

**Tumor-Matrix Interaktionen: Ihre Bedeutung für die Regulation der  
lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin B am Beispiel des malignen  
Melanoms**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Anke Klose**

aus Solingen

2005

Berichterstatter:

**Prof. Dr. Thomas Krieg**

**Prof. Dr. Helmut W. Klein**

Vorsitzender:

**Prof. Dr. Thomas Langer**

Tag der mündlichen Prüfung:

**8. Juni 2005**

*Für meine Eltern*

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>5</b>
2.1	Einleitung .....	5
2.1.1	Aufbau der humanen Haut .....	5
2.1.2	Das maligne Melanom und seine genetische Progression .....	7
2.1.3	Invasion und Metastasierung.....	11
2.1.3.1	Die Rolle von Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen bei der Invasion und der Proteolyse des Bindegewebes .....	12
2.1.4	Lysosomale Cysteinproteasen .....	15
2.1.5	Physiologische Funktionen der Cathepsine.....	16
2.1.6	Struktur, Mechanismus und Spezifität der Cathepsine .....	17
2.1.7	Regulation der Enzymaktivität .....	21
2.1.8	Alternative <i>trafficking</i> Mechanismen der Cathepsine in Tumorzellen .....	24
2.1.9	Cathepsine und das maligne Melanom .....	25
2.2	Fragestellung .....	27
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>29</b>
3.1	Immunohistochemischer Nachweis von Cathepsin B in humanen benignen Pigmentnävi, malignen Melanomen und Metastasen.....	29
3.2	Charakterisierung der Invasivität verschiedener Melanomzelllinien in vitro und die Rolle lysosomaler Cysteinproteasen bzw. MMPs bei der Degradation extrazellulärer Matrix .....	31
3.2.1	Das Invasionsverhalten der Melanomzelllinien durch das dermale Bindegewebe und die Basalmembran deepidermisierter humaner Dermis .....	32
3.2.2	Immunohistochemischer Nachweis der Basalmembran der Komposite.....	34
3.2.3	Analyse der gelatinolytischen Aktivität mittels <i>in situ</i> Zymographie .....	36
3.2.4	Spezifische Inhibition proteolytisch aktiver MMPs und Cathepsine .....	40
3.2.5	Hemmung der Melanomzellinvasion durch die Basalmembran deepidermisierter Dermis in Anwesenheit spezifischer Cathepsin-Inhibitoren .....	41
3.2.6	Immunohistochemischer Nachweis von Cathepsin B in MV3 und WM164 Zellen.....	43
3.3	Molekulare Analysen der Expression und zellulären Lokalisation von Cathepsin B und seiner endogenen Inhibitoren Cystatin A, B und C in Melanomzelllinien mit unterschiedlich invasiver Kapazität .....	45
3.3.1	Northern Blot Analysen der Cathepsin B mRNA Expression .....	45
3.3.2	Analyse der Cathepsin B Proteinexpression .....	47
3.3.3	Die Expression und Lokalisation der endogenen Inhibitoren Cystatin A, B und C.....	50
3.3.4	Untersuchungen der extrazellulären Procathepsin B Prozessierung.....	54
3.3.5	Die Rolle von $\beta$ 1 Integrinen bei der Procathepsin B Prozessierung bzw. Ausschleusung reifer Cathepsin B Formen.....	56
3.3.5.1	Die Expression der $\alpha$ 11-Integrinuntereinheit in Melanomzellen .....	60
3.4	Identifizierung gelatinolytisch aktiver Cathepsine in Überständen hoch-invasiver MV3 Zellen.....	62
3.4.1	Die Zeitabhängigkeit der Cathepsin B spezifischen Gelatinolyse .....	64
3.4.2	Immunologischer Nachweis der gelatinolytisch aktiven Cathepsin B Formen .....	67
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>70</b>
4.1	Die Charakterisierung der Invasivität der Melanomzelllinien MV3, SKmel28, SKmel23 und WM164 in vitro.....	70
4.2	Die Rolle aktiver Cathepsine und MMPs bei der Invasion durch die Basalmembran und die Dermis humaner Hautkomposite .....	71

4.3	Der Einfluss Zell-Matrix vermittelter Regulationsmechanismen auf die Expression und zelluläre Lokalisation des Cathepsin B .....	73
4.4	Die Rolle von Zell-Kollagen I Interaktionen bei der Procathepsin B Prozessierung bzw. Exocytose reifer Cathepsin B Formen .....	75
4.5	Die Rolle von $\beta$ 1-Integrinen bei der über Zell-Kollagen I Interaktionen vermittelten Cathepsin B Sekretion .....	76
4.6	Zell-Matrix vermittelte Mechanismen regulieren die Expression und zelluläre Lokalisation endogener Cathepsin B Inhibitoren .....	79
4.7	Die Detektion der extrazellulären, gelatinolytisch aktiven Cathepsine B und L in hoch-invasiven Melanomzellen mittels LDS-Zymographie .....	82
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG – ABSTRACT .....</b>	<b>86</b>
5.1	Zusammenfassung.....	86
5.2	Abstract .....	88
<b>6</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>90</b>
6.1	Materialien.....	90
6.1.1	Chemikalien.....	90
6.1.2	Gewebe .....	90
6.1.3	Zellkulturmaterialien .....	90
6.1.4	Kits und weitere Materialien .....	90
6.1.5	Lösungen und Puffer .....	91
6.1.6	Antikörper .....	92
6.1.7	Proteine und Enzyme .....	93
6.1.8	Oligonucleotide.....	94
6.2	Methoden .....	94
6.2.1	Zellbiologische Methoden.....	94
6.2.1.1	Zellkulturen .....	94
6.2.1.2	Kultivierung von Zellen auf einer Kollagenbeschichtung und in dreidimensionalen Kollagengelen..	95
6.2.2	Invasion von Melanomzelllinien in deepidermisierte humane Haut .....	96
6.2.3	Immunohistochemische Methoden .....	97
6.2.4	Molekularbiologische Methoden .....	97
6.2.4.1	RNA Isolation.....	97
6.2.4.2	Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) .....	98
6.2.4.3	Radioaktive DNA Markierung .....	98
6.2.4.4	Northern Blot Analyse .....	99
6.2.5	Proteinbiochemische Methoden .....	100
6.2.5.1	Präparation der Zellüberstände, Zellysate und Plasmamembranen.....	100
6.2.5.2	SDS-PAGE und Western / Immunoblot Analyse.....	100
6.2.5.3	Lithium Dodecylphosphat (LDS)-PAGE und -Zymographie .....	101
6.2.5.4	<i>In situ</i> Zymographie.....	102
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>104</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

<b>1D, 2D, 3D</b>	Ein- / Zwei- / Dreidimensional
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ADAM</b>	A Disintegrin And Metalloproteinase
<b>bp, kbp</b>	Basenpaare, Kilobasenpaare
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	Circa
<b>CA-074</b>	(L-3- <i>trans</i> -propylcarbamoyloxiran-2-carbonyl)-L-Isoleucyl-L-prolin
<b>Cat</b>	Cathepsin
<b>cDNA</b>	DNA-Kopie der mRNA
<b>Da, kDa</b>	Dalton, Kilodalton
<b>d. h.</b>	das heißt
<b>DNA</b>	Desoxiribonucleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E-64</b>	<i>trans</i> -epoxysuccinyl-L-leucylamino-(4-guanidino)-butane
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ECM</b>	extrazelluläre Matrix
<b>et al.</b>	et aliter
<b>g</b>	Erdbeschleunigung, $9,81\text{ms}^{-2}$
<b>h</b>	Stunde
<b>h-dc</b>	heavy-chain of the double-chain form
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>Kap.</b>	Kapitel
<b>l-dc</b>	light-chain of the double-chain form
<b>LDS</b>	Lithiumdodecylsulfat
<b>LDS-PAGE</b>	LDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>M</b>	mol/l
<b>MBq</b>	Megabequarel
<b>min</b>	Minute
<b>ML</b>	Monolayer
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase
<b>MT-MMP</b>	Membran-Typ-MMP

---

<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>nm</b>	Nanometer
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>pH</b>	potentium hydrogenii
<b>ProCat</b>	Procathepsin
<b>RNA</b>	Ribonucleinsäure
<b>RNase A</b>	Ribonuclease A
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
<b>s.</b>	siehe
<b>s.a.</b>	siehe auch
<b>s.o.</b>	siehe oben
<b>sc</b>	single-chain
<b>sec</b>	Sekunde
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TBq</b>	Terabequar
<b>TIMP</b>	tissue inhibitor of MMPs
<b>tPa</b>	tissue type plasminogen activator
<b>uPa</b>	urokinase type plasminogen activator
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>v/v</b>	volume / volume, ml Volumen in 100ml Gesamtvolumen
<b>W</b>	Watt
<b>w/v</b>	weight / volume, g Substanz in 100ml Gesamtvolumen
<b>X</b>	beliebige Aminosäure
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>Z-FY-CHO</b>	N-(benzyloxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-tyrosinal
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

## 2 Einleitung und Fragestellung

### 2.1 Einleitung

#### 2.1.1 Aufbau der humanen Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und besteht aus drei Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis.

Die **Epidermis** ist ein geschichtetes, verhorntes Plattenepithel, ektodermaler Herkunft, und dient hauptsächlich als Schutzbarriere. Sie besteht zu 90% aus Keratinozyten und beherbergt das Immunsystem der Haut (Langerhans-Zellen), pigmentbildende Zellen (Melanozyten) und Merkel-Zellen (s. Abb. 2.1). Als klassisches Proliferationsgewebe unterliegt die Epidermis einer dauernden Erneuerung. Die Keratinozyten entstehen aus Stammzellen der Basalschicht, durchwandern die Epidermis und bilden, terminal differenziert, die toten Korneozyten der Hornschicht (Sitz der Barrierefunktion).

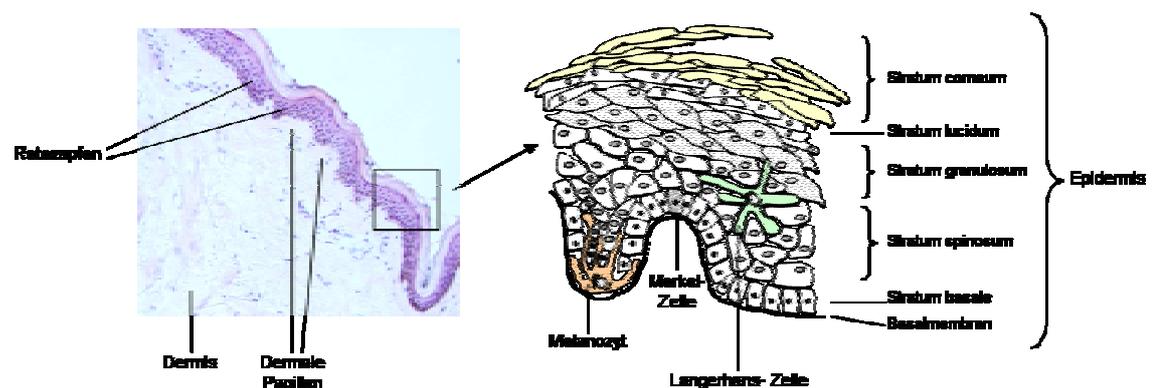


Abbildung 2.1: H&E-Färbung humaner Normalhaut - Aufbau der Epidermis

Die Grenzfläche zwischen Epidermis und **Dermis** bezeichnet man als **Dermoepidermale Junctionszone** bzw. Basalmembranzzone (s. Abb. 2.2). Basalmembranen sind ubiquitäre, extrazelluläre Matrixstrukturen, die unterschiedliche Gewebe trennen und als Grenzmembranen den Austausch von Molekülen und Zellen kontrollieren. Sie sind komplex aufgebaut und bestehen aus einer Vielzahl kollagener und nicht-kollagener Glykoproteinen, hauptsächlich Kollagen IV, Perlekan, Laminin und Nidogen, die durch multiple Interaktionen ein makromolekulares Gerüst bilden. Basalmembranen erfüllen diverse Funktionen; in den Glomeruli der Niere z. B. übernimmt eine ungewöhnlich dicke Basalmembran die Aufgabe eines molekularen Filters und verhindert die Passage von Makromolekülen aus dem Blut in den Urin.

Die Basalmembran kann auch als eine selektive Barriere bei der Zellbewegung fungieren. Unterhalb des Epithels verhindert sie den Kontakt von Epithelzellen zu Fibroblasten des unterliegenden Bindegewebes. Unter normalen Bedingungen sind Basalmembranen für große Proteine impermeabel und beeinhalteten für Zellen keine Passagewege. Während der Umbildung von Gewebe oder invasiven Prozessen, wie der Inflammation, Wundheilung, Angiogenese und Neoplasie, können sie jedoch lokal für sich bewegende Zellen permeabel werden. Bei einer Verletzung von Muskel-, Nerven- oder Epithelgewebe bildet die Basalmembran ein Gerüst, entlang dem die regenerierenden Zellen migrieren können, wodurch die Gewebearchitektur regeneriert wird. Maligne Tumore zeigen übereinstimmend an den Stellen, wo Tumorzellen in das unterliegende Stroma invadieren, eine defekte Basalmembran auf. Eine defekte Organisation der Basalmembran kann das Resultat (1) einer verringerten Synthese der Basalmembranbestandteile (2) einer abnormalen Anordnung ihrer Komponenten (3) einer erhöhten Degradation ihrer Bestandteile sein oder durch eine Kombination dieser drei Mechanismen entstehen (Mignatti und Rifkin, 1993).

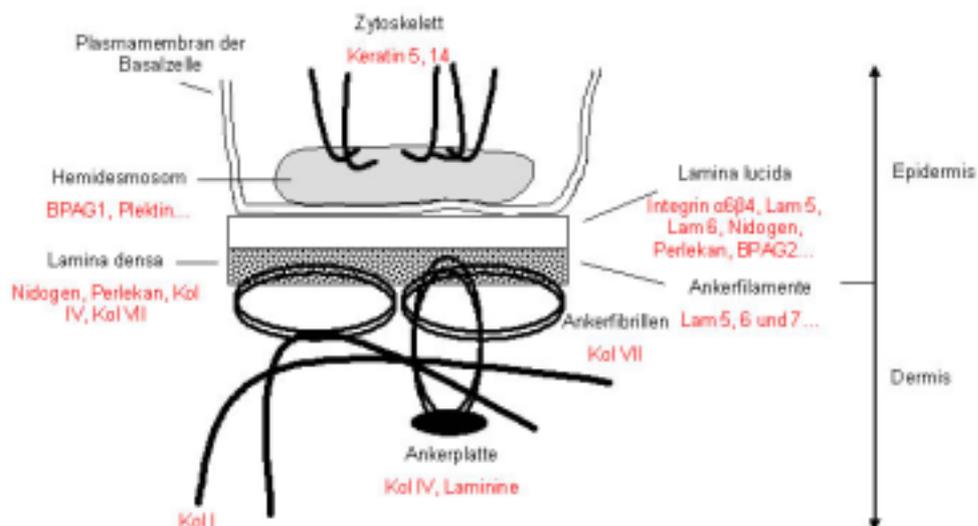


Abbildung 2.2: Dermoepidermale Junctionszone; **Lam**, Laminin; **Kol**, Kollagen; **BPAG**, bullöses Pemphigoid-Antigen; Abbildung modifiziert nach Borradori et al., 1990.

Die der Basalmembran unterliegende Dermis ist das bindegewebige Gerüst der Haut und gleichzeitig deren Versorgungsteil (Träger der Gefäße und Nerven). Dermale Zellen, hauptsächlich Fibroblasten, aber auch Histiozyten, Mastzellen, mikrovaskuläre Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Epithelzellen der Hautanhangsgebilde (s. u.) und ein geringer Anteil an Melanozyten, sind zusammen mit den Bindegewebsfasern (Kollagenfasern, Retikulinfasern, elastische Fasern und Ankerfibrillen) in eine gelartige Grundsubstanz aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen eingebettet. Für die

Summe aller fibrillären Strukturen und löslicher Substanzen wird der Begriff *extrazelluläre Matrix* verwendet. Den Hauptanteil der Dermis nehmen Kollagenfasern ein, die sich wiederum aus Kollagenfibrillen zusammensetzen. In der Dermis herrscht Kollagen Typ I vor, zusätzlich finden sich auch Kollagene vom Typ III, IV, VI, VII.

Die **Subkutis** ist ein Fettgewebepolster, das durch lockeres, lamellär angeordnetes Bindegewebe unterteilt wird.

Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen werden als Adnexorgane (Anhangsgebilde) bezeichnet. Sie sind epidermaler Herkunft, jedoch tief in die Dermis eingebettet.

### **2.1.2 Das maligne Melanom und seine genetische Progression**

Das maligne Melanom ist ein Tumor der pigmentbildenden Zellen (Melanozyten), welcher hauptsächlich in der Haut vorkommt. Jedoch werden ca. 5% der Melanome auch in den Augen, Ohren, dem Gastrointestinaltrakt, ZNS und in Mund- und Genitalschleimhäuten beschrieben. Charakteristisch für das maligne Melanom ist seine frühzeitige Metastasierung in 20% der Fälle und dem meist letalen Ausgang. Die maligne Transformation von Melanozyten zu Melanomzellen ist bislang nicht eindeutig geklärt.

Primäre kutane Melanome können sich auf dem Boden von Nävuszellnävus entwickeln. In den meisten Fällen entstehen sie aber *de novo* ohne eine bereits existente Pigmentläsion. Nävuszellnävus können im Laufe des Lebens erworben, angeboren (kongenital) oder vom atypischen / dysplastischen Typ sein. Die Abbildung 2.3 zeigt einen Überblick über die Melanomentwicklung. Nach Breslow wird ein fortgeschrittenes Melanom nach seiner vertikalen Wachstumstiefe eingestuft, die wiederum die Prognose des Patienten bedingt (s. Tabelle 2.1). Dabei haben Patienten mit einem, sich primär radial ausbreitenden Melanom, wie das SSM (superfiziell spreitendes Melanom) oder das LMM (*Lentigo maligna* Melanom) eine gute Prognose. Für Patienten mit primär vertikal wachsenden Melanomen, wie das NMM (noduläre Melanom) oder das ALM (akrolentiginöse Melanom), können dahingegen eher schlechte Prognosen vorausgesagt werden.

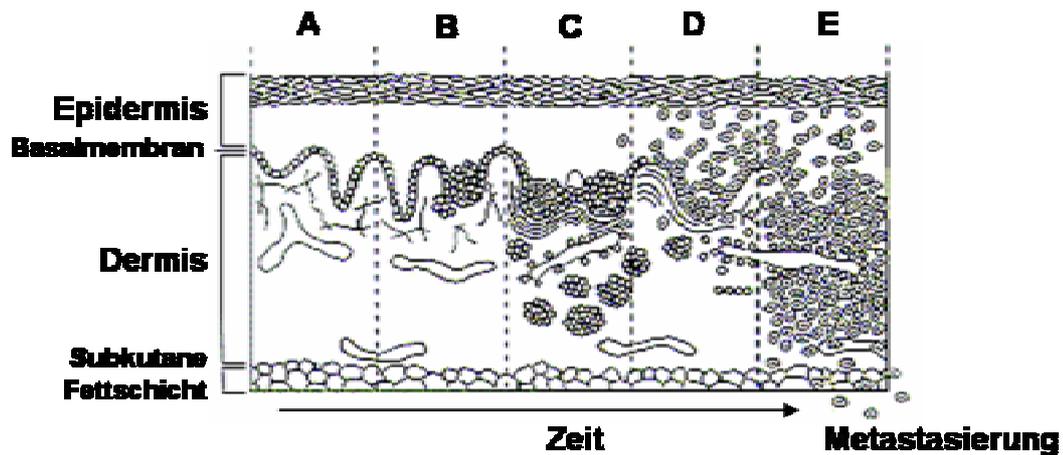


Abbildung 2.3: **A** Melanozytische Hyperplasie **B** Junctionsnävus **C** Dysplastischer Nävus mit abnormalen architektonischen und zytologischen Merkmalen **D** Frühes Melanom in der radialen Wachstumsphase **E** Fortgeschrittenes Melanom in der vertikale Wachstumsphase mit maligner Ausbreitung in die Dermis und den Blutgefäße. Original Abbildung von Dr. Michael Ioffreda, übernommen mit Genehmigung der Autoren Cotran, Kumar, Robbins, Pathologic Basis of Disease, 5<sup>th</sup> Edition, Philadelphia, 1994.

Tabelle 2.1: Prognose (10 Jahre (%)) des malignen Melanoms in Abhängigkeit von der Tumortiefe, nach Bachtter et al., 2000 und Garbe et al., 2002.

vertikale Tumortiefe (mm) (Breslow*) * ohne Ulceration	10 Jahre (%)
≤ 1,0 (Ia)	88-95
1,0 – 2,0 (Ib)	79-84
2,0 – 4,0 (IIa)	64-73
> 4,0 (IIb)	52-54

Die Wahrscheinlichkeit an einem malignen Melanom zu erkranken steigt weltweit stetig an und wird, wie auch andere Hautkrebsformen (Plattenepithelkarzinom, Basalzellkarzinom), mit der UV-Licht Einwirkung assoziiert. Dabei vermutlich, unterstützt kurze aber äußerst intensive UV-Strahlung (vor allem in der Kindheit) die Genese maligner Melanome, wohingegen eine permanente UV-Einstrahlung eher Plattenepithel- oder Basalzellkarzinome hervorruft. Aus diesem Grund können Melanome auch an Stellen auftreten, die nicht häufig dem Sonnenlicht ausgesetzt werden.

Vermutlich stimuliert UV-B Strahlung die Melanomgenerierung durch Modulation von Wachstumsfaktoren, Inhibition endogener Redoxsysteme und / oder Inhibition der Zell-

vermittelten Immunität. Die Überexpression des Wachstumsfaktors bFGF (*basic fibroblast growth factor*), in Kombination mit UV-B Einstrahlung, induziert die maligne Transformation von Melanozyten (Berking et al., 2001). UV-Strahlung führt zu lokalen aber auch systemischen Entzündungsprozessen, die mit einem Anstieg an Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Chemokinen einhergehen.

Die Aktivierung des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signalweges ist ein häufiges und frühes Ereignis im Melanom (Cohen et al., 2002). Neue Untersuchungen an Melanomzelllinien und Geweben zeigen, dass in 60 bis 70% aktivierende Mutationen im Protoonkogen *B-raf* vorliegen (Davies et al., 2002). In 80% dieser Fälle resultiert die Punktmutation *B-raf*<sup>V599E</sup> in einer konstitutiven Aktivierung der B-Raf Kinase.

Die Aktivierung des MAPK Signalweges im Melanom könnte durch mehrere Mechanismen ausgelöst werden: (1) Mutation innerhalb des *B-raf* Gens, (2) Stimulation durch endogene Wachstumsfaktoren, bFGF und HGF (*hepatocyte growth factor*) (Satyamoorthy et al., 2003), (3) exogene Stimulation durch IGF-1 (*insulin like growth factor 1*) (Satyamoorthy et al., 2001) und (4) über Signalwege der Adhäsionsrezeptoren (Perlis und Herlyn, 2004). Zusätzlich werden auch Interaktionen zwischen MAPK und (5) der Signalwege der sieben-Transmembran-G-Proteingekoppelten Rezeptoren diskutiert (Dupin und Le Douarin, 2003; Imokawa et al., 1992; Nesbit et al., 1999; Park et al., 1996; Tada et al., 1998) (s. Abb. 2.4). Vermutlich stellt die Aktivierung von ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) eine Voraussetzung für die Metastasierung des Melanoms dar. Zusätzlich wird dem MEK / ERK Signalweg eine regulatorische Rolle in der Expression von Matrix abbauenden Proteasen, Adhäsionsmolekülen und dem Transkriptionsfaktor Mitf (*microphthalmia associated transcription factor*), der für das Überleben der Melanomzellen mitverantwortlich ist, zugeschrieben (Huntington et al., 2004; Smalley, 2003).

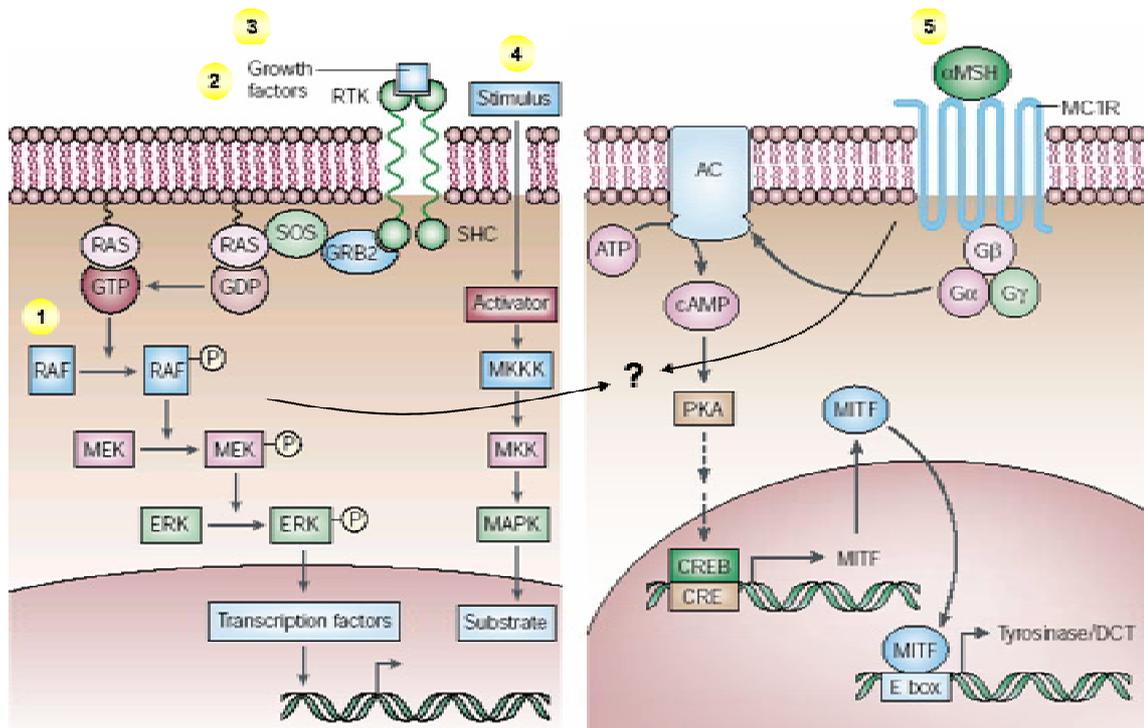


Abbildung 2.4: Mögliche Aktivierungsmechanismen der MAPK Signalkaskade im Melanom durch 1 Mutationen innerhalb des *B-raf* Gens, 2 + 3 Wachstumsfaktoren, 4 Signalwege der Adhäsionsmoleküle und 5 potentielle Interaktionen zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und der MAPK Kaskade, hier am Beispiel des MC1R dargestellt. RTK Rezeptor Tyrosinkinase; AC Adenylatcyclase; MC1R Melanocortin-1 Rezeptor;  $\alpha$ MSH  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone. Abbildung modifiziert nach Chin, 2003.

Verschiedenste Mutationen des TP53 Gens, die zum Verlust der onkosuppressiven Funktion des p53 Proteins führen, werden im Zusammenhang mit der Progression des Melanoms kontrovers diskutiert. p53 ist beteiligt (1) am Zellzyklusarrest in der  $G_1 / S$  Übergangsphase (2) an der Induktion der Apoptose und (3) an Interaktionen mit weiteren Molekülen, die in diesen Mechanismen eingreifen. Mutationen unterschiedlicher Gene, wie *apoptosis protease-activating factor 1* (Apaf-1), *murine of double minute 2* (Mdm2), *growth arrest and DNA damage inducible protein* (GADD45), *wild-type p53-activated fragment 1* (p21 / Cip1 / Waf1), *Bcl-2-associated X protein* (Bax) und *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) (Hussein et al., 2003), deren Produkte mit p53 interagieren, assoziieren ebenfalls mit der Melanomprogression. Darüber hinaus spielen auch Mutationen und Expressionsmuster anderer Moleküle p53-verwandter Signalwege eine Rolle, wie zum Beispiel der p53 Aktivator  $p14^{ARF}$  und der *cyclin-dependent kinase inhibitor*  $p16^{INK4a}$ , die über den CDK4-pRb bzw. p53 Signalweg agieren. Beiden Faktoren werden Tumorsuppressorfunktionen zugeschrieben (Hussein et al., 2003). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass

während der Invasion des metastasierenden malignen Melanoms die Zellen verschiedene Charakteristika erwerben, wie unkontrolliertes abnormales Wachstum, Apoptose-Resistenz und Ausbildung invasiver Kapazität, die sich wiederum durch adhäsive, bewegliche, proteolytische und angiogene Fähigkeiten auszeichnet.

### **2.1.3 Invasion und Metastasierung**

Tumorzellen erwerben die Fähigkeit, sich aus dem Zellverband des Primärtumors zu lösen und durch das lymphatische oder das Blutzirkulationssystem zu weiter entfernten Organen im Körper zu migrieren, dort zu proliferieren und somit eine Metastase zu formen. Auf diesem Weg müssen Tumorzellen sowohl die Basalmembranen der dermoepidermalen Junctionszone als auch subendotheliale Basalmembranen des Blutgefäßsystems und das interstitielle Stroma durchwandern. Während dieses mehrstufigen Prozesses der Tumor-Metastasierung spielen Tumorzell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen (Aznavorian et al., 1993), die über Adhäsionsmoleküle (z.B. Cadherine, Integrine, s. Kap. 2.1.3.1) auf der Zelloberfläche der Tumorzellen vermittelt werden, eine wesentliche Rolle. Dabei ist die Fähigkeit der Zellen zu invadieren von einem intermediären Expressionsmuster dieser Adhäsionsmoleküle und der Matrixdegradation abhängig (s. Kap. 2.1.3.1).

Ein Hauptmerkmal invasiver Prozesse ist der Abbau von Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix (Mignatti und Rifkin, 1993). Ebenso wie die Degradation epidermaler Basalmembranekomponenten und dermalen Bindegewebskomponenten, stellen die Intra- und Extravasion von Tumorzellen Grundvoraussetzungen der Fernmetastasierung dar; Prozesse die durch konzertierte Aktionen verschiedener Proteaseklassen ermöglicht werden (Goel und Chauhan, 1997). Die Expression dieser Proteaseklassen ist in malignen Zellen stark erhöht, kann aber auch zusätzlich, über die Sekretion löslicher Faktoren durch Tumorzellen, in stromalen Zellen induziert werden (Loffek et al., 2005). Folgende Proteaseklassen werden mit der Invasion und Metastasierung maligner Zellen in Zusammenhang gebracht: (1) Matrix-Metalloproteinasen (z. B. MMP-1, -2, -3, -7, -9, MT1-MMP), (2) ADAMs, (3) Serinproteasen (Plasmin, uPA, tPA), (4) Aspartatproteasen (Cathepsin D) und (5) lysosomale Cysteinproteasen (Cathepsin B, H, L) (Andreasen et al., 2000; Duffy, 1996; Duffy et al., 2003; Johansson et al., 2000; Kos und Lah, 1998; Rochefort und Liaudet-Coopman, 1999). Letztgenannte werden ausführlich in den Kapiteln 2.1.4 bis 2.1.10 dargestellt.

### **2.1.3.1 Die Rolle von Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen bei der Invasion und der Proteolyse des Bindegewebes**

Tumorzell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen werden über verschiedene Adhäsionsrezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt. Dabei übernehmen die Cadherine eine entscheidende Rolle bei den Zell-Zell Interaktionen (Yap et al., 1997), wohingegen die Integrine Zell-Matrix Interaktionen vermitteln (Hynes, 1992). Zwei weitere Mitglieder der Zelladhäsionsrezeptorfamilie stellen die Immunglobuline (Walsh und Doherty, 1997) und die Selektine dar (Krause und Turner, 1999).

Cadherine sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Adhäsionsmoleküle, die Zell-Zell Kontakte vermitteln. Ihre Nomenklatur orientiert sich an dem Gewebe aus welchem das betreffende Cadherin erstmals isoliert wurde. Demzufolge ist E-Cadherin aus epitheliale, N-Cadherin aus Nerven- und P-Cadherin aus Plazentagewebe isoliert. Die Adhäsion zwischen Keratinozyten und Melanozyten wird hauptsächlich über E-Cadherin vermittelt, welches während der Melanomprogression stark verringert wird (Tang et al., 1994). Nävus- oder Melanomzellen exprimieren kein E-Cadherin (Danen et al., 1996; Hsu et al., 1996). Diese Zellen stehen nicht mehr unter der Kontrolle von Keratinozyten und zeigen eine erhöhte Mobilität und Invasivität. Melanomzellen regulieren anstelle von E-Cadherin die Expression von N-Cadherin hoch, wodurch die Zellen mit stromalen Fibroblasten und Endothelzellen assoziieren können. N-Cadherin stellt die Kommunikation, die Adhäsion und letztendlich das Überleben der Melanomzellen sicher, die die Dermis durchwandern (Li et al., 2001).

Eine wichtige Familie von Adhäsionsmolekülen stellen die Integrine dar, die nicht nur Zell-Matrix Interaktionen ermöglichen, sondern auch Informationen aus dem Extrazellulärraum an die Zellen vermitteln. Zusätzlich sind sie an der Zellmigration und am Aufbau und der Organisation des die Zelle umgebenden Stromas beteiligt. Integrine sind nicht-kovalent assoziierte, heterodimere Zelloberflächenrezeptoren, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen (van der Flier und Sonnenberg, 2001; Hynes et al., 1992). In den Vertebraten sind bislang 24 Mitglieder dieser Familie bekannt (s. Abb. 2.5), die sich durch eine Kombination aus 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten zusammensetzen (Hynes, 1992; Plow et al., 2000). Die meisten Integrine sind vorwiegend Rezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix, vermitteln aber auch zum Teil die Bildung von Zell-Zell-Kontakten (Smith et al., 1994). Die Kombinationen der Untereinheiten bestimmen die Substratspezifität der Integrinheterodimere (Plow et al., 2000; van der Flier und Sonnenberg, 2001).



festgestellt werden (Annabi et al., 2001; Puyraimond et al., 2001). Zudem wird dem  $\alpha\beta3$ , aber auch dem  $\alpha\beta5$  Integrin eine Beteiligung bei der tumorinduzierten Angiogenese zugeschrieben (Friedlander et al., 1995).

