

**Der Einfluss embryonaler Morphogene der TGF- β
Familie auf Invasivität, Motilität und Therapieresistenz
von Melanomzellen *in-vitro* und *in-vivo***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Maia Dettweiler, Christoph

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Garbe

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Sipos

Für meine Familie
Para minha familia

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Melanom.....	1
1.2 TGF- β	2
1.3 BMP und Noggin.....	3
- 1.3.1 BMP.....	3
- 1.3.2 Noggin.....	8
1.4 <i>Nodal</i> , <i>Lefty</i> und SB431542.....	9
- 1.4.1 <i>Nodal</i>	9
- 1.4.2 <i>Lefty</i>	12
- 1.4.3 SB431542.....	13
1.5 EMT.....	13
1.6 Vorarbeiten.....	16
1.7 Zielsetzung.....	17
2. Material und Methodik.....	19
2.1 Zellkulturmethoden.....	19
- 2.1.1 Zelllinien.....	19
- 2.1.2 Einfrieren von Zellen.....	19
- 2.1.3 Zellkultur.....	19
2.2 Zellzählung.....	21
2.3 Herstellung von Melanomzellaggregaten.....	21
2.4 Zellzyklusanalyse.....	23
2.5 MUH (4-methylumbelliferyl-heptanoate)-assay.....	24
2.6 Koloniebildung im Softagar.....	26
2.7 Primäraggregatmessung.....	26
2.8 Randschleier/Aggregat-Ratio.....	27
2.9 Humanes epidermales Hautrekonstrukt.....	29
2.10 <i>in-vivo</i> Experiment im Hühnerembryomodell.....	31
2.11 Statistik.....	33

3. Ergebnisse.....	34
3.1 Proliferation/Chemosensitivierung.....	34
- 3.1.1 Zellzyklusanalyse per Durchflusszytometrie.....	34
- 3.1.2 Zellproliferations- und Chemosensitivitätsmessung.....	36
- 3.1.3 Koloniebildung im Softagar.....	40
3.2 Aggregation/Migration.....	41
- 3.2.1 Zellaggregation.....	41
- 3.2.2 EMT <i>in-vitro</i> / Randschleierbildung.....	43
- 3.2.3 Invasion <i>in-vitro</i> im humanen epidermalen Hautrekonstrukt..	45
- 3.2.4 Expression von BMP-2 und <i>Nodal</i> in proliferativen und invasiven Melanomzellen.....	50
3.3 Der Einfluss von <i>Nodal</i> , <i>Lefty</i> und SB431542 auf die Neuralleistenwanderung von SKMEL28 Melanomzellen <i>in-vivo</i> im Hühnerembryo.....	52
 4. Diskussion.....	 56
 5. Zusammenfassung.....	 63
 6. Literaturverzeichnis.....	 66
 Danksagung.....	 82
 Lebenslauf.....	 83
 <u>Abbildungen und Tabellen:</u>	
Abbildung 1: BMP-Signalkaskade.....	5
Abbildung 2: <i>Nodal</i> -Signalkaskade.....	10
Abbildung 3: Aggregatmessung.....	27
Abbildung 4: Beispielmessung Randschleier/Aggregat-Ratio.....	28
Abbildung 5: Zellyklusanalyse nach Morphogenbehandlung.....	35
Abbildung 6: Chemosensitivitäts-assay von SKMEL28 Melanomzellen...	37

Abbildung 7: Chemosensitivitäts-assay von SKMEL28 und B16-F1 Melanomzellen anhand ansteigenden Cisplatin-Konzentrationen.....	39
Abbildung 8: Koloniebildung von SKMEL28 Melanomzellen im Softagar.....	40
Abbildung 9: Aggregatgrößen verschiedener Melanomzelllinien nach Behandlungen mit Morphogenen.....	42
Abbildung 10: Randschleierbildung (EMT <i>in-vitro</i>) verschiedener Melanomzelllinien nach Vorbehandlung mit den Morphogenen.....	44
Abbildung 11: Invasion von unbehandelten, BMP-2- oder Noggin- vorbehandelten BLM Melanomzellen im humanen epidermalen Hautrekonstrukt.....	46
Abbildung 12: Invasion von unbehandelten, <i>Nodal</i> -, <i>Lefty</i> - oder SB431542-vorbehandelten BLM Melanomzellen im humanen Epidermalen Hautrekonstrukt.....	47
Abbildung 13: Induktion von invasivem Wachstum in SBCL2 RGP Melanomzellen durch die Agonisten BMP-2 und <i>Nodal</i> im humanen epidermalen Hautrekonstrukt.....	49
Abbildung 14: Erhöhte BMP-2 Genexpression bei invasiven Melanomzelllinien im Vergleich zu proliferativen Melanomzelllinien.....	51
Abbildung 15: SB431542 inhibiert die spontane Neuralleistenwanderung von SKMEL28 Melanomzellen nach Injektion in das Neuralrohr des Hühnerembryos.....	53
Abbildung 16: <i>Nodal</i> -Expression unbehandelter B16-F1 Zellen nach Injektion das Neuralrohr von Hühnerembryonen.....	55
Tabelle 1: Auswertung der Neuralleistenwanderung von SKMEL28 Melanomzellen im Hühnerembryomodell nach Behandlung mit <i>Lefty</i> oder SB431542.....	54
Tabelle 2: Zusammenfassung und schematische Darstellung der Effekte von den Morphogenen und deren Antagonisten auf Melanomzellen <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i>	65

1 Einleitung

1.1 Melanom

Das maligne Melanom ist ein hochaggressiver Tumor, dessen Inzidenz in den hellhäutigen Populationen rasch zunimmt [74]. Ausmaß der Tumordicke und Ulzeration des Melanoms sind assoziiert mit einer wesentlichen Verschlechterung der Überlebenswahrscheinlichkeit, und selbst kleinste Tumoren haben das Potential zur Metastasierung [32, 78]. Die Früherkennung von Primärtumoren und Rezidiven sowie die anschließende chirurgische Resektion ist bislang die einzige kurative Therapiemöglichkeit und war bis vor kurzem die einzige Option zur Verbesserung der Überlebenszeit [39]. Effektive medikamentöse Therapien zur Behandlung im disseminierten Krankheitsstadium (Stadium IV) waren bisher nicht bekannt, so dass die Überlebenszeiten in diesem Krankheitsstadium relativ kurz waren [31]. 2012 wurden jedoch zwei neuere Substanzen (Vemurafenib und Ipilimumab) für die Therapie von metastasierten Melanomen zugelassen. Melanompatienten mit Fernmetastasen, welche eine BRAF V^{600E}-Mutation aufwiesen, wurde in klinischen Studien [20, 36] mit einem BRAF-Inhibitor (Vemurafenib) behandelt. Eine andere Gruppe von Patienten mit metastasiertem Melanom wurde mit Ipilimumab behandelt [54]. Ipilimumab ist ein monoklonaler humaner IgG1 Antikörper, welcher die immunsuppressiven Eigenschaften von *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) blockt und somit die antitumorale Immunantwort verstärkt. Beide Substanzen konnten einen Überlebensvorteil im Vergleich zu den bisherigen Behandlungsmöglichkeiten zeigen [20, 54]. Eine kurative Behandlungsmöglichkeit stellen beide Substanzen jedoch nicht dar, da es nach der Behandlung in beiden Fällen wieder zu einem Krankheitsprogress kommt. Ebenso sind die langfristigen Nebenwirkungen abzuwarten.

Melanome entstehen aus Melanozyten oder Melanoblasten, welche der embryonalen Neuralleiste entstammen. Die Reaktivierung von embryonalen Signalkaskaden und die Zunahme von Progenitorzellmerkmalen scheinen teilweise für das aggressive Wachstum und die Resistenz gegenüber

medikamentösen Therapien des Melanoms verantwortlich zu sein. Kürzlich wurden stammzellartige Krebszellen in verschiedenen soliden Tumoren identifiziert [41]. Charakteristisch für diese Zellen sind eine niedrige Proliferationsrate bei gleichzeitig hoher Migrationsrate und Invasivität (entsprechend einem mesenchymalen Zellphänotyp). Autokrine und parakrine Aktivierung durch Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel der TGF-beta Familie, spielen wahrscheinlich eine essentielle Rolle in diesem Prozess. Stammzellartige Krebszellen sprechen möglicherweise aufgrund ihrer niedrigen Proliferationsrate und anderen stammzellartigen Eigenschaften gering auf Chemotherapien und andere therapeutische Modalitäten an. Man geht zurzeit davon aus, dass solche stammzellartigen Tumorzellen nach initialem Ansprechen des Tumors auf Therapie persistieren und somit vielleicht ein erneutes Tumorwachstum hervorrufen [2]. Das macht die Analyse von embryonalen (Stammzell-)Eigenschaften (z.B. Neuralleisten-*signalling*) bei Melanomzellen und die Modulation dieser Signalkaskaden zu einer Schlüsselfrage für das Verständnis zur Therapieresistenz und der invasiven Eigenschaften des Melanoms.

1.2 TGF- β

Transforming growth factor β (TGF- β) ist ein Zytokin, welches eine Schlüsselrolle in der Biologie komplexer mehrzelliger Organismen einnimmt. Unter anderem reguliert es die Evolution der epithelialen und neuronalen Gewebe sowie des Immunsystems und der Wundheilung. Dysfunktionen in der TGF- β Signalkaskade führen unter anderem zu Tumorigenese. Normalerweise vermittelt TGF- β den Zellen direkte tumorsuppressive Eigenschaften wie Zytostase, Zelldifferenzierung und Apoptose. Indirekte tumorsuppressive Effekte, zum Beispiel auf das Tumorstroma, werden unter anderem durch Entzündungshemmung erreicht.

Bei Krebszellen gehen diese Eigenschaften jedoch verloren, und stattdessen werden TGF- β vermittelte Prozesse eingeleitet, die eine Tumorprogression ermöglichen, zum Beispiel durch eine erhöhte Wachstumsfaktorproduktion, eine (De-)Differenzierung hin zu einem invasiven Zellphänotyp und eine erhöhte

Immuntoleranz der Krebszellen. Damit wird unter anderem auch eine Metastasierung ermöglicht.

Diese Umkehrung der tumorsuppressiven Eigenschaften des TGF- β wird einerseits durch inaktivierende Mutationen im TGF- β Rezeptor verursacht, andererseits durch spezifische Mutationen, welche die tumorsuppressiven Signalkaskaden deaktivieren. Karzinomzellen können den Einfluss von TGF- β ebenfalls zur epithelialen-mesenchymalen-Transformation (EMT) nutzen, welche als einer der entscheidenden Prozesse bei der Tumorzellmetastasierung gilt. Weitere Zytokine der TGF- β -Familie, die bei der EMT eine Rolle spielen, sind *bone morphogenic protein* (BMP), Noggin, Nodal und Lefty [33, 63, 66, 81-82, 113, 119].

1.3 Bone morphogenic protein (BMP) und Noggin

1.3.1 Bone morphogenic protein (BMP)

BMPs bilden mit über 20 verschiedenen Zytokinen die größte Untergruppe in der TGF- β Superfamilie und sind an einer Vielzahl an Regulationsprozessen verschiedenster Zellen in verschiedenen Organismen beteiligt [6, 98, 129].

Ursprünglich wurden BMPs als Induktor der enchondralen Knochenentstehung identifiziert. BMPs sind zusätzlich ein Bestandteil einer während der Evolution hochkonservierten Signalkaskade, welche Einfluss auf Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose, Chemotaxis, Angiogenese und die Entstehung der extrazellulären Matrix hat [130]. Durch transgene- und *knockout*-Tiermodelle wurde zum Beispiel die Bedeutung von BMPs für die embryologische Entwicklung des Herzens [134], des Skeletts, der Nieren und des Auges [57] dargestellt. Des Weiteren sind BMPs und deren Antagonisten (z.B. Noggin) an der Strukturentstehung des Neuralrohrs und der Somiten in Mausembyronen, sowie der Organverteilung (z.B. ektodermale Hautanteile und Bindegewebe, mesodermale Gefäßstrukturen) in der ventral/dorsalen Achse während der Embryogenese beteiligt [42, 84]. Ebenso ist BMP-2 in Kombination mit *cyclic*-AMP (cAMP) im Rahmen der Neuralleisteninduktion an der Entstehung von Melanozyten beteiligt. Die Behandlung von Neuralleistenzellen

mit BMP-2 führt zu einer selektiven Aktivierung der Transkription des Tyrosinasegens und somit zu einer verstärkten Melaninsynthese [9].

Die Signaltransduktion von BMPs wird über die Bildung eines dimeren Vorläuferproteins initiiert, welches über eine Disulfidbindung der beiden Homodimere entsteht. Die Homodimere werden als inaktive Vorläuferproteine gebildet. Nach Proteolyse durch Proproteinconvertasen am carboxyterminalen Ende entsteht das aktive Protein mit einer Molekularmasse im Bereich von 20-38 kDa. Zwei Arten (Typ I und Typ II) transmembraner Serin-Threonin Kinase Rezeptoren sind an der Signaltransduktion beteiligt. Insgesamt drei Arten von Typ I Rezeptoren [IA Activin-Rezeptor (ActR-IA oder Alk2), Typ IA (BMPR-IA oder Alk3) und Typ IB (BMPR-IB oder Alk6)] und drei Arten von Typ II Rezeptoren [Typ II BMP-Rezeptor (BMPR-II), Typ IIA (ActR-IIA) und Typ IIB (ActR-IIB) Activin-Rezeptor] sind bisher als BMP-Rezeptoren bekannt. Nach Bindung von BMPs aktiviert die konstitutive Kinase eines Typ II Rezeptors einen Typ I Rezeptor und initiiert damit die Signalkaskade durch Phosphorylierung der Rezeptor-regulierten *mothers against decapentaplegic* Proteine (z.B. Smad1, 5, und 8). Diese bilden mit *common-partner* Smad (Co-Smad bzw. Smad4) einen Komplex und translozieren in den Zellkern abhängig vom Einfluss weiterer Modulatoren, um die Transkription von BMP-Zielgenen zu aktivieren oder zu hemmen [87]. Ein BMP-Zielgen ist *Slug*, welches ein Zinkfingerprotein in Wirbeltieren kodiert und während der EMT (s. 1.5) aktiviert wird. *Slug* bewirkt eine Hemmung der E-Cadherin-Gen Expression, aus der ein Verlust von Zell-Zell-Kontakten bei gleichzeitiger *Slug*-induzierter Vimentinexpression während EMT resultiert [70].

Ähnlich wie in anderen Signalkaskaden wird das BMP-Signal an verschiedenen Punkten reguliert (s. Abb. 1 Hsu et al., 2003 [57]).

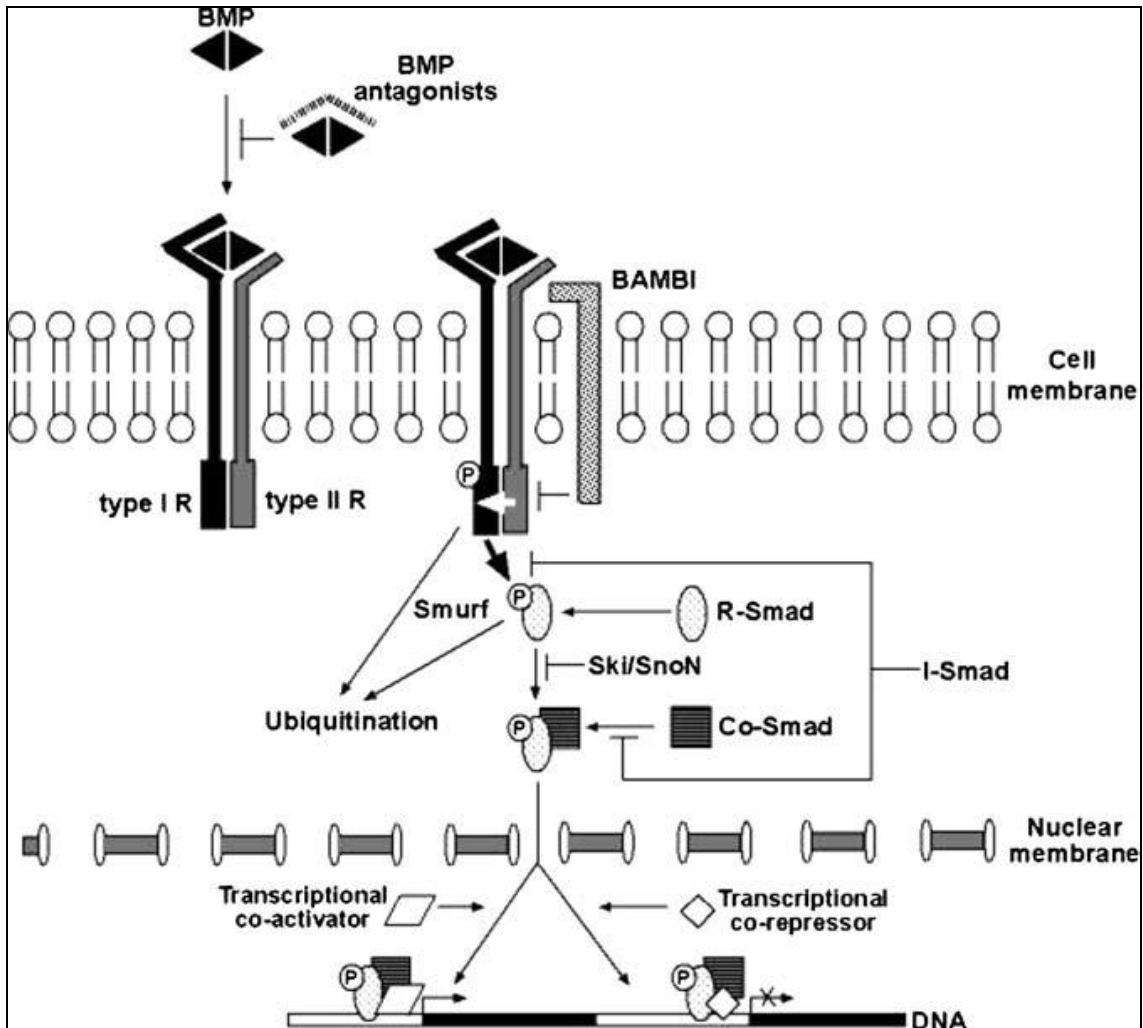


Abb. 1: BMP-Signalkaskade (Hsu et al., 2005 [57]).

Dieses kann auf extrazellulärer Ebene durch direkte Bindung von Antagonisten (z.B. Noggin, Chordin, Follistatin, Gremlin, *differential screening selected genes aberrative in neuroblastoma* (DAN)-/Cerberus-Protein Familie, Glypican-3, Ectodin und Sclerostin) an BMP [6, 18, 75], an der Zellmembran, durch Abschwächung des Signals an BMP-Rezeptoren nach Interaktion mit dem Pseudorezeptor BAMBI (*BMP and Activin membrane-bound inhibitor homolog*), welcher in der Froschgattung *Xenopus* nachgewiesen wurde [91], und zytoplasmatisch durch inhibitorische Smads (I-Smads, z.B., Smad6 und 7) sowie SKI (Sloan-Kettering-Institut-Protein)/SnoN, welche mit RSmads and Co-Smad Komplexen interagieren, geschehen. Zudem erfolgt die zytoplasmatische Regulierung durch Smurfs (Smad ubiquitination regulatory factors), welche den Abbau der aktivierten BMP-Rezeptoren und R-Smads über deren

Ubiquitylierung regulieren [18, 139]. Obwohl es viele Hinweise dafür gibt, dass Smads essential für die BMP-Signalkaskaden sind, scheint es auch alternative, Smad unabhängige BMP-Signalkaskaden zu geben. Ein Beispiel dafür ist der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg, welcher unter anderem p38^{MAPK} involviert [128]. Dabei wird durch die BMP-induzierte Rezeptorkomplexbildung das *x-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) aktiviert, welches wiederum eine sequentielle Aktivierung von TAB1 (TAK1 binding protein) und TAK1 (TGF- β activated kinase 1) einleitet. TAK1 aktiviert p38 and JNK (C-jun-N-terminale Kinase), welche Apoptose induzieren können. Zudem aktiviert TAK1 die *Nemo-like kinase* (NLK), welche eine Hemmung der β -Catenin abhängigen Transkription durch Inhibition der Phosphorylierung der TCF-1 (*transcription factor 1*)/Lef-1 (*lymphoid enhancing binding factor 1*) Transkriptionsfaktoren vermittelt. Es scheint, dass die Bindung von BMPs an bereits bestehende heterodimere Rezeptorkomplexe die Smad-Signalkaskade aktiviert, und die nach einer BMP-Bindung an einen Rezeptor induzierte Rezeptorkomplexbildung den alternativen MAPK-Signalweg einleitet [46, 89].

Fehlende BMP-induzierte Funktionen während der Embryogenese endeten in *knock-out* Tierversuchen oft mit letalen Ergebnissen. Dysregulationen in der BMP-Signalkaskade spielen eine pathophysiologische Rolle bei einer Vielzahl von Krankheiten, unter anderem Übergewicht, Diabetes mellitus, vaskuläre Krankheiten und malignen Tumoren [64].

Einen starken Hinweis für die Rolle von Zusammenhängen zwischen BMP-Signalkaskaden und der Tumorigenese haben genetische Studien über familiäre Tumorerkrankungen erbracht, welche zeigten, dass zum Beispiel Mutationen von Smad4 und BMPRI-IA (Alk3) die Familiäre Juvenile Polyposis, eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung hervorrufen können [25]. Keimzellmutationen im BMPRI-IA (Alk3)-Gen wurden ebenfalls in einer Untergruppe von Familien, welche von dem autosomal-dominant vererbaren Cowden-Syndrom (auch multiples Hamartom-Syndrom genannt), betroffen sind [136]. Zudem wurden fehlerhafte BMP-Signalkaskaden sowie eine Überexpression von BMP-2, BMP-4 und BMP-7 in verschiedenen sporadischen Krebserkrankungen nachgewiesen [57, 114].

In oropharyngealen Karzinomen und hochrisiko oropharyngealen Präkanzerosen wurde eine Überexpression von BMP-2, -4 und -5 beobachtet [61]. Bei Prostatakarzinomen konnte im metastasierten Stadium im Gegensatz zu lokal begrenzten Krankheitsstadien eine BMP-6 Überexpression nachgewiesen werden. Die BMP-6 Expression korrelierte ebenfalls positiv mit einer erhöhten Rezidivrate und geringeren Überlebensrate bei Prostatakarzinomen [26, 121]. Zudem wurde eine hohe BMP-7 Expression in Knochenmetastasen bei Prostatakarzinomen detektiert [83].

In verschiedenen Melanomzelllinien wurde eine Hochregulation der BMP-2, -4 und -7 -Expression im Vergleich zu normalen Melanozyten festgestellt; BMP-4 und -7 werden während der Entstehung von Melanomen als embryonale Morphogene reaktiviert [102]. Des Weiteren wurde in Melanozyten eine positive Korrelation der Expression von BMPs in Abhängigkeit des Malignitätsgrades (Nävus → dysplastischer Nävus → primäres Melanom → Melanometastase) beobachtet. Ebenso konnte in Melanomzellen unterschiedlicher Wachstumsphasen (radial growth phase, vertical growth phase, metastatische Zellen) eine Abhängigkeit der BMP-Expression von der jeweiligen Wachstumsphase nachgewiesen werden. Dabei konnte insbesondere für BMP-7 eine positive Korrelation mit der Tumoraggressivität (Metastasierungspotential *in-vivo*, Invasivität *in-vitro*) gezeigt werden [57, 103]. Die erhöhte Invasivität von Tumorzellen scheint über eine Induktion der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT, s. 1.5) zu erfolgen [47, 135].

Auch in weiteren Prozessen der Karzinogenese spielen BMPs eine Rolle, zum Beispiel bei der Angiogenese und der Regulation von Tumorstammzellen [57]. BMP-2 wirkt durch autokrine Effekte auf A549 Lungenkarzinomzellen proliferationshemmend, migrations- und invasionsstimulierend [72]. Durch parakrine Aktivität aktiviert BMP-2 Smad in endothelialen Zellen und fördert somit die Neovaskularisation über eine Induktion der Id1-Expression [73]. In Prostatakarzinomzellen aktiviert BMP-7 den VEGF-Promotor über autokrine Mechanismen. In Folge dessen fördert VEGF die Angiogenese sowie die osteoblastische Aktivität von Knochenmetastasenzellen des Prostatakarzinoms [24].

