

Aus der Klinik und Poliklinik für Haut und Geschlechtskrankheiten  
der Universität Würzburg

Direktorin: Prof. Dr. med. E.-B. Bröcker

**Die Sekretion angiogenetischer Zytokine  
durch menschliche Melanomzellen unter Hypoxie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der  
Bayrischen Julius-Maximilians-Universität  
zu Würzburg

vorgelegt von  
Sebastian Michael Cosmann Köstlin  
aus Großostheim

Würzburg, März 2006

**Referentin** : Prof. Dr. E.B. Bröcker

**Korreferent** : Prof. Dr. C. Wanner

**Dekan**: Prof. Dr. Georg Ertl

**Tag der mündlichen Prüfung** :

**Der Promovend ist Arzt**

<b><u>1. Einleitung</u></b>	1
<b>1.1. Allgemeines</b>	1
<b>1.2. Malignes Melanom</b>	2
<b>1.3. Angiogenese</b>	5
<b>1.4. Angiogenetische Zytokine</b>	7
1.4.1. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	7
1.4.2. Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF)	11
1.4.3. Angiogenin (ANG)	13
1.4.4. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	14
1.4.5. Transforming Growth Factor-Beta (TGF- $\beta$ )	16
<b>1.5. Angiogenetische Chemokine</b>	18
1.5.1. Interleukin-8 (IL-8)	19
1.5.2. GRO-Alpha (Gro- $\alpha$ )	20
1.5.3. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF)	21
<b>1.6. Problemstellung</b>	23
<b><u>2. Materialien und Methoden</u></b>	24
<b>2.1. Gewinnung der Zellüberstände für die Zytokinbestimmung</b>	24
2.1.1. Zellkultur	24
2.1.2. Versuchsaufbau	26
2.1.2.1. Das Ablösen des Zellmonolayers	26
2.1.2.2. Bestimmung der Zellzahl	27
2.1.2.3. Inkubation der Zellen unter entsprechenden Kulturbedingungen	27
2.1.2.4. Verarbeitung der Zellüberstände	28

<b>2.2. Zytokinbestimmung mit Enzym-linked-immunosorbent-Assay (ELISA)</b>	29
2.2.1. Messprinzip	29
2.2.2. Versuchsablauf	30
2.2.2.1. Erstellen der Standardreihe	30
2.2.2.2. Bearbeitung der Mikrotitermessplatte	31
2.2.2.3. Auswertung der Messergebnisse	32
<b>2.3. Endothelzellproliferationsbestimmung</b>	33
2.3.1. Messprinzip	34
2.3.2. Versuchsablauf	34
2.3.2.1. Beschicken der Messplatte	35
2.3.2.2. Auswertung der Versuchsergebnisse	37
<b>2.4. Computerunterstützte Datenverarbeitung</b>	38
<b><u>3. Ergebnisse</u></b>	39
<b>3.1. Wachstumsverhalten verschiedener Melanomzelllinien</b>	39
3.1.a) Melanomzelllinie BLM	39
3.1.b) Melanomzelllinie MV3	40
3.1.c) Melanomzelllinie HT 144	41
3.1.d) Melanomzelllinie WM 115	41
3.1.e) Melanomzelllinie IF6	42
3.1.f) Melanomzelllinie 530	43

<b>3.2. ELISA</b>	44
<b>3.2.1. Veränderungen der Sekretion angiogenetischer Zytokine unter Hypoxie, Reoxigenierung, Serum- und Glukosemangel</b>	44
<b>3.2.1.1. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</b>	45
3.2.1.1.1. VEGF-Sekretion durch Melanomzellen	45
3.2.1.1.2. VEGF-Sekretion durch Melanozyten	47
3.2.1.1.3. VEGF-Sekretion durch Endothelzellen	48
3.2.1.1.4. VEGF-Sekretion durch Fibroblasten	48
<b>3.2.1.2. Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF)</b>	50
3.2.1.2.1. b-FGF-Sekretion durch Melanomzellen	50
3.2.1.2.2. b-FGF-Sekretion durch Melanozyten	52
3.2.1.2.3. b-FGF-Sekretion durch Endothelzellen	52
3.2.1.2.4. b-FGF-Sekretion durch Fibroblasten	53
<b>3.2.1.3. Angiogenin (ANG)</b>	54
3.2.1.3.1. Angiogenin-Sekretion durch Melanomzellen	54
3.2.1.3.2. Angiogenin-Sekretion durch Melanozyten	56
3.2.1.3.3. Angiogenin-Sekretion durch Endothelzellen	56
3.2.1.3.4. Angiogenin-Sekretion durch Fibroblasten	57
<b>3.2.1.4. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)</b>	58
3.2.1.4.1. PDGF-Sekretion durch Melanomzellen	58
3.2.1.4.2. PDGF-Sekretion durch Melanozyten	59
3.2.1.4.3. PDGF-Sekretion durch Endothelzellen	59
3.2.1.4.4. PDGF-Sekretion durch Fibroblasten	60
<b>3.2.1.5. Transforming Growth Factor-Beta (TGF-<math>\beta</math>)</b>	61
3.2.1.5.1. TGF- $\beta$ -Sekretion durch Melanomzellen	61
3.2.1.5.2. TGF- $\beta$ -Sekretion durch Melanozyten	62
3.2.1.5.3. TGF- $\beta$ -Sekretion durch Endothelzellen	62
3.2.1.5.4. TGF- $\beta$ -Sekretion durch Fibroblasten	63

<b>3.2.2. Veränderungen der Sekretion angiogenetischer Chemokine</b>	<b>63</b>
<b>unter Hypoxie, Reoxigenierung, Serum- und Glukosemangel</b>	
<b>3.2.2.1. Interleukin-8 (IL-8)</b>	<b>64</b>
3.2.2.1.1. IL-8-Sekretion durch Melanomzellen	64
3.2.2.1.2. IL-8-Sekretion durch Melanozyten	66
3.2.2.1.3. IL-8-Sekretion durch Endothelzellen	67
3.2.2.1.4. IL-8-Sekretion durch Fibroblasten	67
<b>3.2.2.2. GRO-Alpha (Gro-<math>\alpha</math>)</b>	<b>68</b>
3.2.2.2.1. Gro- $\alpha$ -Sekretion durch Melanomzellen	68
3.2.2.2.2. Gro- $\alpha$ -Sekretion durch Melanozyten	71
3.2.2.2.3. Gro- $\alpha$ -Sekretion durch Endothelzellen	71
3.2.2.2.4. Gro- $\alpha$ -Sekretion durch Fibroblasten	71
<b>3.2.2.3. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF)</b>	<b>72</b>
3.2.2.3.1. GM-CSF-Sekretion durch Melanomzellen	72
3.2.2.3.2. GM-CSF-Sekretion durch Melanozyten	74
3.2.2.3.3. GM-CSF-Sekretion durch Endothelzellen	74
3.2.2.3.4. GM-CSF-Sekretion durch Fibroblasten	75
<b>3.3. Proliferationsassay</b>	<b>77</b>
3.3.1. Proliferationsverhalten von Endothelzellen	77
3.3.2. Einfluss angiogenetischer Zytokine auf die Endothelzellproliferation	78
in vitro	
3.3.2.1. Vascular Endothelial Growth Factor	78
3.3.2.2. Basic-Fibroblast Growth Factor	79
3.3.2.3. Angiogenin	80
3.3.3. Einfluss angiogenetischer Chemokine auf die Endothelzellproliferation	82
in vitro	
3.3.3.1. Interleukin-8	82
3.3.3.2. Gro-Alpha	83

<b><u>4. Diskussion</u></b>	85
<b>4.1. Diskussion der ELISA-Ergebnisse</b>	87
<b>4.1.1. Vergleich der Veränderungen der Sekretion angiogenetischer Zytokine unter Hypoxie, Reoxigenierung, Serum- und Glukosemangel mit Daten aus der Literatur</b>	87
4.1.1.1. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	87
4.1.1.2. Basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF)	91
4.1.1.3. Angiogenin (ANG)	94
4.1.1.4. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	95
4.1.1.5. Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ )	97
<b>4.1.2. Vergleich der Veränderungen der Sekretion angiogenetischer Chemokine unter Hypoxie, Reoxigenierung, Serum- und Glukosemangel mit Daten aus der Literatur</b>	98
4.1.2.1. IL-8	98
4.1.2.2. Gro-Alpha	101
4.1.2.3. GM-CSF	102
<b>4.1.3. Interpretation der ELISA-Ergebnisse</b>	103
<b>4.2. Diskussion der Ergebnisse des Proliferationsassays</b>	106
<b>4.2.1. Vergleich des Einflusses angiogenetischer Zytokine auf das Proliferationsverhalten von Endothelzellen</b>	106
4.2.1.1. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	107
4.2.1.2. Basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF)	108
4.2.1.3. Angiogenin (ANG)	109

<b>4.2.2. Vergleich des Einflusses angiogenetischer Chemokine auf das Proliferationsverhalten von Endothelzellen</b>	110
4.2.2.1. IL-8	110
4.2.2.2. Gro-Alpha	111
<b>4.2.3. Interpretation der Ergebnisse des Proliferationsassays</b>	111
<b><u>5. Abschlussbemerkung</u></b>	115
<b><u>6. Zusammenfassung</u></b>	116
<b><u>7. Tabellenanhang</u></b>	118
Wachstumsverhalten der Melanomzelllinien unter Normalkultur, Hypoxie, Glukose- und Serummangel sowie anschließender Normalkultur	
<b><u>8. Literaturverzeichnis</u></b>	119



## Abkürzungsverzeichnis

In alphabetischer Reihenfolge

<b>Ak</b>	Antikörper
<b>ALM</b>	Akral-lentiginöses Melanom
<b>ANG</b>	Angiogenin
<b>b-FGF</b>	Basic-Fibroblast-Growth-Factor
<b>BrD-U</b>	5-Bromo-2'-deoxy-uridin
<b>BSA</b>	Serumalbumin, bovin
<b>CA</b>	Carcinom
<b>CAM-Assay</b>	ChorioAllantoic-Membrane-Assay
<b>DMSO</b>	Dimethyl-sulfoxid
<b>DNA</b>	DesoxyriboNucleic-Acid
<b>ECM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>EDTA</b>	Ethylen-diamine-tetraacetic-acid
<b>EGF</b>	Epidermal-Growth Factor
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay
<b>FACS</b>	Fluorescence-activated-cell-sorter
<b>FCS</b>	fetales Kälberserum
<b>FGFR</b>	Basic-Fibroblast-Growth-Factor-Rezeptor
<b>Flt</b>	Fms-like tyrosine kinase= VEGF-R1
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor
<b>Gro-<math>\alpha</math></b>	Growth Related Oncogen-Alpha
<b>HBGF2</b>	Heparin Binding Growth factor-2
<b>HDMEC</b>	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
<b>HMEC-1</b>	(nach Ades) immortalisierte humane mikrovaskuläre Endothelzellen
<b>HMW-b-FGF</b>	High molecular weight- basic Fibroblast Growth Factor
<b>HUVEC</b>	Humane Umbilicalvenen-Endothelzellen
<b>ICAM</b>	Inter-Cellular-Adhesion-Molecule-1
<b>IFN-<math>\alpha</math>/-<math>\beta</math>/-<math>\gamma</math></b>	Interferon -alpha/-beta/-gamma
<b>IL-1</b>	Interleukin-1
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>IL-8</b>	Interleukin-8
<b>IL-8RA/B</b>	IL-8-Rezeptor Typ A / B
<b>KDR/ FLK</b>	kinase-insert-domain-containing receptor = VEGF-R2
<b>LAI</b>	leukocyte adhesion inhibitor
<b>LMM</b>	Lentigo-maligna-Melanom
<b>LTBP</b>	Latent TGF- $\beta$ binding protein
<b>MDNCF</b>	Monocyte-Derived Neutrophil Chemotactic Factor
<b>MGSA</b>	Melanocyte growth stimulator factor
<b>MONAP</b>	Monocyte-Derived Neutrophil-Activating Peptide
<b>mRNA</b>	messenger-RiboNucleic-Acid /Ribonukleinsäure
<b>MSH</b>	Melanozyten Stimulierendes Hormon
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NAP-1</b>	neutrophil attractant/ activating protein
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	NuklearFaktor- $\kappa$ B
<b>NM</b>	Noduläres Melanom

<b>PAI-1</b>	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
<b>PBS</b>	Phosphatbuffered-Saline
<b>PGF</b>	Placenta Growth Factor
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonsäure
<b>RNase A</b>	RiboNuklease A
<b>SMC</b>	Smooth muscle cell
<b>SSM</b>	Superfiziell spreitendes Melanom
<b>Stabwn</b>	Standardabweichung
<b>TCF</b>	T-lymphocyte chemotactic factor
<b>Tek</b>	Transmembrane receptor protein tyrosine endothelial kinase
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor-beta
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Transforming Growth Factor-beta
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming-Growth-Factor-beta
<b>Tie</b>	Tunica interna endothelial cell kinase
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor-Necrosis-Factor-alpha
<b>t-PA</b>	tissue-type-Plasminogen-Activator
<b>t-PAR</b>	tissue-type -Plasminogen-Activator-Rezeptor
<b>u-PA</b>	urokinase-like-Plasminogen-Activator
<b>u-PAR</b>	urokinase-like -Plasminogen-Activator-Rezeptor
<b>UVA/-B</b>	Ultra Violette Strahlen A/B
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor = Vascular Permeability Factor (VPF), Vasculotropin
<b>VEGF-R1/2</b>	VEGF-Rezeptor-1/2
<b>VPF</b>	Vascular Permeability Factor

# **1. Einleitung**

## **1.1. Allgemeines**

Die Malignität eines Tumors resultiert aus der Abkopplung der Tumorzellen von normalen Regulations- und Kontrollmechanismen des Zellwachstums und Zellzyklus. Damit erlangen Tumorzellen die Potenz zu unkontrolliertem Wachstum. Die Proliferation normaler Zellen ist abhängig von einer Reihe von Signalen und Faktoren, wie interzellulären Kontakten, vermittelt über spezifische Membranproteine, extrazellulären Matrixproteinen und humoral von Zytokinen.

Malignen Zellen sind dagegen meist nicht nur ihre ursprüngliche Funktion und ihre Sensibilität gegenüber Regulationsinteraktionen verlorengegangen, sondern sie erlangen auch die Fähigkeit, neue und / oder vermehrt Faktoren zu synthetisieren und zu sezernieren. Sie fördern damit entweder direkt, über autokrine Stimulation, oder über Drittzellen (parakrin) ihr eigenes Wachstum. So sind normale Melanozyten in vitro abhängig von diversen Medienzusätzen und benötigen für ihr Wachstum das Zytokin „basic-Fibroblast Growth Factor“ (b-FGF), Melanozyten Stimulierendes Hormon (MSH) und Serum. Melanomzellen als das maligne Pendant von differenzierten Melanozyten können aber ohne die exogene Zugabe dieser Wachstumsfaktoren proliferieren. Im Gegensatz zu normalen Melanozyten produzieren sie oft selbst b-FGF, welches ihr Wachstum fördert (zur Übersicht 1, 2).

Ein weiteres Malignitätskriterium stellt die vaskuläre Versorgung des Tumors dar. Die Fähigkeit zur (Neo-)Angiogenese ermöglicht dem Tumor nicht nur ein schnelles Wachstum über die durch die Diffusion begrenzte Größe hinaus, sondern erhöht gleichzeitig auch das Risiko der Metastasierung (3). Dies wurde erstmalig am Beispiel des kutanen malignen Melanoms beschrieben. Eine erhöhte Gefäßdichte war bei prognostisch eher günstigeren Melanomen geringerer und mittlerer Größe mit kürzeren Überlebenszeiten assoziiert (4,5). Die Induktion einer wachstumsfördernden Neovaskularisation scheint beim malignen Melanom schon frühzeitig und vor der eigentlichen Tumorprogression stattzufinden (6).

Man vermutet, dass angiogenetisch wirksame Zytokine, deren Aktivierung oder Inhibition experimentell über Proliferation und Migration der Endothelzellen

entscheidet, eine Schlüsselfunktion bei der Angiogenese einnehmen. Die Expression des Zytokins „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) in Melanomzellen korrelierte im Tierversuch mit Gefäßneubildung, Tumorstadium und Metastasierung (7).

Alle diese Beobachtungen weisen das maligne Melanom als ein Tumormodell aus, dessen weitere Erforschung zum besseren Verständnis der Pathomechanismen bei der Tumorentstehung dienen und zum Ansatz neuer Therapieprinzipien genutzt werden kann.

## **1.2. Malignes Melanom**

Das maligne Melanom ist ein ausgesprochen bösartiger Tumor mit sehr früher und unberechenbarer Metastasierung, der aus Pigmentzellen der Haut, den Melanozyten, als Abkömmlingen des Neuroektoderms, hervorgeht. Das Melanom der Haut kann in normalen Hautarealen aus einzelnen, im Stratum basale der Epidermis liegenden Melanozyten entstehen, oder in melanozytären Naevi, gutartigen Pigmentzelltumoren. Weitere mögliche Lokalisationen der Melanomentstehung sind die Schleimhäute, die Uvea und die Hirnhäute.

Die Inzidenz des Melanoms ist weltweit steigend und betrifft besonders die hellhäutige, kaukasische Bevölkerung Australiens, Nordamerikas und Nordeuropas (8). Einerseits ist die zu starke UV-Belastung der Haut, vor allem in der Kindheit, als eine der Ursachen für die Melanomentstehung anzusehen (9). Andererseits zeigen der kongenitale Naevus, das Syndrom der dysplastischen Naevi und die familiäre Neigung zur generellen Ausbildung von Naevi die genetische Disposition zum erhöhten Melanomrisiko (10).

Das Melanom erscheint klinisch als unregelmäßig begrenzter, inhomogen pigmentierter Tumor, dessen Färbung von selten völlig pigmentfrei bis tiefbraun oder blauschwarz reichen kann. Das Melanom variiert in der Wachstumsrate und sekundärem Erscheinungsbild, das durch Erosionen, Ulzerationen und Blutungen gekennzeichnet sein kann. In der hellhäutigen Bevölkerung sind bei der Frau vor allem die untere Extremität, beim Mann besonders der Stamm betroffen (10). Bei Asiaten und Afrikanern finden sich Melanome dagegen meist ausschließlich in den weniger pigmentierten Arealen der Handinnenfläche und Fußsohle sowie in Schleimhäuten.

Anhand von Wachstumsverhalten und Lokalisation unterscheidet man klinisch und histologisch vier Melanomtypen:

1. Superfiziell spreitendes Melanom ( SSM )
2. Noduläres Melanom ( NM )
3. Lentigo-maligna-Melanom ( LMM )
4. Akral-lentiginöses Melanom ( ALM )

Die schrittweise Entdifferenzierung und maligne Entartung der Tumorzellen lässt sich gut am Beispiel der Melanomprogression von Melanozyten zum Melanom darstellen. Beginnend mit normalen Melanozyten verläuft die Genese über den dysplastischen Naevus bis hin zum progredient horizontal wachsenden Melanoma in situ. Mit dem Erreichen der vertikalen Wachstumsphase durchbricht das Melanom die Basalmembran des Epithels und hat dann Zugang zu Lymph- wie Blutgefäßen. Dies ermöglicht die Absiedlung und Ausbreitung von Metastasen (11).

Die prognostische Beurteilung des Melanoms erfolgt klinisch anhand des Stadiums und der Lokalisation unter Einbeziehung des Alters und Geschlechts der Patienten. Histologische Prognoseparameter sind die Tumordicke nach Breslow, die Eindringtiefe nach Clark, die Mitoserate, der Nachweis von Tumorulzeration, die Gefäßinvasion und der dann damit häufig verbundene Nachweis von tumorassoziierten Mikroabsiedelungen (Satellitenmetastasen bis 2 cm um den Primärtumor, In-transit-Metastasen in der Haut bis zur ersten Lymphknoten-Station). Bei fortgeschrittenen Stadien kommen noch die Anzahl positiver Lymphknoten, extranodaler Befall, erhöhte Lactat-Dehydrogenase-Spiegel im Serum, Resektabilität und Remissionsdauer hinzu (zur Übersicht 12).

In die derzeit gültige klinische Stadieneinteilung des Melanoms der Haut flossen die wichtigsten dieser Parameter ein und sie wird entsprechend der sechsten Fassung des American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma (AJCC, 13) wie folgt vorgenommen :

- Stadium 0 - Intraepitheliales Melanom / Melanoma in situ*
- Stadium IA - Primärtumor mit maximal 1 mm Durchmesser ohne Ulzeration*
- Stadium IB - Primärtumor mit 1,01 – 2 mm Durchmesser ohne Ulzeration oder  
- Stadium IA mit Ulzeration*
- Stadium IIA - Primärtumor mit 2,01 – 4 mm Durchmesser ohne Ulzeration oder  
- Stadium IB mit Ulzeration*
- Stadium IIB - Primärtumor mit > 4 mm Durchmesser ohne Ulzeration oder  
- Stadium IIA mit Ulzeration*
- Stadium IIC - Primärtumor mit > 4 mm Durchmesser mit Ulzeration*
- Stadium IIIA - mikroskopischer Befall von 1-3 regionären Lymphknoten ohne  
Ulzeration des Primärtumors*
- Stadium IIIB - makroskopischer Befall von 1-3 regionären Lymphknoten ohne  
Ulzeration des Primärtumors oder  
- Stadium IIIA mit Ulzeration des Primärtumors oder  
- Nachweis von Satellitenmetastasen oder in-transit-Metastasen ohne  
Lymphknotenbefall und ohne Ulzeration des Primärtumors*
- Stadium IIIC - makroskopischer Befall von 1-3 regionären Lymphknoten mit  
Ulzeration des Primärtumors oder  
- Befall von mehr als 3 regionären Lymphknoten oder  
- Nachweis von Satellitenmetastasen oder in-transit-Metastasen mit  
Lymphknotenbefall und ohne Ulzeration des Primärtumors*
- Stadium IV - Nachweis von Fernmetastasen*

Als Tumor der Haut ist das Melanom relativ früh einer Diagnostik und Therapie zugänglich. Die Verbesserungen in der Frühdiagnose haben entscheidend zur Senkung der Mortalität um 50% seit den Fünfzigerjahren beigetragen (10).

Die Therapie des Melanoms in den Stadien I – IV besteht in der Exzision des Tumors und der Ausräumung eventuell befallenerer Lymphknoten. Ab einem Tumordurchmesser von 1 mm oder ungeklärtem Lymphknotenstatus wird mittels Szintigraphie der sich primär im Lymphabfluss des Tumors darstellende sogenannte Wächterlymphknoten exzidiert und histologisch untersucht. Bei positivem Befund erfolgt die Lymphadenektomie. Bei Entfernung von Tumoren im Stadium 0 wird ein

Sicherheitsabstand von 0,5 cm, bei Tumoren bis 2mm Durchmesser ein Sicherheitsabstand von 1 cm empfohlen. Bei Tumoren >2mm Durchmesser ist ein Sicherheitsabstand von 2cm anzustreben (14). Im Stadium IV besteht die Therapie in chirurgischer Entfernung einzelner Metastasen oder einer palliativen Chemotherapie bzw. Radiatio bei disseminiertem Befall. Man versucht dann oft eine Mono- oder Kombinationstherapie von Immunmodulatoren wie Alpha-Interferonen oder Interleukin-2 und / oder Chemotherapeutika wie Dacarbazin, Temozolomid, Cisplatin, Bleomycin, Vindesin oder Vincristin. Die Ansprechraten dieser Regime liegen bei maximal 40-50% (12,14,15,16).

Therapieansätze mittels Gentransfer zeigten erste Erfolge. Eine Phase I-Studie an einer Kohorte von 20 Patienten mit IFN- $\gamma$ -Gen transfizierten Melanomzellen zeigte, dass nach Inaktivierung und Injektion solcher Tumorzellen von den 13 Patienten, die das Behandlungsprotokoll beendeten, 8 Patienten Antikörper gegen ihr Melanom entwickelten und bei 2 Patienten eine Regression erreicht werden konnte (17).

Einen weiteren erfolgversprechenden Ansatz in der Antitumorthherapie könnte die Wachstumsblockierung des Melanoms durch Antikörper gegen Angiogenesefaktoren darstellen. So zeigten Tierversuche, dass Behandlung mit Antikörpern gegen VEGF (18,19), b-FGF (20) und Angiogenin (21) einen Arrest von rapide wachsenden Tumoren in vivo induziert, die Tumorzellen in vitro aber nicht beeinflusst. Diese Befunde verdeutlichen die Rolle der Angiogenese bei der Tumorprogression und verleihen der Forderung nach einem tieferen Verständnis für die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen Nachdruck.

### **1.3. Angiogenese**

Der Begriff Angiogenese wurde erstmals im Zusammenhang mit der plazentaren Gefäßneubildung definiert (22). Sie hat bei vielen physiologischen Vorgängen, wie während der Entwicklung, im Ablauf des weiblichen Zyklus und bei der Wundheilung, aber auch im Rahmen pathologischer Prozesse im menschlichen Körper große Bedeutung.

Die einzelnen Schritte während der Angiogenese und ihre Regulation sind erst in den Ansätzen geklärt. Das Prinzip der Bildung neuer Gefäße besteht vereinfacht aus einem

primären, enzymatischen Abbau der Gefäßbasalmembran und der extrazellulären Matrix, dem Auswandern von Endothelzellen in Richtung des auslösenden Stimulus und schließlich ihre Proliferation mit der Ausbildung neuer Gefäßtubuli (23).

Wichtig für eine geregelte Gefäßneubildung ist auch die zeitliche Abfolge bzw. das Zusammenspiel entsprechender Faktoren, die eine koordinierte Aktivierung und Regulierung der angiogenetischen Genantwort bewirken.

Unter physiologischen Bedingungen ist dieser Prozeß stark reglementiert und zeitlich begrenzt. Bei Entzündungen führen Entzündungszellen über Einwanderung und Reaktion mit dem Gewebe zu Gefäßneubildungen. Paradigmatisch hierfür ist die rheumatische Arthritis, bei der eine Korrelation zwischen Gefäßdicke und eingewanderten Mastzellen besteht (zur Übersicht siehe 24).

Ungeordnete Gefäßbildung führt zu Blutungen, destrukturierender Invasion im Gewebe (25) und hat Auswirkungen auf Wachstum und Metastasierung von Tumoren (26).

Ausgehend von klinischen und experimentellen Daten hat man in den letzten Jahren versucht, die Rolle der Angiogenese für verschiedene Tumoren zu charakterisieren. In diversen Tierversuchsmodellen erscheint das Tumorwachstum primär langsam und bei fehlender Neubildung von Gefäßen limitiert (27). Es nimmt jedoch nach Anschluss an die Blutversorgung nahezu exponentiell zu. Obwohl nicht nur maligne Tumore die Fähigkeit besitzen, Angiogenese zu initiieren, hat sie bei diesen besondere Bedeutung, da sich mit Zunahme von Gefäßneubildungen die Gefahr der hämatogenen Streuung und Metastasierung erhöht (3,26).

Als wichtiger Auslösemechanismus wird der Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen angesehen (28). Abseits der unkontrolliert wachsenden Gefäßneubildungen herrscht in den zentralen Tumorarealen mit ihrer wenig organisierten Struktur und vermindertem Stoffwechsel steter Versorgungsmangel für die Stromazellen und die sich rasch vermehrenden Tumorzellen.

In der Literatur wird von einer erhöhten Sekretion angiogenetisch wirksamer Zytokine durch Glioblastomzellen und Fibroblasten als Reaktion auf Hypoxie oder Glucosemangel bei in vitro-Experimenten berichtet (29,30,31). Zudem zeigten Experimente eine Zunahme der Endothelzellproliferation unter Hypoxie in vitro (32). Die Beobachtungen bestärkten die Hypothese, dass sich hypoxische Tumorzellen in



vivo ihren eigenen Gefäßanschluß mittels Angiogenesefaktoren verschaffen können (33).

Diese Zytokine können sowohl direkt, wie für basic-Fibroblast-Growth-Factor (b-FGF) oder Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) beschrieben (7,25), oder indirekt, was für Interleukin-8 (IL-8), Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) oder Angiogenin angenommen wird (25,34,35), zu Neovaskularisation führen. Es wird vermutet, dass die indirekte Wirkung über Interaktionen mit Drittzellen erfolgt, die wiederum direkt oder über Veränderungen der extrazellulären Matrix Endothelzellen stimulieren und so die Gefäßneubildung anregen.

Im folgenden sollen die in der vorliegenden Studie untersuchten angiogenetischen Zytokine VEGF, b-FGF, Angiogenin, PDGF und TGF- $\beta$  sowie die angiogenetischen Chemokine IL-8, Gro- $\alpha$  und GM-CSF, kurz unter besonderer Berücksichtigung auf ihre Funktion während der Angiogenese, in der Haut und in Tumoren beschrieben werden.

## **1.4. Angiogenetische Zytokine**

### **1.4.1. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF, Vascular Permeability Factor (VPF), Vasculotropin)**

Einer der ersten in diesem Zusammenhang bekannt gewordenen Angiogenesefaktoren ist der Vascular Permeability Factor (VPF). Er erhielt seinen Namen aufgrund seiner zuerst beschriebenen Wirkung, die Gefäßdurchlässigkeit zu steigern. Unabhängig davon beobachtete man die mitogene Wirkung eines 34-46kDa großen homodimeren Glykoproteins selektiv (36) auf Endothelzellen und nannte diese Protein Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oder Vasculotropin (37,38,39,40). Nach molekularer Charakterisierung erwiesen sich die Zytokine später in ihrer Aminosäuresequenz als identische Proteine (41).

VEGF besitzt eine zu ca. 20% identische Aminosäuresequenz mit A- und B-Ketten des PDGF (42,43,44) sowie zu 53% (45) mit dem Placenta Growth Factor.

Das VEGF-Gen besteht aus acht Exonen (46) und scheint essentiell für die Embryogenese. Die heterozygote Inaktivierung führt zu diversen Missbildungen und

schließlich zum Absterben des Feten (47). Das Gen kodiert VEGF je nach Sequenzkombination in fünf verschiedenen Aminosäurelängen. Die VEGF<sub>165</sub>-Form ist dabei die häufigste gegenüber den 121, 145, 189 und 206 Aminosäuren enthaltenden Polypeptiden (41,48) und nach Ferrara et al. ist VEGF<sub>165</sub> die in den meisten Geweben vorherrschende Isoform (49).

Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich in ihrem biologischen Verhalten bezüglich ihrer Bindungsfähigkeit an Heparin und Heparansulfat enthaltenden Proteoglykanen, welche dem VEGF<sub>121</sub> bezüglich des Heparins fehlt (50,51) und bei den übrigen Formen mit steigender Aminosäurezahl zunehmend stärker ausgeprägt ist (52). Diese ermöglicht VEGF<sub>165</sub>, im Gegensatz zu VEGF<sub>121</sub>, nach Oxidationsschäden trotzdem noch eine Rezeptorbindung einzugehen (51). Nach der Sekretion sind VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> bis zur Rezeptorbindung oder Inaktivierung frei löslich, während VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> vor allem in der extrazellulären Matrix oder an der Zelloberfläche gebunden vorliegen. Von dort kann VEGF durch Heparinasen und Plasmin freigesetzt werden. Bei der Abspaltung geht die Bindungsdomäne zu Heparin verloren, und VEGF kann als verkürztes Peptid wieder aktiv werden (53). An Heparansulfat-Proteoglykane gebundenes VEGF<sub>189</sub> setzt extrazellulärmatrixgebundenes b-FGF frei und fördert somit indirekt Angiogenese (54).

VEGF-mRNA findet sich in diversen Zelltypen (u.a. in Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen, Perizyten oder Keratinozyten (31,55,56,57)), wie auch in Tumorzellen des Oesophagus (58), des Glioms (59,60), des Meningeoms (61) oder des Melanoms (27,62). Durch die Reize Hypoxie, UV-B-Strahlen, Entzündungen, Verletzungen oder durch Tumorwachstum entstehender Sauerstoff- und Nährstoffmangel wird VEGF vermehrt von den betroffenen Zellen synthetisiert und sezerniert (29,30,62,63,64,65,66,67,68). Unter Hypoxie verlängert sich die Halbwertszeit von VEGF-mRNA. Reoxigenierung zeigt bei malignen Zellen ein langsames Abnehmen des Effektes, bei normalen Zellen geht die mRNA rasch auf den Basalwert zurück (69,70).

VEGF ist vor allem in den direkten Randgebieten mangelversorgter Geweberegionen nachzuweisen (71). Entsprechend führt es in Nachbarschaft nekrotischer Tumorareale von Melanommetastasen zu einer verstärkten Gefäßneubildung bzw. -einsprossung (30,65,72,73). Die Expression bzw. Sekretion von VEGF kann durch spezifische

Zytokine bzw. Faktoren (TGF- $\beta$ , b-FGF, PDGF-BB, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, TGF- $\alpha$  und EGF) oder Phorbolster in einigen Zielzellen induziert bzw. verstärkt werden. Nachgewiesen werden konnte das für Fibroblasten, Keratinozyten, glatten Gefäßmuskelzellen oder Endothelzellen sowie für Tumorzellen des Glioms und Melanoms (31,56,60,74,75,76,77,78,79,80).

Die von VEGF hervorgerufene Steigerung der Gefäßpermeabilität ist um einen Faktor von 50.000 höher als die von Histamin (7). Es wird vermutet, dass dieser Effekt die Abscheidung von Fibrin in die Extrazellulärmatrix initiiert (18,81). Daraufhin würde die von VEGF in vitro und in vivo vermittelte Stimulation der Mitogenität und Migration bei Endothelzellen erleichtert und die Gefäßeinsprossung bzw. -neubildung begünstigt (7,27,43,72,82,83). Dabei bestehen für letztere in vitro überadditive Synergismen mit b-FGF bzw. Hyaluron-Oligosacchariden (84,85).

Die Rolle von VEGF bei der Induktion der Plasminogen-Aktivatoren vom Gewebe- und Urokinasetyp (t-PA und u-PA), sowie des u-PA-Rezeptors (u-PAR) und des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) ist für humane Endothelzellen strittig. Eine neuere Studie zeigt eine VEGF abhängige Induktion von u-PAR in mikro- und makrovaskulären Endothelzellen sowie eine Proteaseninduktion in mikrovaskulären Endothelzellen (37,86,87,88). Eine weitere VEGF Wirkung auf mikrovaskuläre Endothelzellen besteht in der Reduktion nährstoffmangelbedingter Apoptose (89).

Auf Monozyten wirkt VEGF chemotaktisch (90) und kann somit durch Drittzellen zusätzlich die Gefäßversorgung bzw. das Tumorwachstum fördern.

Wie bei Mamma- und Magencarcinom korreliert hohe VEGF-Expression auch beim Melanom mit schlechter Prognose, erhöhter Gefäßzahl bzw. aggressiver Gefäßanomalie der Tumore und Metastasierung (91,92,93,94).

Die Blockade VEGF-induzierter Angiogenese durch Antikörper (AK) gegen VEGF oder Bindungsantagonisten wandelt schnell wachsende Tumoren in ruhende Zellkolonien bzw. reduziert deutlich deren Wachstum und Vaskularisation in vivo (19,95). Ebenso senken Anti-VEGF-Ak die Gefäßpermeabilität in Glioblastom und Adenocarcinom, nicht aber im Melanom (47). Die Ausschaltung der FLK-1-Rezeptoren in Endothelzellen wirkt hemmend auf deren Migrations- und Kapillarbildungsvermögen in

vitro sowie das Tumorwachstum und die Metastasenbildung von Melanom und Lungen-CA in vivo (96,97).

Je nach Molekülgröße bindet VEGF an vier mögliche Tyrosinkinase-Rezeptor-Typen : fms-like tyrosine kinase (Flt-1-4 oder VEGF-R1), kinase-insert-domain-containing receptor (KDR/ FLK oder VEGF-R2), Tie und Tek. Die Rezeptortypen kommen hauptsächlich auf Gefäßendothelzellen (98), aber auch auf Melanomzellen (99) vor. Unter normalen Bedingungen werden sie, abgesehen von stark vaskularisierten Organen wie Niere oder Herz, nicht oder nur geringgradig exprimiert (100). In malignen Tumoren zeigen Endothelzellen eine erhöhte Anzahl von VEGF-Rezeptoren vom KDR-, Flt-1- und Tie-Typ (59,71). Unter Hypoxie variiert z.T. die Expression der einzelnen Rezeptortypen in Endothelzellen zu der unter Normalbedingungen (32,63,101). Soker et al. konnten bei Endothelzellen und einigen Tumorzellen einen VEGF<sub>165</sub>-spezifischen Corezeptor, das Neuropilin-1 identifizieren. Dieser verstärkte die KDR-abhängigen Zellreaktionen auf VEGF. Ein noch weniger bekannter Corezeptor ist das Neuropilin-2 (80).

Mikrovaskuläre Endothelzellen (H(D)MEC) exprimieren in vitro unter Normalbedingungen vor allem VEGF-Rezeptoren-mRNA vom KDR-Typ und kaum vom Flt-1-Typ. Unter Hypoxie kehrt sich das Verhältnis um, die mRNA von Flt-1 wird hochreguliert, wohingegen die von KDR stark abnimmt (63). Allerdings ergibt sich nach Hypoxie keine Zunahme einer VEGF-Bindung an HMEC (101). In Biopsien entzündlicher Läsionen wurde eine deutliche Expressionszunahme für beide Rezeptortypen in HDMEC festgestellt (67).

Makrovaskuläre Endothelzellen (HUVEC) exprimieren beide Rezeptortypen. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten bei in-vitro-Versuchen, dass hypoxische Bedingungen unterschiedliche Rezeptorverhältnisse hervorriefen. Konnten Nomura et al. keine Veränderungen in deren Verhältnis unter Hypoxie feststellen (32), zeigten die Ergebnisse anderer Untersucher einmal eine Flt-1-Zunahme (102) andererseits eine KDR-Zunahme bei HUVEC unter Sauerstoffmangel (101,103).

Mit Hilfe eines Mediums, das von kultivierten Myoblasten unter Hypoxie gewonnen wurde, ließ sich eine unabhängige, von bekanntermaßen durch Wachstumsfaktoren (d.h. TNF, b-FGF, TGF-β) ausgelöste, Stimulation der KDR-Expression und deren VEGF-

Bindungsfähigkeit bei Endothelzellen feststellen. Diese VEGF-KDR-Bindung nahm trotz Zugabe von VEGF-Antikörpern bei HUVEC noch zu (101).

Für Flt-1 konnte eine VEGF-induzierbare Zunahme der Rezeptorexpression in Endothelzellen nachgewiesen werden (104,105).

#### **1.4.2. Basic Fibroblast Growth Factor ( b-FGF / FGF2 / HBGF2 )**

Basic-Fibroblast Growth Factor wurde 1973 erstmals als Bestandteil von Hypophysenextrakt und als Mitogen für 3T3-Fibroblasten beschrieben (106). 1974 wurde das Polypeptid (18-24 kDa) Fibroblast Growth Factor (FGF) benannt und aufgrund seines kationischen Charakters in Abgrenzung zum später entdeckten acidic-FGF (Isoelektrischer Punkt bei pH 5,6) als basic-FGF bezeichnet. Sieben weitere zur FGF-Gruppe gehörende Wachstumsfaktoren wurden in den folgenden Jahren entdeckt, so dass man heute die Familie der „Fibroblast Growth Factors“ in einer numerischen Nomenklatur, von FGF-1 bis FGF-9, einteilt, wobei b-FGF FGF2 entspricht (zur Übersicht s.107). Aufgrund der Fähigkeit einiger FGFs, an Heparin zu binden, wurde b-FGF auch zeitweilig als Heparin Binding Growth factor-2 (HBGF2) bezeichnet (107,108). Dieser Begriff setzte sich allerdings nicht durch, da nicht nur FGFs an Heparin binden. Das Synonym b-FGF soll in dieser Arbeit beibehalten werden.

B-FGF kommt in vielen Gewebearten vor. Er wurde in Nieren-, Nebennieren-, Hirn- und Myometriumgewebe, in Neuronen des ZNS, in Epithelzellen des Kolons, der Bronchien und des Endometriums sowie in Makrophagen und im Plasma nachgewiesen. Die Freisetzung von b-FGF erfolgt wahrscheinlich über Exozytose (109,110) und als Folge von Zellschädigung bzw. -untergang (107,111). Das 24 kDa große, sogenannte „high molecular weight“ b-FGF (HMW-b-FGF) wirkt wohl intrazellulär und findet sich im Gegensatz zu dem häufigsten, 18 kDa großen b-FGF nicht im endoplasmatischen Retikulum, sondern im Nukleus. Entsprechend scheinen die vermittelten Effekte Rezeptor-unabhängig (112). Nach der Freisetzung wird b-FGF in der extrazellulären Matrix gespeichert. Durch die Bindung an Heparin oder Heparansulfat wird es biologisch aktiviert (113) und vor Denaturierung durch Proteasen oder Säuren geschützt (114).

Die Bindung von b-FGF an Heparansulfat ermöglicht erst bzw. verstärkt die Bindung an den Rezeptor an der Zelloberfläche (113,115,116,117), welcher die Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes folgt. B-FGF bindet an vier ähnliche Rezeptoren, die zur Gruppe der Tyrosinkinase gehören und in FGFR1 – 4 eingeteilt werden. Synonym für FGFR-1 und FGFR-2 werden die Rezeptoren auch flg-1 bzw. bek genannt. Des Weiteren gibt es noch zwei weitere, aber strukturell unterschiedliche FGF-Rezeptoren; den sogenannten „cystinreichen Typ“ und den E-selectin-Liganden. Beider Funktion ist jedoch bisher unbekannt (118,119). Das basalmembranständige Proteoglycan Perlecan fördert die b-FGF-Rezeptorbindung und wird als möglicher „low-affinity“-Rezeptor für b-FGF angesehen (120).

Rezeptorstimulation bei Endothelzellen durch b-FGF erhöht unter anderem die gleichen Transkriptionsregulationsproteine wie unter Einwirkung von VEGF (88). Grund hierfür ist, dass in vitro wie in vivo b-FGF in Endothelzellen die VEGF-Expression steigert, VEGF also auch ein sogenannter „downstream mediator“ von b-FGF ist (76).

In Endothelzellen verringert b-FGF spezifisch die Expression von ICAM-1 und -2, auch wenn diese vorher durch TNF- $\alpha$  induziert wurden, und wirkt somit hemmend auf die Leukozytenadhäsion und eventuell die Emigration von CD4<sup>+</sup>-Zellen (121). Der Einfluss von Interferon- $\alpha$  und - $\beta$  verringert jeweils die b-FGF-Expression in diversen humanen Malignomzellen (122). Für HUVEC hingegen zeigte sich in vitro unter Interferon- $\alpha$  eine Zunahme der b-FGF-Expression und durch Interleukin-2-Zugabe wurde das b-FGF dann freigesetzt und führte zu gesteigerter Zellproliferation (123).

Die Anzahl der u-PAR nimmt unter b-FGF zu (124). In vitro fördert b-FGF die Tubulusbildung von Endothelzellen (125) und spielt demzufolge eine wichtige Rolle bei der Angiogenese. Es leitet nicht nur Veränderungen in der Bindegewebsstruktur ein, induziert und erhöht die Chemotaxis, sondern erleichtert auch die Proliferation von Endothelzellen. Im Zusammenspiel mit den Zytokinen VEGF und Angiogenin in vitro (126), aber nicht in vivo (127), verstärken sich die Effekte des b-FGF auf die Proliferation und Tubulusbildung von Endothelzellen wie auch die u-PAR-Anzahl (124). Ein wichtiger Aspekt ist hierbei die sich durch endogen sezerniertes b-FGF selbstunterhaltende Endothelzellproliferation, die via Antikörper gegen b-FGF gehemmt werden kann (126).

Die Wirkung des b-FGFs ist jedoch im Gegensatz zu VEGF nicht nur oder hauptsächlich auf die Gefäßendothelzellen ausgerichtet. Sie erfasst auch viele Zelltypen neuroektodermalen und mesodermalen Ursprungs. So stimuliert das Wachstum von glatten Muskelzellen, Gliazellen und Fibroblasten (120,128,129,130). Durch Chemotaxis wirkt b-FGF auf Fibroblasten, Astroglia und Endothelzellen migrationsfördernd (107 zur Übersicht,129,131,132). In vitro senkt b-FGF die Kollagenproduktion und erhöht die Bildung von Kollagenase durch Fibroblasten und führt so zu Veränderungen der extrazellulären Matrix (107,133,134,135).

In Neoplasien ist b-FGF meist als Produkt der Stromazellen, d.h. Fibroblasten und Endothelzellen vorhanden (107). Eine Ausnahme bildet das maligne Melanom, bei dem auch Tumorzellen stets b-FGF exprimieren. Diese Tatsache ist von großem Interesse, weil normale Melanozyten nicht (107,136,137,138,139) bzw. nur in geringem Maße b-FGF sezernieren (140). In Melanozyten von Naevi ist b-FGF nachweisbar (2). Im Gegensatz zu normalen Melanozyten ist die Abhängigkeit des in-vitro-Zellwachstums von b-FGF bei Naevusmelanozyten kaum noch oder gar nicht mehr vorhanden (11). Trotzdem ist b-FGF ein autokriner Wachstumsfaktor für Melanomzellen. Dies konnte durch Anti-b-FGF-Antikörper bzw. Antisense-b-FGF vermindertes Melanomzellwachstum und verhinderte Tumorangiogenese dargestellt werden (141,142). Entsprechend weisen sowohl normale Melanozyten als auch Melanomzellen b-FGF-Rezeptoren auf (143).

Hypoxie regt Makrophagen und Endothelzellen (130), nicht aber Fibroblasten zu einer Sekretionssteigerung von b-FGF an (144). Endothelzellen reagieren auf Sauerstoffmangel zusätzlich mit einer erhöhten FGFR-1-, nicht aber FGFR-2 -Bildung (144).

### **1.4.3. Angiogenin ( ANG )**

Angiogenin ist der erste humane Angiogenesefaktor, der ursprünglich im Medium von Tumorzellen, nämlich des Adenocarcinoms HT-29 des Kolons, entdeckt wurde. Später wurde Angiogenin in humanem Plasma (145), in Fibroblasten und Lymphozyten sowie normalen Kolonepithelzellen nachgewiesen. Die weitere Charakterisierung ergab ein aus 123 Aminosäuren bestehendes, 14,2 kDa großes Protein (146,147). Angiogenin

besitzt eine 35%ige Homologie mit der pankreatischen Ribonuklease A (RNase A) und gehört wie diese zur Superfamilie der RNasen.

ANG bindet über membranständiges  $\alpha$ -Aktin an Endothelzellen (126,148,149,150). Über eine teilweise Dissoziation des Aktin-Angiogenin-Komplexes kommt es zu einer schnelleren Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin über den gewebständigen Plasminogen-Aktivator (t-PA) einerseits und einer Aufhebung der Plasmin-inhibierenden Wirkung des Aktins. Dadurch wäre die Möglichkeit einer Plasmin-vermittelten Aktivierung verschiedener Proteasen wie des Plasminogen-Aktivator-Systems gegeben. In vitro Versuche zeigten eine deutliche Stimulation fibrinolytischer Eigenschaften von Endothelzellen (151). In Endothelzellen aktiviert Angiogenin die Enzyme Phospholipase A<sub>2</sub> und C (152,153). Durch die damit verbundene Denaturierung der extrazellulären Matrix und der Basalmembran unterstützt Angiogenin, wie b-FGF und VEGF, die Migration von Endothelzellen und wirkt angiogenetisch (151,152). Die ANG-Bindung wird durch Anionen wie Kupfer verstärkt (154).

Diese Ergebnisse wurden in vivo durch eine Angiogenin-induzierte Migration von Endothelzellen, Tubulusstrukturbildung und generelle Gefäßneubildung bestätigt (127,147,155). In vitro ließ sich eine dosisabhängige Zunahme der Proliferation von Endothelzellen unter der Zugabe von Angiogenin nachweisen (126,156,157). Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass die auch durch die Zytokine b-FGF und VEGF induzierte Endothelzellproliferation von Angiogenin moduliert wird (158).

Über die beschriebenen Einflüsse auf die Angiogenese hinaus zeigte durch systemische Entzündungsreaktionen freigesetztes Angiogenin eine bakterizide wie fungizide Wirkung (159).

Des weiteren ist Angiogenin ein wirksames Adhäsionsmolekül für Tumorzellen. Es erleichtert möglicherweise die Metastasierung (160) und das Tumorwachstum, das experimentell über Angiogenin-Inhibition vermindert werden konnte (21,161,162).

#### **1.4.4. Platelet Derived Growth Factor (PDGF)**

PDGF wurde erstmalig im Serum als Mitogen identifiziert (163). Das Fehlen im Plasma resultiert aus seiner Freisetzung aus Granula aktivierter Thrombozyten bei der Blutgerinnung. PDGF liegt nicht als einheitliches Molekül, sondern in drei



verschiedenen Isoformen vor. Diese werden aus der Kombination der beiden Peptidketten, den sogenannten A- und B-Ketten, gebildet. Die resultierenden PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB sind alle natürlich vorkommende Zellprodukte mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa (164). Viele Zelltypen sind potentielle Produzenten der einen oder anderen PDGF-Isoform. So findet sich PDGF-BB in Endothelzellen (165), Kolonkarzinomzellen (166) und Glioblastom (167), während Keratinozyten nur PDGF-A-Ketten enthalten (168). Normale Melanozyten exprimieren entweder –wie in den meisten Fällen –gar keine PDGF-mRNA, oder aber lediglich die für PDGF-A (136,138). Im Gegensatz dazu besitzen einige Melanomzelltypen die Potenz, beide Ketten zu synthetisieren und weisen zudem noch den PDGF-Rezeptor vom  $\alpha$ -Typ auf (138,169,170,171). Dieser bindet alle drei Isoformen des PDGF hochaffin und findet sich darüber hinaus auf Fibroblasten sowie auf Gliomzellen (172). Hingegen ist der für PDGF-BB hochaffin bindende  $\beta$ -Rezeptor auf Myofibroblasten (173), Gefäßendothelzellen (165,167,174) und Monozyten lokalisiert.