Aus der Integrinfamilie sind 4 Mitglieder bekannt, die als Kollagenrezeptoren fungieren und tripelhelikales, natives Kollagen binden können. Neben den Integrinen  $\alpha1\beta1$  und  $\alpha2\beta1$  (Gullberg et al., 1992; Kuhn und Eble, 1994), werden auch die Integrine  $\alpha10\beta1$  (Camper et al., 1998) und  $\alpha11\beta1$  (Velling et al., 1999) zu den Kollagen-bindenden Rezeptoren gezählt.

Eine Vielzahl von Autoren vermuten, dass Bestandteile der Extrazellulären Matrix bei der Regulation der Expression Matrix-degradierender Proteasen maßgeblich beteiligt sind (Klein et al., 1991; Koblinski et al., 2002; Kurschat et al., 1999; Langholz et al., 1995; Zigrino et al., 2001). Veränderte Expressionsmuster, die auf diesen Zell-Matrix Interaktionen beruhen, lassen sich durch Kultivierung der zu untersuchenden Zellen innerhalb eines dreidimensionalen Netzwerks aus fibrillärem Kollagen Typ I *in vitro* untersuchen (Mauch et al., 1988). Die Kollagenkultivierung eignet sich auch, um Expressionsprofile in Melanomzellen zu analysieren. Aufgrund der Untersuchungen von Klein et al. (1991) und Friedl et al. (1997), wurde der  $\alpha2\beta1$  Integrinrezeptor mit den invasiven Kapazitäten von Melanomzellen in Zusammenhang gebracht. Bereits 1991 zeigten Studien von Klein et al., dass die hoch-invasive Melanomzelllinie MV3 während ihrer Kultivierung innerhalb 3D Kollagen Typ 1 Matrices, vermehrt  $\alpha2\beta1$  Integrin exprimiert, wohingegen nur eine schwache Expression dieses Integrinrezeptors in niedrig-invasive Melanomzellen beobachtet wird. Mit Hilfe spezifischer Antikörper, die gegen die  $\alpha2$ - bzw. die  $\beta1$ -Untereinheit des Integrins gerichtet sind und die Adhäsion der Zellen zu Kollagen Typ I inhibieren, konnte diese Arbeitsgruppe nachweisen, dass die Fähigkeit der MV3 Zellen 3D Kollagenfibrillen zu kontrahieren, über  $\alpha2\beta1$  Integrinrezeptoren vermittelt wird. Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, ist mittlerweile bekannt, dass Integrinrezeptoren nicht nur die Zelladhäsion an Kollagen Typ I vermitteln, sondern auch extrazelluläre Signale an den Zellkern übertragen. In humanen, dermalen Fibroblasten, wird sowohl die  $\alpha1\beta1$  Integrin abhängige Kollagen Synthese als auch die  $\alpha2\beta1$  Integrin vermittelte MMP-1 Expression über diese, so genannten *outside-in* Signalwege reguliert (Langholz et al., 1995). Unter ähnlichen Versuchsbedingungen, demonstrierten Zigrino et al. (2001) die Regulation der MT1-MMP Expression durch aktivierte  $\alpha2\beta1$  Integrinrezeptoren und auch die MT1-MMP vermittelte ProMMP-2 Aktivierung. Nach Kultivierung humaner Fibroblasten auf nativem Kollagen Typ I konnten Koblinski et al. (2002) zudem zeigen, dass die Integrine  $\alpha1\beta1$  und  $\alpha2\beta1$  die Sekretion von Procathepsin B induzieren.

### 2.1.4 Lysosomale Cysteinproteasen

Cysteinproteasen werden nach ihren unterschiedlichen evolutionären Ursprüngen in acht so genannte Klans unterteilt, deren Mitglieder sich jeweils durch bezeichnende strukturelle Eigenschaften auszeichnen und diesen entsprechend in eigenständige Familien eingeteilt werden. Unter ihnen umfasst die Papain Familie (Klan CA, Familie C1) die meisten Mitglieder (Barrett und Rawlings, 2001), einschließlich Papain und verwandte pflanzliche Proteasen, wie Chymopapain, Caricain, Bromelain, Actinidin, Ficin und Aleurain, Cruzipain und verwandte parasitäre Proteasen und die lysosomalen Cathepsine. Der Begriff „Cathepsin“ (von griechisch „καθελειν“ „abbauen“) beschreibt intrazelluläre saure Proteasen (Willstätter und Bamann, 1929). Alle lysosomalen Cysteinproteasen werden auch Cathepsine genannt, obwohl die Kontroverse aufgrund der alten Nomenklatur nicht zutrifft. Cathepsin D und E sind Aspartatproteasen, Cathepsin III ist eine Matrix-Metalloproteinase und Cathepsin A und G sind Serinproteasen.

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind 11 humane lysosomale Cysteinproteasen bekannt, sequenziert und nach Sequenzhomologien weiter unterteilt in Cathepsin B-ähnliche (Cathepsin B, C, O, und X) und Cathepsin L-ähnliche (Cathepsin L, V, K, S, W, F und H). In Tabelle 2.2 sind ihre proteolytischen Eigenschaften und die chromosomalen Lokalisationen der Gene zusammengefasst.

*Tabelle 2.2:* Die humanen lysosomalen Cysteinproteasen, ihre proteolytischen Aktivitäten und die chromosomalen Lokalisationen der Gene. **n. b.**, nicht bestimmt

Name	Endopeptidase	Exopeptidase		Chromosom
		Carboxypeptidase	Aminopeptidase	
Cathepsin L	+	-	-	9q21
Cathepsin V	+	-	-	9q21
Cathepsin S	+	-	-	1q21
Cathepsin K	+	-	-	1q21
Cathepsin W	n. b.	n. b.	n. b.	11q13
Cathepsin F	+	-	-	11q13
Cathepsin O	n. b.	n. b.	n. b.	4q31-32
Cathepsin B	+	+ Dipeptidase	-	8p22-23
Cathepsin X	-	+ Mono- und Dipeptidase	-	20q13
Cathepsin H	+	-	+ Monopeptidase	15q24-25
Cathepsin C	-	-	+ Dipeptidase	11q14

### 2.1.5 Physiologische Funktionen der Cathepsine

Lange Zeit wurde vermutet, dass die Lokalisation der Cathepsine auf endosomale bzw. lysosomale Zellkompartimente beschränkt ist und somit ihre Hauptfunktion *in vivo* darin besteht, Proteine, die von der Zelle aufgenommen werden oder aus Kompartimenten derselben Zelle stammen, zu degradieren (Kirschke et al., 1995; Mort und Buttle, 1997). Diese Vermutung wurde durch die ubiquitäre Expression der Cathepsine B, C, F, H, L, O und Z weiter gestützt.

Neuere Forschungsergebnisse weisen den Cathepsinen, neben ihrer Beteiligung an der unspezifischen lysosomalen Proteindegradation, jedoch eindeutig auch Zell- und Gewebe-spezifische Funktionen zu, die auf einer limitierten Proteolyse spezifischer Substrate hinweisen. Dabei Cathepsin K wird hauptsächlich in Osteoklasten und Ovarien exprimiert (Bromme et al., 1996) und die Homeostase von Knochen und Knorpel (Chapman et al., 1997). Mutationen, die eine Instabilität von Cathepsin K oder den Verlust der proteolytischen Aktivität verursachen, sind im Menschen Auslöser der Pyknodysostose, einer autosomal-rezessiven Fehlbildung des Skeletts (Gelb et al., 1996). Denselben Phänotyp entwickeln auch Cathepsin K-defiziente Mäuse (Saftig et al., 1998).

Cathepsin S wird hauptsächlich in der Milz, in Lymphknoten und in Antigen-präsentierenden Zellen, wie B Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert. Ebenso wie Cathepsin L, ist Cathepsin S an der Prozessierung der MHC Klasse II assoziierten invarianten Kette beteiligt (Chapman et al., 1997), und somit essentiell für die normale Funktion der MHC Klasse II assoziierten Antigen Präsentation (Nakagawa et al., 1998; Nakagawa et al., 1999; Nakagawa und Rudensky, 1999; Shi et al., 1999). Dabei supplementiert Cathepsin L aktiv für Cathepsin S in den äußeren Epithelzellen des Thymus. Es wird diskutiert, dass die Prozessierung der invarianten Kette in der Maus von Cathepsin L, im Menschen jedoch von Cathepsin V, welches nur im Thymus und im Gehirn exprimiert ist, ausgeführt wird (Bromme et al., 1999). Cathepsin F ist in Makrophagen ebenfalls an diesen Prozessen beteiligt (Shi et al., 2000).

Cathepsin L-defiziente Mäuse entwickeln, neben den oben beschriebenen Veränderungen, periodischen Haarverlust und epidermale Hyperplasie. Dies deutet darauf hin, dass Cathepsin L eine Funktion in der epidermalen Homeostase und der Morphogenese von Haarfollikeln ausübt (Roth et al., 2000). Zudem kann eine Reduktion an CD4<sup>+</sup> T Lymphozyten beobachtet werden (Nakagawa et al., 1998). Cathepsin L defiziente Mäuse entwickeln im Alter von 12 Monaten histomorphologische und funktionelle Veränderungen des Herzens, die in einer verzögerten Kardiomyopathie resultieren (Stypmann et al., 2002).

Eine weitere Erbkrankheit wird mit der Defizienz von Cathepsin C in Verbindung gebracht. Das Papillon-Lefevre-Syndrom oder auch Keratose palmoplantaris repräsentiert eine autosomal-rezessive Krankheit, charakterisiert durch Hyperkeratose und starker Periodontitis, ausgelöst durch eine *loss-of-function* Mutation des Cathepsin C Gens (Toomes et al., 1999). Cathepsin C ist außerdem an der Zymogenaktivierung vieler granulärer Serinproteasen beteiligt. Die Aktivierung von Granzym A und B, Cathepsin G, Neutrophilen Elastase und Chymase ist in Cathepsin C-defizienten Mäusen vermindert (Pham und Ley, 1999).

Cathepsin W stellt ein weiteres Cathepsin mit einer Zell-spezifischen Expression dar; es wird exklusiv nur in CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten gefunden, wobei ihm bislang keine Funktion zugeordnet werden konnte (Linnevers et al., 1997).

Cathepsin B-defiziente Mäuse verlieren die Fähigkeit, Schilddrüsen Trypsinogen zu prozessieren und TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose in der Leber zu unterlaufen (Reinheckel et al., 2001). Die Proteolyse von Thyroglobulin, dem Vorläufer der Schilddrüsenhormone, scheint eine weitere physiologische Funktion des Cathepsin B, in Epithelzellen der Schilddrüse, zu sein (Brix et al., 2001).

Der Cathepsin B / L Doppel-*knockout* wurde 2002 von der Arbeitsgruppe um Felbor et al. generiert und charakterisiert. Diese Mäuse sterben zwischen Tag 10 und 14 nach ihrer Geburt und zeigen neben einer Hyperproliferation der Keratinozyten, die auch für Cathepsin L-defiziente Mäuse beschrieben ist, eine unspezifische Involution des Thymus und einen auffälligen Phänotyp des Gehirns, gekennzeichnet durch einen frühen Beginn und einer rapiden Progression an neurodegenerativen Prozessen. Die Autoren vermuten, dass Cathepsin B und L an der Homeostase des Vesikeltransports und an der Ausbildung von Axonen und synaptischen Verbindungen während des frühen postnatalen Lebens beteiligt sind. Beide Proteasen sind essentiell für die Reifung und Integrität des postnatalen zentralen Nervensystems. Darüber hinaus wird spekuliert, dass Cathepsin B und L *in vivo* füreinander kompensieren (Felbor et al., 2002).

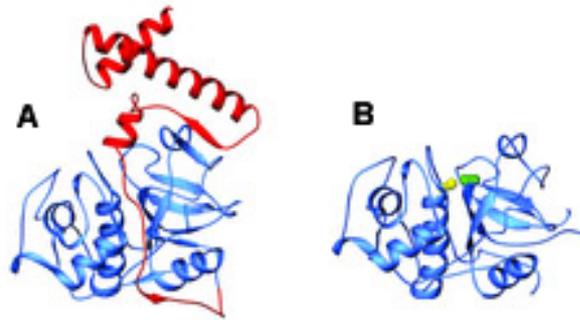
### **2.1.6 Struktur, Mechanismus und Spezifität der Cathepsine**

Die lysosomalen Cysteinproteasen der Papain Familie sind monomere Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 22 und 28kDa. Die einzige Ausnahme bildet das tetramere Cathepsin C mit einem Molekulargewicht von 200kDa. Die Kristallstrukturen aller humaner Vertreter dieser Familie bzw. ihrer Säugetieranaloga, mit Ausnahme der Cathepsin O und W, sind mittlerweile bestimmt und in der Proteindatenbank (PDB) zugänglich (s. Tabelle 2.3).

**Tabelle 2.3:** Erstpublikationen und Proteindatenbank (PDB) ID Nummern der Cathepsin- bzw. Proenzymstrukturen

<b>Cathepsin</b>	<b>PDB ID</b>	<b>Erstpublikation</b>	<b>Spezies</b>
B	1huc	Musil et al., 1991	Human
C	1jqp	Olsen et al., 2001	Ratte
	1k3b	Turk et al., 2001a	Human
F	1m6d	Somoza et al., 2002	Human
H	8pch	Guncar et al., 1998	Schwein
L	1icf	Guncar et al., 1999	Human
K	1mem	McGrath et al., 1997	Human
	1atk	Zhao et al., 1997	Human
S	1glo	Turkenburg et al., 2002	Human
V	1fh0	Somoza et al., 2000	Human
X	1ef7	Guncar et al., 2000	Human
<b>Zymogen</b>	<b>PDB ID</b>	<b>Erstpublikation</b>	<b>Spezies</b>
B	1mir	Cygler et al., 1996	Ratte
	1pbh	Turk et al., 1996	Human
	2pbh		
	3pbh	Podobnik et al., 1997	Human
L	1cjl	Coulombe et al., 1996	Human
K	7pck	Sivaraman et al., 1999	Human
	1by8	LaLonde et al., 1999	Schwein
X	1deu	Sivaraman et al., 2000	Human

Cathepsine folgen der allgemeinen Faltung einer Papain-ähnlichen Struktur. Eine Papain-ähnliche Faltung kennzeichnet sich durch zwei Domänen, die an ein geschlossenes Buch erinnern, bei dem der Buchrücken zur Vorderseite zeigt (s. Abb. 2.3, (Turk und Guncar, 2003)). Die Domänen teilen sich zum oberen Ende hin in eine V-förmigen Spalte, die das aktive Zentrum bildet und in ihrer Mitte die Aminosäurereste C25 und H159 (Papain Nummerierung) beherbergt, die wiederum das katalytische Zentrum des Enzyms ausmachen. Das hervorstechende Merkmal der linken (L) Domäne ist die zentrale  $\alpha$ -Helix mit einer Länge von 30 Aminosäureresten, die N-terminal C25 beinhaltet. Die rechte (R) Domäne stellt sich als eine  $\beta$ -Fass-ähnliche Struktur dar, die H159 und zusätzlich ein kürzeres  $\alpha$ -helikales Motiv beinhaltet (die Bezeichnungen L und R Domäne beziehen sich auf die Standardorientierung dargestellt in Abb. 2.3). Abbildung 2.3 zeigt die Struktur von Cathepsin L, eines typischen Vertreters der Endopeptidasen aus der Papain Familie.



**Abbildung 2.3:** Die Proteinfaltung von Procathepsin L (A) und Cathepsin L (B) in der Standardorientierung, betrachtet entlang der Berührungspunkte beider Domänen. Die zentrale  $\alpha$ -Helix zeigt einen vertikalen Verlauf. **A** Die Propeptidregion ist in rot, der Anteil des reifen Proteins in blau dargestellt. **B** Das aktive Zentrum liegt in dieser Orientierung am oberen Ende der Struktur. Die katalytischen Aminosäurereste C25 und H163 sind als gelber und grüner Atomball eingezeichnet (Cathepsin L Nummerierung); Abbildung modifiziert nach Turk und Guncar, 2003.

Cathepsine werden als Präproenzyme synthetisiert. Nach kotranslationaler Abspaltung des Signalpeptids und darauf folgendem Transport bzw. *trafficking* des Enzyms über die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), wird das Procathepsin in der sauren Umgebung der späten Endosomen oder Lysosomen weiter zur aktiven Enzymform prozessiert (s. a. 2.1.7). Die Kristallstrukturen der Procathepsine (s. Tabelle 2.3) lassen eindeutig erkennen, dass die Struktur des reifen Enzyms bereits in der Zymogen-Form festgelegt ist. Am Beispiel des Cathepsin L in Abbildung 2.3 ist zu erkennen, dass das Propeptid eine  $\alpha$ -helikale Domäne bildet, welche sich entlang des aktiven Zentrums, bis hin zum N-Terminus des Enzyms erstreckt. Dabei nimmt es eine ausgedehnte Struktur an, in einer entgegengesetzten Orientierung zur Substratbindung, wodurch der Zugang des aktiven Zentrums blockiert wird. Die Propeptide der Cathepsine sind daher auch Inhibitoren ihrer jeweiligen Enzyme, was durch kinetische Daten nachgewiesen wurde (Guay et al., 2000).

Die Substratbindungsstellen des Papains wurden erstmals von Schechter und Berger (1967) beschrieben. Durch unterschiedliche Kristallstrukturanalysen von Cathepsin-Inhibitor-Komplexen, wurde dieses Modell neu überarbeitet und detailliert definiert (Turk et al., 1998).

Papain-ähnliche Proteasen repräsentieren eine spezielle Klasse unter den proteolytischen Enzymen, mit der kleinsten Anzahl an Substratbindungsstellen. Das Grundgerüst dieser fünf Bindungsstellen bzw. Bereiche bilden zwei kürzere *loops* in der L Domäne (Aminosäurereste 19-25 und 61-69; S2' Bindungsstelle bzw. S3 Bindungsbereich), ein dritter *loop*, der die beiden erstgenannten über eine

Disulfidbrücke (C22-C65; S1 Bindungsstelle) miteinander verbindet, und zwei längere *loops* (136-162 und 182-213; S1' bzw. S2 Bindungsstelle) in der R Domäne. Trotz ihrer definierten Substratbindungsstellen, sind Cathepsine eher nicht-spezifische Enzyme. Cathepsin B-ähnliche Enzyme ziehen basische Aminosäuren in der S2 Bindungsstelle vor und spalten somit Proteine effizient nach Arg-Arg oder Lys-Arg (-**R/K**-X-X) Sequenzen, wohingegen Cathepsin L-ähnliche hydrophobe oder verzweigte Aminosäuren in Position S2 bevorzugen (-**L/I**-X-X) (Chapman et al., 1997).

Die Mechanismen der Substratspaltung sind für die lysosomale Cysteinproteasen noch nicht vollständig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass in ihrer aktiven Form die katalytischen Aminosäurereste C25 und H159 beide in einem ionisierten Zustand vorliegen und ein Thiolat-Imidazolium Ionenpaar bilden, welches die Katalyse der Substratspaltung über Acylierung und Deacylierung des Enzyms ermöglicht (Storer und Menard, 1994).

Ein Vergleich der Struktur einer typischen Endopeptidase, wie Cathepsin L, mit den Exopeptidase Strukturen von Cathepsin B (Carboxydipeptidase), Cathepsin H (Aminomonopeptidase), Cathepsin X (Carboxy(di)peptidase) und Cathepsin C (Aminodipeptidase) zeigt, dass die Exopeptidaseaktivität dieser Enzyme durch zusätzliche strukturelle Merkmale definiert wird. Cathepsin X zeichnet sich durch einen kurzen *mini-loop* aus. Das H23 innerhalb dieses *loops* wirkt als Anker für die Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure des Substrats (Guncar et al., 2000). Eine zusätzliche Mini-Kette in Cathepsin H bzw. eine so genannte Ausschluss-Domäne in Cathepsin C, führen zu ähnlichen Substrateinschränkungen (Turk und Guncar, 2003).

Auch Cathepsin B weist ein besonderes Strukturmotiv auf, den 18 Aminosäuren langen *occluding loop*, der den Substratzugang zum aktiven Zentrum verhindert. (s. Abb. 2.5). Zwei Histidinreste innerhalb des *loops*, H110 und H111, binden mit ihren positiven Ladungen die Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure des Substrats und bestimmen somit die Carboxydipeptidaseaktivität des Cathepsin B (Turk et al., 1995). Ein großer Anteil des *occluding loops*, der zwischen den, über eine Disulfidbindung verknüpften, Cysteinen C108 und C119 liegt, ist flexibel und kann verschiedene Konformationen annehmen. Neben seiner Carboxydipeptidaseaktivität, weist Cathepsin B auch eine Endopeptidaseaktivität auf, die durch die Flexibilität dieser Region ermöglicht wird. Durch Verlagerung des *occluding loops*, wird das aktive Zentrum zugänglicher, und die Endopeptidaseaktivität verstärkt (Illy et al., 1997; Nagler et al., 1997; Podobnik et al., 1997).

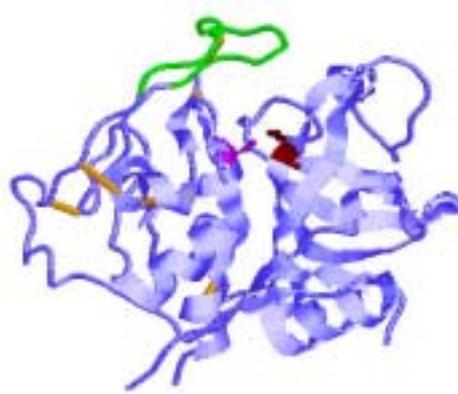


Abbildung 2.5: Die Proteinfaltung von Cathepsin B in der Standardorientierung. Der *occluding loop* (P107-D124) ist in grün dargestellt, die katalytischen Aminosäurereste C29 und H199 in magenta bzw. braun (Cathepsin B Nummerierung). Disulfidbindungen sind in gelb präsentiert. Die Abbildung ist mit Hilfe des Programms *Proteinexplorer 2.41 beta* angefertigt.

### 2.1.7 Regulation der Enzymaktivität

Es gibt unterschiedlichste Wege auf denen die Aktivität der lysosomalen Cysteinproteasen reguliert werden kann (Twining, 1994). Abgesehen von den Determinanten der Genexpression, wird ihre proteolytische Aktivität von vielzähligen Faktoren bestimmt, die im Folgenden zusammengefasst werden:

1. **Der pH-Wert:** Lange Zeit wurde vermutet, dass unter neutralem pH-Wert, Papain-ähnliche Cysteinproteasen instabil sind und deswegen nur in sauren, intrazellulären Kompartimenten der Zelle optimale Funktion ausüben können. Aus diesem Grund galt der pH-Wert als Hauptregulationsfaktor für die Cathepsine, die möglicherweise aus den Lysosomen gelangt sind. Tatsächlich sind nur einige Cathepsine relativ instabil (Cathepsin L, H, K, V, F), wohingegen andere äußerst stabil sind (Cathepsin S, Cruzipain). Bei einem pH-Wert von 4,5 - 5,5 zeigt Cathepsin B hauptsächlich seine Carboxydipeptidaseaktivität, jedoch liegt das pH-Optimum seiner zusätzlichen Endopeptidaseaktivität bei pH 7 - 7,4 (Khouri et al., 1991; Willenbrock und Brocklehurst, 1985). Diese Daten legen nahe, dass Cathepsine auch außerhalb lysosomaler Kompartimente aktiv sein können.
2. **Das Redoxpotential:** Das Cystein des aktiven Zentrums wird schnell oxidiert, und Cathepsine zeigen daher ihre höchste Aktivität in einer reduzierenden Umgebung. Endosome können spezifisch Cystein akkumulieren, um solche Umgebungsbedingungen zu schaffen (Pisoni et al., 1990).

**3. Die Synthese inaktiver Vorstufen, die Zymogenaktivierung und das zielgerichtete trafficking:** Alle lysosomalen Cathepsine werden als inaktive Präproenzyme, die eine Signalsequenz umfassen, auf der Oberfläche des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) synthetisiert. Im Folgenden wird die Synthese und das *trafficking* am Beispiel des Cathepsin B beschrieben (Mort und Buttle, 1997).

Im rER wird die Signalsequenz kotranslational abgespalten und das resultierende, inaktive Procathepsin B (Zymogen) glykosyliert und zum Golgi-Apparat transportiert, wo die Glykosylierungen weiter modifiziert werden. Procathepsin B besitzt zwei Glykosylierungsstellen, N38 in der Proregion und N192 in der Proteasedomäne, die differentiell glykosyliert werden können. Daher kann Procathepsin B ein Molekulargewicht zwischen 43 und 46kDa aufweisen. Phosphorylierte Oligosaccharide ermöglichen Procathepsin B im trans-Golgi-Netzwerk die Bindung mit Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPRs), welche das Enzym zu prälysosomalen Kompartimenten (z. B. späte Endosome) weiterleiten. Dazu sind die Kationen-unabhängigen (CI-MPR), als auch die Kationen-abhängigen (CD-MPR) MPRs nötig (Ludwig et al., 1994). Aufgrund der sauren Umgebung innerhalb der endosomalen Kompartimente (pH 5,0), dissoziiert das Enzym von den Rezeptoren und die Proregion wird abgespalten, was zu der 31kDa großen, aktiven *single-chain* Form des Enzyms führt.

Cathepsin B wird daraufhin in die Lysosomen transportiert, wo es weiter zu seiner *double-chain* Form prozessiert wird, die sich aus einer 25 / 26kDa großen, aktiven *heavy-chain* und einer 5kDa kleinen *light-chain* zusammensetzt, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind (Nishimura et al., 1988; Rowan et al., 1992). Unter normalen Bedingungen wird Cathepsin B, als *housekeeping* Enzym, in den Lysosomen aufbewahrt.

Aufgrund dieser mehrstufigen Prozessierung des Enzyms, die auf bestimmte Zellkompartimente beschränkt zu sein scheint, stellt die limitierte Proteolyse, die zur Reifung des aktiven Cathepsin B führt, einen entscheidenden Schritt für dessen Aktivitätskontrolle dar. Das Propeptid übernimmt mehrere wichtige Kontrollfunktionen: (1) es reguliert die Aktivität der Protease, indem es *in vitro* als stark bindender Inhibitor wirkt (Fox et al., 1992), (2) es ist verantwortlich für die zielgerichtete Lokalisation des Enzyms (Hanewinkel et al., 1987) und (3) es ist möglicherweise für die Stabilität und die richtige Faltung des Cathepsins wichtig (Tao et al., 1994). Verschiedene Proteasen werden in Zusammenhang mit der Zymogenaktivierung des Procathepsin B diskutiert, Cathepsin D (van der Stappen et al., 1996) und Cathepsin G, tPA, uPA und mehrere Elastasen (Dalet-Fumeron et

al., 1996; Dalet-Fumeron et al., 1993), jedoch wird auch von einer autokatalytische Prozessierung ausgegangen. Turk et al. (2000) vermuten, dass die Autoaktivierung durch einen pH-Wert Abfall ausgelöst wird, der die Wechselwirkungen zwischen dem Propeptid und der katalytischen Domäne soweit schwächt, dass ein weiteres Zymogen gebunden werden kann, was zu einer kreuzweisen Aktivierung beider Zymogene führt. Auch die Arbeit von Rozman et al. (1999) zeigt, dass die autokatalytische Prozessierung von Procathepsin B *in vitro* ein bimolekularer Prozess ist, und nicht, wie ursprünglich angenommen, ein intramolekularer Prozess.

- 4. Inhibitoren der lysosomalen Cathepsine:** Reguliert werden lysosomale Cysteinproteasen hauptsächlich von endogenen Inhibitoren, den Cystatinen (Klan IH, Familie I25), die wiederum in Unterfamilien eingeteilt werden (Turk und Bode, 1991). Die Unterfamilie A umfasst, unter anderem, die Cystatine A und B (auch Stefine genannt), einkettige, nicht glykosylierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 11kDa. Cystatin A wird in hohen Konzentrationen in verschiedenen epithelialen Zellen und Leukozyten gefunden und schützt Epithel- und Lymphgewebe vor eindringenden Bakterien. Cystatin B ist dagegen weit verbreitet und wird in unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen exprimiert. Beiden Inhibitoren fehlt ein Signalpeptid, daher ist anzunehmen, dass sie ihre Aktivität hauptsächlich intrazellulär ausüben und die Zelle vor unkontrollierter Cathepsinaktivität schützen (Kos und Lah, 1998). Allerdings gibt es Berichte, dass Cystatin A und B auch extrazellulär nachgewiesen werden können, was auf zusätzliche Funktionen dieser Cystatine hinweist (Abrahamson et al., 1986).
- Zu der Unterfamilie B der Cystatine gehört Cystatin C, ein ebenfalls einkettiges, über zwei Disulfidbrücken stabilisierter Inhibitor mit einem Molekulargewicht von 13kDa. Aufgrund seines Signalpeptids, wird dieser nicht glykosylierte Inhibitor in den Extrazellularraum sezerniert. Cystatin C zeigt im Menschen ein breites Vorkommen, mit hohen Konzentrationen in Samen- und Gehirnflüssigkeit und niedrigeren Konzentrationen in Plasma, Tränenflüssigkeit und Urin.
- Eine weitere Unterfamilie der Cystatine enthält die Kininogene, die ebenfalls als Inhibitoren der Cathepsine bekannt sind (Turk und Bode, 1991). Auch Vertreter anderer Inhibitorfamilien werden in diesem Zusammenhang diskutiert, z. B. die Familie der Thyropine (Lenarcic und Bevec, 1998), das MHC Klasse II-assoziierte p41 Fragment (Bevec et al., 1996; Guncar et al., 1999) und auch der generelle Proteaseinhibitor  $\alpha$ 2-Makroglobulin (Mason, 1989).

### 2.1.8 Alternative *trafficking* Mechanismen der Cathepsine in Tumorzellen

Neben den oben beschriebenen Funktionen als lysosomale Proteasen, gibt es Berichte, dass Cathepsine von verschiedenen Zellen in den Extrazellularraum sezerniert werden. Dermale Fibroblasten und Leberzellen sezernieren beispielsweise geringe Mengen an Procathepsin B (Hanewinkel et al., 1987; Mach et al., 1992). Von besonderer Bedeutung aber sind zahlreiche Berichte, dass maligne Zellen vermehrt lysosomale Cysteinproteasen ausschleusen. Außerhalb der Zelle, können nicht alle, oben genannten Kontrollmechanismen die Aktivität dieser Cysteinproteasen regulieren. Unkontrollierte Cathepsinaktivitäten werden in vielen pathologischer Prozessen beobachtet, wie z. B. rheumatische Arthritis, Osteoarthritis, neurologische Defekte, Osteoporose, eine Reihe inflammatorischer Krankheiten und, im besonderen maligne Tumore (Chapman et al., 1997; Kirschke et al., 1995; Kos und Lah, 1998).

Cathepsin B wird in Tumorzellen nach dem klassischen *trafficking* Mechanismus (s. 2.1.7) prozessiert und gelangt so zu seinem Zielort, den Lysosomen. Zusätzlich zu seiner lysosomalen Lokalisation, findet man Cathepsin B in Tumorzellen sowohl in Vesikeln, die sich im peripheren Cytoplasma befinden als auch auf der Plasmamembran. Procathepsin B, ebenso wie reife, aktive Formen des Enzyms können von Tumorzellen auch extrazellulär sezerniert werden (Mort und Recklies, 1986; Rozhin et al., 1994; Sloane et al., 1986). Diese Beobachtungen werden nicht nur für Cathepsin B, sondern auch Cathepsin L (Ishidoh und Kominami, 1998; Rozhin et al., 1989), Cathepsin H (Kageshita et al., 1995; Waghray et al., 2002) und für die Aspartatprotease Cathepsin D (Rocheffort, 1992; Rocheffort et al., 1990; Sameni et al., 1995) beschrieben.

Die Mechanismen, mit deren Hilfe Cathepsine zur Plasmamembran befördert bzw. extrazellulär ausgeschleust werden, sind bis heute nicht komplett aufgeklärt. Vermutlich existieren diskrete Mechanismen, die zur Ausschleusung bestimmter Cathepsine führen (McIntyre und Erickson, 1991; McIntyre und Erickson, 1993; McIntyre et al., 1994; Sameni et al., 1995). Cavallo-Medved und Sloane (2003) postulieren, dass Cathepsin B in Tumorzellen, zusätzlich zu klassischen, auch über alternative *trafficking* Mechanismen verfügen kann (s. Abb. 2.6). (1) Procathepsin B kann von den Zellen über den sekretorischen Weg sezerniert werden, wo es extrazellulär, als lösliches Procathepsin B existiert, oder mit der Plasmamembran als gebundenes Procathepsin B assoziieren kann. (2) Reifes Cathepsin B kann in sekretorischen Lysosomen transportiert werden, die entweder über exocytotische Prozesse lösliches Cathepsin B sezernieren, oder mit der Plasmamembran fusionieren und dadurch gebundenes Cathepsin B auf der Plasmamembran anhäufen.

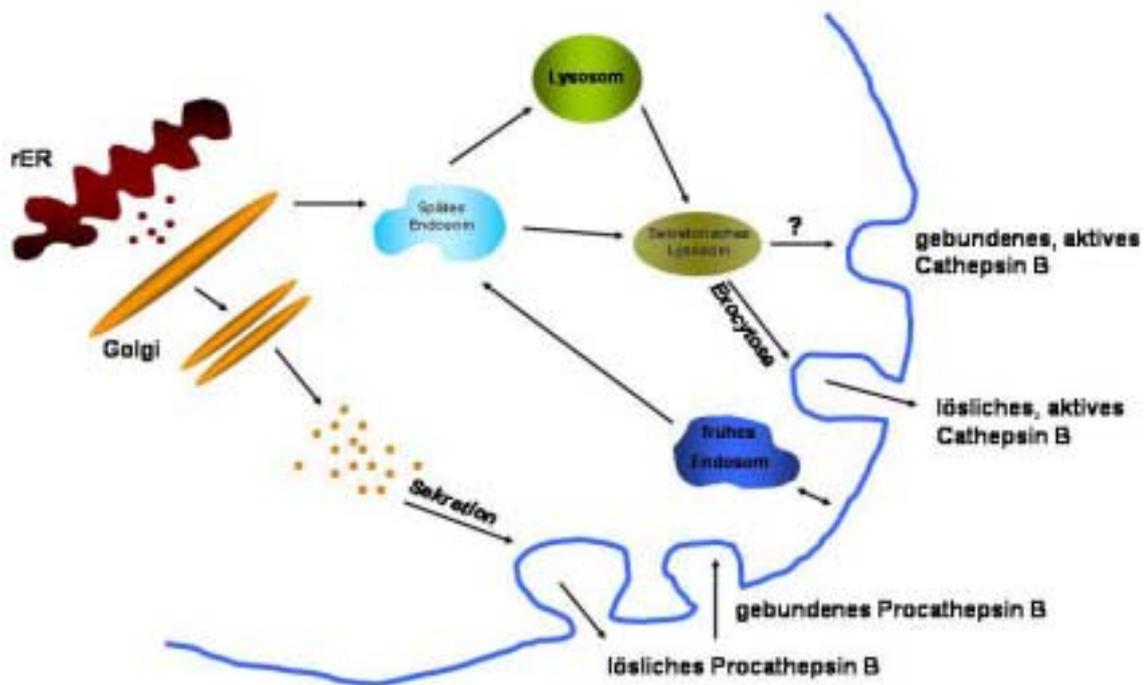


Abbildung 2.6: Klassische und alternative Cathepsin B trafficking Mechanismen. Die Abbildung ist nach Cavallo-Medved and Sloane (2003) modifiziert.