Der Effekt von BMPs auf die Angiogenese in malignen Melanomen erfolgt ebenfalls über parakrine Mechanismen. BMP-2 und BMP-4 induzieren dabei sowohl die Tubenformation als auch die Migrationseigenschaften mikrovaskulärer Endothelzellen. Im Mausmodell zeigten Melanome mit vergleichsweise reduzierter BMP-Expression reduzierte Tumorgößen oder Tumore mit ausgedehnten Nekrosearealen, welche mit der verminderten Angiogenese assoziiert sind [104].

Trotz der hier aufgeführten Beispiele für die weitestgehend positive Korrelation von erhöhter BMP-Expression mit verschiedenen Tumorerkrankungen scheinen die BMPs ebenso wie TGF- β entweder als Stimulatoren oder Inhibitoren der Tumorentstehung und -progression zu fungieren. Diese Eigenschaften scheinen in einem komplexen Zusammenspiel von der Dosis, dem Zell- oder Gewebetyp und bei malignen Erkrankungen von dem Krankheitsstadium und dem Mikromilieu der jeweiligen Tumore abhängig zu sein, deren genaue Mechanismen noch nicht ausreichend verstanden sind [1, 4, 29, 52, 57, 64-65, 95, 100].

1.3.2 Noggin

Erstmals beschrieben wurde Noggin 1992 durch Smith und Harland, welche das Protein aus einem Embryo der Froschgattung *Xenopus* isolierten [115]. Noggin ist ein BMP-Antagonist, welcher auf der extrazellulären Ebene wirkt. Es wird als glykosyliertes Protein gebildet und weist nach Homodimerisierung über kovalente Bindungen eine Molekularmasse von 64 Kilodalton (kDa) auf. Die primäre Proteinstruktur Noggins hat ein saures aminotermiales Ende und ein carboxyterminales Ende, welches ein Cystein-Knoten aufweist [40]. Ein zentrales, basisches Heparin-bindendes Segment im Protein führt zur Lokalisation Noggins an der Zelloberfläche durch die Affinität zu Heparansulfat-Proteoglykanen [94].

Noggin bindet mit verschieden starker Affinität an BMP-2, -4, -6 und -7, an *growth differentiation factor* (GDF)-5 und -6 und an *vegetally localized protein-1* (Vg-1); zu anderen TGF- β Peptiden weist es jedoch keine Affinität auf. Dabei ist die Affinität zu BMP-2 und BMP-4 am stärksten, da die beiden BMP-Proteine

eine hohe Aminosäurehomologie aufweisen [137]. Die Inhibition durch Noggin erfolgt durch direkte Bindung an die BMPs, so dass deren Ligand an die jeweiligen Rezeptoren an der Zellmembran verhindert wird [38, 137]. Dies geschieht über eine Konformationsänderung des BMP-Proteins, wodurch es zu einer Maskierung der rezeptorbindenden Epitope des Proteins kommt [44].

Dass die Rolle von Noggin auch für die physiologischen Funktionen von BMP von hoher Bedeutung ist, zeigen Studien, in denen *knockout*-Mausmodelle ohne das Noggin-Gen sowohl schwerwiegende Defekte bei der Neuralrohrformation als auch Malformationen im Achsenskelett aufwiesen [11, 84, 131].

1.4 Nodal, Lefty und SB431542

1.4.1 Nodal

Nodal, ebenfalls ein Zytokin der TGF- β Superfamilie, gehört ebenso wie die BMPs zu den so genannten Morphogenen, welche eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung in embryologischen und adulten Zellen spielen [106-107]. Erstmals als Morphogen beschrieben wurde Nodal bei der Gastrulation im Mausembryo [106]. Die Gastrulation im Mausembryo ähnelt morphogenetisch dem Prozess der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT, s. 1.5) in der Neuralleiste. Unter anderem reguliert Nodal zusammen mit TGF- β und Activin die Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen, was durch Zelldifferenzierung dieser Stammzellen nach Inhibition der Nodal-Signalkaskade durch den spezifischen Rezeptorantagonist SB431542 gezeigt wurde [60, 124]. Des Weiteren ist Nodal an der Mesodermentwicklung, der Entstehung der Links-Rechts-Achse und damit der Positionierung der viszerale Organe beteiligt [107, 116, 122].

Die Expression und Signaltransduktion von Nodal wird sowohl durch transkriptionelle und posttranslationelle Prozesse als auch über extrazelluläre Modifikationen gesteuert (Abb. 2, Strizzi et al. [117]).

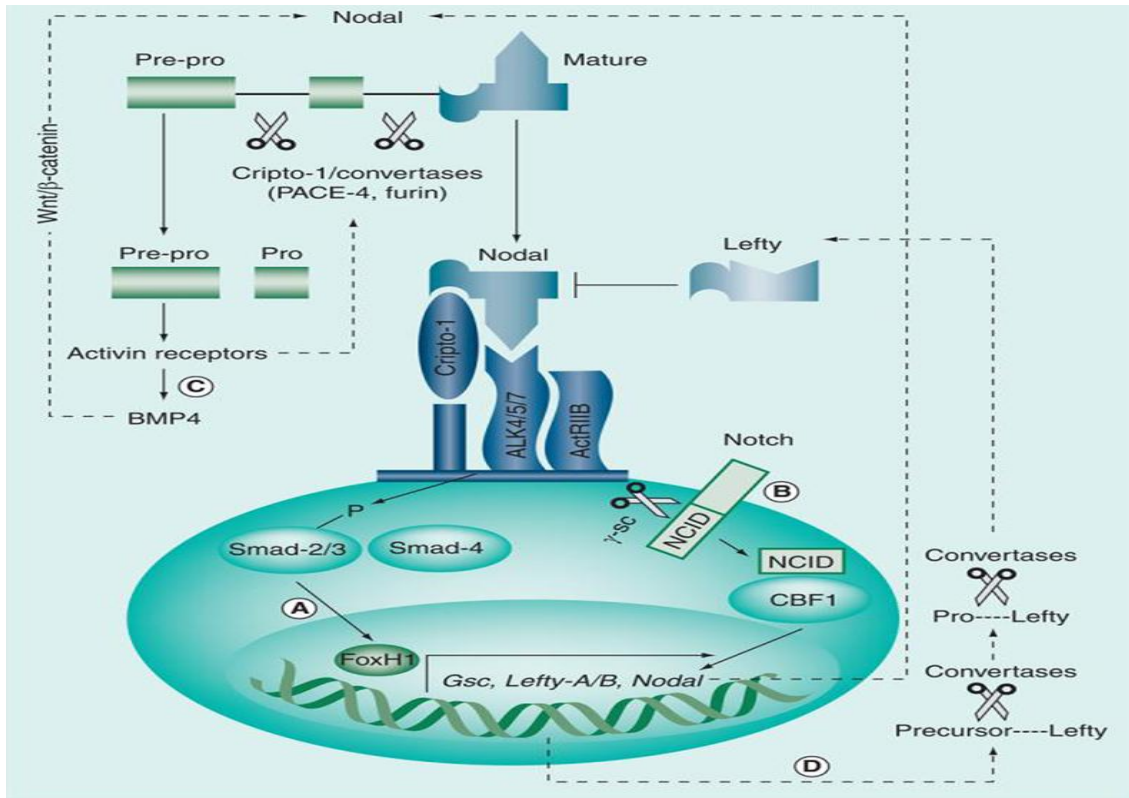


Abb. 2: Nodal-Signalkaskade (Strizzi et al., [117]).

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass die Expression von Nodal über verschiedene Transkriptionsregulatoren, welche schlussendlich die Transkriptionsfaktoren *Forkhead box H1* (FoxH1) [90, 105, 126] und *core binding factor 1* (CBF-1) [67, 97] aktivieren, erfolgt. Sequenzierungsanalysen des humanen Genoms lassen vermuten, dass im Menschen die Nodal-Expression ähnlich funktioniert [117].

Für die Aktivierung der Nodal-Signalkaskade spielen posttranslationelle Prozesse eine wichtige Rolle. Das Nodal-Proprotein wird über proteolytische Prozesse durch die subtilisin-ähnlichen Proproteinkonvertasen wie PACE-4 und Furin aktiviert [7]. Das Nodal-Präprotein greift ebenfalls funktionell in die Nodal-Expression ein, indem es die Activin-Rezeptoren aktiviert, welche neben der Expression PACE-4 und Furin auch die BMP-4 Expression induzieren. BMP-4 wiederum aktiviert indirekt die Nodal-Expression [8]. Die Expression von Nodal löst über einen positiven Feedback-Mechanismus in humanen Embryostammzellen und Melanomzellen eine weitere Verstärkung des Nodal-Signals aus [51, 123].

Die Umwandlung des Proproteins in das reife Nodal-Protein führt zu einer Destabilisierung des Proteins und Reduktion der Signalreichweite, so dass die die Funktion von Nodal auf eine autokrine Wirkung beschränkt wird. Im Gegensatz dazu führt eine Glykosylierung zu einer Stabilisierung des reifen Proteins und damit zur Möglichkeit, eine parakrine Signalstärke zu erreichen [77].

Die Signaltransduktion von Nodal wird über die Bindung an einen heterodimeren Rezeptorkomplex aus Typ I (Alk 3/4) und Typ II (ActRIIb) *activin-like-kinase*-Rezeptoren eingeleitet. Dadurch kommt es über einer Phosphorylierung zu einer Aktivierung von *mothers against decapentaplegic homolog 2* und 3 (SMAD-2) und (SMAD-3) [133]. Diese bilden mit SMAD-4 einen Komplex, welcher im Zellkern mit anderen Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel FoxH1 und Mixer die Genexpression reguliert [107].

Cripto-1 kann möglicherweise die Aktivität von Nodal beeinflussen, indem es als Co-Rezeptor für Nodal fungiert und somit eine verstärkte Umwandlung des unreifen Präproteins in das reife Nodal-Protein induziert [10, 133]. Es gibt jedoch auch Arbeiten, die zeigen, dass Cripto-1 nicht essentiell für die Aktivität von Nodal ist [8, 79].

Die Nodal-Expression in Melanomzellen und embryonalen Stammzellen unterscheidet sich von der Nodal-Expression in normalen Zellen. So wird Nodal in Melanomzellen und embryonalen Stammzellen überexprimiert, während in normalen Zellen, wie zum Beispiel Melanozyten, in Western Blot-Analysen kein Nodal-Protein nachgewiesen werden konnte [96]. Die Arbeit von Topczewska et al. lässt vermuten das Nodal in humanen Melanomzellen eine essentielle Rolle im Tumorwachstum und bei der Zelldifferenzierung hin zu einem „metastatischem Phänotyp“ spielt [123]. Melanomzellen exprimieren zum Beispiel vermehrt *vascular endothelial*-Cadherin (VE-Cadherin) und Keratin, welche typischerweise in Endothel- bzw. Epithelzellen nachweisbar sind [50]. VE-Cadherin spielt eine Rolle in der tumorinduzierten Angiogenese, welche für ein schnelleres Tumorwachstum notwendig ist. Keratin spielt eine Rolle bei der Transformation der Zellen zu einem invasiven Phänotyp und ist daher mit dem Vorgang der Metastasierung assoziiert [48-49]. In metastasierten

Melanomzelllinien konnte im Vergleich zu nicht metastasierten Melanomzelllinien eine stärkere Nodal-Expression nachgewiesen werden. Dieses korreliert mit dem Nachweis der Nodal-Expression in 60% der Melanomsubtypen die primär eine vertikale Wachstumsrichtung aufweisen. In Melanomsubtypen, die primär eine horizontale Wachstumsrichtung aufweisen, existiert hingegen nur vereinzelt eine Nodal-Expression [123]. Da sich viele Daten anhand Mausmodellen gewinnen ließen und noch weitere Arbeiten zur Entschlüsselung der Nodal-Signalkaskade notwendig sind, lässt sich nicht ausschließen, dass Nodal auch, wie schon für TGF- β beschrieben, mit anderen Signalwegen wie zum Beispiel MAPK und PI3K-AKT interagiert [117]. Diese Beobachtungen deuten auf die potentielle Nutzung Nodals als Biomarker bei Melanomkrankungen und als Angriffspunkt für neue therapeutische Ansätze in der Therapie metastasierter Melanome hin.

1.4.2 Lefty

Zu den physiologischen Inhibitoren von Nodal zählt Lefty, ebenfalls ein Mitglied der TGF- β Superfamilie. Lefty kann zur Antagonisierung von Nodal entweder direkt an das Protein binden oder die Nodal-Aktivität über eine Bindung an den Cripto-1 Co-Rezeptor abschwächen, indem es verhindert, dass Cripto-1 mit den Activin-I und -II Rezeptoren einen signalverstärkenden Komplex bildet [21]. Die Inhibierung von Nodal und Cripto-1 kann sowohl in der extrazellulären Matrix als auch an der Zelloberfläche stattfinden. Dadurch kann Lefty die Phosphorylierung Nodal-induzierter Smad2-Phosphorylierung hemmen [118]. Bisher konnte eine Bindung von Lefty an ALK-4 oder ActIIIRB nicht nachgewiesen werden, was gegen eine kompetitive Nodal-Hemmung am heterodimeren Rezeptorkomplex spricht. In embryonalen Zellen existiert ein negativer Feedbackmechanismus über eine Nodal-induzierte Lefty-Expression [112].

Eine Hypothese für die Entstehung metastatischer Melanomzellen suggeriert eine unkontrollierte Wirkung der Nodal-Signalkaskade durch fehlende Lefty-Expression in diesen Zellen [96]. Eine Möglichkeit der fehlenden Lefty-Expression in diesen Melanomzellen könnte über eine erhöhte Methylierung der

Lefty-B CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin)-Insel bestehen [80]. Kürzlich erschienene Arbeiten zeigen eine erhöhte Nodal-Expression bei gleichzeitig fehlender Lefty-Expression in Prostatakarzinomzellen [76], sowie eine erhöhte Apoptoserate und verminderte Proliferationsrate in einer hepatozellulären Karzinomzelllinie (HepG2), welche mit Lefty-A behandelt wurde [19].

1.4.3 SB431542 (4-(5-benzof[1,3]dioxol-5-yl)-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)-Benzamid)

SB431542 ist ein synthetischer ALK-4, -5 und -7 Inhibitor, welcher erstmals 2002 von Callahan et al. Beschrieben wurde [17]. Die inhibitorische Wirkung erfolgt über eine kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle der Kinase, so dass konsekutiv die Smad-2 und -3 Phosphorylierung unterbunden wird. Durch die selektive Hemmung von ALK-4, -5 und -7 unterbindet es generell die TGF- β , Nodal und Activin vermittelten Signalkaskaden ohne die BMP-induzierten Signalkaskaden zu beeinflussen [59, 99].

Anhand der folgenden Beispiele lässt sich die Bedeutung von SB431542 als potentem Inhibitor der durch Nodal vermittelten Prozesse auf die Zelldifferenzierung oder Tumorigenese erahnen. Durch Behandlung von humanen embryonalen Stammzellen mit SB431542 verlieren diese ihre pluripotenten Eigenschaften [60]. Des Weiteren kann SB431542 die Proliferation, Motilität und Angiogenese in humanen Gliomzelllinien hemmen [53, 58]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die *in-vitro* Angiogenese und Invasivität bei Melanomzelllinien durch eine dosisabhängige Behandlung mit SB431542 unterbunden werden konnte [123]. Kürzlich erschienene Daten berichten über den möglichen Einfluss von Nodal, bzw. Nodal-Inhibition durch SB431542, auf die Migration und Proliferation von Prostatakarzinomzelllinien [127].

1.5 Epithelial-Mesenchymale-Transformation (EMT)

Greenburg und Hay beschrieben 1982 die epithelial-mesenchymale-Transformation (EMT) erstmalig als zentralen Prozess in der frühen embryologischen Morphogenese. Die EMT beschreibt die Differenzierung aus

polarisierten epithelialen Zellen hin zu kontraktilen und motilen mesenchymalen Zellen, wodurch Zellmigration und die Entstehung neuer Gewebe ermöglicht wird. Dabei kommt es zu einer essentiellen Änderung des strukturellen Zellphänotypes epithelialer Zellen, die sich dabei durch den Abbau von Desmosomen, *tight-*, *adherent-* und *gap-junctions* aus der gewöhnlichen Gewebestruktur lösen können [43].

Die Neuralleiste ist eine einzigartige Struktur in Wirbeltierembryos, welche aus einer transienten Population migratorischer Zellen besteht aus denen eine Vielzahl verschiedener Zelltypen und Gewebe hervorgehen, wie zum Beispiel das periphere Nervensystem und melanozytäre Zellen. EMT ist mit dem Verlust von Zelladhäsion während des Beginns der Migration von Zellen der Neuralleiste verbunden. Dabei kommt es zu einem Verlust der E-Cadherin Expression, während gleichzeitig eine beginnende Expression von N-Cadherin auf der Zelloberfläche zu beobachten ist [88]. Die Vorläufer der melanozytären Zellen (Melanoblasten) sind zwar per definitionem nicht epithelial, besitzen aber während der Embryogenese viele Eigenschaften von Epithelzellen. Sie sind zum Beispiel in der Lage, kompakte Gewebe ohne interzelluläre Bindegewebestrukturen zu formen, indem sie Zell-Zell-Kontakte über E-Cadherin herstellen. Hierbei kommt es während der Embryogenese ebenfalls zur bereits oben erwähnten Transformation hin zu einem mesenchymalen Phänotyp mit migratorischen Eigenschaften durch den Verlust der E-Cadherin Expression [71].

Die Aktivierung der EMT ist mit der Erlangung von Migration und Invasivität von Tumorzellen während der Tumorgenese assoziiert [5, 47]. Bei der Entstehung von Melanomzellen können vergleichbare phänotypische Veränderungen, welche sich bei der EMT ereignen, zum Beispiel E-Cadherin Verlust, N-Cadherin Expression, Interaktionsverlust mit Keratinozyten, Re-Expression der Intermediärfilamente Vimentin und Nestin, welche letztendlich eine verstärkte Zellmigration ermöglichen, beobachtet werden. E-Cadherin ist in vielen Tumorerkrankungen, welche hohes Metastasierungspotential besitzen, wie dem lobulären Mammakarzinom, dem diffusen Typ des Magenkarzinoms oder dem Melanom, inaktiviert. Die neoplastischen Zellen dieser Tumore haben viele ihrer

epithelialen Charakteristika verloren und weisen histologisch mesenchymale Muster auf. Die verminderte E-Cadherin Expression wurde in soliden Tumoren anhand histologischer Schnitte, welche an der Stromagrenze des Tumors einzelne, invasiv wachsende mesenchymartige Zellen zeigten, nachgewiesen. Hierbei werden E-Cadherin Suppression und EMT als transiente bzw. reversible Prozesse vermutet, welche möglicherweise durch das Tumormikromilieu reguliert werden. So scheinen Tumorzellen, welche die EMT während der invasiven Phase durchlaufen haben, ihre E-Cadherin Expression und epithelialen Eigenschaften danach wiederzuerlangen (mesenchymale-epitheliale-Transformation, MET). Auch die maligne Transformation von Melanozyten geht mit einer verminderten E-Cadherin Expression und erhöhten Expression typisch mesenchymaler Proteine, wie N-Cadherin einher [70-71].

Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass die Reaktivierung embryonaler Prozesse, die der EMT ähneln und auch bei der Migration, Invasivität und damit letztlich der Metastasierung von Tumorzellen beobachtet werden, für die Entstehung von pharmakoresistenten Tumorzellen substantiell zu sein scheinen. So ist zum Beispiel die Gemcitabin-Resistenz in Pankreaskarzinomzellen eine mögliche Folge phänotypischer Veränderungen, welche diese Zellen nach Behandlung mit verschiedenen hohen Gemcitabindosen durchliefen, die der EMT ähneln. Diese Veränderungen spiegelten sich zum Beispiel in einer spindelförmigen Zellstruktur, Pseudopodienbildung und reduzierter Adhäsionseigenschaften wieder. Ebenso zeigten diese eine erhöhte Migrationskapazität und Invasivität [111]. Ein weiteres Beispiel für die Pharmakoresistenz durch EMT wurde anhand von Ovariakarzinomzellen beschrieben. Dabei zeigten Paclitaxel-resistente Zelllinien eine erhöhte Expression von Snail und Twist, beides Transkriptionsfaktoren, welche die EMT regulieren. Zudem waren phänotypische Veränderungen, wie zum Beispiel verminderte E-Cadherin Expression und erhöhte Expression von mesenchymalen „Markern“ wie Vimentin, Fibronectin und *smooth-muscle* Actin, nachweisbar [62]. In Zellen mit hochinvasiven Eigenschaften, welche aus verschiedenen Mammakarzinomzelllinien selektiert wurden, zeigten sich ebenfalls eine Paclitaxel-Resistenz und EMT-typische Veränderungen wie

reduzierte E-Cadherin-Expression und vermehrter Vimentin, Fibronectin und beta-1-Integrin Nachweis, welche auf eine *Twist*-induzierte Transkription zurückzuführen sind [23]. Bei 42 nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien, die eine fehlende Sensibilität auf die *in-vitro* Behandlung mit dem EGFR (*epidermal growth factor receptor*) - Inhibitor Erlotinib aufwies, konnte eine Gensignatur, welche mit den während der EMT exprimierten Genen stark korrelierte, nachgewiesen werden [132]. Des Weiteren wurden Beispiele für die Rolle der EMT für die Chemoresistenz verschiedener Krebszelllinien in Kolon- und Leberkarzinomzelllinien beobachtet [35, 86].

Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass medikamentöse Interaktionen, welche auf die verschiedenen an der EMT beteiligten Moleküle abzielen, möglicherweise neue Therapieoptionen in der Tumorthherapie darstellen könnten.

1.6 Vorarbeiten

Diese Promotion ist Teil einer Arbeit im Rahmen des SFB (Sonderforschungsbereich) 773 „Therapieresistenz solider Tumoren und ihre Überwindung“ (www.dfg.de). Die Idee dieser Arbeit basiert auf Arbeiten unseres Labors, welche in der Vergangenheit zu diesem Thema publiziert wurden und im folgenden Abschnitt zusammengefasst sind.

Nach Transplantation von SKMEL28 Zellen, einer humanen metastatischen Melanomzelllinie, oder B16-F1 Mausmelanomzellen in das Neuralrohr von Hühnerembryonen migrierten diese spontan entlang der medialen und lateralen Neuralleistenwanderwege [92, 109]. Diese Arbeiten erbrachten ein neues *in-vivo* Modell, welches die Beobachtung der Morphogenese von Melanomzellen in dem Mikromilieu der Neuralleiste bzw. der melanozytären Vorläuferzellen erlaubt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das embryologische Milieu eine Auswanderung der Melanomzellen entlang der physiologischen Neuralleistenpfade ermöglicht. Die Bestätigung der Neuralleistenwanderung von Melanomzellen im Hühnerembryomodell wurde anhand der GFP (*green fluorescent protein*) - transfizierten B16 Mausmelanomzelllinie erwiesen [93]. Dabei konnte durch die GFP emittierten Epifluoreszenzsignale eine aktive

Migration der Zellen nachgewiesen werden, welches die Ergebnisse der Beobachtungen der SKMEL28-Zelllinie bestätigte. In dem gleichen *in-vivo* Modell zeigte sich, dass murine neuronale Stammzellen aus der subventrikulären Zone (SVZ) die EMT und anschließende Neuralleistenauswanderung nur nach vorheriger Behandlung mit BMP-2 absolvierten [12]. Diese Arbeit zeigte erstmals die Abhängigkeit der *in-vivo* Morphogenese von SVZ-Stammzellen von einer vorherigen *in-vitro* Behandlung mit BMP-2. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die Neuralleistenwanderung von Melanomzellen ebenfalls von BMP-abhängig ist, da BMPs von Melanomzellen konstitutiv exprimiert werden [102]. Diese Hypothese wurde durch die Vorbehandlung der transplantierten B16-F1 Melanomzellen mit dem BMP-Inhibitor Noggin, die die Fähigkeit zur Neuralleistenwanderung inhibierte, verifiziert [14]. Das der Einfluss von Noggin und BMP-2 auf die Migration von Melanomzellen auch außerhalb der Neuralleiste, welche das physiologische Milieu zur EMT bietet, essentiell ist, zeigte die Transplantation von Melanomzellen, welche entweder unbehandelt oder mit Noggin bzw. BMP-2 vorbehandelt waren, in den Augenbecher von Hühnerembryonen [14]. Die Vorbehandlung mit Noggin unterband das invasive Wachstum der transplantierten B16-F1 Melanomzellen. Die Veränderungen der Melanomzellen während des invasiven Wachstums im Augenbecher ähnelten einer EMT.