In Melanomzellen ist die Expression von PDGF-R durch Interferone induzierbar bzw. verstärkbar (169). Über Aktivierung einer Tyrosinkinase werden in der Zielzelle die Antworten auf die PDGF-Rezeptorbindung vermittelt. Auf Endothelzellen wirken PDGF-AB und -BB in vitro wie in vivo direkt chemotaktisch und proliferativ und zumindest indirekt gefäßneubildend (144,168,175,176,177,178,179). Im Gegensatz zu den angioproliferierenden Zellen produzieren nicht reagiblen, PDGF- $\beta$ -Rezeptor negative, makrovaskuläre Endothelzellen PDGF-BB (165).

Für Melanomzellen stellt PDGF ein chemotaktisches Agens dar (180), das trotz zelleigener  $\alpha$ -Rezeptoren unter Serumangel (bis 2%) keine direkte Wachstumsstimulation bewirkt (136,175,180). In Kombination mit 10% serumhaltigem Medium wirkt PDGF-AA auf Melanomzellen proliferativ und führt zu einer autokrinen Induktion der PDGF-Produktion (181). Furuhashi et al. zeigten, dass Melanomzellen mit ihrer PDGF-BB und –DD-Sekretion über ein vermehrtes Perizytenrecruitment indirekt das eigene Tumorwachstum förderten (182).

Bei Bindegewebszellen, d.h. Fibroblasten, wirkt PDGF stimulierend auf die Produktion von Insulin-like-Growth-Factor-1, welches wiederum das Wachstum und die Migration von Melanomzellen erhöht (183). Auch erhöht PDGF die VEGF-Sekretion von glatten

Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten (77,184). Zusätzlich wirkt es auf letztere chemotaktisch und mitogen. Da diese Zellen selbst PDGF produzieren, spricht man bei ihnen auch von „autokrinen Loop“. Dabei verstärken sie über die PDGF-angeregte Sekretion von Botenstoffen synergistisch die PDGF-eigene Wirkung auf Endothelzellen und Melanomzellen (179,180).

Unter Sauerstoffmangel zeigen Makrophagen, im Gegensatz zu Fibroblasten und glatten Muskelzellen eine Zunahme der PDGF-Sekretion (144). Im Tierversuch führt Hypoxie in diversen Organgeweben zu keinen Veränderungen der PDGF-Gen-Expression (185).

#### **1.4.5. Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ )**

TGF- $\beta$  wurde erstmals aus einer Melanomzelllinie isoliert und als ein die Zellmorphologie und -haftung verändernder Faktor für Fibroblasten beschrieben (186). Seitdem wurden sechs weitere TGF- $\beta$ -Isoformen entdeckt, wobei TGF- $\beta$ 1 den erstbeschriebenen Prototyp der Zytokinfamilie darstellt. TGF- $\beta$  besteht aus zwei identischen Proteinketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind und ein 25kDa großes Molekül bilden.

TGF- $\beta$  stellt nur für wenige, meist mesenchymale Zellen einen potenten Wachstumsfaktor dar, ist aber für viele, v.a. epitheliale und neuroektodermale Zellen, darunter Endothelzellen, glatte Muskelzellen der Gefäße, normale Melanozyten und sogar einige Melanomzellen, ein potenter Wachstumsinhibitor (187,188,189,190). Dabei zeigt sich ein mit steigender Malignität einhergehender Verlust dieser Inhibition (191).

TGF- $\beta$  wird von sehr vielen verschiedenen Zellen, u.a. Monozyten (192), einigen normalen Melanozyten und Melanomzellen (138,191) in einer sogenannten latenten Form synthetisiert und sezerniert. In der extrazellulären Matrix wird TGF- $\beta$  an „Latent TGF- $\beta$  binding protein“ (LTBP) gebunden. Durch Plasmin, Thrombospondin, Glycosidasen oder extreme pH-Werte, wie sie bei Verletzungen entstehen können, wird das aktive TGF- $\beta$  aus dem LTBP abgespalten (190 Tab.1) und beschleunigt dann die Wundheilung (193,194). Hochmaligne, TGF- $\beta$ -resistente Melanome sezernieren auch aktives TGF- $\beta$  (191).

Das aktivierte TGF- $\beta$  bindet an drei Arten von Rezeptoren, die meist parallel auf den Zielzellen vorhanden sind. Die Typen I und II sind Serin-Threonin-Kinasen und interagieren miteinander. Sie binden beide TGF- $\beta$  unabhängig voneinander, können aber ohne Komplexbildung mit dem jeweils anderen Rezeptor keine 100%ige Signaltransduktion erreichen (190,195). Der Typ III-Rezeptor ist ein Chondroitin- und Heparansulfat-Proteoglykan, auch Betaglykan genannt. Auch er bindet TGF- $\beta$  im nanomolaren Bereich, besitzt aber keine Signalstruktur, sondern erleichtert die Bindung von TGF- $\beta$ 1 an den Typ II-Rezeptor (196).

Die durch TGF- $\beta$  ausgelöste Wachstumsstimulation für mesenchymale Zellen scheint auf einer kaskadenartigen Induktion weiterer Wachstumsfaktoren zu beruhen. So induziert TGF- $\beta$  in Fibroblasten sowohl die Genexpression für PDGF, PDGF-Rezeptoren, b-FGF wie auch für VEGF (184,190,197,198). Letzteres wird unter Hypoxie noch verstärkt (184).

Bei niedrig- und hochmalignen Melanomzellen steigert TGF- $\beta$ 1 die Bildung von Kolonien. Außerdem stellt es für die niedrigmalignen Melanomzellen einen mitogenen Faktor dar (199). Im Widerspruch zu diesen Daten zeigten die Melanomzellen auf TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2, sofern sie TGF- $\beta$ -Rezeptoren besaßen, ein gehemmtes Wachstum (136,188). TGF- $\beta$ 2 besitzt wie TGF- $\beta$ 1, eine mit der Metastasierungspotenz abnehmende inhibitorische Potenz (200). Außerdem wurde für TGF- $\beta$ 2 eine Korrelation zwischen mRNA-Expression und Melanomprogression festgestellt (201). Krasagakis et al. fanden bei Patienten mit disseminiertem Melanombefall erhöhte Serumlevel von TGF- $\beta$  (202). In der Genese des Colon-Carcinoms unterdrückt TGF- $\beta$ 1 die Schleimhautendifferenzierung von der Hyperplasie zur Dysplasie (203).

TGF- $\beta$ 1 inhibiert *in vitro* auch die Proliferation von Endothelzellen großer und kleiner Gefäße sowie von glatten Gefäßmuskelzellen (SMC), während TGF- $\beta$ 2 die Proliferation makrovaskulärer Endothelzellen nicht beeinflusst. Auch die Migration dieser Zellen wurde von TGF- $\beta$ 1 stärker inhibiert als von TGF- $\beta$ 2. Demgegenüber steigert TGF- $\beta$ 1, nicht aber TGF- $\beta$ 2, die Migration der SMC. Beide TGF- $\beta$ -Isoformen haben keinen Einfluß auf die Migration von mikrovaskulären Endothelzellen, beeinträchtigten aber die von Monozyten und Fibroblasten. In niedrigen Konzentrationen stimuliert TGF- $\beta$ 1 die Ausbildung tubulärer Strukturen durch mikrovaskuläre Endothelzellen in Kollagen-

Gelkultur. Dabei weist TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu TGF- $\beta$ 2 eine zehnmal höhere Induktion der Angiogenese auf. Höhere Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 scheinen einen negativen Effekt auf die Gefäßneubildung *in vitro* zu haben. (187,189). Dass TGF- $\beta$  *in vivo* angiogenetisch bzw. regulatorisch auf Gefäßneubildungen wirkt, wird zudem auf seine stimulierende Wirkung auf die Synthese von Plasminogen-Aktivatoren (PA) und PA-Inhibitoren zurückgeführt. Im Besonderen scheint hier die, im Gegensatz zum b-FGF inhibitorisch gewichtete, zeitlich versetzte Wirkung auf die Gewebsproteasen von Bedeutung zu sein (204,205,206) und die Höhe der TGF- $\beta$ -Konzentration. Hohe TGF- $\beta$ -Spiegel wirkten inhibitorisch, niedrige dagegen stimulierend auf die Angiogenese (112). Dies geschieht *in vitro* auch über eine konzentrationsabhängige Ab- oder Zunahme der b-FGF-vermittelten Endothelzellreaktion (204,207). Ein weiterer Grund für die angiogenetische Wirkung könnte die Induktion angiogenetischer Zytokine in Monozyten sein. Diese reagieren auf TGF- $\beta$ 1+2 unter anderem mit einer Zunahme der Expression von b-FGF, PDGF und wiederum von TGF- $\beta$ 1 (192). Serummangel und Hypoxie bewirken in Fibroblasten eine Verringerung bzw. Steigerung der TGF- $\beta$ 1-Synthese. Dabei überwiegt der durch Sauerstoffmangel induzierte Effekt über den, der durch Serummangel ausgelöst wird. Nach Reoxygenierung stellen sich wieder Normalwerte ein (208).

### **1.5. Angiogenetische Chemokine**

Chemokine sind sogenannte sekundäre proinflammatorische Botenstoffe, deren Synthese durch primäre proinflammatorische Mediatoren, wie Tumor Necrosis Factor (TNF) oder Interleukin -1, induziert wird (209,210). Chemokine sind ca. 7-15 kDa große Polypeptide mit vier Cysteinresten. An Hand der Position der ersten beiden Cysteinreste in der Aminosäuresequenz können die Chemokine in zwei Gruppen unterteilt werden. Einmal die C-X-C- oder  $\alpha$ -Gruppe, bei der zwischen den Cysteinen variable Aminosäuren lokalisiert sind. Dazu gehören IL-8 und die GRO-Gruppe. Die andere Chemokingruppe ist die sogenannten C-C- oder  $\beta$ -Subfamilie, bei der die beiden Cysteinreste direkt verbunden sind, und zu denen die Proteine MCP-1 oder RANTES gehören.

### 1.5.1. Interleukin 8 (IL-8)

Die Erstbeschreibung von IL-8 als Faktor erfolgte von mehreren Arbeitsgruppen zeitgleich und unabhängig. Aufgrund seiner Fähigkeit neutrophile Granulozyten zur Chemotaxis anzuregen (211) und sie zu aktivieren, wurden ihm die Namen „monocyte-derived neutrophil-activating peptide“ (MONAP), „monocyte-derived neutrophil chemotactic factor“ (MDNCF), „neutrophil attractant/ activating protein“ (NAP-1), „T-lymphocyte chemotactic factor“ (TCF) oder „leukocyte adhesion inhibitor“ (LAI) zugeschrieben.

Wichtig ist die Funktion von IL-8 bei der Diapedese von neutrophilen Granulozyten. Durch IL-8 vermittelte Aktivierung von Adhäsionsmolekülen können Neutrophile an der Gefäßwand haften und dann transmigrieren (212).

IL-8 hat außer den seinen verschiedenen Bezeichnungen zugrundeliegenden Wirkungsweisen auch proliferative und chemotaktische Effekte auf Gefäßendothelzellen *in vitro* (34). Yoshida und seine Mitarbeiter zeigten, dass neu gebildete Gefäße IL-8 positiv waren und dass Antikörper gegen IL-8 Neoangiogenese im Glaskörper ebenso inhibierten wie Antikörper gegen VEGF (213). Auch Melanomzellen konnten durch IL-8 zu haptotaktischer Migration induziert werden (214).

Neben Leukozyten produzieren auch Keratinozyten (215,216), Fibroblasten (215), Endothelzellen (217) und Melanomzellen (218,219) Interleukin-8. Die Sekretion von IL-8 lässt sich in Neutrophilen, Monozyten und Endothelzellen (220) durch Zugabe von IL-1, LPS, TNF und GM-CSF stimulieren. Dies trifft bei IL-1 und TNF auch für Melanomzellen zu. Interferon- $\alpha$  und - $\beta$  antagonisieren diesen Effekt (209,221). Unter Hypoxie reduzieren Neutrophile die Sekretionsrate von IL-8, wohingegen darauffolgende Reoxygenierung einen Anstieg der Chemokinsekretion über den Basalwert zur Folge hat (222,223). Pankreascarcinomzellen zeigten im Zuge einer hypoxie- und azidoseinduzierten IL-8-Expression aggressiveres Tumorstadium und metastatisches Potential (214). Ähnlich wie bei Neutrophilen können durch Aktivierung von Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptoren, UVB-Strahlen, Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ -B und Hypoxie Melanomzellen zur IL-8-Sekretion stimuliert werden (218,224,225).

Bei Melanomzellen ließ sich in Primärtumoren und Metastasen keine bzw. nur geringe IL-8-Immunfärbung (216,226), in vitro und in nekrotischen Metastasen dagegen meistens bzw. immer eine IL-8-Sekretion / -Expression nachweisen (219,226,227,228,229). Dies könnte mit der Melanom-eigenen TGF- $\beta$  Produktion korrelieren, welche die IL-8 Synthese in Melanomzellen hemmt (209). In vitro zeigt sich nur teilweise eine IL-8-abhängige Proliferation IL-8-rezeptorpositiver Melanomzellen (219,230,231). Im Tierversuch hingegen wirkt sich IL-8 deutlich auf das Tumorwachstum und die Metastasierung von Melanomzellen sowie auf deren angiogenetische Potenz aus (231,232,233,234).

Für IL-8 existieren zwei Rezeptoren, von denen der IL-8-Rezeptor Typ A (IL-8RA) selektiv für IL-8 ist, während der IL-8-Rezeptor Typ B (IL-8RB) alle C-X-C-Chemokine bindet (zur Übersicht s.217).

Obwohl in vivo IL-8RA bei Endothelzellen und eine über sie vermittelte angiogenetische Wirkung nachweisbar sind (34,230), ließen sich in vitro bisher keine der beiden Rezeptoren bei diesen Zellen nachweisen (235).

### **1.5.2. Growth Related Oncogen-Alpha (Gro- $\alpha$ ) / Melanocyte growth stimulating factor (MGSA )**

Gro- $\alpha$  wurde erstmals als Wachstumsfaktor für Hs0294T Melanomzellen beschrieben. Weitere Gro- $\alpha$ -produzierende Zellen sind spezifische Melanomzelllinien, Naevuszellen und verschiedene primäre Melanozyten in Kultur (136,236). Eine genauere Untersuchung des Moleküls ermöglichte eine Zuordnung von Gro- $\alpha$  zu den C-X-C-Chemokinen (s.o.). Entsprechend zeigt Gro- $\alpha$  neben dem mitogen-autokrinen Effekt auf seine Produzenten chemotaktische Wirkung auf Monozyten und neutrophile Granulozyten (139,211,236). IL-8 inhibiert die Chemotaxis von Neutrophilen zu Gro- $\alpha$ , aber Gro- $\alpha$  nicht die zu IL-8 (211). Neutrophile wiederum können über die Sekretion der Zytokine IL-1, TNF und PDGF die Gro- $\alpha$ -Produktion in Melanomzellen verstärken. Die Kombination proteolytischer Eigenschaften granulozytär-sezernierter Enzyme, freigesetzter Radikale und anderer Entzündungsmediatoren ist Grundlage für eine

Hypothese zur Onkogenese von Melanozyten und die eines sich selbst unterhaltenden Tumorprozesses (237).

Kulturmedien ohne Serum bewirken eine verminderte oder gar fehlende Expression bzw. Produktion von Gro- $\alpha$  in Melanomzellen (236). In Endothelzellen wirkt Gro- $\alpha$  hemmend auf die DNA-Synthese und die Gefäßneubildung im CAM-Assay (238). Auch hier zeigt sich ein Unterschied zum C-X-C-Chemokin IL-8, das wie GRO- $\alpha$  durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\beta$  in Endothelzellen vermehrt exprimiert wird (220).

Bei den Rezeptoren gibt es analog zu den IL-8-Rezeptoren den gemeinsamen Rezeptor für Gro- $\alpha$  und IL-8 sowie einen Gro- $\alpha$  spezifischen Rezeptor, zumindest in Melanomzellen (239). Die durch Gro- $\alpha$  vermittelte Autostimulation der melanozytischen Zellen ist via monoklonale Antikörper blockierbar (240).

### **1.5.2. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor ( GM-CSF )**

Der Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor gehört zu der Gruppe der hämatopoetischen Zytokine und wurde ursprünglich, entsprechend der Namensgebung, als Stimulans zur Koloniebildung von Zellen verschiedener Differenzierungsstadien in Richtung Neutrophile, Monozyten/ Makrophagen und Eosinophile beschrieben. Das Wachstum hämatopoetischer Zellen ist von diesem Faktor abhängig. Zudem stimuliert GM-CSF die Ausdifferenzierung und Aktivierung dieser Zellen und erhöht ihre Lebensdauer (zur Übersicht s.241).

GM-CSF ist ein Protein, das aus 127 Aminosäuren besteht, die in zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices angeordnet sind. Über Bindung an membranständige Rezeptoren mit Domänen verschiedener Affinität wird die Wirkung auf die Zielzellen übermittelt. Hierbei unterscheidet man die niedrig affine  $\alpha$ -Domäne von der hochaffinen  $\beta$ -Domäne. Letztere wurde auch als  $\beta_c$  oder KH97 Untereinheit bezeichnet und schien entscheidend für die über Kinasen vermittelte Signaltransduktion.

Melanomzellen exprimieren die mRNA für beide GM-CSF-Rezeptoren im Gegensatz zu normalen Melanozyten die weder  $\alpha$ - noch  $\beta$ -Rezeptor-mRNA aufweisen (140). Allerdings ist nicht nur die Expressionsrate in den einzelnen Tumorzelllinien unterschiedlich, sondern auch die Umsetzung in die jeweiligen Untereinheiten des

Rezeptors (140,242). In Melanomzellen erhöht sich die Glukoseaufnahme über GM-CSF-Bindung an die  $\alpha$ -Einheit, nicht aber ihre Zellproliferationsrate (242,243).

Eine Sekretion von GM-CSF konnte für mehrere Melanomzelllinien (140,228,244,137), nicht aber für normale Melanozyten gezeigt werden (140). Es ließ sich in vitro eine Abnahme der Proliferation GM-CSF-sezernierender Melanomzellen nachweisen, wenn ihre GM-CSF-Produktion unterdrückt wurde (246). Des weiteren führt GM-CSF zu einer autokrinen Migrationsförderung in Melanomzellen (247). Dies könnte die Beobachtung erklären, dass in einem Screening vieler Melanomzelllinien alle GM-CSF positiven Melanomzellen von Metastasen stammen (229). Die Kokultur von Keratinozyten und Fibroblasten führt zu einer verstärkten GM-CSF-Transkription in Fibroblasten (248).

In Monozyten induziert von Melanomzellen sezerniertes GM-CSF die Produktion von TNF, IL-1 und IL-8 (249). Diese Zytokine wiederum verstärken die GM-CSF-Sekretion von HUVEC (250) und können somit die GM-CSF-abhängige Migration und Proliferation der Endothelzellen steigern (251).

Antigen von humanen Melanomzellen führte in HLA-identischen, tumorinfiltrierenden Leukozyten zu einer Freisetzung von GM-CSF, TNF und IFN- $\gamma$ . Ein direkter zeitlicher Zusammenhang zwischen Zytokinsekretion und stattgefundenen verstärkter Zytolyse von Tumorzellen bestand jedoch nicht (252). GM-CSF erhöht die Antikörper-abhängige Zytotoxizität von Monozyten und Granulozyten gegen Tumorzellen. Bei Monozyten zeigte sich keine signifikante Zunahme der zytolytischen Aktivität gegen Melanomzellen (253).

Über Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen bewirkt GM-CSF eine starke antitumoröse Immunreaktion gegen murine Melanomzellen (254). Auch bei Melanopatienten konnte im Rahmen von Studien ein GM-CSF-vermittelter antitumoröser Effekt gezeigt werden. Sowohl die lokale intratumoröse GM-CSF-Injektion (255) als auch die Impfung mit bestrahlten autologen Melanomzellen mit artefizieller zelleigener GM-CSF-Sekretion (256) oder mit bestrahlten autologen Melanomzellen und rekombinantem humanen GM-CSF (257) resultierten in einer verstärkten Immunantwort gegen Tumorzellen und teilweiser Regression der Erkrankung.



## 1.6. Problemstellung

In dieser Arbeit soll das Sekretionsverhalten hoch- und niedrigmaligner Melanomzellen, sowie ihrer Vorläuferzellen, den normalen Melanozyten, und die Freisetzung der ausgewählten Angiogenesefaktoren bzw. Zytokine unter normalen Kulturbedingungen sowie unter Stressbedingungen (Sauerstoff- oder Nährstoffmangel) untersucht werden. Die Klärung des Fragenkomplexes, ob generell qualitative Unterschiede im Sekretionsverhalten zwischen Melanomzellen und normalen Melanozyten bestehen und ob der Malignitätsgrad der Melanomzelllinien mit einem typischen Zytokinmuster korreliert, sollte für das Verständnis des Tumorverhaltens und der Prognose von Nutzen und eventuell von therapeutischer Relevanz sein.

Da Stromazellen via Zyto- und Chemokin-Expression das Tumorwachstum ebenso maßgeblich wie die Neoangiogenese beeinflussen, sollen in dieser Arbeit auch Fibroblasten, als ubiquitär vorkommende Prototypen potentieller Interaktionspartner im Tumorstroma, vor allem von Metastasen, untersucht werden. Ebenso sollen Endothelzellen als die eigentlichen Zielzellen angiogenetischer Zytokine in ihrem Sekretionsverhalten miterfasst werden.

Die unterschiedliche Wirkung dieser Zytokine auf die Angiogenese soll anhand der Proliferationsrate von Endothelzellen erfasst werden. Bei der Stimulation der Proliferation in vitro sollen die Zytokine getestet werden, die durch vermutlich proangiogenetische Regulationsveränderung (Sekretionssteigerung) unter den genannten Stressbedingungen aufgefallen sind.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Gewinnung der Zellüberstände für die Zytokinbestimmung

#### 2.1.1. Zellkultur

Alle Primärzellen bzw. Zelllinien wurden routinemäßig auf eine Infektion mit Mykoplasmen getestet und waren negativ. Die Zellen wurden in Gewebekultur-Petrischalen mit den jeweils für sie geeigneten Medien (siehe Tabelle 2.1) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (siehe Tabelle 2.3.) kultiviert. Sämtliche Reagenzien für die Zellkultivierung wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Für die Zellanzucht wurde das Medium jeweils nach 48 Stunden gewechselt. Zur Zytokin- bzw. Chemokinbestimmung aus den Überständen der entsprechenden Versuchskultur-

**Tabelle 2.1**

ZELLEN:	Ursprung	bezogen von / Bestellnummer	Kulturmedium
<b>Melanomzellen</b>			
MV3	Metastase	<i>freundlicherweise überlassen von Dr. Goos van Muijen, Pathologisches Institut, Universität Nijmegen</i>	RPMI-Medium
BLM	Metastase		
IF6	Primärtumor		
530	Primärtumor		
HT 144	Hautmetastase		
WM 115	Primärtumor		
<b>Fibroblasten</b>			
HFF		<i>freundlicherweise Überlassen von Dr. D. Kaufmann, Institut für Humangenetik, Universität Ulm</i>	RPMI-Medium
FPJ			
FGS			
<b>Melanozyten</b>			
MRF		<i>freundlicherweise Überlassen von Dr. D. Kaufmann, Institut für Humangenetik, Universität Ulm</i>	TIC-Medium
MGS			
MSD			
Mel4			
<b>Endothelzellen</b>			
HUVEC	humane Umbilicalvenenendothelzellen	Clonetics, San Diego, USA Nr. CC-2517	EGM
Einzelspender			
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	Clonetics, San Diego, USA Nr. CC-2582	
HMEC-1	(nach Ades) immortalisierte humane mikrovaskuläre Endothelzellen	<i>freundlicherweise Überlassen von Dres. T.J. Lawrey und E.W. Ades Emroy Universität bzw. CDC, Atlanta, USA (9)</i>	

bedingungen (siehe Abschnitt 2.1.2.3.) erfolgte der Medienwechsel unter Asservation der Überstände nach jeweils 24 Stunden wie in Abschnitt 2.1.2.4. beschrieben. In einem Versuchsansatz wurden stets parallel die Überstände unter Stress- und Standardbedingungen (normales Medium und Normoxie) kultivierter Zellen der selben Passage gewonnen. Die Melanomzellen wurden in den Passagen 10 bis 29, Melanozyten und Fibroblasten bis zur 25. Passage und Endothelzellen bis maximal zur 5. Passage verwendet.

**Tabelle 2.2**

KULTURMEDIEN:	bezogen von	Bestellnummer	Endkonzentration
<b>RPMI 1640 ohne L-Glu, Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup></b> <b>RPMI 1640 glukosefrei, ohne L-Glu, Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup></b> (mit Supplementation):	Linaris, Bettingen am Main	Nr. F-2612-KG Nr. F-2629-KK	
fetales Kälberserum (FCS)  Glutaminlösung (L-Glu) Nicht Essentielle Aminosäuren (NEA) Penicillin-Streptomycin		Nr. S-3111-KG ChargeB.-D.20.593 Nr. K-1941-GG Nr. K-1924-GG Nr. A-1153-GG	10 % bzw. 1 % bei Serummangelmedium 2 mmol / ml 1M 100 IE bzw. 100µg /ml
<b>TIC-Medium</b> (bestehend aus / mit Supplementation):	(Rezeptur nach Prof. D. Kaufmann, Ulm )		
HAM's F 10-Medium  NU-Serum  in Phosphatbuffered-Saline (PBS) gelöst: (nach Dulbecco, ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Linaris, Bettingen am Main  Becton Dickinson  Linaris, Bettingen am Main  Serva / Boehringer-Bioproducts, Ingelheim  Serva/ Boehringer-Bioproducts, Ingelheim  Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen	Nr. F-2211-KG  Nr. 55.000 Charge 907266 / 904376 Nr. L-1622-KG  Nr. 32496  Nr. 20385 Nr. C-8052 Nr. I-7018	80 %  10 %  68 ng / ml  6,8×10 <sup>-6</sup> % 6,8×10 <sup>-3</sup> % 28,6 ng / ml
<b>EGM-Medium</b> (mit Supplementation):	Clonetics, San Diego, USA (Endkonzentration):	Nr. CC-4133	
Endothel-Wachstums-Faktor, human  Hydrocortison Gentamycin boviner Hirnextrakt fetales Kälberserum		Nr. CC-4017 Nr. CC-4035 Nr. CC-4081 Nr. CC-4092 Nr. CC-4101	0,1 % 1 mg / ml 1mg / ml 0,25 % 2 %

## 2.1.2. Versuchsaufbau

Die einzelnen Zellarten, wie auch die verschiedenen Zelllinien, vor allem die Melanomzelllinien, unterscheiden sich in ihrem Wachstumsverhalten zum Teil sehr stark. Eine Standardisierung war deshalb nur in der Festlegung der Ausgangszellzahl möglich.

### 2.1.2.1. Das Ablösen des Zellmonolayers

Der Monolayer aller Zelllinien wurde primär einmal mit 5ml PBS gespült, um Reste des Kulturmediums zu beseitigen, die das folgende Ablösen der Zellen beeinträchtigen könnten. Der Monolayer wurde mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung für ca. 5-10 s bedeckt. Diese wurde entfernt und die Petrischale für ca. 3 min im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 ml des zellentsprechenden Mediums (bei allen Endothelzellen mit reinem FCS) gestoppt. Die gelösten Zellen wurden dabei vom Schalenboden gespült und in dem Volumen durch mehrmaliges Aufnehmen mit einer 10ml Gaspipette in ein 15 ml Polystyren Conical Tube gleichmäßig verteilt.

**Tabelle 2.3**

<b>MATERIALIEN für Zellkultur:</b>	bezogen von	Bestellnummer
T75-Zellkultur-Flaschen	Falcon , Becton Dickinson,	Nr. 3111
Rundbodenplatte, 96-Loch	Heidelberg	Nr. 3077
Flachbodenplatte, 96-Loch, high binding		Nr. 3915
Petrischalen 100×20 mm		Nr. 3003
Petrischalen 150×25 mm		Nr. 3025
Polystyren Conical Tube, 15 ml		Nr. 2095
Anaerokult Anaerobentopf Vol.2,5l / 12 Petrischalen	Merck, Darmstadt	Nr. 116387
Anaerokult A		Nr. 113829
Anaerotest-Stäbchen		Nr. 115112
Kryo-Röhrchen, 2ml	Hartenstein, Würzburg	Nr. KT-20
Polypropylen Cups, 2 ml	Eppendorf	Nr. RSL-2

### 2.1.2.2. Bestimmung der Zellzahl

40µl dieser Zellsuspension wurden 1:1 mit einer physiologischen NaCl-Lösung unter Zusatz von 0,4% Trypanblau gemischt und in ein Loch einer 96-Lochplatte gegeben. 10µl dieses Gemisches dienten der Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauerzählkammer. Die Summe der in den vier Kammern vorhandenen Zellen wurde durch vier geteilt, entsprechend der Verdünnung mit der Trypanblau-Lösung mit dem Faktor zwei und dem Volumenfaktor 10.000 der Neubauerzählkammer sowie dem der ursprünglichen 10ml Zellsuspension multipliziert:

$$\text{Gesamte Zellzahl} = \text{gezählte Zellzahl} / 4 \times 2 \times 10.000 \times 10$$

Während der Zellzählung wurden die 10 ml Zellsuspension bei 4°C und 900 Umdrehungen/min 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Das Volumen wurde so gewählt, dass zwei Millionen Zellen in einem Milliliter Medium suspendiert wurden.

**Tabelle 2.4**

Reagenzien	bezogen von	Bestellnummer
0,5% Trypsin/ 0,2% EDTA-Lösung 10-fach in PBS 1/10 verdünnt	Linaris, Bettingen am Main	Nr. K-1252 GG
Serumalbumin, bovin (BSA) 1%	Biomol, Hamburg	Nr. 01400
Dimethyl-sulfoxid (DMSO) 10%	Serva, Boehringer Ingelheim	Nr. 20385
0,4% Trypanblau		Nr. 37252
0,9% NaCl-Lösung	Fresenius	Nr. 46473
Aprotinin 2,2 mg in 15 ml (= 3000 IU/ml) (aus Rinderlunge nach Biurett)	Sigma, Deisenhofen	Nr. A-62279 Lot. 64-H-70501
Phenylmethylsulfonsäure (PMSF) 200 mM		Nr. P 7626 / Lot.84-H-0372

### 2.1.2.3. Inkubation der Zellen unter entsprechenden Kulturbedingungen

Ein Milliliter dieser Suspension wurde mit einer 100-1000 µl Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg) in eine 100×20 mm Petrischale gegeben und mit weiteren 7 ml Medium gemischt, indem die Schale in achtförmigen Bewegungen vorsichtig geschwenkt wurde. Die Zellen wurden für 24 Stunden unter normalen Kulturbedingungen inkubiert.

Danach wurde das Medium abgenommen, der Monolayer einmal mit 8 ml PBS gespült und mit 8 ml normalem, serumarmem (1% statt 10% bzw. bei EGM 0,2% statt 2%) oder (nur bei den Melanom- und Fibroblastenzellen) mit glucosefreiem RPMI-Medium für weitere 24 Stunden kultiviert.

Um ebenfalls Zellüberstände von Zellen unter Anoxie zu gewinnen, wurden mit normalem Medium versehene Kulturschalen in einem Anaerokult-A Anaerobiertopf ohne Sauerstoff über den gleichen Zeitraum inkubiert. Der Sauerstoff wurde durch eine Oxidierungs-Reaktion von Eisen dem Topfvolumen entzogen und die Vollständigkeit der Oxidation über ein Anaerotest-Stäbchen kontrolliert.

Nach 24 Stunden wurden die Zellüberstände der jeweiligen Kulturbedingungen wie im folgenden Abschnitt beschrieben abgenommen (siehe Kapitel 2.1.2.4.), und die Zellen über weitere 24 Stunden unter Standardbedingungen (normales Medium und Normoxie) kultiviert.

Aus den Überständen der stets unter Standardbedingungen kultivierten Zellen wurden die im folgenden als (24- bzw. 48-Stunden-) Kontrollwert bezeichneten Zytokinmengen ermittelt. Die Proben der nach 24 Stunden Stressbedingungen unter Standardbedingungen kultivierten Zellen wurden mit Reoxigenierung bzw. Reglukosierung bezeichnet. Die jeweiligen Kontrollwerte wurden dann mit den unter Stressbedingungen bzw. Poststressbedingungen (Reoxigenierung oder Reglukosierung) erhaltenen Zytokinmengen verglichen.

#### **2.1.2.4. Verarbeitung der Medienüberstände**

Nach der Inkubation wurden die Zellüberstände abgenommen und die Petrischalen einmal vorsichtig mit diesem Zellüberstand abgespült um nur leicht anhaftende Zellen beim anschließenden Waschschrift mit PBS nicht zu verlieren. Der Überstand wurde mit 15 µl Aprotinin-Lösung (entsprechend 45 IU Aprotinin) versetzt und bei 4°C und 900 Umdrehungen pro Minute sieben Minuten zentrifugiert. Während dessen wurde der verbleibende Monolayer einmal mit PBS gespült und die Zellen gemäß Abschnitt 2.1.2.1. gelöst und in 15 ml Polystyren Conical Tubes auf Eis gelagert. Die Petrischale wurde nach der Abnahme der Zellsuspension ein Mal mit 5 ml PBS nachgespült. Die so gewonnenen Restzellen wurden der gesamten Zellzahl zugefügt.

Nach Zentrifugation wurde der mit Aprotinin versetzte Zellüberstand unter Zugabe von 75 µl Phenylmethylsulfonsäure gelöst in absolutem Ethanol in ein 15 ml Polystyren Conical Tube umgeschüttet. Das verbliebene Pellet wurde in 2 ml PBS resuspendiert und bis zur Zellzahlbestimmung ebenso wie der mit Proteinase-Inhibitoren versetzte Zellüberstand auf Eis gekühlt. Die Zellzählung erfolgte wie in Absatz 2.1.2.2. beschrieben, wobei die gesamte Zellzahl aus lebenden und toten Zellen des Monolayers und des Überstandes errechnet wurde. Die gesamte Zellsuspension wurde erneut bei 4°C und 900 Umdrehungen/min sieben Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit 5ml PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Kryo-Röhrchen gefüllt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit einer 200µl Pipette trockengelegt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung im Northern-Blot bei -80°C gelagert. Der Zellüberstand wurde in 500µl Portionen in Kryo-Röhrchen verteilt. Diese Aliquots wurden ebenfalls mit Flüssigstickstoff tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

## 2.2. Zytokinbestimmung mit Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Für die Bestimmung der einzelnen Zytokine wurden die entsprechenden Quantikine™ Immunoassays der Firma R&D-Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt verwendet (siehe Tabelle 2.5).

**Tabelle 2.5**

-human Angiogenin, Cat.Nr. DAN00	-human IL-8, Cat.Nr. D8000
-human b-FGF, Cat.Nr. DFB00	-human PDGF-AB, Cat.Nr. DHD00
-human GM-CSF, Cat.Nr. DGM00	-human TGF-β1/ TGF-β2, Cat.Nr. DB100 / DB250
-human Gro-α, Cat.Nr. DGR00	-human VEGF, Cat.Nr. DVE00

### 2.2.1. Messprinzip

Der ELISA ist nach der sogenannten „Sandwich-Bauweise“ konzipiert. Die mit einem monoklonalen Antikörper gegen das zu messende Zytokin beschichteten Mikrotiterplattenlöcher binden das Antigen des Standards bzw. das der Proben. Die ungebundenen Bestandteile der Proben werden in einem folgenden Waschschrift

entfernt. Es folgt die Zugabe eines polyklonalen, enzymgekoppelten Antikörpers gegen das Zytokin. Die ungebundenen Zweitantikörper werden gewaschen und eine Enzym-Substratlösung zugefügt. Über das Enzym wandelt sich das Substrat proportional zum antikörpergebundenen Zytokingehalt in ein farbiges Präzipitat um. Mit einer Stopplösung wird die Reaktion beendet und ihre Intensität mit einem ELISA-Reader bestimmt.

### **2.2.2. Versuchsablauf**

Die Durchführung des Versuchs folgte dem Protokoll des Herstellers für den jeweiligen Immunoassay. Das Vorgehen wird anhand des VEGF-ELISAs beschrieben und eventuelle Abweichungen zu den anderen Protokollen sind der Tabelle 2.5 zu entnehmen. Die einzelnen Reagenzien des ELISA-Kits und die, wie unter 2.1.2.4. erläutert, gewonnenen Zellüberstände wurden auf Raumtemperatur gebracht.

#### **2.2.2.1. Erstellen der Standardreihe**

Das Pipettieren in diesem Arbeitsschritt erfolgte mit immer der selben 100-1000 $\mu$ l Pipette. Der Standard wurde in 1 ml Kalibrierungsflüssigkeit RD5K in einer Konzentration von 2000 pg/ml 15 min bei 200 Umdrehungen pro Minute auf dem Vortex gelöst.

In acht, gemäß der Konzentration beschrifteten 2 ml-Cups wurden je 500  $\mu$ l RD5K-Lösung vorpipettiert. In das erste wurden 500  $\mu$ l der 2000 pg/ml VEGF enthaltenden Stocklösung zugegeben und das Cup verschlossen. Die resultierende 1000 pg/ml Lösung wurde bei 9000 Umdrehungen/ min ca. 10 sec gevortext und dann mit der Pipette fünf mal durchmischt. Danach wurden 500  $\mu$ l der als Höchststandard dienenden Lösung in das nächste Cup übertragen. Dieser Vorgang wurde siebenmal bis zur Vervollständigung der Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1000/ 500/ 250/ 125/ 62,5/ 31,2 und 15,6 pg/ml wiederholt. Als Standardleerwert diente die RD5K-Lösung. Um ein eventuelles Zytokinorkommen im Medium zu erfassen, wurden die angesetzten Kulturmedien jeweils einmal mitgetestet. Die minimal detektierbare VEGF-Menge beläuft sich nach Herstellerangaben auf 5,0 pg/ml.



#### **2.2.2.2. Bearbeiten der Mikrotitermessplatte**

Zuerst wurde jedes Loch mit 50 µl des Essay Diluents RD1W beschickt. Darauf folgte die Zugabe von je 200 µl Standard- oder Zellüberstandslösung, wobei die Proben immer im Doppelansatz eingesetzt wurden. Um bei den Zellüberständen aufgrund zu hoher Proteinkonzentrationen nicht außerhalb des Standardbereiches zu liegen, wurden Vorergebnissen entsprechend, die Proben mit der RD5K-Lösung im geeigneten Verhältnis (1:10) verdünnt. Die Platte wurde für die Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur mit einer Folie bedeckt und bei 200 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

Am Ende der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit kurz und kräftig aus den Löchern gestürzt und die umgedrehte Platte mehrfach auf saugfähiges Papier geschlagen, um Restflüssigkeit zu entfernen. Mit der Multipipette (Eppendorf) wurden diese mit 400 µl Waschpuffer gefüllt und erneut entleert. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Danach wurde 200 µl Konjugat, der an Zytokin- / Chemokin-Antikörper gekoppelten (Pferderettich) Peroxidase-Lösung, in jedes Loch gegeben und unter obigen Bedingungen erneut für zwei Stunden inkubiert.

Farbreagenzien A (Hydrogen-Peroxid) und B (Tetramethylbenzidin) angesetzten Substratlösung. Nach zwanzigminütiger Reaktion bei Raumtemperatur ohne Schütteln wurde durch Zugabe von 50 µl Stopplösung (2N Schwefelsäure) der Farbumschlag beendet.

Die Messplatte wurde binnen dreißig Minuten mit einer Wellenlänge von 450 nm, gegen die Referenzwellenlänge von 620 nm im SLT 400 SF Plattenphotometer ( Fa. SLT LAB Instruments, Deutschland GmbH, Crailsheim) gemessen, und mit dem Programm Easyfit /SLT wurden aus den Extinktionswerten die entsprechenden Proteinkonzentrationen berechnet.

**Tabelle 2.6 ELISA-Reagentien**

Zytokin	Angiogenin	b-FGF	GM-CSF	Gro-alpha	IL-8	PDGF	TGF-β1 / TGF-β2	b-FGF high sensitivity
Standardkonzentration in pg/ml	5000	640	500	1000	6000	2000	2000	32
Standard Part-Nr.	DAN02	890110	890028	890152	890023	890095	890207/-267	890140
gelöst in	5ml RD5C	2ml RD5D	5ml RD5	5ml RD5B	5ml RD5	2ml RD5	2ml RD5I	1ml PBS *
Höchstkonzentration in pg/ml	5000	320	500	1000	6000	2000		32
Niedrigstkonzentration in pg/ml	78	5	7,8	31,3	93,8	31,2		0,5
Sensitivität in pg/ml	<3	<1	<2,8	<9	<18	<8,4	<7	<0,043
Waschpuffer Part- Nr.	D0020	895003						895073
Essay Diluent Preload	50µl RD1A	∅			100µl RD1A	50µl RD1G	100µl RD6M / ∅	100µl Part 895062
Antigenmenge	200µl				100µl	200µl		150µl
Inkubationszeit	1h	2h		1,5h	2h		2h / 1,5h	14-20h
Inkubationstemperatur	~20°C							
Konjugat Part- Nr.	DAN02	8990109	890028	890151	890022	890094	890206/-5134	89990139
Konjugatmenge	200µl							
Inkubationszeit	1h	2h		1h	2h			
Inkubationstemperatur	~20°C			2-8°C		~20°C		
Substratlösung Part-Nr.	1:1 895000 + 895001							895077 in 6ml 895078
Substratmenge	200µl							50µl
Substratinkubationszeit	20 min							60 min
Amplifiersolution Part-Nr.	∅							895075 in 6ml 895076
Amplifierlösungsmenge	∅							50 µl
Amplifierinkubationszeit	∅							30 min
Stopplösung Part-Nr.	895032							895074
Stopplösungsmenge	50µl							

- nach Rücksprache mit R&D

### 2.2.2.3. Auswertung der Messergebnisse

Aufgrund des spezifischen Wachstumsverhaltens der einzelnen Zellarten und Zelllinien und entsprechend großen Unterschieden in der Zellzahl wurden die in den Überständen gemessenen Proteinkonzentrationen zur besseren Vergleichbarkeit jeweils in Relation zu  $10^6$  Zellen gesetzt.

Mit den Messwerten der Doppelbestimmungen wurden, ebenso wie mit den Ergebnissen aus mehreren Messungen gleicher Zellen unter gleichen Bedingungen, der Mittelwert  $\bar{x}$  und die Standardabweichung  $s$  gemäß den Formeln  $\bar{x} = 1/n \times \sum_{i=1}^n x_i$  und  $s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$  berechnet. Der Quotient  $\bar{x}$  der Zytokinmenge unter

Stressbedingungen/  $\bar{x}$  der Zytokinmenge unter Kontrollbedingungen wurde als Faktor bzw. Maß für die Änderung des Sekretionsverhaltens festgelegt.

Bei genügend hoher Anzahl  $n$  ( $n \geq 5$ ) von Meßdaten sich entsprechender Zell- und Kulturarten wurde die Signifikanz der Resultate mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen ermittelt. Dieser Test wurde zum Vergleich zweier verbundener Stichproben angewandt (z.B. für die Klärung der Fragestellung: Liegt der unter Hypoxie erhaltene Wert für die IL-8-Sekretion über dem Kontrollwert?), da die Werte auf metrischer Skala mit unbekannter Häufigkeitsverteilung vorlagen, d.h. von einer Normalverteilung der Ergebnisse nicht ausgegangen werden konnte (Wilcoxon-Test, 275).

Aus dem gleichem Grund der nicht vorhersagbaren Ergebnisverteilung wurde zur Beurteilung der Signifikanz zweier unverbundener Proben der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Withney verwandt. Mit diesem Test konnte beispielsweise die Signifikanz einer unterschiedlichen Sekretionsrate von VEGF zwischen hoch- und niedrigmalignen Melanomzellen unter vergleichbaren Kulturbedingungen untersucht werden (U-Test, 275).

### **2.3. Endothelzellproliferationsbestimmung**

Zur Erfassung der Zytokinwirkung auf Proliferationsrate von Endothelzellen wurde der 5-Bromo-2'-deoxy-uridin Labeling und Detection Kit III (Boehringer Mannheim, Cat.Nr. 1444 611) verwendet.

### 2.3.1. Messprinzip

In diesem Test wird von den Zellen, die in 5-Bromo-2'-deoxy-uridin-haltigem Medium kultiviert werden, anstatt des Thymidins 5-Bromo-2'-deoxy-uridin (BrD-U) in die Zell-DNA eingebaut. Mit einer Nuklease wird das BrD-U der DNA für die Bindung des Antikörpers freigelegt. Der Nachweis von inkorporiertem BrD-U in der Zell-DNA mit einem monoklonalen Antikörper geschieht mittels einer an diesen gekoppelten Peroxidase, die entsprechend der Antigenmenge einen Farbumschlag des Substrats bewirkt. Dies gilt als Parameter für die DNA-Synthese und Proliferationsrate der Zellen während der Kulturzeit.

### 2.3.2. Versuchsablauf

Es wurden HUVEC und HMEC-1 als je eine makrovaskuläre und mikrovaskuläre Endothelzellart in diesen Test eingesetzt. Deren Einbau von BrD-U wurde unter Stimulation durch die Zytokine Angiogenin, basic-FGF und VEGF sowie durch die Chemokine Interleukin-8 und Gro- $\alpha$  (siehe Tabelle 2.7) im Vergleich zu unstimulierten Zellen nach 96 Stunden gemessen.

**Tabelle 2.7** Zyto- und Chemokine

• human Angiogenin	R&D Systems Europe, Abingdon	Nr. 265-An-050
• human basic FGF	UK	Nr. 233-FB-025
• human GRO- $\alpha$		Nr. 275-GR-010
• human IL-8		Nr. 208-IL-010
• human VEGF <sub>165</sub>		Nr. 293-VE-050

Bisher publizierte Versuche zu Endothelzellproliferation unter Zytokinen fanden meistens unter dem Einfluß von Serumangel statt. Entsprechend wurde obiger Versuchsaufbau mit HUVEC zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Daten unter Serumangel durchgeführt.

Mit einem Experiment nonadhärenter Endothelzellen sollte untersucht werden, inwieweit Endothelzellen mit geringeren Zell-Zellkontakten untereinander, wie z.B. bei

frischeinsprossenden Gefäßen oder migrierenden Endothelzellen, sich in ihrer Reaktion auf angiogenetische Stimulantien von adhärennten Endothelzellen unterscheiden.

### **2.3.2.1. Beschicken der Messplatte**

Die 96-Loch-Mikrotitermeßplatte wurde einmal mit 400 µl sterilem PBS gewaschen. HUVEC wurden gemäß 2.1.2.1. und 2.1.2.2. gelöst und gezählt. Um eine konstante Zellzahl einzusäen, wurden eine Million Zellen in 5 ml Medium suspendiert und vor jeder Zellentnahme durch langsames mehrmaliges Aufziehen mit einer 5 ml-Pipetten durchmischt. Die Zellen wurden in der Konzentration von 200 Zellen pro µl mit Zellzahlen von 16000, 8000, 4000, 2000 und 1000 Zellen pro Loch in einer 96-Well-Platte eingesetzt.

Außerdem wurden 2000 Zellen eingesetzt, deren Proliferationsvermögen durch eine dreistündige Inkubation mit Mitomycin C gestoppt worden war. Sie wurden als Nullwert und 12 Proben ohne Zellen als Mediumleerwerte eingerichtet. Die Löcher waren zuvor mit der Differenz von 200 µl EGM-Medium minus des Volumens der einzufüllenden Zellsuspension gefüllt worden.

Für jede Zellzahl wurden 12 Proben eingesetzt. Nach 8-10 Stunden, nachdem die Zellen adhärent waren, wurde das Medium nach einmaligem Spülen mit PBS gewechselt. Bei jeweils 6 der 12 Proben wurden 200 µl 10 µM BrD-U enthaltendes EGM-Medium, bei den anderen 6 Proben wurde 0,2% Serum enthaltendes EGM-Medium mit der gleichen BrD-U-Konzentration verwendet.

Nach 48 Stunden wurden die jeweiligen Medien einmal gewechselt. Nach insgesamt 96 Stunden wurde der Versuch wie unten beschrieben ausgewertet. Kürzere Kulturzeiten oder BrD-U-Inkubationszeiten erbrachten keine verwertbaren Aussagen. Die Dauer der Inkubation mit BrD-U wurde mit der Firma Boehringer Mannheim abgestimmt.

In diesem Versuchsaufbau konnte das Proliferationsverhalten von Endothelzellen unter normalen wie unter Serummangelbedingungen erfasst werden. Anhand der Werte der Proliferationstests (s.Kap.3.2.1.) wurde eine Ausgangszellzahl von 2000 Zellen als optimal festgelegt.