### 2.1.9 Cathepsine und das maligne Melanom

Erhöhte Transkriptionsraten, Proteinlevel und Enzymaktivitäten, sowie die extrazelluläre Lokalisation der lysosomalen Cysteinproteasen B, H und L wurden für eine Vielzahl unterschiedlichster Tumorarten und -zellen *in vitro* beschrieben. Aber auch *in vivo* können erhöhte Mengen dieser Proteasen sowohl in biologischen, Flüssigkeiten der Tumorumgebung, als auch in Seren und Urin von Tumorpatienten nachgewiesen und als Tumormarker eingesetzt werden (Kos und Lah, 1998). Neben einer erhöhten Expression und Sekretion der Proteasen, tragen vor allem eine Störung des Gleichgewichts zwischen Proteasen und endogenen Inhibitoren, zur malignen Progression der Tumore bei.

Bisherige *in vitro* Untersuchungen des malignen Melanoms, wie auch klinische Studien an Melanompatienten, deuten ebenfalls auf ein Ungleichgewicht zwischen den Cathepsinen B, H und L und ihrer Inhibitoren hin. Im Vergleich zu gesunder Haut, beschreiben Frohlich et al. (2001) eine vermehrte Transkriptions- und Expressionsrate, sowie erhöhte Aktivitäten der Cathepsine B und L in Gewebeproben humaner Melanome. Diese Arbeitsgruppe postuliert, dass die erhöhte Gentranskription der Tumorzellen mit dem malignen Phänotyp des Melanoms korreliert. Immunohistochemische Untersuchungen von Kageshita et al. (1995) zeigen deutlich

stärkere Signale der Cathepsine B, H und L in invasiven und fortgeschrittenen, primären Melanomen, gegenüber frühen, primären Melanomen und Nävi. Messungen der Serenspiegel von Cathepsin B, H, L und der Inhibitoren, Cystatin A und C, sind aus mehreren klinischen Studien an Patienten mit malignem Melanom bekannt und veröffentlicht (Kos et al., 1997; Schweiger et al., 1997). Seren von Patienten mit malignem Melanom zeigen einen signifikant erhöhten Cathepsin B Spiegel, verglichen mit Seren von Patienten ohne Metastasierung oder Seren gesunder Spender. Der Serumlevel von Cathepsin H ist ebenfalls deutlich erhöht, sowohl in Patienten mit metastasierenden, als auch, in einem geringeren Maße, in Patienten mit nicht-metastasierenden Melanomen. Das Konzentrationsprofil von Cystatin C ist dem des Cathepsin H sehr ähnlich, höchste Werte werden auch hier in Seren der Patienten mit metastasierendem Melanom gefunden (Kos et al., 1997). Kontrollseren, Seren der Patienten mit metastasierenden und nicht-metastasierenden Melanomen, zeigen im Vergleich allerdings wenig Unterschiede der Cathepsin L und Cystatin A Konzentrationen.

## 2.2 Fragestellung

Zell-Matrix Interaktionen spielen eine entscheidende Rolle für die Regulation der Expression und Aktivierung Matrix-degradierender Proteasen, die an der Invasion des malignen Melanoms maßgeblich beteiligt sind. Neben einer Vielzahl von Berichten, die auf die MMPs fokussieren, liegen mittlerweile auch einzelne Berichte vor, die ähnliche Regulationsmechanismen für die lysosomalen Cysteinproteasen beschreiben. Dabei scheinen, neben einer vermehrten Expression und intrazellulären Aktivität, vor allem die zusätzliche extrazelluläre Lokalisation aktiver Cathepsine von besonderer Bedeutung zu sein. Innerhalb eines *in vitro* Modells, welches humanes Bindegewebe als Substrat verwendet, konnten Dennhofer et al. (2003) eine vermehrte Einwanderung hoch-invasiver Melanomzellen nachweisen, die auf einer erhöhten Aktivität der Cathepsine beruhte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher, anhand humaner Melanomzelllinien, die sich aufgrund ihrer hoch- (MV3), intermediär- (SKmel28) und niedrig-invasiven (SKmel23, WM164) Fähigkeiten unterscheiden lassen, erörtert werden, welche Rolle lysosomale Cysteinproteasen bei der Invasion dermalen Bindegewebes spielen. Hierzu stand das von Dennhofer et al. (2003) etablierte *in vitro* Invasionsmodell zur Verfügung, welches im Weiteren modifiziert werden sollte, um die Analyse der Melanomzellinvasion durch humane Basalmembran zu ermöglichen. Das charakteristische Invasionsverhalten der einzelnen Zelllinien sollte anschließend mit ihren Proteaseaktivitäten in Bezug gesetzt werden, wobei speziell der Vergleich zwischen den aktiven Gelatinasen (MMP-2 und -9) und den Cathepsinen, im Besonderen Cathepsin B, untersucht werden sollte.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit sollten dann die erkennbaren Unterschiede im Invasionsverhalten und den Proteaseaktivitäten der einzelnen Melanomzelllinien hinsichtlich ihrer Cathepsin B Expression und der zellulären Lokalisation dieser Protease herausgestellt werden. Dabei sollte vordergründig geklärt werden, ob die Regulation der Protease und auch die ihrer endogenen Inhibitoren (Cystatin A, B, C) über Zell-Matrix Interaktionen vermittelt werden. Zur Analyse dieser Zell-Matrix vermittelten Regulationsmechanismen, sollte hier die Kultivierung der Melanomzellen innerhalb eines Netzwerkes aus nativen Kollagen Typ I Fibrillen, so genannten Kollagengelen, Aufschluss geben.

Die Detektion und Analyse extrazellulär aktiver Cysteinproteasen war Bestandteil weiterer Untersuchungen, die die Etablierung einer neuen zymographischen Methode voraussetzte. Diese Technik sollte ermöglichen, die Proteasen aus den Überständen der Melanomzelllinien elektrophoretisch aufzutrennen, um anschließend ihre

gelatinolytische Aktivität nachweisen und eindeutig bestimmten extrazellulären Cathepsinen zuordnen zu können. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass neben Cathepsin B möglicherweise auch andere Cathepsine extrazellulär aktiv sind.

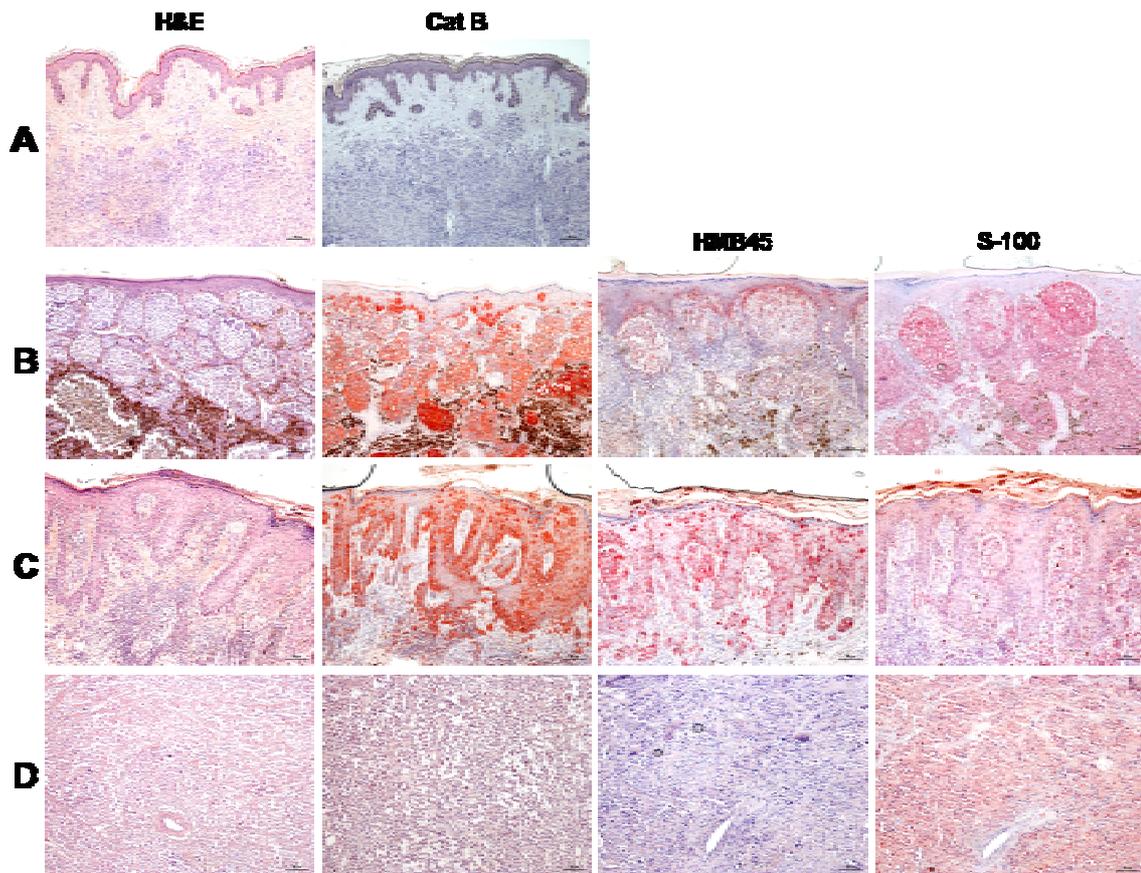
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunohistochemischer Nachweis von Cathepsin B in humanen benignen Pigmentnävi, malignen Melanomen und Metastasen

Eine Vielzahl von Autoren beschreiben, dass vermehrte Expressionsraten lysosomaler Cysteinproteasen und ihre sowohl intra- als auch extrazellulär erhöhten, proteolytischen Aktivitäten, mit der Progression des malignen Melanoms in Einklang stehen (Frohlich et al., 2001; Kageshita et al., 1995). Dabei wird vermutet, dass speziell Cathepsin B eine funktionelle Signifikanz zugeschrieben werden kann, da es sowohl an der intra- und extrazellulären Degradation von Matrixkomponenten als auch an der extrazellulären Initiation proteolytischer Kaskaden, beteiligt zu sein scheint (Cavallo-Medved und Sloane, 2003). Bislang sind die Rolle, die lysosomalen Cysteinproteasen bei der Progression des malignen Melanoms übernehmen und die dafür zugrunde liegenden Mechanismen, nicht bekannt.

Um die Bedeutung von Cathepsin B im Invasionsprozess des malignen Melanoms genauer zu untersuchen, wurden immunohistochemische Untersuchungen dieser Protease an humanem Gewebematerial benigner Pigmentnävi durchgeführt und mit entsprechenden Untersuchungen an malignen, superfiziell spreitenden Melanomen (SSM) und subkutanen Metastasen verglichen. Neben der Analyse des Cathepsin B, dienten zusätzliche immunohistochemische Untersuchungen der Tumorzelloberflächenproteine HMB45 bzw. S-100 der Identifikation maligner Melanomzellen (s. Kap. 6.2.3). In Abbildung 3.1 sind typische Ergebnisse dieser Versuchsreihe dargestellt.

In den untersuchten Gewebeproben der SSM war zu erkennen, dass in S-100 und HMB45 positiven Tumorbereichen, auch deutlich Cathepsin B positive Tumorzellen bzw. ganze Tumornester detektiert wurden (s. Abb. 3.1 B, C). Im Gegensatz dazu, war diese Protease in einem benignen Pigmentnävus kaum nachweisbar (s. Abb. 3.1 A). Die Analyse einer subkutanen Metastase zeigte Melanomzellen mit einer schwachen HMB45 Expression, die aber deutlich S-100 und ebenfalls Cathepsin B exprimierten. Diese Resultate lassen die Vermutung zu, dass lysosomale Cysteinproteasen und im Besonderen Cathepsin B entscheidend am Übergang von benignen zu malignen Wachstumsprozessen beteiligt sind. In den folgenden Versuchen, sollte daher die Rolle dieser Proteaseklasse anhand von Melanomzelllinien mit unterschiedlich invasiven Fähigkeiten *in vitro* untersucht und charakterisiert werden.



*Abbildung 3.1:* Immunohistochemische Untersuchungen eines **A** benignen Pigmentnävus, **B, C** zweier superfiziell spreitender Melanome und **D** einer subkutanen Metastase. Die Paraffingewebe wurden H&E gefärbt und mittels der Primärantikörper Maus anti-Cathepsin B Ab 7430 (Endkonzentration 2µg/ml), Maus anti-HMB45 (gebrauchsfertige Lösung) und Kaninchen anti-S-100 (gebrauchsfertige Lösung), immunohistochemisch untersucht (s. Kap. 6.2.3). Dargestellt sind lichtmikroskopischen Aufnahmen (100x Vergrößerung) der einzelnen Paraffingewebe; Skalierungsbalken sind in den jeweiligen Teilabbildungen angegeben.

### **3.2 Charakterisierung der Invasivität verschiedener Melanomzelllinien *in vitro* und die Rolle lysosomaler Cysteinproteasen bzw. MMPs bei der Degradation extrazellulärer Matrix**

Der Prozess der Tumordinvasion, welcher die Metastasierung von Tumorzellen ermöglicht, ist durch vielzählige Interaktionen zwischen den Tumorzellen und den zellulären bzw. strukturellen Komponenten des sie umgebenden Bindegewebes gekennzeichnet. *In vitro* Modelle, die zur Untersuchung invasiven Verhaltens unterschiedlichster Zelltypen dienen, bestehen aus Matrixkomponenten oder Basalmembran-ähnlichen Matrices, wie Matrigel (Hendrix et al., 1987), und stellen überwiegend zweidimensionale (2D) Systeme dar. Diese Modelle entsprechen jedoch nicht einer dreidimensionalen (3D) Architektur der ECM und erlauben daher nur bedingt die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen der Invasion. Die Entwicklung verschiedener 3D Invasionsmodelle, basierend auf artifiziellen Haut-Äquivalenten oder humaner Dermis, schafft der *in vivo* Situation ähnlichere Bedingungen und kann zur Analyse invasiver Zellen eingesetzt werden (Bechettille et al., 2000; Bullard et al., 1997; Eves et al., 2000; Meier et al., 1998). In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde ein *in vitro* Invasionsystem etabliert, das humane deepidermisierte Dermis als Substrat verwendet, um das Invasionsverhalten humaner Melanomzelllinien zu studieren (Dennhofer et al., 2003). In diesem Modell wandern hoch-invasive Melanomzellen, nach 14 Tage langer Kulturdauer, bis zu 400µm tief in das dermale Bindegewebe ein. Untersuchungen der beteiligten Proteaseklassen zeigen deutlich, dass neben aktiven MMPs, der proteolytischen Aktivität lysosomaler Cysteinproteasen eine besondere Rolle zukommt.

Für die folgenden Untersuchungen wurde dieses Invasionsmodell modifiziert (s. Kap. 6.2.2), um das Invasionsverhalten vier verschiedener, humaner Melanomzelllinien (MV3, SKmel28, SKmel23, WM164; s. Kap. 6.2.1.1) zu charakterisieren. Neben der Invasion dermalen Komponenten, standen im Besonderen die Fähigkeit der Zellen, Basalmembranen zu degradieren bzw. zu überwinden und der Vergleich zwischen beteiligten MMPs bzw. lysosomalen Cysteinproteasen im Vordergrund dieser Untersuchungen.

### **3.2.1 Das Invasionsverhalten der Melanomzelllinien durch das dermale Bindegewebe und die Basalmembran deepidermisierte humaner Dermis**

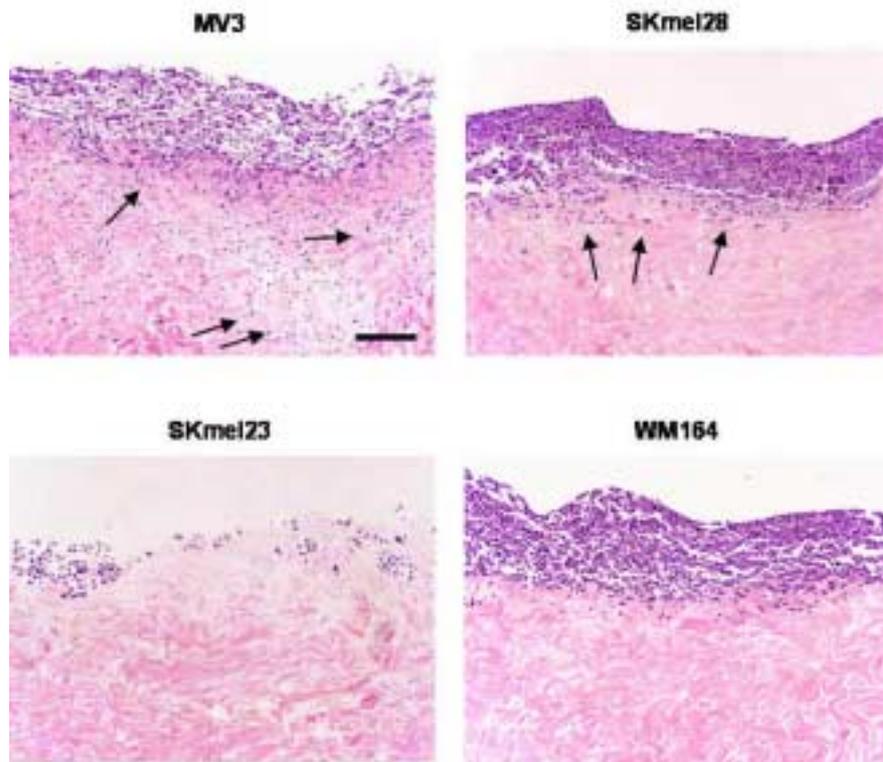
Das Invasionsverhalten der Melanomzelllinien MV3, SKmel28, SKmel23 und WM164 wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen mit Hilfe des modifizierten *in vitro* Invasionssystems verfolgt. Um innerhalb dieses Systems sowohl die Invasion dermalen Bindegewebes als auch initiiierende Schritte der Invasion, wie die Penetration der Basalmembran, analysieren zu können, mussten zwei unterschiedliche Versuchsansätze durchgeführt werden:

(a) Aussäen der einzelnen Zelllinien auf der dermalen Seite, zur Analyse der Invasion des dermalen Bindegewebes.

(b) Aussäen der Zellen auf der Basalmembran der deepidermisierten Hautkomposite, zur Analyse der Penetration dieser Barriere als ersten Schritt der Tumorzellinvasion.

Nach erfolgter Inkubation der Komposite wurden die Melanomzellen und das Bindegewebe durch H&E Färbung sichtbar gemacht. Abbildung 3.2 zeigt die Ergebnisse, nach (a) Inkubation der Zelllinien auf der dermalen Seite.

MV3 Zellen wanderten sehr tief in das dermale Bindegewebe ein (Tiefe  $\geq 500\mu\text{m}$ ), wohingegen SKmel28 Zellen nur die obere Dermis erreichten (Tiefe  $\geq 100\mu\text{m}$ ). WM164 Zellen konnten nur sehr schwach in die Dermis invadieren (Tiefe  $\leq 60\mu\text{m}$ ). Alle verwendeten Melanomzelllinien proliferierten auf der Oberfläche der Hautkomposite und bildeten mehrere Schichten aus, die teilweise abgetrennt wurden (s. SKmel23 Zellen). SKmel23 Zellen waren nicht in der Lage in das Gewebe einzuwandern.

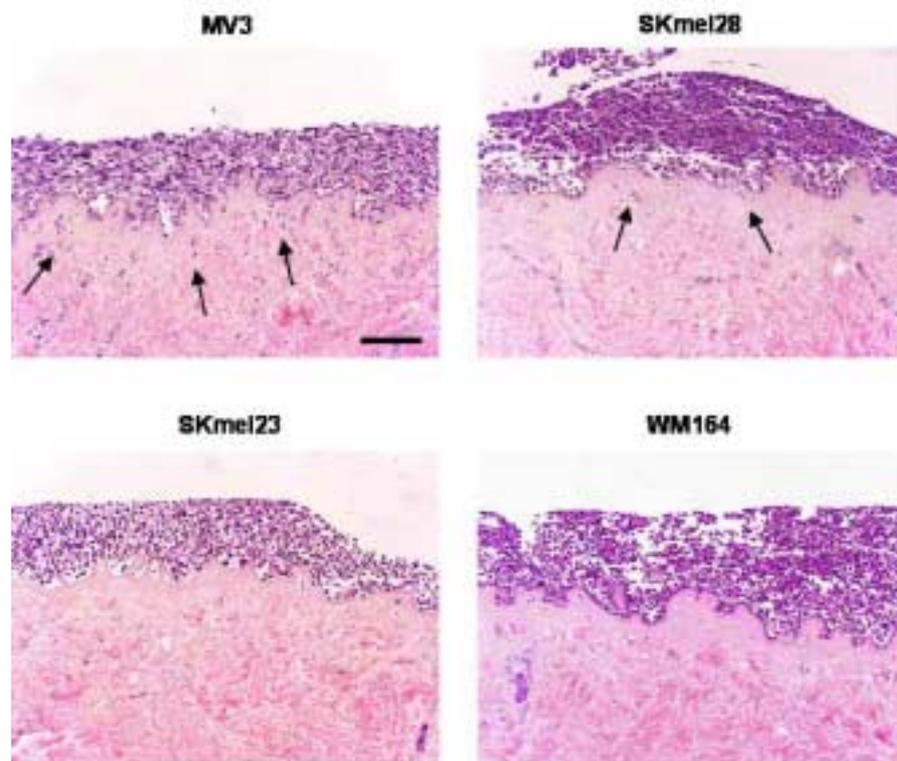


*Abbildung 3.2:* Charakterisierung der Invasivität humaner Melanomzelllinien in humane Dermis. Dargestellt sind lichtmikroskopisch aufgenommene H&E Färbungen der Hautkomposite, nach Inkubation der Melanomzelllinien auf der dermalen Seite (Vergrößerung 100x). Die Pfeile zeigen den Unterschied der Einwanderungstiefe der MV3 bzw. SKmel28 Zellen, wohingegen WM164 Zellen die Dermis nur sehr schwach invadieren und SKmel23 Zellen nicht fähig sind das Gewebe zu durchwandern. Skalierungsbalken = 150µm.

Eine deutlichere Unterscheidung der Melanomzelllinien, lieferte (b) ihre Inkubation auf der Basalmembran der Hautkomposite, dargestellt in Abbildung 3.3.

Zu sehen sind die H&E gefärbten Paraffinschnitte dieser entsprechenden Komposite. Die hoch-invasiven MV3 Zellen penetrierten flächenhaft die Basalmembran und wanderten tief in das dermale Bindegewebe ein (Tiefe  $\geq 400\mu\text{m}$ ), wohingegen SKmel28 Zellen nur sehr vereinzelt in der Dermis nachgewiesen wurden (Tiefe  $\leq 40\mu\text{m}$ ). Die Zelllinien SKmel23 und WM164 proliferierten auf der Oberfläche der Basalmembran, konnten diese Barriere jedoch nicht überwinden.

Die Zelllinien konnten aufgrund ihres Potentials die Basalmembran zu penetrieren neu klassifiziert und in den nachfolgenden Experimenten als hoch- (MV3), intermediär- (SKmel28) und niedrig-invasiv (SKmel23, WM164) bezeichnet werden.

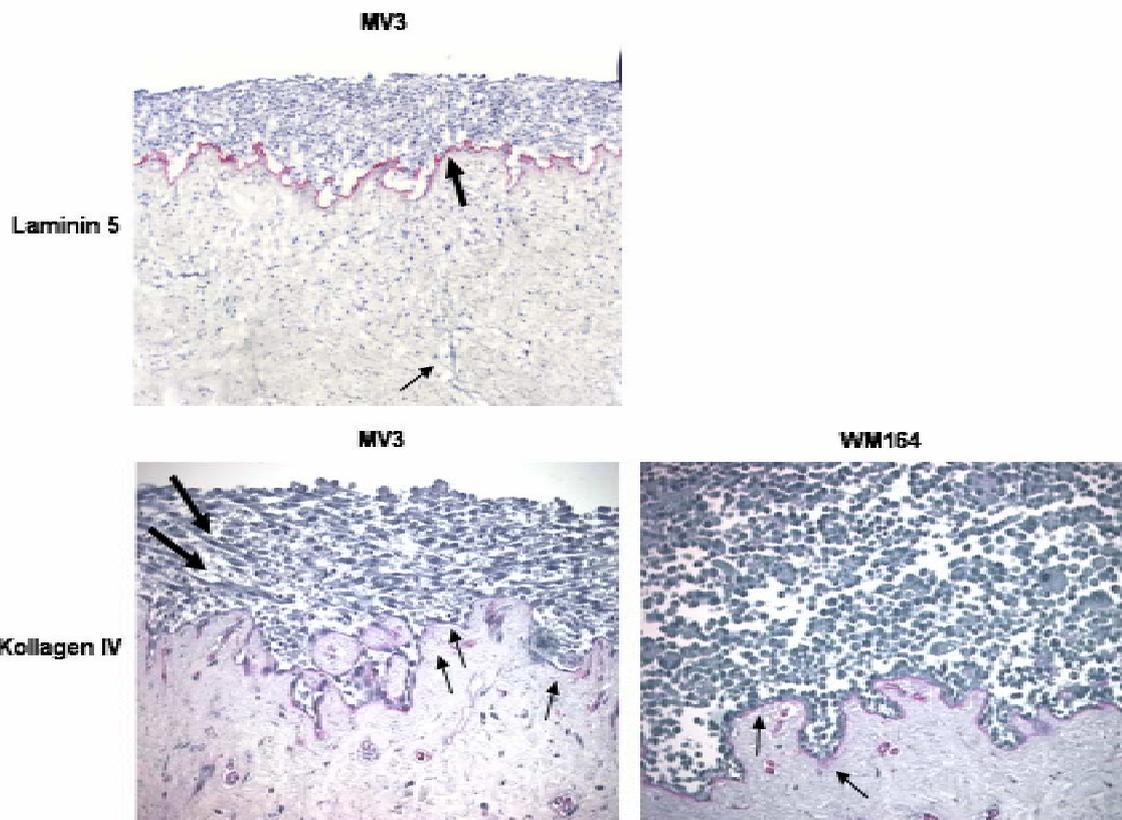


*Abbildung 3.3:* Das Invasionsverhalten humaner Melanomzelllinien durch die Basalmembran deepidermisierte Dermis. Dargestellt sind lichtmikroskopisch aufgenommene H&E Färbungen der Hautkomposite, nach Inkubation der Melanomzelllinien auf der Basalmembran (Vergrößerung 100x). MV3 und SKmel28 Zellen überwinden die Barriere und wandern in die Dermis ein. Pfeile weisen auf hoch-invasive MV3 und vereinzelte SKmel28 Zellen. Weder SKmel23, noch WM164 Zellen können die Basalmembran penetrieren. Skalierungsbalken = 150µm.

### 3.2.2 Immunohistochemischer Nachweis der Basalmembran der Komposite

Das *in vitro* Invasionsmodell basiert auf der Verwendung kleiner Hautstücke als Substrat, welche der Charakterisierung des Invasionsverhaltens verschiedener Melanomzelllinien dienen. Durch die Erwärmung der Haut in PBS (56°C, 10min), wird die Dermis von der Epidermis befreit und die Basalmembran freigelegt, auf die anschließend die Melanomzelllinien gesät und inkubiert werden. Immunohistochemische Untersuchungen einzelner Basalmembranbestandteile, ließ diese Barriere in den Hautkompositen sichtbar werden (s. Kap. 6.2.3). Unabhängig davon, welche Melanomzelllinie auf der Basalmembran inkubiert wurde, konnte sie, mittels immunohistochemischer Detektion von Laminin 5 Molekülen, als durchgängiges Band nachgewiesen werden. Als Beispiel ist im oberen Teil der Abbildung 3.4 die Laminin 5 Färbung eines Hautkomposits nach Inkubation mit MV3 Zellen gezeigt. Ein

stärker gezeichneter Pfeil weist auf die rot gefärbte Basalmembran, ein dünner Pfeil auf die weit in die Dermis eingewanderten hoch-invasiven Zellen.



*Abbildung 3.4:* Immunohistochemische Darstellung der Basalmembranbestandteile Laminin 5 und Kollagen IV. Die Färbungen wurden an 8µm dicken Paraffinschnitten mit der Hilfe von Maus anti-Kollagen IV Col-94 (gebrauchsfertige Lösung) bzw. Maus anti-Laminin 5  $\alpha 3$  BM165 (Tunggal et al., 2002) Primärantikörpern durchgeführt. Laminin 5 bzw. Kollagen IV Moleküle erscheinen in rot, die Zellkerne, nach Hämatoxylinfärbung, in blau. Die Aufnahmen wurden lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 100 (Laminin 5) bzw. 200 (Kollagen IV) angefertigt.

Im unteren Teil der Abbildung ist der immunohistochemische Nachweis des Basalmembranbestandteils Kollagen IV an Hautkompositen dargestellt, die mit MV3 oder WM164 Zellen inkubiert wurden. Auffällig in beiden Fällen war, dass sich die Zellen parallel der Basalmembran entlang anordneten (s. dünne Pfeile), wobei nur die MV3 Zellen diese durchbrechen konnten. Auch nach dem immunohistochemischen Nachweis des Kollagen IV, erschien die Basalmembran als durchgehendes Band, allerdings nur in Hautkompositen, die mit den intermediär-invasiven SKmel28 (Daten nicht dargestellt) oder den niedrig-invasiven SKmel23 (Daten nicht dargestellt) und WM164 Zellen inkubiert wurden. Als Beispiel ist hier die Kollagen IV Färbung innerhalb

eines, mit WM164 Zellen kultivierten, Komposits gezeigt. Im Gegensatz dazu erschien die Basalmembran bei, den mit MV3 Zellen kultivierten Kompositen, nicht mehr als durchgängiges Band. Vielmehr ließen sich an einzelnen Stellen nur noch die Zellen, die sich der Basalmembran parallel angelagerten, nachweisen (s. dünne Pfeile). Innerhalb dieser Komposite, wurde eine weitere Besonderheit der MV3 Zellen sichtbar. Im Vergleich zu den WM164 Zellen, die in einem lockeren Zellverband proliferierten, schienen die MV3 Zellen sich anzuordnen. Bei einer 200x Vergrößerung, ließen sich ganze Zellbündel, die sich parallel zur Basalmembran ausrichteten, erkennen (s. dicke Pfeile).

### 3.2.3 Analyse der gelatinolytischen Aktivität mittels *in situ* Zymographie

Die Degradation von Basalmembrankomponenten und interstitiellem Stroma stellt eine Grundvoraussetzung für die Tumorzellinvasion und Metastasierung dar. Mittels *in situ* Zymographie, konnten Denhofer et al. (2003), in Hautkompositen, die mit einer hochinvasiven Melanomzelllinie auf der dermalen Seite inkubiert wurden, erhöhte gelatinolytische Aktivitäten, sowohl der MMPs als auch der Cathepsine nachweisen.

Aufgrund dieser Daten und der Erkenntnisse aus den bereits erwähnten *in vitro* Invasionsexperimenten (s. Kap. 3.2.1), stellte sich die Frage, ob die charakteristischen Invasionseigenschaften der untersuchten Melanomzelllinien mit einem spezifischen Aktivitätsprofil der MMPs und der Cathepsine korrelieren. Um einen Hinweis zu erhalten, welche Proteasen bei der Penetration der Basalmembran bzw. der Invasion des dermalen Bindegewebes beteiligt sind, wurden die Hautkomposite mittels *in situ* Zymographie (s. Kap. 6.2.5.4) untersucht. Dabei wurde Gelatine als Substrat für die Detektion proteolytischer Aktivität innerhalb der Komposite eingesetzt. Zur Unterscheidung zwischen den Aktivitäten neutraler (MMPs) und saurer (Cathepsine) Proteasen, wurden die Experimente einmal unter neutralen Pufferbedingungen (pH 7,4) in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (zum Nachweis der MMPs), und einmal unter reduzierenden, sauren Pufferbedingungen (pH 5,5) ausgeführt, die die Aktivität der Cathepsine fördern. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abbildungen 3.5 und 3.6 dargestellt und in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Unter sauren Bedingungen zeigten Hautkomposite, die zuvor mit Melanomzelllinien auf der dermalen Seite (s. Abb. 3.5) oder auf der Basalmembran der deepidermisierten Dermis (s. Abb. 3.6) inkubiert wurden, gleichermaßen starke gelatinolytische Aktivitäten, die mit der Invasivität der einzelnen Zelllinien korrelierten. Demnach ließ sich die Proteolyse am stärksten in Kompositen, die mit den hochinvasiven MV3 Zellen behandelt wurden, nachweisen. Das Ausmaß der Degradation erschien schwächer in mit SKmel28 Zellen kultivierten Kompositen, und war am geringsten,

nach Inkubation der Haut mit SKmel23 oder WM164 Zellen. Der Vergleich der Zymogramme mit den entsprechenden Methylenblaufärbungen der dermalen Komposite machte deutlich, dass die Gelatinolyse über die Zellschicht hinaus, auch in tieferen Gewebeschichten erfolgte (s. Abb. 3.5). Diese Beobachtung traf, für die Inkubation auf der Basalmembran, ausschließlich für die mit MV3 Zellen behandelten Komposite zu (s. Abb. 3.6). Eine weitere Besonderheit nach dermalen Zellkultivierung, die allerdings nie in Kompositen auftrat, die mit MV3 Zellen behandelt wurden, bildete ein Bereich, der deckungsgleich mit der Zellschicht des jeweiligen Komposits war und eine hohe Konzentration an nicht degradierten Proteinen aufwies (s. weiße Pfeile). Die Blaufärbung der Zymogramme war in diesen Bereichen deutlich stärker. Ob es sich dabei um die inkooperierte Gelatine handelte oder um eine Proteinausschüttung der Zellen, konnte dieser Versuchsansatz nicht klären.