1.7 Zielsetzung

Die führende Hypothese dieser Arbeit sagt aus, dass EMT in Melanomzellen für die Entwicklung derer Pharmakoresistenz und des Progresses des malignen Phänotyps mitverantwortlich ist. Daher ist anzunehmen, dass Hemmung der EMT in Melanomzellen deren Phänotyp modifiziert und einen positiven Effekt auf das therapeutische Ansprechen hat.

Diese Arbeit hat das Ziel, den Einfluss der embryonalen Morphogene BMP-2 und Nodal und deren Inhibitoren Noggin, Lefty und SB431542 auf die EMT und somit unter anderem der Invasivität, Motilität und Therapieresistenz von Melanomzellen *in-vitro* und *in-vivo* zu erforschen.

Um die biologischen und molekularen Unterschiede zwischen Melanomzellen herauszuarbeiten, welche die Fähigkeit zur EMT besitzen oder nicht wurden ausführlich beschriebene humane Melanomzelllinien (siehe auch Material und Methodik) und eine murine Melanomzelllinie (B16-F1, siehe auch Material und Methodik) verwendet. Alle verwendeten Zelllinien weisen eine konstitutive BMP- und Nodal-Expression auf. Um den Effekt der Morphogene und deren Inhibitoren auf die EMT *in-vivo* zu testen wurde das Hühnerembryomodell verwendet. Die molekularen Unterschiede zwischen Melanomzellen mit und ohne EMT-Potential wurden mittels Protein- und Genexpression, vor und nach entsprechender Behandlung mit den o.g. Substanzen, ermittelt.

Die Effekte der Morphogene auf die Therapieresistenz von Melanomzellen wurden mit Chemosensitivitätstestungen verschiedener gängiger Zytostatika, welche in der Therapie metastasierter Melanome eingesetzt werden können, überprüft. Des Weiteren wurden zu diesem Zweck der B-RAF-Inhibitor Sorafenib und der mTOR (*mammalian target of rapamycin*) –Inhibitor Sirolimus verwendet, welche in klinischen Studien zur Therapie von Patienten mit metastasiertem Melanom eingesetzt werden.

2 Material und Methodik

2.1 Zellkulturmethoden

2.1.1 Zelllinien

Für die Experimente verwendeten wir die Melanomzelllinien SKMEL19, SKMEL28, 451LU, BLM, WM115, IGR39, MEWO, SBCL2 und B16-F1.

Bis auf B16-F1 handelt es sich dabei bei allen Zelllinien um humane Melanomzelllinien. Die verwendeten SBCL2 Zellen wurde aus einem primären superfiziell spreitenden Melanom, welches sich in der horizontalen Wachstumsphase befand, isoliert. B16-F1 ist eine murine Melanomzelllinie, welche erstmals 1975 von Fidler beschrieben wurde [34]. Sie ist durch ein hohes Metastasierungspotential charakterisiert.

2.1.2 Einfrieren von Zellen

Die längerfristige Aufbewahrung von Zellen erfolgte durch Einfrieren. Dazu wurden bis zu 10^6 Zellen nach Abzentrifugation für 5 min bei $1200 \times g$ (g = Erdschwerebeschleunigung) in 1ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das Einfriermedium bestand aus 90% fetales Kälberserum (FBS, *fetal bovine serum*, Biochrom, Berlin, Deutschland) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Die kurzfristige Lagerung erfolgte bei -80°C in einem Tiefkühlschrank.

2.1.3 Zellkultur

Zunächst wurden eingefrorene Zellen (1 Mio. Zellen in 1ml Einfriermedium) vorsichtig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis keine Eiskristalle mehr sichtbar waren. Danach wurde die Zellsuspension in 10ml Vollmedium (RPMI 1640 Medium + 10% fetales Kälberserum + 1% Penicillin und Streptomycin + 1% L-Glutamin) in einem Falcon-Röhrchen aufgenommen und bei $1200 \times g$ für 5min zentrifugiert. RPMI 1640 wurde 1966 am Roswell Park Memorial Institute (RPMI) entwickelt. Dabei handelt es sich um ein Hydrogencarbonat-

Puffersystem (Quellen: Lindl, Zell- und Gewebekultur, Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage, 2002; Sigma-Aldrich Produktinformation).

Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Diese Prozedur wurde zweimalig wiederholt, um das DMSO aus dem Einfriermedium möglichst vollständig zu entfernen. Das bei der Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde nun in 10ml Vollmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C in einer 95% Sauerstoff und 5% CO₂ Atmosphäre bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Sämtliche Maßnahmen erfolgten bei Benutzung einer Sterilbank, um die Kontaminationsgefahr der Zellen durch mikrobiologische Organismen zu minimieren.

Die Melanomzelllinien wurden in Vollmedium kultiviert. Die Dichte des Zellrasens auf dem Boden der Kulturflasche wurde regelmäßig mikroskopisch (Zeiss IM Mikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) kontrolliert. Nachdem sich eine Zellschicht gebildet hatte, welche den kompletten Boden der Zellkulturflasche bedeckte, wurden die Zellen je nach Bedarf fraktioniert und weiterkultiviert. Dazu wurde zunächst das alte Vollmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimalig mit 10ml steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*) gewaschen, indem nach Hinzugabe des PBS die Zellkulturflasche vorsichtig geschwenkt wurde, und das PBS anschließend vorsichtig abgesaugt wurde. Danach wurden 2ml Trypsinlösung hinzugegeben und die Zellkulturflasche für einige Minuten in den Inkubator gestellt, um die optimale Temperatur (37°C) für die Enzymaktivität des Trypsins zu erreichen. Nach mikroskopischer Kontrolle zur Überprüfung der Lösung des Zellrasens vom Boden der Zellkulturflasche wurden die gelösten Zellen in 10ml Vollmedium aufgenommen, welches die proteolytischen Eigenschaften des Trypsins inhibiert [101]. Anschließend wurde die Zellmenge je nach Bedarf fraktioniert oder eingefroren. Zur Fraktionierung wurden die Zellen nach Hinzugabe des Vollmediums mittels einer Glaspipette vorsichtig mehrmals auf- und abpipettiert. Die gewünschte Zellmenge wurde je nach Bedarf ermittelt und

nach Zugabe von frischem Vollmedium in insgesamt 10ml Medium, wie oben beschrieben, weiterkultiviert.

2.2 Zellzählung

Um die Zellzahl eines bestimmten Volumens einer Zellsuspension zu Ermitteln, erfolgte eine Zellauszählung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Die Kammer wurde vor jedem Gebrauch mit 70% Ethanol gereinigt, um mögliche Fremdkörper zu entfernen. Danach wurde das Deckglas auf die Trägerstäbe geschoben. Wenn daraufhin die so genannten regenbogenartigen „Newtonschen Ringe“ entstehen, ist gewährleistet, dass der Zwischenraum zwischen Deckglas und Trägerstäben korrekt ist. Anschließend wurden ca. 7 μ l der Zellsuspension unter das Deckglas pipettiert, wobei die Suspension durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Kammer gesaugt wird. Nun wurden per Lichtmikroskop die vitalen Zellen innerhalb der vier der großen Quadrate der Neubauer-Kammer ausgezählt. Um die Zellzahl eines Milliliters der Suspension zu erhalten dividiert man die Gesamtzellzahl durch 4. Danach multipliziert man diesen Wert mit 10000.

2.3 Herstellung von Melanomzellaggregaten

Die Herstellung von Zellaggregaten erfolgte, um die Tumoreigenschaften eines *in-vivo* entstandenen Tumors realitätsnäher zu beurteilen, als dies mit einzelnen Tumorzellen möglich ist. Dazu wurden die Melanomzelllinien in *6-well-plates* ausgesät und anschließend für 24h bei 37°C in einer 95% Sauerstoff und 5% CO₂ Atmosphäre bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach erfolgte eine zweimalige Wäsche der Zellen mit 2ml sterilem PBS und anschließender Behandlung mit 0,5ml Trypsin, um die Zellen vom Boden der *6-well-plates* zu lösen. Nach mikroskopischer Kontrolle zur Verifizierung der Zellrasenablösung wurden 2ml Vollmedium in das *6-well-plate* zu der Zellsuspension hinzugefügt um die Trypsin Wirkung zu inhibieren. Anschließend wurde das Volumen bestimmt, welches eine Zellzahl von 10⁶ enthält. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Das entsprechende Volumen wurde in Eppendorfröhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert

und bei 1200 x g für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 1ml Vollmedium aufgenommen. Dabei wurden die Zellen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren voneinander gelöst. Um nun die Einzellzellen zu Aggregaten zu formen, wurde die Suspension in sterile, gaspermeable Biofoliebeutel überführt. Die Herstellung der Biofolienbeutel erfolgte eigenständig mit Hilfe eines haushaltsüblichen Folienschweißgeräts (Modell BSF 165, Fa. Alaska) und Biofolie (Heraeus-Kulzer, Hanau, Deutschland). Dazu wurde die Folie gefaltet, so dass eine Doppelschicht entstand. Anschließend wurde die Folie an drei Seiten verschweißt um ein ca. 1cm x 3 cm großen Folienbeutel zu erhalten, welcher an einer der kurzen Seiten offen war. Nach Überführung der Zellsuspension in den Beutel wurde das jeweilige Morphogen in die Zellsuspension hinzupipettiert (Endkonzentrationen: BMP-2 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) 20 ng/ml, Noggin (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) 100 ng/ml, Nodal (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) 30 ng/ml, Lefty (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) 100 ng/ml, und SB431542 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 30 μ M). Danach wurde die offene Seite ebenfalls verschweißt, so dass ein fast luftleerer, mit einer dichten Zellsuspension gefüllter Beutel entstand. Die Beutel wurden in zylindrische Behälter gesteckt und in der Zellroll-Anlage „Cellroll“ (Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland) bei 2 Umdrehungen/min bei einer Temperatur von bei 37°C in einer 95% Sauerstoff und 5% CO₂ Atmosphäre bei 100% Luftfeuchtigkeit für 24h inkubiert. Der Versuch wurde nach dem Modell, welches 1988 von Drews et al [28] beschrieben wurde, durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Maschine mit einem elektrisch betriebenen Motor und jeweils vier ebenfalls zylindrischen Behältern, in welchen die kleineren zylindrischen Behälter mit den Melanomzellen platziert wurden. Nach 24h wurden die Beutel mit einer Schere an einer Seite eröffnet und die Zellaggregate für die jeweiligen Versuche weiterverwendet.

2.4 Zellzyklusanalyse

Um den Effekt der Morphogene beziehungsweise deren Inhibitoren auf die Proliferation der Melanomzellen zu überprüfen, erfolgte eine Zellzyklusanalyse mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) – Durchflusszytometrie. Zur DNA Markierung der Zellen wurde Propidiumiodid verwendet. Diese Methode wurde 1975 erstmals beschrieben [68]. Dazu wurden die Melanomzelllinien SKMEL28, 451LU und B16-F1, als Aggregate sowie in konventioneller Zellrasenkultur, nach Behandlung mit BMP-2, Noggin, Nodal, oder SB431542 (Konzentrationen s. oben) für 24h bei 37°C in einer 95% Sauerstoff und 5% CO₂ Atmosphäre bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellaggregate wurden nach 24-stündiger Inkubation mittels vorsichtigem auf- und abpipettieren trituriert und anschließend wie die Zellrasenkulturen für die folgende Zellzyklusanalyse weiterbehandelt. Wie unter 2.1.3 (Zellkultur) und 2.2 (Zellzählung) beschrieben, wurden 10⁶ Zellen gewonnen und anschließend in einem Falcon-Röhrchen mit kaltem PBS gewaschen, danach mit 75%-iger Ethanollösung (Eigenherstellung) fixiert und bei 4°C für 1h gekühlt. Danach wurde die Zellsuspension bei 1200 x g für 5min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellsuspension mit kaltem PBS gewaschen. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde der PBS-Überstand erneut vorsichtig abgesaugt. Danach wurde eine Rnase A (Ribonuklease A)-Lösung (100mg/ml PBS) (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) hinzugegeben, und die Zellsuspension wurde für 30min bei 37°C bei Dunkelheit inkubiert. Die RNase baut RNA ab und verhindert damit eine Verfälschung der DNA-Markierung durch Propidiumiodid. Anschließend wurde eine hypotone Propidiumiodid-Lösung (40mg/ml) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) hinzugegeben und die Zellsuspension für 30min bei 4°C gekühlt. Propidiumiodid ist ein Farbstoff, welcher in der Lage ist, Nukleinsäuren zu markieren. Normalerweise kann Propidiumiodid die Zellmembran vitaler Zellen nicht passieren. Durch die Verwendung einer hypotonen Lösung kommt es zu einer Zellschädigung durch osmolaren Schock, sodass das Propidiumiodid auch die DNA zuvor vitaler Zellen markieren kann [68].

Das emittierte Lichtsignal des Propidiumiodids wurde anschließend anhand der Fluoreszenz im FACS-Gerät (LSRII FACS BD, Heidelberg, Deutschland) registriert. Die Zellzyklusanalyse wurde anschließend mittels der FACSDiva Software (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt, die Ergebnisse sind als Durchschnittswerte \pm Standardabweichung dargestellt.

2.5 MUH (4-methylumbelliferyl-heptanoate)-assay

Das Prinzip der Messung von Zellproliferation mittels des MUH-Tests beruht auf der Messung eines fluoreszierenden Spaltproduktes des 4-methylumbelliferyl-heptanoates, welches 1987 erstmals beschrieben wurde [27]. Das MUH wird ausschließlich von vitalen Zellen aufgenommen. Vitale Zellen besitzen zytoplasmatische Esterasen, welche das MUH als Substrat verwenden und metabolisieren. Bei der Spaltung werden Lichtstrahlen mit einer Wellenlänge von 460 nm emittiert, welche von einem Fluorometer detektiert werden können. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz korreliert mit der Anzahl vitaler Zellen [138].

Zunächst wurden 1500 Zellen/*well* in jeweils 3 *wells* für jede Gruppe der jeweiligen Zelllinie (451LU, SKMEL28, B16-F1) in eine 96 well Platte ausgesät und in 150 μ l (1×10^4 Zellen pro μ l) Vollmedium pro *well* für 24h bei 37°C in einer 95% Sauerstoff und 5% CO₂ Atmosphäre bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24h wurde das Medium durch 150 μ l Vollmedium ersetzt, in welchem die Zytostatika und Morphogene gemeinsam in folgenden Endkonzentrationen enthalten waren:

Zytostatikum bzw. Morphogen	Konzentration
Sirolimus/Rapamycin	10 nM
Temozolomid	30 μ M
Cisplatin	6 μ m
BMP-2	20 ng/ml
BMP-7	30 ng/ml

Noggin	100 ng/ml
Nodal	30 ng/ml
Lefty	100 ng/ml
SB431542	30 μ M

Für die Kontrollgruppen wurden die jeweiligen Zellen mit Vollmedium oder Vollmedium + DMSO behandelt. Die einzelnen zu messenden Gruppen wurden jeweils in Triplets pipettiert und dreifach angesetzt, um die unterschiedlichen Wirkungen nach 24h, 48h und 72h miteinander zu vergleichen. Die Versuchsreihen wurden insgesamt dreimal wiederholt.

Vor der Messung wurden die jeweiligen Zellen zweimal mit PBS, welches weder Ca^{2+} noch Mg^{2+} enthielt, gewaschen. Dazu wurde das Medium aus jedem well vorsichtig abgesaugt und anschließend zweimal mit 200 μ l PBS aufgefüllt und erneut abgesaugt. Danach wurden jeweils 100 μ l der MUH-Lösung (100mg 4-methylumbelliferyl Heptanoat/1 ml PBS) in die wells pipettiert und für 1h bei 37°C in einer 95% Sauerstoff und 5% CO_2 Atmosphäre bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Messung erfolgte nach der Inkubation bei einem Exzitationsfilter von 460nm und einem Emmisionsfilter von 355nm mit dem Fluoroskan II Gerät (Labsystems, Helsinki, Finnland). Die Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt, die Ergebnisse sind als Durchschnittswerte \pm Standardabweichung dargestellt.

2.6 Koloniebildung im Softagar

Wie unter 2.1.3 (Zellkultur) und 2.2 (Zellzählung) beschrieben, wurden 5000 Melanomzellen (SKMEL28) gewonnen und jeweils in die wells einer 12-well Platte zusammen mit 0,5ml 0,5%igem Noble Agar (Difco, Heidelberg, Deutschland) und Vollmedium pipettiert. Nach der Gelierung des Agars wurde pro well jeweils 1ml Vollmedium mit den verschiedenen Agonisten und Antagonisten in den oben beschriebenen Konzentrationen hinzugegeben. Als Kontrolle wurde unverändertes Vollmedium verwendet. Danach wurden die Zellen bei 37°C in einer 95% Sauerstoff und 5% CO_2 Atmosphäre bei 100%

Luftfeuchtigkeit für 14 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Koloniebildungen in jedem *well* gezählt und photographiert. Die Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt, die Ergebnisse sind als Durchschnittswerte \pm Standardabweichung dargestellt.

2.7 Primäraggregatmessung

Um den Effekt der Morphogene auf die Zellaggregation festzustellen, erfolgte eine Größenausmessung der Primäraggregate. Die Gewinnung der Zellaggregate wurde wie unter 2.3 beschrieben, durchgeführt. Nach Eröffnung des Plastikbeutels wurden die Aggregate zur besseren Verteilung in 6-well-plates mit Vollmedium ausgesät. Um die Aggregate zu fotografieren, wurde ein Lichtmikroskop (Zeiss IM Mikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einem Anschluss für eine Digitalkamera verwendet. In 10-facher Vergrößerung wurden die Aggregate (pro Versuchsreihe ca. $n=800-1200$), in meanderförmigen Linien vom oberen Teil der Petrischale nach unten abfotografiert, um eine doppelte Erfassung zu vermeiden. Die Messung der Aggregatgrößen erfolgte elektronisch mit dem Softwareprogramm Axiovision V4.7.2 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Dazu wurde nach Festlegung eines Maßstabs von $100\mu\text{m}$ manuell eine Linie per Computermouse um die Aggregatsbegrenzung gezogen. Das Programm errechnete die Fläche in μm^2 automatisch.

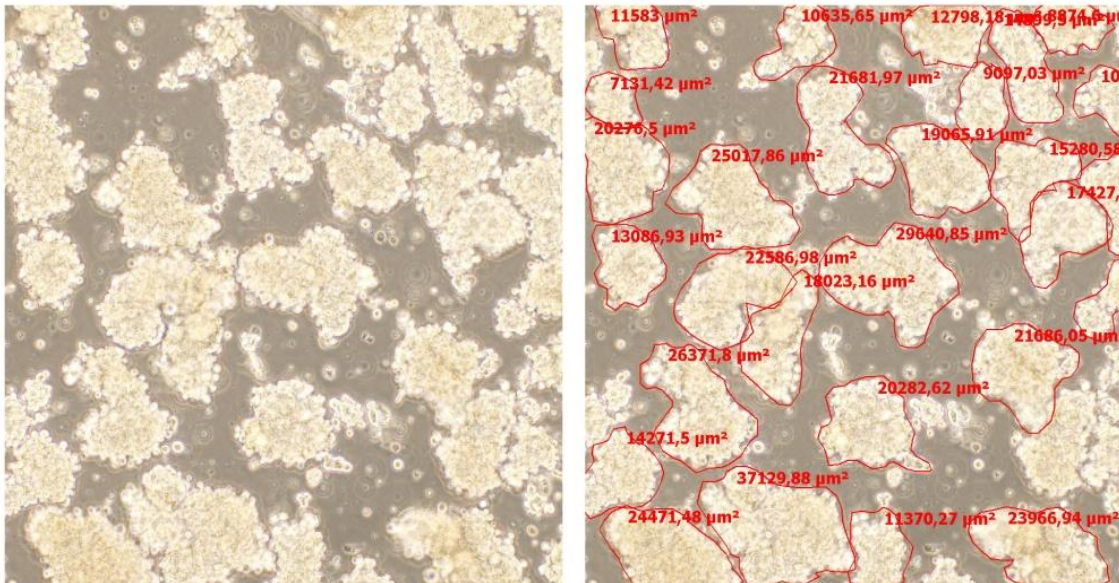


Abb. 3: Aggregatmessung(10x-Vergrößerung).

Beispiel für eine Melanomzellaggregatmessung. Links Primäraggregate, rechts nach manueller Ausmessung der Aggregate mit dem Softwareprogramm Axiovision.

Die Ergebnisse wurden statistisch mittels T-Test ausgewertet. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch relevant gewertet. Die Versuchsreihen wurden insgesamt dreimal durchgeführt.

2.8 Randschleier/Aggregat-Ratio

Um die Zellmigration der Melanomzellen unter dem Einfluss der Morphogene zu determinieren, erfolgte die Erstellung einer Randschleier/Aggregat-Ratio Messung. Die Aggregate wurden wie unter 2.3 beschrieben, hergestellt. Nach Verteilung der Zellaggregate wurden nun einzelne Aggregate, welche vom Durchmesser ähnlich groß waren, unter lichtmikroskopischer Sichtkontrolle in eine kleine (10µl) Pippettenspitze aufgezogen und in ein neues 6-well-plate, welches mit Vollmedium gefüllt war, überführt. Dabei wurde auf gleichmäßige Verteilung und Abstände zwischen den einzelnen Aggregaten geachtet. Nach Überführung aller Aggregate (n=100-200 Aggregate/Gruppe) wurde die Petrischale vorsichtig in den Inkubator gestellt um ein Konfluieren der Aggregate durch Schwanken der Petrischale bzw. des Mediums zu verhindern. Es erfolgte keine weitere Behandlung der während der ursprünglichen

Aggregationsphase vorbehandelten Aggregate mit den Morphogenen. Anschließend erfolgte eine 16-stündige Inkubation bei 37°C in einer 95% Sauerstoff und 5% CO₂ Atmosphäre bei 100% Luftfeuchtigkeit, damit die Zellaggregate auf den Boden der Petripermschale absinken und anwachsen konnten. Per Lichtmikroskop war nach 16h eine „spiegeleiförmige“ Formation zu sehen, welche aus dem ursprünglichen Restaggregat im Zentrum und aus den in die Peripherie ausgewanderten Zellen bestand. Die Größenausmessung mittels der Axiovision-Software erfolgte wie unter 2.7 beschrieben, mit dem Unterschied, dass nun auch die „Randschleier“ Umfänge ausgemessen wurden. Somit war nach Division der Gesamtfläche des Randschleiers durch die Gesamtfläche des Primäraggregats eine Ratio zu Erfassung der Zellmigration („Zellmigrations-Index“) erfassbar.

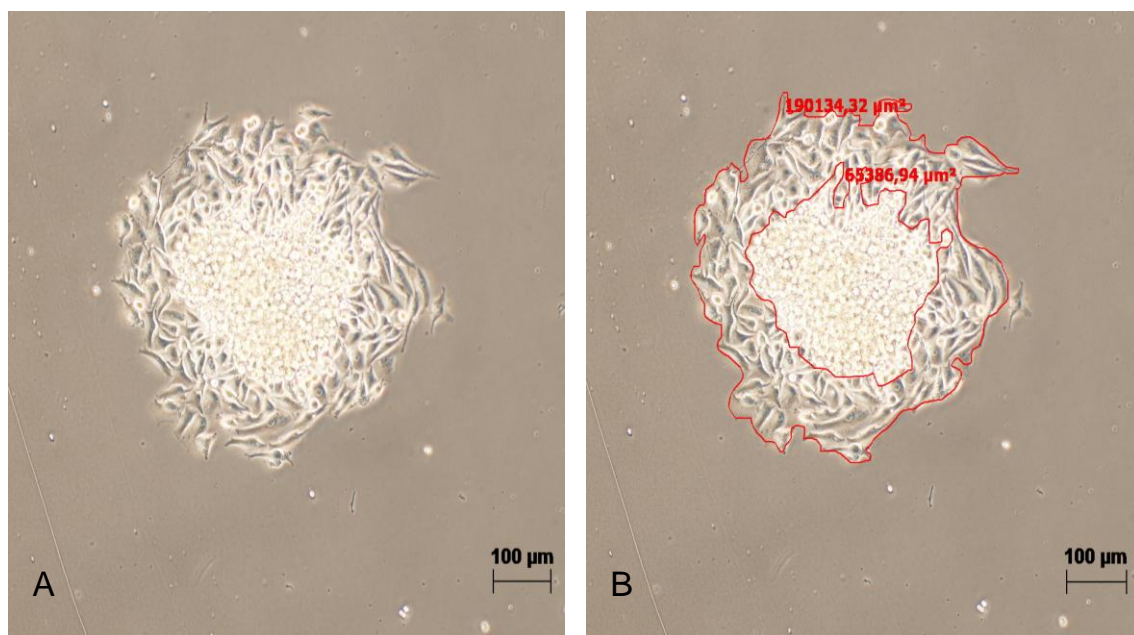


Abb. 4: Beispielmessung Randschleier/Aggregat-Ratio (10x- Vergrößerung).