Für die Stimulationsversuche diente weiterhin eine Standardreihe mit unterschiedlichen Zellzahlen (16000, 8000, 4000, 2000, 1000 und 0) als Kontrolle. Die 2000 mit

Mitomycin behandelten Zellen ergaben den Nullwert. Für alle Proben wurden die Zellen mindestens im Dreieransatz eingesät. Die randständigen Löcher wurden mit PBS gefüllt, um eine verdunstungsbedingte Beeinflussung des Zellwachstums zu minimieren.

Wieder nach 8-10 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch 200 µl 10 µM BrD-U enthaltendes Kulturmedium EGM ersetzt. Im Dreieransatz wurden die adhären Endothelzellen mit einem der Zytokine Angiogenin, basic-FGF, Interleukin-8, Gro-α und VEGF in den Konzentrationen 1 ng, 10 ng, 100 ng und 1 µg/ml stimuliert und mit den Kontrollen ohne Zytokin für 96 Stunden kultiviert. Nach 48 Stunden wurde das BrD-U-haltige Medium erneuert und die gleichen Zytokinkonzentrationen den jeweils drei entsprechenden Proben zugegeben. Nach weiteren 48 Stunden wurde der Versuch beendet und ausgewertet (s.u.).

Zur Differenzierung eines möglichen Proliferationsunterschiedes zwischen mikro- oder makrovaskulären Endothelzellen wurde ein Versuch mit HMEC-1 unter Normalbedingungen durchgeführt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit publizierter Daten und einer eventuell unterschiedlichen Zytokinempfindlichkeit der Endothelzellen unter Mangelbedingungen wurde in einem Versuch die BrD-U-Einbaurrate in HUVEC unter Serumangel untersucht. Hierzu wurden die jeweiligen Zellen nach gleichem Protokoll, für Serumangel mit 0,2% FCS enthaltendem EGM-Medium und den entsprechenden Zytokinen kultiviert.

Bei einem Versuch mit HUVEC sollten die Veränderungen des Proliferationsverhaltens der Endothelzellen unter Zytokinapplikation sofort nach Zelleinsaat getestet werden. Die verwendeten Zytokinkonzentrationen betragen 10 ng, 100 ng und 1 µg pro ml. Das weitere Prozedere und die Auswertung folgte dem für adhären Zellen beschriebenen Protokoll.

Das Medium wurde abgesaugt und die Löcher mit je 250 µl 10% FCS haltigem PBS gewaschen und wieder trockengesaugt. Dieses wurde dreimal durchgeführt. Zum Minimieren des Zellverlustes wurde das Absaugen immer an der gleichen Stelle des Loches ausgeführt. Die Zellen wurden dann mit einer auf -20°C vorgekühlten und angesäuerten (0,5M HCL) 70% Ethanol-Lösung eine halbe Stunde bei -20°C fixiert. Nach dreimaligen Waschen mit 10% FCS-PBS folgte die Zugabe von 100 µl einer Nuklease-Lösung bei 37°C unter Ausschluß von CO<sub>2</sub> für 30 Minuten. Nach einem

nochmaligen Waschschrift mit 10% FCS-PBS wurde für weitere 30 Minuten bei 37°C mit dem Peroxidase-gekoppelten, monoklonalen Antikörper inkubiert. Abschließend wurde jedes Loch der Platte dreimal mit 250 µl Waschpuffer gespült, um Reste der Antikörperlösung zu entfernen, und dann mit je 200 µl Substratlösung versehen. Nach ca. 15 Minuten wurde die Farbreaktion bei der Wellenlänge 405 nm zur Referenzwellenlänge 492 nm mit dem SLT 400 SF Plattenphotometer gemessen ( Fa. SLT LAB Instruments, Deutschland GmbH, Crailsheim).

### 2.3.2.2. Auswertung der Versuchsergebnisse

Aus den drei Einzelwerten der Extinktion eines jeden Probentriplets wurde der Mittelwert  $\bar{x}$  und die Standardabweichung  $s$  gemäß den Formeln  $\bar{x} = 1/n \times \sum_{i=1}^n x_i$  und  $s = \frac{\sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2}}{n^2}$  berechnet. Der Mittelwert der mitomycinversetzten Proben wurde als Nullwert, kontrolliert durch die Leerwerte (0 Zellen pro Loch), von den Mittelwerten abgezogen. Die Ergebnisse der zytokinbehandelten Proben wurden zu dem Mittelwert der unstimulierten Proben der gleichen Ausgangszellzahl (2000 Zellen/Loch) ins Verhältnis gesetzt. Als weiterer Vergleich zu den Zytokinproben wurden die Proliferationsraten der Standardzellzahlen (16000, 8000, 4000 und 1000 Zellen pro Loch) betrachtet.

Für die Ergebnisse der adhärennten HUVEC wurde die Signifikanz bezüglich von Proliferationsunterschieden nach dem Wilcoxon-Test für paarige Stichproben berechnet (275). Aufgrund geringer Probenzahl ließ sich nur eine Irrtumswahrscheinlichkeit für stimulierte im Vergleich zu unstimulierten Endothelzellen berechnen, nicht aber für die einzelnen Konzentrationen der jeweiligen Zytokine.

Ebenso konnten die Unterschiede in der proliferativen Potenz zwischen den jeweiligen Zytokinen nur für die Gesamtheit aller Konzentrationen gezeigt werden. Hierfür wurde der U-Test für unpaarige Stichproben nach Wilcoxon, Mann und Withney eingesetzt (275).

## 2.4. Computerunterstützte Datenverarbeitung

Diese Arbeit wurde mit folgender Software erstellt:

**Tabelle 2.8**

Daten	Software	zugelassen auf
Textverarbeitung	Microsoft Word	Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten, Universität Würzburg
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel	
ELISA	Synelisa 3.2	



### 3. Ergebnisse

#### **3.1. Wachstumsverhalten verschiedener Melanomzelllinien**

(zur Übersicht siehe auch 7. Tabellenanhang 3.1.a-f)

Die Kenntnis des Wachstumsverhaltens von Melanomzellen in vitro ist unabdingbare Voraussetzung für die Analyse ihres Sekretionsmusters von Zyto- und Chemokinen. Im ersten Teil der vorliegenden Studie wurde deshalb das Wachstumsverhalten von Melanomzellen unter normalen Kulturbedingungen (Normoxie und normales Medium), Hypoxie und Substratmangel, sowie den Stressbedingungen folgenden normalen Bedingungen (Reoxigenierung und Reglukosierung) untersucht.

Ausgewählt wurden einerseits die hochmalignen, im Tierversuch stark zu Metastasierung neigenden Melanomzelllinien BLM und MV3 und andererseits die Zelllinien IF6 und 530 mit geringerer Malignität. Einbezogen wurden auch die Zelllinien HT144 und WM115, die beide laut Vertreiber zur Bildung von Metastasen fähig sind, deren Neigung zur Metastasierung aber bisher nicht in Relation zu anderen Melanomzelllinien beurteilt wurde.

##### **3.1.a) Melanomzelllinie BLM**

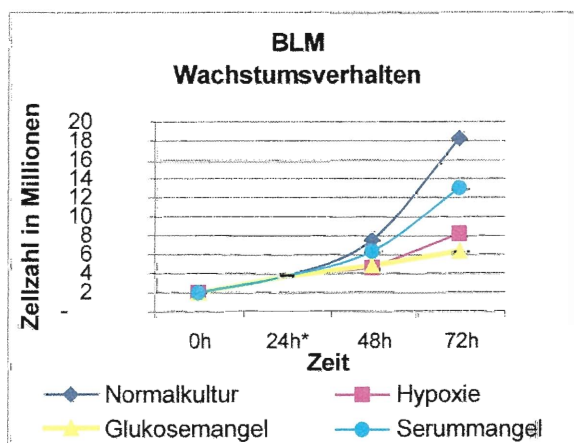


Abbildung 3.1.a) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie BLM unter Normalkultur, Hypoxie, Glukosemangel bzw. Serummangel sowie den darauffolgenden Normalkulturbedingungen.

Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

Die Melanomzelllinie BLM zeigte ein starkes Wachstum unter normalen Kulturbedingungen. Nach den ersten 48 Stunden hatte sich ihre Anzahl um den Faktor 3,7 vermehrt und erhöhte sich nach weiteren 24 Stunden nochmals um das 2,5-fache von initial 2 auf 18,2 Millionen Zellen.

Nach 24 Stunden Hypoxie nahm das Zellwachstum stark ab und resultierte in der deutlichsten Proliferationsverzögerung unter allen Stressbedingungen (61% im Vergleich zum Kontrollwert).

\* der sich in den Diagrammen widerspiegelnde 24h-Wert ist rein graphisch und nicht auf gezählten Zellzahlen basierend

Die Wachstumsrate unter Glukosemangel war mit 64,7% annähernd niedrig und wesentlich geringer als unter Serummangel (84,6%). Nach Glukosemangel blieb aber das Zellwachstum über die nächsten 24 Stunden (Reglukosierung) am deutlichsten zurück. Die Apoptoserate unter Glukosemangel belief sich auf ca. 10% und war damit am höchsten, während sie unter allen anderen Kulturbedingungen im Vergleich nur <2% betrug.

### 3.1.b) Melanomzelllinie MV3

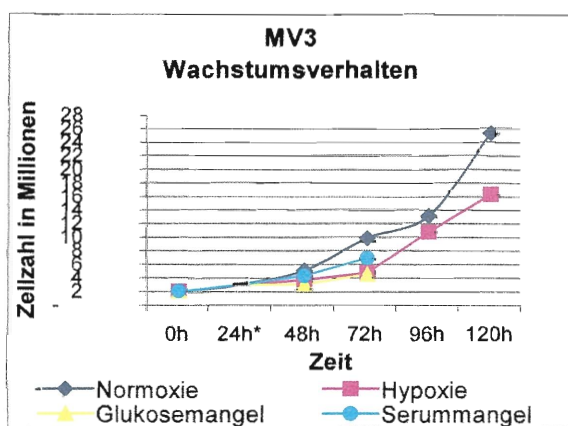


Abbildung 3.1.b) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie MV3 unter Normalkultur, Hypoxie, Glukosemangel bzw. Serummangel sowie den darauffolgenden Normalkulturbedingungen.

Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

der Kontrolle wurde innerhalb der folgenden 72-Stunden Reoxigenierung nie aufgeholt, obwohl nach den ersten 24 posthypoxischen Stunden die maximale Zellteilungsrate von 125% erreicht wurde. Sonst lag die Proliferationsrate zwischen 20-60%. Glukosemangel induzierte mit  $25,2 \pm 11,9\%$  toten Zellen die höchste Apoptoserate und ein annähernd niedriges Zellwachstum wie unter Hypoxie. Der Effekt hielt noch unter Reglukosierung an und war dabei im Vergleich zur Reoxigenierung sogar noch stärker ausgeprägt. Die Apoptoserate bei den übrigen Proben belief sich unter Hypoxie um 5%, sonst lag sie im

Die Zellzahl der Linie MV3 erreichte nach 48h den zwei bis dreifachen Wert der zu Versuchsbeginn eingesetzten zwei Millionen Zellen und verdoppelte sich in den nachfolgenden 24h. Ein weiterer Tag ließ die Melanomzellzahl um nochmals 135% zunehmen und sie erreichten mit 25,2 Millionen Zellen nach 120h unter Normalkultur ihre maximale Anzahl.

Hypoxie ergab mit Zellzahlen zwischen 2,4 und 5,05 Millionen die deutlichste Wachstumsverzögerung aller Mangelbedingungen. Der Rückstand zur Zellzahl

\* der sich in den Diagrammen widerspiegelnde 24h-Wert ist rein graphisch und nicht auf gezählten Zellzahlen basierend

Schnitt unter 2%.

### 3.1.c) Melanomzelllinie HT 144

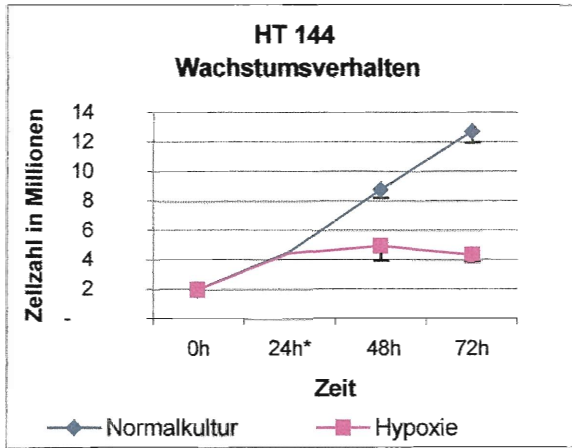


Abbildung 3.1.c) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie HT144 unter Normalkultur, Hypoxie und Reoxigenierung.

Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

Für die Zelllinie HT144 ergab sich mit 8,75 Millionen Zellen für den 48-h-Wert eine Vervierfachung der Ausgangszellzahl. Die Zellzahl des 72-h-Kontrollwertes belief sich auf 12,7 Millionen. Unter hypoxischen Bedingungen erreichte die Zellzahl 4,95 Millionen wobei der prozentuale Anteil toter Zellen 21% betrug. Nach Reoxigenierung fiel die Zellzahl auf 4,4 Millionen ab mit einem prozentualen Anteil von 11% toter Zellen, d.h. es fand in der posthypoxischen Phase nahezu keine Zellteilung mehr statt.

### 3.1.d) Melanomzelllinie WM 115

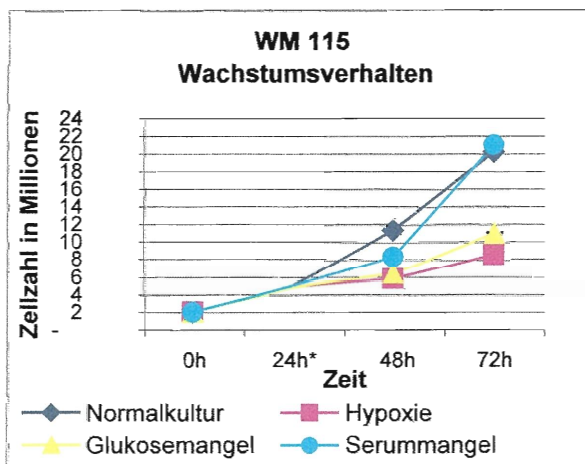


Abbildung 3.1.d) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie WM115 unter Normalkultur, Hypoxie, Glukosemangel bzw. Serummangel sowie den darauffolgenden Normalkulturbedingungen.

Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

Bei den Zellen der Linie WM115 vermehrten sich die eingesetzten 2 Millionen Zellen auf 11,4 Millionen beim ersten (48-Stunden-)Kontrollwert und auf 20,2 Millionen beim zweiten Kontrollwert. Hypoxie bewirkte die stärkste Wachstumsminde- rung und einen Anstieg der Zellzahl von 2 auf 5,8 Millionen. Unter Serummangel zeigte sich die geringste Wachstumshemmung. Nach Beendigung dieser Stressbedingung reagierten WM115 mit 2,5-fachen

\* der sich in den Diagrammen widerspiegelnde 24h-Wert ist rein graphisch und nicht auf gezählten Zellzahlen basierend

Zunahme der Zellzahl binnen 24 Stunden, unter Reoxigenierung allerdings nur mit einer Zunahme von 67%. Die Auswirkungen von Glukosemangel und folgender Stressbeendigung auf die Zellen lagen dazwischen. Die Anzahl toter Zellen lag bei allen Experimenten unter 3%. Entsprechend waren die Melanomzellen der Linie WM115 am unempfindlichsten gegenüber allen Stressbedingungen.

### 3.1.e) Melanomzelllinie IF6

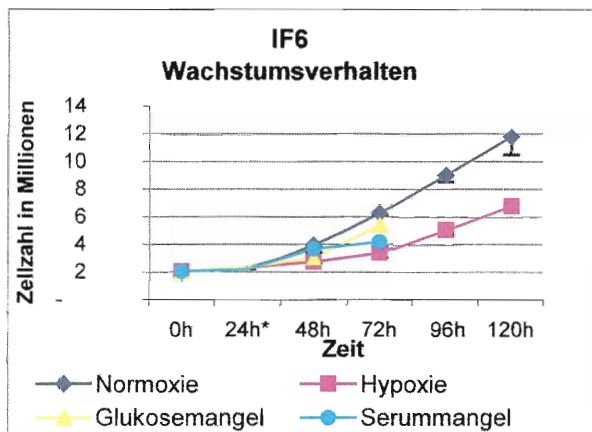


Abbildung 3.1.e) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie IF6 unter Normalkultur, Hypoxie, Glukosemangel bzw. Serummangel sowie den darauffolgenden Normalkulturbedingungen.

Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings fand sich nach Zugabe von Serum keine Erhöhung der Zellzahl binnen weiterer 24 Stunden.

Die Zellletalität unter kontrollierten Mangelbedingungen war unter Glukosemangel oder Hypoxie am stärksten ausgeprägt und betrug maximal 7,4% bzw. 12%. Eine ähnlich hohe Apoptoserate zeigte sich nach 120 Stunden unter Normalkulturbedingungen. Unter allen anderen Kulturbedingungen lag die Zellviabilität durchschnittlich bei über 94%.

Innerhalb der ersten 48 Stunden unter Normalbedingungen verdoppelten IF6 Melanomzellen ihre Zellzahl. Im weiteren Verlauf der Kulturdauer senkte sich die Zunahme der Zellzahl von  $53 \pm 2,4$  % nach 72 Stunden bis auf schließlich 30% nach 120 Stunden. Die stärkste Wachstumshemmung erfolgte unter Hypoxie.

Dieser Effekt hielt auch nach Reoxigenierung noch einen Tag an. Demgegenüber zeigten 24 Stunden Serummangel keine Änderung der

\* der sich in den Diagrammen widerspiegelnde 24h-Wert ist rein graphisch und nicht auf gezählten Zellzahlen basierend

### 3.1.f) Melanomzelllinie 530

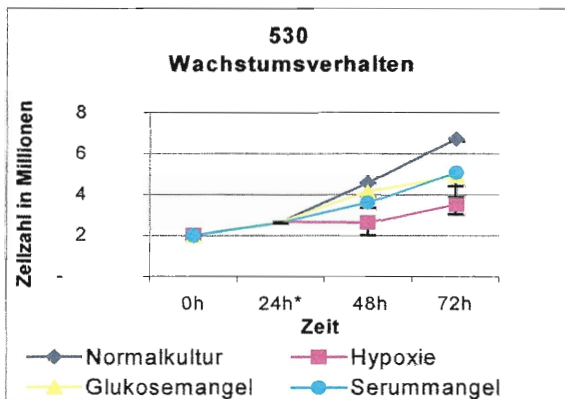


Abbildung 3.1.f) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie 530 unter Normalkultur, Hypoxie, Glukosemangel bzw. Serummangel sowie den darauffolgenden Normalkulturbedingungen.

Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

Für die Melanomzelllinie 530 zeigte sich eine Zellzahlzunahme in den ersten 48 Stunden auf 4,3 Millionen Zellen. Nach weiteren 24 Stunden stieg deren Anzahl noch mal um 50%. Die stärkste Wachstumshemmung wurde durch Hypoxie (2,6 Millionen Zellen) erreicht, gefolgt von Serummangel (3,2 Millionen Zellen) und Glukosemangel (3,8 Millionen Zellen).

Bei nachfolgender Kultur unter Normalbedingungen blieben die für 24 Stunden hypoxischen Zellen am

deutlichsten im Wachstum zurück. Gleichzeitig war unter Hypoxie die Viabilität der Zellen mit 76% am geringsten. Die Zellen der Linie 530 waren diejenigen mit der geringsten Wachstumstendenz aller getesteten Melanomzelllinien.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die aus Metastasen rekrutierten, hochmalignen Melanomzellklone BLM und MV3 eine deutlich höhere Wachstumsrate haben als die niedrigmalignen Linien IF6 und 530. Unter den getesteten Stressbedingungen reagierten sie entsprechend weniger ausgeprägt mit einer Wachstumsverzögerung und regenerierten sich unter nachfolgender Kulturnormalisierung wieder schneller (Ausnahme MV3 unter Glukosemangel bzw. Reglukosierung, s.u.). Für alle getesteten Melanomzelllinien zeigte sich unter Hypoxie die stärkste Wachstumsverzögerung unter allen direkten Streßbedingungen. Diese hielt meist noch in der posthypoxischen Kulturphase an.

Je höher die Zellteilungspotenz der Zelllinien war, umso ausgeprägter fielen die jeweiligen Wachstumseinbußen und Apoptoseraten unter Glukosemangel und vor allem nach Reglukosierung aus. Bei BLM und MV3 führte Glukosemangel jeweils zur

\* der sich in den Diagrammen widerspiegelnde 24h-Wert ist rein graphisch und nicht auf gezählten Zellzahlen basierend

höchsten Apoptoserate und nach Reglukosierung zeigte sich bei beiden Zelllinien die absolut stärkste Wachstumsreduktion aller Poststressbedingungen. Unter diesen beiden Kulturbedingungen proliferierten die Zellen der Linie MV3 sogar weniger als die der niedrigmalignen Zelllinien IF6 und 530, die in ihrem Zellwachstum nicht so ausgeprägt glukoseabhängig waren.

Die Zelllinien HT144 (aus einer Hautmetastase) und WM115 (aus einem Primärtumor) entsprachen in ihrem stark ausgeprägten Wachstumsverhalten am ehesten MV3 bzw. BLM. Die Melanomzellen der Linie WM115 zeigten sogar die höchste Zellteilungsrate aller Zelllinien, wenn auch das Zellwachstum und die Viabilität weniger stark glukoseabhängig waren als bei den hochmalignen Zelllinien MV3 und BLM.

## **3.2. ELISA**

Die verwendeten Medien enthielten keine Zytokine bzw. Chemokine in nachweisbaren Konzentrationen, welche die Ergebnisse der untersuchten Zellen hätten verfälschen können.

### **3.2.1. Veränderungen der Sekretion angiogenetischer Zytokine unter Hypoxie, Reoxigenierung, Serum- und Glukosemangel**

Anhand des Wachstumsverhaltens der Melanomzelllinien zeigten sich deutliche Unterschiede im Vergleich der hochmalignen Zelllinien von BLM und MV3 mit den niedrigmalignen Zelllinien IF6 und 530 sowie den Zelllinien HT144 und WM115.

Im zweiten Teil der vorliegenden Studie wurde das Sekretionsverhalten der verschiedenen Melanomzelllinien sowie von normalen Melanozyten, Fibroblasten und Endothelzellen untersucht. Wie in Kapitel 2.1.2.3. beschrieben, wurden dazu die nach 24 bzw. 48 Stunden in den Überständen detektierten Zytokinmengen der unter Kontrollbedingungen kultivierten Zellen mit denen unter Stress- bzw. Poststressbedingungen kultivierten Zellen verglichen.

Von besonderem Interesse war die Fragestellung, ob sich dabei für die Melanomzelllinien in Bezug auf Malignitätsgrad und Veränderungen unter Mangelsituationen charakteristische Unterschiede nachweisen lassen.

### **3.2.1.1. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

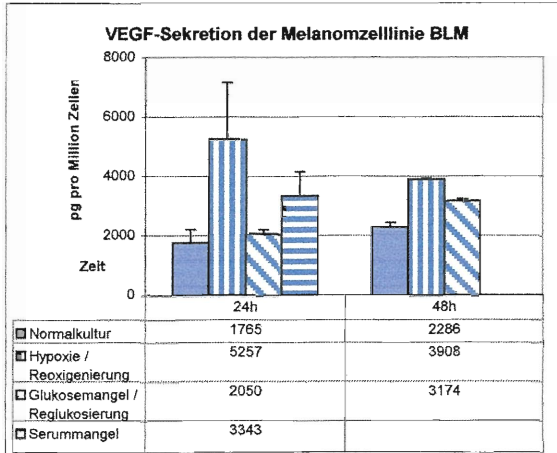
#### **3.2.1.1.1. VEGF-Sekretion durch Melanomzellen**

Nach 24 Stunden unter normalen Kulturbedingungen sezernierten die hochmalignen Zelllinien BLM und MV3 im Mittel deutlich höhere VEGF-Mengen in die Überstände als die Melanomzellen IF6 und 530 mit geringerer Malignität ( $p < 0,025$ ). Mit zunehmender Kultivierungsdauer zeigte sich vor allem bei der Zelllinie MV3, aber auch bei BLM, HT144 und WWM115 eine noch weiter ansteigende VEGF-Sekretion, die Zelllinien IF6 und 530 hingegen veränderten das Niveau ihrer Kontrollwerte nicht bzw. senkten es in Abhängigkeit der Zeit oder der damit verbundenen Zelldichte.

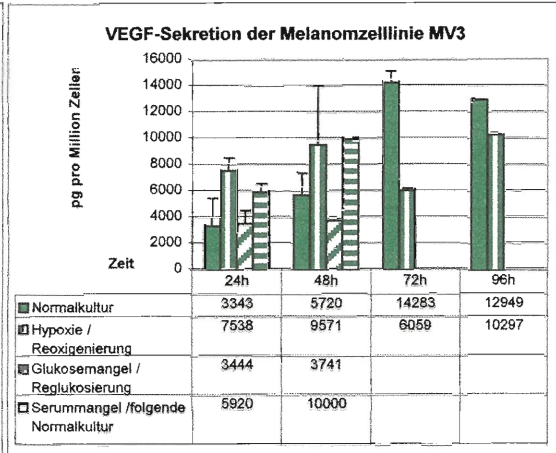
Auf Hypoxie reagierten alle Melanomzellen uniform mit einer signifikanten Zunahme ihrer VEGF-Sekretion ( $p < 0,01$ ; MV3 und IF6  $n=4$ ; BLM und 530  $n=3$ ; HT144 und WM115  $n=1$ ). Dabei steigerten die Zelllinien, deren 24-Stunden-Kontrollwerte gering ausfielen (IF6 und HT144), ihre Zytokinsekretion so stark, dass sich nach 24h Hypoxie keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Malignitätsgraden nachweisen ließen. Eine Ausnahme bildeten die Zellen der Linie 530. Mit maximal 170 pg VEGF pro Million Zellen übertrafen sie den unter Normalkulturbedingungen erhaltenen Kontrollwert um ein 12-faches, erreichten aber nicht die sehr hohen Werte ( $> 1000 \text{ pg}/10^6$  Zellen) der anderen Zelllinien.

Unter der nach 24 Stunden Hypoxie erfolgten Reoxigenierung sezernierten alle Melanomzelllinien weiterhin erhöhte VEGF-Mengen. Bezüglich der Malignität der jeweiligen Zelllinien unterschieden sich die Ergebnisse nicht signifikant. Die Zelllinien IF6 und BLM sezernierten ungefähr gleiche VEGF-Level nach Reoxigenierung (jeweils  $n=2$ ). Die Linie MV3 gab im Mittel mit 9570 pg pro  $10^6$  Zellen deutlich am meisten VEGF in den Überstand ab ( $n=3$ ). Die Zellen von HT144 ( $\sim 1230 \text{ pg}/10^6$  Zellen;  $n=1$ ) und besonders 530 ( $\sim 3 \text{ pg}/10^6$  Zellen;  $n=1$ ) fielen durch ihre niedrigen Werte auf.

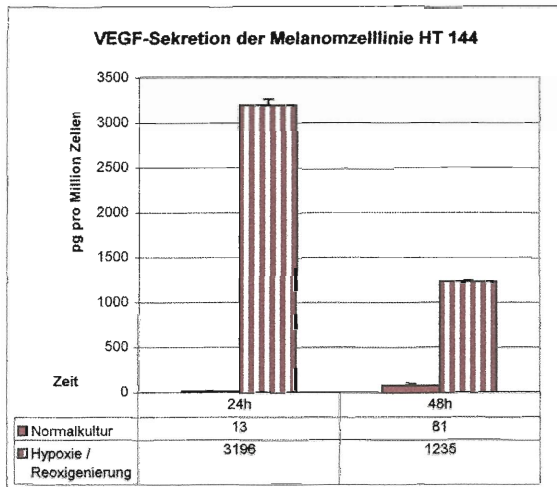
**Tabellen 3.2.1.1.a-f.) VEGF-Sekretion durch Melanomzellen**



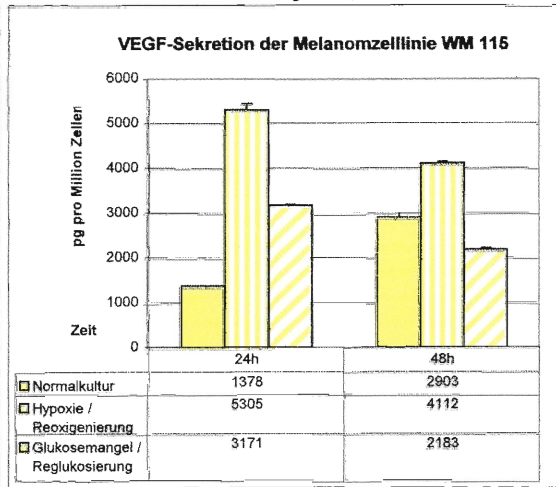
Tab.3.2.1.1.a) Melanomzelllinie BLM Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=3, alle anderen n=2



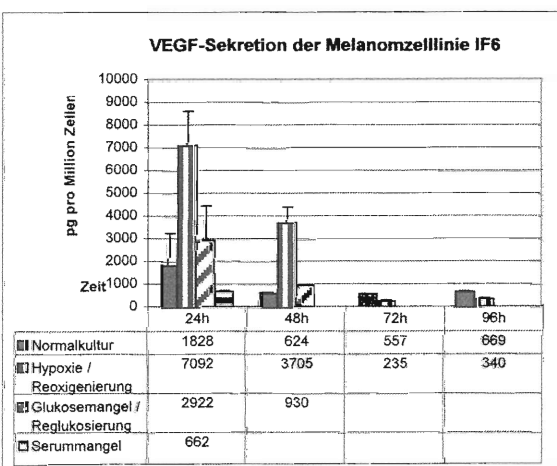
Tab.3.2.1.1.b) Melanomzelllinie MV3 Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=4, Reoxigenierung n=3, Glukose- und Serummangel n=2, alle anderen n=1



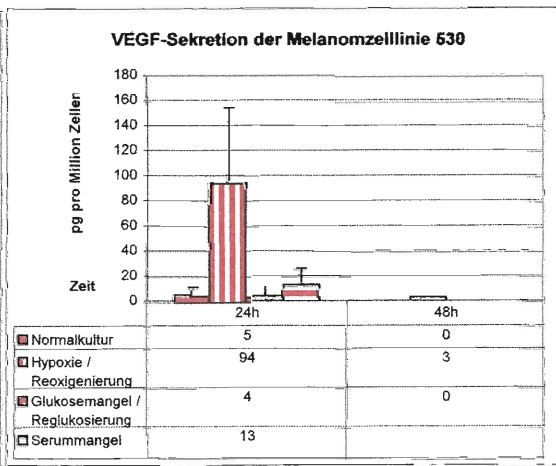
Tab.3.2.1.1.c) Melanomzelllinie HT 144 Versuchszahl n für alle Versuche n=1



Tab.3.2.1.1.d) Melanomzelllinie WM115 Versuchszahl n für alle Versuche n=1



Tab.3.2.1.1.e) Melanomzelllinie IF6 Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=4; Reoxigenierung, Glukose- und Serummangel n=2; alle anderen n=1



Tab.3.2.1.1.f) Melanomzelllinie 530 Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=3, Glukose- und Serummangel n=2; alle anderen n=1



Der Entzug von Glukose über 24 Stunden führte zu einer für alle getesteten Melanomzellen signifikanten Zunahme der VEGF-Sekretion ( $p < 0,01$ ), obwohl die Zelllinien MV3 und 530 in je nur einem von zwei Experimenten reagierten. Analog zur Reaktion auf Hypoxie wiesen die Ergebnisse keine Korrelation zwischen metastatischer Potenz und Zytokinlevel auf.

Nach 24-stündiger Reglukosierung zeigte sich bei den Zelllinien BLM ( $n=2$ ) und MV3 ( $n=1$ ) ein noch höherer Anstieg der VEGF-Sekretion als schon unter Glukosemangel. Die von den Zelllinien IF6 und WM115 (jeweils  $n=1$ ) abgegebenen VEGF-Mengen sanken nach Reglukosierung im Vergleich zu den unter Glukosemangel erhaltenen Werten ab, bezüglich ihrer 48-Stunden-Kontrollwerte blieben sie aber erhöht.

Serummangel zeigte in je zwei Experimenten stets eine Steigerung der VEGF-Sekretion für die Zellen von BLM um  $\sim 60\%$ , die Zelllinien MV3 und 530 reagierten uneinheitlich und die Zelllinie IF6 senkte ihre Zytokinabgabe in beiden Versuchen um rund  $40\%$ .

Als einzige der getesteten Mangelbedingungen führte der Entzug von Sauerstoff in allen Versuchen zu einer deutlichen und meistens sogar maximalen Zunahme der VEGF-Sekretion der jeweiligen Melanomzelllinien unabhängig vom Malignitätsgrad.

### 3.2.1.1.2. VEGF-Sekretion durch Melanozyten

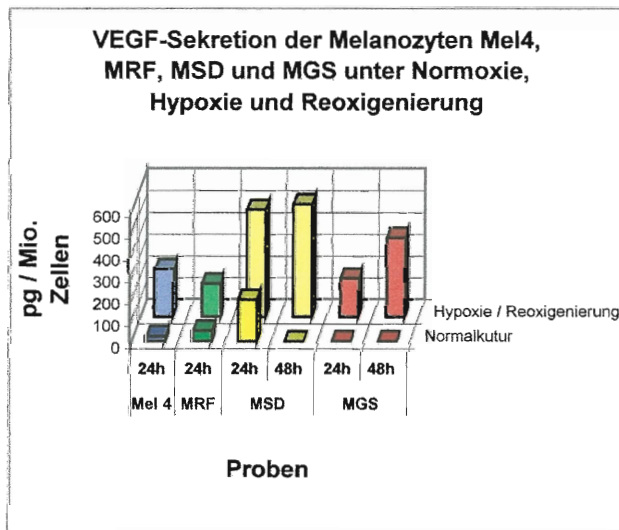


Abbildung 3.2.1 zeigt die VEGF-Sekretion der vier getesteten Melanozyten unter Normoxie und Hypoxie bzw. Reoxigenierung. Es wurde je ein Experiment ( $n=1$ ) durchgeführt

Die nach 24 Stunden unter Normalbedingungen ermittelten Kontrollwerte der primären Melanozyten Mel 4, MGS, MRF (jeweils  $n=1$ ) und MSD ( $n=3$ ) waren unterschiedlich. Bei den Zellen MSD wurden  $191,4 \pm 80,2$  pg VEGF pro  $10^6$  Zellen gemessen. Bei MGS war kein VEGF im Zellüberstand nachweisbar. Im Vergleich zu den niedrigmalignen Melanomzelllinien 530 und IF6 waren keine signifikanten Unterschiede in der

VEGF-Sekretion nachzuweisen. Entsprechend lagen die Werte aber deutlich unter denen der hochmalignen Melanomzellen ( $p < 0,005$ ).

Unter Hypoxie und nach Reoxigenierung (nur MSD und MGS ; jeweils  $n=1$ ) stieg bei allen Melanozyten die VEGF-Menge im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollwerten an. Die höchsten Zytokinmengen sezernierten die Zellen MSD mit bis zu 490 pg bzw. 520 pro  $10^6$  Zellen.

Serummangel bewirkte nur im Bereich der Standardabweichung in einem von einem Versuch mit MRF eine Abnahme auf die Hälfte des Kontrollwertes. Auch unter Hypoxie entsprachen die getesteten normalen Melanozyten der niedrigmalignen Melanomzelllinie 530 in ihrem Sekretionsverhalten.

#### **3.2.1.1.3. VEGF-Sekretion durch Endothelzellen**

Bei den primären Endothelzellen ließ sich sowohl bei HDMEC ( $n=1$ ) als auch bei HUVEC ( $n=2$ ) unter Kontrollbedingungen, Hypoxie, Reoxigenierung und Serummangel kein VEGF in den Zellüberständen nachweisen.

Bei der mikrovaskulären Zelllinie HMEC-1 ergab ein Versuch eine basale Sekretion von  $12,2 \pm 0,95$  pg pro  $10^6$  Zellen. Auf Hypoxie reagierte die Zelllinie HMEC-1 mit einer 6-fachen Steigerung der VEGF-Sekretion.

Unter Serummangel sezernierten die HMEC-1-Zellen die 1,4-fache Menge VEGF im Vergleich zur Kontrolle unter normalen Kulturbedingungen.

#### **3.2.1.1.4. VEGF-Sekretion durch Fibroblasten**

In je einem Experiment mit den Fibroblastenzellen FGS und FPJ und in zwei Versuchen mit HFF ergaben sich für eine Million Zellen unter normalen Kulturbedingungen 24-Stunden-Kontrollwerte für VEGF von 0 pg (FGS),  $843 \pm 3$  pg (FPJ) bzw.  $408,2 \pm 52,3$  pg (HFF). Der 48-Stunden-Kontrollwert belief sich für die Fibroblasten FGS auf  $358,7 \pm 7,2$  pg und für HFF auf  $131,4 \pm 5,8$  pg VEGF pro Million Zellen. Die beiden Zellstämme verhielten sich also mit zunehmender Kulturdauer gegenläufig in ihrer VEGF-Freisetzung.

Unter hypoxischen Zellkulturbedingungen sezernierten die Fibroblasten FGS  $3154,3 \pm 3,3$  pg VEGF pro  $10^6$  Zellen. Die Zellen FPJ und HFF steigerten ihre Sekretion um das 6- bzw. 10,7-fache im Vergleich zu den 24-Stunden-Kontrollwerten. Die unter Reoxigenierung freigesetzte VEGF-Menge betrug das 5 bis 10-fache des 48-Stunden-Kontrollwertes, fiel aber bei beiden Zellstämmen im Vergleich zu den unter Hypoxie sezernierten Niveaus auf die Hälfte ab.

Unter Serumangel sezernierten die Fibroblasten HFF rund 40% mehr VEGF als nach 24 Stunden unter Kontrollbedingungen.

Zusammengefasst ließ sich grundsätzlich in jedem Versuch eine VEGF-Sekretion bei allen melanozytären Zellen (außer bei MGS unter Kontrollbedingungen) feststellen. Hierbei zeigte sich kein eindeutiger Unterschied zwischen normalen Melanozyten und Melanomzellen im allgemeinen, wohl aber eine signifikante Differenzierung zwischen niedrigmalignen Melanomzellen und normalen Melanozyten auf der einen und hochmalignen Melanomzellen auf der anderen Seite.

Auf Hypoxie reagierten alle melanozytären Zellen gleichartig mit einer deutlichen Steigerung ihrer VEGF-Sekretion. Dabei steigerte die niedrigmaligne Melanomzelllinie IF6 ihre Sekretion so stark, dass keine signifikanten Unterschiede mehr zu den hochmalignen Melanomzelllinien (BLM und MV3) bestanden. Normale Melanozyten und die niedrigmaligne Melanomzelllinie 530 steigerten ihre VEGF-Freisetzung unter Hypoxie relativ gesehen wesentlich stärker, blieben aber in ihren absolut abgegebenen Zytokinmengen deutlich unter dem Niveau der übrigen Melanomzelllinien.

Ein klarer Unterschied in der VEGF-Sekretion bestand zwischen den Zellen melanozytären Ursprungs und primären Endothelzellen. Nur die immortalisierte Endothelzelllinie HMEC-1 setzte überhaupt VEGF frei. Diese HMEC-1 reagierten auf Hypoxie wie die Melanomzellen mit einer Sekretionssteigerung.

Fibroblasten ähnelten in ihrem VEGF-Sekretionsverhalten den melanozytären Zellen. Abgesehen von normalen Endothelzellen besitzen alle getesteten Zelltypen die Potenz, VEGF zu sezernieren. Alle diese Zellen reagieren auf Hypoxie und nach Reoxigenierung mit einer erhöhten VEGF-Freisetzung.

### **3.2.1.2. Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF)**

#### **3.2.1.2.1. b-FGF-Sekretion durch Melanomzellen**

Für die Höhe der b-FGF-Sekretion ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den hoch- und geringmalignen Melanomzelllinien. Die abgegebenen b-FGF-Mengen nach 24 Stunden unter normalen Kulturbedingungen betrugen zwischen 0,3 pg (WM115) und 3,3 pg (MV3) pro  $10^6$  Zellen. Während bei der Zelllinie MV3 die b-FGF-Sekretion mit der Dauer der Kultivierungszeit auf maximal 13,8 pg pro  $10^6$  Zellen nach 96 Stunden zunahm, zeigten alle anderen Melanomzelllinien keine über die Kulturdauer zunehmende b-FGF-Freisetzung.

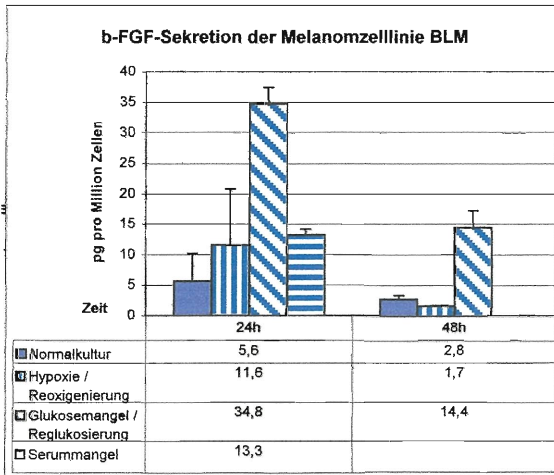
Auf Hypoxie reagierten alle Melanomzellen mit einer signifikanten Steigerung ihrer b-FGF-Sekretion um das 2 bis 4,5-fache ( $p < 0,005$ ; MV3  $n=6$ ; IF6  $n=4$ ; BLM und 530  $n=3$ ; HT144 und WM115  $n=2$ ). Ebenso wie unter Kontrollbedingungen ließ sich keine Abhängigkeit der Zytokinmenge von der Malignität nachweisen.

Reoxigenierung ergab bei den Zelllinien IF6 ( $n=3$ ) und 530 ( $n=2$ ) einen zum Kontrollwert deutlich erhöhten Zytokinspiegel ( $p < 0,05$ ). Die Zelllinien WM115 und HT144 zeigten ein gleichförmiges Verhalten. Die hochmalignen Zelllinien BLM ( $n=2$ ) und MV3 ( $n=3$ ) sezernierten hingegen tendenziell geringere b-FGF-Mengen als unter Kontrollbedingungen (nicht signifikant).

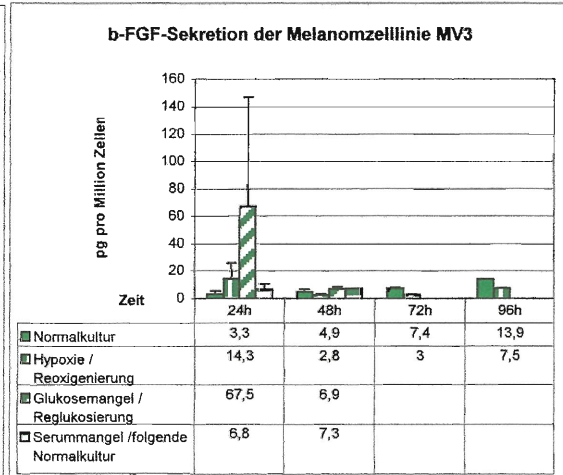
Auf Glukosemangel und Reglukosierung antworteten BLM und MV3 in je zwei Experimenten mit einer im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollwerten bis zu 30-fachen Steigerung der b-FGF-Sekretion ( $p < 0,05$ ). Unter Glukosemangel wurden von MV3 in einem von drei Versuchen mit 180 pg b-FGF pro  $10^6$  Zellen die höchste b-FGF-Menge aller Melanomzellen sezerniert. Entsprechend unterschieden sich die absoluten Zytokinmengen der beiden hochmalignen Zelllinien deutlich von denen der niedrigmalignen Melanomzellen ( $p < 0,025$ ).

Auch die Zelllinien 530 ( $n=2$ ) und WM115 ( $n=1$ ) erhöhten auf Glukoseentzug und folgende Reglukosierung die b-FGF-Abgabe. Die Zelllinie IF6 reagierte auf Glukosemangel mit der Reduktion ihrer b-FGF-Sekretion und kehrte unter nachfolgenden Normalbedingungen in den Bereich der 48-Stunden-Kontrollwerte zurück ( $n=2$ ).

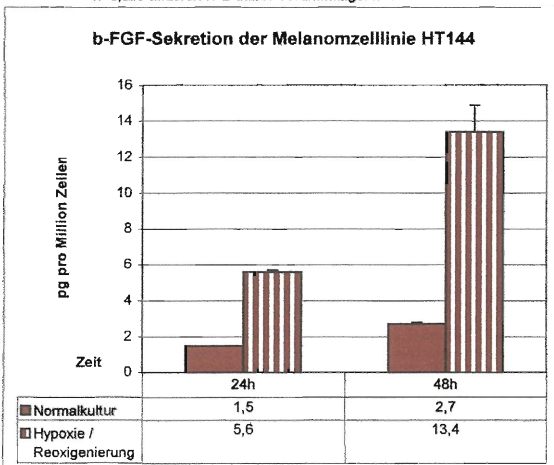
**Tabellen 3.2.1.2.a-f.) b-FGF-Sekretion durch Melanomzellen**



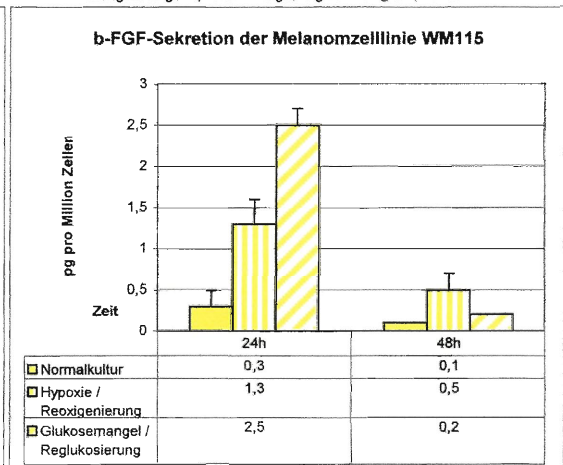
Tab.3.2.1.2.a) Melanomzelllinie BLM Versuchszahl n für Normalkultur, Hypoxie, n=3; alle anderen n=2 außer Serummangel n=1



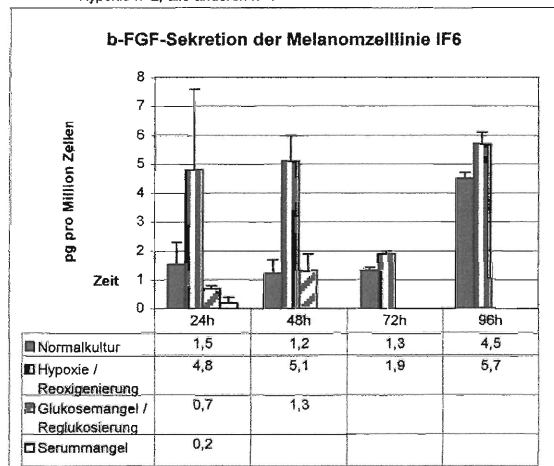
Tab.3.2.1.2.b) Melanomzelllinie MV3 Versuchszahl n für Normalkultur, Hypoxie n=6; Reoxygenierung n=4; Glukosemangel, Reglukosierung n=3, alle anderen n=1



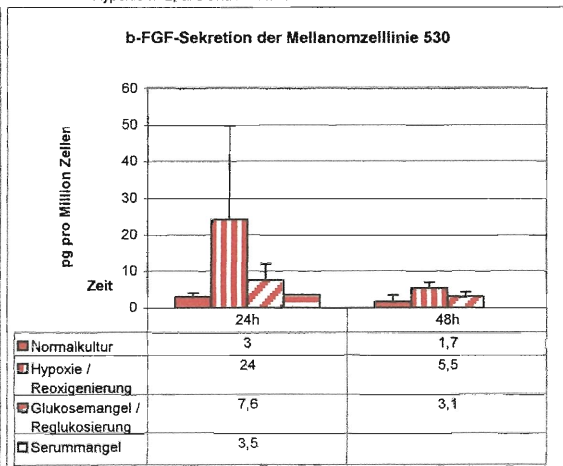
Tab.3.2.1.2.c) Melanomzelllinie BLM Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=2; alle anderen n=1



Tab.3.2.1.2.d) Melanomzelllinie WM115 Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=2; alle anderen n=1



Tab.3.2.1.2.e) Melanomzelllinie IF6 Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=4; Reoxygenierung n=3; alle anderen n=2 außer Serummangel n=1



Tab.3.2.1.2.f) Melanomzelllinie 530 Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=3; alle anderen n=2 außer Serummangel n=1

Serummangel beeinflusste die b-FGF-Sekretion der Melanomzelllinien BLM, IF6 und 530 nicht (jeweils n=1). MV3 reagierte mit einer im Bereich der Standardabweichung des 24h-Kontrollwertes gelegenen Zunahme der b-FGF-Sekretion (n=1).

#### **3.2.1.2.2. b-FGF-Sekretion durch Melanozyten**

Die b-FGF-Werte für normale Melanozyten wurden unter Normal- und Hypoxiebedingungen in je einem Versuch ermittelt. Nur im „high-sensitivity-Elisa“ waren Proteinmengen bei Mel 4 und MGS messbar. In den Überständen der Zellen MRF und MSD ließ sich kein b-FGF nachweisen. Unter Kontrollbedingungen zeigten Mel 4 die höchste Sekretion mit knapp 4 pg pro  $10^6$  Zellen. Auf Hypoxie reagierten die Zellen von MGS und Mel 4 mit einer nach Reoxigenierung reversiblen Hochregulation ihrer b-FGF-Ausschüttung um das 2 bis 3-fache während MSD keine Sekretionsänderungen auf Hypoxie und Reoxigenierung zeigte.