Unter neutralen Versuchsbedingungen konnte nur in Kompositen, die mit den hochinvasiven MV3 Zellen präpariert wurden, Gelatinolyse nachgewiesen werden und zwar ausschließlich nach Inkubation der Zellen auf der dermalen Seite. Komposite, die zuvor mit dieser Zelllinie auf der Basalmembran inkubiert wurden, sowie alle anderen Melanomzellkomposite zeigten, unter diesen Pufferbedingungen, keine proteolytische Aktivität. Auffällig war, dass in allen Fällen, in denen keine Gelatinolyse beobachtet wurde, wiederum den Zellschichten deckungsgleiche Bereiche auftraten, die eine hohe Proteinkonzentration aufwiesen (s. weiße Pfeile).

*Tabelle 3.1:* Zusammenfassung der *in situ* Zymographieanalysen. Die Stärke der unter beiden Pufferbedingungen (pH 7,4 bzw. pH 5,5) nachgewiesenen, gelatinolytischen Aktivitäten ist durch die Anzahl an + Symbolen dargestellt, nicht nachweisbare Aktivität entsprechend durch ein - Symbol.

Zelllinie	Basalmembran		Dermis	
	pH 7,4	pH 5,5	pH 7,4	pH 5,5
<b>MV3</b>	-	+++	++	+++
<b>SKmel28</b>	-	++	-	++
<b>SKmel23</b>	-	+	-	++
<b>WM164</b>	-	-	-	+

## Kultivierung der Melanomzelllinien auf der dermalen Seite der deepidermisierten Dermis

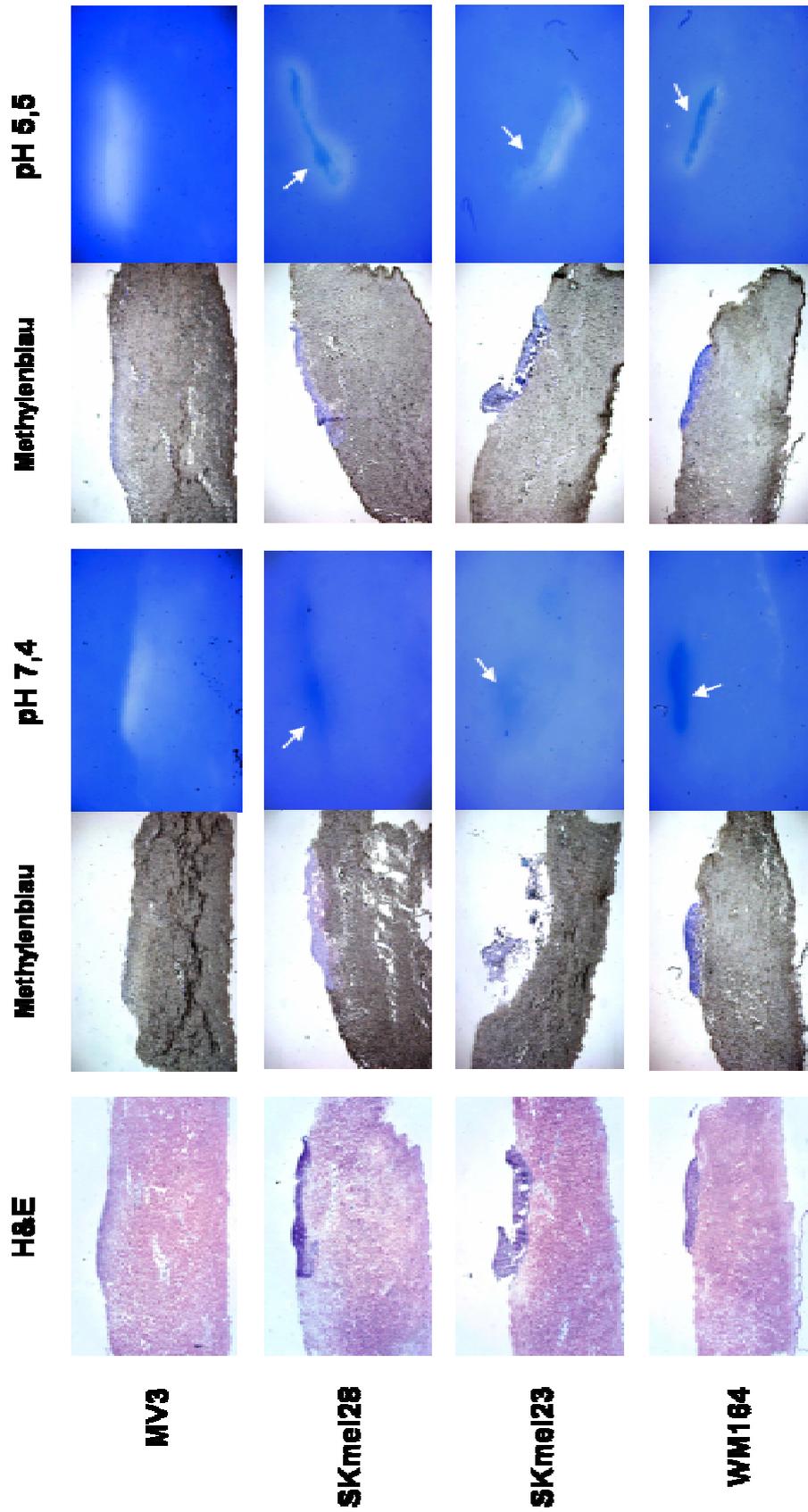
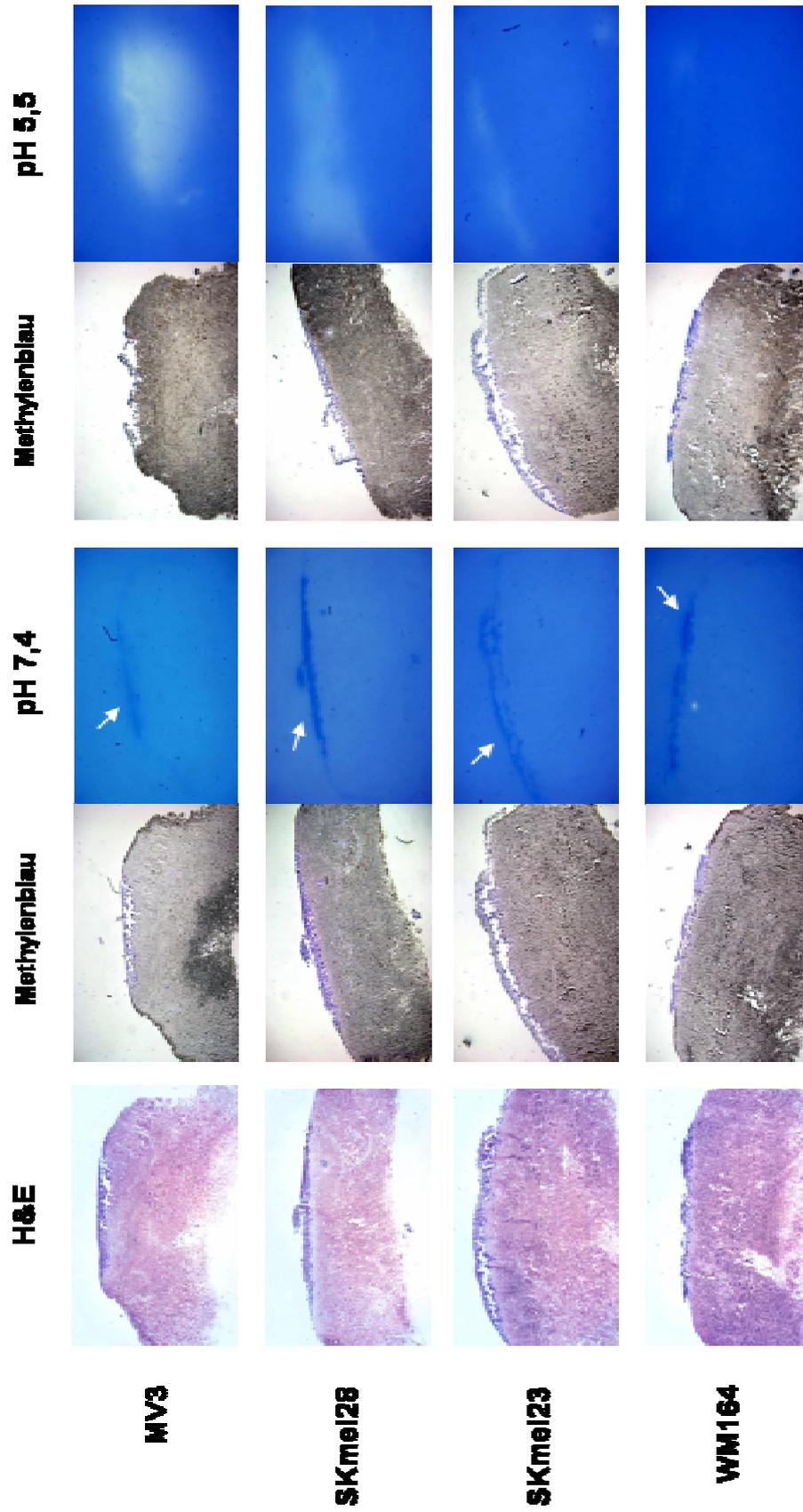


Abbildung 3.5. *In situ* Zymographie der Hautkomposite, nach Inkubation der Melanomzelllinien auf der dermalen Seite der deepidermisierten Dermis. Die Zymogramme wurden, wie in Kapitel 8.2.5.4 beschrieben, unter neutralen bzw. sauren Bedingungen durchgeführt. Dargestellt sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zymogramme und der entsprechenden H&E bzw. Methylenblaufärbungen (20x Vergrößerung).

**Kultivierung der Melanomzelllinien auf der Basalmembran der deepidermisierten Dermis**



**Abbildung 3.6:** *In situ* Zymographie der Hautkomposite, nach Inkubation der Melanomzelllinien auf der Basalmembran der deepidermisierten Dermis. Die Zymogramme wurden, wie in Kapitel 8.2.5.4 beschrieben, unter neutralen bzw. sauren Bedingungen durchgeführt. Dargestellt sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zymogramme und der entsprechenden H&E bzw. Methylenblaufärbungen (20x Vergrößerung).

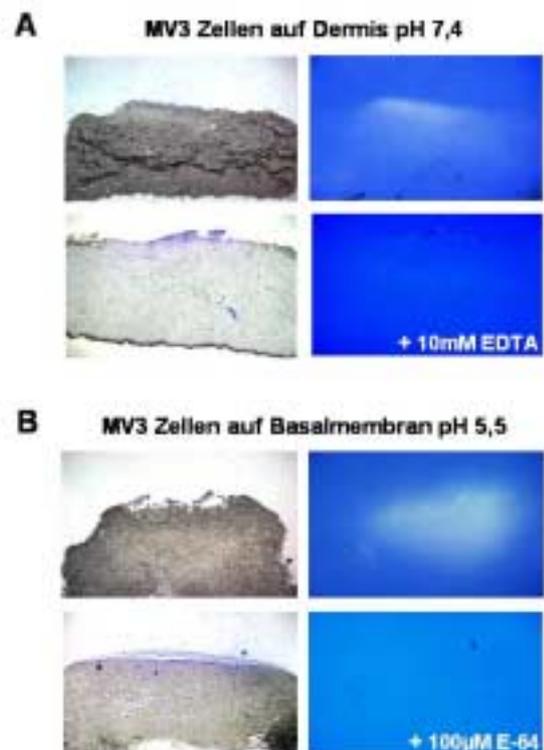
### 3.2.4 Spezifische Inhibition proteolytisch aktiver MMPs und Cathepsine

Die neutralen bzw. sauren Versuchsbedingungen der *in situ* Zymographiestudien, begünstigen möglicherweise nicht nur die Aktivitäten der MMPs bzw. Cathepsine, sondern auch die Aktivitäten anderer Proteaseklassen, wie Serin- oder Aspartatproteasen.

Um nachweisen zu können, ob unter neutralen Versuchsbedingungen nur MMPs und unter sauren Bedingungen nur Cathepsine zur Gelatinolyse beitragen, wurden die *in situ* Zymogramme in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren der beiden Proteaseklassen durchgeführt. Abbildung 3.7 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe und vergleicht sie mit den entsprechenden Zymogrammen, die in Abwesenheit der Inhibitoren angefertigt wurden (s. a. Abb. 3.5 und 3.6).

Unter neutralen Versuchsbedingungen wurde die gelatinolytische Aktivität der MV3 Zellen, die auf der dermalen Seite inkubiert wurden, durch die Zugabe von 10mM EDTA (Endkonzentration) komplett inhibiert (s. Abb. 3.7 A). Dagegen wurde die markante proteolytische Aktivität der Cathepsine in MV3 Zellen, die auf der Basalmembran kultiviert wurden, in Anwesenheit des spezifischen Cysteinproteaseninhibitors E-64 (100 $\mu$ M Endkonzentration) gänzlich gehemmt (s. Abb. 3.7 B). Die Gelatinolyse durch die Zelllinien SKmel28, SKmel23 oder WM164 wurde ebenfalls in Gegenwart von E-64 blockiert (Daten nicht dargestellt).

**Abbildung 3.7:** Spezifische Inhibition gelatinolytisch aktiver MMPs und Cathepsine in der *in situ* Zymographie. MV3 Zellen wurden auf der Dermis (**A**) bzw. der Basalmembran (**B**) kultiviert. **A** Zymogramme der Komposite, unter neutralen Bedingungen. Die Zugabe von 10mM EDTA hemmt die gesamte gelatinolytische Aktivität. **B** Zymogramme der Komposite, unter sauren Bedingungen. In Anwesenheit von 100 $\mu$ M E-64 ist die Proteolyse komplett inhibiert. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen (20x Vergrößerung) der Zymogramme und der jeweiligen Methylenblaufärbungen.



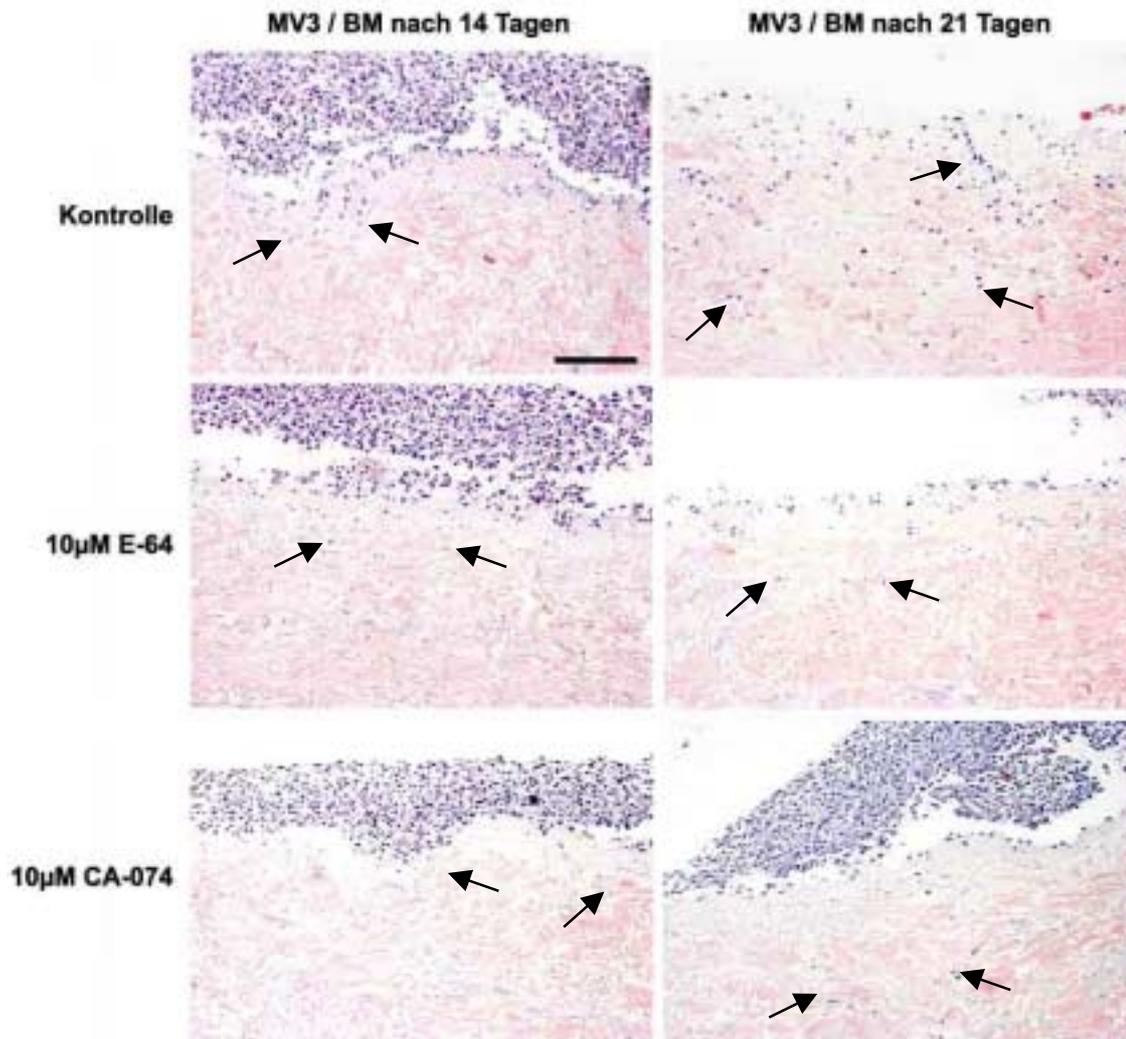
### **3.2.5 Hemmung der Melanomzellinvasion durch die Basalmembran deepidermisierte Dermis in Anwesenheit spezifischer Cathepsin-Inhibitoren**

Die oben aufgeführten *in situ* Zymographiestudien (s. Kap. 3.2.3 und 3.2.4) legen nahe, dass lysosomale Cysteinproteasen eine entscheidende Rolle sowohl bei der Degradation von Basalmembranbestandteilen als auch bei der Invasion dermalen Bindegewebes spielen. Im Fall des malignen Melanoms, werden in diesem Zusammenhang, vor allem die Cathepsine B und L diskutiert (Kos und Lah, 1998).

Um die Beteiligung lysosomaler Cysteinproteasen und im Besonderen des Cathepsin B bei der Invasion von Basalmembranbestandteilen deepidermisierte Dermis zu überprüfen, wurde erneut das Invasionsverhalten hoch-invasiver MV3 Zellen getestet, diesmal jedoch in Anwesenheit eines spezifischen Cysteinproteaseninhibitors (E-64) bzw. Cathepsin B Inhibitors (CA-074). Die Hautkomposite wurden, wie in Kapitel 6.2.2 beschrieben, über 14 bzw. 21 Tage inkubiert. Dabei erfolgte alle 48 Stunden ein Mediumwechsel, über den die jeweiligen Inhibitoren, in einer Endkonzentration von 10µM, erneut frisch zugesetzt wurden. Die Inkubation der Kontrollkomposite wurde in Abwesenheit der Inhibitoren durchgeführt. H&E Färbungen, die an Paraffinmaterial der einzelnen Komposite angefertigt wurden, sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, waren die hoch-invasiven MV3 Zellen nach 14 Tage langer Inkubation auf der Basalmembran der deepidermisierten Dermis in der Lage, diese zu durchbrechen und begannen in das unterliegende Bindegewebe einzuwandern. Nach 21 Tage langer Kultivierung war die Anzahl invadierender Melanomzellen und ihre Invasionstiefe deutlich größer (s. Pfeile). Wurde die Aktivität der Cysteinproteasen durch E-64 und die Aktivität von Cathepsin B spezifisch durch Zugabe von CA-074 gehemmt, so konnte die Invasion durch die Basalmembran in gleichem Maße gehemmt werden (81% bzw. 88% Hemmung nach 21 Tage langer Kultivierung). Zwar wurden nach der Kultivierung mit E-64 oder CA-074 einzelne Melanomzellen nachgewiesen, die tief in das Bindegewebe einwanderten (s. Pfeile), jedoch war ihre Anzahl, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, stark verringert.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Penetration der Basalmembran durch Melanomzellen die Aktivität von Cathepsin B involviert.



*Abbildung 3.8:* Hemmung der Melanomzellinvasion, nach Inkubation von MV3 Zellen auf der Basalmembran deepidermisierte Dermis. 10µM E-64 bzw. 10µM CA-074 (Endkonzentrationen) wurden den Hautkompositen über einen Zeitraum von 14 Tage (linke Spalte) bzw. 21 Tage (rechte Spalte) zugefügt. Kontrollexperimente wurden in Abwesenheit der Inhibitoren durchgeführt. Die Abbildung zeigt H&E Färbungen an Paraffinschnitten der einzelnen Komposite in 100x Vergrößerung. BM Basalmembran, Pfeile weisen auf MV3 Zellen, die durch die Basalmembran in das Bindegewebe eingewandert sind. Skalierungsbalken = 150µm.

### 3.2.6 Immunohistochemischer Nachweis von Cathepsin B in MV3 und WM164 Zellen

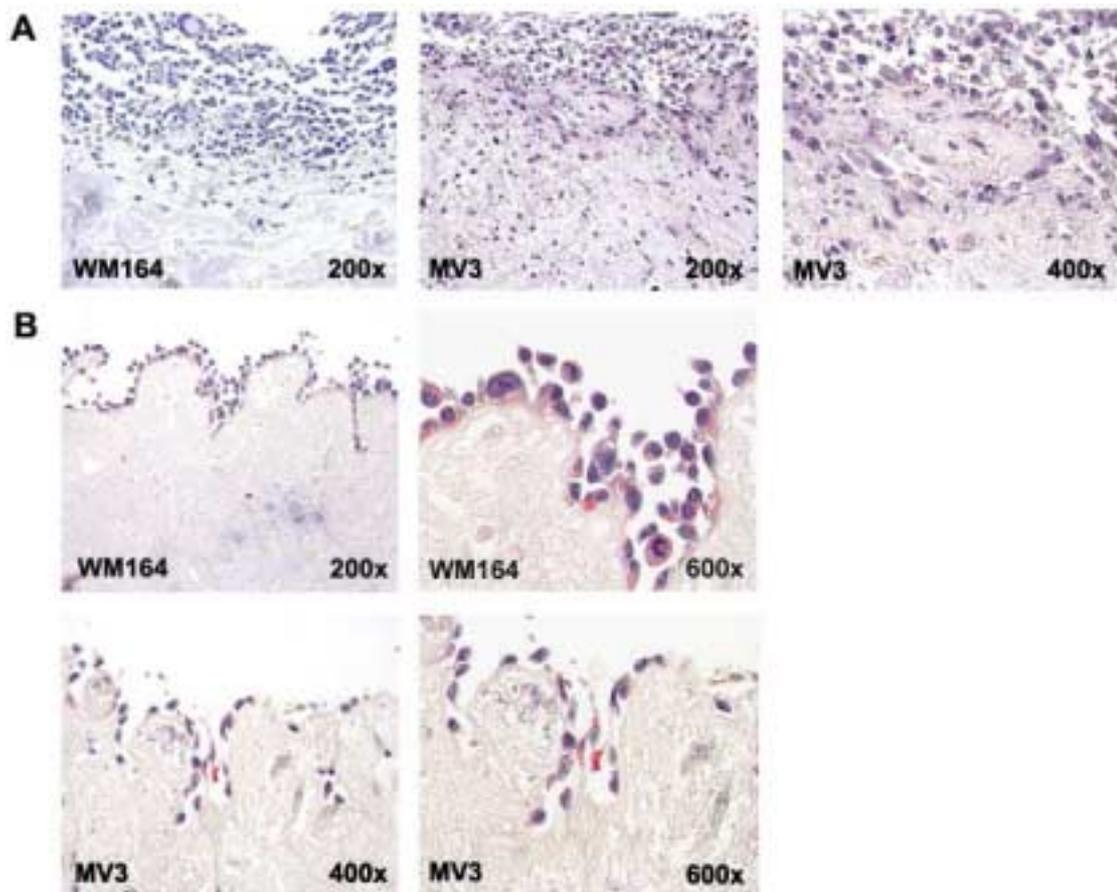
MV3 Zellen zeigen, während der Invasion durch die Basalmembran deepidermisierte Dermis, sehr hohe gelatinolytische Aktivitäten, die aufgrund der *in situ* zymographischen Analysen, ausschließlich aktiven Cathepsinen zugeordnet werden können (s. Kap. 3.2.4). Zudem wird ihre Invasion durch Hemmung von Cathepsin B bis zu 88% inhibiert (s. Kap. 3.2.5). WM164 Zellen sind nicht in der Lage, die Basalmembran zu durchwandern und in entsprechenden Hautkompositen können auch keine aktiven Cathepsine nachgewiesen werden (s. Kap. 3.2.1 und 3.2.3).

Nach Inkubation von MV3 bzw. WM164 Zellen auf der dermalen Seite der Komposite, werden jedoch für beide Zelllinien aktive Cysteinproteasen nachgewiesen, wobei ihre Aktivität in den MV3 Zellen deutlich stärker als in den WM164 Zellen ist (s. Kap. 3.2.3).

Um im Folgenden zu klären, ob diese Ergebnisse der *in situ* Zymographie mit der Cathepsin B Expression der einzelnen Zelllinien korreliert, wurden immunohistochemische Untersuchungen der Protease an Kompositen, die mit MV3 bzw. WM164 Zellen kultiviert wurden, vorgenommen (s. Kap. 6.2.3).

Abbildung 3.9 zeigt den immunohistochemischen Nachweis von Cathepsin B in MV3 und WM164 Zellen, die auf der dermalen Seite (A) bzw. der Basalmembran (B) kultiviert wurden. Hierbei wurde deutlich, dass die hoch-invasiven MV3 Zellen stark erhöhte Proteinmengen an Cathepsin B aufwiesen, wohingegen diese Protease in den WM164 Zellen kaum detektierbar war. Cathepsin B positive MV3 Zellen fanden sich sowohl in der auf der Oberfläche der Hautkomposite proliferierenden Zellschicht, als auch in den tief in das Bindegewebe eingewanderten Zellen (s. Abb. 3.9 A).

Im Gegensatz dazu, konnten in beiden Zelllinien gleichermaßen erhöhte Cathepsin B Mengen nachgewiesen werden, wenn diese Zellen auf der Basalmembran der Komposite kultiviert wurden (s. Abb. 3.9 B). Am Beispiel der WM164 Zellen, die der Basalmembran aufsaßen und diese nicht durchwandern konnten, war die cytoplasmatische Verteilung der Protease gut zu erkennen. Zellregionen, die in direktem Kontakt zur Basalmembran standen, wiesen dabei höchste Cathepsin B Konzentrationen auf.



*Abbildung 3.9:* Immunohistochemische Nachweis der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin B in Hautkompositen, nach Inkubation der MV3 bzw. WM164 Zellen auf der dermalen Seite (**A**) oder der Basalmembran deepidermisierter Dermis (**B**). Immunohistochemische Untersuchungen wurden, wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben, an Paraffinmaterial mit Hilfe des Primärantikörpers Maus anti-Cathepsin B Ab 7430 (Endkonzentration 2 $\mu$ g/ml) durchgeführt. Die jeweiligen Zelllinien und Vergrößerungen der lichtmikroskopischen Aufnahmen sind in den Teilabbildungen angegeben.

### **3.3 Molekulare Analysen der Expression und zellulären Lokalisation von Cathepsin B und seiner endogenen Inhibitoren Cystatin A, B und C in Melanomzelllinien mit unterschiedlich invasiver Kapazität**

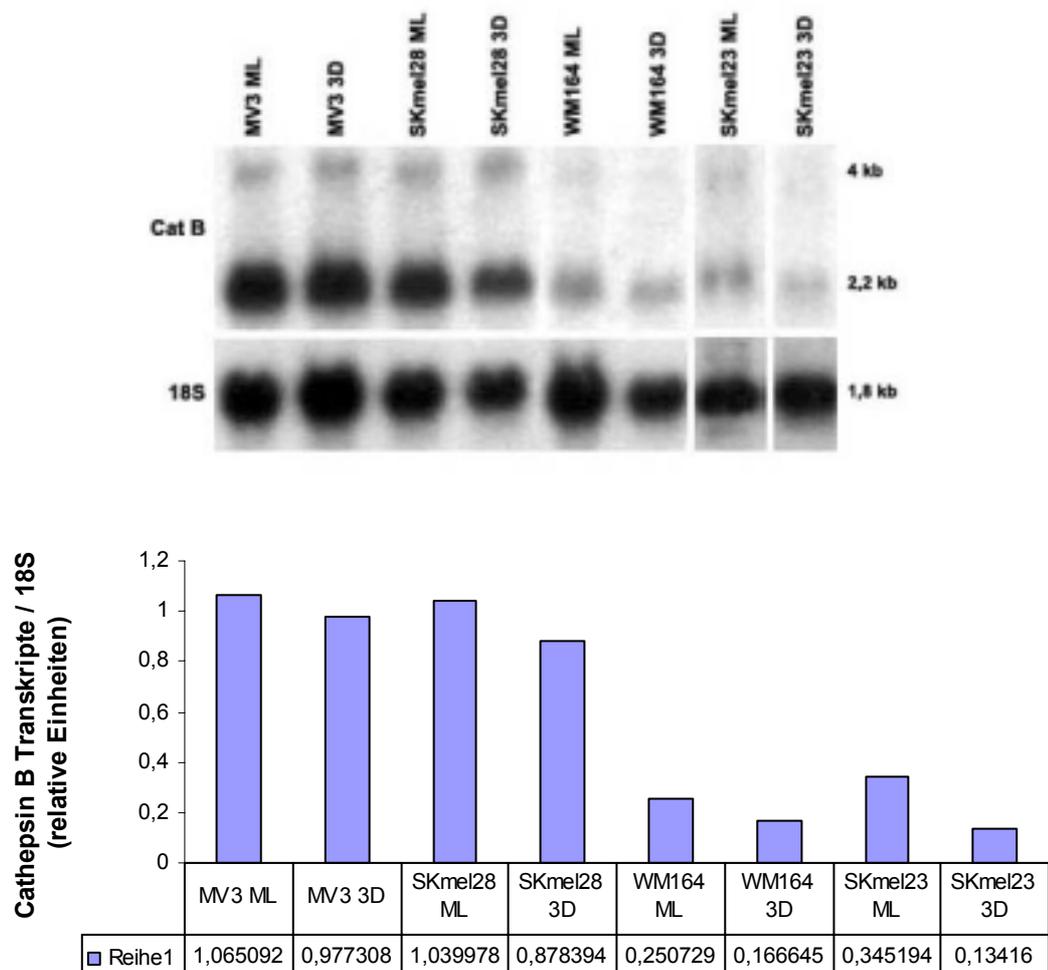
Die bisher dargestellten Untersuchungen, sowohl *in vivo* (an Gewebe von benignen Pigmentnävi, malignen Melanomen und subkutanen Metastasen, s. Kap. 3.1) als auch in einem *in vivo*-ähnlichen *in vitro* Invasionsmodell (s. Kap. 3.2) zeigen deutlich die Bedeutung von Cathepsin B für die Invasivität von Melanomzellen. Da es sich dabei um sehr komplexe Modelle handelt, sollten nun die molekularen Mechanismen in einem vereinfachten *in vitro* Modell analysiert werden, in welchem fibrilläres Kollagen Typ I, der Hauptbestandteil der Dermis, als definiertes Matrixprotein verwendet wird. Die Absicht der folgenden Experimente bestand darin, die Expression und zelluläre Lokalisation der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin B in Melanomzelllinien mit unterschiedlich invasiver Kapazität zu analysieren. Dabei sollte vordergründig die Rolle von Melanomzell-Matrix Interaktionen bei der Regulation der Expression bzw. des *trafficking* dieser Protease und ihrer endogenen Inhibitoren, Cystatin A, B und C, untersucht werden.

#### **3.3.1 Northern Blot Analysen der Cathepsin B mRNA Expression**

Als erster Schritt wurde die Cathepsin B mRNA Expression innerhalb der hoch- (MV3), intermediär- (SKmel28) und niedrig-invasiven (SKmel23, WM164) Melanomzelllinien untersucht, die als Monolayer (ML) oder in Kontakt zu fibrillärem Kollagen Typ I (3D) kultiviert wurden (s. Kap. 6.2.1.1 und 6.2.1.2).

Abbildung 3.10 zeigt die Ergebnisse der Northern Blot Analysen aller untersuchten Melanomzelllinien. Dargestellt ist die Cathepsin B mRNA Expression der Monolayer Kulturen im Vergleich zur Expression nach Kultivierung der Zellen in 3D Kollagen Typ I Gelen, sowie die densitometrische Auswertung dieser Versuchsreihe.

Die Analysen zeigten deutlich vermehrte Cathepsin B Transkriptmengen in den hoch- und intermediär-invasiven Zelllinien MV3 bzw. SKmel28, im Vergleich zu den niedrig-invasiven Zelllinien SKmel23 und WM164. Nach der densitometrischen Auswertung konnten in den beiden invasiven Zelllinien vier- bis fünffach höhere Transkriptmengen gegenüber den niedrig-invasiven Zellen verzeichnet werden. Die Kultivierung der Zellen in Kontakt zu nativem Kollagen Typ I führte bei keiner der untersuchten Zelllinien zu einer Regulation der Cathepsin B mRNA Menge.