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung der studentischen T-Verteilung. Die Versuchsreihen wurden insgesamt dreimal durchgeführt.

2.9 Humanes epidermales Hautrekonstrukt

Eine weitere Methode, um die *in-vitro* Invasivität von Melanomzellaggregaten, welche mit Morphogenen vorbehandelt wurden, zu testen, stellt das Modell eines Rekonstruktes der menschlichen Hautschichten dar, welches 2000 von Maier et al. beschrieben wurde [85]. Dazu wurde eine gepufferte, zellfreie Kollagenlösung aus Rattenschwanzkollagen Typ I (Collaborative Biomedical, Bedford, Massachusetts, USA) mit einer Endkonzentration von 1,35mg/ml in DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*) plus 10% FBS hergestellt. Von dieser Lösung wurde jeweils 1ml in Transwell[®] Gewebekultureinlagen (Costar, Cambridge, Massachusetts, USA), welche in 6-well Platten platziert wurden, pipettiert. Nachdem sich diese Kollagenschicht verfestigt hatte, wurde eine weitere Kollagenlösung hergestellt, welche identisch zu der o.g. Lösung war, außer dass diese Lösung humane Fibroblasten in einer Anzahl von $1,125 \times 10^5$ /ml enthielt.

Die humanen Fibroblasten wurden wie von Schittek et. al 2007 [108] beschrieben, gewonnen. Dazu wurden die Fibroblasten, nach schriftlicher Aufklärung der Patienten oder deren Eltern bei minderjährigen Patienten, nach Routinezirkumzisionen aus dem Präputium isoliert. Die Hautproben wurden bei 4°C in, Ca^{2+} und Mg^{2+} freiem HBSS (*Hank's balanced salt solution*) plus Penicillin, Gentamycin und Amphotericin gelagert. Nach Entfernung des subkutanen Fettgewebes wurden die verbliebenen Hautbestandteile in kleinstmögliche Stücke geschnitten und anschließend in einer Lösung mit 0,25%igem Trypsin für ca. 19 Stunden bei 4°C zersetzt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von serumhaltigem Vollmedium gestoppt und die Fibroblasten isoliert. Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgte in DMEM plus 10% FBS. Von dieser fibroblastenhaltigen Kollagenlösung wurden 3ml auf die bereits verfestigte zellfreie Kollagenlösung pipettiert. Nach fünftägiger Inkubation bei 37°C war durch die Kontraktion der Fibroblasten eine zentrale konkave Mulde in der zweiten Kollagenschicht entstanden.

Um eine epidermale Hautschicht zu herzustellen wurden die fertigen dermalen Rekonstrukte gewaschen und anschließend in 2ml eines modifizierten epidermalen Wachstumsmediums, welches 1995 von Chen et al. [22]

beschrieben wurde, inkubiert. Die Modifikationen bestanden in der Hinzugabe von 2%-igem, dialysiertem fetalem Kälberserum und den Verzicht auf Verwendung von Linolsäure bei der Herstellung des Mediums (Meier et al. 2000). Nach einstündiger Inkubation wurde das modifizierte epidermale Wachstumsmedium abgesaugt damit die Oberfläche des Hautrekonstruktes anschließend trocknen konnte. Anschließend wurde ein Zellgemisch aus BLM Melanomzellaggregaten (unbehandelt, BMP-2, Noggin, Nodal, Lefty, SB431542) bzw. SBCL2 Melanomzellen (unbehandelt, BMP-2 und Nodal) und Keratinozyten im Verhältnis von 1:5 (Melanomzellen 1 Teil, Keratinozyten 5 Teile) bei einer Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ Keratinozyten in einem Endvolumen von 50 μ l auf die zentralen Konkavitäten der Hautrekonstrukte pipettiert und für 2h bei 37°C in einer 95% Sauerstoff und 5% CO₂ Atmosphäre bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert, damit die Zellaggregate anwachsen konnten. Als Kontrolle wurden unbehandelte BLM-Melanomzellaggregate bzw. SBCL2-Zellen verwendet. Die Keratinozyten wurden ebenfalls nach Routinezirkumzisionen aus dem Präputium isoliert und, wie von Valyi-Nagy et al. 1993 beschrieben [125], kultiviert. Nach 2h wurden 3ml modifiziertes epidermales Wachstumsmedium in die *wells* der 6-*well* Platten in denen sich die Transwell® Gewebekultureinlagen befanden pipettiert. 2ml modifiziertes epidermales Wachstumsmedium wurde direkt auf die Gewebekultureinlagen pipettiert. Danach wurde das Zellgemisch auf den Hautrekonstrukten für 4-6 Tage inkubiert, so dass eine Zellproliferation ermöglicht wurde. Dabei wurde das Medium alle 48h durch frisches Medium ersetzt. Nach der Inkubationszeit wurde überschüssiges Medium in den Gewebekultureinlagen entfernt, so dass die Hautrekonstrukte mit den proliferierten Zellen in der zentralen Konkavität nicht mehr von Medium bedeckt waren. Das Medium in den wells wurde nun ebenfalls entfernt und durch ein „Erhaltungsmedium“ [22] ersetzt, welches wie das epidermale Wachstumsmedium durch oben genannte Änderungen modifiziert wurde. Dadurch entstand am unteren Ende der Gewebekultureinlagen eine Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht. Nach 16 Tagen Inkubation bei 37°C in einer 95% Sauerstoff und 5% CO₂ Atmosphäre bei 100% Luftfeuchtigkeit wurden die Rekonstrukte 8h in 4%igem Paraformaldehyd fixiert,

entwässert und in Parafin eingebettet. Danach wurden für die histologische Untersuchung 3µm Schnitte aus den Parafinblöcken angefertigt und mit Hämatoxilin/Eosin angefärbt.

Danach wurden 3ml Vollmedium in jedes well der 6-well Platte und 2ml in die Gewebekultureinlagen pipettiert um die Zellen mit ausreichend Medium für die Zellproliferation zu versorgen.

2.10 in-vivo Experiment am Hühnerembryomodell

Die *in-vivo* Versuche wurden anhand des Hühnerembryomodells durchgeführt, welches von Busch et al. [13, 15] beschrieben wurde beschrieben wurde. Befruchtete Haushühnerier (*Gallus gallus domesticus*) der Firma Anton Weiß Vermehrungszucht GmbH (Kilchberg/Iller, Deutschland) wurden bei 38°C in der Brutmaschine BRUJA Typ 400a (Brutmaschinen Janeschitz, Hammelburg, Deutschland) inkubiert. Für die Injektion der Melanomzellen wurden die Eier 48h inkubiert, so dass die Hühnerembryonen sich im Stadium 13 nach Hamburger und Hamilton (HH) [45] befanden. Nach gründlicher Säuberung mit 70% Ethanol wurde mit einem Eierstecher die Schale seitlich eröffnet und ca. 2ml Eiklar mit einer Spritzenkanüle entfernt, um den Hühnerembryo bei der folgenden „Fensterung“ nicht zu beschädigen. Das entstandene Loch in der Eierschale wurde mittels Isolierband (Super 88, 3 M, St. Paul, Minneapolis, USA) verschlossen. Mit einer Metallsäge (Stanley Black&Decker, New Britain, Connecticut, USA) wurde ein ca. 1,5cm breites und 2cm hohes „Fenster“ zwischen dem oberen und unteren Pol des Eies gesägt. Während des „Fensters“ lagen die Eier in Paraffinhaltern aus eigener Herstellung. Die abgesägte Eierschale wurde anschließend mittels Pinzetten (Moria, Antony, Frankreich) entfernt. Um die Sichtbarkeit der Embryonen zu verbessern, wurde die Keimscheibe vor der Transplantation unter mikroskopischer Sicht mit schwarzer Tinte (Black Ink A, Pelikan, Hannover, Deutschland) unterspritzt. Die Vitellinmembran des Eies wurde vor der Injektion mit Hilfe eines sterilen Wolframdrahtes (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, Florida, USA) unter stereomikroskopischer Kontrolle (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in fünf- bis achtfacher Vergrößerung über der Schwanzknospe eröffnet. Die zur

Injektion verwendeten Mikrogaskapillaren (Kwik-Fil™, 1mm Außendurchmesser, Borosilikatglas, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, Florida, USA) wurden durch Verwendung eines Kapillarherstellers (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland) hergestellt, indem die Glaskapillaren an beiden Enden unter Zug eingespannt wurden. Danach wurden die Glaskapillaren in der Mitte erhitzt, so dass das Glas anfang zu schmelzen. Durch den Zug entstanden so zwei spitz zulaufende Mikrogaskapillaren. Die Melanomzellaggregate wurden wie unter 2.3 beschrieben hergestellt. Um einer eventuellen Aus- oder Antrocknung des Embryos während des Transplantationsvorgangs vorzubeugen, wurde die Keimscheibe bzw. der Embryo sowohl vor, als auch nach erfolgter Transplantation mit sterilem PBS benetzt. Für den Fall, dass der Embryo durch das Abziehen des Eiklars zu weit ins Ei abgesunken war, wurde dieses mit sterilem PBS aufgefüllt, um den Embryo anzuheben und somit eine gute Positionierung für die Transplantation zu erreichen. Unter stereomikroskopischer Kontrolle wurden mit den Inhibitoren (Lefty, SB431542) vorbehandelte SKMEL28 Melanomzellaggregate mit Hilfe einer Mundpipette (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, Florida, USA) in die Mikrogaskapillaren aufgenommen. Als Kontrolle wurden unbehandelte SKMEL28 Aggregate verwendet. Anschließend wurden die Aggregate unter stereomikroskopischer Kontrolle und koaxialer Kaltlichtbeleuchtung (Schott, Mainz, Deutschland) zur besseren Tiefendiskrimination mit der Mundpipette vorsichtig auf Höhe der 13.-19. Somitenpaare der Embryonen (was bei Hühnchen in etwa der Höhe der oberen Extremitätenknospe entspricht) ins Lumen des Neuralrohrs injiziert. Nach der Transplantation wurden die „Fenster“ der Eier mit Isolierband verschlossen und für weitere 24 - 48h in der Brutmaschine bebrütet.

Nach der Bebrütung wurden die Embryonen mit Pinzette und gebogener Schere (Moria, Antony, Frankreich) aus den Eiern entfernt. Danach wurden die Embryos für 24h in frisch angesetzter, gepufferter 4% Paraformaldehydlösung fixiert und in Gewebekassetten (Rotilabo® Macro, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelegt. Nach mehrfachem Waschen wurden die Embryonen mit

Ethanol dehydriert, mit Xylol behandelt und mit Paraplast[®] (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) durch einen Automaten des histologischen Labors der dermatologischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen eingebettet. Mittels Mikrotom wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt und auf poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern platziert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Zusätzlich wurden repräsentative Objektträger mit dem Melanom-spezifischen anti-HMB-45 Antikörper (1:20, Dako, Hamburg, Deutschland) zur Identifizierung der Melanomzellen im Hühnchengewebe immunhistochemisch in Färbautomaten des Routinelabors der Dermato-Onkologie in Tübingen gefärbt.

2.11 Statistik

Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels zweiseitigen unpaarigen T-Tests. Die Hühnerembryoexperimente wurden mit dem *Fisher`s Exact Test*, welcher für den Vergleich von kleinen Experimentgruppen geeignet ist, ausgewertet.

3 Ergebnisse

Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse sind in drei Abschnitte unterteilt. In allen Experimenten wurde der Einfluss embryonaler Morphogene und ihrer Antagonisten auf unterschiedliche Eigenschaften von Melanomzellen untersucht. Zuerst werden die Ergebnisse zur Proliferation und Chemosensitivierung gezeigt; im zweiten Abschnitt werden Adhäsions- und Migrationseigenschaften von Melanomzellen *in-vitro* und im Hautrekonstrukt behandelt, während im dritten Abschnitt die Ergebnisse des *in-vivo* Versuches im Hühnerembryo dargestellt werden.

3.1 Proliferation / Chemosensitivierung

3.1.1 Zellzyklusanalyse per Durchflusszytometrie

Die mögliche Beeinflussung der embryonalen Morphogene auf den Zellzyklus von Melanomzellen wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Hierfür wurden unterschiedliche Melanomzellen (B16-F1, 451LU, SKMEL28) für 24h mit den verschiedenen Agonisten (BMP-2, Nodal) oder Antagonisten (Noggin, Lefty, SB431542) vorbehandelt. Nach 24h wurden die Zellen nach Propidiumiodid-Färbung für die Zellzyklusanalyse mittels FACS untersucht. Die FACS-Ergebnisse zeigen, dass die Behandlungen mit den verschiedenen Agonisten oder Antagonisten keinen Einfluss auf die Zellzyklusstadien der untersuchten Melanomzelllinien hatten (Abb. 5).

Zusammenfassung: Die Morphogene (Agonisten und Antagonisten) haben keinen Einfluss auf den Zellzyklus von Melanomzellen.

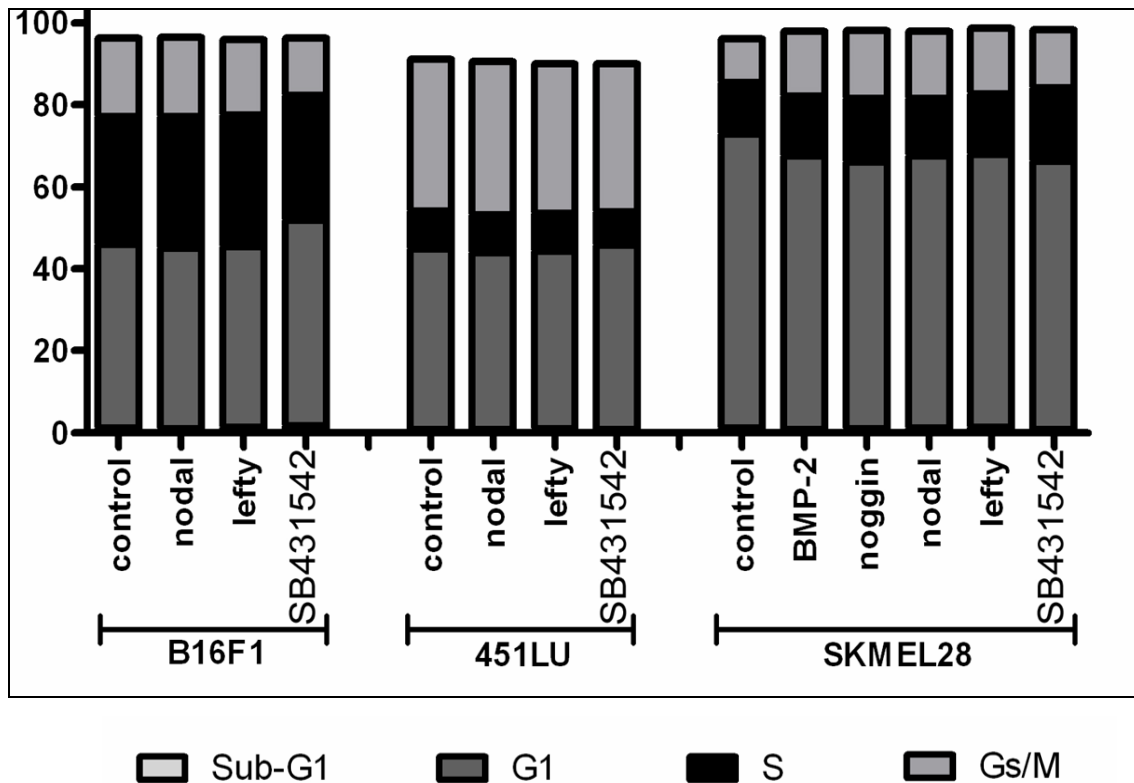


Abb. 5: Zellyklusanalyse nach Morphogenbehandlung.

Zellzyklus in Prozent.

Sub-G1: präapoptotische Phase

G1: gap 1, postmitotische Phase, Präsynthesephase

S: Synthesephase

Gs/M: gap 2, prämitotische Phase, Postsynthesephase

3.1.2 Zellproliferations- und Chemosensitivitätsmessung

Ein großes Problem in der Tumorthherapie stellt die klinisch häufig zu beobachtende Resistenzentwicklung von Melanomzellen auf Chemotherapeutika oder beispielsweise Vemurafenib dar [3, 30]. Daher fragten wir als nächstes, ob die Behandlung mit den Agonisten oder Antagonisten einen Einfluss auf die Zytotoxizität verschiedener Therapeutika hat, die klinisch in der Melanomtherapie angewendet werden. Zur Messung der Zellproliferation und Chemosensitivität führten wir daher eine MUH-Untersuchung nach Behandlung mit den Morphogenen in Kombination mit Behandlung verschiedener Zytostatika oder dem Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib durch. Nach 24-stündiger Vorbehandlung mit dem jeweiligen Morphogen wurden unterschiedliche Melanomzellen (B16-F1, SKMEL28) mit den Chemotherapeutika behandelt, und nach weiteren 24h, 48h und 72h wurde die Vitalität der behandelten Zellen im MUH-assay bestimmt. Dabei zeigte sich in diesem Versuchsaufbau mit einer maximalen Behandlungszeit der Chemotherapeutika von 72h nach Vorbehandlung mit den Morphogenen hinsichtlich der Chemosensitivität kein Unterschied (Abb. 6).

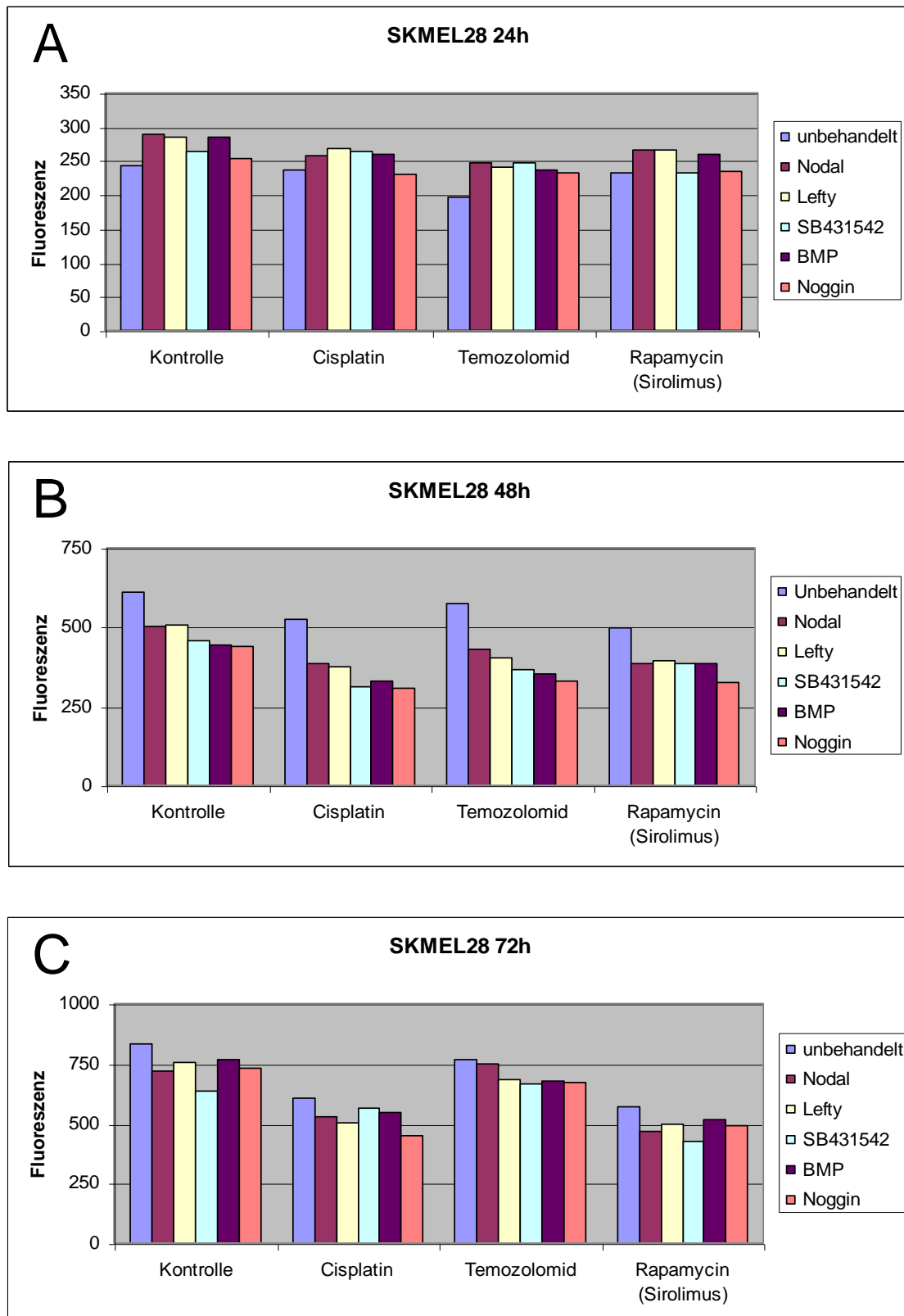


Abb. 6: Chemosensitivitäts-assay von SKMEL28 Melanomzellen.

A-C: MUH-Vitalitäts-assay von SKMEL28 Melanomzellen 24h, 48h und 72h nach Vorbehandlung mit den embryonalen Morphogenen und Chemotherapeutika.

Um die Abhängigkeit der Melanomzellvitalität von der Konzentration der eingesetzten Zytostatika zu überprüfen, und um zu sehen, ob die Vorbehandlung mit den Morphogenen eventuell bei höheren Konzentrationen einer Chemotherapeutikabehandlung eine Beeinflussung der Zellvitalität mit sich bringt, führten wir an vorbehandelten B16-F1 und SKMEL28 Melanomzellen eine Versuchsreihe mit ansteigenden Konzentrationen (1µM, 50µM, 100µM) von Cisplatin durch. Es zeigte sich für die Behandlung der nicht mit Morphogenen vorbehandelten Melanomzellen („unbehandelt“) mit Cisplatin eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellvitalität (Abb. 7). Auch in diesem Versuchsansatz führte die Vorbehandlung mit den Agonisten oder Antagonisten nicht zu einer Beeinflussung der Zellvitalität im Sinne einer Chemosensitivierung.

Zusammenfassung: Die Vorbehandlung von Melanomzellen mit den Morphogenen hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität nach Zytostatika-Behandlung und wirkt nicht chemosensitivierend.