#### **3.2.1.2.3. b-FGF-Sekretion durch Endothelzellen**

Die Endothelzellen HDMEC (n=3) und HUVEC (n=3) gaben unter normalen Kulturbedingungen b-FGF in Höhe von  $124 \pm 71$  bzw.  $80 \pm 42$  pg pro  $10^6$  Zellen in den Überstand ab.

Unter Hypoxie ergaben sich sowohl für die mikro- als auch die makrovaskulären Endothelzellen keine signifikanten Veränderungen (jeweils n=3). Nach Reoxigenierung stieg die b-FGF-Sekretion bei HUVEC in zwei Experimenten im Vergleich zum 48h-Kontrollwert auf knapp das Doppelte an. Auf Serummangel reagierten HDMEC und HUVEC in je einem Versuch nicht.

HMEC-1 hatten deutlich niedrigere 24h-Kontrollwerte von  $19,4 \pm 0,2$  pg b-FGF pro  $10^6$  Zellen, stiegen aber unter Hypoxie auf das 1,6-fache dieses Wertes an (n=1). Serummangel bewirkte einen Abfall der Sekretion auf 16 % des Kontrollwertes in einem Versuch.

#### 3.2.1.2.4. b-FGF-Sekretion durch Fibroblasten

Unter normalen Kulturbedingungen sezernierten die verschiedenen Fibroblastenzellen FGS  $13,3 \pm 0,5$  pg pro  $10^6$  Zellen, FPJ  $8,2 \pm 0,04$  pg pro  $10^6$  Zellen und HFF  $27,3 \pm 2,1$  pg b-FGF pro  $10^6$  Zellen. In je einem von einem Versuch bei FGS und FPJ stieg die b-FGF-Sekretion unter Hypoxie um das 2- bzw. 3,5-fache an. Für HFF ergaben sich in zwei Versuchen widersprüchliche Ergebnisse. Es zeigte sich in einem Experiment eine Steigerung der b-FGF-Sekretion um das  $\sim 1,4$ -fache, ein anderes zeigte keine Veränderung. Die Fibroblasten FGS veränderten über die Zeit ihre basale b-FGF-Sekretion nur geringfügig. Somit belief sich nach 48 Stunden der Kontrollwert bei FGS (n=1) auf nahezu den Wert des 24 Stunden-Niveaus. Bei HFF (n=1) fiel er im Vergleich zu letzterem auf die Hälfte ab. Reoxigenierung bewirkte bei den Zellen HFF keine Veränderung, während bei FGS eine um  $59 \pm 2,5$  % erhöhte b-FGF-Sekretion zu messen war. Unter Serumangel sezernierten HFF Fibroblasten  $64,7 \pm 4,45$  pg b-FGF pro  $10^6$  Zellen und verdoppelten damit ihre b-FGF-Abgabe im Vergleich zur 24h-Kontrolle. Aufgrund der Befunde ergibt sich kein klares, für Fibroblasten allgemein zutreffendes b-FGF-Sekretionsmuster, auch wenn die hypoxiebedingte Sekretionszunahme eine für alle getesteten Fibroblasten mögliche Reaktion ist.

Insgesamt besaßen also alle melanozytären Zelltypen die Fähigkeit, b-FGF zu sezernieren, auch wenn b-FGF z.T. nur in geringen Mengen und nicht bei allen primären Melanozyten (3 von 4 Zellstämme b-FGF positiv) nachweisbar war. Alle melanozytären Zellen reagierten auf Hypoxie mit einer Sekretionssteigerung. Soweit getestet stellte Glukosemangel vor allem bei den schnellwachsenden Melanomzelllinien einen noch stärkeren Reiz zur b-FGF-Freisetzung dar. Dabei unterschieden sich die hochmalignen Melanomzelllinien BLM und MV3 signifikant von den niedrigmalignen Melanomzelllinien.

Während Fibroblasten ein zu den melanozytären Zellen ähnliches Sekretionsverhalten aufwiesen, unterschieden sich Endothelzellen von diesen in zwei Punkten. Endothelzellen besaßen unter normalen Kulturbedingungen eine grundsätzlich höhere b-FGF-Sekretion als melanozytäre Zellen und erhöhten ihre b-FGF-Freisetzung erst unter Reoxigenierung.

### **3.2.1.3. Angiogenin (ANG)**

#### **3.2.1.3.1. Angiogenin-Sekretion durch Melanomzellen**

Bei den untersuchten Melanomzelllinien ergab sich ein signifikanter Unterschied in den sezernierten Angiogenin-Mengen unter normalen Kulturbedingungen zwischen den hoch- und niedrigmalignen Zelllinien ( $p < 0,01$ ). Die mittleren Angiogeninmengen der Zelllinien BLM ( $n=2$ ) und MV3 ( $n=4$ ) lagen mit 750 bzw. knapp 1000 pg pro Million Zellen deutlich höher als die der niedrigmalignen Linien IF6 ( $n=4$ ) und 530 ( $n=3$ ) mit 300-400 pg pro  $10^6$  Zellen. Die Zelllinie HT144 lag in dem für niedrigmaligne Melanomzellen gemessenen Bereich, die Zelllinie WM115 mit rund 110 pg pro  $10^6$  Zellen noch deutlich darunter (jeweils  $n=1$ ).

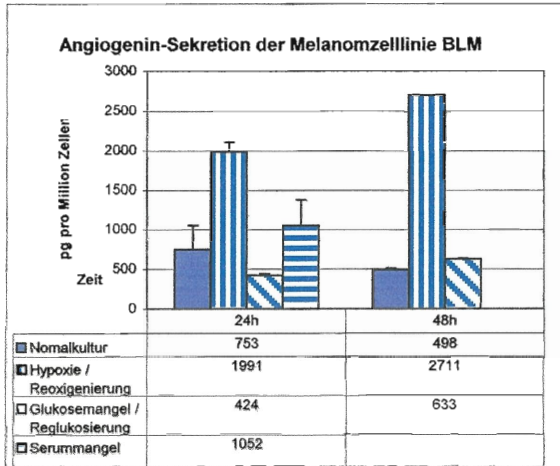
Hypoxie erzeugte in allen Melanomzelllinien eine signifikante Zunahme in der Zytokinsekretion ( $p < 0,005$ ). Dabei verdeutlichte sich die Differenz zwischen den von BLM und MV3 sezernierten Angiogenin-Mengen zu denen von Melanomzellen geringerer metastatischer Potenz ( $p < 0,001$ ; Anzahl der Versuche analog zu der unter Kontrollbedingungen).

Besonders stark reagierten die Zelllinien HT144 und WM115 auf Hypoxie und erhöhten ihre Angiogenin-Sekretion um das 6- bzw. 10-fache ihrer 24-Stunden-Kontrollwerte. Während die Zellen der Linie WM115 das Angiogenin-Niveau der Linien IF6 und 530 erreichten, lagen die unter Hypoxie sezernierten Zytokinmengen bei der Zelllinie HT144 im Bereich der hochmalignen Melanomzelllinien. Beide Zelllinien befanden sich auch nach Reoxigenierung in den entsprechenden Zuordnungsbereichen. Bei allen getesteten Melanomzelllinien blieben die nach Reoxigenierung gemessenen Angiogenin-Mengen auf deutlich erhöhtem Niveau im Vergleich zu den 48-Stunden-Kontrollwerten ( $p < 0,005$ ; MV3  $n=3$ , IF6  $n=2$ , alle anderen  $n=1$ ). Auch dabei zeigten sich klare Unterschiede in den absoluten Zytokinmengen entsprechend der Malignität der Melanomzellen, die aber aufgrund geringerer Probenzahl eine niedrigere Signifikanz ergaben ( $p < 0,1$ ).

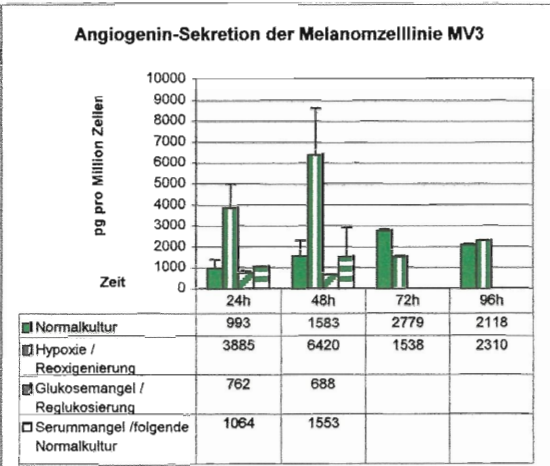
Serummangel induzierte in den Melanomzelllinien kein einheitliches Sekretionsverhalten. BLM-Zellen steigerten ihre Angiogenin-Abgabe um 40%, während die Zellen von 530, IF6 und MV3 das jeweilige Niveau ihrer 24-Stunden-Kontrollwerte



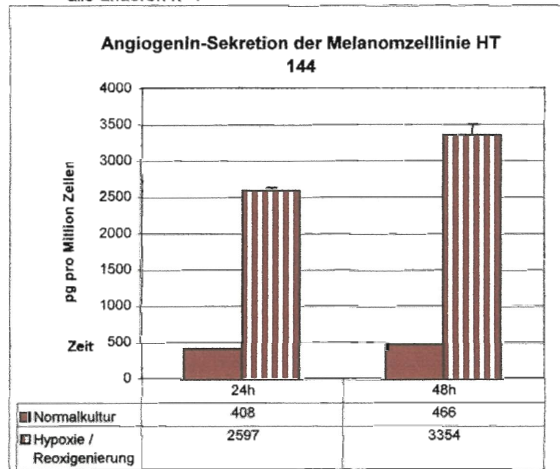
**Tabellen 3.2.1.3.a-f.) Angiogenin-Sekretion durch Melanomzellen**



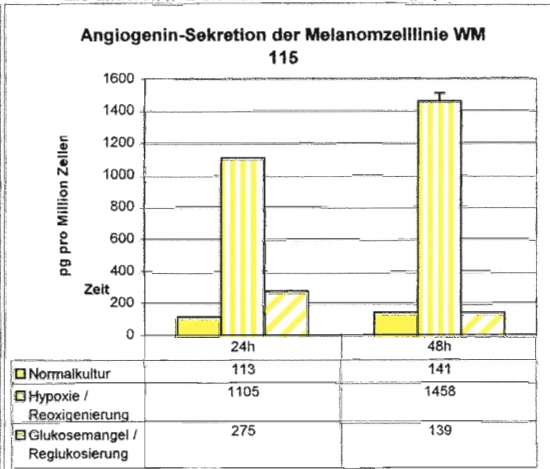
Tab.3.2.1.3.a) Melanomzelllinie BLM Versuchsanzahl n für Normalkultur, Hypoxie, Glukose- und Serummangel n=2; alle anderen n=1



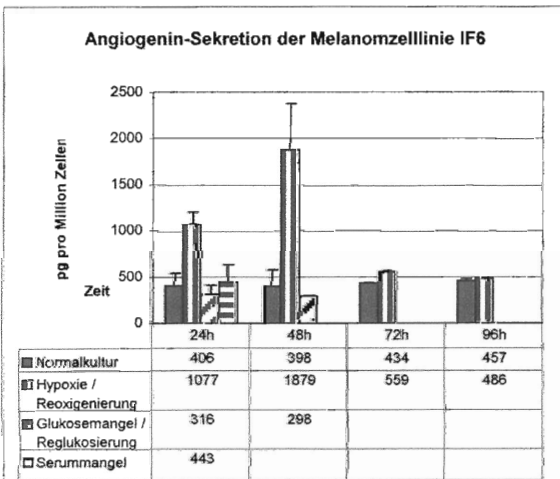
Tab.3.2.1.3.b) Melanomzelllinie MV3 Versuchsanzahl n für Normalkultur und Hypoxie n=4; Reoxigenierung n=3, alle anderen n=2 bis auf 72 und 96h Werte n=1



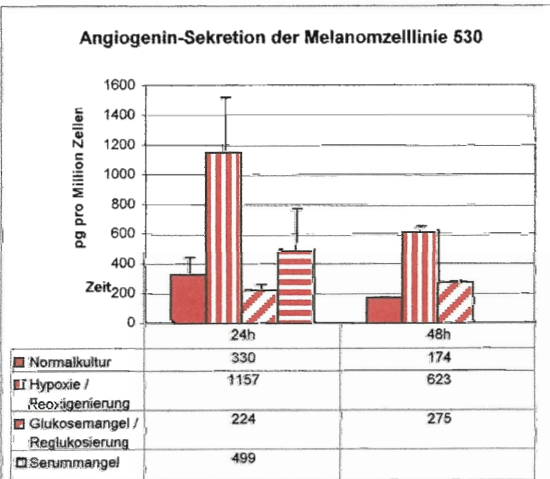
Tab.3.2.1.3.c) Melanomzelllinie HT144 Versuchsanzahl n für alle Versuche n=1



Tab.3.2.1.3.d) Melanomzelllinie WM115 Versuchsanzahl n für alle Versuche n=1



Tab.3.2.1.3.e) Melanomzelllinie IF6 Versuchsanzahl n für Normalkultur und Hypoxie n=4; Reoxigenierung, Glukose- und Serummangel n=2, alle anderen n=1



Tab.3.2.1.3.f) Melanomzelllinie 530 Versuchsanzahl n für Normalkultur und Hypoxie n=3; Glukose- und Serummangel n=2, alle anderen n=1

beibehielten (jeweils n=2). Auch wenn die Zellen der Linie MV3 keine Sekretionsveränderung unter Serumangel zeigten, waren die sezernierten Zytokinmengen der hochmalignen Linien BLM und MV3 (wie schon bei den Kontrollwerten) deutlich höher als die der niedrigmalignen Zelllinien. Die Zelllinien HT144 und WM115 wurden nicht getestet.

Im Hinblick auf Glukosemangel (jeweils n=2) und die dann folgende Reglukosierung (MV3 n=2, alle anderen n=1) ließen sich keine charakteristischen Veränderungen in der Angiogenin-Sekretion im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollwerten erkennen. Einzig WM115 zeigten in einem Versuch unter Reglukosierung eine 2,4-fache Erhöhung der Angiogenin-Menge.

#### **3.2.1.3.2. Angiogenin-Sekretion durch Melanozyten**

Die von den primären Melanozyten Mel4, MGS, MRF und MSD nach 24 Stunden unter normalen Zellkulturbedingungen sezernierten Angiogeninmengen lagen zwischen 366 und 947 pg pro  $10^6$  Zellen. Entsprechend sind sie mit den 24-Stunden-Kontrollwerten der niedrig- wie auch hochmalignen Melanomzelllinien vergleichbar.

Unter Hypoxie reagierten sie aber alle, im Gegensatz zu den Melanomzelllinien, mit einer signifikanten Senkung ihrer Angiogenin-Sekretion um ca. 50% und bis zu 85% bei Mel4 ( $p < 0,01$ , jeweils n=1 außer MSD n=3).

Während sich die basale Sekretion nach 48 Stunden bei MGS und MSD im Vergleich zum 24-Stunden-Kontrollwert nicht wesentlich veränderte, stieg die Zytokinausschüttung bei Reoxigenierung auf das 2,3- bzw. 2,5-fache der Kontrollwerte an. Bei Mel4 blieb dieser Effekt aus (jeweils n=1).

Unter Serumangel zeigte die MRF-Melanozytenkultur keine Änderungen im Sekretionsverhalten (n=1).

#### **3.2.1.3.3. Angiogenin-Sekretion durch Endothelzellen**

Die Endothelzellen HDMEC und HUVEC sezernierten unter Kontrollbedingungen rund 700 pg Angiogenin pro  $10^6$  Zellen. Unter Hypoxie stieg die Angiogeninmenge um das 1,8- bzw. das 1,4-fache an (jeweils n=2). Nach Reoxigenierung glichen sich HUVEC

mit ihren noch leicht erhöhten Angiogenin-Mengen dem 48-Stunden-Kontrollwert an (n=1).

Die HMEC-1 sezernierten mit  $149 \pm 2,2$  pg pro Million Zellen deutlich weniger Angiogenin als die nicht immortalisierten Endothelzellen. Unter Hypoxie stieg der Wert auf mehr als das 4-fache des Kontrollwertes an.

Serummangel zeigte keinen Effekt auf die Angiogenin-Sekretion der Endothelzellen (HDMEC und HMEC-1, je n=1).

#### **3.2.1.3.4. Angiogenin-Sekretion durch Fibroblasten**

Die Fibroblasten FGS, FPJ und HFF sezernierten unter normalen Kulturbedingungen zwischen  $1048 \pm 165$  und  $1665 \pm 64$  pg Angiogenin pro  $10^6$  Zellen. Diese unter Kontrollbedingungen abgegebenen Angiogenin-Mengen veränderten sich nicht in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.

Unter Hypoxie erhöhten die Fibroblasten ihre Angiogenin-Sekretion in unterschiedlichem Ausmaß (FGS 1,6-fach und FPJ 3-fach in jeweils n=1 Versuchen; HFF 2,6-fach n=2). Nach Reoxygenierung verstärkte sich dieser Effekt jeweils noch auf das bis zu 8-fache des 48-Stunden-Kontrollwertes (FGS und HFF; jeweils n=1).

Serummangel hatte keinen Einfluss auf die Angiogenin-Sekretion der Zellen von HFF (n=1).

Zusammengefaßt ließ sich bezüglich der Angiogenin-Sekretion der getesteten Zellarten folgendes feststellen:

Sezernierten niedrigmaligne Melanomzelllinien unter normalen Kulturbedingungen signifikant niedrigere Angiogenin-Mengen als hochmaligne Zelllinien, spiegelte sich die höhere Differenzierung der primären Melanozyten in keiner weiteren Verminderung der Angiogenin-Sekretion wider, sondern erreichte z.T. auch das Niveau der hochmalignen Melanomzellen.

Erst unter Hypoxie zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen normalen Melanozyten (Reduktion der Angiogenin-Sekretion) und den Melanomzellen allgemein (Sekretionssteigerung), sowie zwischen den niedrig- und hochmalignen Melanomzelllinien im Besonderen (Zunahme der Differenz).

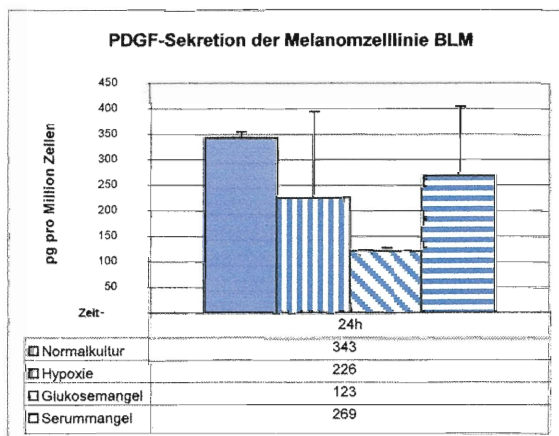
Endothelzellen wie Fibroblasten sezernierten ähnlich hohe bzw. sogar teilweise höhere Angiogenin-Mengen als die hochmalignen Melanomzelllinien. Ebenso wie diese reagierten sie auf Hypoxie mit einer Sekretionssteigerung und unterschieden sich dadurch von den differenzierten Melanozyten.

### 3.2.1.4. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)

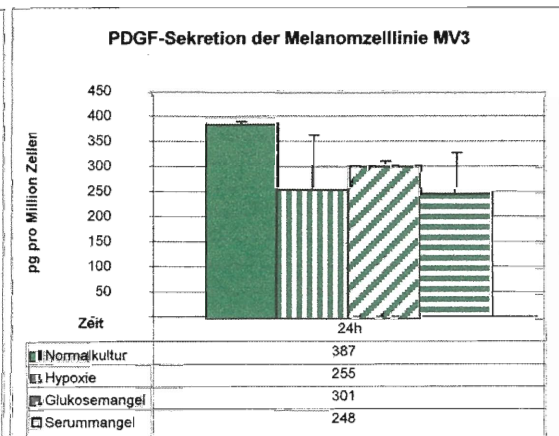
#### 3.2.1.4.1. PDGF-Sekretion durch Melanomzellen

In je zwei Versuchen wurden die Zelllinien BLM, MV3, IF6 und 530 auf ihre PDGF-Sekretion getestet. Die hochmalignen Zelllinien BLM und MV3 wiesen eine im Vergleich zu den niedrigmalignen Melanomzellen geringere Basalsekretion auf ( $p < 0,1$ ).

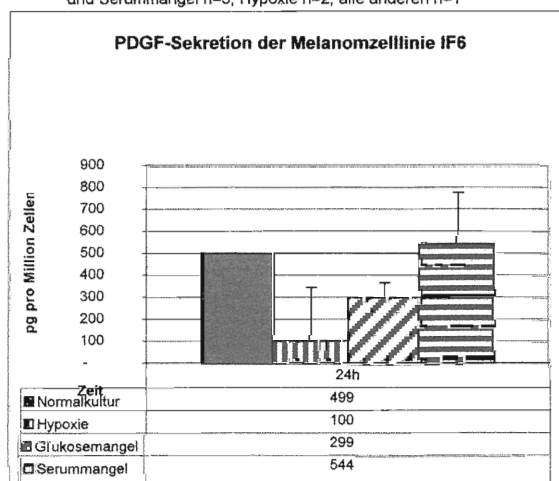
Tabellen 3.2.1.4.a-d.) PDGF-Sekretion durch Melanomzellen



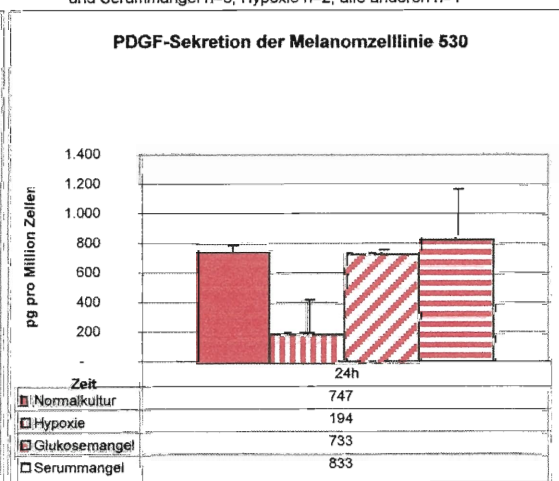
Tab.3.2.1.4.a) Melanomzelllinie BLM Versuchszahl n für Normalkultur und Serummangel n=3; Hypoxie n=2; alle anderen n=1



Tab.3.2.1.4.b) Melanomzelllinie MV3 Versuchszahl n für Normalkultur und Serummangel n=3; Hypoxie n=2; alle anderen n=1



Tab.3.2.1.4.c) Melanomzelllinie IF6 Versuchszahl n für Normalkultur und Serummangel n=3; Hypoxie n=2; alle anderen n=1



Tab.3.2.1.4.d) Melanomzelllinie 530 Versuchszahl n für Normalkultur und Serummangel n=3; Hypoxie n=2; alle anderen n=1

Die Zellen der Linie 530 sezernierten mit rund 750 pg pro  $10^6$  Zellen doppelt soviel PDGF wie die der Linien BLM und MV3. Die Zellen der Linie IF6 erreichten mit ca. 390 pg pro  $10^6$  Zellen einen mittleren PDGF-Wert.

Alle Ziellinien reagierten auf Hypoxie mit einer signifikanten Senkung ihrer PDGF-Abgabe ( $p < 0,005$ ; jeweils  $n=2$ ). Dabei nahm bei den niedrigmalignen Melanomzelllinien IF6 und 530 die PDGF-Sekretion um etwa 80% ab. Sie fiel damit wesentlich stärker als bei den Linien BLM und MV3, deren Zytokinmengen auf 2/3 der Kontrollwerte absanken.

Serummangel bewirkte in den hochmalignen Zellklonen BLM und MV3 eine Verminderung der PDGF-Sekretion um 15 bzw. 40% (jeweils  $n=3$ ). Die geringmalignen Zelllinien IF6 und 530 unterschieden sich davon mit einer Sekretionssteigerung um bis zu 20% signifikant ( $p=0,01$ ; jeweils  $n=3$ ).

Glukosemangel hatte bei der Zelllinie 530 keine Auswirkungen auf das Sekretionsverhalten. Die übrigen Melanomzelllinien reduzierten ihre PDGF-Ausschüttung als Reaktion auf diesen Reiz um 26-43% (jeweils  $n=1$ ).

#### **3.2.1.4.2. PDGF-Sekretion durch Melanozyten**

Die primären Melanozyten MSD und MRF sezernierten in jeweils einem Experiment unter normalen Kulturbedingungen ca. 20 pg PDGF pro  $10^6$  Zellen. Sie zeigten keine außerhalb der Standardabweichungen liegenden Veränderungen im Sekretionsverhalten unter Hypoxie bzw. Hypoxie und Serummangel.

Damit unterschieden sie sich klar von den Melanomzellen, deren PDGF-Sekretion 10-fach höher ausfiel und sich unter Mangelbedingungen z.T. signifikant änderte ( $p < 0,025$ ).

#### **3.2.1.4.3. PDGF-Sekretion durch Endothelzellen**

In je einem Versuch wurden die PDGF-Kontrollwerte für HDMEC, HMEC-1 und HUVEC mit  $2416,5 \pm 577$  pg,  $298 \pm 16,6$  pg und  $2289,1 \pm 41,8$  pg pro  $10^6$  Zellen gemessen.

Unter Hypoxie zeigten nur HMEC-1 eine deutliche Verringerung ihrer Sekretion auf ein Fünftel des Kontrollwertes. HDMEC und HUVEC blieben im Bereich der Standardabweichung der Kontrollwerte.

Auf Serummangel reagierten alle Endothelzellen mit einer Abnahme der PDGF-Sekretion. Dieser Effekt fiel bei HUVEC-Zellen mit einer Reduktion um ~30% geringer aus als bei den mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC ~70% und HMEC-1 ~90%).

#### **3.2.1.4.4. PDGF-Sekretion durch Fibroblasten**

Die Fibroblastenzellen HFF wiesen in je einem Versuch weder unter Kontroll-, Hypoxie- noch unter Serummangelbedingungen PDGF im Medium auf.

Insgesamt zeigten sich für PDGF signifikante Unterschiede zwischen niedrigmalignen und hochmalignen Melanomzelllinien. Letztere sezernierten unter normalen Kulturbedingungen deutlich weniger PDGF als die niedrigmalignen Zelllinien. Diese wiederum beantworteten Hypoxie mit einer wesentlich stärkeren Sekretionsminderung. Auch unter Serummangel steigerten sie ihre PDGF-Sekretion im Gegensatz zu den hochmalignen Zelllinien (welche diese reduzierten).

Normale Melanozyten unterschieden sich wiederum signifikant von allen Melanomzelllinien mit ihrer deutlich niedrigeren PDGF-Freisetzung unter Kontrollbedingungen sowie einer fehlenden Reaktion auf Stressbedingungen.

Auffällige Unterschiede bestanden auch zwischen immortalisierten und normalen Endothelzellen. Glichen erstere (HMEC-1) in ihren PDGF-Sekretionsverhalten und -mengen unter normalen und hypoxischen Kulturbedingungen Melanomzellen, setzten die genetisch unveränderten mikro- und makrovaskulären Endothelzellen die mit Abstand höchsten PDGF-Mengen frei und zeigten keine Sekretionsveränderung unter Hypoxie.

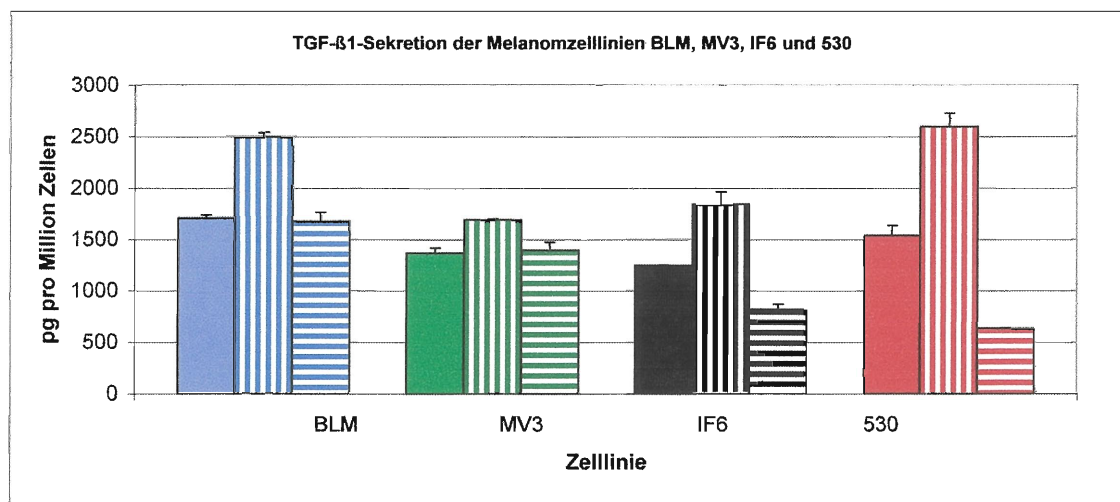
PDGF war das einzige aller getesteten Zyto- bzw. Chemokine in dieser Arbeit, das unter keinen Kulturbedingungen im Überstand von Fibroblasten nachgewiesen werden konnte.

### 3.2.1.5. Transforming-Growth-Factor-Beta ( TGF-β )

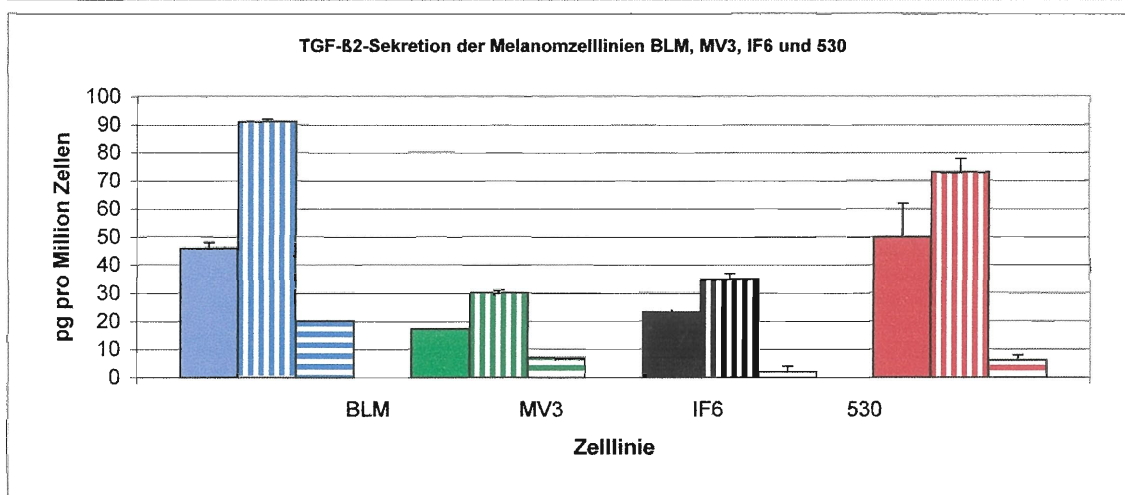
#### 3.2.1.5.1. TGF-β-Sekretion durch Melanomzellen

Im Überstand wurde sowohl die Menge an TGF-β1, als auch die von TGF-β2 gemessen. Die Zelllinien BLM, MV3, IF6 und 530 sezernierten unter Normoxie zwischen 1245 pg (IF6) und 1707 pg TGF-β1 pro 10<sup>6</sup> Zellen (BLM).

Tabellen 3.2.1.5.a und b.) TGF-β-Sekretion durch Melanomzellen



a) TGF-β1	BLM (n=1)		MV3 (n=1)		IF6 (n=1)		530 (n=1)	
	pg / Mio. Zellen	Stabwn pg	pg / Mio. Zellen	Stabwn pg	pg / Mio. Zellen	Stabwn pg	pg / Mio. Zellen	Stabwn pg
Normalkultur	1707	33	1366	47	1245	3	1534	102
Hypoxie	2493	43	1687	9	1833	132	2596	67
Serummangel	1675	91	1393	82	816	54	629	2



b) TGF-β2	BLM (n=1)		MV3 (n=1)		IF6 (n=1)		530 (n=1)	
	pg / Mio. Zellen	Stabwn pg	pg / Mio. Zellen	Stabwn pg	pg / Mio. Zellen	Stabwn pg	pg / Mio. Zellen	Stabwn pg
Normalkultur	46	2	17	0	23	1	50	12
Hypoxie	91	2	30	1	35	2	73	5
Serummangel	20	1	7	0	2	2	6	2

Unter Hypoxie steigerten alle Zelllinien ihre TGF- $\beta$ 1-Abgabe (jeweils n=1). MV3 zeigte mit einer 1,2-fachen Sekretionssteigerung die geringste Reaktion auf diesen Reiz. Die anderen Zelllinien reagierten in annähernd gleicher Weise mit einer  $\sim$ 1,5-fach erhöhten Zytokinfreisetzung.

Während Serumangel die TGF- $\beta$ 1-Ausschüttung bei den Zelllinien BLM und MV3 nicht beeinflusste, nahm die Sekretion der niedrigmalignen Zelllinien IF6 und 530 auf das 0,6- bzw. 0,4-fache ihrer Basalwerte ab.

Im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1 ergaben sich für die  $\beta$ 2-Isoform deutlich geringere Basalwerte. Sie lagen zwischen 17 pg (MV3) und 50 pg pro  $10^6$  Zellen (530). Auch hier zeigten die Proben je eines Experimentes keine Korrelation zwischen dem Zytokinlevel und dem Malignitätsgrad.

Analog zu den Veränderungen in der TGF- $\beta$ 1-Sekretion reagierten alle Melanomzelllinien mit einer ähnlichen Zunahme der TGF- $\beta$ 2-Abgabe unter Hypoxie. Unter Serumangel nahm bei allen Melanomzelllinien die TGF- $\beta$ 2-Sekretion ab. Bei den Linien BLM und MV3 um ca. 60%, bei denen von IF6 und 530 auf nur noch ein Zehntel des Kontrollwertes.

#### **3.2.1.5.2. TGF- $\beta$ -Sekretion durch Melanozyten**

Die Normalwerte von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 betragen 1840 pg bzw. 15,6 pg pro  $10^6$  Zellen MSD. Sowohl die Sekretion von TGF- $\beta$ 1, als auch die von TGF- $\beta$ 2 nahm unter Hypoxie um den Faktor 1,4 bzw. 2,2 zu (jeweils n=1).

#### **3.2.1.5.3. TGF- $\beta$ -Sekretion durch Endothelzellen**

In einem Experiment betrug die von  $10^6$  Zellen HMEC-1 sezernierte TGF- $\beta$ 1-Menge unter Normoxie rund 260 pg und unter Hypoxie das 1,6-fache dessen. Bei Serumangel fiel die Menge auf zwei Drittel des Kontrollwertes ab (jeweils n=1).

Bei TGF- $\beta$ 2 lag der Basalwert bei 6,4 pg pro  $10^6$  Zellen. Hypoxie induzierte keine Veränderungen und Serumangel führte zu einer Abnahme der Sekretion um 72% (jeweils n=1).



#### **3.2.1.5.4. TGF- $\beta$ -Sekretion durch Fibroblasten**

Die Fibroblasten HFF erreichten pro  $10^6$  Zellen unter normalen Kulturbedingungen eine TGF- $\beta$ 1- und - $\beta$ 2-Menge von 3400 pg bzw. 53 pg. Während Hypoxie die TGF- $\beta$ 1-Sekretion gering beeinflusste (Zunahme um  $13 \pm 3$  %), fiel sie unter Serumangel um 40% ab (jeweils  $n=1$ ).

Für TGF- $\beta$ 2 ergab sich unter Sauerstoffentzug bzw. Serumangel eine Steigerung der Zytokinausschüttung auf das 3,4- bzw. 1,2-fache des Kontrollwertes (jeweils  $n=1$ ).

In ihrer TGF- $\beta$ 1/2-Sekretion unter normalen wie auch hypoxischen Kulturbedingungen gab es keine Unterschiede zwischen allen melanozytären Zellen. Lediglich die TGF- $\beta$ 1 Sekretion unter Serumangel (an normalen Melanozyten nicht getestet) zeigte für niedrigmaligne Melanomzellen eine Sekretionsminderung im Vergleich zu den auf diesen Reiz nicht reagierenden hochmalignen Melanomzellen.

Die Endothelzellen der Linie HMEC-1 zeigten ähnliche Reaktionsmuster in der TGF- $\beta$ -Sekretion wie melanozytäre Zellen. Die Zytokinmengen beider Isoformen waren jedoch vergleichsweise niedriger.

Im Gegensatz dazu wiesen Fibroblasten die jeweils höchste Sekretion von TGF- $\beta$  auf und unterschieden sich in ihrer Sekretionsmodulation unter Serumangel von allen anderen getesteten Zellarten.

#### **3.2.2. Veränderungen der Sekretion angiogenetischer Chemokine unter Hypoxie, Reoxygenierung, Serum- und Glukosemangel**

Unter identischen Kulturbedingungen wurden die verschiedenen Melanomzelllinien auf ihr Sekretionsverhalten angiogenetischer Chemokine untersucht und mit dem von normalen Melanozyten, Endothelzellen und Fibroblasten verglichen.

### **3.2.2.1. Interleukin 8 ( IL-8 )**

#### **3.2.2.1.1. Interleukin-8-Sekretion durch Melanomzellen**

Unter normalen Kulturbedingungen konnten deutliche Unterschiede in der Höhe der sezernierten IL-8 Mengen zwischen den hochmalignen und niedrigmalignen Melanomzelllinien nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ). Die von den Zelllinien BLM ( $n=2$ ) und MV3 ( $n=4$ ) sezernierten Chemokinmengen lagen im Bereich zwischen 1100 und rund 11000 pg pro  $10^6$  Zellen. Die Linien IF6 ( $n=3$ ) und 530 ( $n=3$ ) zeigten mit Werten zwischen 1000 und 3000 pg pro  $10^6$  Zellen keine so großen Schwankungen. Die sich entsprechenden Mittelwerte sind den Tabellen 3.2.2.1.a-f) zu entnehmen. Die Zelllinien WM115 und HT144 lagen mit IL-8-Mengen von 4300 bzw. 8100 pg pro  $10^6$  Zellen im Wertebereich der hochmalignen Melanomzellen.

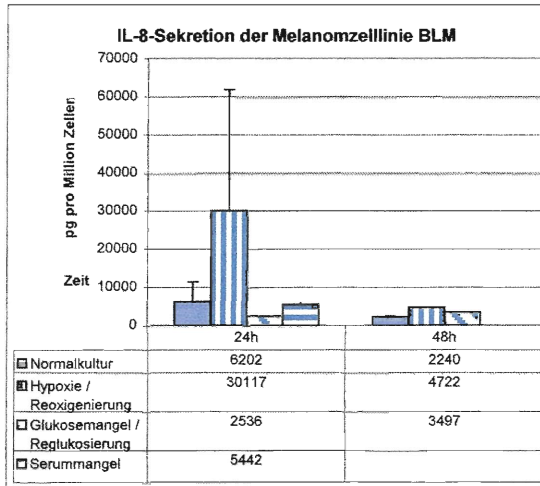
Auf Hypoxie reagierten niedrigmaligne Melanomzellen mit einem signifikanten Abfall in ihrer IL-8-Abgabe ( $p < 0,05$ ) und zeigten somit ein zu den Zelllinien BLM und MV3 gegenläufiges Verhalten. Die hochmalignen Melanomzellen steigerten im Mittel ihre IL-8-Sekretion unter Sauerstoffentzug um das 6- bzw. 4-fache des 24-Stunden-Kontrollwertes ( $p < 0,05$ ).

Reoxigenierung bewirkte in Melanomzellen mit starker metastatischer Potenz noch immer einen Anstieg der IL-8-Sekretion um das 2-4-fache der entsprechenden 48-Stunden-Kontrollwerte. Die Linien IF6 und 530 reagierten auf die Beendigung der Hypoxie mit einem deutlichen Anstieg ihrer IL-8-Sekretion, so dass die absoluten Chemokinmengen denen der Zelllinien BLM und MV3 glichen.

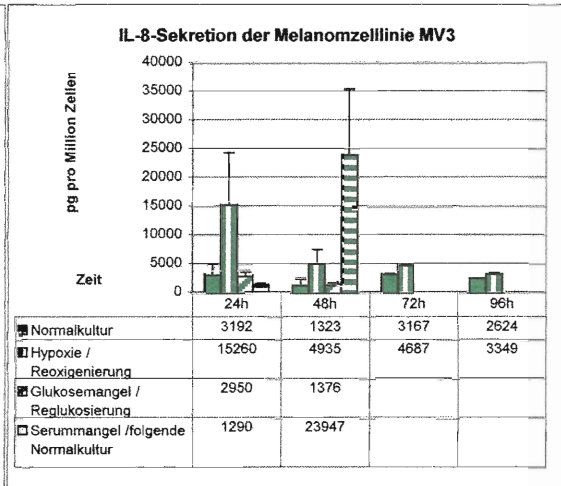
Die Linie WM115 reagierte nur geringfügig sowohl auf Hypoxie als auch Reoxigenierung, wohingegen HT144-Zellen in ihrem Sekretionsverhalten der Linie MV3 ähnelten.

Auf Serumangel reagierten alle getesteten Melanomzelllinien mit einer signifikanten Abnahme der IL-8-Sekretion ( $p < 0,05$ ). Mit ca. 17% des Kontrollwertes reduzierte die Zelllinie MV3 ihre IL-8-Abgabe am deutlichsten ( $n=2$ ). Die niedrigmalignen Zelllinien IF6 (ca. 80%) und 530 (ca. 50%) zeigten ebenso wie die Zelllinie BLM (ca. 50%) keine so ausgeprägte Reaktion ( $n=1$  für IF6 und BLM;  $n=2$  für 530).

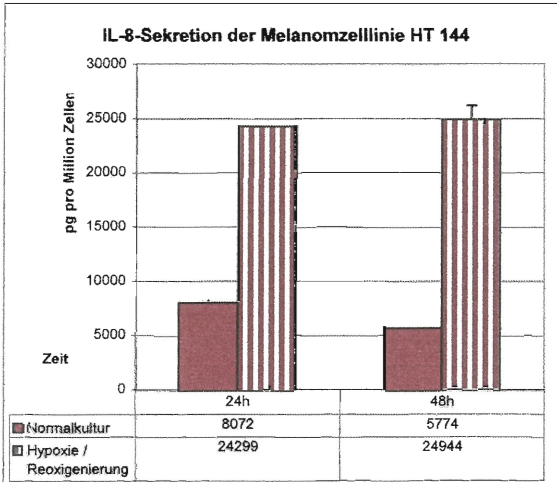
**Tabellen 3.2.2.1.a-f.) IL-8-Sekretion durch Melanomzellen**



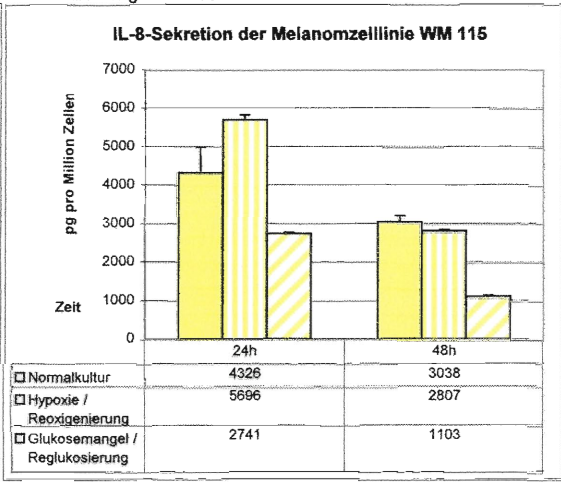
Tab.3.2.2.1.a) Melanomzelllinie BLM Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=2; alle anderen n=1



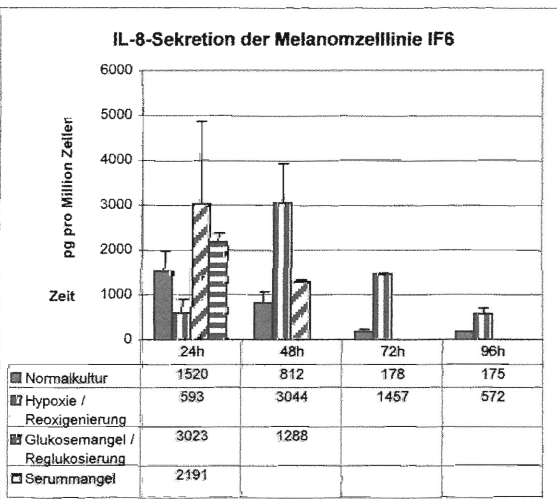
Tab.3.2.2.1. b) Melanomzelllinie MV3 Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=4; Reoxigenierung n=3, alle übrigen n=2 außer 72 bzw. 96h n=1



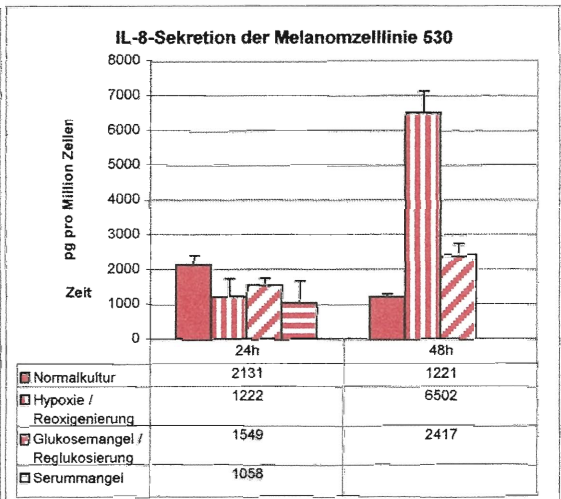
Tab.3.2.2.1.c) Melanomzelllinie HT144 Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=1



Tab.3.2.2.1.d) Melanomzelllinie WM115 Versuchszahl n für alle Versuche n=1



Tab.3.2.2.1.e) Melanomzelllinie IF6 Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=4; alle übrigen n=2 außer 72 bzw. 96h n=1



Tab.3.2.2.1.f) Melanomzelllinie 530 Versuchszahl n für Normalkultur und Hypoxie n=3; 3 alle übrigen n=2

Den Entzug von Glukose beantworteten die Zelllinien BLM (n=1), MV3 und IF6 (beide n=2) mit einer Steigerung der Chemokin-Sekretion um den Faktor 1,4 bis 2,3 , während die Zelllinien 530 (n=2) und WM115 (n=1) diese um 20% bzw. 40% verringerten.

Auf Reglukosierung steigerten alle Melanomzellen bis auf die Linie WM115 ihre IL-8-Sekretion. Die von den hochmalignen Melanomzellen erreichten IL-8-Level waren meistens (bis auf einen Versuch mit IF6) deutlich höher als die der Zelllinien IF6 und 530. Aufgrund zu geringer Probenzahl war eine Signifikanz nicht zu berechnen.

### **3.2.2.1.2. Interleukin-8-Sekretion durch Melanozyten**

Primäre Melanozyten sezernierten unter Normalbedingungen IL-8-Mengen zwischen  $35 \pm 4,7$  pg (MGS; n=1) und  $230,6 \pm 188,9$  pg (MSD; n=3) pro  $10^6$  Zellen. Sie lagen damit signifikant unter den von niedrigmalignen Melanomzellen abgegebenen Mengen ( $p < 0,005$ ). Nach 48 Stunden war die Basalsekretion der MGS-Zellen unwesentlich geringer als nach 24 Stunden, die Zellen MSD hingegen verdreifachten die IL-8-Menge innerhalb von 48 Stunden.

Hypoxie bewirkte bei MRF eine Zunahme der Sekretion um den Faktor 1,6 (n=1). Bei den Zellen von MGS zeichnete sich unter Berücksichtigung der Standardabweichungen eine diskrete Mindersekretion ab. Mel4-Zellen zeigten mit einer Abnahme der Zytokinmenge um ~60% ein den niedrigmalignen Melanomzelllinien entsprechendes Verhalten (n=1). Die Zellen von MSD reagierten in 2 von 3 Versuchen mit einer deutlichen Sekretionsminderung um 45-70%. In einem Versuch steigerten sie ihre IL-8-Freisetzung um ~95%.

Auch nach Reoxigenierung war kein einheitliches Sekretionsmuster bei den getesteten normalen Melanozyten zu erkennen. Wiedergabe von Sauerstoff ließ die IL-8-Ausschüttung bei MGS um das 9-fache des 48-Stunden-Kontrollwertes ansteigen, bei MSD ergab sich diesbezüglich eine Reduktion von 35% (jeweils n=1).

Serummangel induzierte eine Zunahme der Sekretion bei MRF um das 3,3-fache auf  $400 \pm 17$  pg pro  $10^6$  Zellen (n=1). Damit zeigte die MRF-Melanozytenkultur ein den Melanomzelllinien gegenläufiges Regulationsverhalten.

### **3.2.2.1.3. Interleukin-8-Sekretion durch Endothelzellen**

Bei den makrovaskulären Endothelzellen von HUVEC betrug der 24-Stunden-Kontrollwert im Mittel  $3256,9 \pm 1306,9$  pg pro  $10^6$  Zellen. Unter Hypoxie ließ sich bei HUVEC in zwei von drei Experimenten keine Veränderung in der Sekretionsrate nachweisen, bei einem kam es zu einem Anstieg um das 2,7-fache. Reoxigenierung führte in zwei von zwei Versuchen zu einer Sekretionszunahme um 120% bezüglich des 48-Stunden-Kontrollwertes.