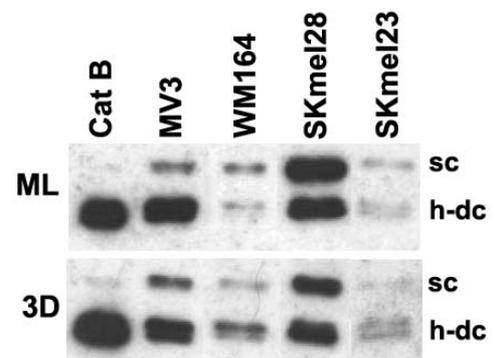
*Abbildung 3.10:* Northern Blot Analyse der Cathepsin B mRNA Expression (Cat B). 5µg der gesamten zellulären RNA der verschiedenen Melanomzelllinien nach Monolayer (ML) Kultivierung bzw. Kultivierung innerhalb fibrillärer Kollagen Typ I Matrices (3D) wurden für Northern Blot Analysen eingesetzt und die Membranen anschließend mit einer <sup>32</sup>P markierten Cathepsin B cDNA Sonde hybridisiert, die spezifisch die beiden mRNA Transkripte (4kb und 2,2kb) der Protease detektiert. Unterschiede in der Beladung sind durch die Hybridisierung der Membranen mit 18S rRNA dargestellt. Die Quantifizierung der Cathepsin B mRNA Transkripte erfolgte densitometrisch und wurde hinsichtlich der 18S rRNA Signale normalisiert (s. Kap. 6.2.4.4). Hierzu wurden die Intensitäten beider Cathepsin B Transkripte addiert. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

### 3.3.2 Analyse der Cathepsin B Proteinexpression

Um die Proteinexpression und die zelluläre Lokalisation von Cathepsin B zu untersuchen, wurden die Überstände, Lysate und Membranpräparationen (s. Kap. 6.2.5.1) der Melanomzelllinien unter den Bedingungen der Monolayer Kultivierung, als auch nach ihrer Kultivierung innerhalb 3D Kollagen Typ I Gelen analysiert.

Die Analyse der Zellysate verdeutlichte, dass reifes Cathepsin B Protein in allen Melanomzelllinien nachgewiesen wurde, wohingegen die Proform der Protease intrazellulär nicht auftrat (s. Abb. 3.11). Dabei fiel auf, dass neben der 31kDa großen *single-chain* Form (sc) des reifen Enzyms, auch die voll prozessierte *double-chain* Form (dc) zu erkennen war. Da der verwendete anti-Cathepsin B Antikörper spezifisch ein Epitop der h-dc erkannte, ließ sich unter reduzierenden Bedingungen die l-dc nicht nachweisen. Deutlich zu sehen waren jedoch die nicht glykosylierte (25kDa) und die glykosylierte Form der h-dc (26kDa). Übereinstimmend mit den oben dargestellten Transkriptmengen, fanden sich die höchsten intrazellulären Konzentrationen der Protease in MV3 und SKmel28 Zellen, wohingegen die niedrig-invasiven SKmel23 und WM164 Zellen deutlich weniger Cathepsin B intrazellulär anreicherten. Auch waren keine Mengenunterschiede des reifen Enzyms nach Kontakt der Zellen zu nativem Kollagen Typ I zu verzeichnen, wie der Vergleich des intrazellulären Cathepsin B Spiegels nach Monolayer Kultivierung verdeutlichte.

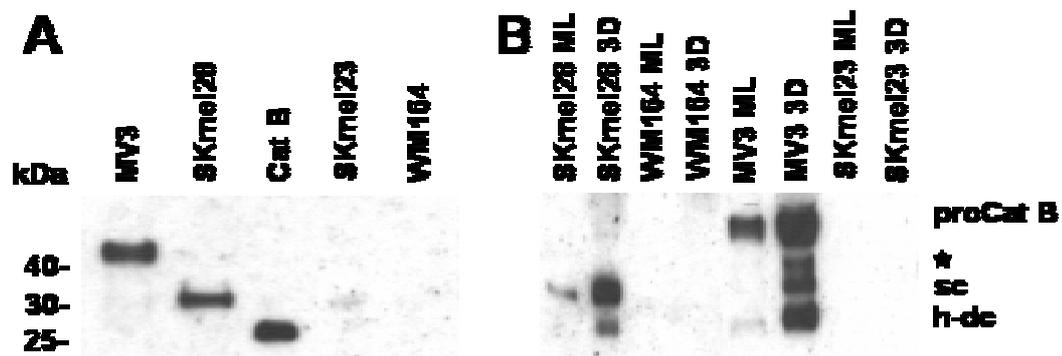
**Abbildung 3.11:** Western Blot Analyse der intrazellulären Cathepsin B Proteinmengen. Untersucht wurden die Lysate, resultierend aus jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen der vier Melanomzelllinien, nach Monolayer (ML) bzw. 3D Kollagen Typ I Kultivierung. Zur Immunodetektion wurde der Maus anti-Cathepsin B CB 59-4B11 Primärantikörper in einer Endkonzentration von  $2\mu\text{g/ml}$  eingesetzt. 250ng / Bahn, aus humaner Leber aufgereinigtes, Cathepsin B (**Cat B**) dienten als Positivkontrolle der Detektion. **sc** *single-chain* Form der Protease (31kDa); **h-dc** *heavy-chain* der *double-chain* Form des reifen Cathepsin B (25 / 26kDa).



Die Analyse der Überstände der Melanomzellen dagegen zeigte ein weitgehend anderes Bild. Nach der Kultivierung der Melanomzelllinien als Monolayer auf Plastik Kulturschalen, waren nur MV3 und SKmel28 Zellen in der Lage, Cathepsin B konstitutiv in den extrazellulären Raum auszuschleusen, wohingegen SKmel23 und WM164 Zellen keine bemerkenswerten bzw. nachweisbaren Mengen der Protease

entließen. Dabei war festzuhalten, dass die Ausschleusung von Procathepsin B exklusiv für die hoch-invasiven MV3 Zellen beobachtet wurde. SKmel28 Zellen hingegen entließen, unter diesen Kulturbedingungen, ausschließlich die Cathepsin B sc Form (s. Abb. 3.12 A).

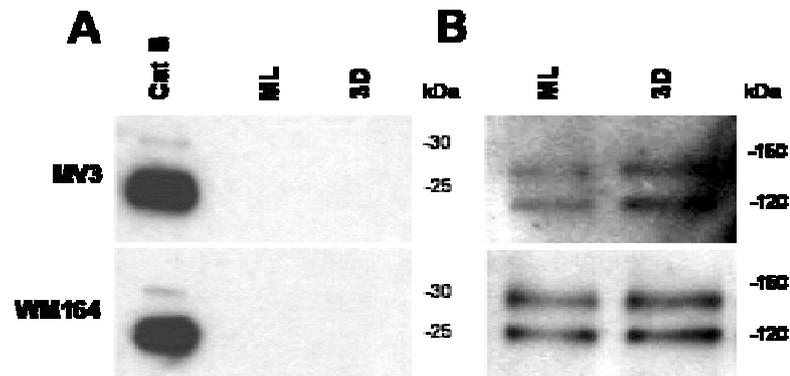
Auch nach Kultivierung der Zelllinien in fibrillärem Kollagen Typ I, konnte kein Cathepsin B in Überständen der SKmel23 und WM164 Zellen detektiert werden. Zusätzlich zu ihrer konstitutiven Freisetzung des Procathepsin B, wurden in den Überständen der MV3 Zellen nach ihrem Kontakt zu nativen Kollagenfibrillen auch beide aktiven Formen der Protease (sc und h-dc) nachgewiesen. Auch wurde eine weitere Bande sichtbar, die einem Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 30 und 40kDa entspricht und möglicherweise eine glykosylierte Cathepsin B Übergangsform darstellt (s. Sternchen). Nach 3D Kollagengel Kultivierung konnten in den Überständen der SKmel28 Zellen, neben der konstitutiv ausgeschleusten sc Form, auch deutlich die komplett prozessierte dc Form der Protease extrazellulär nachgewiesen werden (s. Abb. 3.12 B).



**Abbildung 3.12:** Immunoblot Analysen der Melanomzellüberstände resultierend aus **A** Monolayer Kulturen (ML) und **B** Vergleich mit Überständen nach Kultivierung der Zellen in 3D Kollagen Typ I Gelen. Die jeweiligen Überständen wurden auf eine Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen normalisiert. Zur Detektion wurde der Maus anti-Cathepsin B CB 59-4B11 Primärantikörper in einer Endkonzentration von  $2\mu\text{g/ml}$  eingesetzt. 250ng, aus humaner Leber aufgereinigtes, Cathepsin B (**Cat B**) dienten als Positivkontrolle der Detektion. **proCat B** Procathepsin B (43 / 46kDa); **sc** *single-chain* Form der Protease (31kDa); **h-dc** *heavy-chain* der *double-chain* Form des reifen Cathepsin B (25 / 26kDa). Das Sternchen markiert eine Bande, die nach Kontakt zu 3D Kollagenfibrillen, zusätzlich in MV3 Überständen auftritt.

Die Analyse der Membranpräparationen der einzelnen Zelllinien, die für 72 Stunden als Monolayer bzw. innerhalb 3D Kollagenfibrillen kultiviert wurden, ist in Abbildung 3.13 am Beispiel der MV3 und der WM164 Zellen dargestellt. Weder in

Membranpräparationen der hoch-invasiven MV3, noch in Präparationen der niedrig-invasiven WM164 Zellen, konnte Cathepsin B detektiert werden. Als Kontrolle erfolgreicher Membranpräparationen diente die Detektion von pan-Cadherin, die ebenfalls in Abbildung 3.13 zu sehen ist.



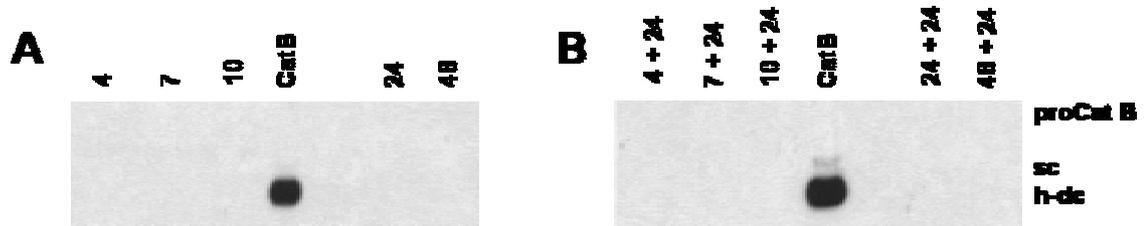
*Abbildung 3.13:* Western Blot Analysen von Plasmamembranpräparationen der Melanomzelllinien MV3 und WM164, nach ihrer Kultivierung als Monolayer (ML) bzw. innerhalb 3D Kollagenmatrices. **A** Plasmamembranpräparationen von jeweils  $1,5 \times 10^5$  Zellen wurden mit Hilfe des Maus anti-Cathepsin B CB 59-4B11 Primärantikörper (Endkonzentration  $2\mu\text{g/ml}$ ) untersucht. **Cat B**, 250ng aus humaner Leber gereinigtes Cathepsin B. **B** Zur Kontrolle erfolgreicher Membranpräparationen wurde zusätzlich die immunologische Detektion von **pan-Cadherin** mit dem Kaninchen anti-pan-Cadherin pep-1 Primärantikörper (Endkonzentration 1:1000; Choi et al., 1990) durchgeführt. Ein Molekulargewichtsstandard ist jeweils rechts im Bild dargestellt.

Im Gegensatz zu den hoch-invasiven MV3 Zellen konnte, für die niedrig-invasiven WM164 Zellen weder extrazelluläres noch membrangebundenes Cathepsin B nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob Cathepsin B von diesen Zellen möglicherweise zu einem früheren Zeitpunkt ausgeschleust oder außerhalb der Zellen degradiert wird, wurden die Überstände nach 4, 7, 10, 24 und 48 Stunden langer Kultivierung der Zellen innerhalb 3D Kollagengele analysiert.

Gleiche Proteinmengen der Überstände wurden dann für Immunoblot Analysen eingesetzt und hinsichtlich der Cathepsin B Ausschleusung untersucht. Wie die Abbildung 3.14 A zeigt, konnte zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung innerhalb nativer Kollagenfibrillen extrazelluläres Cathepsin B detektiert werden.

Die in den Gelen eingebetteten Zellen wurden anschließend jeweils für weitere 24 Stunden in serumfreien Medium kultiviert und die daraus resultierenden Überstände ebenfalls analysiert, um eine eventuelle Induktion der Cathepsin B Ausschleusung

unter serumfreien Kulturbedingungen zu dokumentieren. Jedoch war auch unter diesen Bedingungen zu keinem Zeitpunkt extrazelluläres Cathepsin B in den Überständen der WM164 Zellen nachweisbar (s. Abb. 3.14 B).



**Abbildung 3.14:** Zeitabhängige Analyse der Cathepsin B Ausschleusung. Untersucht wurden die Überstände der WM164 Zellen nach **A** 4, 7, 10, 24 und 48 Stunden langer Kultivierung innerhalb 3D Kollagengele und **B** jeweils weiteren 24 Stunden serumfreier Kultivierung der Zellen (4+24, 7+24, 10+24, 24+24, 48+24 Stunden) hinsichtlich der extrazellulären Anwesenheit von Cathepsin B. Die analysierten Proteinmengen der Überstände wurden auf  $1,5 \times 10^5$  Zellen normalisiert. Zur Immunodetektion wurde der Maus anti-Cathepsin B CB 59-4B11 Primärantikörper in einer Endkonzentration von  $2\mu\text{g/ml}$  eingesetzt. **Cat B**, 250ng aus humaner Leber gereinigtes Cathepsin B; **proCat B** Procathepsin B (43 / 46kDa); **sc** *single-chain* Form der Protease (31kDa); **h-dc** *heavy-chain* der *double-chain* Form des reifen Cathepsin B (25 / 26kDa).

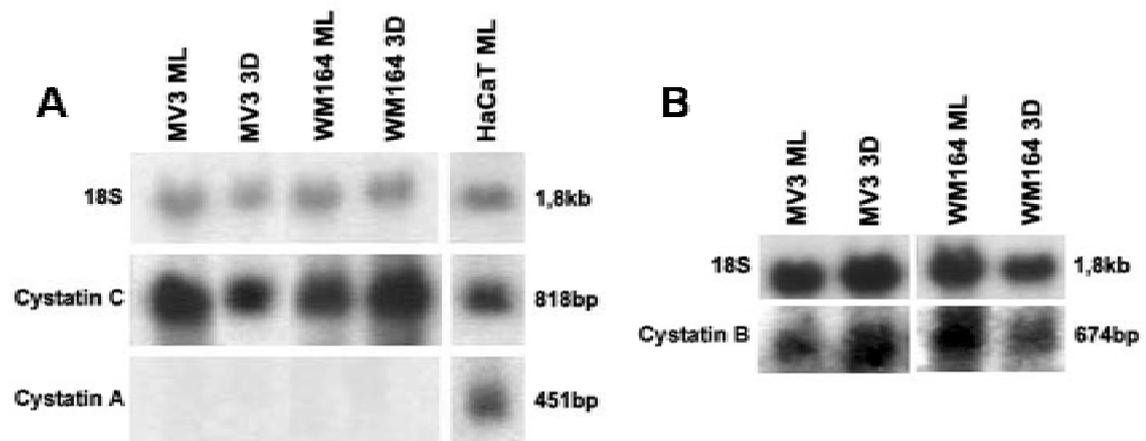
### 3.3.3 Die Expression und Lokalisation der endogenen Inhibitoren Cystatin A, B und C

Die Aktivität lysosomaler Cysteinproteasen wird *in vivo* auf unterschiedlichen Ebenen reguliert. Zu diesen zählen auch die endogenen Inhibitoren (s. Kap. 2.1.7).

Um herauszuarbeiten, ob die Balance zwischen Protease und Inhibitor die tatsächlichen Cathepsinaktivitäten der Melanomzellen bestimmt, wurde in den folgenden Experimenten die Expression und zelluläre Lokalisation der endogenen Inhibitoren, Cystatin A, B und C in Melanomzelllinien mit unterschiedlich invasiven Fähigkeiten untersucht. Dazu wurden zelluläre RNA, Überstände und Lysate der einzelnen Melanomzelllinien, nach Monolayer oder 3D Kollagen Typ I Kultivierung, eingesetzt und miteinander verglichen.

Spezifische cDNA Sonden der jeweiligen Cystatine wurden mittels RT-PCR unter Zugabe entsprechender Primer (s. Kap. 6.1.8) aus RNA, die zuvor von HaCaT (Cystatin C), Jurkat (Cystatin A) oder WM164 (Cystatin B) Monolayer Kulturen gewonnen wurde, generiert (s. Kap. 6.2.4.2).

Diese cDNA Sonden erkannten spezifisch die mRNA Transkripte der Cystatine A (451bp), B (674bp) und C (818bp). Nach Kultivierung der Zellen als Monolayer oder innerhalb 3D Kollagengele konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Cystatin B und C Transkriptmengen festgestellt werden, weder in hoch- MV3 noch in niedrig-invasiven WM164 Zellen. Cystatin A Transkripte sind hingegen unter beiden Kulturbedingungen in keiner der untersuchten Zelllinien nachweisbar, während ein spezifisches Transkript in HaCaT RNA detektiert wurde (s. Abb. 3.15 A).



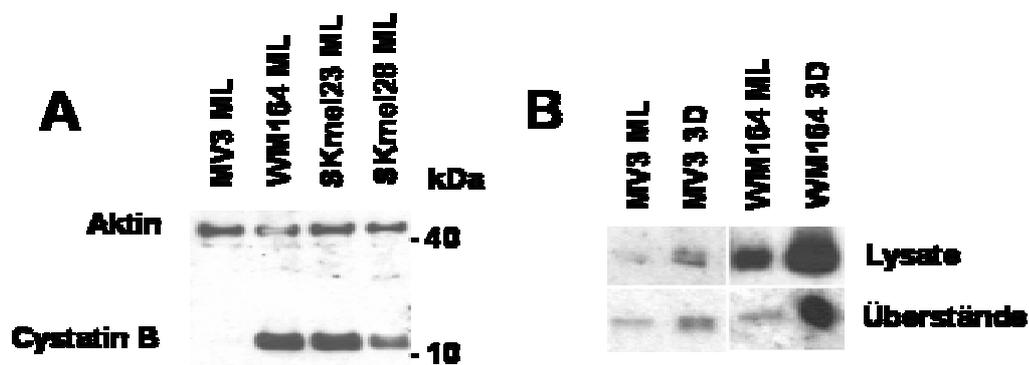
*Abbildung 3.15:* Northern Blot Analysen der Cystatin A, B und C mRNA Expression in MV3 und WM164 Zellen, nach Monolayer (ML) oder 3D Kollagen Typ I Kultivierung. 10µg der gesamten zellulären RNA der jeweiligen Melanomzelllinie wurden für Northern Blot Analysen eingesetzt und die Membranen anschließend mit spezifischen <sup>32</sup>P markierten cDNA Sonde für Cystatin A und C (**A**) und Cystatin B (**B**) hybridisiert. Die jeweiligen Längen der Transkripte sind rechts der Abbildungen angegeben. Als Kontrolle, speziell für die Detektion spezifischer Cystatin A mRNA, wurde die Hybridisierung ebenfalls an RNA aus HaCaT Monolayer Kulturen durchgeführt. Unterschiede in der Beladung sind durch zusätzliche Hybridisierung der Membranen mit 18S rRNA dargestellt.

Die Proteinsynthese und zelluläre Lokalisation der einzelnen Inhibitoren wurde durch Immunoblot Analysen der Zellysate und Überstände untersucht (s. Kap. 6.2.5.2) und ist in den Abbildungen 3.16 und 3.17 zusammengefasst.

Cystatin B wurde zwar intrazellulär in allen untersuchten Zelllinien nach Monolayer Kultivierung detektiert, jedoch konnten deutliche Konzentrationsunterschiede des Inhibitors zwischen den einzelnen Zelllinien nachgewiesen werden (s. Abb. 3.16 A). Dabei wiesen Lysate der WM164 und SKmel23 Zellen höchste Mengen des Inhibitors auf, wohingegen Cystatin B in SKmel28 Zellen in geringeren Mengen und in MV3 Zellen kaum nachweisbar war. Ein Vergleich der intrazellulären Konzentrationen des Inhibitors nach Kultivierung der Zelllinien in 3D Kollagengelen verdeutlichte, dass

sowohl in MV3 als auch in WM164 Zellen der Kontakt mit kollagener Matrix zur Induktion der Cystatin B Synthese führte. Jedoch war die Cystatin B Konzentration in den hoch-invasiven MV3 Zellen auch in diesem Kultursystem deutlich geringer als in den niedrig-invasiven WM164 Zellen (s. Abb. 3.16 B).

Vergleichsweise niedrige Konzentrationen des Inhibitors fanden sich auch in den Überständen beider Zelllinien nach Monolayer Kultivierung. Wurden die Zellen jedoch innerhalb nativer Kollagenfibrillen kultiviert, war die extrazelluläre Cystatin B Konzentration in den Überständen der WM164 Zellen deutlich, gegenüber denen der MV3 Zellen, erhöht (s. Abb. 3.16 B).

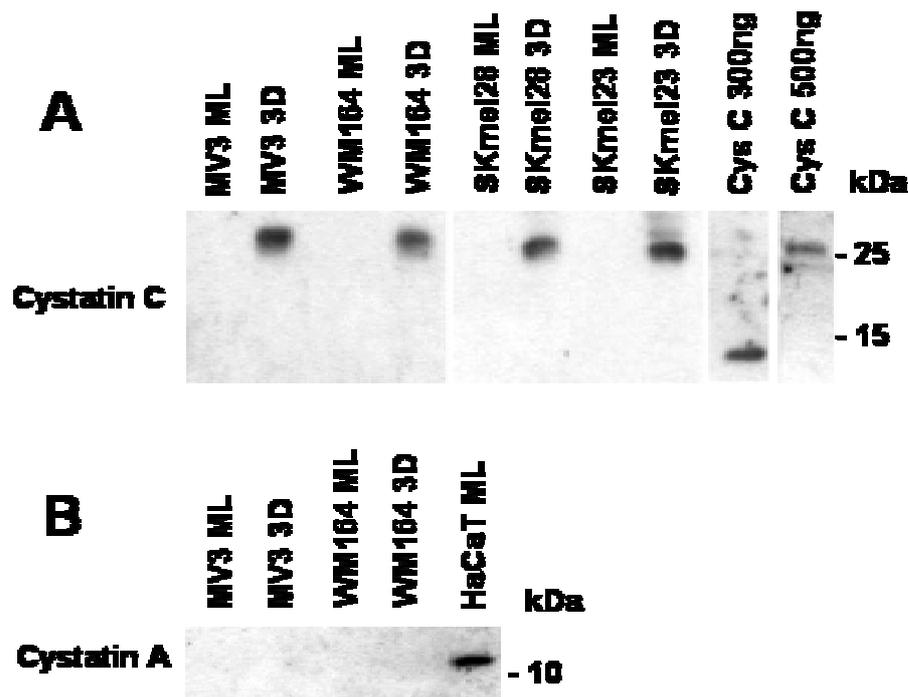


*Abbildung 3.16:* Immunologische Detektion von Cystatin B in Lysaten der Melanomzelllinien nach Monolayer (ML) Kultivierung (**A**) und im Vergleich mit Lysaten und Überständen nach Kultivierung von MV3 bzw. WM164 Zellen innerhalb 3D Kollagengele (**B**). Analysiert wurden Lysate, resultierend aus jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen bzw. die Menge an Überstand, die einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen entsprach. Der Maus anti-Cystatin B RJMW 2E7 Primärantikörper wurde in einer Endkonzentration von 100ng/ml zum spezifischen Nachweis des Inhibitors verwendet. Unterschiede in der Beladung sind durch die zusätzliche Detektion des Aktinspiegels (Kaninchen anti-Aktin C11, Endkonzentration 6µg/ml) dargestellt.

Extrazelluläres Cystatin C war in keiner der analysierten Melanomzelllinien unter den Bedingungen der Monolayer-Kultur zu detektieren. Nach Kultivierung der Zellen in 3D Kollagenmatrices dagegen wurden deutlich erhöhte Mengen Inhibitors in den Überständen aller Melanomzelllinien gefunden (s. Abb. 3.17 A). Dabei fiel auf, dass Cystatin C nur als Dimer, mit einem Molekulargewicht von 26kDa, nachgewiesen wurde. Aus humanem Urin gereinigtes Cystatin C, welches als Positivkontrolle der Immunodetektion diente, erschien bei einer Konzentration von 500ng ebenfalls als Dimer, wohingegen 300ng des Inhibitors deutlich als Monomer nachgewiesen wurden. Innerhalb dieser Versuchsreihe konnte nicht geklärt werden, ob extrazelluläres Cystatin C als Dimer ausgeschleust wurde oder erst im extrazellulären Raum dimerisierte. Die

Immunoblot Analysen des gereinigten Inhibitors wiesen allerdings darauf hin, dass die Dimerisierung auch durch hohe Konzentrationen des Inhibitors induziert werden könnte.

Im Falle des Cystatin A konnte dieser Inhibitor in keiner der untersuchten Melanomzelllinien und unter keiner der Kulturbedingungen nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der immunologischen Analyse wurde auch hierfür ein Lysat aus HaCaT Zellen verwendet, in welchem der intrazelluläre Inhibitor detektiert wurde (s. Abb. 3.17 B).



*Abbildung 3.17:* Immunodetektion der Cystatine C (A) und A (B). Zur Analyse des extrazellulären Cystatin C wurden gleiche Mengen der Überstände aus Monolayer (ML) bzw. 3D Kollagen Typ I Kulturen der Melanomzelllinien, die jeweils einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen entsprachen, eingesetzt und mit Hilfe des Primärantikörpers Ziege anti-Cystatin C P-14 (Endkonzentration  $4 \mu\text{g/ml}$ ) untersucht. **Cys C**, 300 bzw. 500ng aus humanem Urin gereinigtes Cystatin C. Die Analyse des intrazellulären Cystatin A wurde an Lysaten (einer Zellzahl von  $2 \times 10^4$  entsprechend) der MV3 bzw. WM164 Zellen nach Monolayer (ML) und 3D Kollagen Typ I Kultivierung vorgenommen. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper Maus anti-Cystatin A WR 23/2/3/3 (Endkonzentration  $200 \text{ng/ml}$ ). Ein Lysat aus HaCaT Zellen diente als Positivkontrolle des Cystatin A Nachweises.

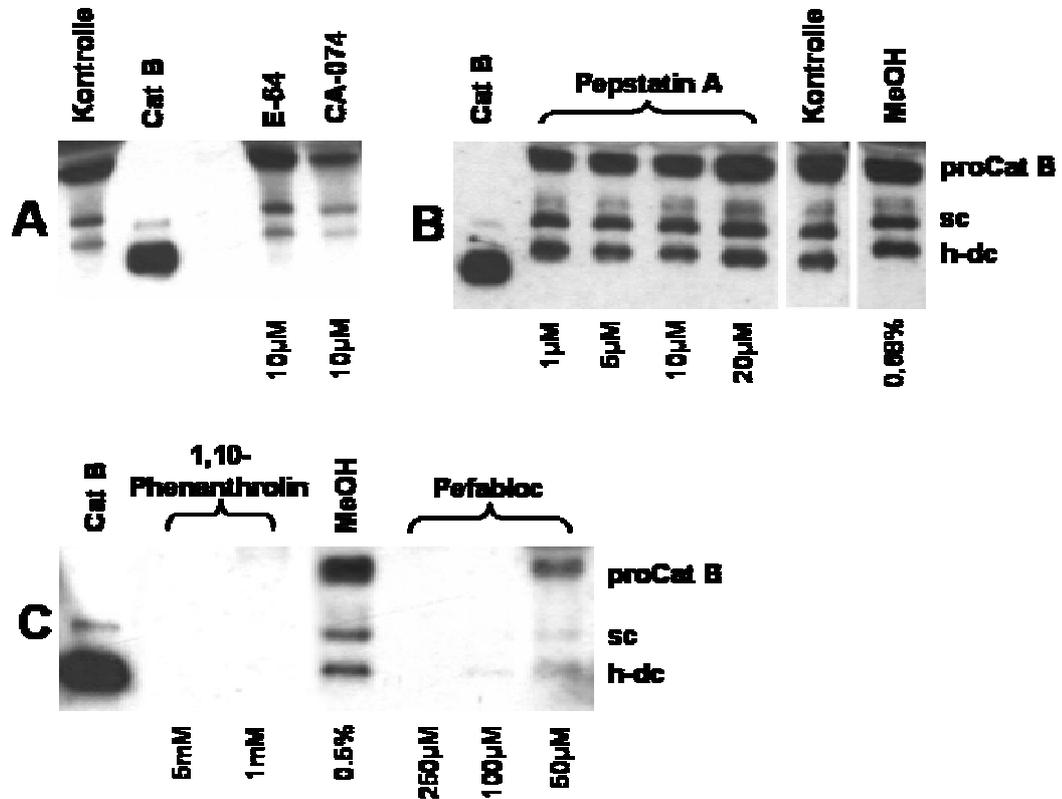
### 3.3.4 Untersuchungen der extrazellulären Procathepsin B Prozessierung

Aus den oben dargestellten Untersuchungen ist deutlich geworden, dass hoch-invasive MV3 Zellen unter Monolayer Kulturbedingungen, konstitutiv Procathepsin B in den extrazellulären Raum sezernieren. Nach Kultivierung der Zellen in Kontakt mit nativen 3D Kollagenfibrillen werden zusätzlich beide reife Formen (sc und dc) der Protease extrazellulär nachgewiesen (s. Abb. 3.12). Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich nun die Frage, ob die Aktivierung auf einer autokatalytischen Zymogenaktivierung beruht oder auf der Prozessierung des extrazellulären Procathepsin B durch andere, ebenfalls extrazelluläre Proteasen zurückzuführen ist.

Um diese Frage zu beantworten, wurden MV3 Zellen in 3D Kollagen Typ I Matrices in Anwesenheit spezifischer Proteaseinhibitoren kultiviert und extrazelluläres Procathepsin B in den Überständen immunodetektiert. Dabei wurde der spezifische Cathepsin B Inhibitor CA-074 verwendet, um autokatalytische Aktivierungsmechanismen des Zymogens aufzuklären, während die Inhibitoren E-64, 1,10-Phenanthrolin, Pefabloc<sup>®</sup>SC oder Pepstatin A eingesetzt wurden, um die Beteiligung von Cystein-, Matrixmetallo-, Serin- oder Aspartatproteasen an der Procathepsin B Prozessierung zu klären. In Abbildung 3.18 sind die Ergebnisse dieser Inhibitorstudien dargestellt.

Verglichen mit dem Überstand unbehandelter Zellen bzw. mit dem entsprechenden Lösungsmittel der Inhibitoren behandelten Kontrollen, wurden weder in Anwesenheit von E-64 noch von CA-074, eine mit einer Zunahme des extrazellulären Procathepsin B einhergehende Aktivierung nachgewiesen (s. Abb. 3.18 A). Auch eine Beteiligung von Aspartatproteasen konnte bei der Zymogenaktivierung ausgeschlossen werden, da die Inkubation der Zellen in Anwesenheit aufsteigender Pepstatin A Konzentrationen, selbst bei höchsten Konzentrationen (20µM), zu keiner Anhäufung des Procathepsin B führte (s. Abb. 3.18 B). Im Gegensatz dazu, wurde die Sekretion von Procathepsin B, aber auch die Freisetzung aktiver Formen der Protease komplett durch 1,10-Phenanthrolin inhibiert. Ähnliche Ergebnisse wurden durch Inhibition der Aktivität von Serinproteasen, nach Inkubation mit 250 oder 100µM Pefabloc<sup>®</sup>SC, erzielt. Auch hier wurden keine extrazellulären Cathepsin B Formen detektiert. In Anwesenheit geringerer Konzentrationen des Inhibitors (50µM) wurden sowohl Pro- als auch reifes Cathepsin B extrazellulär nachgewiesen (s. Abb. 3.18 C). Nach Inhibition der Matrixmetallo- bzw. Serinproteasen wurde, neben dem deutlich verringerten extrazellulären Cathepsin B Spiegel, zusätzlich eine komplette Hemmung der Gelkontraktion beobachtet. Da sich in beiden Fällen die gesamte Menge an extrazellulärem Cathepsin B verringert und aus diesem Grund die Anhäufung an Procathepsin B nicht analysiert werden kann, klärt diese Versuchsreihe nicht eindeutig,

ob Matrixmetallo- und Serinproteasen eine Funktion bei der Procathepsin B Prozessierung übernehmen oder möglicherweise die Zell-Kollagen Interaktionen beeinflussen.



**Abbildung 3.18:** Die Rolle extrazellulärer Proteasen bei der Procathepsin B Prozessierung. MV3 Zellen wurden innerhalb 3D Kollagen Typ I Matrices in Abwesenheit (Kontrolle) oder Anwesenheit von Proteaseinhibitoren (Endkonzentrationen wie angegeben) oder des entsprechenden Lösungsmittels, **MeOH**, kultiviert. **A** 10 µM **E-64**, 10 µM **CA-074**. **B** 1-20 µM **Pepstatin A** (20 µM des Inhibitors entsprechen einer Endkonzentration von 0,68% (v/v) MeOH). **C** 1 mM, 5 mM **1,10-Phenanthrolin** (5 mM des Inhibitors entsprechen einer Endkonzentration von 0,5% (v/v) MeOH), 50-250 µM **Pefabloc®SC**. Analysiert wurde jeweils die Menge an Überstand, die einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen entsprach. Cathepsin B wurde mit Hilfe des Maus anti-Cathepsin B CB 59-4B11 Primärantikörpers in einer Endkonzentration von 2 µg/ml detektiert. 250 ng, aus humaner Leber aufgereinigtes, Cathepsin B (**Cat B**) dienten als Positivkontrolle der Immunodetektion. **proCat B** Procathepsin B (43 / 46 kDa); **sc** *single-chain* Form der Protease (31 kDa); **h-dc** *heavy-chain* der *double-chain* Form des reifen Cathepsin B (25 / 26 kDa).

### 3.3.5 Die Rolle von $\beta 1$ Integrinen bei der Procathepsin B Prozessierung bzw. Ausschleusung reifer Cathepsin B Formen

Wie die bisherigen Experimente zeigten, beeinflusste die Kultivierung der MV3 Zellen innerhalb 3D Kollagen Typ I Matrices, die ein makromolekulares, fibrilläres Netzwerk repräsentieren, das extrazelluläre Auftreten reifer Cathepsin B Formen. Um zu untersuchen, ob die Konformation des Kollagen Typ I einen Einfluss auf die Procathepsin B Prozessierung bzw. die Ausschleusung reifer Cathepsin B Formen hat, wurden MV3 Zellen auf Zellkulturschalen kultiviert, die zuvor entweder mit monomerem, nicht-fibrillärem (1D) oder nativem, fibrillärem Kollagen Typ I (2D) beschichtet wurden. Hier wurde deutlich, dass Melanomzellen nach Kultivierung auf monomerem Kollagen Typ I (1D), wie auf unbeschichteten Plastikculturschalen, ausschließlich Procathepsin B sezernierten (s. a. Abb. 3.12 A). Wurden die Zellen auf einer Beschichtung mit fibrillärem Kollagen (2D) kultiviert oder in 3D fibrillären Kollagengelen, konnten neben dem konstitutiv ausgeschleusten Zymogen auch beide prozessierte Formen der Protease in Zellkulturüberständen detektiert werden. Somit scheint die fibrilläre Konformation des nativen Kollagen Typ I entscheidend für das extrazelluläre Auftreten der reifen Protease zu sein.