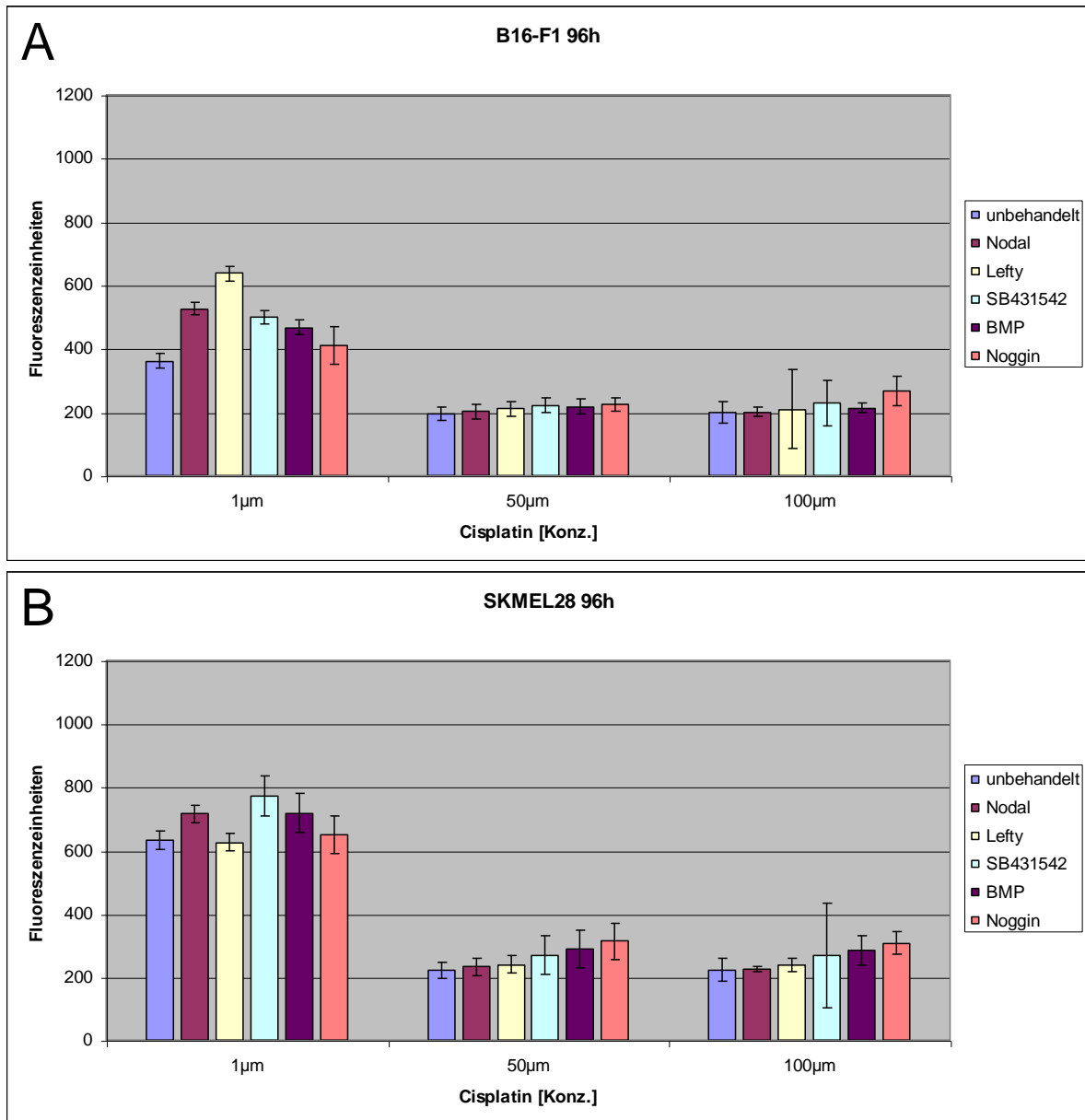


Abb. 7: Chemosensitivitäts-assay von SKMEL28 und B16-F1 Melanomzellen anhand ansteigenden Cisplatin-Konzentrationen.

MUH-Vitalitäts-assay von SKMEL28 (A) und B16-F1 (B) Melanomzellen 96h nach Vorbehandlung mit den embryonalen Morphogenen und ansteigenden Cisplatin-Konzentrationen. Die Melanomzellen zeigen einen konzentrationsabhängigen Abfall der Vitalität. Die Vorbehandlung mit den Morphogenen hat keinen weiteren Einfluss auf die Zellvitalität.

3.1.3 Koloniebildung im Softagar

Um den Einfluss der Morphogene auf die Tumorigenität von Melanomzellen zu überprüfen wählten wir die Koloniebildung im Softagar als Versuchsmodell. Dabei wurde die Fähigkeit zur Proliferation einzelner Melanomzellklone, ohne den Einfluss parakriner Stimulation durch andere Melanomzellen, gemessen. Nach 24h Vorbehandlung mit den Morphogenen wurden SKMEL28 Zellen in einer Softagarlösung ausgesät. Die Wirkung der Morphogene auf Zellkoloniebildungen im Softagar zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (Abb. 8).

Zusammenfassung: Die Vorbehandlung mit den Morphogenen hat keinen Einfluss auf die Koloniebildung.

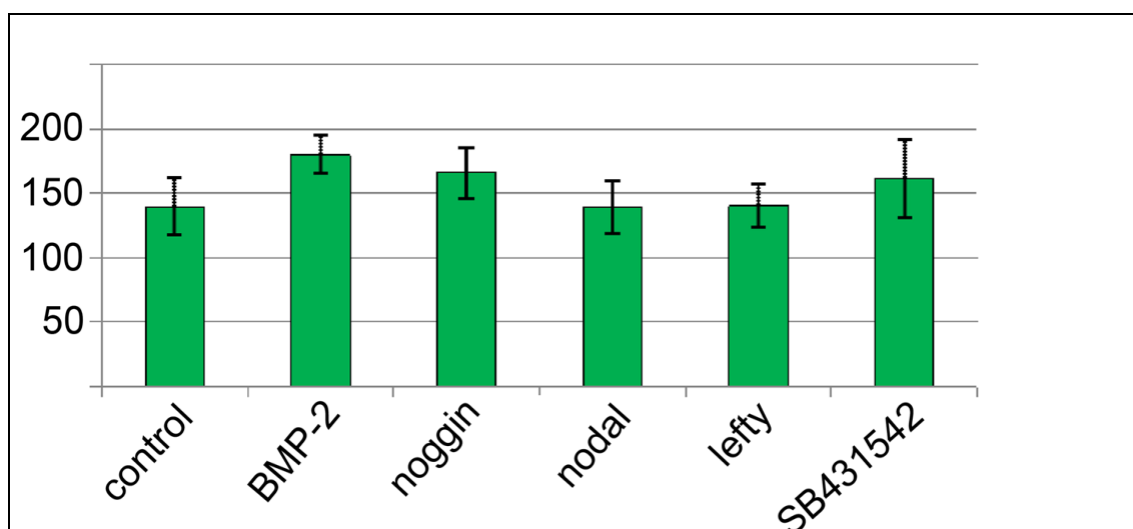


Abb. 8: Koloniebildung von SKMEL28 Melanomzellen im Softagar.

14 Tage nach Aussaat von vorbehandelten SKMEL28 Zellen in Softagar wurde die Anzahl der entstandenen Zellkolonien bestimmt.

3.2 Aggregation / Migration

3.2.1 Zellaggregation

Die von uns angewandte Aggregation der Zellen erfolgte unter der Annahme, dass diese Methode im Vergleich zu Versuchen mit Einzelzellen zelluläre Interaktionen und autokrine Stimulationen ermöglicht, welche den *in-vivo* Tumoreigenschaften ähnlicher sind. Um zu testen ob die Unterschiede in der Zelladhäsion und –migration mit denen übereinstimmen, welche im Hühnerembryomodell beobachtet wurden (s. 3.3) führten wir *in-vitro* Versuche durch. Hierfür wurden unterschiedliche Melanomzellen (SKMEL19, SKMEL28, BLM, WM115, IGR39, B16-F1) in einer dichten Zellsuspension (1×10^6 Zellen pro ml Medium) in einer Tüte aus gasdurchlässiger Biofolie im Zellinkubator in doppelter Rotation 24h lang inkubiert [28]. Während der Aggregationszeit wurden die jeweiligen Morphogene behandelt. Zur Messung der Zelladhäsionsfähigkeit wurde nach 24h Aggregationszeit die Größe der Aggregate ausgemessen (s. 2.7). Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Die Behandlung mit den Agonisten BMP-2 oder Nodal führte zu einer Abnahme der Aggregatgröße im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. In den Antagonisten-vorbehandelten Melanomzellen zeigte sich ein anderes Bild: die Vorbehandlung mit Noggin, Lefty oder SB431542 führte zu einer Zunahme der Aggregatgrößen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 9).

Zusammenfassung: Die Vorbehandlung von Melanomzellen mit den Agonisten BMP-2 und Nodal inhibiert die Aggregationsfähigkeit, während die Antagonisten Noggin, Lefty und SB431542 die Aggregationsfähigkeit erhöhen.

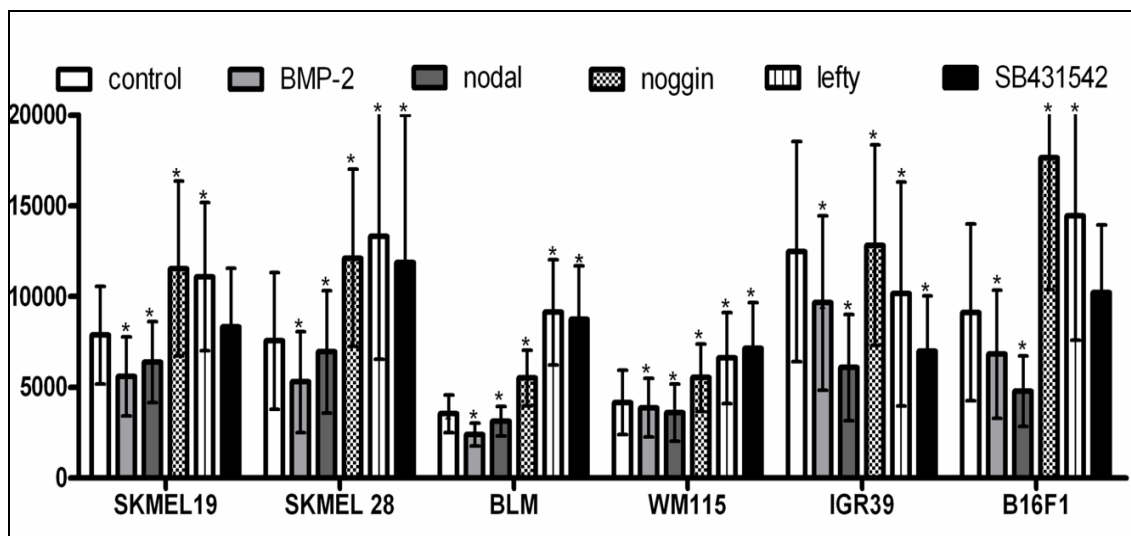


Abb. 9: Aggregatgrößen verschiedener Melanomzelllinien nach Behandlungen mit Morphogenen.

6 Melanomzelllinien wurden für 24h in doppelter Rotation unter Vorbehandlung mit den Agonisten oder Antagonisten aggregiert. Die entstandenen Aggregate wurden fotografiert und ausgemessen (Zeiss Axiovision). Die Vorbehandlung mit den Agonisten (BMP-2, Nodal) resultierte in kleineren Aggregaten (bei allen Zelllinien) als die unbehandelten Kontrollaggregate, und die Vorbehandlung mit den Antagonisten (Noggin, Lefty, SB431542) führte zu größeren Aggregaten (bei allen Zelllinien bis auf die *radial growth phase* IGR39 Zellen) als die unbehandelten Kontrollen.

Aggregatgröße in μm^2 .

* $p < 0.001$, Student's T-Test.

3.2.2 EMT *in-vitro* / Randschleierbildung

Die spontane flächenhafte Bildung eines Zellrasens von morphologisch mesenchymalen Zellen aus dem embryonalen Korneaepithel des Hühnchens nach Auspflanzung in die Zellkulturschale wurde 1982 von Elisabeth Hay und Kollegen erstmals als epitheliale-mesenchymale Transformation (EMT) beschrieben [43]. Die von Hay beschriebene EMT *in-vitro* ähnelt morphologisch dem Verhalten von Neuralleistenzellen während der Induktion der embryonalen Neuralleiste und den Wanderbewegungen der Neuralleistenzellen. Um die dieser EMT *in-vitro* entsprechenden Migrationseigenschaften von Melanomzellen zu bestimmen, verwendeten wir die so genannte „Randschleierbildung“. Hierfür wurden über 24h generierte (vorbehandelte) Melanomzellaggregate von verschiedenen Melanomzelllinien in 6-well-Kulturschalen ausgesät und für weitere 16 Stunden im Kulturschrank inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die jeweiligen Aggregate nicht erneut mit den Morphogenen stimuliert. Danach wurden die Aggregate mit den entstandenen Randschleiern von ausgewanderten Zellen, welche eine spindelförmige, mesenchymale Morphologie angenommen hatten, fotografiert und ausgemessen (Zeiss Axiovision; s. Material und Methoden). Hierauf wurde die Ratio zwischen der Größe des Restaggregates und der Gesamtfläche Restaggregate + Randschleier gebildet und als „*cell migration index*“ definiert, welcher der Fähigkeit, EMT zu durchlaufen, entspricht. Um die statistische Analyse eines Effekts der Morphogene auf die EMT *in-vitro* durchzuführen, wurden die durchschnittlichen Größen der Aggregate der verschiedenen Behandlungsgruppen an die Aggregatgrößen der Kontrollgruppen angepasst. Der Einfluss der Aggregatgrößen als möglicher Störfaktor bei der statistischen Auswertung konnte somit behoben werden. Die unbehandelten Melanomzellen bildeten nach den 16h Inkubationszeit in allen Zelllinien große Höfe um die verbliebenen Restaggregate. Der *cell migration index* in den Agonisten (BMP-2, Nodal) vorbehandelten Melanomzellen war gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht. In den mit den Antagonisten (Noggin, Lefty, SB431542) vorbehandelten Melanomzellen sahen wir einen erniedrigten *cell migration index* verglichen mit den Kontrollaggregaten (Abb. 10).

Zusammenfassung: Die Vorbehandlung mit den Agonisten BMP-2 oder Nodal erhöht die Fähigkeit von Melanomzellen, *in-vitro* eine EMT zu durchlaufen; die Antagonisten Noggin, Lefty und SB431542 reduzieren die EMT-Fähigkeit.

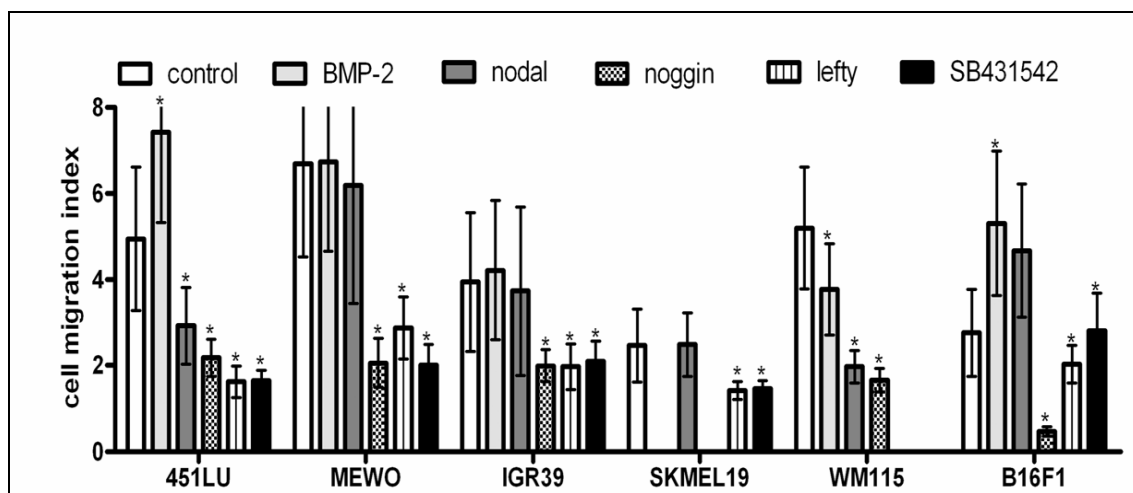


Abb. 10: Randschleierbildung (EMT *in-vitro*) verschiedener Melanomzelllinien nach Vorbehandlung mit den Morphogenen.

Vorbehandelte Melanomzellaggregate wurden für 16h weiter kultiviert. Der spontan entstandene Randschleier aus morphologisch mesenchymalen Melanomzellen, sowie das morphologisch epitheliale Restaggregat wurden für die Bildung des cell migration index vermessen. Die Agonisten BMP-2 oder Nodal erhöhten den cell migration index bei 451LU und B16-F1 Zellen; die Antagonisten Noggin, Lefty oder SB431542 erniedrigten den cell migration index bei allen 6 Zelllinien.

Zellmigrationsindex (*cell migration index*) = Randschleierumfang / Restaggregatumfang.

* $p < 0.01$, Student's T-Test

3.2.3 Invasion *in-vitro* im humanen epidermalen Hautrekonstrukt

Um zu überprüfen, ob die Vorbehandlung mit den Morphogenen einen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit von Melanomzellen in einem der menschlichen Haut ähnlichen dreidimensionalen Gewebeverband ausübt, verwendeten wir menschliche epidermale Hautrekonstrukte. Vorbehandelte (BMP-2, Noggin, Nodal, Lefty, SB431542) und unbehandelte BLM Melanomzellaggregate wurden wie oben beschrieben gemischt mit menschlichen Keratinozyten auf eine Fibroblasten/Kollagen-„Dermis“ ausgesät. Nach 16 Tagen Inkubation wurde die Invasivität der BLM Aggregate durch histologische Untersuchung ausgewertet. Unbehandelte BLM Zellen invadierten bis zu 90% der gesamten Tiefe des Hautrekonstruktes, unter massiver Zerstörung des epidermalen Kompartimentes (Abb. 11 und 12). Die mit BMP-2 oder Nodal vorbehandelten BLM Aggregate zeigten eine verstärkte Destruktion der epidermalen Schicht und eine massive Invasion in das dermale Kompartiment der Rekonstrukte (n=3 pro Aggregat-Gruppe; Abb. 11 und 12). In den mit Noggin bzw. Lefty oder SB431542 vorbehandelten Aggregaten zeigte sich ein gegenteiliger Effekt: Weniger ausgeprägte Zerstörung des epidermalen Kompartimentes und eine verminderte Invasion in das dermale Kompartiment (Abb. 11 und 12). Dieser inhibierende Effekt war in den mit Lefty oder SB431542 vorbehandelten BLM Aggregaten sehr ausgeprägt. Auffällig waren darüber hinaus die verschiedenen Zellmorphologien zwischen den vorbehandelten Melanomzellen. Während die Behandlung mit BMP-2 und Nodal dazu führte, dass die invadierenden Zellen durchgehend eine spindelförmige, mesenchymale Morphologie aufwiesen, zeigten die BLM Zellen, welche mit Noggin, Lefty oder SB431542 vorbehandelt waren, im dermalen Kompartiment multiple Nester / Aggregate von kompakten, morphologisch eher epithelialen Zellen (Abb. 11 und 12).

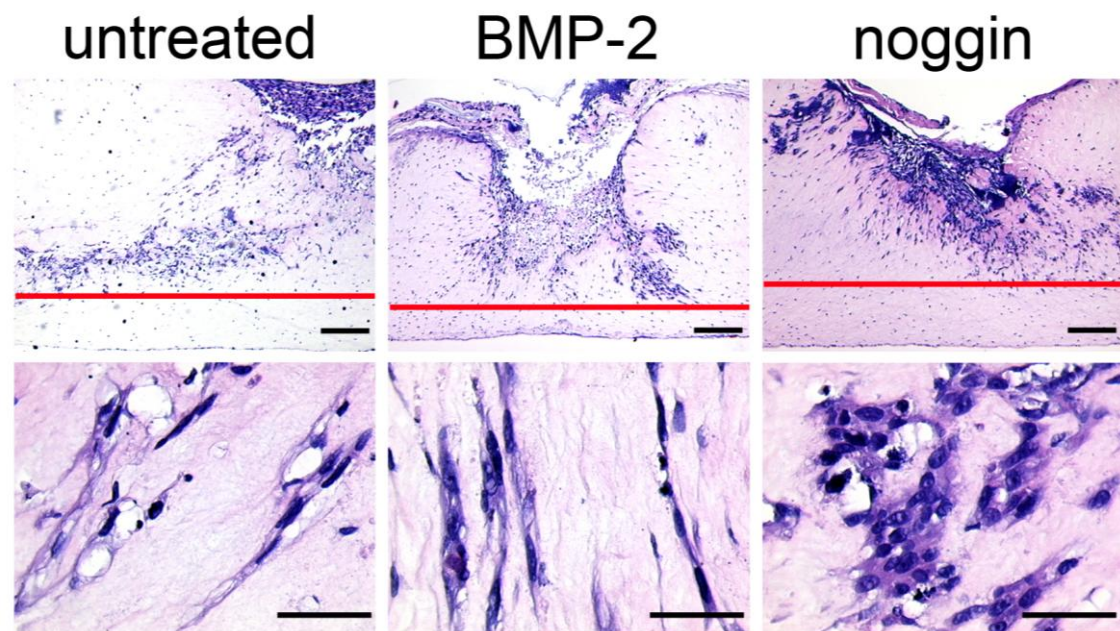


Abb. 11: Invasion von unbehandelten, BMP-2- oder Noggin-vorbehandelten BLM Melanomzellen im humanen epidermalen Hautrekonstrukt.

(Vorbehandelte) BLM Melanomzellaggregate wurde auf epidermale Rekonstrukte ausgesät und die Invasion nach 16 Tagen im histologischen Schnitt beurteilt. Die Vorbehandlung mit Noggin verminderte die Invasion der BLM Zellen verglichen mit unbehandelten und BMP-2 behandelten BLM Zellen. Unbehandelte und BMP-2 vorbehandelte BLM Zellen invadierten die Dermis in Straßen morphologisch mesenchymaler, ausgestreckter Zellen (obere Reihe). Die Noggin-vorbehandelten BLM Zellen wuchsen im dermalen Kompartiment des Rekonstruktes teilweise in kompakten, morphologisch epithelialen Zellnestern (untere Reihe).

HE-Färbung, Rote Linie = Invasionsgrenze ; Maßstäbe (schwarze Linien): obere Reihe = 200 μ m, untere Reihe 50 μ m).

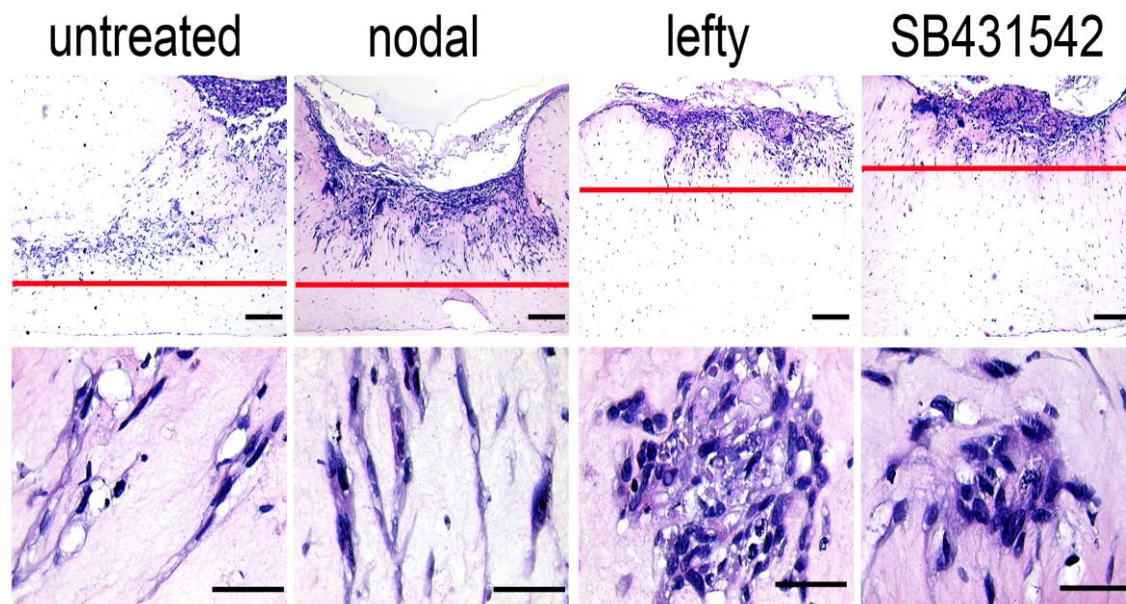


Abb. 12: Invasion von unbehandelten, Nodal-, Lefty- oder SB431542-vorbehandelten BLM Melanomzellen im humanen epidermalen Hautrekonstrukt.

(Vorbehandelte) BLM Melanomzellaggregate wurde auf epidermale Rekonstrukte ausgesät und die Invasion nach 16 Tagen im histologischen Schnitt beurteilt. Die Vorbehandlung mit Lefty oder SB431542 verminderte die Invasion der BLM Zellen deutlich (ca. um 50%) verglichen mit unbehandelten und Nodal vorbehandelten BLM Zellen (obere Reihe). Unbehandelte und Nodal-vorbehandelte BLM Zellen invadierten die gesamte Dermis in Straßen morphologisch mesenchymaler, ausgestreckter Zellen. Die Lefty- oder SB431542-vorbehandelten BLM Zellen wuchsen im dermalen Kompartiment des Rekonstruktes teilweise in kompakten, morphologisch epithelialen Zellnestern (untere Reihe; vgl. die Noggin-vorbehandelten BLM Aggregate in Abb. 11).

HE-Färbung, Rote Linie = Invasionsgrenze, Maßstäbe (schwarze Linien): obere Reihe = 200 μ m, untere Reihe 50 μ m).