Die IL-8-Abgabe von einer Million HDMEC unter Normalbedingungen war knapp doppelt so hoch wie bei HUVEC. Auf Hypoxie zeigte sich jeweils eine Steigerung um das 1,8-fache im Vergleich zu den Kontrollwerten (n=3).

HMEC-1-Zellen sezernierten unter normalen Kulturbedingungen mit  $5433 \pm 30,4$  pg pro  $10^6$  ähnlich hohe IL-8-Mengen wie HDMEC. Unter Hypoxie verminderten sie aber ihre Chemokin-Abgabe um 44% (n=1).

Serummangel wirkte sich bei allen Endothelzellen senkend auf die IL-8 Sekretion aus (jeweils n=1), wobei die Veränderung bei HDMEC mit  $73 \pm 1\%$  des Kontrollwertes am geringsten und bei HMEC-1 mit einem Viertel des Kontrollwertes am stärksten ausfiel.

### **3.2.2.1.4. Interleukin-8-Sekretion durch Fibroblasten**

Unter normalen Kulturbedingungen wiesen die von den Fibroblasten abgegebenen IL-8-Mengen starke zellstammspezifische Unterschiede auf. Die Zellen FGS sezernierten im Mittel rund 16300 pg IL-8 pro  $10^6$  Zellen, FPJ hingegen weniger als ein Zehntel dessen. Die Fibroblasten HFF lag mit ca. 3800 pg pro  $10^6$  Zellen dazwischen.

Nach weiteren 24 Stunden in Kultur sanken die Chemokinmengen von HFF (n=1) und noch stärker die von FGS (n=2) unter den jeweiligen 24 Stunden Kontrollwert.

Alle Fibroblasten verhielten sich unter hypoxischen Bedingungen gleichartig und steigerten ihre IL-8-Ausschüttung um das 3,8- bis 5-fache im Vergleich zu den 24-Stunden-Kontrollwerten. Nach Reoxigenierung blieb die IL-8-Sekretion auf dem Niveau der Hypoxiewerte.

Insgesamt gesehen unterschieden sich die hochmalignen Melanomzelllinien in ihrer IL-8-Sekretion durch Freisetzung höherer IL-8-Mengen signifikant von den niedrigmalignen Melanomzelllinien. Diese wiederum sezernierten signifikant mehr IL-8 als normale Melanozyten.

In ihrem Sekretionsverhalten unter Hypoxie verhielten sich die niedrigmalignen Melanomzelllinien, die ihre IL-8-Freisetzung senkten, gegensätzlich zu den hochmalignen Melanomzelllinien, welche diese steigerten. Normale Melanozyten reagierten auf Hypoxie zwar uneinheitlich, ihre sezernierten IL-8-Mengen blieben aber stets deutlich unter denen der niedrigmalignen Melanomzelllinien ( $p < 0,05$ ). Unter normalen Kulturbedingungen und Hypoxie korrelierte also mit zunehmender Entdifferenzierung der melanozytären Zellen eine höhere IL-8-Sekretion.

Auch unter Serumangel zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den auf diesen Reiz mit Sekretionssteigerung reagierenden normalen Melanozyten und allen Melanomzelllinien, die darunter ihre IL-8-Freisetzung drosselten.

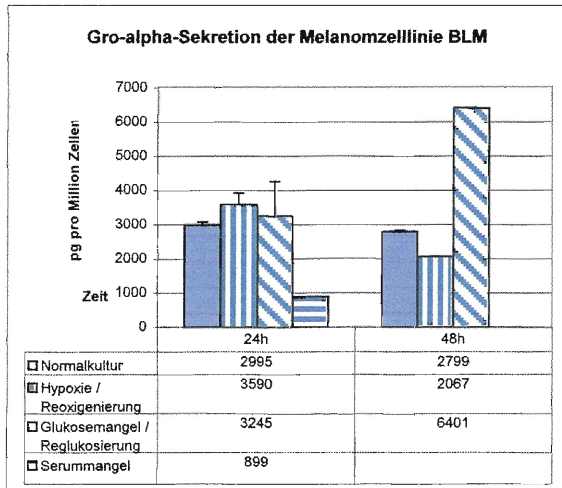
Sowohl Endothelzellen als auch Fibroblasten sezernierten IL-8 in zu hochmalignen Melanomzelllinien vergleichbar hohen bzw. sogar deutlich höheren Mengen unter normalen Kulturbedingungen. Auch in ihrer stressabhängigen Sekretionsveränderung ähnelten mikrovaskuläre Endothelzellen wie auch Fibroblasten den hochmalignen Melanomzellen, wobei Fibroblasten wiederum am meisten IL-8 von allen Zellarten freisetzen konnten. Makrovaskuläre Endothelzellen (HUVEC) vermochten auf gleiche Weise wie die mikrovaskulären Endothelzellen auf Hypoxie zu reagieren, wenn sie dies auch nicht regelmäßig taten.

### **3.2.2.2. GRO-Alpha**

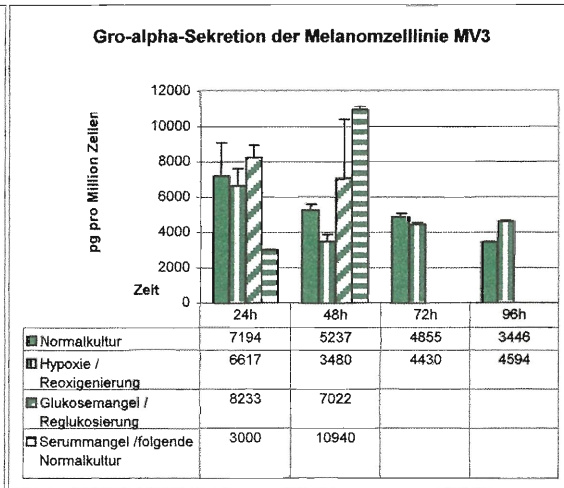
#### **3.2.2.2.1. Gro-Alpha-Sekretion durch Melanomzellen**

Die Gro- $\alpha$ -Sekretion der hochmalignen Melanomzellen war unter normalen Kulturbedingungen signifikant höher als die der Zelllinien IF6 und 530 ( $p < 0,025$ ). Diese beiden Linien sezernierten zwischen 850 (IF6;  $n=3$ ) und 1170 pg Gro- $\alpha$ /  $10^6$  Zellen (530;  $n=3$ ) und setzten damit nur rund 12% bis maximal 60% der Chemokinmengen von MV3 bzw. BLM frei. Bei allen Melanomzelllinien zeichnete sich im Verlauf der

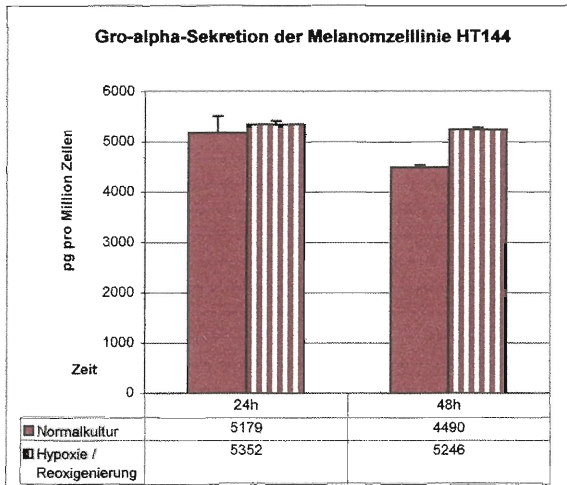
**Tabellen 3.2.2.2.a-f.) Gro-alpha-Sekretion durch Melanomzellen**



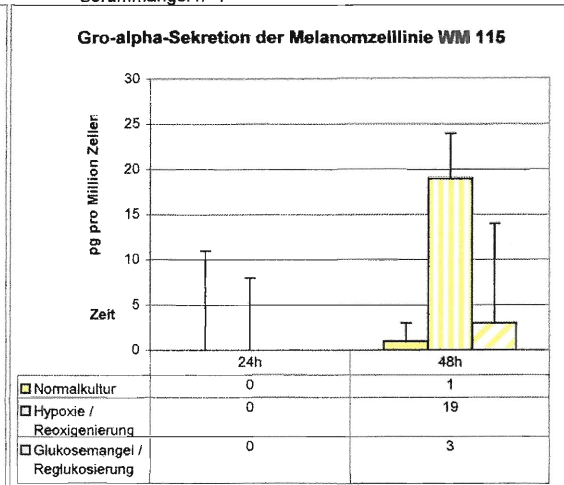
Tab.3.2.2.2.a) Melanomzelllinie BLM Versuchsanzahl n für Serummangel und Reoxigenierung n=1; alle anderen n=2



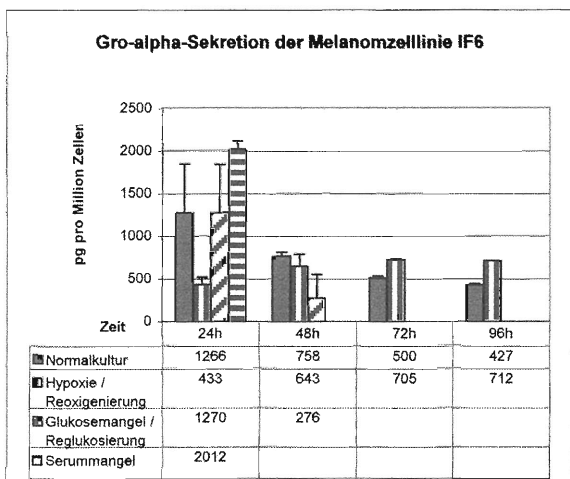
Tab.3.2.2.2.b) Melanomzelllinie MV3 Versuchsanzahl n für Normalkultur und Hypoxie n=3; alle anderen n=2 außer Serummangel n=1



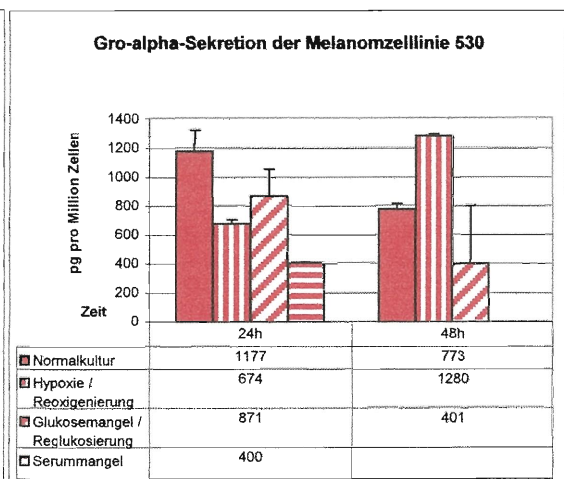
Tab.3.2.2.2.c) Melanomzelllinie HT 144 Versuchsanzahl n für alle Versuche n=1



Tab.3.2.2.2.d) Melanomzelllinie WM 115 Versuchsanzahl n für alle Versuche n=1



Tab.3.2.2.2.e) Melanomzelllinie IF6 Versuchsanzahl n für Normalkultur und Hypoxie n=3; alle anderen n=2 außer 72 und 96h-Wert n=1



Tab.3.2.2.2.f) Melanomzelllinie 530 Versuchsanzahl n für Serummangel und Reoxigenierung n=1; alle anderen n=2

Kulturzeit eine Abnahme der Gro- $\alpha$ -Sekretion ab, die bei den Linien IF6 und MV3 über 96 Stunden zu beobachtet werden war.

Auf Hypoxie reagierten die hochmalignen Melanomzellen mit uneinheitlichen Veränderungen ihres Sekretionsverhaltens. Bei der Linie BLM war nach Hypoxie ca. 20% mehr Gro- $\alpha$  in den Überständen messbar als in den 24-Stunden-Kontrollen (n=2). Die Linie MV3 sezernierte unter Hypoxie (n=3) in einem Versuch mehr und in zwei Versuchen etwas weniger Gro- $\alpha$  als unter Kontrollbedingungen. Die Zelllinien IF6 und 530 hingegen zeigten eine signifikante Abnahme in der Gro- $\alpha$ -Sekretion (p<0,05).

Nach Reoxigenierung fiel bei den Zelllinien MV3 (n=2), BLM(n=1) und IF6 (n=2) die Chemokinsekretion im Vergleich zu den Kontrollwerten, bei 530 (n=1) nahm sie um 66% zu.

Die Linie HT144 sezernierte unter allen getesteten Bedingungen immer annähernd gleichviel Gro- $\alpha$  und lag mit rund 5000 pg pro 10<sup>6</sup> Zellen im Bereich zwischen BLM und MV3 (n=1).

Im Überstand der Zelllinie WM115 war nach Ablauf der ersten 24 Stunden gar kein Gro- $\alpha$  nachweisbar. Nach Reoxigenierung ließen sich knapp 20 pg pro 10<sup>6</sup> Zellen nachweisen. Dies war mehr als das 13-fache des 48 Stunden-Kontrollwertes (n=1).

Auf den Entzug von Glukose war bei keiner Melanomzelllinie eine aussagefähige Veränderung der Chemokin-Sekretion zu verzeichnen. Unter allen getesteten Melanomzelllinien beantworteten nur die Linien MV3 und BLM die Reglukosierung mit einer Zunahme der Gro- $\alpha$ -Freisetzung um das 2,5-fache im Vergleich zu den 48-Stunden-Kontrollwerten. Die niedrigmalignen Melanomzellen und die Linie WM115 zeigten weiterhin keine Modulation in ihrem Sekretionsverhalten (n=2 für BLM, MV3, IF6 und 530, n=1 für WM115).

Bis auf die Linie IF6 induzierte Serummangel bei allen getesteten Melanomlinien einen starken Abfall in der Gro- $\alpha$ -Abgabe und zwar bis auf rund 30% des 24-Stunden-Kontrollwertes (jeweils n=1).

Unter allen Kulturbedingungen gaben jeweils MV3 die höchste Gro- $\alpha$ -Menge aller Melanomzelllinien in die Überstände ab.



#### **3.2.2.2.2. Gro-Alpha-Sekretion durch Melanozyten**

Die Gro- $\alpha$ -Sekretion der Melanozyten Mel4, MGS, MRF (jeweils n=1) und MSD (n=2) unter Kontrollbedingungen lag mit Werten zwischen 126 und 230 pg pro  $10^6$  Zellen signifikant unter der von niedrigmalignen Melanomzelllinien ( $p < 0,05$ ). Ebenso wie bei den Melanomzellen verringerte sich die Chemokin-Abgabe in Abhängigkeit von der Kulturdauer.

Hypoxie bewirkte keine signifikanten Veränderungen. Die Sekretion unter Reoxigenierung stieg auf das 3,2-fache (MGS) bzw. 1,45-fache (MSD) über den jeweiligen Kontrollwert an.

Unter Serumangel gaben MRF-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen knapp das 3-fache an Gro- $\alpha$  in den Überstand ab.

#### **3.2.2.2.3. Gro-Alpha Sekretion durch Endothelzellen**

Die Endothelzellen HDMEC sezernierten im Mittel rund 3200 pg Gro- $\alpha$  pro  $10^6$  Zellen (n=2). Unter Hypoxie stieg die Chemokin-Menge im Vergleich zur Kontrolle geringfügig an.

HUVEC erreichten eine mittlere Normalsekretion von 2300 pg pro  $10^6$  Zellen (n=2). Hypoxie induzierte in einem von zwei Versuchen keine Veränderung, im anderen einen Abfall des Niveaus um 63% im Bezug auf den 24-Stunden-Kontrollwert. Nach Reoxigenierung lag die abgegebene Gro- $\alpha$ -Menge weiterhin um 30% unter dem entsprechenden 48-Stunden-Kontrollwert.

Serumangel induzierte bei beiden Zellarten eine Senkung des Sekretionsniveaus um ca. 30%.

#### **3.2.2.2.4. Gro-Alpha-Sekretion durch Fibroblasten**

Die Sekretion von Gro- $\alpha$  wies beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Fibroblastenzellen auf. So sezernierten eine Million Zellen FGS rund 17000 pg, gleich viele Zellen von FPJ und HFF hingegen 2750 pg bzw. 5900 pg. Nach weiteren 24

Stunden sanken die Gro- $\alpha$ -Mengen bei FGS wie HFF auf 75% bzw. 55% des Vorwertes ab.

Hypoxie bewirkte bei den Fibroblastenkulturen der Zellen von FPJ und HFF keine Veränderungen in der Chemokin-Sekretion. Die Zellen FGS steigerten ihre Gro- $\alpha$ -Abgabe unter Hypoxie um rund 17% (bzw. 2300 pg pro  $10^6$  Zellen absolut) auf ~20000 pg pro  $10^6$  Zellen.

Nach Reoxigenierung steigerte sich die Sekretion bei FGS auf das 2,6-fache des 48-Stunden-Kontrollwertes. Bei HFF betrug sie mit  $4110,4 \pm 0$  pg pro  $10^6$  Zellen 125% des Vergleichswertes, lag aber niedriger als der 24-Stundenwert.

Wie für IL-8 zeigte sich für das Chemokin Gro- $\alpha$  ein mit der Differenzierung korrelierendes Sekretionsverhalten der melanozytären Zellen (Ausnahme: Melanomzelllinie WM115). Auch hier sezernierten die Zellen mit der geringsten Differenzierung die höchsten Chemokinmengen.

Ebenso zeigten Endothelzellen und Fibroblasten ein ähnliches Sekretionsverhalten für Gro- $\alpha$  wie für IL-8. Allerdings erreichten alle Zellarten unter den entsprechenden Kulturbedingungen nicht ganz so hohe Absolutmengen.

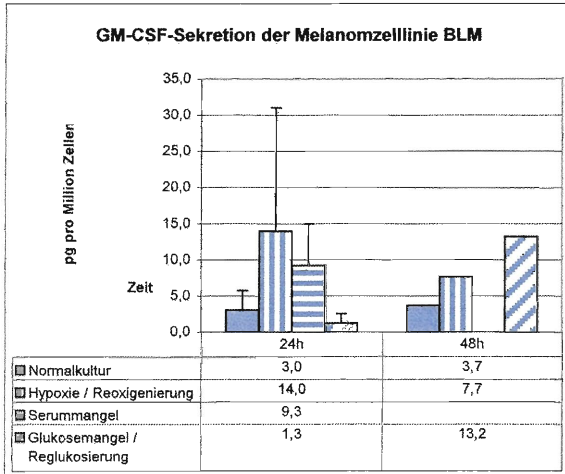
### **3.2.2.3. Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor ( GM-CSF)**

#### **3.2.2.3.1. GM-CSF-Sekretion durch Melanomzellen**

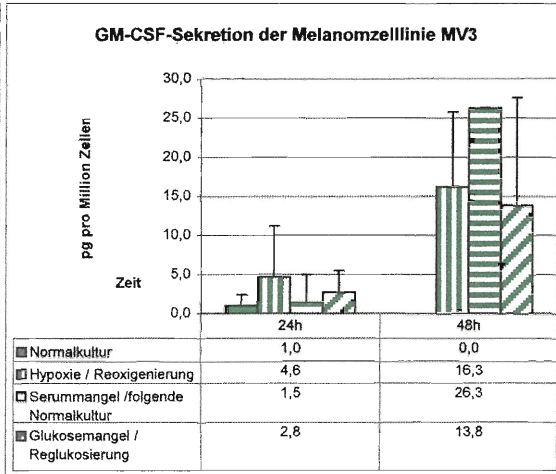
Die hochmalignen Melanomzellen gaben unter normalen Kulturbedingungen nur geringe Mengen GM-CSF in die Überstände ab (jeweils n=3). Die Werte von BLM und MV3 schwankten dabei zwischen 0 und rund 6 pg pro  $10^6$  Zellen. Ein signifikanter Unterschied zu den niedrigmalignen Zelllinien konnte nicht nachgewiesen werden, da die Linie IF6 auf gleich niedrigem Niveau GM-CSF sezernierte (n=3). Bei 530 ließ sich in keinem der drei Experimente GM-CSF im Überstand detektieren.

Höhere GM-CSF-Werte zeigten Zellen der Linie WM115. Unter Normalbedingungen gaben sie unabhängig von der Kulturdauer eine Zytokinmenge von rund 12 pg pro  $10^6$  Zellen in den Überstand ab.

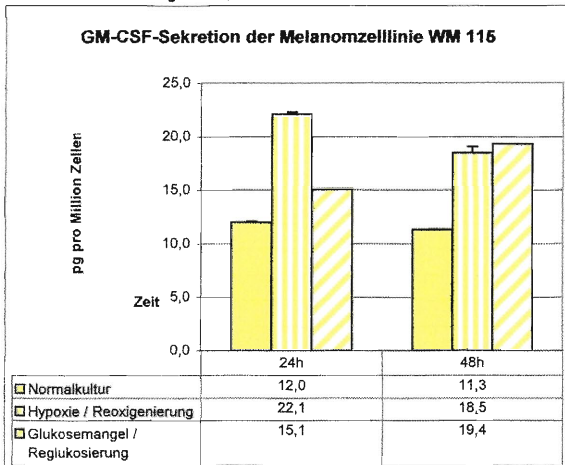
**Tabellen 3.2.2.1.a-e.) GM-CSF-Sekretion durch Melanomzellen**



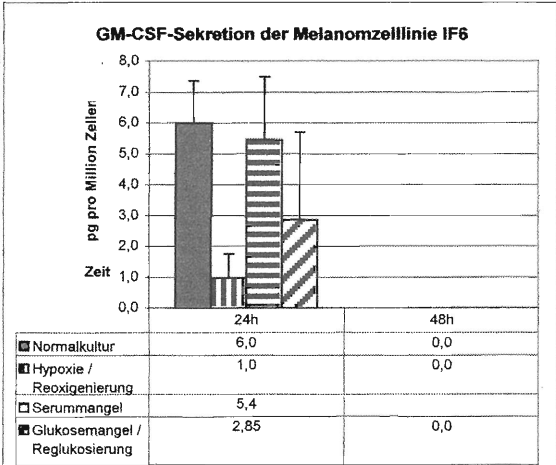
Tab.3.2.2.3.a) Melanomzelllinie BLM Versuchsanzahl n für Normalkultur, Hypoxie und Serummangel n=3; Glukosemangel n=2, alle anderen n=1



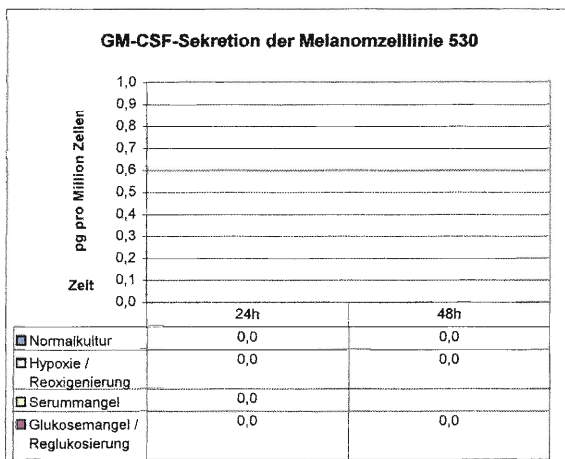
Tab.3.2.2.3.b) Melanomzelllinie MV3 Versuchsanzahl n für Normalkultur, Hypoxie und Serummangel n=3; alle anderen n=2



Tab.3.2.2.3.c) Melanomzelllinie WM115 Versuchsanzahl n für alle Versuche n=1



Tab.3.2.2.3.d) Melanomzelllinie IF6 Versuchsanzahl n für Normalkultur, Hypoxie und Serummangel n=3; Glukosemangel n=2, alle anderen n=1



Tab.3.2.2.3.e) Melanomzelllinie 530 Versuchsanzahl n für Normalkultur, Hypoxie und Serummangel n=3; Glukosemangel n=2, alle anderen n=1

Unter Hypoxie und nach Reoxigenierung steigerte die Linie WM115 die GM-CSF-Sekretion auf knapp das Doppelte der entsprechenden Kontrollwerte. Die anderen Melanomzelllinien reagierten unterschiedlich auf den Entzug von Sauerstoff. Die Linien BLM und MV3 zeigten in zwei bzw. einem von jeweils drei Versuchen eine Sekretionssteigerung um den Faktor 5,5 bzw. 4,5. Die Zelllinie IF6 senkte ihre GM-CSF-Abgabe (n=2 von 3). In den jeweils anderen Versuchen wiesen alle drei Zelllinien aber, wie die Linie 530 in jedem Experiment (n=3), keine Veränderungen zur negativen Basalsekretion auf.

Reoxigenierung bewirkte in den Zelllinien BLM und MV3 (jeweils n=1) bei zuvor negativem Chemokinnachweis eine GM-CSF-Sekretion von rund 7,5 bzw. 6,7 pg/10<sup>6</sup> Zellen. Bei den Zelllinien IF6 und 530 blieben diese Proben weiterhin stumm.

Auf Serummangel reagierte die Linie BLM in zwei Versuchen mit einer Zunahme der GM-CSF-Sekretion auf das bis zu 2-fache der 24-Stunden-Kontrollwerte, blieb aber in einem Versuch mit fehlender Basalsekretion auch areaktiv (n=3). Die Zelllinien MV3 und IF6 verhielten sich in den einzelnen Experimenten widersprüchlich. In den Überständen der Zelllinie 530 ließ sich weiterhin kein GM-CSF nachweisen.

Der Entzug von Glukose löste bei allen getesteten Melanomzelllinien keine wesentlichen Sekretionsveränderungen aus.

#### **3.2.2.3.2. GM-CSF-Sekretion durch Melanozyten**

Die Melanozyten MRF und MSD gaben unter allen Testbedingungen kein GM-CSF in die Medien ab.

#### **3.2.2.3.3. GM-CSF-Sekretion durch Endothelzellen**

Die Endothelzellen HDMEC, HMEC-1 und HUVEC sezernierten GM-CSF unter normalen Bedingungen in einer Höhe von  $7,6 \pm 0,16$  pg,  $3,6 \pm 0,5$  pg bzw.  $12,3 \pm 0,4$  pg pro 10<sup>6</sup> Zellen. Unter Hypoxie steigerten die mikrovaskulären HDMEC und HMEC-1 ihre GM-CSF-Sekretion um 47% bzw. 39%, die makrovaskulären HUVEC um 148 % (jeweils n=1).

Auf Serummangel reagierten HDMEC mit einer Zunahme um den Faktor 1,4 im Vergleich zum 24-Stunden-Kontrollwert. Die Proben von HMEC-1 enthielten kein GM-CSF mehr, und die der HUVEC blieben unverändert zum Vergleichswert.

#### **3.2.2.3.4. GM-CSF-Sekretion durch Fibroblasten**

Auf GM-CSF getestet, zeigten die Fibroblastenzellen HFF unter normalen Zellkulturbedingungen eine basale Sekretion von rund 30 pg pro  $10^6$  Zellen. Unter Hypoxie stieg die Sekretion um den Faktor 7,5. Serummangel beantworteten die Fibroblasten dagegen nur mit einer leichten Erhöhung der GM-CSF-Abgabe (Faktor 1,3/n=1).

Insgesamt betrachtet war eine GM-CSF-Sekretion in geringem Ausmaß bei einigen Melanomzelllinien möglich, aber nicht immer vorhanden. Es zeigte sich bei diesen Zellen auch kein typisches Sekretionsverhalten in Abhängigkeit von Kulturbedingungen. Durch differenzierte melanozytäre Zellen und die niedrigmaligne Melanomzelllinie 530 wurde unter keinen Umständen GM-CSF sezerniert.

Darin unterschieden sich die melanozytären Zellen grundsätzlich sowohl von Endothelzellen als auch Fibroblasten, welche allesamt unter normalen Kulturbedingungen GM-CSF freisetzen und dies unter Hypoxie sogar noch steigerten.

Zusammengefasst ließ sich bezüglich des Sekretionsverhaltens der getesteten Zellarten für die jeweiligen Zyto- bzw. Chemokine folgendes feststellen:

Die untersuchten Melanomzelllinien zeigten für alle in dieser Arbeit getesteten Zyto- und Chemokine außer für GM-CSF unter bestimmten Kulturbedingungen ein charakteristisches Sekretionsverhalten. Sie unterschieden sich dabei bezüglich der abgegebenen Zyto- bzw. Chemokinemengen und / oder ihres Sekretionsverhaltens unter Stressbedingungen für VEGF, Angiogenin, PDGF, IL-8 und Gro- $\alpha$  signifikant von den getesteten normalen Melanozyten. Angiogenin war das einzige Zytokin, das unter Hypoxie von normalen Melanozyten weniger, aber von allen Melanomzelllinien verstärkt sezerniert wurde.

Unter Kontroll- und/ oder Stressbedingungen unterschieden sich die niedrigmalignen von den hochmalignen Melanomzelllinien durch Freisetzung signifikant geringerer Zyto- bzw. Chemokinmengen von VEGF, Angiogenin, IL-8 und Gro- $\alpha$ . PDGF hingegen sezernierten die Zelllinien IF6 und 530 signifikant mehr als die hochmalignen Zelllinien BLM und MV3.

Teilweise unterschieden sich die niedrigmalignen von den hochmalignen Melanomzellen zusätzlich durch gegensätzliches Sekretionsverhalten. Unter Hypoxie zeigten letztere eine deutliche Steigerung ihrer IL-8-Freisetzung, niedrigmaligne Melanomzellen hingegen reduzierten diese. Auch die Gro- $\alpha$ -Sekretion der niedrigmalignen Zelllinien nahm unter Sauerstoffentzug ab, die hochmalignen Melanomzellen veränderten diese nicht oder steigerten sie sogar.

Endothelzellen zeigten im Vergleich zu den Melanomzelllinien aber auch zu normalen Melanozyten z.T. ähnliche Sekretionsverhalten. Glichen sie bezüglich TGF- $\beta$  den getesteten melanozytären Primärzellen im Allgemeinen, ähnelten sie bezüglich Angiogenin, IL-8 und Gro- $\alpha$  in ihrer Sekretionsmenge und -veränderung unter Stressbedingungen den hochmalignen Melanomzelllinien.

Es ließen sich aber auch deutliche Unterschiede in ihrem Sekretionsverhalten bzw. Zytokinmengen zu diesen feststellen. So konnte bei genetisch unveränderten mikro- und makrovaskulären Endothelzellen (HDMEC bzw. HUVEC) keine VEGF-Sekretion, dafür aber die Freisetzung der höchsten Zytokinmengen von b-FGF und PDGF aller getesteten Zellarten nachgewiesen werden.

Das Sekretionsverhalten für die Zytokine VEGF und b-FGF wies Ähnlichkeiten der Fibroblasten mit den melanozytären Zellen allgemein, für die Zyto- bzw. Chemokine Angiogenin, IL-8 und Gro- $\alpha$  mit den hochmalignen Melanomzelllinien (und entsprechend den Endothelzellen) im Besonderen auf. Bezüglich der Zyto- bzw. Chemokine TGF- $\beta$ , GM-CSF und PDGF unterschieden sie sich in ihrem Sekretionsverhalten grundsätzlich von den melanozytären Zellen. Über die kulturabhängigen Sekretionsmodulationen hinaus ließen sich dabei auch Auffälligkeiten in den von Fibroblasten freigesetzten Zytokinmengen feststellen. Wurde PDGF als einziges Zytokin unter keinen Kulturbedingungen durch Fibroblasten sezerniert, gaben jeweils einzelne Fibroblastenstämme (d.h. nicht grundsätzlich alle der z.T. sehr

unterschiedlich hoch sezernierenden Fibroblasten) von allen getesteten Zellarten die höchsten Zytokin- bzw. Chemokinspiegel von Angiogenin, TGF- $\beta$ 1/2, IL-8, Gro- $\alpha$  und GM-CSF in die Überstände ab.

### 3.3. Proliferationsassay

Im dritten Teil der vorliegenden Studie wurde der Einfluss angiogenetischer Zyto- und Chemokine auf die Proliferationsrate von Endothelzellen untersucht. Anhand der ELISA-Ergebnisse kamen dazu alle Zyto- bzw. Chemokine in Betracht, welche unter Hypoxie vermehrt durch Melanomzellen sezerniert wurden. Aus diesen wurden die Zyto- bzw. Chemokine ausgewählt, für welche zudem signifikante Unterschiede zwischen Melanomzellen und normalen Melanozyten im Sekretionsverhalten nachgewiesen wurden. Vorab wurde das Proliferationsverhalten der Endothelzellen in Abhängigkeit von Zellzahl und Kulturbedingungen untersucht.

#### 3.3.1. Proliferationsverhalten von Endothelzellen

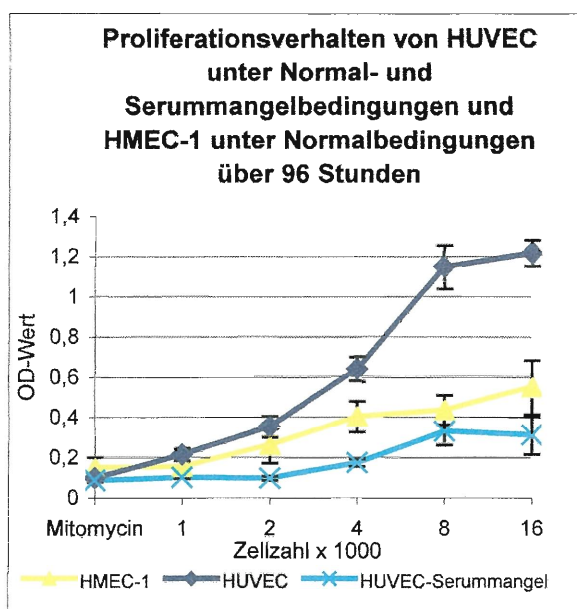


Abbildung 3.3.1. Mittelwerte je eines Experimentes mit der Probenzahl  $n=6 \pm$  der Standardabweichung. Im Bereich von 2000 bis 8000 Zellen ließ sich die Proliferation am genauesten erfassen.

Die durchgeführten Messungen ergaben, dass der BrD-U-Einbau der HMEC-1 und HUVEC abhängig von der Zelldichte war. Bezogen auf die Zellzahl bei Einsaat ließ sich nach 96 Stunden Inkubation eine erkennbare Proliferation von HUVEC erst ab einer Zellzahl von 1000 Zellen unter Normalbedingungen und 2000 Zellen von HMEC-1 bzw. HUVEC unter Serum-mangel nachweisen.

Das Proliferationsmaximum erreichten HMEC-1 bei einer Zellzahl von 4000 Zellen, HUVEC bei einer Zellzahl von 8000 Zellen. Bei höheren Zelleinsaaten

ging der BrD-U-Einbau im Verhältnis wieder zurück. Dementsprechend wurde für die Stimulationsversuche jeweils eine Zellzahl von 2000 Zellen eingesetzt, um eine Änderung in der Proliferation optimal beurteilen zu können.

Im Vergleich zum Serumangel war die BrD-U-Einbaurrate der HUVEC bei gleicher Ausgangszellzahl unter Normalbedingungen 3,7-fach erhöht. Die Proliferationsrate von 2000 Zellen HMEC-1 fiel um ~25% geringer aus als die von HUVEC unter Normalbedingungen.

### **3.3.2. Einfluss angiogenetischer Zytokine auf die Endothelzellproliferation in vitro**

Die Wirkung der Zytokine VEGF, b-FGF und Angiogenin und des Chemokins IL-8 wurde jeweils an der Linie HMEC-1 (n=1) und an HUVEC (n=3) getestet. Der Einfluss des Chemokins Gro- $\alpha$  wurde in einem Experiment mit HUVEC und doppelter Probenanzahl (sechs statt drei) untersucht.

Signifikanzen konnten wegen zu geringer Probenzahl nur im Vergleich zwischen Basalwerten und den jeweiligen Zytokinstimulationen errechnet werden, nicht für die einzelnen Zytokinkonzentrationen.

Des weiteren wurde ein Experiment mit HUVEC unter Serumangel und eines mit direkt bei Zelleinsaat erfolgender Zytokinstimulation durchgeführt (s. Kapitel 2.3.2.).

#### **3.3.2.1. Vascular-Endothelial-Growth-Factor**

Schon 1 ng/ml VEGF stimulierte die Zelllinie HMEC-1 zu einer Erhöhung der Proliferationsrate. Entsprechend des gemessenen Extinktionswert-(OD-Wert)-Anstieges von  $0,15 \pm 0,03$  auf  $0,28 \pm 0,05$  nahm die BrD-U-Einbaurrate um ca. 95% zu. Auf höhere Konzentrationen reagierten HMEC-1 unter Berücksichtigung der Standardabweichung mit einer nahezu konstanten Proliferationssteigerung mit um den Faktor 2,1 bis 2,4 erhöhten OD-Werten. In den Experimenten mit adhärennten HUVEC ergab sich eine dosisabhängige, ab 10 ng/ml signifikante Steigerung der BrD-U-Einbaurrate ( $p < 0,05$ ). Die mit um den Faktor 2,2 maximal erhöhte Proliferationssteigerung ließ sich für die Stimulation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  VEGF nachweisen.



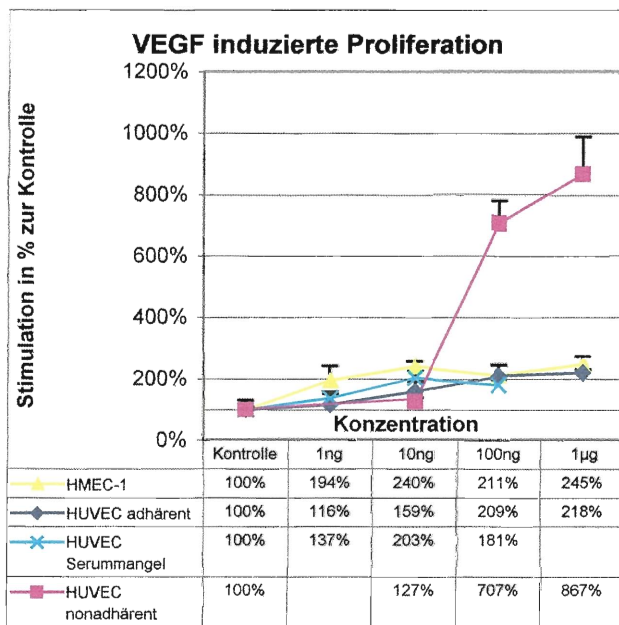


Abbildung.3.3.2.1. zeigt die Mittelwerte von 3 Experimenten unter normalen Bedingungen (n=4) der Probenzahl n pro getesteter Konzentration  $\pm$  der Standardabweichung.

Serummangelbedingungen (n=5), HMEC (n=4) und nonadhärente HUVEC (n=3) wurden in je einem Experiment getestet.

Stimulation der Proliferation unter dem Einfluss der getesteten Zytokine dar.

Unter Serum-mangel entsprachen die Zellen in ihrem Proliferationsverhalten unter Berücksichtigung der Standardabweichungen ungefähr den adhären HUVEC in normalem Medium, bei tendenziell etwas stärkerem Reagieren auf geringere VEGF-Konzentrationen.

Gleichzeitige Einsaat und Stimulation der Zellen zeigte ebenfalls eine dosisabhängige aber viel stärkere Proliferationszunahme.

Mit 1 µg VEGF/ml stimulierte Zellen wiesen eine fast 8,7-fach verstärkte

Farbreaktion im Vergleich zur Kontrolle auf. Dies stellte die stärkste

### 3.3.2.2. Basic-Fibroblast-Growth-Factor

Die Wirkung von b-FGF auf die Zelllinie HMEC-1 war ab einer Dosis von 10ng b-FGF/ml zu beobachten und an einem um  $195 \pm 64\%$  erhöhten OD-Wert im Vergleich zum Kontrollwert nachweisbar. 100 ng b-FGF/ml führten zu keiner weiteren Wachstumszunahme. Die größte Proliferationssteigerung bewirkten 1 µg b-FGF/ml mit einem OD-Wert von  $0,37 \pm 0,06$ . Dies entspricht dem 2,7-fachen des Basalwertes.

In den Experimenten mit adhären HUVEC zeigte sich eine signifikante Proliferationssteigerung ( $p < 0,05$ ) ab b-FGF-Konzentrationen von 1 ng/ml. Die höchste Einbaurrate ergab sich bei 100 ng b-FGF/ml und betrug das  $\sim 1,7$ -fache des Kontrollwertes. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung zeigte sich aber keine wesentliche Steigerung der Proliferation in Abhängigkeit der b-FGF-Dosierung.

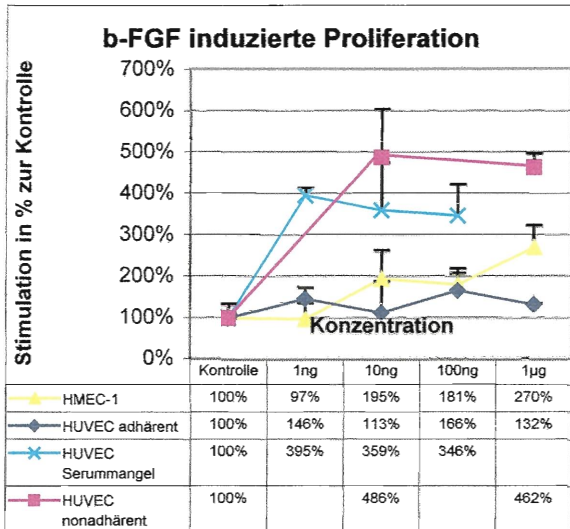


Abbildung.3.3.2. zeigt die Mittelwerte von 3 Experimenten unter normalen Bedingungen (n=4) der Probenzahl n pro getesteter Konzentration  $\pm$  der Standardabweichung. Serum-mangelbedingungen (n=5), HMEC (n=4) und nonadhärente HUVEC (n=3) wurden in je einem Experiment getestet

deutlichen Proliferationssteigerung im Vergleich zu HUVEC unter adhären Normalbedingungen und entsprechender Zytokinstimulation führte.

Sofortige Stimulation der noch nicht adhären Zellen mit 10 ng bzw. 1 µg b-FGF/ml b-FGF ergab jeweils eine ca. 4,8-fache Proliferationszunahme.

Insgesamt stimulierte b-FGF von allen an HUVEC getesteten Zytokinen am unabhängigsten von der Dosis. Die Zunahme des BrD-U-Einbaues in adhären HUVEC unter dem Einfluss von b-FGF war aber signifikant schwächer als unter den anderen getesteten Zytokinen (ANG  $p < 0,025$ , IL-8  $p < 0,05$ , VEGF  $p < 0,1$ ).

### 3.3.2.3. Angiogenin

Unter dem Einfluss von Angiogenin zeigte sich bei der Zelllinie HMEC-1 eine dosisabhängige Steigerung des BrD-U-Einbaus. Das Maximum der Stimulation ließ sich bei einer Konzentration von 100 ng Angiogenin/ml nachweisen. Die OD-Werte der 100 ng/ml-Proben betragen  $0,36 \pm 0,04$ . Sie wiesen damit eine ~2,6-fach erhöhte Extinktion im Vergleich zu den unstimulierten Zellen auf. Die Stimulation mit 1 µg/ml

Unter Serum-mangel zeigten HUVEC nach Inkubation mit b-FGF eine deutliche Steigerung in der BrD-U-Einbaureate. Ab 1 ng/ml fiel diese um das 3,9-fache höher aus als unter Kontrollbedingungen. Bei höheren Dosen sistierten Sie auf etwas niedrigerem Niveau.

Unter Serum-mangel induzierte b-FGF von allen getesteten Zyto- und Chemokinen die Endothelzellproliferation am stärksten.

B-FGF war das einzige Zytokin, das unter Serum-mangel zu einer so

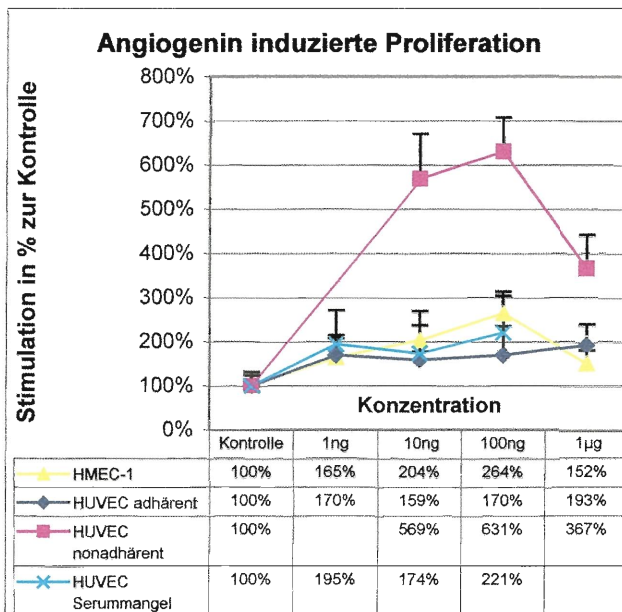


Abbildung 3.3.3. zeigt die Mittelwerte von 3 Experimenten unter normalen Bedingungen (n=4) der Probenzahl n pro getesteter Konzentration  $\pm$  der Standard-abweichung. Serum-mangelbedingungen (n=5), HMEC (n=4) und nonadhärente HUVEC (n=3) wurden in je einem Experiment getestet.

Zellen zu verzeichnen. Die höchste Proliferationsrate zeigte sich unter 1  $\mu$ g Angiogenin pro ml mit einem Anstieg des BrD-U-Einbaues um den Faktor  $1,9 \pm 0,3$ .

Unter Serum-mangel wiesen HUVEC im Vergleich zu den in normalem Medium mit entsprechenden Angiogenin-Konzentrationen kultivierten Zellen eine geringe Steigerung der Proliferation auf. Mit der höchsten getesteten Dosis (100 ng ANG/ml) wurde eine 2,2-fache Proliferation im Vergleich zum Basalwert erreicht.

Bei simultaner Zelleinsaat und Angiogenin-Applikation induzierten Konzentrationen von 10 bzw. 100 ng ANG/ml eine um den Faktor 5,7 bzw. 6,3 erhöhte Proliferation im Vergleich zur Kontrolle. Dies entspräche der Proliferation von ca. 8000 unstimulierten Zellen im Vergleich zu den eingesetzten 2000.

Ebenso wie HMEC-1 reagierten nicht adhären-te HUVEC auf einen weiteren Anstieg der Zytokinkonzentration (1  $\mu$ g ANG/ml) noch mit einer gegenüber unstimulierten Zellen signifikanten Zunahme des BrD-U-Einbaus um ca. 370%. Im Vergleich zur maximalen Stimulation unter 100 ng ANG/ml fiel die Proliferationsrate deutlich geringer aus.

führte zu einer geringeren Proliferationszunahme als die um eine Potenz niedrigere Dosierung. Die Farbreaktion zeigte mit einem OD-Wert von  $0,15 \pm 0,035$  eine  $52 \pm 31\%$ ige Steigerung der BrD-U-Einbaurrate an.

In den Experimenten mit HUVEC stieg unter Zugabe von Angiogenin ab der Konzentration von 1 ng/ml die Proliferation signifikant ( $p < 0,05$ ) an. Dabei war zwar keine

Signifikanz zwischen den einzelnen Konzentrationen, wohl aber eine Signifikanz (nach Wilcoxon) zwischen Kontrolle und stimulierten

### 3.3.3.3. Einfluss angiogenetischer Chemokine auf die Endothelzellproliferation in vitro

#### 3.3.3.1. Interleukin-8

Der Proliferationsassay mit der Zelllinie HMEC-1 ergab eine dosisunabhängige Stimulation der Zellen durch IL-8, die schon ab der Konzentration von 1 ng/ml deutlich wurde. Den maximalen Effekt des BrD-U-Einbaus erreichten schon 10 ng IL-8/ml mit einer fast 2,4-fachen Erhöhung des OD-Wertes. Die Chemokinkonzentrationen von 100 ng/ml und 1 µg/ml bewirkten noch eine Proliferationszunahme um ~70% bzw. 90% im Vergleich zur Kontrolle.

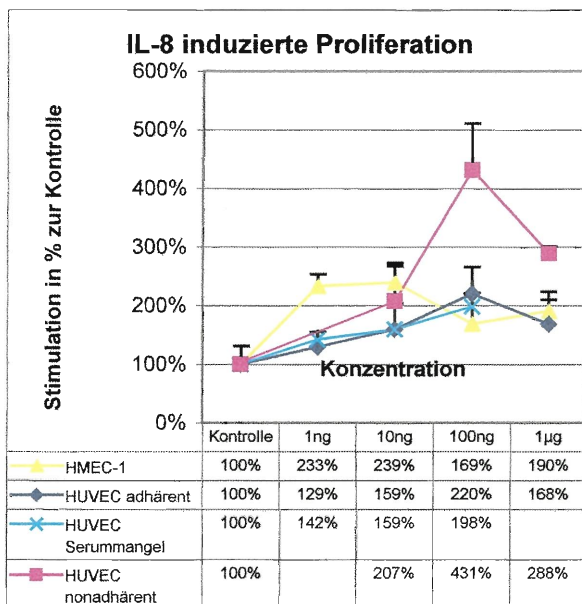


Abbildung 3.3.4. zeigt die Mittelwerte von 3 Experimenten unter normalen Bedingungen (n=4) der Probenzahl n pro getesteter Konzentration ± der Standardabweichung. Serummangelbedingungen (n=5), HMEC (n=4) und nonadhärente HUVEC (n=3) wurden in je einem Experiment getestet.

Vergleich zu schon adhärennten Zellen. Die maximale Wachstumssteigerung um  $430 \pm 80\%$  wurde auch bei den nonadhärennten HUVEC mit der Dosis von 100 ng IL-8/ml erreicht.

Bei HUVEC zeigte sich ab Konzentrationen von 10 ng IL-8/ml ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) in der Proliferation mit einem Gipfel bei 100 ng IL-8 pro ml Medium. Im Mittel ergab diese Konzentration eine  $2,2 \pm 0,4$ -fache Steigerung des BrD-U-Einbaus im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.