*Abbildung 3.19:* Einfluss der Kollagen Typ I Konformation auf die Cathepsin B Ausschleusung bzw. Procathepsin B Prozessierung. MV3 Zellen wurden entweder auf mit monomerem (1D) oder fibrillärem (2D) Kollagen beschichteten Zellkulturschalen oder innerhalb eines Netzwerkes (3D) aus fibrillärem Kollagen Typ I



kultiviert. Gleiche Mengen der jeweiligen Überstände, einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen entsprechend, wurden hinsichtlich Cathepsin B mit Hilfe des Maus anti-Cathepsin B CB 59-4B11 Primärantikörpers (Endkonzentration  $2\mu\text{g/ml}$ ) analysiert. 250ng, aus humaner Leber aufgereinigtes, Cathepsin B (Cat B) dienten als Positivkontrolle der Immunodetektion. **proCat B** Procathepsin B (43 / 46kDa); **sc** *single-chain* Form der Protease (31kDa); **h-dc** *heavy-chain* der *double-chain* Form des reifen Cathepsin B (25 / 26kDa).

Diese Beobachtung führte zu der Frage, welche Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche, Interaktionen der hoch-invasiven MV3 Zellen mit nativen Kollagenfibrillen ermöglichen und somit das extrazelluläre Auftreten potentiell aktiver Cathepsin B Formen vermitteln. Um diese Frage zu klären, wurde zunächst untersucht, ob möglicherweise Kollagen bindende  $\alpha 2\beta 1$  Integrinrezeptoren diese Interaktionen

vermitteln. Dazu wurden MV3 Zellen entweder mit inhibitorischen anti- $\alpha 2$  oder anti- $\beta 1$  Integrinantikörpern, oder mit einer Kombination aus beiden Antikörpern, präinkubiert und anschließend innerhalb 3D Kollagen Typ I Matrices kultiviert (s. Kap. 6.2.1.2). Die verwendeten Antikörper 4B4, mAb13 (gerichtet gegen die  $\beta 1$ -Integrinunterheit) und 6F1, 12F1, P1E6 (gerichtet gegen die  $\alpha 2$ -Integrinunterheit) blockieren die Adhäsion der Zellen an Kollagen Typ I (Estavillo et al., 1999; Shimizu et al., 1990; Takada und Puzon, 1993; Wayner et al., 1988). Ihre Bindungsstellen innerhalb der einzelnen Integrinketten sind schematisch in Abbildung 3.20 dargestellt. Die jeweiligen Zellüberstände der einzelnen Versuchsansätze wurden anschließend mittels Western Blot Analysen und Immunodetektion auf ihre Menge an extrazellulärem Cathepsin B hin untersucht. In Abbildung 3.21 sind die Resultate dieser Integrinblockierungsstudie zu sehen.

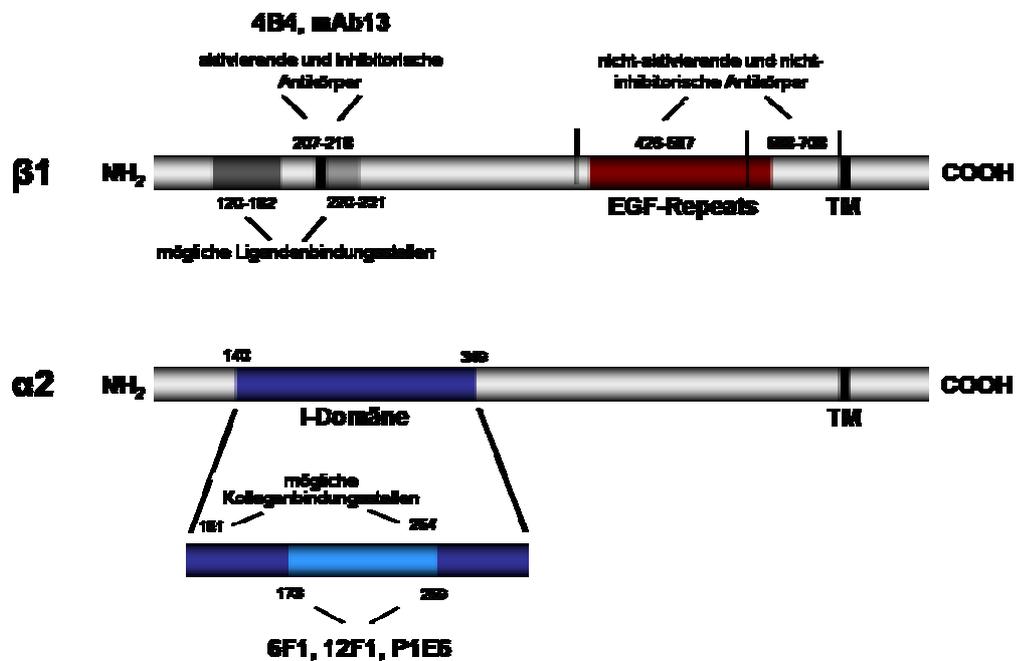


Abbildung 3.20: Identifizierte Bindungsstellen der blockierenden **anti- $\alpha 2$  (6F1, 12F1, P1E6)** bzw. **anti- $\beta 1$  (4B4, mAb13)** Antikörper. **EGF-repeats**, Cystein reiche Region EGF ähnlicher Sequenzen; **TM**, Transmembrandomäne. Die Abbildung wurde nach Takada und Puzon (1993) und Tuckwell et al. (1995) modifiziert.

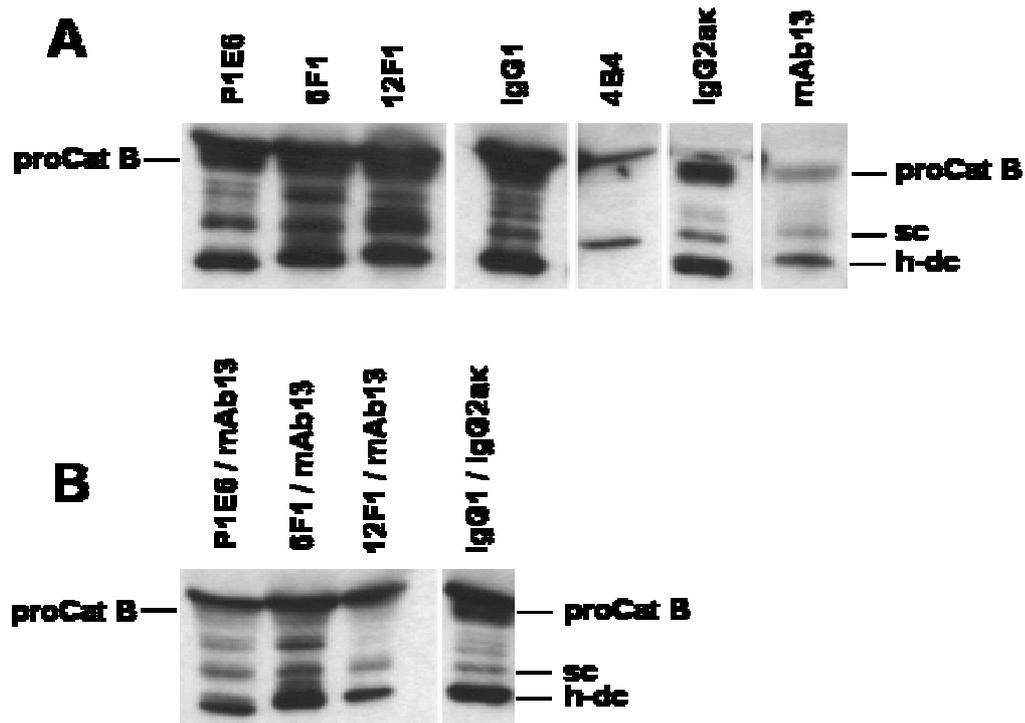
Die verwendeten anti- $\alpha 2$  Integrinantikörper zeigten keinen inhibitorischen Effekt bezüglich des Kontraktionsverhaltens der MV3 Zellen. Zellen, die mit P1E6 behandelt wurden, kontrahierten die Kollagengele gleich stark wie Zellen, die in Anwesenheit einer unspezifischen IgG1 Kontrolle kultiviert wurden. Auch die Fähigkeit der mit 6F1 oder 12F1 präinkubierten Zellen, Kollagengele zu kontrahieren, war nur äußerst gering

eingeschränkt (Daten nicht dargestellt). Vergleicht man die extrazellulären Cathepsin B Spiegel dieser Zellen, konnte durch keinen der verwendeten anti- $\alpha$ 2 Integrinantikörper eine Änderung der Cathepsin B Ausschleusung erreicht werden. Zellüberstände, die nach Kultivierung in Anwesenheit von P1E6, 6F1 oder 12F1 gewonnen wurden, zeigten vergleichbare Mengen an Pro- und reifem Cathepsin B, verglichen mit der entsprechenden IgG1 Kontrolle (s. Abb. 3.21 A).

Nach einer Behandlung der MV3 Zellen mit anti- $\beta$ 1 Integrinantikörpern, konnte jedoch in beiden Fällen, sowohl nach Präinkubation mit 4B4 als auch nach Präinkubation mit mAb13, keine Kontraktion der Kollagengele mehr beobachtet werden, wohingegen das Kontraktionsverhalten der Zellen, die mit unspezifischen IgG1 (Kontrolle zu 4B4) bzw. IgG2ak (Kontrolle zu mAb13) Kontrollen inkubiert wurden, nicht eingeschränkt war (Daten nicht dargestellt). Die blockierte Kontraktionsfähigkeit der mit anti- $\beta$ 1 Integrinantikörpern behandelten Zellen, stand zudem in Einklang mit einer Reduktion an extrazellulärem Cathepsin B. Nach der Präinkubation mit mAb13, wurde im Vergleich zu der entsprechenden IgG2ak Kontrolle, eine deutlich verringerte Menge an extrazellulärem Procathepsin B detektiert. In Folge einer Behandlung der Zellen mit 4B4, konnten gar keine nachweisbaren Mengen der Protease mehr extrazellulär nachgewiesen werden, wohingegen der Kontrollüberstand, der nach Kultivierung der Zellen mit IgG1 gewonnen wurde, sowohl Pro- als auch beide reife Cathepsin B Formen enthielt (s. Fig. 3.21 A).

Nach einer Präinkubation der Zellen mit einer Kombination aus anti- $\alpha$ 2 Integrinantikörpern und dem anti- $\beta$ 1 Integrinantikörper mAb13, war die Fähigkeit der Zellen Kollagenfibrillen zu kontrahieren, komplett inhibiert, wohingegen Kontrollzellen, die mit einer Kombination aus IgG1 und IgG2ak behandelt wurden, ein normales Kontraktionsverhalten zeigten (Daten nicht dargestellt). Ein Vergleich der entsprechenden Zellüberstände dieser Kulturen führte zu den gleichen Ergebnissen, die zuvor nach der alleinigen Verwendung des mAb13 Antikörpers beobachtet wurden. Im Gegensatz zu der IgG1 / IgG2ak Kontrolle wurden kaum noch nachweisbare Mengen des Procathepsin B extrazellulär nachgewiesen (s. Abb. 3.21 B).

In allen Fällen, in denen Antikörper vom IgG1 Isotyp zur Präinkubation der Zellen verwendet wurden (P1E6, 6F1, 12F1, 4B4 und das unspezifische IgG1), wurde die Kreuzreaktion mit dem Maus anti-Cathepsin B Antikörper sichtbar, der ebenfalls vom IgG1 Isotyp war und der Immunodetektion der Protease diente. Aus diesem Grund sind in der Abbildung 3.21 die Pro- bzw. reifen Cathepsin B Formen gesondert markiert, um eine Verwechslung mit der schweren bzw. der leichten Kette (im Fall des 4B4) der Antikörper auszuschließen.

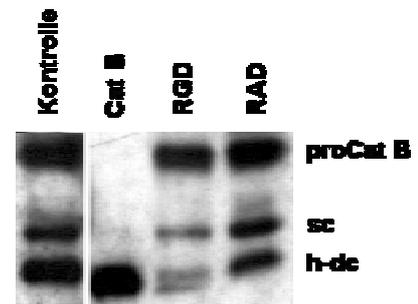


*Abbildung 3.21:* Der Einfluss Kollagen bindender  $\beta 1$  Integrinrezeptoren hinsichtlich des Auftretens an extrazellulärem Cathepsin B. **A** MV3 Zellen wurden entweder mit inhibitorischen anti- $\alpha 2$  (P1E6, 6F1, 12F1) oder anti- $\beta 1$  Antikörpern (4B4, mAb13) präinkubiert oder **B** mit einer Kombination beider Antikörper (P1E6 / mAb13, 6F1 / mAb13, 12F1 / mAb13) und innerhalb 3D Kollagen Typ I Matrices kultiviert. Kontrollen wurden mit gereinigtem IgG1 und IgG2ak angesetzt. Überstände dieser Kulturen wurden, entsprechend einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen, normalisiert und hinsichtlich Cathepsin B mit Hilfe des Maus anti-Cathepsin B CB 59-4B11 Primärantikörpers (Endkonzentration  $2\mu\text{g/ml}$ ) analysiert. 250ng, aus humaner Leber aufgereinigtes, Cathepsin B (**Cat B**) dienten als Positivkontrolle der Immunodetektion. **proCat B** Procathepsin B (43 / 46kDa); **sc** *single-chain* Form der Protease (31kDa); **h-dc** *heavy-chain* der *double-chain* Form des reifen Cathepsin B (25 / 26kDa).

Um zu untersuchen, ob RGD erkennende  $\beta 1$ -Integrine eine Rolle bei der Procathepsin B Prozessierung bzw. Ausschleusung reifer Proteaseformen übernehmen, wurden MV3 Zellen mit einem zyklischen RGD-Peptid präinkubiert und anschließend innerhalb 3D Kollagen Typ I Fibrillen kultiviert. Kontrollen wurden nach Behandlung der Zellen mit einem ebenfalls zyklischen Peptid, welches jedoch ein nicht relevantes Tripeptid (RAD) umfasst, oder in Abwesenheit zyklischer Peptide unter den gleichen Kulturbedingungen durchgeführt (s. Kap. 6.2.1.2). Mittels Western Blot Analysen und Immunodetektion wurden die jeweiligen Überstände dieser Versuchsreihe anschließend auf ihre Menge an extrazellulärem Cathepsin B hin untersucht. In *Abbildung 3.22* sind die Ergebnisse dieser Blockierungsstudien dargestellt.

Im Vergleich zu den MV3 Zellen, die mit dem zyklischen RAD-Peptid behandelt oder in Abwesenheit synthetischer Peptide kultiviert wurden, zeigten die Zellen nach einer Präinkubation mit dem RGD-Peptid kaum merkliche Unterschiede hinsichtlich ihres extrazellulären Cathepsin B Spiegels (s. Abb. 3.22). Die scheinbar geringere Menge an reifem Cathepsin B (sc und h-dc) korrelierte mit einer ebenfalls schwächer erscheinenden Menge an Procathepsin B und könnte somit eher auf eine ungleiche Beladung der SDS-Gele hinweisen als auf eine verminderte Procathepsin B Aktivierung bzw. Ausschleusung des reifen Cathepsin B.

**Abbildung 3.22:** Der Einfluss RGD erkennender Integrinrezeptoren hinsichtlich des Auftretens an extrazellulärem Cathepsin B. MV3 Zellen wurden mit zyklischen Peptiden, die entweder die **RGD** oder eine nicht spezifisch erkennbare **RAD** Sequenz umfassen, präinkubiert und anschließend innerhalb 3D Kollagen Typ I



Matrices kultiviert. Als zusätzliche Kontrolle wurden MV3 Zellen in Abwesenheit der Peptide inkubiert. Die Überstände der Kulturen wurden anschließend, einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  entsprechend, normalisiert und hinsichtlich ihres extrazellulären Cathepsin B Spiegels, mit Hilfe des Maus anti-Cathepsin B CB 59-4B11 Primärantikörpers (Endkonzentration  $2\mu\text{g/ml}$ ) untersucht. 250ng, aus humaner Leber aufgereinigtes, Cathepsin B (**Cat B**) dienten als Positivkontrolle der Immunodetektion. **proCat B** Procathepsin B (43 / 46kDa); **sc** *single-chain* Form der Protease (31kDa); **h-dc** *heavy-chain* der *double-chain* Form des reifen Cathepsin B (25 / 26kDa).

### 3.3.5.1 Die Expression der $\alpha 11$ -Integrinuntereinheit in Melanomzellen

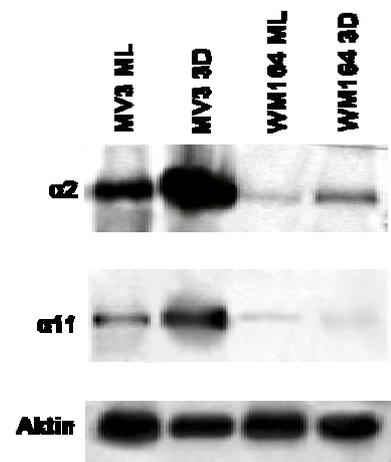
Die bisherigen Beobachtungen zeigten deutlich, dass die Cathepsin B Ausschleusung der hoch-invasiven Zellen über Zell-Kollagen Interaktionen vermittelt wurde und auf die Kollagen bindende Funktion der  $\beta 1$ -Integrinrezeptoren angewiesen war. Welche  $\alpha$ -Integrinuntereinheit für die benötigte Aktivität des involvierten  $\beta 1$ -Integrins von Bedeutung ist, konnten die oben dargestellten Untersuchungen nicht klären. Es ist bekannt, dass hoch-invasive MV3 Zellen, im Gegensatz zu niedrig-invasiven Melanomzellen, während ihrer Kultivierung innerhalb 3D Kollagen Typ 1 Matrices, vermehrt  $\alpha 2\beta 1$  Integrin exprimieren, wohingegen das  $\alpha 1\beta 1$  Integrin in keiner der Zelllinien nachweisbar ist (Klein et al., 1991). Dieselben Autoren konnten zudem zeigen, dass  $\alpha 2\beta 1$  Integrinrezeptoren auf der Oberfläche der Melanomzellen maßgeblich für die Kontraktion der Kollagengele verantwortlich sind.

Um die  $\alpha 2$ -Integrinexpression der Melanomzellen zu überprüfen, wurden Lysate der MV3 und WM164 Zellen, nach Kultivierung als Monolayer bzw. innerhalb 3D Kollagen Typ I Matrices, mittels Western Blot Analysen und anschließender Immunodetektion untersucht. Unter den Bedingungen der Monolayer-Kultur synthetisierten die hoch-invasiven MV3 im Vergleich zu den niedrig-invasiven WM164 Zellen deutlich höhere Mengen des  $\alpha 2$ -Proteins. Der Kontakt mit 3D Kollagenmatrices führte in beiden Zelllinien zu einer erhöhten Synthese diese Integrinuntereinheit, die bei MV3 Zellen wesentlich stärker war als bei den WM164 Zellen (s. Abb. 3.23).

In einem zweiten Versuchsansatz wurde die Expression der  $\alpha 11$ -Integrinuntereinheit in Lysaten der MV3 und WM164 Zellen untersucht, welche ebenfalls mit der  $\beta 1$ -Kette assoziieren kann und als  $\alpha 11\beta 1$  Heterodimer als Kollagenrezeptor bekannt ist (Velling et al., 1999).

Die  $\alpha 11$ -Integrinuntereinheit wurde sowohl von den hoch-invasiven MV3 als auch von den niedrig-invasiven WM164 Zellen unter den Bedingungen der Monolayer-Kultur exprimiert, wobei die MV3 Zellen eine höhere Proteinmenge der  $\alpha 11$ -Integrinkette aufwiesen. Nach Kultivierung der Zellen in 3D Kollagengelen, wurde die Expression dieser Integrinuntereinheit in den MV3 Zellen verstärkt detektiert, wohingegen in WM164 Zellen gleiche Konzentrationen der  $\alpha 11$ -Untereinheit, wie zuvor in Abwesenheit des nativen Kollagens nachgewiesen wurden.

*Abbildung 3.23:* Die Expression der  $\alpha 2$ - und  $\alpha 11$ -Integrinketten in MV3 und WM164 Zellen. Die Zellen wurden entweder als Monolayer (ML) oder innerhalb 3D Kollagen Typ I Matrices kultiviert und gleiche Mengen der resultierenden Lysate ( $2 \times 10^4$  Zellen entsprechend) anschließend mittels Immunodetektion unter Verwendung der Primärantikörper Kaninchen anti- $\alpha 2$ -Integrin (1:200) bzw. Kaninchen anti- $\alpha 11$ -Integrin (1:1000) auf ihre  $\alpha 2$ - und  $\alpha 11$ -Integrinexpression untersucht. Unterschiede in der Beladung sind durch die zusätzliche Detektion des Aktinspiegels (Kaninchen anti-Aktin C11, Endkonzentration  $6\mu\text{g/ml}$ ) dargestellt.



### **3.4 Identifizierung gelatinolytisch aktiver Cathepsine in Überständen hoch-invasiver MV3 Zellen**

Im Gegensatz zu den Gelatinasen kann die Aktivität der Cathepsine nicht durch die Technik der SDS-Zymographie, wie Kurschat et al. (2002) sie beschrieben haben, nachgewiesen werden. Grund dafür ist das niedrige pH-Optimum ( $\leq 7$ ) einiger Cathepsine und die Notwendigkeit reduzierender Versuchsbedingungen, um die Oxidation des katalytischen Cysteins zu verhindern (s. Kap. 2.1.7).

Daher musste die Zymographie-Technik modifiziert werden, um die Detektion und Analyse aktiver Cathepsine zu ermöglichen. Basierend auf der mathematischen Beschreibung elektrophoretischer Systeme von Jovin (1973a-d), konnten die optimalen Bedingungen für die so genannte LDS-Zymographie berechnet werden (Dennhöfer, persönliche Mitteilung), mit deren Hilfe es möglich sein sollte, Proteine unter sauren Bedingungen elektrophoretisch aufzutrennen und gleichzeitig die gelatinolytische Aktivität der Cathepsine zu erhalten (s. Kap. 6.2.5.3).

Um extrazellulär aktive Cathepsine in Überständen der hoch-invasiven MV3 Zellen analysieren zu können, waren zunächst eine Reihe von Untersuchungen für die Etablierung der LDS-Zymographie notwendig. Insbesondere sollte geklärt werden, ob mit Hilfe dieser Technik nur aktive Cathepsine oder möglicherweise auch andere Proteaseklassen detektiert werden. Daher wurden die Zellüberstände mit Hilfe der LDS-Zymographie in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren untersucht, die spezifisch Cystein-, Aspartat- oder Serinproteasen hemmen (s. Kap. 6.2.5.3).

Anschließend mussten die nachweisbaren Cathepsinaktivitäten identifiziert und bestimmten Cathepsinen zugeordnet werden. Dazu wurden neben den Überständen der MV3 Zellen, die aus 3D Kollagengel Kulturen stammten und potentiell aktives Cathepsin B enthielten, auch aus humaner Leber gereinigtes Cathepsin B bzw. Cathepsin L in der LDS-Zymographie untersucht. Zur Identifizierung der Cathepsine B und L wurden die Analysen zusätzlich in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren dieser beiden Proteasen durchgeführt (s. Kap. 6.2.5.3).

Unbehandelte Kontrollen wurden in Abwesenheit jeglicher Inhibitoren zymographisch untersucht. Die Resultate dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 3.24 zusammengestellt.

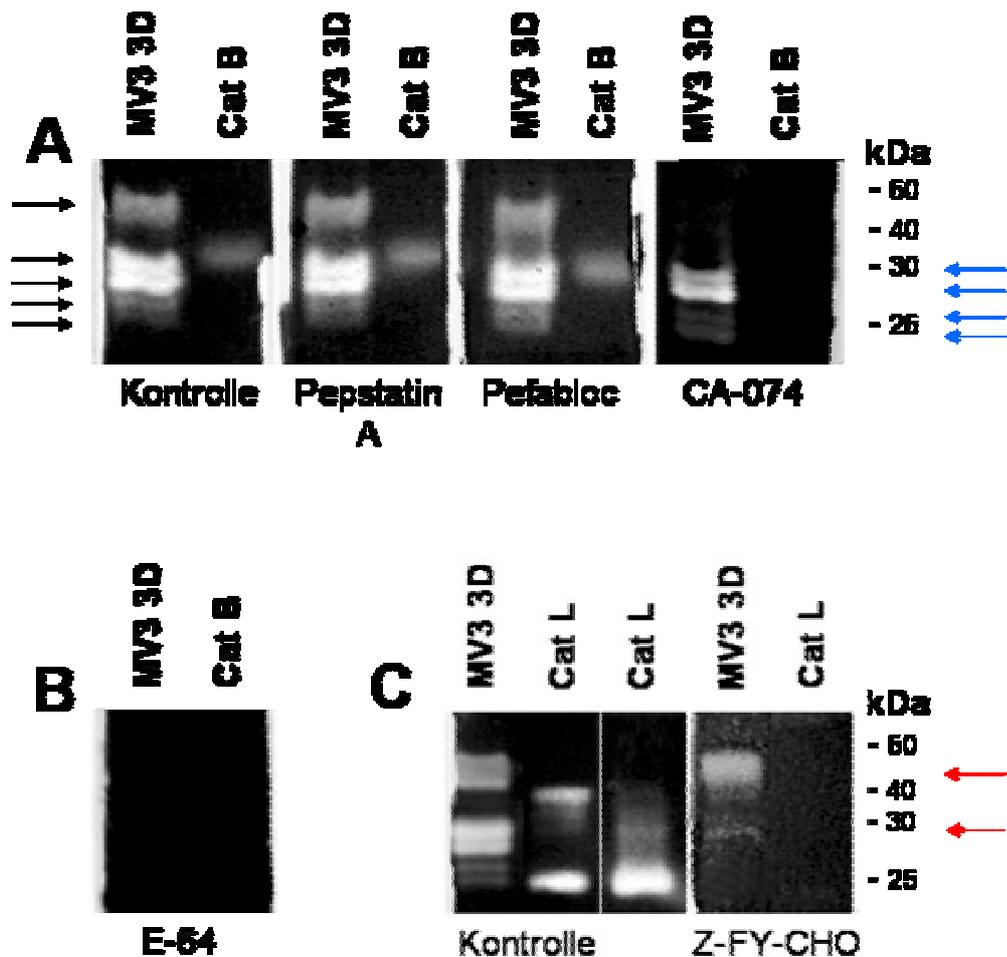


Abbildung 3.24: Detektion aktiver Cathepsine in den Überständen der hoch-invasiven Melanomzelllinie MV3, nach Kultivierung der Zellen innerhalb 3D Kollagenmatrices (MV3 3D). Gleiche Mengen des Zellüberstandes (normalisiert auf 10µg Gesamtprotein) und jeweils 100ng aus humaner Leber gereinigtes Cathepsin B (Cat B) bzw. L (Cat L) wurden zur LDS-Zymographie eingesetzt und in Anwesenheit (Endkonzentrationen wie angegeben) oder Abwesenheit (Kontrolle) spezifischer Proteaseinhibitoren untersucht. **A** 100µM **Pepstatin A**, 1mM **Pefabloc**<sup>®</sup>, 10µM **CA-074**. **B** 10µM **E-64**. **C** 5µM **Z-FY-CHO**. Schwarze Pfeile zeigen auf die fünf detektierten Cathepsinaktivitäten in den Überständen der MV3 Zellen. Gelatinolytische Aktivitäten, die nach spezifischer Hemmung des Cathepsin B nachgewiesen wurden, sind durch blaue Pfeile dargestellt. Rote Pfeile weisen auf Aktivitäten, die nach spezifischer Inhibition des Cathepsin L detektiert wurden.

In Abwesenheit spezifischer Proteaseinhibitoren wurden nach der zymographischen Analyse des MV3 Überstandes fünf verschiedene gelatinolytische Proteinbanden sichtbar (s. Abb. 3.24 A, schwarze Pfeile). Weder in Anwesenheit von Pepstatin A noch durch Zugabe von Pefabloc<sup>®</sup>, wurden diese Aktivitäten bzw. Cathepsin B inhibiert, so dass die Detektion von Aspartat- bzw. Serinproteasen ausgeschlossen werden konnte (s. Abb. 3.24 A).

Im Gegensatz dazu wurde in Anwesenheit von E-64 die Gelatinolyse in den Überständen der MV3 Zellen, sowie die des gereinigten Cathepsin B vollständig gehemmt, was die Identifizierung von Cathepsinen bestätigte (s. Abb. 3.24 B).

Die Aktivität von Cathepsin B, die bei einem Molekulargewicht zwischen 30 und 40kDa erschien, wurde ausschließlich durch den allgemeinen Cysteinproteaseninhibitor E-64 oder den spezifischen Cathepsin B Inhibitor CA-074 blockiert (s. Abb. 3.24 A, B).

Bei der Analyse der MV3 Überstände in Anwesenheit von CA-074 konnte eine gelatinolytische Proteinbande mit einem Molekulargewicht zwischen 40 und 50kDa, nicht mehr detektiert werden. Zudem waren auch die anderen vier gelatinolytischen Banden, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, leicht abgeschwächt (s. Abb. 3.24 A, blaue Pfeile).

Die LDS-Zymographie erlaubte neben der Analyse von Cathepsin B auch die Analyse Cathepsin L spezifischer Aktivität. In Anwesenheit des spezifischen Cathepsin L Inhibitors Z-FY-CHO wurden die 40 und 25kDa großen gelatinolytischen Banden des gereinigten Cathepsin L inhibiert (s. Abb. 3.24 C). Dabei zeigte sich die 40kDa große Cathepsin L Aktivität als nicht stabil, da diese Form nach einmaligem Einfrieren (-80°C) und anschließendem Auftauen des gereinigten Proteins im Zymogramm nicht mehr nachweisbar war (s. Abb. 3.24 C, 3. Spur). In diesem Fall wurde vermehrt die 25kDa große Cathepsin L Aktivität nachgewiesen und eine sehr schwache Aktivität, die einer Größe von 30kDa entsprach.

In den MV3 Überständen wurde durch Z-FY-CHO eine deutliche Inhibition der proteolytischen Aktivitäten nachgewiesen, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in einer Abschwächung vier verschiedener gelatinolytischer Proteinbanden resultierte (s. Abb. 3.24 C). Dabei wurde die zuvor durch CA-074 gehemmte und als Cathepsin B identifizierte Aktivität, mit einem Molekulargewicht zwischen 40 und 50kDa, in Anwesenheit des Cathepsin L Inhibitors nicht blockiert. Zudem wurde deutlich, dass in einem Bereich, der einem Molekulargewicht von 25 bis 30kDa entsprach, sich mehrerer Cathepsinaktivitäten überlagerten, da auch in Anwesenheit von Z-FY-CHO eine gelatinolytische Bande, in diesem Bereich detektierbar blieb (s. Abb. 3.24 C, rote Pfeile).

#### **3.4.1 Die Zeitabhängigkeit der Cathepsin B spezifischen Gelatinolyse**

Die oben dargestellten LDS-Zymogrammen zeigten, dass die Anwesenheit von CA-074 spezifisch eine gelatinolytische Aktivität hemmt und der dafür verantwortlichen Protease ein Molekulargewicht zwischen 40 und 50kDa zuweist. Zudem waren aber auch Aktivitäten, die auf eine Beteiligung weiterer Cathepsine, mit einem geringem Molekulargewicht schließen lassen, durch die Zugabe des spezifischen Cathepsin B

Inhibitors beeinflusst (s. Abb. 3.24 A, blaue Pfeile). In diesem Bereich konnten Cathepsine mit einem Molekulargewicht von 25 bis 30kDa zugeordnet werden, deren gelatinolytische Aktivitäten teilweise auch durch den spezifischen Cathepsin L Inhibitor Z-FY-CHO gehemmt wurden (s. Abb. 3.24 C).

Um eine potentielle Überlagerung von aktivem Cathepsin B und L in diesem Bereich nachzuweisen, wurde ein MV3 Zellüberstand in Anwesenheit von CA-074 bzw. der Kombination von CA-074 und Z-FY-CHO, der LDS-Zymographie unterzogen. Die Zeitabhängigkeit der Cathepsin B spezifischen Gelatinolyse wurde anschließend nach 1, 3, 5 bzw. 24 stündiger Inkubation des jeweiligen Zymogramms in Substratpuffer nachgewiesen. Kontrollen wurden jeweils in Abwesenheit beider Inhibitoren durchgeführt. Abbildung 3.25 zeigt die Resultate dieser Versuchsreihe.

Nach 3 stündiger Inkubation wurden erste gelatinolytische Aktivitäten nachgewiesen, jedoch konnten erst nach 5 Stunden deutliche Unterschiede zwischen den mit bzw. ohne Inhibitor behandelten Zymogrammen erkannt werden. In Abwesenheit der Inhibitoren traten nach dieser Zeitspanne bereits drei Banden gelatinolytischer Aktivität hervor, die Cathepsine mit unterschiedlichen Molekulargewichten repräsentierten. Die als erste auftretende proteolytische Aktivität entsprach einem Molekulargewicht zwischen 40 und 50kDa, einer schwächeren Aktivität konnte ein Molekulargewicht von 30kDa zugeordnet werden und die dritte Aktivität wies eine Größe zwischen 25 und 30kDa auf.

In Anwesenheit des Cathepsin B Inhibitors und 5 stündiger Inkubation, konnte nur eine proteolytische Aktivität mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und 30kDa detektiert werden, die nur durch die zusätzliche Anwesenheit von Z-FY-CHO gehemmt wurde (s. Abb. 3.25, blauer Pfeil).

Nach einer 24 stündigen Inkubationszeit wurden, in Abwesenheit der Inhibitoren, sechs diskrete Aktivitäten nachgewiesen. Zusätzlich zu den fünf, bereits in Abbildung 3.24 A dargestellten Aktivitäten (die Inkuabationszeit betrug in diesem Fall 15 Stunden), erschien eine proteolytische Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 30 und 40kDa.