In der spontanen Melanomentstehung- und Progression ist allgemein anerkannt, dass die Melanomzellen von einer radialen Wachstumsphase (*radial growth phase*, RGP) in eine vertikale Wachstumsphase (*vertical growth phase*, VGP) und zuletzt in das metastatische Stadium (*metastatic melanoma cell*) übergehen [69]. Klinisch entsprechen diese Wachstumsphasen Superfiziell spreitenden Melanomen (RGP), Nodulären Melanomen (VGP) oder Melanommetastasen. Um die Melanomprogression, d.h., den Übergang von der RGP zur VGP zu untersuchen, bieten sich SBCL2 Melanomzellen an, die der RGP entsprechen. Um den Einfluss der Agonisten BMP-2 und Nodal auf das Wachstumsverhalten und die mögliche Modulation der endogenen Invasionsfähigkeit von SBCL2 Zellen zu untersuchen (Übergang von RGP zu VGP), wurden unbehandelte und BMP-2- oder Nodal-vorbehandelte SBCL2 Zellen als Zellsuspension gemischt mit Keratinozyten auf epidermale Hautrekonstrukte ausgesät. Die unbehandelten SBCL2-Zellen lagerten sich band- und nestförmig an der epidermal-dermalen Grenze an und wuchsen nicht invasiv (Abb. 13), was der RGP entspricht. Die Vorbehandlung der Zellen mit BMP-2 oder Nodal führte jedoch zur Induktion von Invasivität und Veränderung der SBCL2-Zellmorphologie hin zu einem mesenchymalen Phänotyp (n=3 pro Gruppe; Abb. 13).

Zusammenfassung: Bei metastatischen BLM Melanomzellen erhöht die Vorbehandlung mit den Agonisten BMP-2 oder Nodal die Invasionsfähigkeit im epidermalen Hautrekonstrukt. Die Vorbehandlung von BLM Zellen mit den Antagonisten Noggin, Lefty oder SB431542 reduzierte die Invasionsfähigkeit und induzierte einen epithelialen, kompakten Zellphänotyp.

Die Agonisten BMP-2 und Nodal induzierten den Übergang von radialem, nicht invasivem Wachstum zu vertikalem, invasivem Wachstum in SBCL2 (RGP) Melanomzellen.

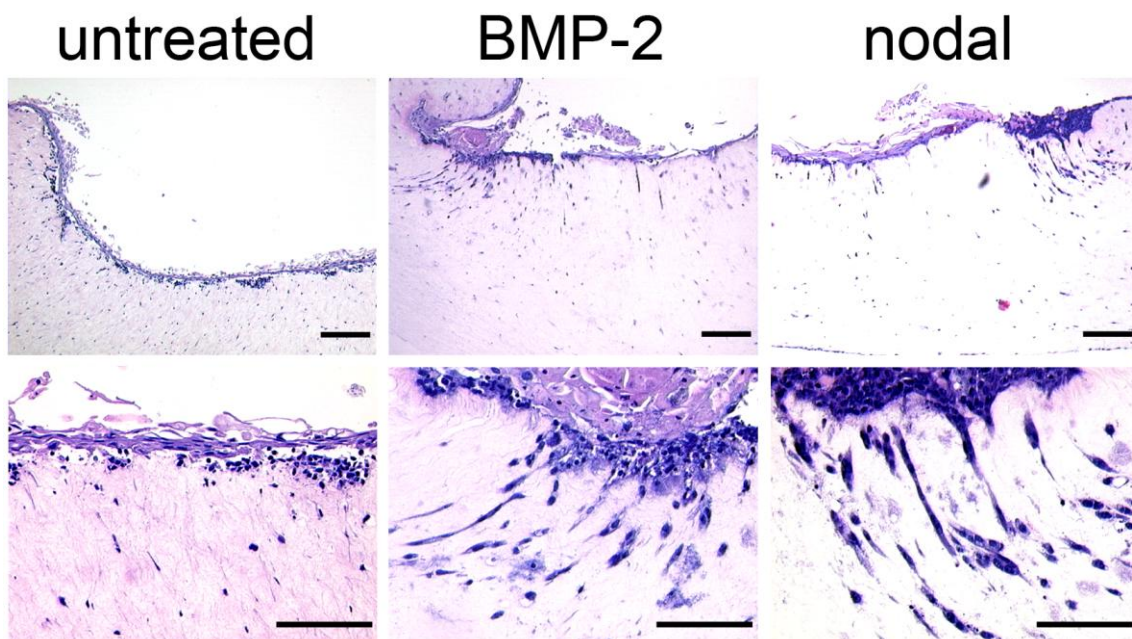


Abb. 13: Induktion von invasivem Wachstum in SBCL2 RGP Melanomzellen durch die Agonisten BMP-2 und Nodal im humanen epidermalen Hautrekonstrukt.

SBCL2 Melanomzellen wurden auf epidermale Rekonstrukte ausgesät und die Invasion nach 16 Tagen im histologischen Schnitt beurteilt. Unbehandelte Zellen sammelten sich entlang der epidermal-dermalen Grenze bandförmig und genestet, ohne das dermale Kompartiment zu invadieren. Die Vorbehandlungen mit BMP-2 oder Nodal induzierten die Invasion der SBCL2 Zellen im Sinne eines Übergangs von der RGP zur VGP. Darüber hinaus induzierten die Agonisten in den SBCL2-Zellen einen morphologisch mesenchymalen, ausgestreckten Zelltyp (vgl. die unbehandelten-BLM Aggregate, Abb. 11).

HE-Färbung, Maßstäbe (schwarze Linien): obere Reihe = 200µm, untere Reihe 50µm).

3.2.4 Expression von BMP-2 und Nodal in proliferativen und invasiven Melanomzellen

Das Invasionspotential von Melanomzellen wird durch ein Genexpressionsmuster charakterisiert, welches sich von dem proliferierender Melanomzellen unterscheidet [55]. Um die Nodal- und BMP-2-Expression in Melanomzellen mit hohem Proliferations- bzw. Invasivitätspotential zu vergleichen, wurde eine Melanomdatenbank untersucht (<http://www.jurmo.ch/php/genehunter.html>). Vier Datensätze mit insgesamt 87 proliferativen und 80 invasiven Melanomzelllinien wurden untersucht. Dabei war in allen vier Datensätzen eine signifikante mRNA-Expressionserhöhung von BMP-2 in den Melanomzelllinien mit invasivem Phänotyp im Vergleich zu den Melanomzelllinien mit proliferativem Phänotyp zu sehen (Abb. 14). Die Nodal-mRNA-Expression hingegen unterschied sich nicht zwischen den untersuchten proliferativen und invasiven Melanomzelllinien (nicht dargestellt).

Zusammenfassung: Die Expression von BMP-2 auf mRNA-Ebene ist in Melanomzellen mit invasiver Gensignatur signifikant höher als in Melanomzellen mit proliferativer Gensignatur.

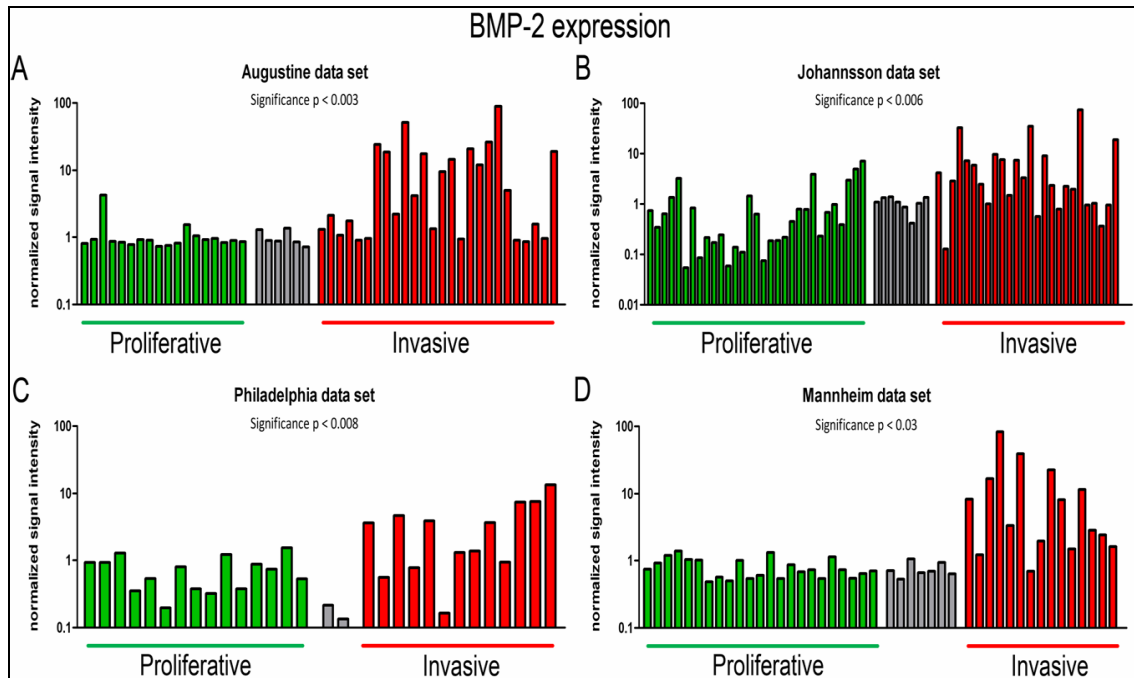


Abb. 14: Erhöhte BMP-2 Genexpression bei invasiven Melanomzelllinien im Vergleich zu proliferativen Melanomzelllinien.

Die Expression von BMP-2 mRNA wurde in vier Datensätzen mit insgesamt 87 proliferativen und 80 invasiven Melanomzelllinien untersucht. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der BMP-2 mRNA in allen 4 Datensätzen (Augustine dataset: $p < 0.003$, Johannsson dataset: $p < 0.006$, Philadelphia dataset: $p < 0.008$, Mannheim dataset: $p < 0.03$).

3.3 Der Einfluss von Nodal, Lefty und SB431542 auf die Neuralleistenwanderung von SKMEL28 Melanomzellen *in-vivo* im Hühnerembryo

Zellen der humanen SKMEL28 und murinen B16-F1 Melanomzelllinien unterziehen sich spontan der Neuralleistenauswanderung nach Transplantation in das Neuralrohr bei Hühnerembryonen im frühen Stadium [93, 109]. Die Neuralleistenwanderung der Melanomzellen hängt von der konstitutiven BMP-Expression der Melanomzellen ab und kann durch den BMP-Antagonisten Noggin aufgehoben werden [13].

Um zu testen, ob die endogene, konstitutiv aktivierte *Nodal*-Expression ebenfalls eine Rolle bei der spontanen Neuralleistenwanderung von Melanomzellen spielt, wurde eine Testreihe am Hühnerembryo durchgeführt, bei der unbehandelte oder mit den Nodal-Antagonisten Lefty oder SB431542 vorbehandelte SKMEL28 Melanomzellaggregate in das Neuralrohr von Hühnerembryonen im Stadium 12/13 nach Hamburger und Hamilton injiziert wurden. Für die histologische Auswertung der Embryonen und die Identifizierung der injizierten Melanomzellen verwendeten wir den Marker HMB45. Die Gruppe der Embryonen, welche unbehandelte Melanomzellaggregate injiziert bekamen, zeigte bei allen 8 Embryonen eine Auswanderung der Melanomzellen entlang der medialen oder lateralen Neuralleistenfade (Abb. 15). Die Gruppe der mit Lefty behandelten Melanomzellaggregate zeigte bei 10 von 10 Embryonen ebenfalls eine Migration der Melanomzellen entlang der medialen und lateralen Neuralleistenfade. Da dieses Ergebnis für uns unerwartet war, wiederholten wir die Versuchsreihe mit neuen Eiern und einer neuen Charge von Lefty. Doch auch im 2. Versuch sahen wir Neuralleistenauswanderung bei allen 10 injizierten Embryonen. In der Gruppe, in der die Melanomzellaggregate mit SB431542 vorbehandelt wurden, zeigte sich hingegen in keinem der Embryonen (0/10) eine Auswanderung der Melanomzellen entlang der Neuralleistenfade (Abb. 15 und Tabelle 1; $p < 0.001$, *Fisher's Exact Test*).

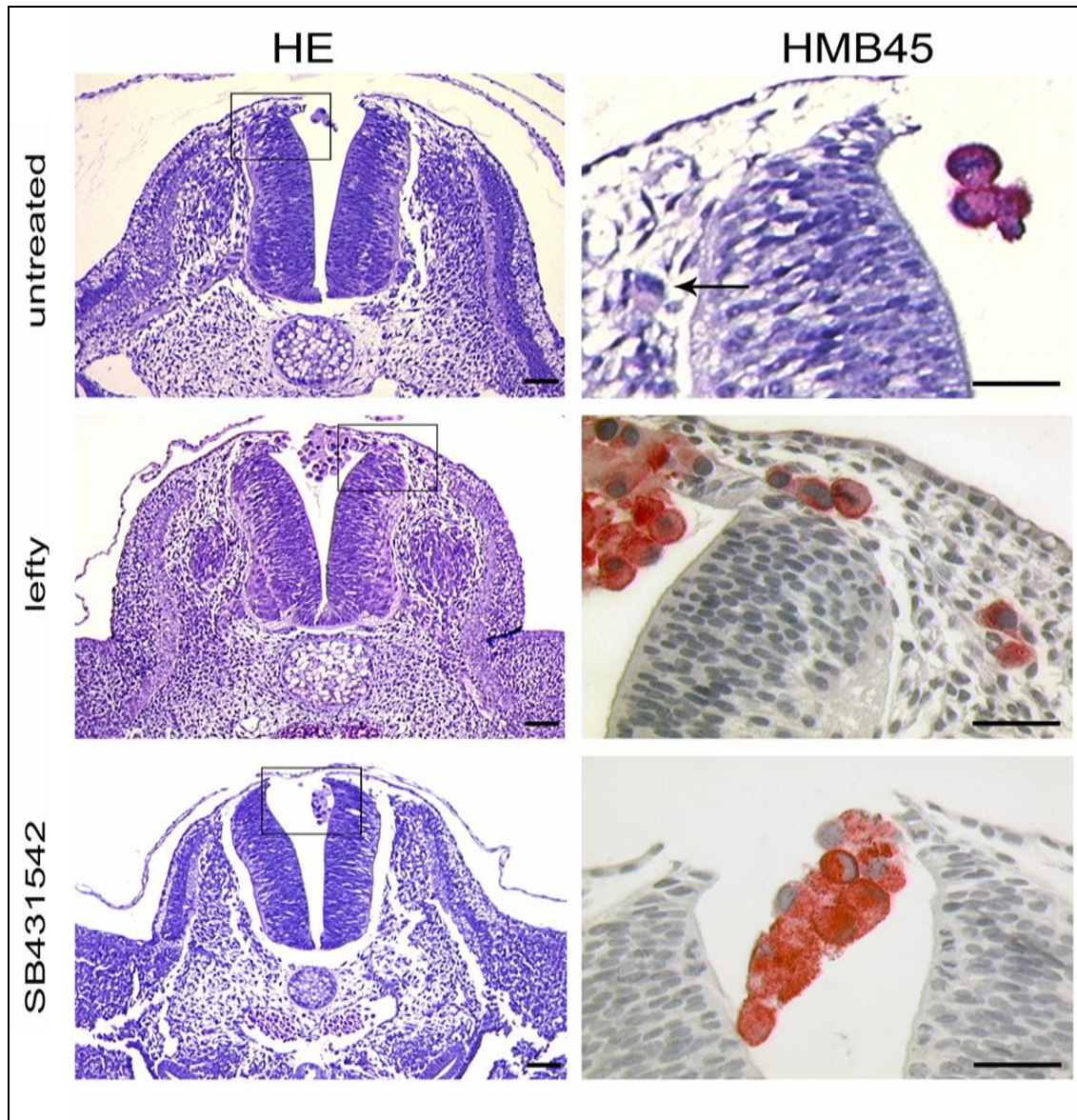


Abb. 15: SB431542 inhibiert die spontane Neuralleistenwanderung von SKMEL28 Melanomzellen nach Injektion in das Neuralrohr des Hühnerembryos.

SKMEL28 Melanomzellaggregate wurden unbehandelt oder nach Vorbehandlung mit den Nodal-Antagonisten Lefty oder SB431542 ins Neuralrohr von Hühnerembryonen im Stadium 12/13 injiziert. Nach 24h oder 48h der weiteren Inkubation wurden Serienschritte angefertigt, und mittels Immunhistologie mit dem Melanom-Marker HMB45 die Melanomzellen im Hühnerembryo identifiziert. Unbehandelte und mit Lefty-vorbehandelte Melanomzellen wanderten spontan entlang der Neuralleistenwanderwege, während die Vorbehandlung mit SB431542 die Neuralleistenwanderung der SKMEL28 Melanomzellen komplett unterband.

Maßstab (schwarzer Balken): 50µm

Behandlung	Neuralleistenwanderung	p-Wert*
Unbehandelt	8/8	
Lefty	20/20	
SB431542	0/10	<0.001

Tabelle 1: Auswertung der Neuralleistenwanderung von SKMEL28 Melanomzellen im Hühnerembryomodell nach Behandlung mit Lefty oder SB431542.

**Fisher's Exact Test*

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die konstitutiv aktivierte endogene (auto- oder parakrine) Stimulation der Melanomzellen mit Nodal ebenfalls bei der Neuralleistenwanderung von Melanomzellen involviert ist. Um die Expression von Nodal auf Proteinebene während der Neuralleistenwanderung in Melanomzellen im Hühnerembryo genauer zu untersuchen, wurden histologische Schnitte der 2007 von Oppitz *et al.* beschriebenen Versuchsreihe [93], in der die Injektion mit unbehandelten, GFP-transfizierten B16-F1 murinen Melanomzellen in das Neuralrohr erfolgte, verwendet. Dafür wurden die Schnitte mit einem anti-Nodal-Antikörper immunhistochemisch gefärbt. B16-F1 Zellen, die sich nicht in die Deckplatte des Neuralrohrs integriert hatten sondern im Neuralrohr verblieben waren, zeigten keine Expression von Nodal (Abb. 16A und C). Die interne Positivkontrolle für den Erfolg der Färbung stellte das Myotom des Hühnerembryos dar (Abb. 16A und B). Die Melanomzellen jedoch, die in die Deckplatte integriert waren (Abb. 16D und E) oder entlang des ventralen Neuralleistenpfades ausgewandert waren (Abb. 16F) zeigten im Gegensatz dazu eine starke Expression von Nodal.

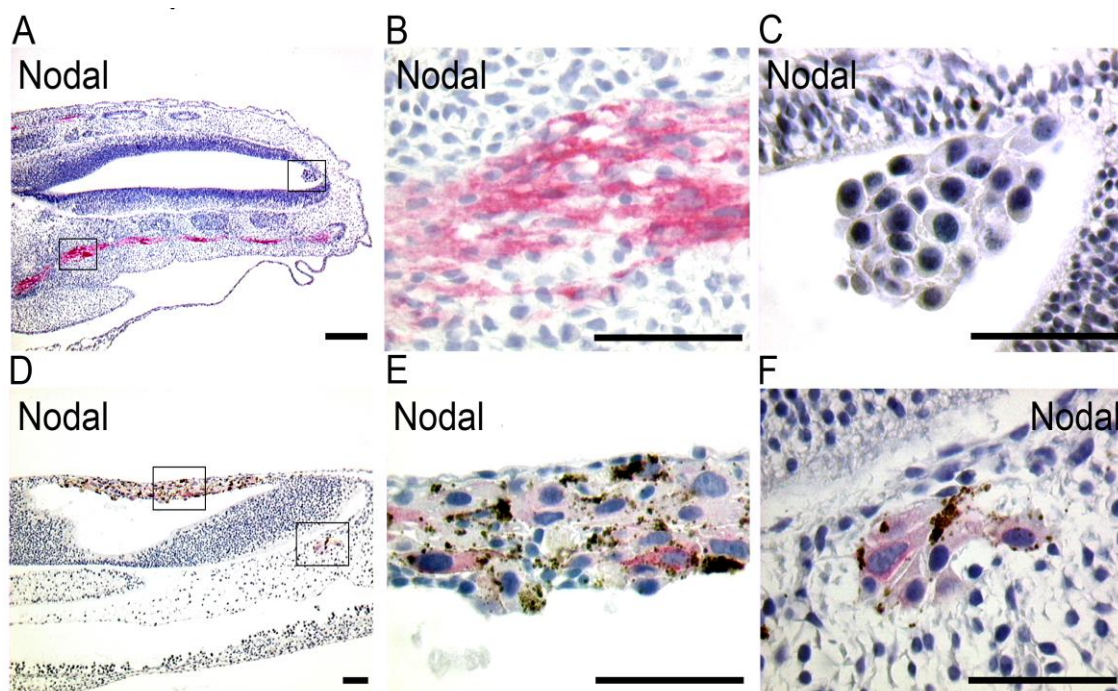


Abb. 16: Nodal-Expression unbehandelter B16-F1 Zellen nach Injektion in das Neuralrohr von Hühnerembryonen.

A: Übersicht eines Hühnerembryos 24h nach Injektion B16-F1 Melanomzellen in das Neuralrohr. B: Ausschnitt aus A. Interne Positivkontrolle, Nodal-positive Myotomzellen. C: Ausschnitt aus A; Nodal-negatives B16-F1 Aggregat im dorsalen Neuralrohr ohne Integration in die Neuralleiste. D: Anderer Embryo mit Nodal-positiven B16-F1 Melanomzellen, welche sich in die Deckplatte (E) integriert haben oder entlang des ventralen Neuralleistenwanderweges auswandern (F).

Maßstab (schwarzer Balken): 50µm

Zusammenfassung: Die Vorbehandlung von SKMEL28 Melanomzellen mit dem Antagonisten Lefty zeigte keine Inhibition der Neuralleistenauswanderung von Melanomzellen im Hühnerembryo, wohingegen die Vorbehandlung mit dem Antagonisten SB431542 zu einer Inhibition der Neuralleistenauswanderung der Melanomzellen in allen Embryonen führte.

Unbehandelte B16-F1 Melanomzellen, welche sich in die Deckplatte integrierten oder entlang des ventralen Neuralleistenpfades auswanderten, zeigten im Gegensatz zu im Neuralrohr verbliebenen Melanomzellen eine Nodal-Expression.

4 Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Experimente anhand der Gliederung im Ergebnisteil diskutiert. Dabei werden zunächst der Einfluss der Morphogene und deren Antagonisten auf die Proliferation und Chemosensitivierung diskutiert und anschließend wird auf die Beobachtungen der Zellaggregation und -migration sowie des *in-vivo* Experiments im Hühnerembyro eingegangen.

Proliferation/Chemosensitivität

Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Morphogene der TGF- β Familie, BMP und Nodal, die epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) in Melanomzellen *in-vivo* und *in-vitro* induzieren und somit die Voraussetzungen für eine Metastasierung der Zellen schaffen können. Die EMT konnte durch Noggin, Lefty und SB431542, allesamt Antagonisten von BMP und Nodal, inhibiert werden. Die Vorbehandlung von Melanomzellen mit den Morphogenen oder deren Antagonisten hatte keinen Einfluss auf die Zellproliferation und führte ebenso wenig zu einer erhöhten Sensitivität der Tumorzellen für eine Zytostatika-Behandlung. Ebenso sahen wir nach Behandlung der Melanomzellen, mit den Agonisten oder den Antagonisten, keinen Unterschied in der Fähigkeit einzelne Kolonien im Softagar auszubilden. Diese Beobachtungen waren aufgrund der bekannten Abläufe der EMT, z.B. während der Induktion der Neuralleiste und der darauf folgenden Auswanderung der Neuralleistenzellen während der Embryogenese, zu erwarten, da diese keinen Einfluss auf die Zellproliferation hat. Vielmehr ist die EMT durch eine komplexe Reihe von Abläufen charakterisiert, welche zu einer Veränderung der Zellmorphologie und des Migrationspotentials führen. Unter anderem wird die EMT während der Embryogenese durch BMP induziert und durch Noggin inhibiert. Dabei führt BMP im Speziellen zu einer Induktion der Zellmigration in der Neuralleiste, welche durch Noggin inhibiert wird [56, 110]. Die EMT in der Neuralleiste läuft in zwei aufeinander folgenden Schritten ab [88]. Zunächst verändert sich die Epithelschicht der Neuralleiste. Dabei kommt

es zu einer Auflösung der Basalmembran in den lateralen Anteilen der Deckplatte des Neuralrohrs. Im zweiten Schritt kommt es zum Ausbrechen der prospektiven Neuralleistenzellen aus dem Deckplattenepithel und in Folge davon zu einer Migration der Neuralleistenzellen aus den dorsalen Abschnitten des Neuralrohrs. Die Neuralleistenzellen folgen dann chemotaktischen Stimuli entweder entlang des dorsoventralen oder entlang des dorsolateralen Neuralleistenzellwanderweges.