Unter Serummangel zeigte sich ebenfalls eine dosisabhängige Steigerung in der Proliferation um bis zu  $98 \pm 25\%$ .

Stimulation frisch eingesetzter HUVEC mit IL-8 induzierte eine deutliche Zunahme in der Proliferation im

### 3.3.3.2. Gro-Alpha

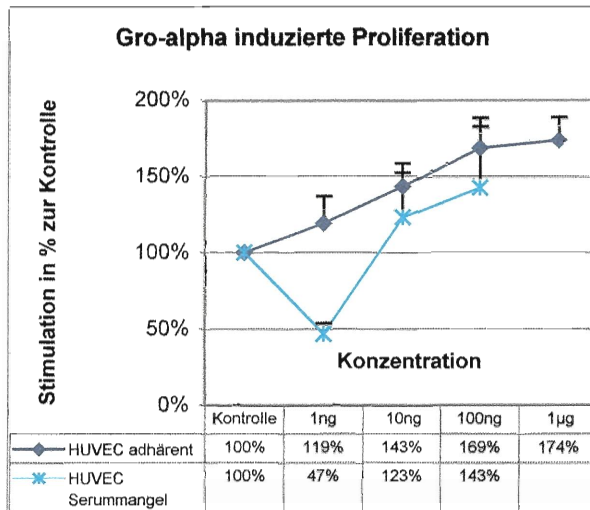


Abbildung 3.3.5. zeigt die Mittelwerte je eines Experimentes unter normalen (n=6) und Serum-mangelbedingungen (n=5) der Probenzahl n pro getesteter Konzentration  $\pm$  der Standardabweichung

Ab einer Konzentration von 10 ng Gro- $\alpha$  /ml ließ sich ein dosisabhängiger Effekt auf die Zellproliferation erkennen. Das Maximum der Stimulation war bei 1  $\mu$ g Gro- $\alpha$ /ml erreicht. Bei dieser Chemokinmenge war die Extinktion im Mittel mit  $0,298 \pm 0,024$  OD um das 1,56-fache höher als bei unstimulierten Zellen. In diesem Experiment stellte das den höchsten BrD-U-Einbau dar, der nur noch von 100 ng VEGF /ml erreicht wurde.

Im Gegensatz dazu zeigte die Konzentration von 1 ng Gro- $\alpha$ /ml in serumarmem Medium deutlich inhibitorische Wirkung auf das Endothelzellwachstum. Die HUVEC reagierten mit einem Proliferationsabfall um  $53 \pm 6\%$ . Die Dosis von 100 ng pro ml hingegen steigerte die Proliferation um das 1,4-fache im Vergleich zur Kontrolle.

Für adhärenente HUVEC konnte unter normalen Kulturbedingungen für die Zyto- bzw. Chemokine VEGF, IL-8 (bis 100 ng/ml) und Gro- $\alpha$  eine dosisabhängige proliferationsfördernde Wirkung gezeigt werden. Eine Zunahme der Proliferation ohne klare Korrelation zur Dosierung wiesen adhärenente HUVEC für die getesteten Zytokine b-FGF und Angiogenin auf. Ebenso nicht eindeutig dosisabhängig steigerten HMEC-1 ihr Zellwachstum unter dem Einfluss von VEGF, b-FGF und IL-8. Nur Angiogenin ließ HMEC-1 bis zur Dosis von 100 ng/ml konzentrationsabhängig stärker proliferieren. Insgesamt glichen die mikrovaskulären HMEC-1 in ihrem Wachstumsverhalten den makrovaskulären HUVEC, reagierten aber auf die jeweiligen Zyto- bzw. Chemokingaben mit einer stärkeren Proliferation.

Unter Serum-mangel zeigte sich vor allem unter dem Einfluss von b-FGF eine deutlich erhöhte Zytokinsensibilität für die Proliferation von HUVEC. Konnte dieser Effekt unter

Serummangel zumindest tendenziell für die Zytokine VEGF und Angiogenin festgestellt werden, war er für die Chemokine IL-8 und Gro- $\alpha$  nicht zu erkennen. Unter Serummangel und dem Einfluss geringer Gro- $\alpha$ -Mengen zeigte sich sogar eine Wachstumshemmung.

Bei simultan zur Zelleinsaat stimulierten HUVEC konnte im Vergleich zu adhärenenten HUVEC eine für alle Zyto- bzw. Chemokine deutlich verstärkte proliferative Wirkung festgestellt werden. Diese war für VEGF, Angiogenin (bis 100 ng/ml) und IL-8 (bis 100 ng/ml), nicht jedoch für b-FGF dosisabhängig.

Zusammengefasst ergibt sich aus den ELISA-Daten eine melanomzellspezifische Höhe bzw. Zunahme der Zyto- und Chemokinsekretion unter entsprechenden Kulturbedingungen für VEGF, Angiogenin, IL-8 und Gro- $\alpha$  im Vergleich zu differenzierten Melanozyten. Dieses zu normalen Melanozyten signifikant unterschiedliche Sekretionsverhalten der Melanomzellen wird aber in ähnlicher Ausprägung auch von Fibroblasten (für VEGF, Angiogenin, IL-8 und Gro- $\alpha$ ) sowie Endothelzellen (für Angiogenin, IL-8 und Gro- $\alpha$ ) gezeigt.

Inwieweit diese Zyto- bzw. Chemokine als exogen zugefügte Angiogenesefaktoren das Endothelzellwachstum *in vitro* beeinflussen, ließ sich mit den Ergebnissen der Proliferationsassays darstellen.

Sowohl mikrovaskuläre (HMEC-1) wie auch makrovaskuläre (HUVEC) Endothelzellen konnten, teilweise dosisabhängig, durch alle getesteten Zyto- und Chemokine zu einer erhöhten Proliferation stimuliert werden. Dabei ließ sich ein meist stärkeres Ansprechen der mikrovaskulären Endothelzellen auf die Zyto- bzw. Chemokine im Vergleich zu den makrovaskulären Endothelzellen feststellen.

Im Vergleich zu stimulierten Endothelzellen unter normalen Kulturbedingungen zeigte sich unter Serummangel eine vermehrte Proliferation der Endothelzellen vor allem für b-FGF und tendenziell für die Zytokine VEGF und Angiogenin. Dieser Effekt konnte nicht für die Chemokine IL-8 und Gro- $\alpha$  festgestellt werden.

Stimulation noch nicht adhärenter Endothelzellen (HUVEC) verstärkte die proliferationsfördernde Wirkung aller getesteten Zyto- und Chemokine um ein Vielfaches.

## **4. Diskussion**

Wesentliche Charakteristika von Malignomen sind deren lange andauernde klinische Inapparenz, oft mehrjährige Rezidivfreiheit nach Primärexzision und die dann akut auftretende Verschlechterung mit Auftreten und Ausbreitung von Metastasen. Dies spricht dafür, dass erst mit dem Erreichen einer bestimmten Tumor- oder Metastasengröße ein rapides Wachstum einsetzt. Eine Erklärung dieses Phänomens fände sich in der im Tumor selbst sequentiell hervorgerufenen Unterversorgung. Diese führt über erhöhte Expression zur verstärkten Generation und Freisetzung von Zytokinen in den Tumor- und Stromazellen. Diese induziert nun Neoangiogenese und ermöglicht bzw. erleichtert vermehrtes Wachstum sowie Metastasierung.

Wie Helmlinger und seine Mitarbeiter (258) beobachteten, stellen Tumorgefäße die Tumorversorgung, trotz vorhandener Gefäßdichte bzw. Gefäßperfusion, nicht in allen Tumorarealen sicher. Mit der Neovaskularisation steigt also die Wahrscheinlichkeit der Filiaebildung, die Mangelversorgung aber dauert zumindest teilweise an, so dass die Produktion angiogenetischer Faktoren durch Tumor wie Stroma weiterhin unterhalten wird.

Die Neoangiogenese scheint trotzdem der entscheidende Schritt, um aus kleinen Tumoren oder Mikrometastasen mit diffusionsreguliertem Proliferations-Apoptose-Gleichgewicht uneingeschränktes Wachstum und weitere Metastasierung zu ermöglichen.

Diese Hypothese wird gestützt durch zahlreiche experimentelle Studien mit VEGF. Auf der Suche nach der potentiellen und essentiellen Regulation für die Neubildung von Gefäßen wurden viele weitere Kandidaten identifiziert (b-FGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Angiogenin oder Interleukin-8). Eine zentrale Rolle von VEGF nicht nur bei der Entwicklung und Differenzierung des Gefäßsystems, sondern auch bei der Neoangiogenese, ist heute unbestritten.

Der erste direkte Nachweis, dass VEGF auch bei der Tumorgenese eine wesentliche Rolle spielt, gelang mit der Applikation spezifischer monoklonaler Antikörper gegen VEGF, die über Hemmung dieses endogenen endothelialen Mitogens die Suppression von Tumorwachstum (humane Tumorzelllinien in Nacktmäusen) in vivo bewirkten

(18). Mit Hilfe intravitaler Tumor-Videomikroskopie konnten diese Befunde bestätigt werden. VEGF-induzierte Angiogenese kann durch Antikörper gegen VEGF blockiert werden und dadurch wachsende, maligne Tumore zu ruhenden Zellkolonien supprimieren (19).

Folgende Studien mit VEGF-Antikörpern, VEGF-Toxin-Verbindungen, kompetitiver VEGF-Rezeptorapplikation oder Zelltransfektionen mit VEGF-Antisense-mRNA konnten die Bedeutung dieses Zytokins für die Angiogenese bzw. Tumorwachstum unterstreichen und machten es zu einem der meistuntersuchten angiogenetischen Zytokine (19,59,79,259,260). Auch für b-FGF, Angiogenin und PDGF konnten diese Effekte beschrieben werden (21,142,161,181).

Weiterhin haben in-situ-Hybridisierungs-Studien gezeigt, dass die VEGF-mRNA in der Mehrzahl menschlicher Tumore auffallend hochreguliert ist, und dass die VEGF-Expression in den hypoxischen Tumorzellen in Nachbarschaft nekrotischer Areale am höchsten ist (71). Außerdem haben Patienten mit VEGF-positiven Tumoren eine weitaus schlechtere Prognose als solche mit VEGF-negativen Tumoren (91,92,93,94,261).

An Melanomzellen konnten Rofstad und Danielsen in ihren in vivo und in vitro Studien zeigen, dass unter Normoxie niedrig-VEGF-sezernierende Melanomzellen, nachdem sie in vitro Hypoxie ausgesetzt waren, in vivo eine Zunahme der Gefäßzahl in den gebildeten Tumoren bzw. eine posthypoxisch deutlich erhöhte Metastasierungstendenz im Vergleich zu normoxischen Zellen der gleichen Linie aufwiesen. Die Anzahl der neugebildeten Kapillaren glich sich der der Tumore jener Melanomzelllinien an, deren VEGF-Sekretion unter Normalbedingungen wie auch Hypoxie deutlich höher waren. Diese Melanomzelllinien konnten in vitro unter Hypoxie ihre schon initial hohe VEGF-Basalsekretion weniger stark vervielfachen. Entsprechend zeigten die hypoxischen Zellen dieser Melanomzelllinien in vivo keine wesentlichen Veränderungen bezüglich einer höheren Gefäßdichte und Metastasierungstendenz im Vergleich zu normoxischen Zellen (262,263).

Die bisherige Studienlage unterstreicht die Hypothese, dass über eine Hemmung angiogenetischer Zytokine und der daraus resultierenden Hemmung der Neovaskularisation ein Mechanismus zur Tumorsuppression gegeben ist, mit



zunehmender Evidenz. Wie Rofstad et al. zeigten, scheint der Einfluss von Melanomzellen auf die Gefäßneubildung nicht nur über absolute Sekretionsmengen von Zytokinen sondern auch über deren zeitliche Regulation gesteuert zu werden.

In der vorliegenden Studie wurde das Zyto- und Chemokinmuster und Sekretionsverhalten von Melanomzelllinien unterschiedlicher Malignität unter Kontrollbedingungen (Normoxie und normales Medium), Hypoxie und Substratmangel und die Auswirkungen dabei besonders hervorstechender Zyto- und Chemokine auf Endothelzellen *in vitro* untersucht, um das grundlegende Verständnis der tumorinduzierten Angiogenese durch Melanomzellen zu verbessern.

Die Ergebnisse des Melanomzellwachstums sollen gemeinsam mit den ELISA-Ergebnissen diskutiert werden, sofern die Proliferationsverhalten der Zelllinien im Zusammenhang mit den Zyto- bzw. Chemokinsekretionen besonders auffällig oder widersprüchlich erscheinen.

## **4.1. Diskussion der ELISA-Ergebnisse**

### **4.1.1. Vergleich der Veränderungen der Sekretion angiogenetischer Zytokine unter Hypoxie, Reoxigenierung, Serum- und Glukosemangel mit Daten aus der Literatur**

#### **4.1.1.1. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

Die basale VEGF-Sekretion der aus Metastasen stammenden Melanomzelllinien BLM und MV3 war signifikant höher als die der niedrigmalignen Zelllinien IF6 und 530. Ebenso zeigte sich für die Zelllinien BLM und MV3 eine mit der Zeit bzw. Zellzahl korrelierende Zunahme in der VEGF-Freisetzung. Auch dies unterschied sie deutlich von den Zelllinien IF6 und 530, welche in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit unter Normalbedingungen sogar ihre VEGF-Sekretion drosselten.

Hypoxie und folgende Reoxigenierung induzierten in allen Melanomzelllinien eine signifikante Sekretionssteigerung. Im Gegensatz zu unter Normalbedingungen

kultivierten Zellen beantworteten die Zelllinien IF6 und 530 den Entzug von Sauerstoff mit einer um den Faktor 6 bzw. 12 erhöhten Zytokinfreisetzung und damit stärkeren Sekretionssteigerung als die Zelllinien BLM und MV3 (Faktor 2-3). Zumindest die Zelllinie IF6 sezernierte damit gleich hohe VEGF-Mengen wie die hochmalignen Zellen.

Glukosemangel führte in den hochmalignen Zelllinien BLM und MV3 nur zu geringer bzw. keiner Sekretionssteigerung. Melanomzellen niedrigerer Metastasierungspotenz hingegen erhöhten ihre VEGF-Sekretion um das 2-3-fache.

Eine Zwischenstellung im Sekretionsverhalten ergab sich für die Zelllinien WM115 und HT144. Bei diesen Zellen war sowohl ein Anstieg der VEGF-Sekretion unter normalen Kulturbedingungen in Abhängigkeit der Zeit als auch eine noch stärkere Hochregulation unter Hypoxie und Glukosemangel (nur WM115) zu verzeichnen. Auffällig war, dass HT144 unter normalen Zellkulturbedingungen kaum VEGF abgaben, aber unter Hypoxie die sezernierte Zytokinmenge um das 24-fache in den Bereich des VEGF-Niveaus hochmaligner Melanomzellen steigerten. Im Vergleich dazu verhielten sich die Zellen der Melanomzelllinie 530 wie normale Melanozyten. Ausgehend von ähnlich niedrigen VEGF-Mengen steigerten auch diese ihre VEGF-Sekretion z.T. bis auf das 15-fache der Basalwerte, blieben aber immer unterhalb des Nanogrammbereiches, einem experimentellen Schwellenwert für in vivo und in vitro Angiogenese (siehe unten).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie passen zu der von Poetgens et al. 1995 beschriebenen VEGF-mRNA-Expression in den Melanomzellen MV3, BLM und IF6 unter normalen bzw. hypoxischen Bedingungen. Dabei unterschieden sich die hochmalignen Zelllinien BLM und MV3 von der Zelllinie IF6 durch höhere basale mRNA-Expression in vitro. Nach Xenotransplantation in Mäuse verzeichneten aber alle nun Tumore-bildenden Melanomzelllinien eine vergleichbare Zunahme der VEGF-mRNA-Expression (264). Diese Entdeckung wäre durch das Phänomen der Induktion von Zytokinproduktion und -sekretion durch Hypoxie und Glukosemangel innerhalb der Tumore zu erklären. Diese Effekte sind für Melanomzellen, andere Tumore und Fibroblasten beschrieben (30,31,62,63) und bestätigen die hier für Melanomzellen und Fibroblasten (siehe unten) erhaltenen Ergebnisse.

Inwiefern eine autokrine Stimulation über die Bindung von VEGF an melanomzelleigene VEGF-Rezeptoren eine Ursache für das z.T. unterschiedliche Verhalten entdifferenzierter melanozytärer Zellen in vitro und in vivo und die Melanomgenese in Betracht kommt, ist eine zusätzliche und wichtige zu klärende Frage, insbesondere da die Arbeitsgruppe um Frau Gitay-Goren für normale Melanozyten keine derartigen Rezeptoren entdecken konnte (99).

Für eine rezeptorpositive Melanomzelllinie (A375) konnten Graells et al. in Abhängigkeit einer zelleigenen VEGF-Überexpression einen zellprotektiven und –proliferativen Effekt unter Serumangelbedingungen in vitro nachweisen (265). Graeven et al. konnten hingegen in ihren Studien mit VEGF- bzw. b-FGF-überexprimierenden WM164-Melanomzellen keine autokrine Proliferationszunahme in vitro feststellen (266). Zur Deutung der unterschiedlichen Ergebnisse beider Publikationen bliebe zu klären, ob die hohen VEGF-Basalwerte der nicht transfizierten Ausgangszelllinie WM164 (im Sinne einer schon initial maximalen autokrinen Proliferationsstimulation) oder der, in der Studie nicht dargestellte, VEGF-Rezeptorstatus der Melanomzelllinie WM164 für die unterschiedlichen Ergebnisse ausschlaggebend sind.

Anhand der in der hier vorgelegten Arbeit dargestellten Daten zum Melanomzellwachstum ließ sich für keine der untersuchten Melanomzelllinien ein proliferativer Effekt unter Serumangelbedingungen im Vergleich zu normalen Kulturbedingungen feststellen. Lediglich die hochmalignen Melanomzelllinien BLM und MV3 hatten unter Serumangel (bei deutlich erhöhter VEGF-Sekretion) eine vergleichbar niedrige Apoptoserate wie unter Kontrollbedingungen. Ob dies ein Hinweis auf den, bis dato für alle in dieser Studie getesteten Melanomzelllinien nicht untersuchten bzw. publizierten VEGF-Rezeptorstatus ist, bleibt zu klären. Allerdings nimmt sich eine bis zu 70%ige Sekretionszunahme unter Serumangelbedingungen, welche in der hier vorgelegten Studie für die Zelllinie BLM gezeigt wurde, gering aus im Vergleich zu der durch Zelltransfektion erreichten bis zu 100-fachen Steigerung der VEGF-Freisetzung. Daher wäre ein Vergleich mit den unterschiedlichen Ergebnissen beider Publikationen auch bei bekanntem Rezeptorstatus fraglich.

Einheitlich dagegen ist die Studienlage für die VEGF-induzierte Melanomprogression *in vivo*, welche über die Neoangiogenese zumindest gefördert wird.

In der vorliegenden Studie konnte für makro- und mikrovaskuläre Endothelzellen keine (HUVEC und HDMEC) bzw. nur eine sehr geringe (HMEC-1) VEGF-Sekretion unter allen getesteten Kulturbedingungen nachgewiesen werden.

In der Literatur finden sich bezüglich der VEGF-Expression bzw. -Sekretion durch Endothelzellen widersprüchliche Angaben. So entdeckten Dvorak et al. bei *in situ* Hybridisierung keine VEGF-Transskripte in Endothelzellen, die tumorassoziiert neue Gefäße bildeten und immunhistochemisch nachweislich VEGF an ihren Rezeptoren stark gebunden hatten (72). Ebenso konnten Minchenko und seine Mitarbeiter bei *in vitro*-Experimenten mit HUVEC nach 18 Stunden Hypoxie keine Zunahme der VEGF-Exprimierung feststellen, welche unter Normalbedingungen zwar vorhanden war aber sehr gering ausfiel (62).

Namiki et al. (66) fanden heraus, dass HUVEC und HMEC unter normalen Bedingungen keine VEGF-mRNA bildeten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen reagierten beide Zelllinien aber mit einer in Abhängigkeit von der Hypoxiedauer zunehmenden VEGF-mRNA-Expression (Maximum nach 48 Stunden), Proteinsynthese und (über autokrine Proliferationssteigerung vermutete) Sekretion.

Gleichartige Ergebnisse beschrieben Detmar et al. (63) für HDMEC nach 24 Stunden Hypoxie. Eine weitere Arbeitsgruppe um Nomura (32) fand nicht nur eine Induktion der VEGF-mRNA unter Hypoxie sondern auch eine gleichzeitige Zunahme der Zellzahl von HUVEC. Hierfür wäre eine autokrine Stimulation via VEGF sehr wahrscheinlich. Allerdings beschränkte sich der Effekt auf O<sub>2</sub>-Werte > 5%. Bei niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen zeigte sich bei Nomura et al. und in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass die Zellzahl der untersuchten HUVEC und HDMEC unter bzw. nach Sauerstoffentzug abnahm.

Das Zustandekommen der z.T. unterschiedlichen Endothelzellreaktionen auf Hypoxie lässt sich am ehesten mit den divergierenden Sauerstoffkonzentrationen in den jeweiligen Studien erklären. Diese resultieren aus den unterschiedlichen Versuchsprotokollen und -zeiten. Wie die Arbeit von Clauss et al. (267) für HUVEC belegen konnte, ist sowohl die Proliferation als auch die VEGF-mRNA-Expression vom

Grad der Hypoxie abhängig und letztere unter Anoxie am höchsten. Inwiefern diese erhöhte mRNA-Expression aber mit einer VEGF-Sekretion einhergeht, wird seitens der Autoren nicht erwähnt.

Eine Erklärung für die Unterschiede im VEGF-Nachweis unter Normalbedingungen könnte in den Kulturbedingungen liegen, da teilweise mit Kollagen oder Gelatine beschichtete Petrischalen und unterschiedliche Medien zur Zellkultur verwandt wurden. Der Einfluß verschiedener Extrazellulär-Matrix-Proteine auf die Proliferation von HUVEC im Zusammenspiel mit VEGF konnte nachgewiesen werden (268). Ob ein diesbezüglicher Einfluss auch auf eine VEGF-Expression existiert, bleibt zu klären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die von Hlatky et al. (29) beschriebene Beobachtung, dass Fibroblasten ihre VEGF-Sekretion unter Hypoxie reversibel auf ein bis zu 10-faches steigern können.

#### **4.1.1.2. Basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF)**

Alle in der vorliegenden Studie getesteten Melanomzelllinien sezernierten b-FGF vor allem unter normalen Kulturbedingungen in geringen Mengen. Dabei ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Sekretionsverhalten unter normalen Kulturbedingungen zwischen den Melanomzelllinien nachweisen.

Unter Entzug von Sauerstoff oder Glukose konnten signifikante Zunahmen der b-FGF-Sekretion durch die hier getesteten Melanomzellen gezeigt werden ( $p < 0,005$  bzw.  $p < 0,05$ ). Glukosemangel und Reglukosierung induzierte insbesondere in den hochmalignen Melanomzelllinien BLM und MV3 die stärkste b-FGF-Sekretionssteigerung. Sie unterschieden sich in ihren sezernierten b-FGF-Mengen signifikant von den geringmalignen Zelllinien ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,025$ ). Die Potenz zur b-FGF-Sekretionssteigerung unter bzw. nach Glukoseentzug besaß, im Gegensatz zur niedrigmalignen Zelllinie IF6, auch die ebenfalls geringmaligne Zelllinie 530.

Hypoxie führte hingegen bei allen getesteten Melanomzelllinien zu einer signifikanten b-FGF-Sekretionssteigerung, welche bei den geringmalignen Melanomzelllinien auch nach Reoxigenierung anhielt.

Die unter Normalkulturbedingungen erhaltenen Ergebnisse dieser Studie sind im Einklang mit der von Singh et al. (137) gezeigten b-FGF-mRNA Expression von

Melanomzellen verschiedener Malignität. Auch die Arbeitsgruppe von Rofstad konnte in vier Melanomzelllinien stets b-FGF-mRNA-Expression nachweisen, stellte allerdings fest, dass in vitro nur bei der im Tierversuch am stärksten metastasierenden Zelllinie b-FGF im Zellüberstand zu detektieren war (269).

Die im Vergleich zu den von den Endothelzellen und Fibroblasten geringen b-FGF-Mengen in den Medienüberständen der Melanomzellen könnten durch einen relativ höheren endogenen b-FGF-Verbrauch in vitro erklärt werden. Die in dieser Arbeit nachgewiesene, unter Hypoxie und Glukosemangel deutlich reduzierte Melanomzellproliferation und erhöhte Apoptoserate bei gleichzeitigem b-FGF-Anstieg in den Überständen würden diese Hypothese stützen. Zur Klärung dieser Hypothese wären weiterführende Experimente aber zwingend erforderlich.

Insgesamt betrachtet ließen sich in den Zellüberständen der Melanomzellen allerdings nur sehr geringe b-FGF-Mengen nachweisen, dass deren parakrine Relevanz zu hinterfragen bleibt (s.Kap.4.2.). Für eine parakrine Bedeutung sprächen die Resultate der Studie von Graeven et al. (266). Diese zeigten bei b-FGF-überexprimierenden Melanomzellen in vitro keine Proliferationszunahme, wohl aber ein verstärktes Metastasenwachstum in SCID-Mäusen im Vergleich zu den nicht transfizierten Melanomzellen der gleichen Linie. Ob die durch b-FGF-mRNA-Transfektion induzierte b-FGF-Sekretion von über 400 pg/10<sup>6</sup> Melanomzellen einen derartigen Rückschluß erlaubt, bleibt allerdings offen.

Vergleichende Daten zu Änderungen der b-FGF-Sekretion von Melanomzellen durch die Reize Hypoxie, Serum- oder Glukosemangel sind bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Bei normalen Melanozyten konnte in dieser Studie für jeweils zwei von vier Zellstämmen keine bzw. eine sich nicht signifikant von Melanomzellen unterscheidende b-FGF-Sekretion nachgewiesen werden. Die zwei primären Melanozytenzellstämme mit basaler b-FGF-Freisetzung zeigten darüber hinaus eine durch Hypoxie induzierbare Sekretionssteigerung und unterschieden sich damit nicht von den Melanomzelllinien.

Mit den Resultaten dieser Studie vergleichbar beschrieben Graeven et al. eine b-FGF-mRNA-Expression und ähnlich hohe b-FGF-Sekretion durch einen melanozytären

Primärzellstamm wie auch eine Melanomzelllinie unter Normalbedingungen (54). Die Ergebnisse beider Arbeiten stehen im Widerspruch zu den von Albino bzw. Mattei et al. vorgestellten Resultaten. Diese Arbeitsgruppen konnten keine bzw. nur mit Signalverstärkung geringe Mengen an b-FGF-mRNA in den getesteten normalen Melanozyten nachweisen (138,140).

Die Tatsache, dass einige primäre Melanozyten b-FGF freisetzen ist vielleicht mit einer, nur in einer bestimmten Phase des Melanozytenlebens stattfindenden b-FGF-Gentranskription und -translation zu erklären, die unter Hypoxie reaktiviert werden kann. Diese Hypothese würde auch die im Vergleich zu den Melanomzellen ähnlich hohen b-FGF-Spiegel in den Melanozytenüberständen erklären. Die in den Melanomzellen als Folge der Entartung stets vorhandene Expressierung und erhöhte mRNA-Translation wäre in normalen Melanozyten bestimmten Bedingungen und Regulationsmechanismen unterworfen, aber im gleichen Ausmaß möglich.

Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch b-FGF enthaltendes Kulturmedium ist aufgrund der negativen Mediumkontrolle auszuschließen und könnte einen Anstieg in der nachweisbaren b-FGF-Menge unter Hypoxie nicht erklären. Da die ELISA-Sensitivität vom Hersteller mit  $<0,043$  pg / ml angegeben wird, sind die Ergebnisse noch im Vertrauensbereich des Tests. Eine Kontamination der primären Melanozytenkultur durch Fibroblasten, die in geringem prozentualen Anteil entsprechende b-FGF-Mengen sezernieren könnten, ist aufgrund mehrerer Parameter als unwahrscheinlich anzunehmen aber nicht auszuschließen:

1. hochsignifikant unterschiedliche Zytokinlevel der gleichen Zellüberstände (selbst im Vergleich von unter Hypoxie erhöhten melanozytären Überständen zu niedrigen Kontrollüberständen von Fibroblasten: IL-8:  $p<0,001$ , b-FGF:  $p<0,001$ , Angiogenin:  $p<0,001$ , VEGF:  $p<0,005$ ),
2. keine prozentuale Korrelation der jeweiligen Zytokinmengen zwischen den Zytokinen und
3. z.T. gegenläufige Sekretionsverhalten unter verschiedenen Kulturbedingungen und -zeiten.

Zum Ausschluss bzw. um genauere Aussagen treffen zu können, wären jedoch weitergehende Experimente auf RNA-Ebene oder eine Prüfung auf spezifische Oberflächenantigene mittels FACS für die verwendeten primären Melanozyten nötig.

#### 4.1.1.3. Angiogenin (ANG)

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit, weiterführenden Experimenten zur Erfassung von Veränderungen der Angiogenin-Synthese auf mRNA-Ebene und in-vivo-Vorkommen des Proteins wie m-RNA konnte gezeigt werden, dass sowohl Angiogenin-mRNA als auch -Protein in Melanomzellen durch Hypoxie verstärkt exprimiert bzw. gebildet und sezerniert werden (270).

Bei allen getesteten Melanomzelllinien ließ sich Angiogenin in den Überständen nachweisen. Die basale Angiogenin-Sekretion war bei den Melanomzelllinien BLM und MV3 signifikant höher als bei den, im Mittel nur halb soviel Angiogenin sezernierenden, niedrigmalignen Zelllinien. Nur Hypoxie induzierte in allen Melanomzelllinien eine deutliche Zunahme der Angiogeninfreisetzung. Die anderen Mangelbedingungen bewirkten keine charakteristischen Veränderungen.

Primäre Melanozyten sezernierten unter normalen Kulturbedingungen je nach Zellstamm ähnlich hohe Angiogeninmengen wie die gering- und hochmalignen Melanomzellen. Unter Hypoxie regulierten sie aber ihre Zytokinabgabe herunter und erhöhten diese erst nach Reoxygenierung. Damit unterschieden sie sich signifikant von den Melanomzellen. Diese Ergebnisse lassen sich durch die von Hartmann et al. (270) gemachte Feststellung untermauern: Melanozyten reagierten unter Hypoxie mit einem reversiblen schwachen Anstieg des Angiogenin-mRNA-Spiegels. Die mRNA-Translation der melanozytären Primärzellen erfolgte im Gegensatz zu den Melanomzellen aber erst unter Reoxygenierung.

In vivo zeigten sich noch weitergehende Unterschiede zwischen normalen Melanozyten und Melanomzellen. In der Arbeit von Hartmann et al. konnte durch Immunfärbungen melanozytärer Läsionen (Melanome und gutartige Nävi) dargelegt werden, dass Melanozyten in den Nävi im Gegensatz zu den malignen Melanomen keine signifikante Färbung für Angiogenin-Protein aufweisen. Zudem ließen sich in benignen Naevi nur in 2 von 8 Fällen, aber in allen Melanomen Angiogenin-mRNA-Transkripte nachweisen. In situ akkumulierte Angiogenin in den an nekrotische Bezirke angrenzenden Tumorebenen. Dies unterstützt die These einer auch in vivo mangelinduzierten Zytokinsynthese. Von besonderer Bedeutung erscheint die Beobachtung, dass diese Gewebestellen, zumindest in Metastasen, eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßen



aufwiesen als Angiogenin-negative Bereiche. Dies könnte auf eine besondere Relevanz von Angiogenin für die Angiogenese hinweisen.

In Anlehnung an die Beobachtung, dass Angiogenin ein weitverbreitet exprimiertes Zytokin ist, ergeben sich keine neuen Resultate für Endothelzellen und Fibroblasten unter normalen Kulturbedingungen.

Die Beobachtung, dass die Angiogenin-Sekretion unter Hypoxie gesteigert wird, stellt für Endothelzellen ein Novum dar, ist aber aufgrund der geringen Experimentanzahlen unter Vorbehalt zu sehen.

In der Studie von Pilch et al. konnte für Fibroblasten eine mit den hier vorgestellten Ergebnissen konforme Sekretionssteigerung unter Hypoxie nachgewiesen werden (271).

#### **4.1.1.4. Platelet-Derived Growth Faktor (PDGF)**

In der vorliegenden Studie konnte für alle Melanomzelllinien eine deutliche PDGF-Sekretion nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den bisherigen Publikationen zu diesem Thema überein (138,171,178,228).

In Anbetracht der geringen Versuchszahl ist die Gewichtung der signifikanten ( $p < 0,1$ ) Mindersekretion durch die hochmalignen Melanomzellen kritisch zu hinterfragen, wird für PDGF doch eine autokrine Wachstumsstimulation bei Melanomzellen postuliert (181). Zu einer abschließenden Beurteilung dieser Frage ist eine Klärung des PDGF-Rezeptorstatus der getesteten Zelllinien essentiell. Diese ist aber bisher noch nicht erfolgt.

Wie hier aber auch gezeigt werden konnte, regulieren niedrigmaligne Melanomzellen ihre PDGF-Sekretion unter Hypoxie wesentlich stärker herunter als hochmaligne Melanomzellen und würden somit, gleichen Rezeptorstatus vorausgesetzt, ab einer gewissen Tumorgröße und dem damit verbundenen Nähr- und Sauerstoffmangel, stärker einen Promotor ihrer Proliferation einbüßen als die bösartigeren Zellklone.

Dieser Hypothese widersprechen die in dieser Studie dargestellten Ergebnisse unter Serumangelbedingungen nur vordergründig:

Obwohl die geringmalignen Zelllinien unter Serumangel kaum veränderte und damit signifikant höhere PDGF-Mengen sezernierten als die Zelllinien BLM und MV3, sind

die absoluten Veränderung in der PDGF-Sekretion unter Hypoxie deutlich stärker ausgeprägt.

Verhindert Serummangel, wie die publizierten Daten nahe legen (136,180), ein Ansprechen der Melanomzellen auf PDGF, betrifft das alle Zelllinien gleichermaßen.

Allerdings bewirkte Serummangel unter den hier getesteten Mangelbedingungen für alle Melanomzellarten die geringste Proliferationshemmung. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Sekretion von PDGF zumindest keine tragende Rolle für die *in vitro* Proliferation der Melanomzellen spielt. Eine weitere, in Betracht zu ziehende Hypothese ist die Möglichkeit der direkt intrazellulär erfolgenden autokrinen Stimulation durch PDGF, wie sie von Harsh et al. für ein Osteosarkomklon postuliert wird (171).

Die beiden getesteten primären Melanozytenzellstämme gaben unabhängig von den Kulturbedingungen jeweils geringe Mengen PDGF in die Überstände ab. Quantitativ und qualitativ unterschieden sie sich dabei deutlich von den Melanomzelllinien in den PDGF-Mengen wie in der Tatsache, dass normale Melanozyten auf Stressbedingungen ihre PDGF-Sekretion nicht erkennbar modulieren. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den von Rodeck und Albino (136,138) vorgestellten Resultaten für normale Melanozyten, die meist keine PDGF-mRNA und wenn, dann nur mRNA für PDGF-A-Ketten exprimierten. Die hier erhaltenen Ergebnisse niedriger PDGF-AB-Proteinwerte in den Überständen könnten aufgrund der vom Hersteller eingeräumten Kreuzreaktivität von 10% zu PDGF-A zustande gekommen sein. Ein weiterer Grund könnte eine technische Messungenauigkeit sein, da die Messwerte unter der niedrigsten Standardkonzentration lagen. Herstellerangaben zufolge liegt die niedrigste Sensitivität mit 8,4 pg pro ml allerdings noch unter den Messwerten.

Wie in der Literatur beschrieben konnte eine PDGF-Sekretion durch Endothelzellen unter normalen Kulturbedingungen festgestellt werden. Ebenso lassen die Ergebnisse von Michiels et al. (130) die Schlussfolgerung zu, dass Hypoxie keine Auswirkungen auf die PDGF-Sekretion von HUVEC hat. Dies bestätigen die hier gezeigten Daten für sowohl HUVEC als auch HDMEC.

#### 4.1.1.5. Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ )

Die Sekretion von TGF- $\beta$ 1 zeigte sich sowohl in Melanomzellen, normalen Melanozyten, Endothelzellen und Fibroblasten durch Hypoxie induzierbar oder steigerbar.

Die primären Melanozyten MSD sezernierten äquivalent hohe TGF- $\beta$ 1-Mengen wie die Melanomzelllinie BLM und veränderten diese unter Hypoxie gleichförmig. Die anderen untersuchten Melanomzelllinien lagen mit ihren Basalsekretionen sogar niedriger als die normalen Melanozyten. Eine Million Zellen beider Zellarten sezernieren schon unter Normalbedingungen ein ausreichend hohes Maß TGF- $\beta$  für eine parakrine Induktion von VEGF und b-FGF in Fibroblasten. Diese wird von Pertovaara und Leof et al. ab Konzentrationen von 1 ng/ml bzw. 10 ng/ml für die Produktion von b-FGF und VEGF bzw. PDGF durch Fibroblasten, sowie nur VEGF durch Epithelzellen beschrieben (35,195,198). Vielleicht liegt darin eine der Ursachen für die frühzeitige Zunahme der Gefäßzahl in noch prämaligen melanozytären Läsionen, wie sie von Barnhill bzw. Ribatti und jeweiligen Mitarbeitern beschrieben wurde (6,272).

Die Fibroblasten HFF sezernierten von allen in dieser Studie getesteten Zellarten die höchsten TGF- $\beta$ -Mengen beider Isoformen. Zeigte sich für TGF- $\beta$ 1 nur eine geringe Steigerung in der Proteinfreisetzung unter Hypoxie, wurde diese bei TGF- $\beta$ 2 um das 3,4-fache erhöht.

Bezüglich der  $\beta$ 1-Isoform sind diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit dem von Falanga et al. beschriebenen in-vitro-Effekt. In dessen Studie nahm die Zytokinsekretion durch Fibroblasten mit der Dauer der Hypoxie zu und stieg nach 72 Stunden auf das 9-fache des Ausgangswertes (208).

Gemäß den Ergebnissen von Pertovaara und Leof et al. (s.o.) besitzen die in dieser Arbeit getesteten Fibroblasten unter normalen Kulturbedingungen die Potenz zur autokrinen Induktion ihrer b-FGF und VEGF, nicht aber PDGF-Synthese. Letzteres kann aufgrund der PDGF-negativen Fibroblastenzellüberstände bestätigt werden.

Grundsätzlich sezernieren alle getesteten Zellarten TGF- $\beta$  und erhöhen unter Hypoxie die Zytokinfreisetzung. Da hohe TGF- $\beta$ -Spiegel aber inhibitorisch auf die Angiogenese wirken (112), würde die Neangiogenese unterversorgter Tumoreale durch TGF- $\beta$  scheinbar erschwert. Mehrere Mechanismen könnten das allerdings beeinflussen:

In dem hypoxischen und der Hypoxie nahen Gewebe wirken die höheren Zytokinlevel parakrin auf die Produktion von angiogenetischen Faktoren.

Durch Rezeptorbindung, den Diffusionsgesetzen folgenden Verdünnungseffekten und durch Inaktivierungsprozesse in der extrazellulären Matrix erreichen nur niedrigere, nun nicht mehr Angiogenese-inhibitorische sondern -fördernde Konzentrationen die, den Gefäßen näheren Tumor- bzw. Gewebезonen. Zu Stützung dieser These wären weitere Untersuchungen allerdings obligat.

#### **4.1.2. Vergleich der Veränderungen der Sekretion angiogenetischer Chemokine unter Hypoxie, Reoxigenierung, Serum- und Glukosemangel mit Daten aus der Literatur**

##### **4.1.2.1. IL-8**

Für die in dieser Studie getesteten Melanomzelllinien ließ sich unter allen Kulturbedingungen stets eine IL-8-Sekretion nachweisen. Dabei unterschieden die unter normalen Kulturbedingungen sezernierten IL-8-Mengen signifikant zwischen den Malignitätsgraden. Unter Hypoxie zeigte sich nicht nur ein quantitativer sondern auch ein qualitativer Unterschied zwischen den hochmalignen Zelllinien, welche ihre IL-8-Sekretion steigerten, und den geringmalignen Zelllinien, die ihre Chemokinfreisetzung drosselten. Nicht ganz so differenzierend reagierten die Melanomzelllinien auf Glukosemangel. Auf diesen Reiz hin reduzierten nur die Linien 530 und WM115 ihre IL-8-Sekretion, alle anderen Zelllinien reagierten mit einer Zunahme.

Charakteristisch für alle Melanomzelllinien erscheint eine Reduktion der IL-8-Freisetzung unter Serumangel sowie die Sekretionssteigerung nach Beendigung aller Stresssituationen.

Normale Melanozyten unterschieden sich in ihrem Sekretionsverhalten signifikant von allen Melanomzelllinien in zwei Punkten: Durch unter allen Kulturbedingungen niedrigere IL-8-Freisetzung und deren Steigerung unter Serumangel (alle Melanomzellen reduzieren ihre IL-8-Sekretion).

Dass IL-8 von Melanomzellen und normalen Melanozyten exprimiert und auch sezerniert wird, bestätigten die Publikationen mehrerer Arbeitsgruppen (219,226,273).

Passend zu den hier vorgestellten Ergebnissen zeigte die Arbeit von Singh et al. eine Korrelation zwischen der Menge an IL-8-Transskripten sowie IL-8-Protein-Sekretion untereinander sowie zu der metastatischen Potenz der Melanomzellen (232). Diese Aussage wird, wie in dieser Arbeit auf Sekretionsebene gezeigt, noch deutlicher für unter Hypoxie kultivierte Zellen, was Bar-Eli et al. anhand einer durch Hypoxie induzierbaren IL-8-mRNA-Expression in Melanomzellen belegen konnten (224). Kunz et al. testeten die Melanomzelllinien BLM, MV3, IF6 und 530 unter Hypoxie und konnten mit der vorliegenden Arbeit übereinstimmende Ergebnisse in der Chemokinsekretion aufweisen. Deren Studienergebnisse zeigten auch, dass die erhöhte Sekretion durch die hochmalignen Zelllinien mit einer deutlich vermehrten IL-8-mRNA-Expression und -Translation korrelierte (226). Ebenso wie Schadendorf et al. (219) konnten Kunz et al. den Nachweis führen, dass einige bzw. die meisten Melanomzellen in vivo IL-8-Rezeptor-A und z.T. auch IL-8-RB positiv sind.

Nach den Beobachtungen von Schadendorf et al. stellt IL-8 einen autokrinen Wachstumsfaktor für Melanomzellen dar (219). Dies könnte eine Erklärung für die sehr hohe bzw. höchste Proliferationsrate der Zelllinien BLM und MV3 nach Beendigung der Hypoxie sein, da die Zellen in dieser Phase, nach der maximalen autokrinen IL-8-Stimulation und weiterhin unter dem Einfluss hoher IL-8-Mengen den zur ungehinderten Proliferation nötigen Sauerstoff zur Verfügung hatten. Analog wiesen IF6 nach ihrer maximalen IL-8-Sekretion unter Reoxigenierung bzw. Glukosemangel eine sehr hohe bzw. die höchste Zellteilungsrate auf.

Die Arbeitsgruppe von Singh konnte darlegen, dass Melanomzellen mit niedriger, im Gegensatz zu denen mit hoher, endogener IL-8-Produktion durch exogenes IL-8 (abhängig von der Serumkonzentration des Mediums) im Wachstum stimuliert werden. Dies könnte die Beobachtungen von Bar-Eli erklären, dass IL-8 negative, nicht-metastatische Melanomzellen mit IL-8-Gen transfiziert im Tierversuch hohes metastatisches Potential entwickelten (224).

Im Einklang mit den Beobachtungen von Goebeler und Sticherling et al. (220,274) zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass Endothelzellen und Fibroblasten in vitro IL-8 sezernieren. Für Fibroblasten ließ sich zudem eine, in ähnlich hohem Maße wie für

Melanomzellen, deutliche Steigerung der IL-8-Sekretion unter Hypoxie und Reoxigenierung nachweisen.

Mikrovaskuläre Endothelzellen unterschieden sich von den makrovaskulären HUVEC durch eine höhere IL-8-Basalsekretion sowie eine stärkere Induzierbarkeit der IL-8-Sekretion. Ob sich hieraus ein autokriner Proliferationsstimulus vor allem von mikrovaskulären Endothelzellen durch IL-8 ableiten lässt, bleibt fraglich. Der geführte Nachweis von IL-8-RezeptorA bei kleinen Gefäßen in Melanommetastasen würde zumindest eine Grundvoraussetzung erfüllen (226).

Der Proliferationsversuch (s.u.) mit HMEC-1 deutet, durch ein sensitiveres Ansprechen in der Proliferationszunahme auf niedrige IL-8-Konzentrationen im Vergleich zu HUVEC, auf einen möglichen additiven autokrinen IL-8-Effekt hin. Allerdings lässt sich anhand nur eines Experimentes keine gültige Aussage treffen, zudem sich HMEC-1 im IL-8 Sekretionsverhalten unter Hypoxie von den nicht immortalisierten (makro- wie auch mikrovaskulären) Endothelzellen unterschieden.

IL-8 kann somit auf mehrere Weisen Melanomprogression fördern: 1. autokrine und von den Stromazellen ausgehende parakrine Wachstumsstimulation, 2. direkte Induktion der Angiogenese, 3. Chemotaktische Rekrutierung von Granulozyten und Makrophagen, die über die, z.T. noch durch Hypoxie verstärkte Sekretion von IL-8, GM-CSF, b-FGF, VEGF (275) Tumor- bzw. Gefäßwachstum induzieren.

Konnten Bornscheuer et al. weder bei Primärtumoren noch bei Metastasen IL-8-Immunreaktivität in Melanomzellen nachweisen (216), zeigte die Studie von Kunz et al. (226) IL-8-mRNA zumindest in Melanommetastasen mit Nekrosearealen. Eine Ursache dafür könnte in der von Gutman et al. beschriebenen TGF- $\beta$ -Wirkung liegen, welche in Melanomzellen eine deutliche Minderung der IL-8-mRNA zur Folge hatte (209).

Dazu passend wären die bereits angeführten Beobachtungen von Falanga (208, s.o.) bezüglich hoher TGF- $\beta$ -Mengen in Stromazellen. In Abhängigkeit der TGF- $\beta$ -Sekretion der Melanom- und Stromazellen wäre also ein fehlender IL-8-Nachweis in Melanomen zu einem gewissen Grad zu erklären. Eine ausreichende IL-8-Suppression durch TGF- $\beta$  in vivo ist aber aufgrund der nachgewiesenen Korrelation hoher IL-8-Expression bzw. Serumspiegel mit Metastasierungsgrad und Prognose unwahrscheinlich (232,233,261).

#### 4.1.2.2. Gro-Alpha

Die Sekretion des Chemokins Gro- $\alpha$  konnte für alle getesteten Melanomzelllinien nachgewiesen werden. Dabei fiel schon unter normalen Kulturbedingungen eine signifikant höhere Gro- $\alpha$ -Sekretion für die aus Metastasen gewonnenen Zelllinien BLM, MV3 und HT144 auf. Die aus Primärtumoren rekrutierten Linien IF6, 530 und WM115 wiesen z.T. nur knapp ein Zehntel der maximalen Chemokinmenge von MV3 in den Überständen auf. Die Zellen von WM115 sezernierten erst nach 48 Stunden überhaupt geringe Mengen an Gro- $\alpha$ .

Unter dem Einfluß von Hypoxie zeigten die niedrigmalignen Zelllinien eine signifikante Abnahme ihrer schon geringen Basalsekretion. Die hochmalignen Zelllinien reagierten entweder mit einer diskreten Abnahme (MV3) oder sogar mit einer leichten Zunahme in der Gro- $\alpha$ -Sekretion (BLM). Die Linie HT144 zeigte keine Veränderung unter Hypoxie. Weder unter Reoxigenierung, Serum- bzw. Glukosemangel und Reglukosierung kam es zu ähnlichen, für die Malignitätsgrade charakteristisch erscheinenden Veränderungen im Sekretionsverhalten der Melanomzelllinien.

Die in der vorliegenden Studie für Melanomzellen nachgewiesene Sekretion des Chemokins Gro- $\alpha$  unter normalen Kulturbedingungen stimmt mit Resultaten in der Literatur überein (136,139). Bisher sind keine Zusammenhänge zwischen der metastatischen Potenz der Melanomzelllinien und deren Gro- $\alpha$ -Sekretion beschrieben, wie sie die hier gezeigten Ergebnisse erwarten lassen. Zu Veränderungen unter Hypoxie sind bisher keine publizierten Nachweise zu finden. Bezüglich der Regulation von Gro- $\alpha$  unter Serumangel stimmt die für alle Melanomzellen, außer der Zelllinie IF6, gezeigte Verringerung der Proteinabgabe mit den von Lawson beschriebenen Resultaten überein (236). Dieser zeigte auch, im Gegensatz zu den von Rodeck (136) erstellten Daten, ein Vorkommen von Gro- $\alpha$  in normalen Melanozyten, was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen würden.

Die nachgewiesenen Gro- $\alpha$ -Mengen in den Überständen der normalen Melanozyten waren unter allen Kulturbedingungen signifikant niedriger als die der Melanomzelllinien (mit Ausnahme der Zelllinie WM115). Darüber hinaus zeigten Melanomzellen im Vergleich zu normalen Melanozyten unter Serumangel

gegenläufige Sekretionsverhalten. Weitere Unterschiede in der Chemokinfreisetzung ließen sich bei Reoxigenierung nur im Bezug auf hochmaligne Melanomzellen bestätigen, nicht aber für die Zelllinien WM115 und 530, die wie normale Melanozyten die Sekretion steigerten.