In Anwesenheit von CA-074 konnten drei dieser Aktivitäten auf gelatinolytisch aktives Cathepsin B zurückgeführt werden. Sowohl die proteolytischen Banden mit Molekulargewichten zwischen 40 und 50kDa bzw. 30 und 40kD als auch eine 30kDa große Aktivität, wurden spezifisch durch CA-074 gehemmt (s. Abb. 3.25, rote Pfeile). Dabei wurde zudem klar erkennbar, dass die 30kDa große, aktive Cathepsin B Form von einer Cathepsin L spezifischen Aktivität überlagert wurde, die ein gleich großes Molekulargewicht aufwies und nur durch die zusätzliche Anwesenheit des Cathepsin L Inhibitors Z-FY-CHO gehemmt wurde (s. Abb. 3.25, rot-blauer Pfeil).

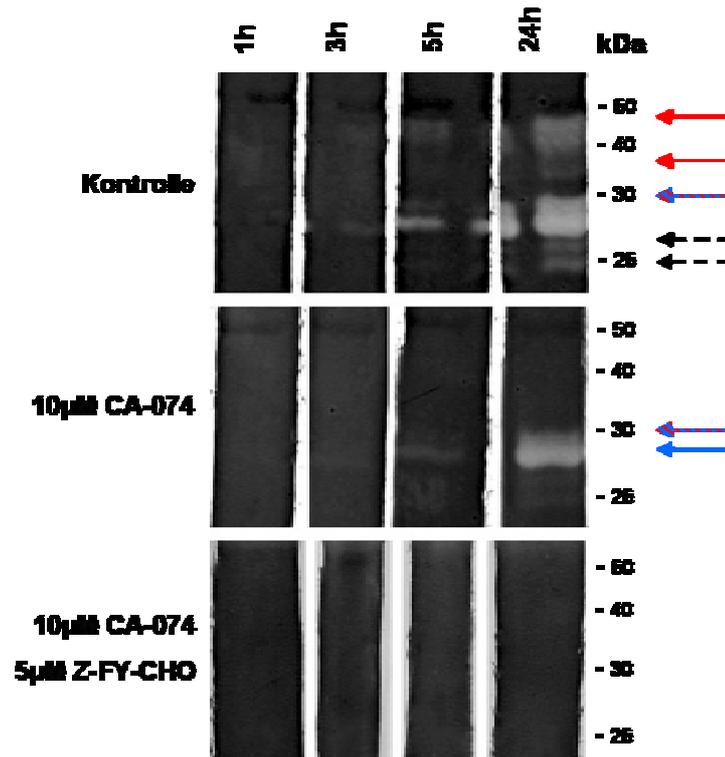


Abbildung 3.25: Zeitabhängigkeit der Cathepsin B spezifischen Gelatinolyse. Gleiche Mengen des Zellüberstandes einer 3D Kollagenkultur der MV3 Zellen (normalisiert auf 10µg Gesamtprotein) wurden mittels LDS-Zymographie, in Anwesenheit von **CA-074** bzw. **CA-074 und Z-FY-CHO**, aufgetrennt und die Zymogramme anschließend über einen Zeitraum von 1, 3, 5 und 24 Stunden (h) in Substratpuffer inkubiert (Endkonzentrationen der Inhibitoren sind in der Abbildung angezeigt). Die Kontrolle wurde in Abwesenheit beider Inhibitoren angefertigt. Die gelatinolytischen Banden wurden anhand des Molekulargewichtsstandard bestimmt. Durchgehend rote Pfeile, zeigen auf gelatinolytische Aktivitäten, die in Anwesenheit von CA-074 spezifisch gehemmt wurden. Durchgehend blaue Pfeile zeigen auf eine Aktivität, die nur von Z-FY-CHO spezifisch inhibiert wurde. Die rot-blau gezeichneten Pfeile weisen auf einen Bereich, in dem sich eine Cathepsin B und eine Cathepsin L spezifische Aktivität, mit Molekulargewichten von jeweils 30kDa, überlagerten. Unterbrochene schwarze Pfeile, weisen auf Aktivitäten, die sowohl von CA-074 als auch von Z-FY-CHO blockiert wurden.

Die Inkubation der Zymogramme in Anwesenheit beider Inhibitoren ließ außerdem erkennen, dass neben den Cathepsinen B und L keine weiteren aktiven Cysteinproteasen in den Überständen der MV3 Zellen nachweisbar waren, da alle detektierbaren Aktivitäten durch die Anwesenheit von CA-074 und Z-FY-CHO inhibiert wurden.

Allerdings wurden zwei proteolytische Aktivitäten detektiert, die sowohl durch den Cathepsin B als auch durch den Cathepsin L Inhibitor gehemmt wurden und somit nicht

eindeutig einer Protease zugeordnet werden konnten (s. Abb. 3.25, schwarze Pfeile; vgl. a. Abb. 3.24 A, C).

### **3.4.2 Immunologischer Nachweis der gelatinolytisch aktiven Cathepsin B Formen**

Mittels SDS-PAGE und anschließender Immunodetektion konnten für hoch-invasive MV3 Zellen, die in Kontakt mit nativen Kollagenfibrillen kultiviert wurden, neben Procathepsin B und einer kleineren, möglicherweise glykosylierten, 30 bis 40kDa großen Übergangsform auch beide potentiell aktiven Formen der Protease (sc und h-dc) extrazellulär nachgewiesen werden (s. Abb. 3.12 B). Die zymographische Analyse dieser Zellüberstände identifizierte drei extrazellulär aktive Formen der Protease (s. Abb. 3.25).

Da diese Ergebnisse mit der Hilfe zweier unterschiedlicher PAGE Systeme ermittelt wurden, war ein direkter Vergleich der Proteinbanden nicht möglich. Die folgenden Versuche sollten daher klären, welche der extrazellulären Cathepsin B Formen proteolytische Aktivität besitzen.

Hierzu wurde zunächst aus humaner Leber gereinigtes Cathepsin B, welches kein Procathepsin B enthielt, mittels LDS-PAGE untersucht. Für die zymographische Analyse der Protease wurden ausschließlich Polyacrylamidgele eingesetzt, die inkorporierte Gelatine enthielten, die zur Detektion proteolytischer Aktivität notwendig war. Da die inkorporierte Gelatine möglicherweise den Proteintransfer bzw. die Immunodetektion der Protease nach erfolgter LDS-PAGE beeinflussen könnte, wurden die Immunoblot Analysen des gereinigten Cathepsin B zusätzlich mit Gelatine-freien Polyacrylamidgelen durchgeführt (s. Kap. 6.2.5.3). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3.26 zusammengefasst.

Die inkorporierte Gelatine behinderten den Proteintransfer im Anschluss an die LDS-PAGE nicht, allerdings erschwerte sie die immunologische Detektion des Cathepsin B, da der verwendete Maus anti-Cathepsin B Primärantikörper mit der Gelatine kreuzreagierte, was mit einer hohen Hintergrundfärbung verbunden war (s. Abb. 3.26 A). Der Vergleich des Western Blots mit dem entsprechenden Zymogramm zeigte, dass die proteolytische Aktivität des gereinigten Cathepsins, deckungsgleich zur immunologisch detektierten Proteinbande, bei einem Molekulargewicht zwischen 30 und 40 kDa, nachweisbar war. Bei der Auftrennung von 250ng reinem Cathepsin B wurde eine zusätzliche Bande von ca. 27kDa immunologisch detektiert, die allerdings nicht proteolytisch aktiv war (s. Abb. 3.26 A).

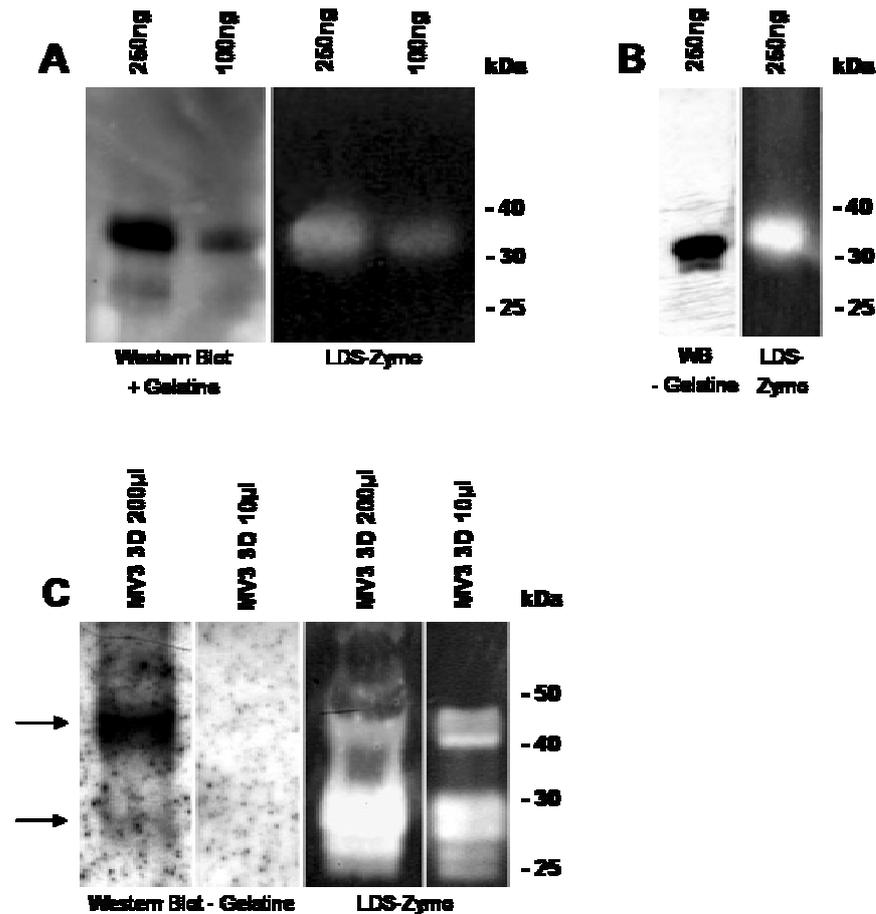
Wurde die LDS-PAGE mit Gelatine-freien Polyacrylamidgelen durchgeführt, konnte die immunologische Detektion des Cathepsins deutlich verbessert werden, jedoch

erschien sie nicht mehr deckungsgleich mit ihrer proteolytischen Aktivität im Zymogramm. In Gelatine-freien Gelen schien das Cathepsin B schneller zu laufen und die Auftrennung der beiden Proteaseformen war schlechter. Die inkorporierte Gelatine im Zymogramm verzögerte die elektrophoretische Auftrennung der Protease (s. Abb. 3.26 B).

Um extrazellulär aktive Cathepsin B Formen der MV3 Zellen zu untersuchen, wurde ein Überstand dieser Zellen, der aus einer 3D Kollagenkultur gewonnen wurde, sowohl mittels Immunoblot als auch mittels Zymographie im LDS-PAGE System analysiert. Dabei wurde für die Western Blot Analysen auf inkorporierte Gelatine verzichtet. Während bereits 10µl des Überstands für den zymographischen Nachweis aktiver Formen der Cathepsine B und L ausreichend waren, konnte mittels Western Blot bei diesen Proteinmengen kein Cathepsin B nachgewiesen werden (s. Abb. 3.26 C).

Bei der zymographischen Analyse einer zwanzigfachen Menge des konzentrierten Überstandes, konnten die einzelnen proteolytischen Aktivitäten kaum voneinander unterschieden werden. Jedoch war diese hohe Proteinkonzentration notwendig, um Cathepsin B im Western Blot zu detektieren. Unter Berücksichtigung der verzögerten Proteinauftrennung in Anwesenheit inkorporierter Gelatine, konnten das Zymogramm und der entsprechende Western Blot in Abbildung 3.26 C gegenübergestellt und verglichen werden.

Mit Hilfe der LDS-PAGE ließen sich zwei proteolytisch aktive Cathepsin B Formen in den MV3 Überständen nachweisen, eine 40 bis 50kDa große und eine kleinere Form mit einem Molekulargewicht von ca. 30kDa, wobei letztere der sc Form des Cathepsin B entsprechen könnte (s. Abb. 3.26, Pfeile). Die größere Proteinform entsprach ihrem Molekulargewicht nach Procathepsin B, welches proteolytisch aktiv war.



*Abbildung 3.26:* Immunologischer Nachweis der gelatinolytisch aktiven Cathepsin B Formen. **A** 250ng bzw. 100ng aus humaner Leber gereinigtes Cathepsin B wurden mittels LDS-PAGE in Anwesenheit von Gelatine aufgetrennt und die entsprechenden Gele hinsichtlich der gelatinolytischen Aktivität der Protease zymographisch untersucht (rechts) bzw. nach erfolgtem Proteintransfer, zur immunologischen Detektion der Protease eingesetzt (links). **B** 250ng aus humaner Leber gereinigtes Cathepsin B wurden mittels LDS-PAGE in An- bzw. Abwesenheit von Gelatine aufgetrennt. Das Gelatine enthaltende Gel wurde hinsichtlich der gelatinolytischen Aktivität der Protease zymographisch untersucht (rechts). Das Gel ohne Gelatine wurde zur immunologischen Detektion der Protease eingesetzt (links). **C** LDS-PAGE eines MV3 Zellüberstandes, gewonnen aus einer 3D Kollagenkultur. 10µl bzw. das Konzentrat aus 200µl dieses Überstandes wurden in An- bzw. Abwesenheit von Gelatine aufgetrennt und anschließend entweder zymographisch untersucht (rechts) oder für Western Blot Analysen eingesetzt. Die Immunodetektion erfolgte in allen Fällen mit Hilfe des Maus anti-Cathepsin B CB 59-4B11 Primäntikörpers (Endkonzentration 2µg/ml). Pfeile weisen auf immunologisch detektierte, proteolytisch aktive Formen des Cathepsin B. **WB**, Western Blot; **Zymo**, Zymographie.

## 4 Diskussion

Cathepsine sind sowohl an intra- als auch an extrazellulären Proteinabbauprozessen beteiligt und üben unterschiedliche physiologische Funktionen aus. Erhöhte Synthese, Aktivität, extrazelluläre Sekretion und ein verändertes Verhältnis zwischen der Menge an Cathepsinen und ihren endogenen Inhibitoren können jedoch zur unkontrollierter Aktivität dieser Proteasen führen und werden mit pathologischen Vorgängen, wie z. B. der Progression maligner Tumore in Zusammenhang gebracht. Im Falle des malignen Melanoms scheinen vor allem die erhöhte Expression und vermehrte Aktivität der Cathepsine B und L mit der Invasivität dieses malignen Tumors zu korrelieren (Frohlich et al., 2001). Über die molekularen Regulationsmechanismen der Cathepsine, die zur erhöhten Tumordinvasion führen, ist jedoch bislang nur wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, die Bedeutung dieser Proteasen für das invasive Wachstum von Melanomzellen zu analysieren. Dabei wurde vor allem herausgearbeitet, inwieweit die Expression von Cathepsin B und seiner endogenen Inhibitoren mit dem unterschiedlichen Metastasierungspotential verschiedener Melanomzellen korreliert. Des Weiteren wurden, über Tumorzell-Matrix Interaktionen vermittelte Regulationsmechanismen des Cathepsin B aufgeklärt, die zu einer erhöhten Aktivität dieser Protease führen können. Durch die Etablierung der LDS-Zymographie konnte anschließend die Analyse gelatinolytisch aktiver, extrazellulär vorliegender Cathepsine ermöglicht werden.

### 4.1 Die Charakterisierung der Invasivität der Melanomzelllinien MV3, SKMel28, SKMel23 und WM164 *in vitro*

Im Gegensatz zu Invasionsmodellen, die auf Basalmembran-ähnlichen Matrices, wie Matrigel (Hendrix et al., 1987) oder artifiziellen Haut-Äquivalenten (Meier et al., 1998) basieren, bot das von Denhofer et al. (2003) etablierte *in vitro* Invasionsmodell die Möglichkeit, die Invasivität von Melanomzellen unter Bedingungen, die der *in vivo* Situation sehr nahe kommen, zu charakterisieren. Diese Methode ermöglichte außerdem eine verbesserte Analyse der Interaktionen von Tumorzellen mit unterschiedlichen Matrixkomponenten und konnte zur Analyse der Melanomzellinvasion durch interstitielles Bindegewebe bzw. durch die Basalmembran eingesetzt werden.

Die Charakterisierung der Melanomzellinvasion innerhalb dieses Modells ergab, dass sich die Zelllinien in ihrer Einwanderungstiefe unterschieden, wobei die MV3 Zellen deutlich tiefer (500µm) in die Dermis einwanderten, SKMel28 und WM164 Zellen

hingegen nur eine Tiefe von ca. 100µm erreichten und SKmel23 Zellen die Dermis überhaupt nicht invadierten. Diese Ergebnisse waren vergleichbar zu früheren Resultaten, die mit zwei weiteren hoch- bzw. niedrig-invasiven Zelllinien (BLM bzw. 530) in diesem Invasionsystem erzielt wurden (Dennhofer et al., 2003).

Da jedoch die Tumorinvasion nicht nur die Degradation dermalen Komponenten umfasst, sondern die Penetration von Basalmembranbestandteilen voraussetzt, waren wir daran interessiert, ob sich das Invasionsmodell auch zur Analyse initialer Schritte der Melanomzellinvasion eignete.

Mittels immunohistochemischer Analysen konnten wir zeigen, dass die Basalmembrankomponenten Laminin 5 und Kollagen IV auch nach dem Entfernen der Epidermis detektiert wurden und somit eine weitgehend intakte Basalmembran demonstrierten. Die Analyse der Melanomzellinvasion durch die Basalmembran der deepidermisierten Dermis ergab, dass die Zelllinien SKmel23 und WM164 diese Barriere nicht überwinden konnten, woraufhin sie als niedrig-invasiv eingestuft wurden. Die Zelllinien SKmel28 und MV3 konnten diese Barriere jedoch penetrieren und 40 bzw. 400µm tief in das unterliegende Bindegewebe einwandern. Aus diesem Grund wurden diese Zelllinien anschließend als intermediär- bzw. hoch-invasiv bezeichnet.

#### **4.2 Die Rolle aktiver Cathepsine und MMPs bei der Invasion durch die Basalmembran und die Dermis humaner Hautkomposite**

Durch *in situ* zymographische Analysen konnten sowohl gelatinolytisch aktive MMPs als auch Cathepsine in den Hautkompositen, die mit den hoch-invasiven MV3 Zellen inkubiert wurden, nachgewiesen werden. Dabei war besonders auffällig, dass aktive Gelatinasen nur in hoch-invasiven MV3 Zellen während der Invasion durch das dermale Bindegewebe detektiert wurden aber nicht während der Invasion durch die Basalmembran. Bei der Invasion von intermediär- oder niedrig-invasiver Zellen durch das dermale Bindegewebe wurden hingegen keine aktiven Gelatinasen nachgewiesen. *In situ* zymographische Untersuchungen an malignen Melanomen und Lymphknotenmetastasen (Kurschat et al., 2002) zeigten, dass die gelatinolytische Aktivität, die vor allem auf aktive MMP-2 zurückzuführen war, vermehrt an der Invasionsfront der Tumore und an den Tumor-Stroma Grenzen nachgewiesen wurde, wohingegen in der Epidermis keine gelatinolytische Aktivität gefunden wurde. Auch innerhalb der Metastasen konnten aktive Gelatinasen hauptsächlich an Grenzen zwischen Melanomzellen und angrenzendem Stroma der Lymphknoten detektiert werden. Die ProMMP-2 Aktivierung ist nicht allein von Tumorzell-ECM Interaktionen abhängig, sondern auch von der Ausbildung eines ternären Komplexes mit MMP-2, TIMP-2 und MT1-MMP auf der Zelloberfläche der Tumorzellen. Dabei ist besonders

das Mengenverhältnis zwischen TIMP-2 und MT1-MMP ausschlaggebend für die Aktivierung der Gelatinase, welches in niedrig invasiven Zellen zugunsten des TIMP-2 verschoben ist (Kurschat et al., 1999). ProMMP-2 kann aber auch auf der Oberfläche stromaler, MT1-MMP exprimierender Zellen aktiviert werden (Zigrino et al., 2001). Das hier verwendete *in vitro* Invasionsystem, erlaubt jedoch nur die Analyse von Tumorzell-Matrix Interaktionen und schließt die ProMMP-2 Aktivierung durch stromale Zellen aus, da residente Zellen der deepidermisierten Dermis die mehrfachen Zyklen des Einfrierens / Auftauens und Erhitzens nicht überleben, wohingegen ECM Proteine durch diese Prozedur nicht beeinflusst werden (Allen et al., 1997; Ceilley et al., 1993; Hambleton et al., 1994; Kronick et al., 1988).

Da hingegen hohe Cathepsinaktivitäten sowohl während der Invasion hoch-invasiver Melanomzellen durch dermale Komponenten als auch während der Invasion durch die Basalmembran nachgewiesen wurden, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass Cathepsine und MMPs maßgeblich an der Invasion des Bindegewebes beteiligt sind, und dass initiale Schritte der Melanomzellinvasion, wie die Degradation und Penetration von Basalmembrankomponenten, vor allem die Anwesenheit aktiver Cathepsine voraussetzen. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von Lakka et al. (2004) gestützt. Die Autoren konnten zeigen, dass die Matrigel-Invasion von SNB19 Glioblastomzellen durch Inhibition der Cathepsin B und MMP-9 Genexpression via *RNA interference* signifikant verringert wurde. Zudem wurde das Tumorwachstum und die Invasion durch intratumorale Injektion von Cathepsin B und MMP-9 *hairpin* RNA exprimierender Plasmid DNA *in vivo* inhibiert.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass der immunohistochemische Nachweis von Cathepsin B in benignen Pigmentnävi negativ ausfiel, wohingegen in malignen superfiziell spreitenden Melanomen und subdermalen Metastasen erhöhte Mengen der Protease nachweisbar waren. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung von Cathepsin B beim Übergang von benignen zu malignen Wachstumsprozessen. Zudem konnten wir zeigen, dass die Fähigkeit der MV3 Zellen, die Basalmembran zu penetrieren durch die Anwesenheit von CA-074 deutlich inhibiert wurde, ein Hinweis, dass aktives Cathepsin B für diese initialen Invasionsschritte verantwortlich war. Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass hoch-invasive Melanomzellen (A375M), in denen die Cathepsin B Synthese durch die Transfektion mit einem Cathepsin B-*antisense* exprimierenden Vektor reduziert wurde, eine stark verringerte Invasivität durch Matrigel aufweisen (Szpaderska und Frankfater, 2001). Diese und andere Arbeitsgruppen vermuten, dass aktives Cathepsin B intra- und extrazellulär Zelltyp-spezifische Funktionen ausübt, wodurch die Invasion von Tumorzellen gefördert wird (Premzl et al., 2003; Sameni et al., 2000; Szpaderska und Frankfater, 2001).

Sameni et al. (2000) konnten zeigen, dass die Brustkrebszelllinie BT549 intrazellulär Kollagen IV abbaut und dass diese Degradation Cathepsin B abhängig ist, wohingegen in BT20 Zellen das Kollagen IV extrazellulär abgebaut wird und neben extrazellulärem Cathepsin B auch die Anwesenheit aktiver Serin- und Metalloproteinasen erforderlich ist. Extrazelluläres Cathepsin B wird als Aktivator proteolytischer Kaskaden diskutiert, da es sowohl Pro-uPA als auch ProMMP-3 aktiviert (Kobayashi et al., 1991; Murphy et al., 1992). uPA wiederum konvertiert Plasminogen zu Plasmin (Dano et al., 1985), welches eine Vielzahl von ProMMPs aktivieren kann, wie z. B. ProMMP-1, -3, -9, -12 und -13 (Baramova et al., 1997; Carmeliet et al., 1997; Festuccia et al., 1998a; Festuccia et al., 1998b; He et al., 1989; Matrisian and Bowden, 1990). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zudem zeigen, dass Tumorzellen Bestandteile der ECM durch Endocytose aufnehmen und intrazellulär abbauen können (Ahram et al., 2000; Montcourrier et al., 1990; Montcourrier et al., 1994). Extrazelluläres Cathepsin B kann aber auch direkt Basalmembranbestandteile, wie Kollagen IV und Laminin, degradieren (Buck et al., 1992; Guinec et al., 1993; Guinec et al., 1990).

Ob in unseren Untersuchungen Cathepsin B aktiv an der Degradation der Basalmembran beteiligt ist oder andere extrazelluläre Proteasen aktiviert, die möglicherweise unter den gewählten Bedingungen der *in situ* Zymographie nicht detektierbar waren, lässt sich aufgrund unserer Untersuchungen nicht sagen. Der Inhibitor CA-074 ist nicht zellpermeabel und sollte daher nur extrazelluläres Cathepsin B hemmen, jedoch konnten Szpaderska und Frankfater (2001) zeigen, dass Tumorzellen während einer längeren Inkubationsphase (über 12h), diesen Inhibitor langsam internalisieren können und dass die Invasivität dieser Zellen mit der intrazellulären Cathepsin B Aktivität korreliert. Auch Premzl et al. (2003) vermuten, dass Cathepsin B sowohl intra- als auch extrazellulär zur Invasion von MCF-10AneoT Zellen durch eine rekonstruierte Matrix beiträgt und dass die Hemmung dieser Invasion nur durch Inhibitoren, die sowohl intra- als auch extrazellulär aktives Cathepsin B blockieren, erzielt werden kann.

### **4.3 Der Einfluss Zell-Matrix vermittelter Regulationsmechanismen auf die Expression und zelluläre Lokalisation des Cathepsin B**

Northern Blot Analysen demonstrierten eine erhöhte Cathepsin B Transkriptionsrate in hoch- und intermediär-invasiven (MV3 bzw. SKmel28) gegenüber niedrig-invasiven Melanomzelllinien (SKmel23, WM164), wenn diese Zellen auf Plastikkulturschalen kultiviert wurden. Die Transkription der Protease wurde in keiner der untersuchten Zelllinien durch die Kultivierung innerhalb 3D Kollagenmatrices erhöht. Gleiche Ergebnisse konnten für die Analyse der intrazellulären Cathepsin B Proteinmenge

verzeichnet werden. Erhöhte Mengen der Protease wurden in MV3 und SKmel28 Zellen gefunden, wohingegen die Konzentration an intrazellulärem Cathepsin B in SKmel23 und WM164 Zellen viel niedriger war. Auch hier konnten in keiner Zelllinie Konzentrationsunterschiede der Protease nach Kultivierung der Zellen in 3D Kollagengelen festgehalten werden.

Erst durch den Vergleich an extrazellulärem Cathepsin B wurde der Einfluss der Kultivierung innerhalb nativer Kollagenfibrillen deutlich. SKmel23 und WM164 Zellen schleusten weder nach ihrer Kultivierung auf Plastik Kulturschalen noch nach Kultivierung in Kontakt zu nativen Kollagenfibrillen Cathepsin B aus. Nur die hoch-invasiven MV3 Zellen sezernierten unter beiden Kulturbedingungen konstitutiv Procathepsin B. Zusätzlich wurden, durch den Kontakt der Zellen zu den 3D Kollagenfibrillen, auch beide potentiell aktiven Formen der Protease extrazellulär detektiert (sc und h-dc). SKmel28 Zellen hingegen sezernierten konstitutiv die 31kDa sc-Form der Protease. Auch für diese Zelllinie konnten im Zuge der Kultivierung innerhalb einer 3D Kollagenmatrix, zusätzlich die 25 / 26 kDa große h-dc Formen der Protease extrazellulär nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse: (1) Im Gegensatz zu niedrig-invasiven, weisen intermediär- und hoch-invasive Zellen zusätzlich zu einer erhöhten Transkriptionsrate und intrazellulären Cathepsin B Konzentration, nach ihrer Kultivierung auf Plastik Kulturschalen auch extrazelluläres Cathepsin B auf (2) Die Kultivierung invasiver Zellen in 3D Kollagenmatrices führt zu einer Erhöhung der Nettoproteinmenge an Cathepsin B durch das zusätzliche Auftreten extrazellulärer, prozessierter Formen der Protease (3) Die erhöhte Proteinkonzentration der Protease korreliert nicht mit einer vermehrten Transkription der Cathepsin B mRNA.

Das intrazelluläre *trafficking* von Cathepsin B ist in malignen Tumoren häufig verändert und kann zur erhöhten Sekretion des Procathepsin B, zur Ausschleusung aktiver Formen der Protease, zur Umverteilung perinukleärer Lysosomen und zur Plasmamembran-Assoziation von Cathepsin B führen (Cavallo-Medved und Sloane, 2003; Yan und Sloane, 2003). Es liegt bis heute jedoch erst ein Bericht vor, der eine über Zell-Matrix Interaktionen vermittelte Regulation der Cathepsin B Sekretion beschreibt. Darin konnten Koblinski et al. (2002) kürzlich zeigen, dass die Sekretion von Procathepsin B in Fibroblasten durch deren Interaktion zu nativem Kollagen I induziert wird. Dabei wurde der Anstieg der Cathepsin B Nettoproteinkonzentration, nach der Interaktion der Fibroblasten mit Kollagen I, nicht durch eine verstärkte mRNA Transkription widerspiegelt. Die Autoren vermuten daher, dass die erhöhte Cathepsin B Expression auf posttranskriptionaler Ebene reguliert wird, entweder durch

vermehrte Translation oder Stabilisierung des Cathepsin B im Zuge der Zell-Kollagen I Interaktionen.

Im Gegensatz zu früheren Berichten von Rozhin et al. (1987) und Sloane et al. (1994a), konnten wir in keiner der untersuchten Melanomzelllinien membrangebundenes Cathepsin B nachweisen, weder unter den Bedingungen der Monolayer-Kultur noch nach Kultivierung der Zellen in 3D Kollagengelen.

#### **4.4 Die Rolle von Zell-Kollagen I Interaktionen bei der Procathepsin B Prozessierung bzw. Exocytose reifer Cathepsin B Formen**

Extrazellulär sezerniertes Procathepsin B kann durch Cathepsin D und G, tPA, uPA und mehrere Elastasen aktiviert werden (Dalet-Fumeron et al., 1996; Dalet-Fumeron et al., 1993; van der Stappen et al., 1996). Außerdem werden autokatalytische Aktivierungsmechanismen des Procathepsin B nachgewiesen (Rozman et al., 1999; Turk et al., 2000).

Die hoch-invasiven MV3 Zellen sezernierten konstitutiv Procathepsin B und in Folge eines Kontakts zu nativem Kollagen I konnten zusätzlich auch reife Formen der Protease extrazellulär detektiert werden. Wir konnten zeigen, dass extrazelluläre reife Cathepsin B Formen nicht das Resultat einer extrazellulären Procathepsin B Aktivierung durch Aspartat- oder lysosomale Cysteinproteasen waren. Zudem konnte auch die Autoaktivierung des Procathepsin B durch Inhibition von Cathepsin B in Anwesenheit von CA-074 ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz dazu wurden weder Pro- noch reife Cathepsin B Formen extrazellulär detektiert, wenn die Aktivität von MMPs oder Serinproteasen inhibiert wurde. Bei diesen Inhibitionsstudien verloren die MV3 Zellen zusätzlich die Fähigkeit Kollagengele zu kontrahieren. Die Kultivierung der MV3 Zellen auf mit fibrillärem Kollagen I beschichteten Kulturschalen (2D) in Anwesenheit der MMP- bzw. Serinproteaseinhibitoren, führte ebenfalls zu einer Inhibition der Cathepsin B Sekretion (Daten nicht dargestellt). Daher vermuten wir, dass die Inhibition der Gelkontraktion im 3D System die Inhibition von MMPs bzw. Serinproteasen widerspiegelt, deren Aktivität möglicherweise für die MV3 Zellen notwendig ist, um mit Kollagen I zu interagieren und Cathepsin B auszuschleusen. Pilcher et al. (1997) konnten zeigen, dass Keratinozyten die Aktivität von MMP-1 für die Migration auf nativem Kollagen I benötigen. MV3 Zellen exprimieren MMP-1 nicht, jedoch könnten andere, von diesen Zellen synthetisierte MMPs diesen Verlust kompensieren. Neben MMP-1 wurde auch die Beteiligung von MMP-2, -3, -12 und -13 und Serinproteasen bei Zellmigrationsprozessen beschrieben (Friedl und Wolf, 2003; Heikkila et al., 2002; Ntayi et al., 2001). Zudem wurde gezeigt, dass die Kontraktion von Kollagengelen in MMP-3 defizienten Fibroblasten deutlich

verringert ist (Bullard et al., 1999a; Bullard et al., 1999b). Außerdem spielen Serinproteasen, wie uPA und Plasmin, eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von ProMMP-1, -3, -9, -12 und -13 (Baramova et al., 1997; Carmeliet et al., 1997; Dano et al., 1985; Festuccia et al., 1998a; Festuccia et al., 1998b; He et al., 1989; Matrisian and Bowden, 1990).

Die Daten legen nahe, dass das extrazelluläre Auftreten reifer Cathepsin B Formen durch Zell-Kollagen I Interaktionen vermittelt wird, die wiederum von der Aktivität extrazellulärer MMPs abhängig sind. Dabei konnte jedoch nicht geklärt werden, ob MMP regulierte Zell-Kollagen I Interaktionen für die extrazelluläre Procathepsin B Prozessierung verantwortlich sind oder möglicherweise die Exocytose reifer Cathepsin B Formen aus späten Endosomen oder Lysosomen induzieren. Linebaugh et al. (1999) haben beschrieben, dass in Tumorzellen die Sekretion von aktivem Cathepsin B unabhängig von der Procathepsin B Sekretion stattfindet. Zudem ist bekannt, dass Lysosome auf einen intrazellulären Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration reagieren und mit der Plasmamembran fusionieren (Andrews, 2000; Rodriguez et al., 1997). Eventuell ist die hohe extrazelluläre Konzentration reifer Cathepsin B Formen eine Konsequenz lysosomaler Exocytose, die durch Zell-Kollagen I Interaktionen stimuliert wird.

Neben Pro- und den reifen Cathepsin B Formen konnte eine weitere, 30-40kDa große Form der Protease extrazellulär nachgewiesen werden, die möglicherweise glykosyliertes sc Cathepsin B darstellt und als Übergangsform während der Procathepsin B Prozessierung auftritt. Da diese Form niemals intrazellulär nachgewiesen werden konnte, entstammt sie wahrscheinlich von glykosyliertem Procathepsin B, welches vom Golgi-Apparat oder trans-Golgi Netzwerk sezerniert wird, anstatt zu den Lysosomen transportiert zu werden.