Aggregation/Migration

Die *in-vitro* Entstehung eines kompakten Zellrasens, welcher von Gewebeproben ausgeht, wird durch Kontakt zur Zellkulturschalenoberfläche induziert und (bei vollständiger Konfluenz) durch die entstandenen Zell-Zell-Kontakte wieder inhibiert (Kontaktinhibition). Die Entstehung eines Randschleiers aus Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp, welche sich kreisförmig um ein embryonales Korneaepithel-Präparat bildeten, führte erstmals zur Verwendung des Begriffs der EMT durch Greenburg und Hay im Jahre 1982 [43]. Heutzutage wird der Begriff verwendet um morphologische Phänomene während der Embryogenese und der Entstehung von malignen Tumoren bzw. deren Metastasen zu beschreiben [120].

Die quantitative Messung der EMT *in-vitro* anhand der durch die Agonisten oder Antagonisten vorbehandelten Melanomzellaggregate (Primäraggregation und Randschleierbildung) spiegelte die Kompetenz der Melanomzellen zur Migration und Invasivität wider. Durch Herstellung von Melanomzellaggregaten konnten die Effekte der Morphogene und deren Antagonisten an einer großen Zellzahl überprüft werden.

Ein charakteristisches Merkmal des Versuchsdesigns für die Untersuchung des Einflusses der Morphogene auf die Zellaggregation war die Herstellung der Melanomzellaggregate. Dazu wurden die Zellen mit den Morphogenen oder deren Antagonisten vorbehandelt und mit Hilfe einer Zellroll-Maschine unter Doppelrotation im freien Fall zu Aggregaten geformt (s. 2.3). Die gaspermeablen Biofolien, welche eine hohe Zelldichte in einem kleinen

Volumen von Zellmedium enthielten, ermöglichten Zellinteraktionen während der Aggregation. Damit konnten angemessene Konzentrationsgradienten von auto- und parakrinen Signalfaktoren erreicht werden.

Die Vorbehandlung der Melanomzellen mit den Antagonisten Noggin, Lefty oder SB431542 führte zu einer temporären Inhibition des migrationsfähigen mesenchymalen Phänotyps, welche sich in einer vermehrten Zellaggregation und einer geringeren Auswanderung von Zellen um das Melanomzellaggregat widerspiegelte. Gleichzeitig induzierte die Vorbehandlung der Melanomzellen mit den Agonisten (BMP-2 und Nodal) eine gesteigerte EMT, was sich in einer verminderten Aggregationsfähigkeit und einer zunehmenden Randschleierbildung ablesen ließ.

Um diese reinen *in-vitro* Beobachtungen in einem der menschlichen Haut sehr ähnlichen dreidimensionalen Modell zu verifizieren benutzten wir das humane epidermale Hautrekonstrukt als Versuchsaufbau. Hier zeigte sich, dass unbehandelte und mit den Agonisten BMP-2 oder Nodal vorbehandelte BLM-Melanomzellen den dermalen Anteil der Hautrekonstrukte spontan invadierten. Hingegen führte die Inhibition der BMP- und Nodal-Signalkaskade durch deren Antagonisten (Noggin, Lefty, oder SB431542) zu einer deutlichen Reduktion der Invasion der epidermal ausgesäten BLM Melanomzellen. In diesem Zusammenhang beobachteten wir darüber hinaus eine Veränderung der mesenchymalen BLM-Zellmorphologie durch die Vorbehandlung mit den Antagonisten: im oberen Teil der dermalen Hautrekonstrukte mit Antagonisten-vorbehandelten BLM-Melanomzellen entstanden multiple Aggregate, die einen kompakten, epithelialen Phänotyp besaßen. Um die Frage einer möglichen Beeinflussung der Melanomprogression genauer zu untersuchen, wiederholten wir den Hautrekonstrukt-Versuch unter Verwendung von RGP-SBCL2-Zellen (Melanomzellen eines Melanoms mit horizontaler Wachstumsrichtung). Wie erwartet konnten wir bei unbehandelten SBCL2 Zellen keine Invasion in den dermalen Anteil der Hautrekonstrukte beobachten. Die Vorbehandlung mit den Agonisten BMP oder Nodal induzierte hingegen ein invasives Wachstum dieser Zellen im Hautrekonstrukt, das dem spontanen invasiven Wachstum der metastatischen BLM-Melanomzellen ähnelte. Diese Beobachtung lässt darauf

schließen, dass die Stimulation durch BMP-2 oder Nodal zum Übergang bzw. Progress der radialen Wachstumsphase hin zur vertikalen, invasiven Wachstumsphase führt und somit einen wichtigen Schritt in Richtung Metastasierung darstellen könnte.

Die von uns erhobenen Resultate wurden durch eine Recherche in einer Melanomdatenbank bestätigt. Hier zeigte sich, dass invasiv wachsende Melanomzelllinien im Vergleich zu proliferierenden Melanomzelllinien eine gesteigerte BMP-2-Transkription aufweisen. Diese konstitutiv erhöhte BMP-Expression in invasiven Melanomzelllinien unterstützt die Hypothese einer BMP-gesteuerten Invasivität von Melanomzellen [55].

Jüngst konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von gutartigen menschlichen Melanozyten mit BMP-2, BMP-7 oder Nodal zu einer „Re-Programmierung“ der Melanozyten führt. Nach Injektion in den embryonalen Augenbecher des Hühnchens konnte eine Invasion der vorbehandelten Melanozyten beobachtet werden, während unbehandelte Melanozyten keinerlei Invasionstendenz aufwiesen [16]. Die Fähigkeit von Melanomzellen zur Invasivität scheint daher ein eigenständiger Prozess zu sein, der sich von der Onkogen-vermittelten Proliferation in Melanomzellen abhebt [16]. Beispiele für solche Onkogene, die eine Schlüsselrolle für die maligne Transformation bei der Melanomentstehung spielen, sind BRAF und NRAS [37].

***In-vivo* Modell**

Die EMT ist eher durch die Transformation des Zellphänotyps von einem kompakten epithelialen Zelltyp in einen mesenchymalen Zelltyp mit Pseudopodien und migratorischem Verhalten definiert, als durch den Nachweis immunhistochemischer Zellmarker. Für unsere *in-vivo* Versuche transplantierten wir Melanomzellen in das Neuralrohr von Hühnerembryonen, so dass die Melanomzellen dem Mikromilieu ihrer embryologischen Vorläuferzellen ausgesetzt waren. Dadurch ließen sich die Veränderungen der Zellen während der EMT unter einem Stereomikroskop betrachten, was den

Hühnerembryo zu einem geeigneten *in-vivo* Modell für den Nachweis der EMT von Melanomzellen prädestiniert [16].

In vorherigen Experimenten wurde beobachtet, dass humane SKMEL28 und murine B16-F1 Melanomzellen sich nach Transplantation in das Neuralrohr von Hühnerembryonen spontan in die Neuralleiste integrierten [13, 93, 109]. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass humane Melanomzelllinien konstitutiv BMP überexprimieren [102], was sie zur EMT befähigt. Ebenso wurde eine konstitutive Nodal-Expression in Melanomzellen beobachtet [123]. Unser Experiment im *in-vivo* Modell des Hühnerembryos bestätigt die oben aufgeführten Erkenntnisse. Die spontane Neuralleistenwanderung von Melanomzellen, welche in das Neuralrohr von Hühnerembryonen transplantiert wurden, konnte durch eine Vorbehandlung der Melanomzellen mit dem BMP-Antagonisten Noggin oder mit dem Nodal-Rezeptorblocker SB431542 vollständig inhibiert werden. Dieser EMT-inhibierende Effekt könnte durch die Blockierung der in Melanomzellen konstitutiv aktivierten BMP- und Nodal-Signaltransduktionswege erklärbar sein.

Hinsichtlich der Inhibition der Neuralleistenauswanderung durch die Nodal-Antagonisten zeigten sich jedoch unerwartete Ergebnisse. Der Nodal-Rezeptorblocker SB431542 inhibierte die EMT (Neuralleistenauswanderung der in das Neuralrohr injizierten Melanomzellen im Hühnerembryo) vollständig. Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung der Melanomzellen mit dem Nodal-Antagonisten Lefty vor der Injektion in das Neuralrohr nicht zu einer Hemmung der Neuralleistenmigration. Eventuell ist die Verwendung von rekombinatem Lefty die Ursache der fehlenden Inhibition der Neuralleistenauswanderung von Melanomzellen. In der Arbeit von Strizzi et al. [117] führte eine Behandlung von Nodal-positiven Melanomzellen mit Lefty, welches aus humanen Embryostammzellen isoliert wurde, zu einer erhöhten Apoptoserate, wohingegen die Behandlung mit humanem rekombinatem Lefty keine Apoptose bei den selben Melanomzellen induzierte. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnten posttranslationelle Modifikationen von Lefty, wie zum Beispiel der Glykosylierungsstatus, sein [96]. Eine weitere mögliche Erklärung des fehlenden Effektes von Lefty auf die Neuralleistenwanderung von

Melanomzellen besteht darin, dass die konstitutive Sekretion von BMP den transplantierten Melanomzellen sowohl auto- als auch parakrine Stimuli liefern und somit die EMT einleiten. Daher scheint die Tatsache, dass sich die EMT in den Melanomzellen durch die Vorbehandlung mit dem Nodal-Rezeptorblocker SB431542 in allen transplantierten Embryonen unterdrücken ließ, darauf hinzuweisen, dass SB431542 eventuell nicht ALK-4, -5 und -7 (Nodal-Rezeptoren) -spezifisch ist, sondern auch die strukturell sehr ähnlichen BMP-Rezeptoren antagonisiert.

Um zu überprüfen, ob Nodal in Melanomzellen während derer aktiven Neuralleistenauswanderung im Hühnerembryo gebildet wird, färbten wir geeignete Paraffinschnitte mit einem Antikörper gegen Nodal. Unsere immunhistochemischen Untersuchungen am Hühnerembryo zeigen, dass die Melanomzellen nur Nodal exprimierten wenn sie sich der EMT oder Migration entlang der Neuralleiste unterzogen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Melanomzellen im Hühnerembryo nur während der EMT Nodal exprimieren um ein invasives Wachstum zu erlangen, während die BMP-Expression in Melanomzellen konstitutiv aktiviert ist. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zur Arbeit von Topczewska et al. [123], welche eine konstitutive Nodal-Expression in metastatischen Melanomzellen beschreibt. Allerdings birgt das Mikromilieu im Hühnerembryo jedoch eine Fülle an Ko-Faktoren, welche die EMT beeinflussen können. Diese sind ggf. bei *in-vitro* Versuchen oder adulten *in-vivo* Modellen zur Untersuchung der Invasivität von Melanomzellen nicht gegeben.

Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass BMP und Nodal Induktoren der EMT sind und sowohl die invasiven als auch die migratorischen Eigenschaften von Melanomzellen fördern. Die Induktion der EMT konnte durch eine Vorbehandlung der Melanomzellen durch die Inhibitoren von BMP und Nodal (Noggin, Lefty und SB431542) inhibiert werden. Diese Erkenntnisse definieren BMP und Nodal als potentielle Ziele neuer pharmakologischer

Therapieansätze, welche in den Prozess der EMT eingreifen und damit die Progression maligner Melanome unterbinden können.

5 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein äußerst aggressiver Tumor mit kontinuierlich zunehmender Inzidenz, für den im klinischen Stadium IV derzeit noch keine kurativen Therapiemöglichkeiten existieren. Um neue Therapieansätze zu erforschen, werden Angriffspunkte für die Elimination von embryonalen Eigenschaften in Melanomzellen gesucht, die durch die maligne Transformation bei der Tumorentstehung von Melanomzellen konstitutiv re-exprimiert werden. Während der malignen Transformation scheinen vor allem embryonale Gene re-aktiviert zu werden, die während der frühen Embryonalentwicklung unter anderem in der Neuralleiste eine epithelial-mesenchymale-Transformation (EMT) induzieren, welche den epithelialen Zellen einen mesenchymalen, migratorischen/invasiven Phänotyp verleiht. Der Vorgang der EMT wird durch eine Vielzahl von Prozessen reguliert, an denen die Morphogene BMP und Nodal der TGF- β -Familie und deren spezifische Antagonisten beteiligt sind.

Zielsetzung und Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der embryonalen Morphogene BMP-2 und Nodal (Agonisten der TGF- β -Familie) und deren spezifischen Antagonisten Noggin und Lefty, bzw. dem Nodal-Rezeptorantagonisten SB431542 auf die EMT-Fähigkeit (Änderung von Adhäsions- und Migrationseigenschaften) von Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* zu erforschen. Im Detail untersuchten wir bei unbehandelten und mit Agonisten oder Antagonisten vorbehandelten Melanomzellen: (1) Zellzyklus, Proliferations- und Koloniebildungskapazität, (2) Therapieresistenz und Chemosensitivierung, (3) Aggregations- und Migrationsfähigkeit, (4) *in vitro* Invasionsfähigkeit und (5) *in vivo* Invasionsfähigkeit.

Unsere Versuche zeigten, dass die Agonisten BMP-2 und Nodal keinen Einfluss auf den Zellzyklus, die Proliferationsrate, Koloniebildung, Therapieresistenz und Chemosensitivierung von metastatischen Melanomzellen hatten. Jedoch beeinflussten sie die EMT-Fähigkeit der untersuchten Melanomzellen erheblich im Sinne einer EMT-Induktion: Sie verringerten die Aggregations- und erhöhten die Migrationsfähigkeit der Melanomzellen. Des Weiteren verstärkten die Agonisten BMP-2 und Nodal die Invasionsfähigkeit von Melanomzellen *in vitro*

in menschlichen epidermalen Hautrekonstrukten. Daneben beobachteten wir, dass Melanomzellen aus der radialen Wachstumsphase nach Agonistenbehandlung im Hautrekonstrukt in ein vertikales, invasives Wachstumsverhalten übergangen. *In vivo* beobachteten wir, dass Melanomzellen, die nach Injektion ins Neuralrohr von Hühnerembryonen spontan die embryonale Neuralleistenwanderung vollzogen, Nodal exprimierten, während nicht wandernde Melanomzellen im Lumen des Neuralrohrs (am Ort der Injektion) keine Nodal-Expression aufwiesen.

Die Antagonisten Noggin und Lefty, bzw. der Nodal-Rezeptorantagonist SB431542 hatten ebenfalls keinen Einfluss auf den Zellzyklus, die Proliferationsrate, Koloniebildung und Therapieresistenz, und zeigten auch keine Chemosensitivierung in Kombination mit unterschiedlichen Chemotherapeutika bei den untersuchten metastatischen Melanomzellen. Allerdings beobachteten wir einen erheblichen Einfluss der Antagonisten und von SB431542 auf die EMT-Fähigkeit von Melanomzellen im Sinne einer EMT-Inhibition: Sie verstärkten die Aggregationsfähigkeit bei gleichzeitiger Verringerung der Migrationsfähigkeit der Melanomzellen. Des Weiteren verringerten die Antagonisten und SB431542 die Invasionsfähigkeit *in vitro* in menschlichen epidermalen Hautrekonstrukten. Nach Injektion von SKMEL28 Melanomzellen ins Neuralrohr von Hühnerembryonen beobachteten wir die komplette Unterbindung der spontanen Neuralleistenwanderung nach Vorbehandlung der Melanomzellen mit SB431542. Dieser inhibitorische Effekt entsprach dem bereits durch die eigene Arbeitsgruppe vorbeschriebenen inhibitorischen Effekt von Noggin sowohl auf die spontane Neuralleistenwanderung als auch auf die maligne Invasion im Augenbecher des Hühnerembryos. Interessanterweise hatte die Vorbehandlung mit Lefty keinen inhibitorischen Einfluss auf die spontane Neuralleistenwanderung der injizierten Melanomzellen, was wir als kompensatorischen Effekt der konstitutiven Expression von BMP durch menschliche metastatische Melanomzellen interpretierten.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass BMP-2 und Nodal potente Induktoren einer EMT sind und sowohl die migratorischen als auch die

invasiven Eigenschaften von Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* fördern. Die Fähigkeit zur EMT konnte durch die Vorbehandlung der Melanomzellen mit dem jeweiligen spezifischen Inhibitor (Noggin, Lefty) oder dem Nodal-Rezeptorantagonisten SB431542 *in-vitro* und *in-vivo* inhibiert werden (s. Tab. 2). Unsere Ergebnisse weisen auf einen potentiellen klinischen Nutzen der Inhibierung von BMP oder Nodal in der Melanomtherapie im Sinne der Unterdrückung der EMT/Invasionsfähigkeit von Melanomzellen hin.

	BMP-2	Nodal	Noggin	Lefty	SB431542
Zellzyklus, Proliferation, Koloniebildung und Chemosensitivierung	↔	↔	↔	↔	↔
Aggregation	↓	↓	↑	↑	↑
Migration	↑	↑	↓	↓	↓
<i>in-vitro</i>-Invasivität	↑	↑	↓	↓	↓
<i>in-vivo</i>-Invasivität	↑	↑	↓	↔	↓

Tabelle 2: Zusammenfassung und schematische Darstellung der Effekte von den Morphogenen und deren Antagonisten auf Melanomzellen *in-vitro* und *in-vivo*.

6 Literaturverzeichnis:

1. Alarmo, E. L., Parssinen, J., Ketolainen, J. M., Savinainen, K., Karhu, R., and Kallioniemi, A., *BMP7 influences proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells*. *Cancer Lett*, 2009. **275**(1): p. 35-43.
2. Alison, M. R., Murphy, G., and Leedham, S., *Stem cells and cancer: a deadly mix*. *Cell Tissue Res*, 2008. **331**(1): p. 109-24.
3. Aplin, A. E., Kaplan, F. M., and Shao, Y., *Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma*. *J Invest Dermatol*, 2011. **131**(9): p. 1817-20.
4. Arnold, S. F., Tims, E., and McGrath, B. E., *Identification of bone morphogenetic proteins and their receptors in human breast cancer cell lines: importance of BMP2*. *Cytokine*, 1999. **11**(12): p. 1031-7.
5. Bailey, J. M., Singh, P. K., and Hollingsworth, M. A., *Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins*. *J Cell Biochem*, 2007. **102**(4): p. 829-39.
6. Balemans, W. and Van Hul, W., *Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators*. *Dev Biol*, 2002. **250**(2): p. 231-50.
7. Beck, S., Le Good, J. A., Guzman, M., Ben Haim, N., Roy, K., Beermann, F., and Constam, D. B., *Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(12): p. 981-5.
8. Ben-Haim, N., Lu, C., Guzman-Ayala, M., Pescatore, L., Mesnard, D., Bischofberger, M., Naef, F., Robertson, E. J., and Constam, D. B., *The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4*. *Dev Cell*, 2006. **11**(3): p. 313-23.
9. Bilodeau, M. L., Greulich, J. D., Hullinger, R. L., Bertolotto, C., Ballotti, R., and Andrisani, O. M., *BMP-2 stimulates tyrosinase gene expression and melanogenesis in differentiated melanocytes*. *Pigment Cell Res*, 2001. **14**(5): p. 328-36.

10. Blanchet, M. H., Le Good, J. A., Mesnard, D., Oorschot, V., Baflast, S., Minchiotti, G., Klumperman, J., and Constam, D. B., *Cripto recruits Furin and PACE4 and controls Nodal trafficking during proteolytic maturation*. EMBO J, 2008. **27**(19): p. 2580-91.
11. Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P., and Harland, R. M., *Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton*. Science, 1998. **280**(5368): p. 1455-7.
12. Busch, C., Oppitz, M., Sailer, M. H., Just, L., Metzger, M., and Drews, U., *BMP-2-dependent integration of adult mouse subventricular stem cells into the neural crest of chick and quail embryos*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 21): p. 4467-74.
13. Busch, C., Drews, U., Garbe, C., Eisele, S. R., and Oppitz, M., *Neural crest cell migration of mouse B16-F1 melanoma cells transplanted into the chick embryo is inhibited by the BMP-antagonist noggin*. Int J Oncol, 2007. **31**(6): p. 1367-78.
14. Busch, C., Drews, U., Eisele, S. R., Garbe, C., and Oppitz, M., *Noggin blocks invasive growth of murine B16-F1 melanoma cells in the optic cup of the chick embryo*. Int J Cancer, 2008. **122**(3): p. 526-33.
15. Busch, C., Krochmann, J., and Drews, U., *Human melanoma cells in the rhombencephalon of the chick embryo: a novel model for brain metastasis*. Exp Dermatol, 2012. **21**(12): p. 944-7.
16. Busch, C., Krochmann, J., and Drews, U., *The chick embryo as an experimental system for melanoma cell invasion*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53970.
17. Callahan, J. F., Burgess, J. L., Fornwald, J. A., Gaster, L. M., Harling, J. D., Harrington, F. P., Heer, J., Kwon, C., Lehr, R., Mathur, A., Olson, B. A., Weinstock, J., and Laping, N. J., *Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5)*. J Med Chem, 2002. **45**(5): p. 999-1001.
18. Canalis, E., Economides, A. N., and Gazzerro, E., *Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton*. Endocr Rev, 2003. **24**(2): p. 218-35.

19. Cavallari, C., Fonsato, V., Herrera, M. B., Bruno, S., Tetta, C., and Camussi, G., *Role of Lefty in the anti tumor activity of human adult liver stem cells*. *Oncogene*, 2012.
20. Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S. J., Sosman, J. A., Kirkwood, J. M., Eggermont, A. M., Dreno, B., Nolop, K., Li, J., Nelson, B., Hou, J., Lee, R. J., Flaherty, K. T., and McArthur, G. A., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(26): p. 2507-16.
21. Chen, C. and Shen, M. M., *Two modes by which Lefty proteins inhibit nodal signaling*. *Curr Biol*, 2004. **14**(7): p. 618-24.
22. Chen, C. S., Lavker, R. M., Rodeck, U., Risse, B., and Jensen, P. J., *Use of a serum-free epidermal culture model to show deleterious effects of epidermal growth factor on morphogenesis and differentiation*. *J Invest Dermatol*, 1995. **104**(1): p. 107-12.
23. Cheng, G. Z., Chan, J., Wang, Q., Zhang, W., Sun, C. D., and Wang, L. H., *Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel*. *Cancer Res*, 2007. **67**(5): p. 1979-87.
24. Dai, J., Kitagawa, Y., Zhang, J., Yao, Z., Mizokami, A., Cheng, S., Nor, J., McCauley, L. K., Taichman, R. S., and Keller, E. T., *Vascular endothelial growth factor contributes to the prostate cancer-induced osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic protein*. *Cancer Res*, 2004. **64**(3): p. 994-9.
25. De Bosscher, K., Hill, C. S., and Nicolas, F. J., *Molecular and functional consequences of Smad4 C-terminal missense mutations in colorectal tumour cells*. *Biochem J*, 2004. **379**(Pt 1): p. 209-16.
26. De Pinieux, G., Flam, T., Zerbib, M., Taupin, P., Bellahcene, A., Waltregny, D., Vieillefond, A., and Poupon, M. F., *Bone sialoprotein, bone morphogenetic protein 6 and thymidine phosphorylase expression in localized human prostatic adenocarcinoma as predictors of clinical*

- outcome: a clinicopathological and immunohistochemical study of 43 cases.* J Urol, 2001. **166**(5): p. 1924-30.
27. Dotsika, E. N. and Sanderson, C. J., *A fluorometric assay for determining cell growth in lymphocyte proliferation and lymphokine assays.* J Immunol Methods, 1987. **105**(1): p. 55-62.
 28. Drews, U., Ebensperger, C., and Wolf, U., *An in vitro model of gonad differentiation in the chick embryo. Roller cultures in gas permeable biofoil bags.* Anat Embryol (Berl), 1988. **178**(6): p. 529-36.
 29. Du, J., Yang, S., Wang, Z., Zhai, C., Yuan, W., Lei, R., Zhang, J., and Zhu, T., *Bone morphogenetic protein 6 inhibit stress-induced breast cancer cells apoptosis via both Smad and p38 pathways.* J Cell Biochem, 2008. **103**(5): p. 1584-97.
 30. Dummer, R. and Flaherty, K. T., *Resistance patterns with tyrosine kinase inhibitors in melanoma: new insights.* Curr Opin Oncol, 2012. **24**(2): p. 150-4.
 31. Eigentler, T. K., Caroli, U. M., Radny, P., and Garbe, C., *Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials.* Lancet Oncol, 2003. **4**(12): p. 748-59.
 32. Eigentler, T. K., Buettner, P. G., Leiter, U., and Garbe, C., *Impact of ulceration in stages I to III cutaneous melanoma as staged by the American Joint Committee on Cancer Staging System: an analysis of the German Central Malignant Melanoma Registry.* J Clin Oncol, 2004. **22**(21): p. 4376-83.
 33. Feng, X. H. and Derynck, R., *Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 659-93.
 34. Fidler, I. J., *Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo.* Cancer Res, 1975. **35**(1): p. 218-24.
 35. Fischer, A. N., Herrera, B., Mikula, M., Proell, V., Fuchs, E., Gotzmann, J., Schulte-Hermann, R., Beug, H., and Mikulits, W., *Integration of Ras subeffector signaling in TGF-beta mediated late stage hepatocarcinogenesis.* Carcinogenesis, 2005. **26**(5): p. 931-42.