Interessanterweise wies die Zelllinie WM115 ohne bzw. mit nur minimalster Gro- $\alpha$ -Sekretion die von allen untersuchten Melanomzelllinien höchste Proliferationsrate auf und wurde in ihrem Zellwachstum von Stressbedingungen am wenigsten beeinflusst. Die Gro- $\alpha$ -Produktion und -Sekretion von Endothelzellen beschrieben Goebeler et al. (220) und bestätigen die für Normalbedingungen erhaltenen Resultate. Veränderungen durch Mangelbedingungen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben.

#### **4.1.2.3. GM-CSF**

Bei allen getesteten Melanomzelllinien war das Ausbleiben einer GM-CSF-Sekretion unabhängig von den Kulturbedingungen möglich. Allerdings besaßen alle Zelllinien bis auf die Linie 530 die Potenz, GM-CSF zu sezernieren, wenngleich sie dazu nur in geringen Mengen und unabhängig vom Malignitätsgrad fähig waren. Hypoxie konnten die Zelllinien BLM, MV3 und WM115 mit einer GM-CSF-Sekretionssteigerung beantworten, taten dies aber nicht immer. Ebenso reagierte die Linie IF6 inkonstant auf diesen Reiz mit Reduktion der Chemokinfreisetzung. Unter den anderen Mangelbedingungen zeigten alle Melanomzelllinien weiterhin, auch zelllinienspezifisch, kein eindeutiges Regulationsverhalten.

Die Überstände der normalen Melanozyten blieben ebenso wie die Melanomzelllinie mit der geringsten Proliferationsrate (530) ohne Nachweis für GM-CSF.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Studien der Arbeitsgruppen von Mattei, Armstrong, Benicelli und Singh, welche bei den meisten Melanomzellen, nicht aber bei normalen Melanozyten GM-CSF nachweisen konnten (137,140,228,244). Auf Veränderungen der GM-CSF-Sekretion unter Mangelbedingungen fanden sich in der Literatur keine Hinweise. Interessant ist die in dieser Studie gemachte Beobachtung, dass einige Melanomzellen oder zumindest Subpopulationen auf den Entzug von Sauerstoff ihre GM-CSF-Sekretion steigern können. In Zusammenhang mit der für Melanomzellen beschriebenen migrationsfördernden Wirkung (247) dieses Chemokins



könnte Hypoxie die Möglichkeit zur Metastasierung bestimmter Zellklone erhöhen. Inwiefern diese Möglichkeit durch die unter Hypoxie verringerte Menge an PDGF (s.Kap.3.2.1.4.1.), welches ebenfalls eine migratorische Antwort bei Melanomzellen (183) hervorrufen kann, kompensiert wird, wäre durch weitere Experimente zu überprüfen.

Sowohl für Endothelzellen als auch Fibroblasten konnte in dieser Studie eine Sekretion von GM-CSF nachgewiesen werden. Beide Zellarten reagieren mit, bei Fibroblasten mit einer um den Faktor 7,5 besonders deutlichen Zunahme ihrer Chemokinfreisetzung unter Hypoxie. Die Ergebnisse unter normalen Kulturbedingungen sind mit den in der Literatur beschriebenen sekretorischen Eigenschaften von HUVEC für GM-CSF vereinbar (250). Schwartz et al. konnten in Hautfibroblasten nur unter Kokultur mit Keratinozyten Spuren von GM-CSF-mRNA nachweisen (245). Insofern sind die hier dargestellten Ergebnisse nur eines Fibroblasten-Zellstammes, insbesondere in Anbetracht der bei den anderen Zellarten so divergierenden Sekretionsverhalten, nicht unbedingt auf Fibroblasten generell übertragbar.

#### **4.1.3. Interpretation der ELISA-Ergebnisse**

Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse lassen sich für die Zytokine VEGF, b-FGF, Angiogenin, PDGF und TGF- $\beta$  sowie die Chemokine IL-8 und Gro- $\alpha$  unter bestimmten Kulturbedingungen charakteristische Sekretionsverhalten bei Melanomzellen beschreiben. Dabei konnten für VEGF, Angiogenin, PDGF, IL-8 und Gro- $\alpha$  signifikante Unterschiede in den abgegebenen Zyto- bzw. Chemokinmengen und / oder Sekretionsänderungen unter Mangelbedingungen im Vergleich zu den getesteten normalen Melanozyten und auch zwischen den niedrigmalignen und hochmalignen Melanomzelllinien nachgewiesen werden.

Von diesen angiogenetisch wirksamen Faktoren wurden wiederum nur VEGF, Angiogenin und IL-8 unter Stressbedingungen vermehrt durch Melanomzellen in vitro sezerniert.

Mit den Daten dieser Arbeit konnte zum erstenmal bzw. zeitgleich mit anderen Publikationen (224,226,232,270) gezeigt werden, dass eine deutliche Regulation angiogenetischer Zytokine unter Hypoxie bei Melanomzellen nicht nur für VEGF,

sondern auch für Angiogenin und IL-8 zutrifft. Dies läßt eine besondere Rolle dieser Zyto- bzw. Chemokine für eine entsprechende Steigerung der Angiogenese in vivo vermuten.

Dies gilt insbesondere im Zusammenhang mit den bisher für diese Angiogenesefaktoren in vitro und in vivo beschriebenen Wirkdosen. Diese, für die in vivo Angiogenese sicherlich etwas hypothetisch starren Werte, konnten von einer Million Zellen der getesteten Melanomzelllinien in Bezug auf VEGF, Angiogenin und IL-8 durch Sekretion erreicht werden.

Unter hypoxischen Bedingungen konnte für Angiogenin und IL-8, im Gegensatz zu VEGF, anhand der absoluten Proteinlevel eine signifikante Differenzierung zwischen hochmalignen und niedrigmalignen Melanomzellen getroffen werden. Sezernierten die hochmalignen Zelllinien BLM und MV3 unter normalen Kulturbedingungen noch signifikant höhere VEGF-Mengen als die geringmalignen Zelllinien, war unter Hypoxie diese Unterscheidung nicht mehr möglich. Angiogenin bzw. IL-8 setzten die hochmalignen Melanomzellen sowohl unter normalen Kulturbedingungen als auch unter Hypoxie in signifikant höheren Zyto- bzw. Chemokinmengen frei. Das Verhalten der niedrigmalignen Zelllinien unterschied sich unter Hypoxie mit einer reduzierten IL-8-Sekretion sogar qualitativ von dem der hochmalignen Melanomzellen.

Darüber hinaus zeigte das Sekretionsverhalten bezüglich der drei Zytokine weitere wichtige Unterschiede im Vergleich von normalen Melanozyten zu den Melanomzellen. So reagierten alle getesteten melanozytären Zellen, benigne wie maligne, auf Hypoxie uniform mit einer Hochregulation der sezernierten VEGF-Mengen. Wie die meisten primären Melanozyten reduzierten niedrigmaligne Melanomzellen unter Sauerstoffentzug ihre IL-8-Freisetzung. Im Kontrast dazu erhöhten die im Tierversuch stark zu Metastasierung neigenden Melanomzellen MV3 und BLM ihre IL-8-Sekretion um das bis zu 8-fache.

Die Sekretion von Angiogenin schließlich nahm bei normalen Melanozyten unter Sauerstoffmangel zunächst ab und erst Reoxigenierung ließ die Zytokinfreisetzung ansteigen. Alle Melanomzellen aber regulierten unter Hypoxie sofort und eindeutig die Angiogenin-Sekretion hoch.

Zusammengefasst hieße das, es bestehen zwischen benignen und malignen melanozytären Zellen unter Hypoxie nur quantitative Unterschiede in einer grundsätzlich gleichförmigen Sekretionsregulation von VEGF. Dagegen ergeben sich entsprechend ihrer gegenläufigen Sekretionsregulation qualitative Differenzen zwischen Melanozyten und Melanomzellen allgemein bezüglich Angiogenin. Zudem unterschieden sich die melanozytären Zellen mit zunehmender Entdifferenzierung in ihrer Angiogenin- und IL-8-Sekretion quantitativ durch Freisetzung jeweils signifikant höherer ANG- bzw. IL-8-Mengen. Niedrig- und hochmaligne Melanomzellen zeigten zudem qualitative Differenzen in der Regulation ihrer IL-8-Sekretion unter Hypoxie.

Diese Korrelation von Malignität und ANG- bzw. IL-8-Sekretion könnte erklären, dass Pötgens et al. (264) im Tierversuch für artifizielle Tumore aus VEGF-transfizierten Melanomzellen weder ein schnelleres Wachstum noch eine höhere Tumorgefäßdichte nachweisen konnten. Es zeigten sich lediglich Veränderungen in der Gefäßverteilung, die nun mehr durch Stromasepten des Tumors als durch direkte Tumoranteile zogen.

Hingegen konnten Luca et al. mittels einer IL-8-Gen-Transfizierung in nicht metastatischen Melanomzellen deren metastatisches Potential und Tumorigenität deutlich steigern (233).

Somit wäre VEGF für die Angiogenese in Melanomen der bisher bekannteste, nicht aber unbedingt ein wichtiger Faktor. Zu dieser Aussage kam 1998 auch die Arbeitsgruppe von Viac (276), welche zwar signifikant erhöhte VEGF-Serumwerte bei 96 Melanompatienten gegenüber gesunden Probanden feststellten, aber bezüglich der Tumorprogression keine Unterschiede in den Zytokinniveaus feststellen konnte. Die Studie von Ugurel et al. (261) konnte bei 125 Melanompatienten eine Korrelation des Tumorstadiums mit erhöhten VEGF-, b-FGF- und IL-8-Serumspiegeln nachweisen. Dabei fiel den Autoren auf, dass sich unter Durchführung von Chemotherapie- bzw. IFN- $\alpha$ -Therapieschemata die Serumlevel von VEGF nicht änderten, die von IL-8 hingegen als einzige getestete Parameter unter beiden Therapieregimen anstiegen.

In der gleichen Studie zeigten sich bei Patienten unter Chemotherapie signifikant erhöhte Serumspiegel für Angiogenin. Ein Zusammenhang bezüglich des Tumorstadiums bzw. der Prognose und der Angiogenin-Serumspiegel konnte aber nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu korrelierten bei Pankreaskarzinompatienten

erhöhte ANG-Serumspiegel und ANG-mRNA-Expression der Tumorzellen mit fortgeschrittenen Tumorstadien bzw. schlechter Prognose (277).

Interessanterweise werden die durch Hypoxie erzeugten Sekretionszunahmen dieser drei Zyto-/ Chemokine sowohl von Endothelzellen (ANG; IL-8) als auch Fibroblasten (VEGF, ANG und IL-8) gleichförmig vorgenommen, so dass von einer Potenzierung des angiogenetischen Effektes in hypoxischen Tumorgewebearealen ausgegangen werden könnte.

## **4.2. Diskussion der Ergebnisse des Proliferationsassays**

Wie bereits (s. Kap. 4.1.3.) ausgeführt, ergibt sich anhand der Eigenschaften des für Melanomzellen charakteristischen Sekretionsverhaltens von VEGF, Angiogenin und IL-8 eine möglicherweise besondere Rolle dieser Zyto-/Chemokine für die Tumorangio-genese. Im dritten Teil dieser Studie wurden diese Angiogenesefaktoren, da sie signifikant und in biologisch relevanten Mengen von den Melanomzellen sezerniert wurden, auf ihre proliferationsfördernde Wirkung auf Endothelzellen *in vitro* getestet. Auch das Zytokin b-FGF, als eines der am häufigsten untersuchten Wachstumsfaktoren für Endothelzellen sollte diesbezüglich mituntersucht werden.

### **4.2.1. Vergleich des Einflusses angiogenetischer Zytokine auf das Proliferationsverhalten von Endothelzellen**

Die bisher in der Literatur beschriebene Beeinflussung des Proliferationsverhaltens von Endothelzellen durch Zytokine wurde immer anhand unter Serum-mangel kultivierter Zellen betrachtet. In dieser Arbeit wurden in einem Experiment mit je 5 Proben diesbezüglich eine Reproduzierbarkeit der Daten überprüft.

Weitere Untersuchungen hatten zum Ziel, die Auswirkung dieser Zytokine auf Endothelzellen unter normalen Medienbedingungen zu erkennen um eventuelle Veränderungen zu den für Serum-mangel bekannten Ergebnissen zu erfassen. Der dahinterstehende Gedanke war, herauszufinden ob Endothelzellen auch dann auf Zytokinreize mit Proliferation reagieren, wenn sie nicht direkt in den mangelversorgten

Arealen lokalisiert sind. Sie könnten dann, wie in der Literatur beschrieben, durch Chemotaxis zu dem Tumor wandern und, von den dortigen Mangelbedingungen und Zytokineinwirkungen entsprechend moduliert, neue Gefäße bilden. Darüber hinaus sollten Unterschiede zwischen mikro- und makrovaskulären Endothelzellen in ihrer Proliferationsantwort auf Zytokinreize in einem Versuch mit HMEC-1 detektiert werden.

In einem zusätzlichen Experiment wurde untersucht, ob HUVEC ihre Proliferation durch exogene Wachstumsfaktoren verändern, wenn sie diesen in nicht adhärentem Zustand ausgesetzt werden. Der Hintergedanke der Versuchsanordnung war ein eventuell verändertes Zytokinansprechen der Zellen nach bzw. unter Migration oder Gefäßneueinsprossung zu erfassen. Wie die Arbeitsgruppen von Brown und Pepper beschrieben (84,278), konnte ein solches „Sprouting“ innerhalb von 4-5 Tagen in Fibrin- bzw. Kollagengelen beobachtet und durch VEGF stimuliert werden. Entsprechend war der in dieser Studie für den Proliferationsnachweis gewählte Zeitrahmen von 96 Stunden für die Erfassung zu erwartender Zytokinwirkungen geeignet.

#### **4.2.1.1. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

Für die makrovaskulären HUVEC ließ sich sowohl unter Serumangel als auch unter normalen Kulturbedingungen eine konzentrationsabhängige und signifikante Proliferationszunahme durch VEGF verzeichnen. Stimulation nonadhärenter HUVEC führte ebenso zu einer dosisabhängigen Steigerung des Zellwachstums, allerdings war der Effekt der Stimulation ab der Konzentration von 100 ng VEGF/ml Medium mehr als dreimal so hoch wie bei adhärennten Zellen und stieg unter 1 µgVEGF/ml noch weiter an.

Mikrovaskuläre HMEC-1 zeigten unter allen Konzentrationen eine im Vergleich zu den adhärennten makrovaskulären Endothelzellen etwas stärkere Zunahme ihrer Proliferation.

Wilting und seine Mitarbeiter zeigten mit Hilfe des CAM-Assays angiogenetische Effekte von VEGF ab Konzentrationen von 0,5 µg. Eindeutigere Ergebnisse wurden mit höheren VEGF-Mengen um 2 µg erzielt (55 bzw. 279). Stimulation boviner

Endothelzellen in Kollagengelen mit VEGF regte die Zellen zur Migration und Tubulusbildung an. Den hierfür maximalen Effekt konnten Pepper et al. (84) innerhalb von 4 Tagen unter Applikation von 100 ng/ml des Zytokins nachweisen. Die Initiation einer Aussprossung von kleinen Gefäßen aus einem Plazentagefäßfragment durch VEGF in vitro konnten Brown et al. für Konzentrationen von 0,5 bis 50 ng/ml feststellen (278). Das Ausmaß der Neoangiogenese war aber umgekehrt proportional zur Dosis. Ähnliche Beobachtungen machten Yoshida et al. (129). Sie beschrieben auch eine Zunahme der Proliferation von HUVEC durch VEGF, die ein Maximum bei 10 ng/ml erreichte und bei höheren Konzentrationen knapp unter diesem Niveau blieb. Die maximal erreichte Stimulation betrug in deren Ergebnissen ca. den doppelten Kontrollwert, was mit den in der vorliegenden Studie für adhärenente HUVEC erhaltenen Resultaten, sowohl unter Serummangel als auch unter Normalbedingungen, übereinstimmt.

Die Proliferationszunahme anfangs nonadhärenter HUVEC auf VEGF wurde bisher nicht untersucht. Ein derartig starkes Abweichen im Proliferationsverhalten im Vergleich zu adhärenenten HUVEC ist bemerkenswert und soll abschließend für alle Zyto- bzw. Chemokine gesondert diskutiert werden.

#### **4.2.1.2. Basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF)**

Im Vergleich zu den für VEGF erhaltenen Ergebnissen fiel die durch b-FGF hervorgerufene Stimulation der Proliferation adhärenenter HUVEC in normalem Medium schwächer, unter Serummangel hingegen stärker aus. Die Verstärkung der proliferationsfördernden Wirkung des Zytokins b-FGF bei parallel zur Zelleinsaat erfolgter Stimulation war deutlich im Vergleich zu adhärenenten HUVEC. Die mikrovaskulären Endothelzellen HMEC-1 reagierten auf niedrigere b-FGF-Konzentrationen mit einer vergleichsweise zu HUVEC geringeren Proliferation. Höhere b-FGF-Dosierungen induzierten HMEC-1 aber mit zu ihrer stärksten Proliferationszunahme unter allen getesteten Zytokinkonzentrationen.

Dass b-FGF in vitro mitogene Eigenschaften für makrovaskuläre Endothelzellen besitzt, haben mehrere Arbeitsgruppen gezeigt (34,111,129). So erreichten bovine makrovaskuläre Endothelzellen in den Ergebnissen von McNeil et al. (111) und

HUVEC bei Koch et al. (34) eine Verdoppelung des Zellwachstums. Die von Yoshida und Hu vorgestellten Resultate für HUVEC zeigten wesentlich stärkere Proliferationszunahmen um das 3,5- bis 8-fache bei Konzentrationen um 10-20 ng b-FGF pro ml Medium (126,129).

Die unter Serumangel erreichte Steigerung des BrD-U Einbaues in dieser Arbeit liegt im Bereich der von Yoshida et al. beschriebenen mitogenen Wirkung des b-FGFs. Wohingegen die unter normalen Bedingungen getesteten HUVEC durch b-FGF in ähnlich starker Weise wie bei McNeil und Koch proliferierten. Die Interpretation dieser Divergenzen soll abschließend im Zusammenhang mit allen Zytokinen geschehen (s.u.).

#### **4.2.1.3. Angiogenin (ANG)**

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige Induktion der Proliferation bei HUVEC durch Angiogenin. Dabei ließen sich im Gegensatz zu b-FGF nur diskrete Unterschiede bezüglich einer vermehrten Angiogenin-induzierten Proliferation unter Serumangel im Vergleich zur Kontrolle erkennen.

Wie für die bisherigen Zytokine beschrieben, konnte auch Angiogenin bei noch nicht adhären HUVEC eine deutlich stärkere proliferative Wirkung entfalten und war unter diesen Bedingungen nach VEGF der zweitpotenteste Angiogenesefaktor.

Auch bei HMEC-1 rief Angiogenin eine deutliche konzentrationsabhängige Stimulation des Zellwachstums hervor. An mikrovaskulären Endothelzellen bewirkte nur b-FGF eine noch stärkere Proliferation.

In der Studie von Hu et al. (126) wird eine dosisabhängige Zunahme der HUVEC-Proliferation in vitro beschrieben. Die maximale Stimulation des Wachstums (Faktor 1,54) wurde mit der höchsten Konzentration von 1 µg Angiogenin/ml Medium erreicht. Dies entspricht den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen für adhären HUVEC.

Hingegen zeigten die Ergebnisse von Chamoux et al. (156) keine mitogene Wirkung von Angiogenin auf bovine makrovaskuläre Endothelzellen. Diese Arbeitsgruppe konnte mittels Iod<sup>125</sup>-markiertem Angiogenin allerdings auch nur für bovine mikrovaskuläre Endothelzellen eine Angiogenin-Endothelzellbindung feststellen, nicht aber für makrovaskuläre Endothelzellen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den für HUVEC (152) und andere makrovaskuläre Zellen veröffentlichten Daten (148,149).

Die Ergebnisse von Badet et al. zeigen allerdings eine starke Varianz der Angiogenin-Bindung unter den Endothelzellen (150) was ein Nicht-Ansprechen der makrovaskulären Zellen bei Chamoux et al. erklären könnte.

Bezüglich boviner mikrovaskulärer Endothelzellen waren die Ergebnisse von Chamoux et al. vergleichbar mit dem Proliferationsverhalten von HMEC-1 der vorliegenden Studie. Analog dazu wurde die maximale Wachstumsstimulation bei diesen Zellen wie bei HMEC-1 in dieser Arbeit mit 100 ng Angiogenin/ml erreicht.

In der Studie von Hu et al. fiel die Proliferation mikrovaskulärer Endothelzellen unter ANG-Stimulation deutlich geringer aus als bei HUVEC (126), was den hier vorgestellten Ergebnissen widerspräche. Auf mögliche Ursachen soll im Anschluss für alle Zytokine eingegangen werden (s.u.).

#### **4.2.2. Vergleich des Einflusses angiogenetischer Chemokine auf das Proliferationsverhalten von Endothelzellen**

##### **4.2.2.1. IL-8**

Unter dem Einfluß von IL-8 ließ sich für HUVEC eine signifikante dosisabhängige Zunahme des Endothelzellwachstums feststellen. Der Vergleich zwischen der Proliferationsstimulation unter Serumangel und der unter Normalbedingungen ergab für IL-8 keine Unterschiede in der Zellreaktion für äquimolare Konzentrationen.

Parallel zur Zelleinsaat erfolgte Stimulation mit IL-8 beantworteten die Endothelzellen wiederum mit einer deutlicheren Proliferationszunahme. Im Gegensatz zu VEGF deutete sich bei IL-8 wie zuvor bei Angiogenin ab der Konzentration von 1 µg/ml eine wieder abnehmende Tendenz in der Stimulation an.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten Koch et al. in ihrer Studie über Proliferation und Chemotaxis von Endothelzellen auf einen Reiz mit IL-8 oder b-FGF einen mit steigender IL-8-Konzentration zunehmenden proliferativen Effekt auf makrovaskuläre Endothelzellen in vitro. Auch hier nahm dieser bei Konzentrationen >100 ng/ml wieder ab (34). Um eine ähnliche Endothelzellproliferation durch b-FGF zu erreichen benötigten sie höhere Konzentrationen als bei IL-8. In der Hornhaut von



Versuchstieren induzierte IL-8 ab Konzentrationen von 10 ng/ml eine angiogenetische Reaktion.

#### **4.2.2.2. Gro-Alpha**

Die hier vorgestellten Ergebnisse für adhärente HUVEC zeigten eine dosisabhängige Zunahme der BrD-U-Inkorporation durch Gro- $\alpha$  unter normalen Medienbedingungen. Unter Serumangel zeigte sich allerdings für die Konzentration von 1 ng pro ml eine deutlich verminderte Proliferation als in der Kontrolle. Dagegen stimulierten 10 bzw. 100 ng Gro- $\alpha$ /ml Medium unter Serumangel das Endothelzellwachstum, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, fast genauso stark wie unter Normalbedingungen.

Wie Cao et al. in ihrer Veröffentlichung beschrieben (238), besitzt Gro- $\alpha$  inhibitorische Wirkung auf die durch b-FGF stimulierte Proliferation von bovinen mikrovaskulären Endothelzellen in vitro und schwächer ausgeprägt in vivo. Diese Ergebnisse wären mit den Daten der hier vorgestellten Studie unter Serumangel und niedrigster Gro- $\alpha$ -Dosierung vereinbar. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsanordnungen ist ein Vergleich jedoch schwierig, denn in keinem der in dieser Arbeit verwendeten Medien konnte b-FGF nachgewiesen werden. Auch die relativ hohe autokrine b-FGF-Sekretion durch Endothelzellen scheidet als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Medien aus, weil sie -wie in Kapitel 3.2.1.2.3. gezeigt- unter Serumangelbedingungen nicht zunahm.

Da in der vorliegenden Arbeit die Versuche nur einmal mit einer Probenzahl von 5 (EGM mit 0,2% FCS) bzw. 6 (EGM mit 2% FCS) durchgeführt worden sind, lässt sich eine Angiogenese induzierende bzw. inhibierende Wirkung des Gro- $\alpha$  in vitro nur vermuten, nicht aber sicher belegen.

#### **4.2.3. Interpretation der Ergebnisse des Proliferationsassays**

Ein interessanter Aspekt ist die Tendenz der Endothelzellen stärker auf sämtlich getestete Zytokine zu reagieren, wenn sie noch ohne Bindung an andere Zellen bzw. Flächen diesen ausgesetzt sind. Wäre diese Beobachtung übertragbar auf sich in

Migration befindende Zellen, hieße das eine vervielfachte angiogenetische Potenz der Zyto- und Chemokine auf einwandernde Zellen. Es müssten also wesentlich weniger Endothelzellen invadieren, um vor Ort eine suffiziente Anzahl zur Neovaskularisation zu bilden.

Bestünde eine den Ergebnissen entsprechende höhere Zytokinsensibilität, bekommen auch die relativ hohen autokrinen Sekretionen der Endothelzellen für b-FGF, Angiogenin und IL-8, besonders im Hinblick auf den schon bekannten synergistischen Effekt von b-FGF und VEGF sowie die über Angiogenin modulierte Angiogenese (84,158), eine zunehmende Bedeutung. Würden (hypoxische) Melanomzellen den Anstoß zur Gefäßneubildung geben, wäre ein Teil der zur Unterhaltung dieses Prozesses notwendigen Zytokine über die Endothelzellen selbst zu rekrutieren. Weitere experimentelle Anhaltspunkte sind zur Bestätigung dieser Hypothesen allerdings zwingend erforderlich.

Die teilweise erheblichen Unterschiede zwischen den hier und auch zwischen den in der Literatur vorgestellten Ergebnissen bezüglich b-FGF zwingen zu einer vorsichtigen Betrachtung und Hinterfragung der Resultate. Wie kommt es zu der im Vergleich zu den anderen Zytokinen niedrigen Proliferationszunahme durch b-FGF unter normalen Bedingungen bzw. zu den starken Schwankungen der Zellproliferation unter verschiedenen Medienzusammensetzungen in dieser Arbeit und auch in der Literatur? Normales und serumarmes EGM-Medium wurden als exogene Quelle von additiven Zytokinen zumindest bezüglich der getesteten Wachstumsfaktoren ausgeschlossen. Eine mögliche Ursache wäre die in dieser Studie nachgewiesene hohe endothelzelleigene Gro- $\alpha$ -Sekretion der Endothelzellen. Diese könnte, den Ergebnissen von Cao et al. (s.o./ 237) entsprechend, die Proliferation der Endothelzellen besonders unter dem Einfluß von b-FGF im Vergleich zu den anderen Zyto- /Chemokinen negativ beeinflusst haben. Allerdings müsste dieser Effekt sich nur auf additiv gegebenes b-FGF beschränken. Denn HUVEC wiesen auch für b-FGF eine relativ hohe autokrine Sekretion auf, und diese endogene b-FGF-Menge führte weder im Zusammenspiel mit exogenem noch autokrin sezerniertem Gro- $\alpha$  zu einer Verringerung der Endothelzellproliferation.

Eine andere Erklärung für die unter b-FGF vergleichsweise niedrige Proliferation bzw. starken Resultatdifferenzen unter Serummangel läge in der Addition des proliferativen Effektes von endogenem b-FGF und den zugegebenen Zytokinen. Entsprechende in-vitro-Effekte sind für Angiogenin und bezüglich der Tubulusbildung, die aus Migration und Proliferation besteht, für VEGF bekannt (84,126). Die Zugabe von b-FGF würde hingegen, wie die gezeigten Daten vermuten lassen, bei schon unter niedrigen b-FGF-Konzentrationen erreichter maximaler Stimulation keinen zusätzlichen Effekt mehr bewirken können. Wäre die relativ niedrige Proliferationszunahme durch exogenes b-FGF unter normalen Kulturbedingungen dadurch erklärbar, sind es die Ergebnisse unter Serummangel nicht. Denn die ELISA-Daten der Endothelzellen wiesen unter Serummangel keine Veränderungen in der Sekretion von b-FGF, VEGF und Angiogenin auf. Für diese Veränderung müssten folglich andere Mechanismen ursächlich sein.

Bei allen Experimenten in der Literatur verwendeten die jeweiligen Arbeitsgruppen unterschiedliche Medien mit zur Ausgangskonzentration vermindertem Serumanteil (Yoshida: M199 20% zu 10%FCS, McNeil: DME 10%FCS zu 0,1%BSA, Hu: HE-SFM 10% zu 1%FCS und Koch: EBM 10% zu 1% FCS). Außerdem wurden die Zellen in den Experimenten jeweils verschieden lange inkubiert (zwischen 18 und 72 Stunden). Diese Unterschiede in den Versuchsprotokollen scheinen bei anderen Zytokinen aber keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten zu haben. Dies legen auch die hier vorgestellten Resultate nahe, die nur für b-FGF eine so deutliche Proliferationsänderung bei Wechsel der Serumkonzentration aufzeigten. Die Differenz der Ergebnisse weist auf einen wahrscheinlichen Zusammenhang zwischen der b-FGF-induzierten Proliferation und den unterschiedlichen Serumkonzentrationen sowie den Medien der jeweiligen Versuche hin.

Der Einfluss verschiedener Kulturmedien könnte auch die divergierenden Ergebnisse bezüglich der durch Angiogenin stimulierten Proliferation bzw. der Angiogenin-Endothelzellbindung für mikro- und /oder makrovaskuläre Endothelzellen erklären (s.o., EGM-Medium in dieser Arbeit, Hu et al. (126): HE-SFM, Hu et al. (149): modifiziertes Eagle-Medium, alle anderen: DMEM (148, 150, 152)).

Dafür sprechen auch die Beobachtungen von Watson et al. (280). Diese ergaben, dass schon die Wahl des Mediums alleine und ein Wechsel zwischen den Medien deutliche

Unterschiede in der Proliferation von HUVEC zur Folge haben. So stimulierte IL-8 signifikant das HUVEC-Wachstum in EGM-Medium, was mit den Resultaten dieser Arbeit konform ist, nicht aber bei Kultur in M199-Medium. Die Ursache hierfür vermuteten Watson und Mitarbeiter in einer Kontamination der HUVEC-Kulturen durch z.B. Mastzellen. Dies versuchten sie durch den Nachweis eines Verlustes einer mitogenen Antwort auf IL-8 bei, mit TNF optimal zu E-Selectin-Exprimierung stimulierten HUVEC zu belegen. Wie Koch dahingehend bemerkte (280), ist aber die IL-8-Synthese in Endothelzellen selbst durch TNF oder IL-1 zu induzieren (209,210), was die Beweisführung von Watson et al. hinfällig macht. Als Erklärung dieses Phänomens liegt eine endogen gesättigte IL-8-Stimulation durch die Endothelzellen in Abhängigkeit der Medien näher. Damit zeigt sich, inwiefern zur Erfassung des Wachstumsverhaltens von Zellen eine genaue Prüfung der Medien auf alle interagierenden, nicht nur direkt proliferativ wirkenden Zytokine und deren Veränderungen von Bedeutung ist.

Entsprechend ist eine generelle Vergleichbarkeit von Ergebnissen allein durch verschiedene Medien bei sonst gleichen Protokollen in Frage zu stellen. Für die Ergebnisse dieser Arbeit trifft das besonders im Fall von b-FGF zu.

Die Resultate für VEGF sind weniger voneinander abweichend und gut mit den hier gemachten Ergebnissen vergleichbar.

Ein möglicher Rückschluss dieser Tatsachen wäre, dass VEGF mit seiner hauptsächlich auf Endothelzellen ausgelegten Funktion eine definierte Zellantwort bewirkt. Die durch multifunktionelle Zyto- und Chemokine hervorgerufene Endothelzellreaktion aber eine stärkere Abhängigkeit von den Kulturbedingungen aufweist, was hier bzw. in der Literatur für b-FGF, Angiogenin, Gro- $\alpha$  und IL-8 gezeigt werden konnte. Allerdings stimulierten IL-8 und Gro- $\alpha$  (zumindest in höheren Dosierungen) die Endothelzellen in dieser Arbeit unter Normal- und Serumangelbedingungen nahezu unverändert, was dieser Schlussfolgerung widerspräche. Zur Klärung der Hypothese sind weiterführende Experimente zwingend erforderlich.

In vitro Experimente sollten dann weitestgehend parakrine Zyto- bzw. Chemokineinflüsse darstellen, oder diese mittels spezifischer Antikörperblockaden ausschließen können. Wichtig in diesem Zusammenhang wäre auch ein Erfassen

eventueller parakriner Beeinflussbarkeit der Angiogenin-Expression in Tumor- und Gewebezellen, die bisher im Gegensatz zu den anderen Zytokinen noch nahezu unerforscht blieb.

## **5. Abschlußbemerkung**

Die in dieser Studie vorgestellten Ergebnisse unterstreichen die wichtige Funktion, die angiogenetischen Zytokinen für die Tumorprogression zugemessen wird. Die Zyto- bzw. Chemokine VEGF, IL-8 und vor allem Angiogenin scheinen anhand des spezifischen Sekretionsverhaltens von Melanomzellen in Kombination mit der proliferativen Wirkung auf Endothelzellen eine besondere Bedeutung in der Angiogenese des malignen Melanoms zu besitzen. Dies spiegelt sich auch in den bisher publizierten Daten wider.

Für VEGF konnten schon einige Therapieansätze im Tierversuch mit z.T. erfolgversprechenden Ergebnissen getestet werden (19,59,79,95,96,259,260,281). Eine kürzlich abgeschlossene Phase II-Studie von Peterson et al. (282) zeigte bei 5 von 31 Melanompatienten mit meist fortgeschrittenem Tumorleiden unter einer Therapie mit einem Flk-1-Rezeptor-Inhibitor (SU 5416) einen verminderten Tumorblutfluss. Allerdings kam nur ein Patient in eine partielle Remission unter dieser Therapie. Sicherlich erwartet man bei Blockade nur eines Zytokins bzw. dessen Regulationsmechanismen den positiven Effekt geringer Nebenwirkungen bei guter therapeutischer Wirksamkeit. Wie die Studie von Petersen et al. aber zeigt, scheint dies beides für VEGF (noch) nicht erreicht. Eine weitere Verbesserung des Therapieansatzes bleibt zu erwarten. Möglicherweise wird die Kombination mit spezifischen Angriffspunkten anderer Zyto- bzw. Chemokinwirkpfade diesem Ziel gerechter.

Bei Bestätigung der in dieser Arbeit für IL-8 und besonders Angiogenin gemachten Beobachtungen bzw. deren Relevanz in vivo könnte auch hier eine Umsetzung der bisherigen Kenntnisse in Therapiestudien erfolgen. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen ob IL-8 und / oder Angiogenin ein Ziel einer solchen Therapie sein können.

## **6. Zusammenfassung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Sekretion acht angiogenetisch wirksamer Zyto- und Chemokine *in vitro* durch hoch- und niedrigmaligne Melanomzellen unter normalen Kulturbedingungen sowie unter Hypoxie, Serum- und Glukosemangel zu erfassen. Diese Stressbedingungen dienten als vereinfachtes *in vitro*-Modell der Mangelbedingungen, die in schnell wachsenden bzw. Nekrosezonen angrenzenden Tumorarealen vorherrschen.

Mittels ELISA wurden die abgegebenen Mengen der Zytokine VEGF, b-FGF, Angiogenin, PDGF und TGF- $\beta$  sowie der Chemokine IL-8, Gro- $\alpha$  und GM-CSF in den Zellüberständen bestimmt. Dabei zeigten die verschiedenen Melanomzelllinien für alle getesteten Zyto- bzw. Chemokine außer GM-CSF charakteristische Sekretionsverhalten unter bestimmten Kulturbedingungen.

Insbesondere unter Hypoxie und nach Reoxigenierung ließen sich signifikante Veränderungen im Sekretionsverhalten der verschiedenen Melanomzelllinien feststellen. Eine signifikante Steigerung in der Freisetzung der Zyto- bzw. Chemokine durch Melanomzellen unter Hypoxie ließ sich nur für VEGF, b-FGF, Angiogenin und IL-8 feststellen. Zudem unterschieden sich hochmaligne Melanomzelllinien signifikant von niedrigmalignen Zelllinien in ihrer Sekretion von VEGF, Angiogenin, PDGF, IL-8 und Gro- $\alpha$  unter normalen Kulturbedingungen und unter Hypoxie (Angiogenin, PDGF, IL-8 und Gro- $\alpha$ ).

In weiterführenden Experimenten wurde das Sekretionsverhalten von normalen Melanozyten, Endothelzellen und Fibroblasten untersucht. Dabei wiesen differenzierte Melanozyten im Vergleich zu den Melanomzellen signifikante Unterschiede in den abgegebenen Zyto-/ Chemokinmengen für VEGF, Angiogenin, PDGF, IL-8 und Gro- $\alpha$  unter normalen bzw. hypoxischen Kulturbedingungen auf.

Differenzierte Melanozyten unterschieden sich also von Melanomzellen in ihrer Sekretion bei den selben Zyto- bzw. Chemokinen wie niedrigmaligne von hochmalignen Melanomzelllinien (VEGF, Angiogenin, PDGF, IL-8 und Gro- $\alpha$ ).

Im Sekretionsverhalten für VEGF, Angiogenin, IL-8 und Gro- $\alpha$  ähnelten Fibroblasten und Endothelzellen (bzgl. VEGF nur HMEC-1) den Melanomzellen.

Der Einfluss dieser vier Zyto- und Chemokine und b-FGF auf das in-vitro-Wachstumsverhalten von Endothelzellen wurde mit einem BrD-U-Proliferationsassay untersucht. Sowohl mikrovaskuläre (HMEC-1) als auch makrovaskuläre (HUVEC) Endothelzellen steigerten ihre Proliferation unter dem Einfluss von VEGF, b-FGF, Angiogenin, IL-8 und Gro- $\alpha$  signifikant. HMEC-1 reagierten dabei mit einem tendenziell stärkeren Ansprechen auf die Stimulation als HUVEC.

In weiteren Versuchen zeigten HUVEC eine erhöhte Sensibilität für Zytokine (insbesondere für b-FGF) unter Serumangelbedingungen, nicht jedoch für Chemokine (IL-8 und Gro- $\alpha$ ). Am deutlichsten fiel die Proliferationssteigerung unter dem Einfluss der einzelnen Zyto- und Chemokine aus, wenn HUVEC in nonadhärentem Zustand stimuliert wurden.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte erstmalig bzw. zeitgleich mit anderen Publikationen gezeigt werden, dass Melanomzellen unter Hypoxie nicht nur VEGF, sondern auch Angiogenin und IL-8 deutlich vermehrt sezernieren, dass diese Sekretionssteigerung nach Reoxygenierung weiter anhält und Melanomzellen signifikant von differenzierten Melanozyten unterscheidet.

Jedes dieser Zyto- und Chemokine stimulierte die Endothelzellproliferation in vitro. Dabei erhöhten Serumangel und vor allem initial fehlende Zell-Zellkontakte die Zyto- bzw. Chemokinwirkung.

Im Gegensatz zu dem bisher intensiver untersuchten VEGF sezernierten hochmaligne Melanomzellen unter Hypoxie signifikant mehr Angiogenin und IL-8 als niedrigmaligne Melanomzellen. Nur für Angiogenin zeigte sich darüber hinaus eine gegensätzliche Sekretionsregulation unter Hypoxie aller Melanomzellen im Vergleich zu normalen Melanozyten.

Dies könnte für IL-8 und im Besonderen für Angiogenin auf eine mögliche Schlüsselfunktion in der Melanom-induzierten Angiogenese hindeuten. Inwieweit Rückschlüsse auf die in vivo-Verhältnisse und eine klinische Relevanz zulässig sind, werden weitere Untersuchungen und ggf. Therapiestudien zeigen müssen.

## 7. Tabellenanhang

### 3.1.a-f) Wachstumsverhalten der Melanomzelllinien unter Normalkultur, Hypoxie, Glukosemangel und Serummangel sowie anschließender Normalkultur

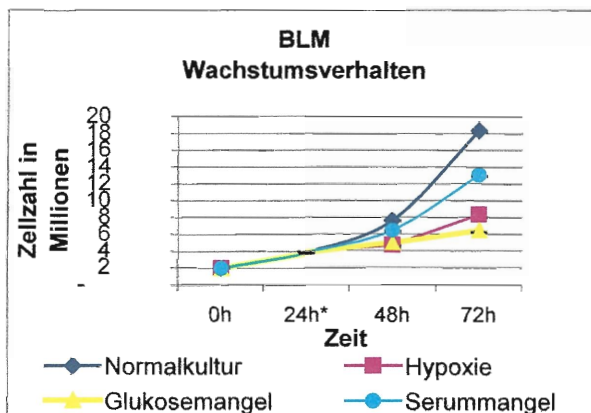


Abbildung 3.1.a) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie BLM unter Normalkultur, Hypoxie, Glukosemangel bzw. Serummangel sowie den darauffolgenden Normalkulturbedingungen. Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

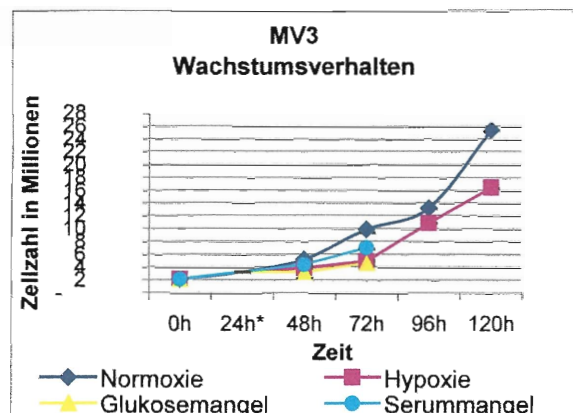


Abbildung 3.1.b) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie MV3 unter Normalkultur, Hypoxie, Glukosemangel bzw. Serummangel sowie den darauffolgenden Normalkulturbedingungen. Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

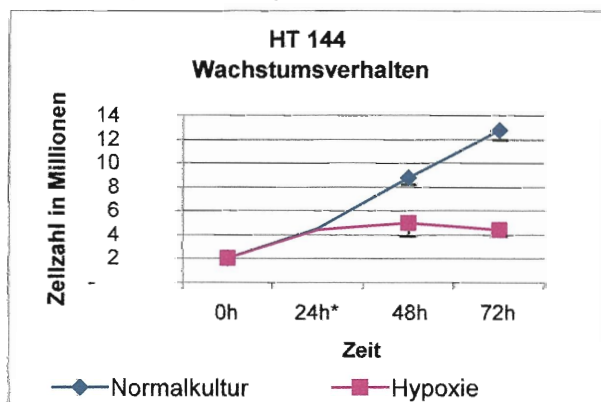


Abbildung 3.1.c) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie HT144 unter Normalkultur, Hypoxie und Reoxigenierung. Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

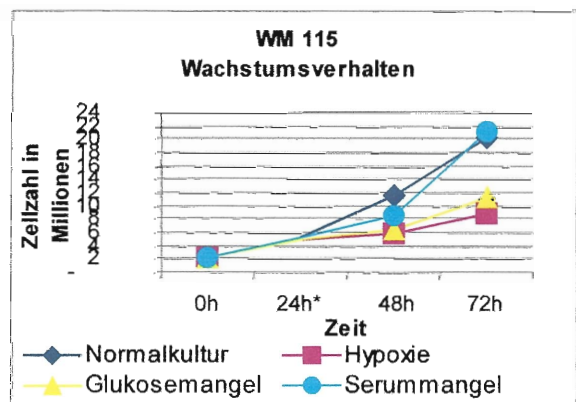


Abbildung 3.1.d) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie WM115 unter Normalkultur, Hypoxie, Glukosemangel bzw. Serummangel sowie den darauffolgenden Normalkulturbedingungen. Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

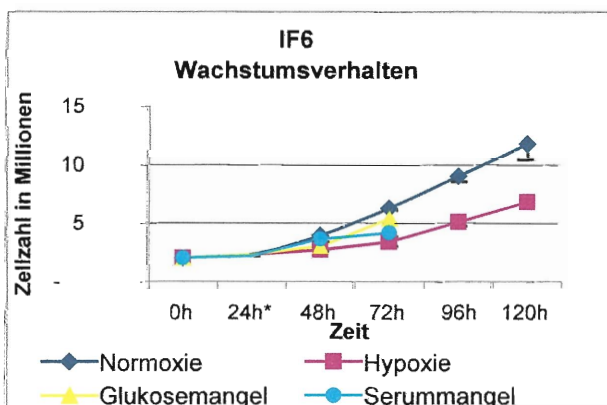


Abbildung 3.1.e) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie IF6 unter Normalkultur, Hypoxie, Glukosemangel bzw. Serummangel sowie den darauffolgenden Normalkulturbedingungen. Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

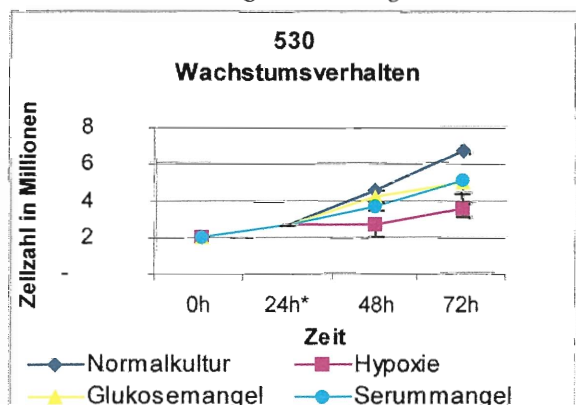


Abbildung 3.1.f) zeigt die Proliferation der Melanomzelllinie 530 unter Normalkultur, Hypoxie, Glukosemangel bzw. Serummangel sowie den darauffolgenden Normalkulturbedingungen. Der Anteil toter Zellen / der Apoptoserate an der Gesamtzellzahl wird als Abweichung nach unten dargestellt.