36. Flaherty, K. T., Puzanov, I., Kim, K. B., Ribas, A., McArthur, G. A., Sosman, J. A., O'Dwyer, P. J., Lee, R. J., Grippo, J. F., Nolop, K., and Chapman, P. B., *Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(9): p. 809-19.
37. Flaherty, K. T. and Fisher, D. E., *New strategies in metastatic melanoma: oncogene-defined taxonomy leads to therapeutic advances*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(15): p. 4922-8.
38. Furthauer, M., Thisse, B., and Thisse, C., *Three different noggin genes antagonize the activity of bone morphogenetic proteins in the zebrafish embryo*. Dev Biol, 1999. **214**(1): p. 181-96.
39. Garbe, C., Paul, A., Kohler-Spath, H., Ellwanger, U., Stroebel, W., Schwarz, M., Schlagenhaupt, B., Meier, F., Schitteck, B., Blaheta, H. J., Blum, A., and Rassner, G., *Prospective evaluation of a follow-up schedule in cutaneous melanoma patients: recommendations for an effective follow-up strategy*. J Clin Oncol, 2003. **21**(3): p. 520-9.
40. Gazzero, E. and Canalis, E., *Bone morphogenetic proteins and their antagonists*. Rev Endocr Metab Disord, 2006. **7**(1-2): p. 51-65.
41. Giordano, A., Fucito, A., Romano, G., and Marino, I. R., *Carcinogenesis and environment: the cancer stem cell hypothesis and implications for the development of novel therapeutics and diagnostics*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 3475-82.
42. Graff, J. M., *Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that is the question*. Cell, 1997. **89**(2): p. 171-4.
43. Greenburg, G. and Hay, E. D., *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells*. J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 333-9.
44. Groppe, J., Greenwald, J., Wiaters, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W. W., Belmonte, J. C., and Choe, S., *Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin*. Nature, 2002. **420**(6916): p. 636-42.

45. Hamburger, V. and Hamilton, H. L., *A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951.* Dev Dyn, 1992. **195**(4): p. 231-72.
46. Hassel, S., Schmitt, S., Hartung, A., Roth, M., Nohe, A., Petersen, N., Ehrlich, M., Henis, Y. I., Sebald, W., and Knaus, P., *Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes.* J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A Suppl 3**: p. 44-51.
47. Hay, E. D., *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it.* Dev Dyn, 2005. **233**(3): p. 706-20.
48. Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Chu, Y. W., Seftor, R. E., Nagle, R. B., McDaniel, K. M., Leong, S. P., Yohem, K. H., Leibovitz, A. M., Meyskens, F. L., Jr., and et al., *Coexpression of vimentin and keratins by human melanoma tumor cells: correlation with invasive and metastatic potential.* J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(3): p. 165-74.
49. Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Meltzer, P. S., Gardner, L. M., Hess, A. R., Kirschmann, D. A., Schatteman, G. C., and Seftor, R. E., *Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 8018-23.
50. Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Hess, A. R., and Seftor, R. E., *Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 411-21.
51. Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Seftor, R. E., Kasemeier-Kulesa, J., Kulesa, P. M., and Postovit, L. M., *Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments.* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 246-55.
52. Herrera, B., van Dinther, M., Ten Dijke, P., and Inman, G. J., *Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation.* Cancer Res, 2009. **69**(24): p. 9254-62.
53. Hjelmeland, M. D., Hjelmeland, A. B., Sathornsumetee, S., Reese, E. D., Herbstreith, M. H., Laping, N. J., Friedman, H. S., Bigner, D. D., Wang,

- X. F., and Rich, J. N., *SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility*. *Mol Cancer Ther*, 2004. **3**(6): p. 737-45.
54. Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A., and Urba, W. J., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(8): p. 711-23.
55. Hoek, K. S., Schlegel, N. C., Brafford, P., Sucker, A., Ugurel, S., Kumar, R., Weber, B. L., Nathanson, K. L., Phillips, D. J., Herlyn, M., Schadendorf, D., and Dummer, R., *Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature*. *Pigment Cell Res*, 2006. **19**(4): p. 290-302.
56. Hogan, B. L., *Bone morphogenetic proteins in development*. *Curr Opin Genet Dev*, 1996. **6**(4): p. 432-8.
57. Hsu, M. Y., Rovinsky, S., Penmatcha, S., Herlyn, M., and Muirhead, D., *Bone morphogenetic proteins in melanoma: angel or devil?* *Cancer Metastasis Rev*, 2005. **24**(2): p. 251-63.
58. Hueng, D. Y., Lin, G. J., Huang, S. H., Liu, L. W., Ju, D. T., Chen, Y. W., Sytwu, H. K., Chang, C., Huang, S. M., Yeh, Y. S., Lee, H. M., and Ma, H. I., *Inhibition of Nodal suppresses angiogenesis and growth of human gliomas*. *J Neurooncol*, 2011. **104**(1): p. 21-31.
59. Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J., and Hill, C. S., *SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7*. *Mol Pharmacol*, 2002. **62**(1): p. 65-74.
60. James, D., Levine, A. J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A., *TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of*

- pluripotency in human embryonic stem cells*. *Development*, 2005. **132**(6): p. 1273-82.
61. Jin, Y., Tipoe, G. L., Liong, E. C., Lau, T. Y., Fung, P. C., and Leung, K. M., *Overexpression of BMP-2/4, -5 and BMPR-IA associated with malignancy of oral epithelium*. *Oral Oncol*, 2001. **37**(3): p. 225-33.
 62. Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Yamashita, M., Ino, K., Nawa, A., and Kikkawa, F., *Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells*. *Int J Oncol*, 2007. **31**(2): p. 277-83.
 63. Kang, Y., Chen, C. R., and Massague, J., *A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells*. *Mol Cell*, 2003. **11**(4): p. 915-26.
 64. Kim, M. and Choe, S., *BMPs and their clinical potentials*. *BMB Rep*, 2011. **44**(10): p. 619-34.
 65. Kleeff, J., Maruyama, H., Ishiwata, T., Sawhney, H., Friess, H., Buchler, M. W., and Korc, M., *Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo*. *Gastroenterology*, 1999. **116**(5): p. 1202-16.
 66. Korchynskyi, O. and ten Dijke, P., *Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4883-91.
 67. Krebs, L. T., Iwai, N., Nonaka, S., Welsh, I. C., Lan, Y., Jiang, R., Saijoh, Y., O'Brien, T. P., Hamada, H., and Gridley, T., *Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression*. *Genes Dev*, 2003. **17**(10): p. 1207-12.
 68. Krishan, A., *Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining*. *J Cell Biol*, 1975. **66**(1): p. 188-93.
 69. Krochmann, J., Sinnberg, T., Meier, F., Garbe, C., and Busch, C., *Melanoma cells in distinct growth phases retain specific invasive qualities*

- during brain metastasis *in vivo*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2012. **25**(1): p. 113-4.
70. Kuphal, S., Palm, H. G., Poser, I., and Bosserhoff, A. K., *Snail-regulated genes in malignant melanoma*. *Melanoma Res*, 2005. **15**(4): p. 305-13.
71. Kuphal, S. and Bosserhoff, A. K., *Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma*. *Oncogene*, 2006. **25**(2): p. 248-59.
72. Langenfeld, E. M., Calvano, S. E., Abou-Nukta, F., Lowry, S. F., Amenta, P., and Langenfeld, J., *The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells*. *Carcinogenesis*, 2003. **24**(9): p. 1445-54.
73. Langenfeld, E. M. and Langenfeld, J., *Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors*. *Mol Cancer Res*, 2004. **2**(3): p. 141-9.
74. Lasithiotakis, K. G., Leiter, U., Gorkiewicz, R., Eigentler, T., Breuninger, H., Metzler, G., Strobel, W., and Garbe, C., *The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003*. *Cancer*, 2006. **107**(6): p. 1331-9.
75. Laurikkala, J., Kassai, Y., Pakkasjarvi, L., Thesleff, I., and Itoh, N., *Identification of a secreted BMP antagonist, ectodin, integrating BMP, FGF, and SHH signals from the tooth enamel knot*. *Dev Biol*, 2003. **264**(1): p. 91-105.
76. Lawrence, M. G., Margaryan, N. V., Loessner, D., Collins, A., Kerr, K. M., Turner, M., Seftor, E. A., Stephens, C. R., Lai, J., Postovit, L. M., Clements, J. A., and Hendrix, M. J., *Reactivation of embryonic nodal signaling is associated with tumor progression and promotes the growth of prostate cancer cells*. *Prostate*, 2011.
77. Le Good, J. A., Joubin, K., Giraldez, A. J., Ben-Haim, N., Beck, S., Chen, Y., Schier, A. F., and Constam, D. B., *Nodal stability determines signaling range*. *Curr Biol*, 2005. **15**(1): p. 31-6.

78. Leiter, U., Buettner, P. G., Eigentler, T. K., and Garbe, C., *Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society*. J Clin Oncol, 2004. **22**(18): p. 3660-7.
79. Liguori, G. L., Borges, A. C., D'Andrea, D., Liguoro, A., Goncalves, L., Salgueiro, A. M., Persico, M. G., and Belo, J. A., *Cripto-independent Nodal signaling promotes positioning of the A-P axis in the early mouse embryo*. Dev Biol, 2008. **315**(2): p. 280-9.
80. Malchenko, S., Galat, V., Seftor, E. A., Vanin, E. F., Costa, F. F., Seftor, R. E., Soares, M. B., and Hendrix, M. J., *Cancer hallmarks in induced pluripotent cells: new insights*. J Cell Physiol, 2010. **225**(2): p. 390-3.
81. Massague, J., Seoane, J., and Wotton, D., *Smad transcription factors*. Genes Dev, 2005. **19**(23): p. 2783-810.
82. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-30.
83. Masuda, H., Fukabori, Y., Nakano, K., Takezawa, Y., T, C. S., and Yamanaka, H., *Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer*. Prostate, 2003. **54**(4): p. 268-74.
84. McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M., and McMahon, A. P., *Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite*. Genes Dev, 1998. **12**(10): p. 1438-52.
85. Meier, F., Nesbit, M., Hsu, M. Y., Martin, B., Van Belle, P., Elder, D. E., Schaumburg-Lever, G., Garbe, C., Walz, T. M., Donatien, P., Crombleholme, T. M., and Herlyn, M., *Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF*. Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 193-200.
86. Minard, M. E., Ellis, L. M., and Gallick, G. E., *Tiam1 regulates cell adhesion, migration and apoptosis in colon tumor cells*. Clin Exp Metastasis, 2006. **23**(5-6): p. 301-13.
87. Miyazono, K., Kusanagi, K., and Inoue, H., *Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling*. J Cell Physiol, 2001. **187**(3): p. 265-76.

88. Newgreen, D. F. and Minichiello, J., *Control of epitheliomesenchymal transformation. I. Events in the onset of neural crest cell migration are separable and inducible by protein kinase inhibitors.* Dev Biol, 1995. **170**(1): p. 91-101.
89. Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y. I., and Knaus, P., *The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways.* J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5330-8.
90. Norris, D. P. and Robertson, E. J., *Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements.* Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1575-88.
91. Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J., and Niehrs, C., *Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI.* Nature, 1999. **401**(6752): p. 480-5.
92. Oppitz, M., Pintaske, J., Kehlbach, R., Schick, F., Schriek, G., and Busch, C., *Magnetic resonance imaging of iron-oxide labeled SK-Mel 28 human melanoma cells in the chick embryo using a clinical whole body MRI scanner.* MAGMA, 2007. **20**(1): p. 1-9.
93. Oppitz, M., Busch, C., Schriek, G., Metzger, M., Just, L., and Drews, U., *Non-malignant migration of B16 mouse melanoma cells in the neural crest and invasive growth in the eye cup of the chick embryo.* Melanoma Res, 2007. **17**(1): p. 17-30.
94. Paine-Saunders, S., Viviano, B. L., Economides, A. N., and Saunders, S., *Heparan sulfate proteoglycans retain Noggin at the cell surface: a potential mechanism for shaping bone morphogenetic protein gradients.* J Biol Chem, 2002. **277**(3): p. 2089-96.
95. Piccirillo, S. G., Reynolds, B. A., Zanetti, N., Lamorte, G., Binda, E., Broggi, G., Brem, H., Olivi, A., Dimeco, F., and Vescovi, A. L., *Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells.* Nature, 2006. **444**(7120): p. 761-5.
96. Postovit, L. M., Margaryan, N. V., Seftor, E. A., Kirschmann, D. A., Lipavsky, A., Wheaton, W. W., Abbott, D. E., Seftor, R. E., and Hendrix,

- M. J., *Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4329-34.
97. Raya, A., Kawakami, Y., Rodriguez-Esteban, C., Buscher, D., Koth, C. M., Itoh, T., Morita, M., Raya, R. M., Dubova, I., Bessa, J. G., de la Pompa, J. L., and Izpisua Belmonte, J. C., *Notch activity induces Nodal expression and mediates the establishment of left-right asymmetry in vertebrate embryos*. Genes Dev, 2003. **17**(10): p. 1213-8.
98. Reddi, A. H., *BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(3): p. 249-50.
99. Reissmann, E., Jornvall, H., Blokzijl, A., Andersson, O., Chang, C., Minchiotti, G., Persico, M. G., Ibanez, C. F., and Brivanlou, A. H., *The orphan receptor ALK7 and the Activin receptor ALK4 mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development*. Genes Dev, 2001. **15**(15): p. 2010-22.
100. Ro, T. B., Holt, R. U., Brenne, A. T., Hjorth-Hansen, H., Waage, A., Hjertner, O., Sundan, A., and Borset, M., *Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells*. Oncogene, 2004. **23**(17): p. 3024-32.
101. Rose, N. L., Palcic, M. M., Shapiro, A. M., and Lakey, J. R., *An evaluation of endogenous pancreatic enzyme levels following enzymatic digestion*. Transplant Proc, 2003. **35**(7): p. 2458-60.
102. Rothhammer, T., Poser, I., Soncin, F., Bataille, F., Moser, M., and Bosserhoff, A. K., *Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration*. Cancer Res, 2005. **65**(2): p. 448-56.
103. Rothhammer, T., Wild, P. J., Meyer, S., Bataille, F., Pauer, A., Klinkhammer-Schalke, M., Hein, R., Hofstaedter, F., and Bosserhoff, A. K., *Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) expression is a potential novel prognostic marker for recurrence in patients with primary melanoma*. Cancer Biomark, 2007. **3**(2): p. 111-7.

104. Rothhammer, T., Bataille, F., Spruss, T., Eissner, G., and Bosserhoff, A. K., *Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma*. *Oncogene*, 2007. **26**(28): p. 4158-70.
105. Saijoh, Y., Oki, S., Tanaka, C., Nakamura, T., Adachi, H., Yan, Y. T., Shen, M. M., and Hamada, H., *Two nodal-responsive enhancers control left-right asymmetric expression of Nodal*. *Dev Dyn*, 2005. **232**(4): p. 1031-6.
106. Schier, A. F. and Shen, M. M., *Nodal signalling in vertebrate development*. *Nature*, 2000. **403**(6768): p. 385-9.
107. Schier, A. F., *Nodal signaling in vertebrate development*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003. **19**: p. 589-621.
108. Schitteck, B., Psenner, K., Sauer, B., Meier, F., Iftner, T., and Garbe, C., *The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(10): p. 2110-8.
109. Schriek, G., Oppitz, M., Busch, C., Just, L., and Drews, U., *Human SK-Mel 28 melanoma cells resume neural crest cell migration after transplantation into the chick embryo*. *Melanoma Res*, 2005. **15**(4): p. 225-34.
110. Sela-Donenfeld, D. and Kalcheim, C., *Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube*. *Development*, 1999. **126**(21): p. 4749-62.
111. Shah, A. N., Summy, J. M., Zhang, J., Park, S. I., Parikh, N. U., and Gallick, G. E., *Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells*. *Ann Surg Oncol*, 2007. **14**(12): p. 3629-37.
112. Shen, M. M., *Nodal signaling: developmental roles and regulation*. *Development*, 2007. **134**(6): p. 1023-34.
113. Shi, Y. and Massague, J., *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. *Cell*, 2003. **113**(6): p. 685-700.
114. Singh, A. and Morris, R. J., *The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. **21**(4): p. 299-313.

115. Smith, W. C. and Harland, R. M., *Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos*. Cell, 1992. **70**(5): p. 829-40.
116. Smith, W. C., McKendry, R., Ribisi, S., Jr., and Harland, R. M., *A nodal-related gene defines a physical and functional domain within the Spemann organizer*. Cell, 1995. **82**(1): p. 37-46.
117. Strizzi, L., Postovit, L. M., Margaryan, N. V., Lipavsky, A., Gadiot, J., Blank, C., Seftor, R. E., Seftor, E. A., and Hendrix, M. J., *Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention*. Expert Rev Dermatol, 2009. **4**(1): p. 67-78.
118. Tabibzadeh, S., *Homeostasis of extracellular matrix by TGF-beta and lefty*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d1231-46.
119. Taylor, I. W. and Wrana, J. L., *SnapShot: The TGFbeta pathway interactome*. Cell, 2008. **133**(2): p. 378 e1.
120. Thiery, J. P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
121. Thomas, B. G. and Hamdy, F. C., *Bone morphogenetic protein-6: potential mediator of osteoblastic metastases in prostate cancer*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2000. **3**(4): p. 283-285.
122. Tian, T. and Burrage, K., *Stochastic models for regulatory networks of the genetic toggle switch*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8372-7.
123. Topczewska, J. M., Postovit, L. M., Margaryan, N. V., Sam, A., Hess, A. R., Wheaton, W. W., Nickoloff, B. J., Topczewski, J., and Hendrix, M. J., *Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness*. Nat Med, 2006. **12**(8): p. 925-32.
124. Vallier, L., Reynolds, D., and Pedersen, R. A., *Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway*. Dev Biol, 2004. **275**(2): p. 403-21.
125. Valyi-Nagy, I. T., Hirka, G., Jensen, P. J., Shih, I. M., Juhasz, I., and Herlyn, M., *Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology,*

- and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. Lab Invest, 1993. 69(2): p. 152-9.*
126. Vincent, S. D., Norris, D. P., Le Good, J. A., Constam, D. B., and Robertson, E. J., *Asymmetric Nodal expression in the mouse is governed by the combinatorial activities of two distinct regulatory elements. Mech Dev, 2004. 121(11): p. 1403-15.*
 127. Vo, B. T. and Khan, S. A., *Expression of nodal and nodal receptors in prostate stem cells and prostate cancer cells: Autocrine effects on cell proliferation and migration. Prostate, 2011.*
 128. von Bubnoff, A. and Cho, K. W., *Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? Dev Biol, 2001. 239(1): p. 1-14.*
 129. Wagner, D. O., Sieber, C., Bhushan, R., Borgermann, J. H., Graf, D., and Knaus, P., *BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. Sci Signal, 2010. 3(107): p. mr1.*
 130. Whitman, M., *Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. Genes Dev, 1998. 12(16): p. 2445-62.*
 131. Wijgerde, M., Karp, S., McMahon, J., and McMahon, A. P., *Noggin antagonism of BMP4 signaling controls development of the axial skeleton in the mouse. Dev Biol, 2005. 286(1): p. 149-57.*
 132. Yauch, R. L., Januario, T., Eberhard, D. A., Cavet, G., Zhu, W., Fu, L., Pham, T. Q., Soriano, R., Stinson, J., Seshagiri, S., Modrusan, Z., Lin, C. Y., O'Neill, V., and Amler, L. C., *Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. Clin Cancer Res, 2005. 11(24 Pt 1): p. 8686-98.*
 133. Yeo, C. and Whitman, M., *Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. Mol Cell, 2001. 7(5): p. 949-57.*
 134. Zhang, H. and Bradley, A., *Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. Development, 1996. 122(10): p. 2977-86.*

135. Zhou, B. P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M., and Hung, M. C., *Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(10): p. 931-40.
136. Zhou, X. P., Woodford-Richens, K., Lehtonen, R., Kurose, K., Aldred, M., Hampel, H., Launonen, V., Virta, S., Pilarski, R., Salovaara, R., Bodmer, W. F., Conrad, B. A., Dunlop, M., Hodgson, S. V., Iwama, T., Jarvinen, H., Kellokumpu, I., Kim, J. C., Leggett, B., Markie, D., Mecklin, J. P., Neale, K., Phillips, R., Piris, J., Rozen, P., Houlston, R. S., Aaltonen, L. A., Tomlinson, I. P., and Eng, C., *Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(4): p. 704-11.
137. Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., and Harland, R. M., *The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4*. Cell, 1996. **86**(4): p. 599-606.
138. Zouboulis, C. C., Garbe, C., Krasagakis, K., Kruger, S., and Orfanos, C. E., *A fluorometric rapid microassay to identify anti-proliferative compounds for human melanoma cells in vitro*. Melanoma Res, 1991. **1**(2): p. 91-5.
139. Zwijsen, A., Verschueren, K., and Huylebroeck, D., *New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 133-9.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken die am Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beteiligt waren:

An erster Stelle möchte Herrn Prof. Dr. med. Claus Garbe für die Ermöglichung der Rahmenbedingungen und für die geduldige Betreuung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. med. Christian Busch möchte ich für die stetige Motivation, die vielen Diskussionen und Hilfestellungen beim Entstehen dieser Arbeit und das stets offene Ohr für Probleme aller Art danken.

Ebenso sei an dieser Stelle allen Mitarbeitern des Labors für dermatologische Onkologie der Universitätshautklinik Tübingen, insbesondere seien hier Dr. rer. nat. Tobias Sinnberg und Dipl. Biol. Heike Niessner genannt, für die Integration in das Laborteam und die Einführung und Unterstützung bei sämtlichen Labortätigkeiten gedankt.

Nicht zuletzt danke ich ganz besonders meiner Familie, welche während der gesamten Zeit dieser Arbeit hinter mir gestanden, mich unterstützt und mir gut zugesprochen hat.

Ebenso verdanke ich meinen Freunden stetige Motivation.

Zum Schluss möchte ich allen Menschen danken die hier nicht namentlich erwähnt wurden, jedoch auf Ihre Art ebenfalls zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Tabellarischer Lebenslauf

PERSÖNLICHE INFORMATION

Name: Christoph Maia Dettweiler

Geburtsdatum: 13.12.1980

Geburtsort: Sao Paulo, Brasilien

AUSBILDUNG

- | | |
|----------------------|--|
| 09/2013-heute | Arzt in Weiterbildung für Innere Medizin,
St. Josephs Krankenhaus Tempelhof
Medizinische Klinik I
Schwerpunkt für Gastroenterologie, Hepatologie,
Onkologie und Diabetologie |
| 01/13-07/2013 | Arzt in Weiterbildung für Innere Medizin,
DRK Klinik Köpenick
Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin |
| 2009-2013 | Arzt in Weiterbildung für Innere Medizin,
Helios Klinikum Berlin-Buch
Abteilung für Hämatologie, Onkologie und
Tumorimmunologie |
| 23.06.2009 | Ärztliche Prüfung |
| 2004 - 2009 | Universität Tübingen
Studium der Humanmedizin |
| 2002 – 2004 | Ignaz Semmelweis Universität Budapest (Ungarn)
Studium der Humanmedizin (Vorklinik) |
| 1993 – 2001 | Waldoberschule - Gymnasium Berlin
Abschluss Abitur |
| 1997 – 1998 | MPCG - Highschool in Mayville, North Dakota
(U.S.A)
Highschool - Jahr und Highschool - Diplom |
| 1987 – 1993 | Grundschule am Ritterfeld Berlin |