\* der sich in den Diagrammen widerspiegelnde 24h-Wert ist rein graphisch und nicht auf gezählten Zellzahlen basierend



## **8. Literaturverzeichnis**

1. Micksche M: Production of polypeptide regulatory factors by human melanoma cells. *in vivo* 8, 859-866, 1994
2. Mancianti ML, Györfi T, Shih IM, Valyi-Nagy I, Levensgood G, Menssen HD, Halpern AC, Elder De and Herlyn M: Growth regulation of cultured human nevus cells. *J. Invest. Dermatol.* 100, 281-287S, 1993
3. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am. J. Pathol.* 143, 401-409, 1993
4. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K and Hughes LE: The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0,76-4,0 mm thick) skin melanoma: a quantitative histologic study. *Am. J. Pathol.* 133, 419-423, 1988
5. Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, Stankiewicz KS, White WL: Extent of vascularisation as a prognostic indicator in thin (<0,76 mm) malignant melanomas. *Am. J. Pathol.* 145, 510-514, 1994
6. Barnhill DL, Fandrey K, Levy MA, Mihm MC jr., and Hyman B: Angiogenesis and tumor progression of melanoma. *Lab. Invest.* 67, 331-337, 1992
7. Claffey K.P, Brown L.F, del Aguila LF, Tognazzi K, Yeo K-T, Manseau EJ and Dvorak HF: Expression of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res.* 56: 172-181. 1996
8. Becker JV: Das maligne Melanom: Epidemiologie, Klinik und Therapie, hautnah dermat 3, 1993
9. Lew RA, Sober AJ, Cook N, Marvell R, Fitzpatrick TB: Sun exposure habits in patients with cutaneous melanoma: a case control study. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 9, 981-986, 1983
10. Koh HK: Cutaneous melanoma. *N.Engl.J.Med.* 325, 171-182, 1991
11. Graeven U, and Herlyn M: In vitro growth patterns of normal human melanocytes and melanocytes from different stages of melanoma progression. *J.Immunother.* 12, 199-202, 1992
12. Fitzpatrick ThB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF: *Dermatology in general medicine; Vol.1, 4<sup>th</sup> edition, 1078-11156;1993*
13. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J. Clin Oncol.* 19,3635-3648, 2001
14. Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom. In: Garbe C (Hrsg.) *Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, S. 23 – 55, 2005*
15. Rosenberg SA, Lotze MD, Yang JC, Lineham WM, Seipp C, and Calabro S: Combination therapy with interleukin -2 and alpha interferon for treatment of patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 7, 1863-1874, 1989

16. Creagan ET, Ahmann DL, Frytak S, Long HJ, Itri LM: Recombinant leukocyte A interferon (rIFN-A) in the treatment of disseminated malignant melanoma: analysis of complete and long term responding patients. *Cancer* 58, 2576-2578, 1986
17. Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D, Pickett N, Vervaert C, Barber JR, Jolly D, Seigler HF: A phase I trial of immunotherapy with interferon-gamma gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. *Cancer* 80(3), 401-412, 1997
18. Kim KJ, Li B, Winter J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N: Inhibition of vascular endothelial growth factor - induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841-844, 1993
19. Borgstöm P, Hillan KJ, Sriramamo P, and Ferrara N Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: Novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res.* 56, 4032-4039, 1996
20. Hori A, Sasada R, Matsutani E, Naito K, Sakura Y, Fujita T, and Kozai Y: Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res.* 51 (22), 6180-6184, 1991
21. Olson K, French T, Vallee B, and Fett J: A monoclonal antibody to human angiogenin supresses tumor growth in athymic mice. *Cancer Res.* 54, 4576-4579, 1994
22. Hertig AT, *Embryol.* 25, 37, 1935
23. Madri JA, et al. Angiogenesis, in Clark RAF, Henson PM: The molecular and cellular biology of wound repair. *New York plenum press*, 337-358, 1988
24. Gruber BL, Marchese MJ, and Kew R: Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* 86, 2488-2493, 1995
25. Folkman J, and Shing Y: Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267, 10931-10934, 1992
26. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM: Quantitative relationship of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res.* 34, 997-1004, 1974
27. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM and Feder J: Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 84: 1470-1478. 1989
28. Ladoux A, Frelin C: Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA in the heart. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 195, 1005-1010, 1993
29. Hlatky L, Tsionou Ch, Hahnfeldt Ph and Coleman CN: Mammary fibroblsts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer research* 54, 6083-6086, 1994
30. Shweiki D, Neeman M, Itin A and Keshet E: Induction of vascular endothelial growthfactor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids : implications for tumor angiogenesis. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA.* , 92, 768-772, 1995
31. Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia- initiated angiogenesis. *Nature (Lond.).* 359, 843-845, 1992

32. Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashima T, Yamashita J, and Yamamoto H: Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J. Biol. Chem.* 270, 28316-28324, 1995
33. Krasagakis K, Garbe C, and Orfanos CE: Cytokines in human melanoma cells: synthesis, autocrine stimulation and regulatory functions-an overview. *Melanoma Res.* 3, 425-433, 1993
34. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, and Strieter RM: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258, 1798-1801, 1992
35. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, and Alitalo K: Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- $\beta$  in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 269, 6271-6274, 1994
36. Harmey JH, Dimitriadis E, Kay E, Redmond HP, Bouchier-Hayes D: Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1. *Ann. Surg. Oncol.* 5, 271-278, 1998
37. Bikfalvi A, Sauzeau C, Moukadiri H, Maclouf J, Busso N, Brykaert M, Plouet J, and Tobelem G: Interaction of vasculotropin/ vascular endothelial cell growth factor with human umbilical vein endothelial cells: Binding, internalization, degradation and biological effects. *J. Cell. Physiol.* 149, 50-59, 1991
38. Plouet J, Schilling J, and Gospodarowicz D: Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO-J.* 8, 3801-3806, 1989
39. Ferrara N and Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 161, 851-858, 1989
40. Gospodarowicz D, Abraham JA, and Schilling J: Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7311-7315, 1989
41. Thomas KA :Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J.Biol.Chem.* 271, 603-606, 1996
42. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren Th, Feder J, Connolly DT: Vascular permeability factor , an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309-1312, 1989
43. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309, 1989
44. Conn G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi ThM, Hope DA, and Thomas KA: Aminoacid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Procl. Natl. Sci. USA* 87, 2628-2632, 1990
45. DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, Palisi ThM, Sullivan KA, and Thomas KA: Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor -Placenta growth factor. *J. Biol. Chem.* 270, 7717-7723, 1995

46. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, and Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 266, 11947-11954, 1991
47. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, and Moore MW: Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442, 1996
48. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I, Keshet E, and Neufeld G: VEGF<sub>145</sub>, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 272, 7151-7158, 1997
49. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, and Leung DW: The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J. Cell. Biochem.* 47, 211-218, 1991
50. Cohen T, Gitay-Goren H, Sharon R, Shibuya M, Halaban R, Levi BZ, and Neufeld G: VEGF<sub>121</sub>, a vascular endothelial growth factor ( VEGF ) isoform lacking heparin binding ability, requires cell surface heparan sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 270, 11322-11326, 1995
51. Gitay-Goren H, Cohen T, Tessler S, Soker S, Gengrinovitch S, Rockwell P, Klagsbrun M, Levi BZ, and Neufeld G: Selective binding of VEGF<sub>121</sub> to one of the three vascular endothelial growth factor receptors of vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271, 5519-5523, 1996
52. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, and Ferrara N: The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem.* 271, 7788-7795, 1996
53. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 267, 26031-26067, 1992
54. Jonca, F., Ortega, N., Gleizes, P. E., Bertrand, N., and Plouet, J.: Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6'-encoded sequence of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 272, 24203-24209, 1997
55. Wilting J, Christ B and Weich HA: The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane ( CAM ) : a study of VEGF<sub>165</sub> and PDGF-BB. *Anatomy and Embryology*, 186, 251-257, 1992
56. Detmar M, Yeo KT, Nagy JA, Van de Water L, Brown LF, Berse B, Elicker BM, Ledbetter S, and Dvorak HF: Keratinocyte - derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 105, 44-50, 1995
57. Ballaun C, Weninger W, Uthman A, Weich H, and Tschachler E: Human keratinocytes express the three major splice forms of vascular endothelial growth factor. *J. Invest. Dermatol.* 104, 7-10, 1995
58. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugira Y, Tanaka S: Vascular endothelial growth factor expression in primary oesophageal squamous cell carcinoma. *Am. Cancer Soc.* 79, 206-213, 1997
59. Plate KH, Breier G, Weich HA, and Risau W: Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359, 845-848, 1992

60. Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, and Kuwano M: Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor- $\alpha$  in human glioma cells. *J. Biol. Chem.* 271, 28229-28228, 1996
61. Samoto K, Ikezaki K, Ono M, Shono T, Kohno K, Kuwano M, and Fukui M: Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularisation in human brain tumors. *Cancer Res.* 55, 1189-1193, 1995
62. Mincheniko A, Bauer Th, Salceda S, and Caro J: Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab. Invest.* 71, 374-379, 1994
63. Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, Claffey KP: Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor ( VPF / VEGF ) and its receptors in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 108, 263-268, 1997
64. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS, Sukhatme VP: Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 375, 577-581, 1995
65. Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, and Risau W: Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 53, 5822-5827, 1993
66. Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L, and Isner JM: Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 31189-31195, 1995
67. Brown LF, Harrist TJ, Yeo KT, Stähle-Bäckdahl M, Jackman RW, Berse B, Tognazzi K, Dvorak HF, and Detmar M: Increased expression of vascular permeability factor ( vascular endothelial growth factor ) in bullous pemphigoid, dermatitis herpetiformis , and erythema multiforme. *J. Invest. Dermatol.* 104, 744-749, 1995
68. Brauchle M, Funk JO, Kind P, and Werner S: Ultraviolet B and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 21793-21797, 1996
69. Levy AP, Levy NS, and Goldberg MA: Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 271, 2746-2753, 1996
70. White FC, Carroll SM, and Kamps MP: VEGF mRNA is reversibly stabilized by hypoxia and persistently stabilized in VEGF-overexpressing human tumor cell lines. *Growth Factors* 12, 289-301, 1995
71. Hatva E, Kaipainen A, Mentulla P, Jääskeläinen J, Paetau A, Haltia M, and Alitalo K: Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. *Am. J. Pathol.* 146, 368-378, 1995
72. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, and Senger DR: Distribution of vascular permeability factor ( vascular endothelial growth factor ) in tumor blood vessels. *J. Exp. Med.* 174, 1275-1278, 1991
73. Peters KG, de Vries C, and Williams LT: Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* , 90, 8915-8919, 1993

74. Tsai JC, Goldman CK, and Gillespie GY: Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF, and bFGF. *J.Neurosurg.* 82, 864-873, 1995
75. Finkenzeller G, Marme D, Weich HA, and Hug H: Platelet-derived growth factor - induced transcription of the vascular endothelial growth factor gen is mediated by protein kinase c. *Cancer Res.* 52, 4821-4823, 1992
76. Seghezzi G, Patel S, Ren C J, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P: Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J. Cell Biol.*, 141, 1659-1673, 1998
77. Stavri GT, Zachary IC, Martin JF and Erusalimsky JD: Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells: synergistic interaction with hypoxia. *Circulation.* 92, 11-14, 1995
78. Cohen T, Nahari D, Weiss Cerem L, Neufeld G, and Levi BZ: Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J.Biol.Chem.* 271, 736-741, 1996
79. Smyth AP, Rook SL, Detmar M, and Robinson GS: Antisense oligonucleotides inhibit vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 108, 523-526, 1997
80. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, and Klagsbrun M: Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745, 1998
81. Claffey KP, Robinson GS: Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Met. Rev.* 15, 165-176, 1996
82. Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinahl Th, Asahara T, Bauters Ch, Symes J, Ferrara N, and Isner JI: Gene transfer of naked DANN encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab. Invest.* 75, 487-501, 1996
83. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, and Detmar M: Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the  $\alpha v$ - $\beta 3$  integrin, osteopontin, and thrombin. *Am. J. Pathol.* 149, 293-305, 1996
84. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R: Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189, 824-831, 1992
85. Connolly DT: Vascular permeability factor: A unique regulator of blood vessel function. *J. Cell. Biochem.* 47, 219-223, 1991
86. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R: Vascular endothelial growth factor ( VEGF ) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor in microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 181, 902-906, 1991

87. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazziere R, Mignatti P, and Pepper MS: Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 9709-9716, 1995
88. Iwasaki C, Tanaka K, Abe M, and Sato Y: Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 169, 522-531, 1996
89. Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol.* 154, 375-384, 1999
90. Gerlach H, Brett J, Wang F, Familetti PC, Pan YCE, Olander V, Connolly DT, Stern D: Vascular permeability factor: A tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 172, 1535-1545, 1990
91. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, and Sowa M: Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 77, 858-863, 1996
92. Relf M, LeJeune S, Scott PAE, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, and Harris AL: Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor  $\beta$ -1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res.* 57, 963-969, 1997
93. Straume O, Akslen LA: Increased expression of VEGF-receptors (FLT-1, KDR, NRP-1) and thrombospondin-1 is associated with glomeruloid microvascular proliferation, an aggressive angiogenic phenotype, in malignant melanoma. *Angiogenesis* 6(4), 295-301, 2003
94. Redondo P, Sanchez-Carpintero I, Bauza A, Idoate M, Solano T, Mihm MC Jr. : Immunologic escape and angiogenesis in human malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 49(2), 255-63, 2003
95. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD and Rudge JS: VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects. *PNAS, Vol. 99, No. 17, 11393-11398, 2002*
96. Sun J, Blaskovich MA, Jain RK, Delarue F, Paris D, Brem S, Wotoczek-Obadia M, Lin Q, Coppola D, Choi K, Mullan M, Hamilton AD, Sebti SM.: Blocking angiogenesis and tumorigenesis with GFA-116, a synthetic molecule that inhibits binding of vascular endothelial growth factor to its receptor. *Cancer Res.* 15, 64(10), 3586-92, 2004
97. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, and Ullrich A: Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 376, 576-579, 1994
98. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989-991, 1992
99. Gitay-Goren H, Halaban R, and Neufeld G: Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biol. Biochem. Res. Comm.* 190, 702-209, 1993

100. Plate KH, Breier G, Weich HA, Menzel HD, and Risau W: Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int. J. Cancer* 59, 520-529, 1994
101. Brogi E, Schattemann G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, and Isner JM: Hypoxia induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J. Clin. Invest.* 97, 469-476, 1996
102. Gerber HP, Condorelli F, Park J, and Ferrara N: Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. *flt-1*, but not *flk-1/kdr*, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 23659-23667, 1997
103. Waltenberger, J., Mayr, U., Pentz, S., and Hombach, V.: Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 94, 1647-1654, 1996
104. Barleon, B., Siemeister, G., Martinybaron, G., Weindel, K., Herzog, C., and Marme, D. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res.* 57, 5421-5425, 1997
105. Wilting, J., Birkenhager, R., Eichmann, A., Kurz, H., Martinybaron, G., Marme, D., McCarthy, J. E. G., Christ, B., and Weich, H. A.: VEGF(121) induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of the chorioallantoic membrane. *Dev. Biol.* 176, 76-85, 1996
106. Armelin HA : Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2702-2706, 1973
107. Slavin J : Fibroblast growth factors : at the heart of angiogenesis. *Cell Biol. Int.* 19, 431-444, 1995
108. Lobb R, Sasse J, Sullivan R, Shing Y, Amores PD, Jacobs J, and Klagsbrun M: Purification and characterization of heparin-binding endothelial cell growth factors. *J. Biol. Chem.* 261, 1924-1928, 1986
109. Mignatti P, Morimoto T, and Rifkin DB: Basic fibroblast growth factor released by single, isolated cells stimulates their migration in an autocrine manner. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11007-11011, 1991
110. Mignatti P, Morimoto T, and Rifkin DB: Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmatic reticulum-golgi complex. *J. Cell. Physiol.* 151, 81-93, 1992
111. McNeil PL, Muthukrishnan L, Warder E, and D'Amore PA: Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J. Cell Biol.* 109, 811-822, 1989
112. Bikfalvi A: Significance of angiogenesis in tumour progression and metastasis. *Eur. J. Cancer* 31A, 1101-1104, 1995
113. Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, and Klagsbrun M: Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: Synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2292-2296, 1987
114. Gospodarowicz D and Cheng J: Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J. Cell. Physiol.* 128, 475-484, 1986



115. Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB: Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252, 1705-1708, 1991
116. Venkataraman G, Sasisekharan V, Herr AB, Ornitz DM, Waksman G, Cooney CL, Langer R, Sasisekharan R : Preferential self-association of basic fibroblast growth factor is stabilized by heparin during receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:845-850, 1996
117. Ornitz DM, Herr AB, Nilsson M, Westman J, Svahn C-M, Waksman G: FGF binding and FGF receptor activation by synthetic heparan-derived di- and trisaccharides. *Science* 268:432-436, 1995
118. Burrus LW, Zuber ME, Lueddecke BA, Olwin BB: Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol* 12:5600-5609, 1992
119. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher P, Kleuser B, Vestweber D: The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* 373:615-620, 1994
120. Aviezer D, Hecht D, Safran M, Eisinger M, David G, Yayon A: Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis and angiogenesis. *Cell* 79:1005-1013, 1994
121. Griffioen AW, Damen CA, Martinotti S, Blijham GH, and Groenewegen G: Endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression is suppressed in human malignancies: the role of angiogenic factors. *Cancer Res.* 56, 1111-1117, 1996
122. Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ: Interferon  $\alpha$  and  $\beta$  down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 4562-4566, 1995
123. Cozzolino F, Torcia M, Lucibello M, Morbidelli L, Ziche M, Platt J, Fabiani S, Brett J, Stern D: Interferon- $\alpha$  and interleukin-2 synergistically enhance basic fibroblast growth factor synthesis and induce release, promoting endothelial cell growth. *J Clin Invest* 91:2504-2512, 1993
124. Koolwijk P, van Erck MGM, de Vree WJA, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaijer R, and van Hinsbergh VWM: Cooperativ effect of TNF $\alpha$ , b-FGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J. Cell Biol.* 132, 1177-1188, 1996
125. Garrido T, Riese HH, Aracil M, and Perezaranda A: Endothelial cell differentiation into capillary-like structures in response to tumor cell conditioned medium: a modified chemotaxis chamber assay. *Brit. J. Cancer* 71, 770-775, 1995
126. Hu GF, Riordan JF, and Vallee BL: A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2204-2209, 1997
127. Fett JW, Bethune JL, and Vallee BL: Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 146, 1122-1131, 1987
128. Chen HH, Chien CH, Liu HM: Correlation between angiogenesis and basic fibroblast growth factor expression in experimental brain infarct. *Stroke* 25, 1651-1657, 1994

129. Yoshida A, Anand-Apte B, and Zetter BR: Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 13, 57-64, 1996
130. Michiels C, de Leener F, Arnould T, Dieu M, and Remacle J: Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens: Role of prostaglandines and b-FGF. *Exper. Cell Res.* 213, 43-54, 1994
131. Wizigmann-Voos S, Breier G, Risau W, and Plate KH: Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res.* 55, 1358-1364, 1995
132. Senior RM, Huang SS, Griffin GL, and Huang JS: Brain-derived growth factor is a chemoattractant for fibroblasts and astroglial cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 141, 67-72, 1986
133. Tan EML, Hoffren J, Rouda S, Greenbaum S, Fox JW, Moore JH, and Dodge GR: Decorin, versican, and biglycan gene expression by keloid and normal dermal fibroblasts: differential regulation by basic fibroblast growth factor. *Exp. Cell Res.* 209, 200-207, 1993
134. Buckley-Sturrock A, Woodward SC, Senior RM, Griffin GL, Klagsbrun M, and Davidson JM: Differential stimulation of collagenase and chemotactic activity in fibroblasts derived from rat wound repair tissue and human skin by growth factors. *J. Cell. Physiol.* 138, 70-78, 1989
135. Chua CC, Chua BHL, Zhao ZY, Krebs C, Diglio C, and Perrin E: Effect of growth factors on collagen metabolism in cultured human heart fibroblasts. *Conn. Tissue Res.* 26, 271-281, 1991
136. Rodeck U, Melber K, Kath R, Menssen HD, Varello M, Atkinson B, and Herlyn M: Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes. *J. Invest. Dermatol* 97, 20-26, 1991
137. Singh RK, Gutman M, and Radinsky R: Heterogeneity of cytokine and growth factor gene expression in human melanoma cells with different metastatic potentials. *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 81-87, 1995
138. Albino AQP, Davis BM, and Nanus DM: Induction of growth factor RNA expression in human malignant melanoma: Markers of transformation. *Cancer Res.* 51, 4815-4820, 1991
139. Shih IM and Herlyn M: Autocrine and paracrine roles for growth factors in melanoma. *in vivo* 8, 113-124, 1994
140. Mattei S, Colombo MP, Melani C, Silvani A, Parmiani G, and Herlyn M: Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int. J. Cancer* 56, 853-857, 1994
141. Halaban R, Kwon BS, Ghosh S, Delli-Bovi P, Baird A: bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene Res.* 3, 177-186, 1988
142. Wang Y, Becker D: Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat Med* 3: 887-893, 1997
143. Rodeck U and Herlyn M : Growth factors in melanoma. *Cancer Met. Rev.* 10, 89-101, 1991

144. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ, Lyn P, Leavy J, Witte L, Joseph-Silverstein J, Furie MB, Torcia G, Cozzolino F, Kamada T, and Stern DM: Hypoxia mediated induction of acidic / basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4606-4610, 1995
145. Shapiro R, Strydom DJ, Olson KA, and Vallee BL: Isolation of angiogenin from normal human plasma. *Biochem.* 26, 5141-5146, 1987
146. Kurachi K, Davie EW, Strydom DJ, Riordan JF, and Vallee BL: Sequence of the cDNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor. *Biochem.* 24, 5494-5499, 1985
147. Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, and Vallee BL: Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochem.* 24, 5480-5486, 1985
148. Hu GF, Chang SI, Riordan JF, Vallee BL: An angiogenin-binding protein from endothelial cells. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2227-2231, 1991
149. Hu GF, Strydom DJ, Fett JW, Riordan JF, Vallee BL: Actin is a binding protein for angiogenin. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1217-1221, 1993
150. Badet J, Soncin F, Guitton JD, Lamare O, Cartwright T, Barritault D: Specific binding of angiogenin to calf pulmonary artery endothelial cells. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8427-8431, 1989
151. Hu GF, Riordan JF, Vallee BL: Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12096-12100, 1994
152. Bricknell R and Vallee BL: Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5961-5965, 1988
153. Bricknell R and Vallee BL: Angiogenin activates endothelial cell prostacyclin secretion by activation of phospholipase A<sub>2</sub>. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1573-1577, 1989
154. Soncin F, Guitton JD, Cartwright T, and Badet J: Interaction of human angiogenin with copper modulates angiogenin binding to endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 236, 604-610, 1997
155. Jimi s, Ito K, Kohno K, Ono M, Kuwano M, Itagaki Y, and Ishikawa H: Modulation by bovine angiogenin of tubular morphogenesis and expression of plasminogen activator in bovine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 211, 476-483, 1995
156. Chamoux M, Dehouck MP, Fruchart JC, Spik G, Monteuil J, Cecchelli R: Charakterisation of Angiogenin receptors on bovine brain capillary endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 30,176 (2); 833-839, 1991
157. Heath WF, Jr, Moore F, Bicknell R, Vallee BL: Modulation of mitogenic stimuli by Angiogenin correlates with in vitro phosphatidylinositol biphosphate synthesis. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 86,2718-2722, 1989
158. Kishimoto K, Liu S, Tsuji T, Olson KA, Hu GF.: Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* 24(3), 445-56, 2005
159. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI : Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology* 4, 269 – 273, 2003

160. Soncin F, Shapiro R, Fett JW: A cell surface proteoglycan mediates human adenocarcinoma HT-29 cell adhesion to human angiogenin. *J. Biol. Chem.* 269, 8999-9005, 1994
161. Piccoli R, Olson KA, Vallee BL, Fett JW: Chimeric anti-angiogenin antibody cAB 26-2F inhibits the formation of human breast cancer xenografts in athymic mice. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4579-4583, 1998
162. Olson KA, Fett JW, French TC, Key ME, and Vallee BL: Angiogenin antagonists prevent tumor growth in vivo. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 442-446, 1995
163. Balk SD: Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma -containing medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 271-275, 1971
164. Westermark B and Heldin CH : Platelet-derived growth factor. *Acta Onc.* 32, 101-105, 1993
165. Bategay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage H, and Pech M: PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF  $\beta$ -receptors. *J. Cell Biol.* 125, 917-928, 1994
166. Hsu S, Huang F, and Friedman E: Platelet-derived growth factor-B increases colon cancer cell growth in vivo by a paracrine effect. *J. Cell. Physiol.* 165, 239-245, 1995
167. Plate KH, Breier G, Farrell CL, and Risau W: Platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  is induced during tumor development and upregulated during tumor progression in endothelial cells in human gliomas. *Lab. Invest.* 67, 529-534, 1992
168. Eming SA, Lee J, Snow RG, Tompkins RG, Yarmush ML, and Morgan JR : Genetically modified human epidermis overexpressing PDGF-A directs the development of a cellular and vascular connective tissue stroma when transplanted to athymic mice -Implications for the use of genetically modified keratinocytes to modulate dermal regeneration. *J. Invest. Dermatol.* 105, 756-763, 1995
169. Worm M, Reichert U, Dippel E, Czarnetzki BM, Schadendorf D: Expression of growth factor receptors on human melanoma cells : Comparison of modulating effects of interferons and retinoids. *Exp. Dermatol.* 2, 217-223, 1993
170. Barnhill RL, Xiao M, Graves D, and Antoniades HN: Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-A, PDGF-B and the PDGF-alpha receptor, but not the PDGF-beta receptor in human malignant melanoma in vivo. *Brit. J. Dermatol.* 135, 898-904, 1996
171. Harsh GR, Keating MT, Escobedo JA, and Williams LT: Platelet derived growth factor (PDGF) autocrine components in human tumor cell lines. *J. Neuro-Oncol.* 8, 1-12, 1990
172. Hermansson M, Nister M, Betsholtz C, Heldin CH, Westermark B, Funa K: Endothelial cell hyperplasia in human glioblastoma: Coexpression of mRNA for PDGF B chain and PDGF receptor suggests autocrine growth stimulation. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7748-7752, 1988
173. Iruela-Arispe ML, and Sage EH: Endothelial cells exhibiting angiogenesis in vitro proliferate in response to TGF- $\beta$ 1. *J. Cell. Biochem.* 52, 414-430, 1993

174. Hermansson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nister M: Platelet-derived growth factor and its receptor in human glioma tissue: Expression of m-RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res.* 52, 3213-3219, 1992
175. Koyama N, Watanabe S, Tezuka M, Morisaki N, Saito Y, and Yoshida S: Migratory and proliferative effect of platelet-derived growth factor in rabbit retinal endothelial cells: Evidence of an autocrine pathway of platelet-derived growth factor. *J. Cell. Physiol.* 158, 1-6, 1994
176. Nicosia RF, Nicosia SV, and Smith M: Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insuline-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am.J.Pathol.* 145, 1023-1029, 1994
177. Forsberg K, Valyi-Nagi I, Heldin CH, Herlyn M: Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: Development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB. *Procl.Natl. Acad. Sci. USA* 90, 393-397, 1992
178. Risau W, Drexler H, Mironov V, Smits A, Siegbahn A, Funa K, and Heldin CH: Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors* 7, 261-266, 1992
179. Sato N, Beitz JG, Kato J, Yamamoto M, Clark JW, Calabresi P, and Frackelton AR jr.: Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis in vitro. *Am.J.Pathol.* 142, 1119-1130, 1993
180. Wach F, Eyrich A-M, Wustrow Th, Krieg Th, Hein R: Comparison of migration and invasiveness of epithelial tumor and melanoma cells in vitro. *J.Dermatol. Sci.* 12, 118-126, 1996
181. Behl C, Bogdahn U, Winkler J, Apfel R, Brysch W, and Schlingensiepen KH: Autoinduction of platelet derived growth factor (PDGF) A-chain mRNA expression in human malignant melanoma cell line and growth inhibitory effects of PDGF-A-chain mRNA-specific antisense molecules. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193, 744-751, 1993
182. Furuhashi M, Sjoblom T, Abramsson A, Ellingsen J, Micke P, Li H, Bergsten-Folestad E, Eriksson U, Heuchel R, Betsholtz C, Heldin CH, Ostman A. : Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate. *Cancer Res.* 64(8), 2725-33, 2004
183. Ellem KAO, and Kay GF: The nature of conditioning nutrients for human malignant melanoma cultures. *J. Cell. Sci.* 62, 249-266, 1983
184. Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, Morganelli P, Yeo K, Brown F, Fava RA: Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta(TGF- $\beta$ ) and IL-1) induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.* 115(1), 176-182, 1999
185. Bucher M, Sandner P, Wolf K, and Kurtz A: Cobalt but not hypoxia stimulates PDGF gene expression in rats. *Am.J.Physiol.* 271, E451-457, 1996
186. Gordon PR, Treloar VD, Vrabel MA, and Gilchrist BA: Relative responsiveness of cultured human epidermal melanocytes and melanoma cells to selected mitogens. *J.Invest. Dermatol.* 87, 723-727, 1986
187. Merwin JR, Newman W, Beall JD, Tucker A, and Madri J: Vascular cells respond differentially to transforming growth factor beta 1 and beta 2 in vitro. *Am. J. Pathol.* 138, 37-51, 1991

188. Altomonte M, Montagner R, Colizzi F, Cattarossi I, Brasoveanu LI, Nicotra MR, Cattelan A, Natali PG and Maio M: Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 binding protein, in human melanoma. *Brit. J. Cancer*, 74, 1586-1591, 1996
189. Merwin JR, Anderson JM, Kocher O, van Itallie ChM, and Madri JA: Transforming growth factor  $\beta$ 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* 142, 117-128, 1990
190. Koll K, Keski-Oja J: Transforming growth factor- $\beta$  system and its regulation by members of steroid-thyroid hormone superfamily. *Adv. Cancer Res.* 70, 63-94, 1996
191. Krasagakis K, Garbe C, Schrier PI, and Orfanos CE: Paracrine and autocrine regulation of human melanocyte and melanoma cell growth by transforming growth factor  $\beta$  in vitro. *Anticancer Res.* 14, 2565-2572, 1994
192. McCartney-Francis N, Mizel D, Wong H, Wahl L, and Wahl S: TGF- $\beta$  regulates production of growth factors and TGF- $\beta$  by human peripheral blood monocytes. *Growth Factors* 4, 27-35, 1990
193. Mustoe ThA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, and Deufel ThF: Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor - $\beta$ . *Science* 237, 1333-1336, 1987
194. Beck LS, Deguzman L, Lee WP, Xu Y, Mcfartidge LA, and Amento EF: TGF- $\beta$ 1 accelerates wound healing : Reversal of steroid-impaired healing in rats and rabbits. *Growth Factors* 5, 295-304, 1991
195. Carcamo J, Zentella A, Massague J : Disruption of transforming growth factor- $\beta$  signaling by a mutation that prevents transphosphorylation within the receptor complex. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1573-1581, 1995
196. Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J: Betaglycan presents ligand to the TGF- $\beta$  signaling receptor. *Cell* 73, 1435-1444, 1993
197. Pertovaara L, Saksela O, and Alitalo K : Enhanced b-FGF gene expression in response to transforming growth factor - $\beta$  stimulation of AKR-2B cells. *Growth Factors* 9, 81-86, 1993
198. Leof EB, Proper JA, Goustin AS, Shipley GD, DiCorleto PI, and Moses HL: Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor  $\beta$  : A proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Procl. Natl. Sci. USA.* 83, 2453-2457, 1986
199. Mooradian DL, Purchio AF, and Furcht LT: Differential effects of transforming growth factor  $\beta$ 1 on the growth of poorly and highly metastatic murine melanoma cells. *Cancer Res.* 50, 273-277, 1990
200. Fujimaki T, Price JE, Fan D, Bucana CD, Itoh K, Kirino T, and Fidler IJ: Selective growth of human melanoma cells in the brain parenchyma of nude mice. *Melanoma Res.* 6, 363-371, 1996
201. Reed JA, McNutt NS, Prieto VG, and Albino AP: Expression of transforming growth factor  $\beta$ 2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion. *Am. J. Pathol.* 145, 97-104, 1994
202. Krasagakis K, Tholke D, Fathmann B, Eberle J, Mansmann U, Orfanos CE: Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br. J. Cancer* 77, 1492-1494, 1998

203. Engle SJ, Hoying JB, Boivin GP, Ormsby I, Gartside PS, Doetschman T: Transforming growth factor  $\beta$ 1 suppresses nonmetastatic colon cancer at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res.*, 59: 3379-3386, 1999
204. Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, and Vassalli JD: Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J. Cell Biol.* 111, 743-755, 1990
205. Falcone DJ, McCaffrey TA, Haimovitz-Friedman A, and Garcia M: Transforming growth factor- $\beta$ 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol* 155, 595-605, 1993
206. Flaumenhaft R, Abe M, Mignatti P, and Rifkin DB: Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor  $\beta$  in endothelial cells. Regulation of plasminogen activator activity. *J. Cell Biol.* 118, 901-909, 1992
207. Pepper MS, Vassalli JD, Orci L and Montesano R: Biphasic effect of transforming growth factor- $\beta$ 1 on in vitro angiogenesis. *Exp. Cell Res.* 204, 356-363, 1993
208. Falanga V, Qian SW, Danielpour D, Katz MH, Roberts AB, and Sporn MB: Hypoxia upregulates the synthesis of TGF- $\beta$ 1 by human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 97, 634-637, 1991
209. Gutman M, Singh RK, Xie K, Bucana CD, and Fidler IJ: Regulation of interleukin -8 expression in human melanoma cells by the organ environment. *Cancer Res.* 55, 2470-2475, 1995
210. Graves Dt, Jiang Y: Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 6, 109-118, 1995
211. Kitayama J, Carr MW, Roth SJ, Buccola J, and Springer TA: Contrasting responses to multiple chemotactic stimuli in transendothelial migration. *J. Immunol.* 158, 2340-2349, 1997
212. Rainger GE, Fisher AC, and Nash GB: Endothelial-borne platelet-activating factor and interleukin-8 rapidly immobilize rolling neutrophils. *Am. J. Physiol.* 272, H114-H122, 1997
213. Yoshida A, Yoshida S, Khalil AK, Ishibashi T, Inomata H: Role of NF-kappaB-mediated interleukin-8 expression in intraocular neovascularization. *Invest. Ophthalmol-Vis-Sci.* 39, 1097-1106, 1998
214. Wang JM, Taraboletti G, Matsushima K, Van Damme J, Mantovani A: Induction of haptotactic migration of melanoma cells by neutrophil activating protein/interleukin-8. *Biochem Biophys Res Commun*, 169, 165-170, 1990
215. Konstantinova NV, Duong DMT, Remenyik E, Hazarika P, Chuang A, and Duvic M: Interleukin is induced in skin equivalents and is highest in those derived from psoriatic fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 107, 615-621, 1996
216. Bornscheuer E, Schröder JM, Christophers E and Sticherling M: Interleukin-8 immunoactivity in malignant tumours of the skin. *Acta Derm. Venereol.* 76, 210-213, 1996
217. Santamaria Babi LF, Moser B, Perez Soler MT, Moser R, Loetscher P, Villiger B, Blaser K, and Hauser C: The interleukin-8 receptor B and CXC chemokines can mediate transendothelial migration of human skin homing T cells. *Eur. J. Immunol.* 26, 2056-2061, 1996

218. Degli-Eposti MA, Davis-Smith T, Din WS, Smolak PJ, Goodwin RG, and Smith CA: Activation of the lymphotoxin  $\beta$  receptor by cross-linking induces chemokine production and growth arrest in A375 melanoma cells. *J.Immunol.* 158, 1756-1762, 1997
219. Schadendorf D, Möller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, and Czanetzki BM: IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J.Immunol.* 151, 2667-2675, 1993
220. Goebeler M, Yoshimura T, Toksoy A, Ritter U, Bröcker E-B, and Gillitzer R: The chemokine repertoire of human dermal microvascular endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines. *J.Invest. Dermatol.* 108, 445-451, 1997
221. Singh RK, Gutman M, Llansa N, and Fidler IJ: Interferon- $\beta$  prevents the upregulation of interleukin-8 expression in human melanoma cells. *J.Interferon Cytokine Res.* 16, 577-584, 1996
222. Takahashi GW, Andrews DF, Lilly MB, Singer JW, and Alderson MR: Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes. *Blood* 81, 357-364, 1993
223. Derevianko A, D'Amico R, Simms H: Polymorphonuclear leukocyte (PMN)-derived inflammatory cytokines- regulation by oxygen tension and extracellular matrix. *Clin. Exp. Immunol.* 106, 560-567, 1996
224. Bar-Eli M.: Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology* 67, 12-18, 1999
225. Huang S., DeGuzman A., Bucana C.D. and Fidler IJ : Nuclear Factor- $\kappa$ B Activity Correlates with Growth, Angiogenesis, and Metastasis of Human Melanoma Cells in Nude Mice. *Clinical Cancer Research Vol. 6*, 2573-2581, 2000
226. Kunz M., Hartmann A., Flory E., Toksoy A., Koczan D., Thiesen H-J., Mukaida N., Neumann M., Rapp U. R., Bröcker E-B., Gillitzer R. Anoxia-induced up-regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. *Am. J. Pathol.*, 155: 753-763, 1999
227. Enzmann V, Faude F, Kohen L, Wiedemann P: Secretion of cytokines by human choroidal melanoma cells and skin melanoma cell lines in vitro. *Ophthalmic. Res.* 30, 189-194, 1998
228. Bennicelli JL, Guerry D IV: Production of multiple cytokines by cultured human melanomas. *Exp. Dermatol.* 2, 186-190, 1993
229. Ciotti P, Rainero ML, Nicolo G, Spina B, Garre C, Casabona F, Santi PL, and Bianchi-Scarra G: Cytokine expression in human primary and metastatic melanoma cells: analysis in fresh bioptic specimens. *Melanoma Res.* 5, 41-47, 1995
230. Norgauer J, Metzner B, Schraufstetter I: Expression and growth-promoting function of the IL-8 receptor  $\beta$  in human melanoma cells. *J Immunol.* 156, 1132-1137, 1996
231. Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M., Yang X.-D. , Gudas J M and Bar-Eli M: Fully Humanized Neutralizing Antibodies to Interleukin-8 (ABX-IL8) Inhibit Angiogenesis, Tumor Growth, and Metastasis of Human Melanoma, *American Journal of Pathology.* 161, 125-134, 2002



232. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, and Fidler IJ: Expression of interleukin-8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res.* 54, 3242-3247, 1994
233. Luca M., Huang S., Gershenwald J. E., Singh R. K., Reich R., Bar-Eli M. : Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am. J. Pathol.*, 151: 1105-1113, 1997
234. Rofstad EK, Halsor EF.: Hypoxia-associated spontaneous pulmonary metastasis in human melanoma xenografts: involvement of microvascular hot spots induced in hypoxic foci by interleukin 8. *Br J Cancer*, 86(2), 301-8, 2002
235. Petzelbauer P: IL-8 and angiogenesis. Evidence that human endothelial cells lack receptors and do not respond to IL-8 in vitro. *Cytokine* 7, 267-272, 1995
236. Lawson DH, Thomas HG, Roy RGB, Gordon DS, Chawla RK, Nixon DW, Richmond A: Preparation of monoclonal antibody to mgsa released into serum-free culture medium by Hs=294 malignant melanoma cells. *J. Cell. Biochem.* 34, 169-185, 1987
237. Medrano EE, Farooqui JZ, Boissy YL, Akadri B, Nordlund JJ: Chronic growth stimulation of human adult melanocytes by inflammatory mediators in vivo: Implications for nevus formation and initial steps in melanocyte oncogenesis. *Procl. Natl. Acad. Sci USA* 90, 1790-1794, 1993
238. Cao Y, Chen C, Weatherbee JA, Tsang M, and Folkman J: gro- $\beta$ , a C-X-C-chemokine, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of lewis lung carcinoma in mice. *J. Exp. Med.* 182, 2069-2077, 1995
239. Horuk R, Yansura DG, Reilly D, Spencer S, Bourell J, Henzel W, Rice G and Unemori E: Purification, receptor binding analysis, and biological characterization of human MGSA. Evidence for a novel MGSA receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 541-546, 1993
240. DeLarco JE and Todaro GJ: Growth factors from murine sarcoma virus transfected cells. *Procl. Natl. Acad. Sci USA* 75, 4001-4005, 1978
241. Xing Z, Ohkawara Y, Jordana M, Graham FL, and Gauldie J: Transfer of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene to rat lung induces eosinophilia, monocytosis, and fibrotic reactions. *J. Clin. Invest.* 97, 1102-1110, 1996
242. Spielholz C, Heaney ML, Morrison ME, Houghton AN, Vera JC, and Golde DW: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signals for increased glucose uptake in human melanoma cells. *Blood* 85, 973-980, 1995
243. Baldwin GC, Golde DW, Widhopf GF, Economou J, and Gasson JC: Identification and characterization of a low-affinity granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor on primary and cultured human melanoma cells. *Blood* 78, 609-615, 1991
244. Armstrong CA, Tara DC, Hart CE, Köck A, Luger TA, Ansel JC: Heterogeneity of cytokine production by human malignant melanoma cells. *Exp. Dermatol.* 1, 37-45, 1992
245. Schwartz SM, Heimark RL, and Majesky MW: Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol. Rev.* 70, 1177-1209, 1990
246. Ciotti P, Imro A, Scudeletti M, Rainero ML, Defferrari R, Ghiorzo P, Indiveri F, and Bianchi-Scarra G : MEL-P, a GM-CSF-producing human melanoma cell line. *Melanoma Res.* 6, 203-213, 1996

247. Kohn EC, Hollister GH, Disperso JD, Wahl S, Liotta LA, Schiffmann E: Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor induces human melanoma-cell migration. *Int. J. Cancer* 53, 968-92, 1993
248. Smola H, Thiekötter G, and Fusenig NE: Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J. Cell Biol.* 122, 417-429, 1993
249. Sabatini M, Chavez J, Mundy GR, and Bonewald LF: Stimulation of tumor necrosis factor release from monocytic cells by the A375 human melanoma via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Cancer Res.* 50, 2673-2678, 1990
250. Lenhoff S, Olofsson T : Cytokine regulation of GM-CSF and G-CSF secretion by human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC). *Cytokine* 8(9), 702-709, 1996
251. Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell CJS, Aglietta M, Arese P, and Mantovani A: Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 337, 471-473, 1989
252. Hom SS, Schwarzentruer DJ, Rosenberg SA, and Topalian SL: Specific release of cytokines by lymphocytes infiltrating human melanomas in response to shared melanoma antigens. *J. Immunother.* 13, 18-30, 1993
253. Ragnhammar P, Frödin JE, Trotta PP, Mellstedt H: Cytotoxicity of white blood cells activated by granulocyte-colony-stimulating factor, Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor and macrophage-colony-stimulating factor against tumor cells in the presence of various monoclonal antibodies. *Cancer Immunol. Immunother.* 39, 254-262, 1994
254. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbe K P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, and Mulligan RC: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3539-3543, 1993
255. Vaquerano JE, Cadbury P, Tresseler P, et al: Regression of in-transit melanoma of the scalp with intralesional recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Arch Dermatol* 135:1276-1277, 1999
256. Soiffer R, Lynch T, Mihm M, et al: Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13141 -13146, 1998
257. Leong SPL, Enders-Zohr P, Zhou Y, et al: Recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor (rhGM-CSF) and autologous melanoma vaccine mediate tumor regression in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 22:166-174, 1999-13146, 1998
258. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, and Jain RK: Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: High resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Med.* 3, 177-182, 1997
259. Ramakrishnan S., Olson T. A., Bautch V. L. and Mohanraj D.: Vascular endothelial growth factor-toxin conjugate specifically inhibits KDR/flk-1-positive endothelial cell proliferation *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Cancer Res.* 56, 1324-1330, 1996

260. Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, and Jain RK: Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14765-14770, 1996
261. Ugurel S, Rapp G, Tilgen W, Reinhold U: Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J Clin Oncol*, Vol 19, Issue 2, 577-583, 2001
262. Rofstad EK, Danielsen T: Hypoxia-induced angiogenesis and vascular endothelial growth factor secretion in human melanoma. *Br. J. Cancer.* 77, 897-902, 1998
263. Rofstad EK, Danielsen: Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Br J Cancer* 80(11), 1697-707, 1999
264. Pötgens AJG, Lubsen NH, van Altena MC, Schoenmakers JGG, Ruiter DJ, de Waal RMW: Vascular permeability factor expression influences tumor angiogenesis in human melanoma lines xenografted to nude mice. *Am. J. Pathol.* 146, 197-209, 1995
265. Graells J, Vinyals A, Figueras A, Llorens A, Moreno A, Marcoval J, Gonzalez FJ, Fabra A.: Overproduction of VEGF concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling. *J. Invest Dermatol* 123(6), 1151-61, 2004
266. Graeven U, Rodeck U, Karpinski S, Jost M, Philippou S and Schmiegel W: Modulation of Angiogenesis and Tumorigenicity of Human Melanocytic Cells by Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor. *Cancer Research* 61, 7282-7290, 2001
267. Clauss M, Gerlach M, Nomura M., Yamagishi S., Harada S., Hayashi Y., Yamashita T., Yamashita J., Yamamoto H.: Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J. Biol. Chem.*, 270: 28316-28324, 1995
268. Soldi R., Mitola S., Strasly M., Defilippi P., Tarone G., Bussolino F. Role of  $\alpha_v\beta_3$  in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J.*, 18: 882-892, 1999
269. Rofstad EK, Halsor EF: Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. *Cancer Res.* 60, 4932-4938, 2000
270. Hartmann A, Kunz M, Köstlin S, Gillitzer R, Toksoy A, Brocker EB, Klein CE.: Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 59(7), 1578-83, 1999
271. Pilch H, Schlenger K, Steiner E, Brockerhoff P, Knapstein P, Vaupel P.: Hypoxia-stimulated expression of angiogenic growth factors in cervical cancer cells and cervical cancer-derived fibroblasts. *Int J Gynecol Cancer.* 11(2), 137-42, 2001
272. Ribatti D, Vacca A, Palma W, Lospalluti M, and Damnacco F: Angiogenesis during tumor progression in human malignant melanoma. *Angiogenesis* 415-420, 1992
273. Zachariae COC, Thestrup-Pedersen K, Matsushima K: Expression and secretion of leukocyte chemotactic cytokines by normal human melanocytes and melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 97, 593-599, 1991

274. Sticherling M, Hetzel F, Schröder JM, Christophers E: Time- and stimulus-dependent secretion of NAP-1/IL-8 by human fibroblasts and endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 101, 573-576, 1993
275. U-Test Sachs: *Biostatistik, Springer-Verlag*, 230-238 / Wilcoxon-Test Sachs: *Biostatistik, Springer-Verlag*, 244-246
276. Viac J, Schmitt D, Claudy A: Circulating VEGF is not a prognostic indicator in malignant melanoma. *Cancer Letters* 125, 35-38, 1998
277. Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Negri G, Oohara T, and Beger HG: Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Res.* 56, 2703-2706, 1996
278. Brown KJ, Maynes SF, Bezos A, Maguire DJ, Ford MD, and Parish CR: A novel in vitro assay for human angiogenesis. *Lab. Invest.* 75, 539-555, 1996
279. Wilting J, Christ B, Bokeloh M, and Weich HA: In vivo effects of vascular endothelial growth factor on the chicken chorioallantoic membrane. *Cell Tissue Research.* 274, 163-172, 1993
280. Watson CA, Camera-Benson L, Palmer-Crocker R, Pober JS: Variability among human umbilical vein endothelial cultures. *Science* 268, 447-448, 1995
281. Ueda Y, Yamagishi T, Ikeya H, Hirayama N, Itokawa T, Aozuka Y, Samata K, Nakaike S, Tanaka M, Ono M, Saiki I.: VEGF1155, a novel binding antagonist of VEGF, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Anticancer Res.* 24(5A), 3009-17, 2004
282. Peterson AC, Swiger S, Stadler WM, Medved M, Karczmar G, Gajewski TF.: Phase II study of the Flk-1 tyrosine kinase inhibitor SU5416 in advanced melanoma. *Clin. Cancer Res.* 10(12 Pt 1), 4048-54, 2004

## **Danksagung**

Mein ausdrücklicher Dank gilt Frau Prof. Dr. E.B. Bröcker für die Bereitstellung des Themas sowie Frau Dr. med. A. Hartmann und Herrn Prof. Dr. C.E. Klein für ihre Betreuung meiner Arbeit.

Für ihre Einführung und Unterstützung in der Laborarbeit möchte ich mich bei Frau Sybille Schmidt und Frau Andrea Rivera herzlich bedanken. Für ihre praktischen Hinweise und Anregungen danke ich im Besonderen meiner Tante Frau Prof. Dr. Karin Gorgas und Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Goebeler.

Hervorheben möchte ich auch den großen Rückhalt und die liebevolle Unterstützung aus meiner Familie.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Sebastian Michael Cosmann Köstlin  
Geburtsdatum/-ort 14.11.1970, Rüsselsheim  
Anschrift Haarstr.14  
63762 Großostheim  
Familienstand verheiratet / 1 Kind (2 Jahre)

### Schulbildung

1976 - 1980 Grundschule Karlstein  
1980 - 1990 Spessart-Gymnasium-Alzenau  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife,  
Note:1,9

### Zivildienst

September 1990 - November 1991 Pflegehilfe auf allgemeinchirurgischer  
Station der Stiftung Juliusspital,  
Würzburg

### Hochschulbildung

WS 1992/ 1992 Bauingenieurwesen, TH Vaihingen-  
Stuttgart  
SS 1992 - SS 1999 Humanmedizin, Julius-Maximilians-  
Universität, Würzburg  
Physikum, April 1994, Note: 2,0  
1. Staatsexamen, April 1995, Note: 3,0  
2. Staatsexamen, April 1998, Note: 2,3  
3. Staatsexamen, Mai 1999, Note: 2,0  
Studienabschluss: Gesamtnote 2,3

### Famulaturen

1994, August Dermatologie, US-Army-Hospital,  
Würzburg, Col. MD B. Coquilia  
1995, September - Oktober Chirurgie, Kreiskrankenhaus Alzenau-  
Wasserlos, Dr. med. univ. Sekanina  
1996, September - Oktober Chirurgie / Innere Medizin, Saraswati  
Hospital, Udaipur, Rajasthan, Indien,  
Prof. Agrawal / MD Chauhan  
1997, September Pädiatrie, Würzburg,  
Praxis Dr. H. Zoepffel

### **Praktisches Jahr**

20. April - 09. August 1998

Chirurgie, Chirurgische  
Universitätsklinik und -Poliklinik,  
Würzburg

10.08.1998 - 30.09.1998

Leitung: Prof. Dr. A. Thiede  
Innere Medizin, Landkrankenhaus  
Coburg

01.10.1998 – 29.11.1998

Leitung: Prof. Dr. J. Brachmann  
Innere Medizin, Sandwell Hospital,  
West Bromwich, Universität  
Birmingham, England

30.11.1998 - 21.03.1999

Leitung: Dr. G.V.H. Bradby  
Neurologie, Klinikum Aschaffenburg  
Leitung: Prof. Dr. R. Schneider

### **AiP/Ärztliche Weiterbildung**

15.09.1999-30.09.2000

Abteilung für Innere Medizin  
Missionsärztliche Klinik , Würzburg  
Lehrkrankenhaus der Universität

Würzburg

01.10.2000 – 30.06.2004

Leitung: Prof. Dr. B. Jany  
Innere Klinik II für Pneumologie,  
Infektiologie, Intensiv- und  
Schlafmedizin, Klinikum Lüdenscheid  
Lehrkrankenhaus der Universität Bonn

01.04.2001

01.07.2004 – 30.09.2005

seit 01.10.2005

Leitung: Prof. Dr. J. Lorenz  
Erhalt der Approbation  
Erziehungszeit  
Abteilung für Innere Medizin  
Krankenhaus Erlenbach  
Leitung: Dr. H. Striegel

### **Promotion**

seit Oktober 1995

Experimentelle Promotionsarbeit im  
Labor der Klinik und Poliklinik für Haut  
und Geschlechtskrankheiten der  
Universität Würzburg,  
Prof. Dr. E.B. Bröcker

Thema

„Die Sekretion angiogenetischer  
Zytokine durch menschliche  
Melanomzellen unter Hypoxie“

Methoden

Zellkultur, ELISA, Proliferationsassay

Literatur

Medline und Fachzeitschriften

• • •



## Sonstige Kenntnisse

Labor	Zelladhäsionsassay, FACScan, Zellspheroidanzucht und -kultur in Fibringel und Softagar
EDV	Anwendungsorientierte Kenntnisse in Textverarbeitung, Graphiken- und Tabellenerstellung in Windows, Kenntnis von Internet und Medline
Sprachen	sehr gute Sprachkenntnisse in Englisch, Grundkenntnisse in Französisch
Akupunktur	Akupunktur im Februar/ März 1997 bei Dr. Fu Wenbin, Universität Guangzhou (Kanton), China

Großostheim, den 06. März 2006

*Sebastian Kobl*