Hoch-invasive Zellen könnten somit zwei Kollagen I abhängige Mechanismen kombinieren, die beide zur Anhäufung extrazellulär aktiver Cathepsin B Formen führen: (1) Die Prozessierung des sezernierten Procathepsin B und (2) die lysosomale Exocytose reifer Cathepsin B Formen.

#### **4.5 Die Rolle von $\beta$ 1-Integrinen bei der über Zell-Kollagen I Interaktionen vermittelten Cathepsin B Sekretion**

Da reife Cathepsin B Formen nie extrazellulär detektiert wurden, wenn MV3 Zellen auf monomerem Kollagen I kultiviert wurden, konnten wir zeigen, dass nur der Zellkontakt mit nativen Kollagenfibrillen essentiell diesen Prozess fördert. Tomasek et al. (1997) demonstrierten, dass die Organisation des Zytoskeletts innerhalb 3D Kollagenmatrices die ProMMP-2 Aktivierung beeinflusst, welche den Kontakt zu fibrillärem Kollagen benötigt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die erhöhte MMP-1 und -13

Expression in Fibroblasten von Kollagen I bindenden Integrinen abhängig ist (Mauch et al., 1989; Ravanti et al., 1999). Bereits 1991 konnten Klein et al. zeigen, dass hoch-invasive MV3 Zellen, im Gegensatz zu niedrig-invasiven Melanomzellen, während ihrer Kultivierung innerhalb 3D Kollagengele, vermehrt  $\alpha 2\beta 1$  Integrin exprimieren, wohingegen das  $\alpha 1\beta 1$  Integrin in keiner der Zelllinien nachweisbar ist. Zudem zeigte diese Gruppe die wesentliche Beteiligung der  $\alpha 2\beta 1$  Integrinrezeptoren bei der Kontraktion der Kollagengele.

Sowohl  $\alpha 1\beta 1$  als auch  $\alpha 2\beta 1$  Integrine können natives Kollagen Typ I binden (Eble et al., 1993; Gullberg et al., 1992). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Procathepsin B Sekretion in Fibroblasten durch die Umverteilung aktivierter  $\beta 1$ -Integrinuntereinheiten induziert wird (Koblinski et al., 2002). Diese Autoren vermuten, dass Kollagen I durch Interaktionen mit  $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 2\beta 1$  Integrinen, die erhöhte Sekretion des Procathepsin B stimuliert.

Mit Hilfe inhibitorischer Antikörper, die gegen die einzelnen Untereinheiten des  $\alpha 2\beta 1$  Integrinrezeptors gerichtet waren, konnten wir zeigen, dass die Ausschleusung des Cathepsin B durch die alleinige Inhibition bzw. Ligation der  $\beta 1$ -Integrinuntereinheiten gehemmt wurde. Zusätzlich wurde unter diesen Bedingungen die Kontraktion der Kollagengele inhibiert. Die isolierte Inhibition der  $\alpha 2$ -Integrinuntereinheiten führte weder zu einer Reduktion der Gelkontraktion noch zu einer verringerten Menge an extrazellulärem Cathepsin B.

Immunoblot Analysen der Expression der  $\alpha 2$ -Integrinuntereinheit bestätigten frühere Ergebnisse von Klein et al. (1991), jedoch konnten wir mit den verwendeten inhibitorischen anti- $\alpha 2$  Integrinantikörpern keine Blockierung der funktionellen Kollagenbindung nachweisen. Die funktionelle Blockierung der Zelladhäsion an Kollagen Typ I wurde jedoch für die verwendeten Antikörper 6F1, 12F1 und P1E6 bereits beschrieben (Estavillo et al., 1999; Shimizu et al., 1990; Takada and Puzon, 1993; Wayner et al., 1988).

Die Hemmung der  $\beta 1$ -Integrinkette beinhaltet allerdings nicht nur die Inhibition der  $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 2\beta 1$  Integrine, sondern auch die Inhibition anderer Integrinheterodimere, wie  $\alpha 10\beta 1$  und  $\alpha 11\beta 1$ . Diese beiden Integrine wurden auch als Kollagenrezeptoren beschrieben (Camper et al., 1998; Velling et al., 1999), jedoch wird das  $\alpha 10\beta 1$  Integrin hauptsächlich in Kollagen Typ II exprimierenden Geweben synthetisiert, während  $\alpha 11\beta 1$  ausschließlich in mesenchymalen Zellen nachgewiesen wurde (Gullberg und Lundgren-Akerlund, 2002).

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass auch Melanomzellen die  $\alpha 11$ -Integrinuntereinheit synthetisieren. Eine mögliche Beteiligung des  $\alpha 11\beta 1$  Integrins in

Bezug auf die Cathepsin B Ausschleusung bzw. lysosomale Exocytose wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Durch die Inhibition der  $\beta$ 1-Integrinuntereinheiten wurden sowohl die konstitutive Sekretion des Procathepsin B als auch die Kollagen I abhängigen Mechanismen, die die Procathepsin B Prozessierung und die lysosomale Exocytose umfassen, gehemmt. Daher liegt es nahe, dass neben den Kollagen bindenden Integrinen auch andere  $\beta$ 1-Integrine eine Rolle spielen und möglicherweise die konstitutive Procathepsin B Sekretion regulieren. Neben  $\alpha$ 2 $\beta$ 1,  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 6 $\beta$ 1, die mit Laminin interagieren können, sind die  $\alpha$ v $\beta$ 1,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 Integrine als Fibronektinrezeptoren bekannt. Fötale Kälberserum, welches im Kulturmedium der Melanomzelllinien vorhanden war, enthält eine Reihe von ECM Proteinen. Auch nach einer Inkubation von 24 Stunden in serumfreien Medium, könnten diese ECM Bestandteile in einer niedrigen Konzentration vorhanden sein und die Procathepsin B Sekretion induzieren. Zudem wurde beschrieben, dass Melanomzellen Matrixproteine wie z. B. Fibronektin synthetisieren (Gaggioli et al., 2005). Durch die Inhibition RGD erkennender Integrinrezeptoren, konnte jedoch keine Reduktion der Procathepsin B Sekretion nachgewiesen werden.

Aufgrund der dargestellten Resultate vermuten wir, dass durch die Blockierung der  $\beta$ 1-Integrinuntereinheit und der dadurch inhibierten Kontraktion der Kollagengele, sowohl die Sekretion des Procathepsin B beeinflusst wird, als auch seine Prozessierung und die lysosomale Exocytose reifer Cathepsin B Formen.  $\beta$ 1-Integrin vermittelte Zell-Kollagen I Interaktionen regulieren daher in hoch-invasiven Melanomzellen die extrazelluläre Lokalisation reifer, potentiell aktiver Cathepsin B Formen (s. Abb. 4.1).

Dumin et al. (2001) postulieren, dass Kollagen I in Keratinozyten Interaktionen zwischen ProMMP-1 und dem  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 Integrin induziert, die zur Kolo-kalisation der Protease und ihrem Substrat führen. Ähnliche Mechanismen werden für die ProMMP-2 Aktivierung durch MT1-MMP in dermalen Fibroblasten vorgeschlagen (Zigrino et al., 2001). Zudem konnten Mai et al. (2000) zeigen, dass Procathepsin B mit Annexin II auf der Tumorzelloberfläche assoziiert, was zur Aktivierung des Zymogens führt. Es wird diskutiert, dass diese Assoziation auch für die Sekretion von Cathepsin B verantwortlich ist (Koblinski et al., 2002).

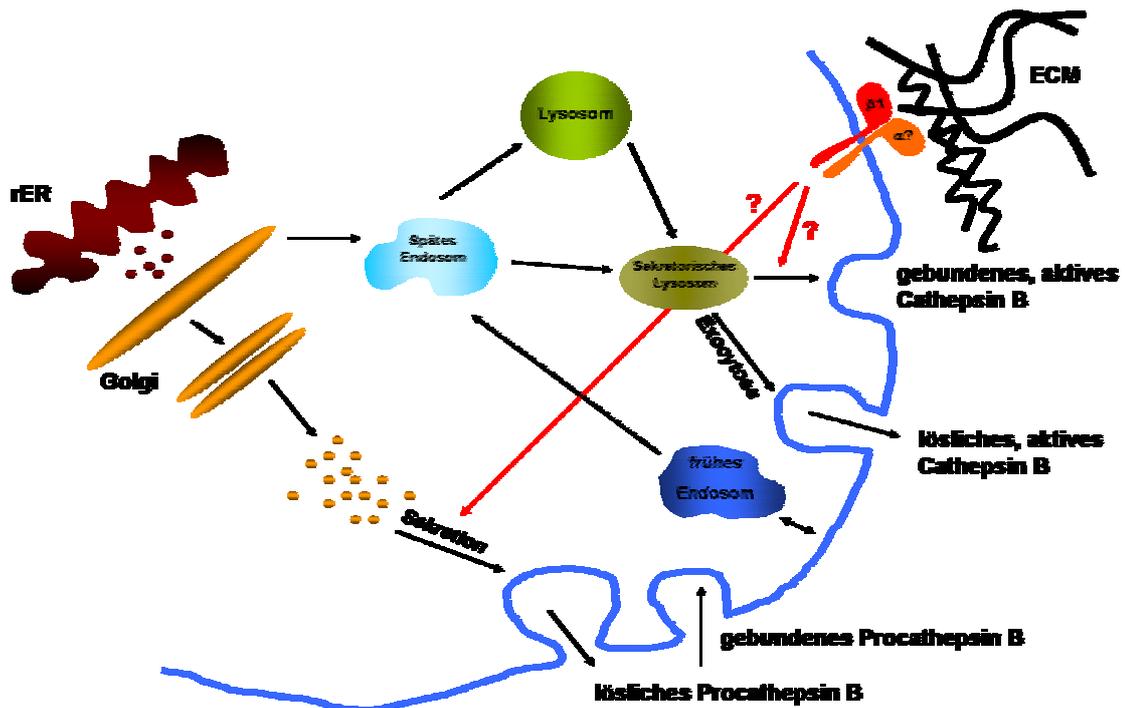


Abbildung 4.1: Theorie der Tumorzell-ECM vermittelten Cathepsin B Sekretion:  $\beta 1$ -Integrin vermittelte Zell-ECM Interaktionen regulieren in hoch-invasiven Melanomzellen die Procathepsin B Sekretion, seine Prozessierung und die lysosomale Exocytose aktiver Cathepsin B Formen. Somit werden wahrscheinlich sowohl klassische als auch alternative Cathepsin B *trafficking* Mechanismen über Zell-ECM Interaktionen kontrolliert (s. rote Pfeile).

#### 4.6 Zell-Matrix vermittelte Mechanismen regulieren die Expression und zelluläre Lokalisation endogener Cathepsin B Inhibitoren

Die Aktivität lysosomaler Cysteinproteasen wird durch vielzählige Faktoren beeinflusst, wobei die Zymogenaktivierung und die Inhibition durch ihre endogene Inhibitoren als Hauptregulationsfaktoren bekannt sind (Turk et al., 2001b). Ein Ungleichgewicht zwischen den Cathepsinen und ihren Inhibitoren, kann jedoch zur Invasion und Metastasierung maligner Tumorzellen beitragen (Sloane, 1996). Da wir zeigen konnten, dass invasive Melanomzellen intra- und extrazellulär vermehrt Cathepsin B synthetisieren bzw. ausschleusen, wurde ebenfalls die Expression und zelluläre Lokalisation der Cystatine A, B und C untersucht.

Cystatin A war in keiner der untersuchten Zelllinien nachweisbar. Derzeit liegen allerdings keine Daten aus der Literatur vor, dass Melanomzellen Cystatin A exprimieren. Dieser Inhibitor ist hauptsächlich in Epithel- und Lymphgewebe lokalisiert und schützt vermutlich diese Gewebe vor eindringenden Bakterien (Barrett, 1986). Für Tumorzellen aus Lungen- und Brustkarzinomen konnte gezeigt werden, dass die

Invasivität mit einer verringerten Cystatin A Transkription korreliert (Ebert et al., 1997; Lah et al., 1992).

Wir konnten keine Mengenunterschiede an Cystatin B und C Transkripten innerhalb der unterschiedlich invasiven Zelllinien feststellen. Auch wurde die Transkription dieser Inhibitoren nicht durch die Kultivierung der Zellen in 3D Kollagengelen reguliert. Allerdings konnte wir zeigen, dass sowohl Cystatin B als auch Cystatin C auf posttranskriptionaler Ebene reguliert wurden.

Cystatin C, welches ein Signalpeptid umfassend, synthetisiert und extrazellulär sezerniert wird, wurde in keiner der untersuchten Melanomzelllinien unter den Bedingungen der Monolayer-Kultur detektiert. Jedoch wurde die Synthese und Sekretion dieses Inhibitors durch den Kontakt der Zellen zu nativen Kollagenfibrillen induziert. In Folge dieser Induktion konnten in den Überständen aller Zelllinien vergleichsweise hohe Mengen an Cystatin C Protein nachgewiesen werden.

Die Cystatin B Proteinexpression korrelierte mit der Invasivität der analysierten Zelllinien und war in den hoch-invasiven MV3 Zellen am geringsten. Die Kultivierung der Zellen in 3D Kollagengelen induzierte in allen Zelllinien eine vermehrte Synthese des Inhibitors, jedoch war die Cystatin B Konzentration in den hoch-invasiven Zellen deutlich geringer im Vergleich zu den niedrig-invasiven Zellen. Erstaunlicherweise konnten wir Cystatin B sowohl intra- als auch extrazellulär nachweisen. Cystatin B wird ohne Signalpeptid synthetisiert, ist daher hauptsächlich intrazellulär lokalisiert und schützt die Zellen vor unkontrollierter Cathepsinaktivität (Kos und Lah, 1998). Allerdings konnte Cystatin B auch extrazellulär in humanem Urin nachgewiesen werden (Abrahamson et al., 1986). Es wurde jedoch nicht geklärt, ob die extrazelluläre Lokalisation auf eine Sekretion des Inhibitors zurückzuführen war oder mit der Membranpermeabilität absterbender Zellen korrelierte. Da in unseren Versuchen die Zellviabilität überprüft wurde, konnten wir davon ausgehen, dass Cystatin B von den Melanomzellen auch in den Extrazellularraum sezerniert wurde.

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass invasive Melanomzellen neben einer erhöhten Konzentration an intra- und extrazellulärem Cathepsin B, gleichzeitig eine reduzierte Cystatin B Proteinsynthese aufweisen. Die stark verringerte Konzentration an Cystatin B führt intrazellulär zu einem Ungleichgewicht des Cathepsin B / Inhibitor Verhältnisses, welches zu Gunsten der Protease verschoben ist.

Cystatin C wurde in allen untersuchten Melanomzelllinien ausschließlich extrazellulär nachgewiesen. Da hoch- wie niedrig-invasive Zellen vergleichbare Mengen des Inhibitors synthetisierten, jedoch die extrazelluläre Cathepsin B Konzentration nur in invasiven Melanomzellen erhöht war, liegt aufgrund der geringen extrazellulären

Cystatin B Konzentration auch außerhalb der invasiven Zellen ein verändertes Cathepsin B / Inhibitor Verhältnis vor.

Der immunohistochemische Nachweis von Cathepsin B in Melanomzellen, die auf der Basalmembran deepidermisierte Dermis kultiviert wurden, zeigte sowohl in hoch- als auch in niedrig-invasiven Zellen eine deutlich erhöhte Konzentration der Protease. Da dieser Nachweis keine Aussage über die Aktivität der Protease zulässt, in den niedrig-invasiven Zellen jedoch eine Balance des Cathepsin B / Inhibitor Verhältnisses nachgewiesen werden konnte, welches in den hoch-invasiven Zellen zu Gunsten der Protease verschoben ist, verdeutlichen diese Ergebnisse, dass ein verändertes Verhältnis zwischen Cathepsin B und seiner Inhibitoren Cystatin B und C zu einer erhöhten intra- und extrazellulären Aktivität der Protease führen kann, die mit dem invasiven Phänotyp der Melanomzellen korreliert.

Sloane, Moin und Lah (1994b) und Calkins et al. (1998) postulieren, dass Cystatin C im Vergleich zu Cystatin B eine höhere Spezifität gegenüber Cathepsin B aufweist und somit eine bedeutendere Rolle bei der Regulation der Cathepsin B Aktivität spielt. Der  $K_{is}$  für die Inhibition von Cathepsin B beträgt für Cystatin C 0,29nM, wohingegen er für Cystatin B bei 19nM liegt. Neuere Berichte verschiedener Arbeitsgruppen weisen Cystatin C eine Rolle als anti-metastasierendes Agens zu. Konduri et al. (2002) konnten zeigen, dass die Überexpression von Cystatin C in SNB19 Glioblastomzellen zu einer signifikanten Reduktion der Invasivität durch Matrigel führt. Zudem wurde keine Tumorformation nach intracerebraler Injektion dieser Zellen in Nachtmäusen beobachtet. Die Invasion von PC3 Prostatakrebszellen durch Matrigel wurde ebenfalls durch die Überexpression von *chicken*-Cystatin verringert (Colella und Casey, 2003). Durch die Zugabe von gereinigtem Cystatin C konnten Nishikawa et al. (2004) eine Inhibition der Matrigel-Invasion von TYK-nu Ovarialkarzinomzellen nachweisen. HT1080 Fibrosarkomzellen sind hoch-invasiv, sezernieren Cathepsin B und synthetisieren geringe Mengen Cystatin C (Corticchiato et al., 1992). Neue Untersuchungen in denen diese Zelllinie mit einem Cystatin C exprimierenden Retrovirus infiziert wurden zeigten ebenfalls eine Reduktion der Matrigel-Invasion. Zudem konnten diese Autoren nachweisen, dass die Invasivität der HT1080 Zellen auf extrazellulär aktives Cathepsin B zurückzuführen war und nicht durch intrazellulär wirksame Cathepsin B Inhibitoren beeinflusst wurde (Sokol und Schiemann, 2004).

#### **4.7 Die Detektion der extrazellulären, gelatinolytisch aktiven Cathepsine B und L in hoch-invasiven Melanomzellen mittels LDS-Zymographie**

Im Gegensatz zu pflanzlichen oder parasitären Cysteinproteasen, die ein pH Optimum von  $7,5 \pm 0,5$  aufweisen, ist die Stabilität und Aktivität vieler humaner Cathepsine unter diesen pH Bedingungen stark eingeschränkt. Ihre Aktivität wird daher bislang durch die spezifische Spaltung chromogener oder fluorogener Substrate nachgewiesen (Bromme et al., 2004). Durch solche Analysen, können zwar spezifische Cathepsinaktivitäten in Zellysaten oder -überständen untersucht werden, jedoch nicht die dafür verantwortlichen Formen der entsprechenden Protease. Mit der von Dalton et al. (1996, 1997) beschriebene SDS-Zymographie unter neutralen Bedingungen, können aktive Formen der Cathepsine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die pH Bedingungen während der Elektrophorese eignen sich aber ebenfalls nur zur Detektion stabiler parasitärer Cathepsinaktivitäten. Aus diesen Gründen, sollte ein elektrophoretisches System entwickelt werden, mit dessen Hilfe gleichzeitig die Aktivität und das Molekulargewicht aktiver, humaner Cathepsine in biologischen Flüssigkeiten, wie z. B. Zellkulturüberständen untersucht werden können.

Mit der von Jovin et al. (1973a-d) entwickelten Theorie der Multiphasen-Zonen-Elektrophorese wurde eine mathematische Beschreibung elektrophoretischer Systeme eingeführt, die auch für die denaturierenden Systeme eingesetzt werden kann (Wiltfang et al., 1991). Basierend auf dieser Theorie konnte ein elektrophoretisches System zur Auftrennung von Proteinen unter sauren pH Bedingungen entwickelt werden, welche die Stabilität der Cathepsine deutlich verstärken (Dehrmann et al., 1996; Turk et al., 1994). Die Kalkulationen zur Entwicklung eines solchen PAGE-Systems wurden mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms unter Verwendung der von Jovin et al. (1973d) veröffentlichten Mobilitäten einzelner Ionen durchgeführt. Danach konnte das System der LDS-PAGE bzw. LDS-Zymographie entwickelt werden, welches durch die Verwendung von MES ( $pK_a$  6,12) als „zurückbleibendes Ion“ und Bistris ( $pK_a$  6,8) als „anführendes Ion“, die Proteinanalysen bei pH Bedingungen unter pH 6,5 erlaubte. Dabei wurde eine Ionenstärke von 0,16M gewählt, da relativ hohe Ionenstärken die Auflösung der Proteinseparation verbessern (Okajima et al., 1993). Weil die Aktivität der Cathepsine durch die Oxidation des katalytischen Cysteins inhibiert wird, wurde die Photopolymerisation unter Verwendung des Riboflavin / TEMED Systems eingesetzt, die den Vorteil besitzt, keine Oxidationsmittel zu beinhalten (Chiari et al., 1992).

Durch die zymographische Analyse der aus humaner Leber gereinigten Cathepsine B und L und eines Überstands der MV3 Zellen, der aus einer Kultivierung dieser Zellen in 3D Kollagengelen stammte, konnte unter Verwendung spezifischer Proteaseinhibitoren gezeigt werden, dass die neu entwickelte Technik der LDS-Zymographie zur Analyse

von aktiven Cathepsinen eingesetzt werden kann. Unter den Bedingungen der LDS-Zymographie waren weder Aspartat- noch Serinproteasen aktiv. Die Aktivität der MMPs wurde durch die Anwesenheit von EDTA inhibiert.

Die LDS-Zymographie wurde daher eingesetzt, um extrazelluläre Cathepsine in Überständen hoch-invasiver MV3 Zellen zu analysieren und zu identifizieren. Durch den Einsatz spezifischer Cathepsin B bzw. Cathepsin L Inhibitoren konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass neben diesen beiden Cathepsinen keine weiteren aktiven Cathepsine von den MV3 Zellen sezerniert werden.

Bei der Analyse der Cathepsin B Aktivität als Funktion der Zeit konnten drei extrazellulär aktive Formen der Protease detektiert werden, die sich aufgrund ihrer Molekulargewichte als 40-50kDa, 30-40kDa große und eine kleinere 30kDa Cathepsin B Form unterscheiden ließen.

Der Vergleich der Zymogramme mit den entsprechenden Western Blots nach erfolgter LDS-PAGE identifizierte zwei Cathepsin B Formen, die auch gelatinolytisch aktiv waren. Dabei handelte es sich um die 40 bis 50kDa große und die kleinere 30kDa große Form der Protease, wobei letztere wahrscheinlich die aktive sc Form des Cathepsin B darstellte und die größere Form ihrem Molekulargewicht nach Procathepsin B entsprach. Allerdings konnten diese Versuche nicht klären, ob natives Procathepsin B eine intrinsische proteolytische Aktivität besitzt. Die schwach denaturierenden Bedingungen der LDS-PAGE könnten auch Konformationsänderungen innerhalb des Procathepsin B auslösen, welche eine Verlagerung des Propeptids und die Freilegung des katalytischen Zentrums begünstigen. Ein derartiger Aktivierungsmechanismus kann jedoch erst in zukünftigen Versuchen mit rekombinantem Procathepsin B näher untersucht werden. Mehrere Autoren vermuten allerdings, dass die Zymogene der Cathepsine eine geringe proteolytische Aktivität besitzen (Baker et al., 1996; Mason et al., 1987; McQueney et al., 1997), wie z. B. auch Procathepsin B (Muentener et al., 2005; Rozman et al., 1999).

Zusätzlich konnten mittels LDS-Zymographie zwei extrazellulär aktive Cathepsin L Formen in den Überständen hoch-invasiver Zellen identifiziert werden mit Molekulargewichten von 30kDa bzw. 25-30kDa, bei denen es sich wahrscheinlich um die sc bzw. h-dc Formen der Protease handelte. Transformierte Zellen, wie auch Melanomzellen sezernieren hauptsächlich Procathepsin L (Ravanko et al., 2004; Rousselet et al., 2004). Procathepsin L kann jedoch bei niedrigen pH-Werten und in Anwesenheit von Glykosaminoglykanen, die auf der Zelloberfläche oder in der ECM vorhanden sind, in seine aktiven Formen konvertieren (Ishidoh und Kominami, 1995; Mason und Massey, 1992; Ravanko et al., 2004).

Somit ermöglicht die entwickelte Technik der LDS-Zymographie, in Kombination mit spezifischen Cathepsin-Inhibitoren, die gleichzeitige Analyse unterschiedlicher Cathepsinaktivitäten in Zellkulturüberständen. Dabei können neben den Aktivitäten auch die dafür verantwortlichen Proteaseformen identifiziert werden. Zudem ist die Methode im Vergleich zu Western Blot Analysen zwanzigmal sensitiver und bietet den Vorteil sehr geringe Proteinmengen zu untersuchen.

Die oben dargestellten Resultate zeigen, dass ein verändertes Verhältnis zwischen Cathepsinen und Inhibitoren zu erhöhten intra- und extrazellulären Proteaseaktivitäten führen kann, die mit dem invasiven Phänotyp der Melanomzellen korrelieren. Dabei spielen über  $\beta$ 1-Integrinrezeptoren vermittelte Zell-ECM Interaktionen in hoch-invasiven Melanomzellen eine bedeutende Rolle bei der Regulation der extrazellulären Lokalisation aktiver Cathepsin B Formen. Neben Cathepsin B sezernieren hoch-invasive Melanomzellen zusätzlich aktives Cathepsin L, wodurch das extrazelluläre Cathepsin / Inhibitor Verhältnis weiter auf die Seite der aktiven Proteasen verschoben wird. Wir vermuten daher, dass die in den Extrazellularraum sezernierten Cathepsine B und L direkt an der Degradation extrazellulärer Matrixbestandteile beteiligt sind. Extrazellulär aktives Cathepsin B kann jedoch auch andere sezernierte Proteasen aktivieren und somit durch Initiation proteolytischer Kaskaden indirekt am Matrixabbau beteiligt sein (s. Abb. 4.2). Neben der extrazellulären ECM Degradation begünstigt ein verändertes intrazelluläres Cathepsin / Inhibitor Verhältnis wahrscheinlich den intrazellulären Abbau endocytierter Matrixbestandteile.

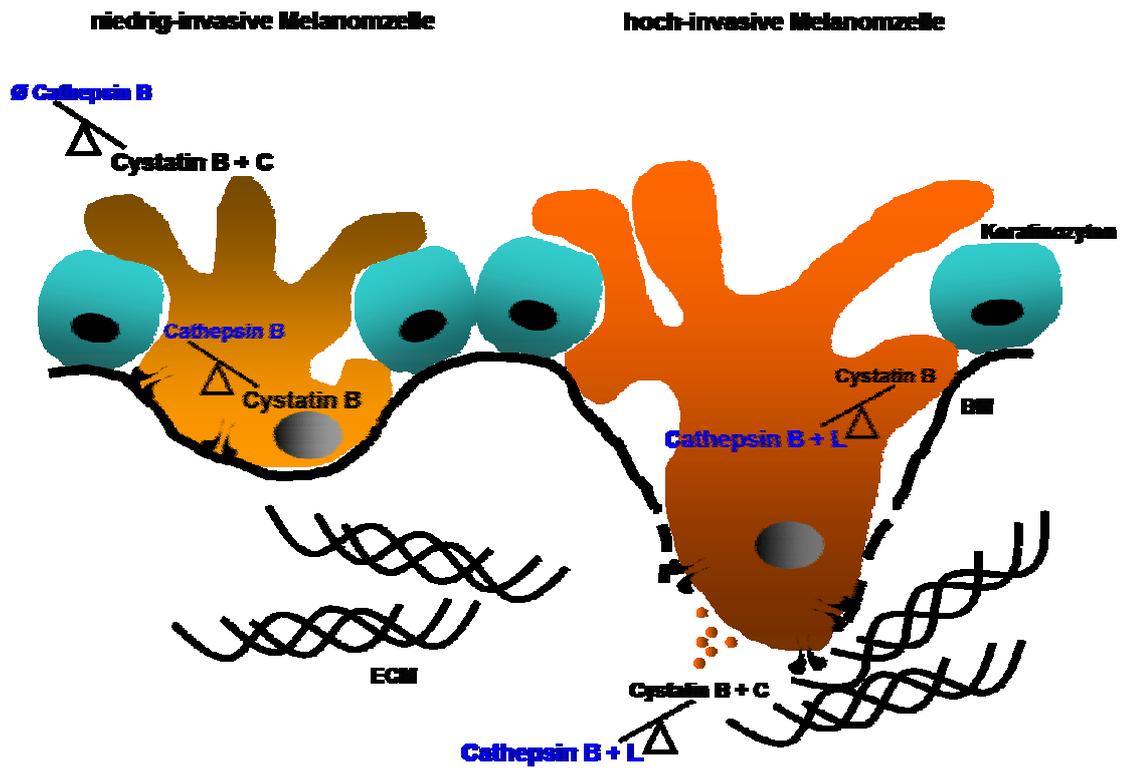


Abbildung 4.2: Das intra- und extrazelluläre Verhältnis zwischen Cathepsinen und ihren Inhibitoren in hoch- bzw. niedrig invasiven Melanomzellen.

## 5 Zusammenfassung – Abstract

### 5.1 Zusammenfassung

Die Invasion maligner Melanomzellen ist ein komplexer Prozess, in dem Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen eine wesentliche Bedeutung einnehmen. Dabei ist die Fähigkeit der Zellen, in das Gewebe einzuwandern von der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle und der Degradation extrazellulärer Matrixkomponenten abhängig. Die Penetration der Basalmembran der dermoepidermalen Junctionszone stellt hierbei einen initialen Schritt der Melanomzellinvasion dar und ist somit entscheidend für den Übergang von benignen zu malignen Wachstumsprozessen. Eine vermehrte Expression der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin B konnte bereits in einer Reihe von Tumormodellen nachgewiesen werden. Die Bedeutung der Zell-Matrix Interaktionen für die molekularen Regulationsmechanismen von Cathepsin B, die zu einer erhöhten Aktivität der Protease und somit zur Progression maligner Wachstumsprozesse führen, sind jedoch bislang nicht bekannt.

Innerhalb dieser Dissertation wurde daher die Rolle lysosomaler Cysteinproteasen während der Invasion humaner Melanomzellen durch dermales Bindegewebe oder bei der Überwindung der Basalmembran in *in vitro* Invasionsmodellen aus humaner deepidermisierter Haut untersucht. Wir konnten zeigen, dass während der Invasion des dermalen Bindegewebes sowohl aktive MMPs als auch aktive Cathepsine nachweisbar waren, wohingegen während der Penetration der Basalmembran ausschließlich aktive Cathepsine detektiert wurden. Zudem konnte durch die spezifische Inhibition von Cathepsin B die Invasion hoch-invasiver Melanomzellen durch die Basalmembran deutlich reduziert werden, was die Beteiligung dieser Protease bei initialen Schritten der Melanomzellinvasion hervorhebt.

Die Expression und zelluläre Lokalisation des Cathepsin B und seiner endogenen Inhibitoren wurde *in vitro* in einer rekonstituierten Matrix aus fibrillärem Kollagen Typ I charakterisiert, die *in vivo*-ähnliche Verhältnisse simuliert. Im Gegensatz zu niedrig-invasiven Melanomzellen, konnte in intermediär- und hoch-invasiven Zellen, in Abwesenheit des nativen Kollagens, sowohl eine erhöhte intrazelluläre Proteasekonzentration als auch eine Ausschleusung von Cathepsin B nachgewiesen werden. Durch den Kontakt der Zellen zu nativen Kollagenfibrillen wurde zusätzlich eine vermehrte extrazelluläre Lokalisation reifer Formen der Protease induziert. Durch den Einsatz inhibitorischer anti- $\beta 1$  Integrantikörper konnten wir zeigen, dass die extrazelluläre Lokalisation der Protease über  $\beta 1$ -Integrine vermittelt wurde.

Des Weiteren wurde sowohl eine Hemmung der Procathepsin B Sekretion / Prozessierung als auch eine Inhibition der lysosomalen Exocytose reifer Cathepsin B Formen beobachtet, wenn MMPs und Serinproteasen innerhalb der Kollagengele inhibiert wurden. Diese Resultate weisen darauf hin, dass MMPs und Serinproteasen für Melanomzell-Kollagen Interaktionen benötigt werden, die zur Ausschleusung von Cathepsin B führen.

Zell-Kollagen Interaktionen regulierten zudem die Synthese der endogenen Inhibitoren Cystatin B und C, unabhängig von der Invasivität der analysierten Zelllinien. Betrachtet man jedoch die Nettoproteinmengen, so wird deutlich, dass im Gegensatz zu niedrig-invasiven Zellen in den hoch-invasiven Zellen ein verändertes Cathepsin / Inhibitor Verhältnis vorliegt, welches intra- und extrazellulär deutlich zugunsten der aktiven Protease verschoben ist. Da die Etablierung der LDS-Zymographie uns die Detektion aktiver Cathepsine ermöglichte, konnten wir zudem zeigen, dass hoch-invasive Melanomzellen neben Cathepsin B auch aktives Cathepsin L sezernieren, wodurch die Balance zwischen Cathepsinen und endogenen Inhibitoren weiter reduziert wird.

Die Analyse molekularer Mechanismen der Tumorzell-ECM vermittelten Regulation der Synthese, Sekretion und Aktivität von Cathepsin B unterstreicht die Rolle lysosomaler Cysteinproteasen bei der Tumorzellinvasion und zeigt neue Ansätze zur Entwicklung therapeutischer Konzepte des malignen Melanoms auf.

## 5.2 Abstract

Invasion of malignant melanoma cells is a complex process characterized by several cell-cell and cell-matrix interactions. The invasive capacity of cells is dependent on the expression of various adhesion molecules as well as on the degradation of peritumoral extracellular matrix. The degradation of basement membrane components of the dermo-epidermal junction is one of the initial steps of melanoma cell invasion characterizing the transition from benign to malignant tumor growth. An increased expression of the lysosomal cysteine protease cathepsin B has been shown in various tumor models. However, little is known about the role of lysosomal cysteine proteases in tumor invasion and about the regulatory mechanisms underlying enhanced cathepsin B activity during tumor growth.

In the present work we analyzed the role of lysosomal cysteine proteases during the invasion of human melanoma cell lines through dermal connective tissue or basement membranes using *in vitro* invasion models of deepdermized human skin. We showed that, besides MMPs, also active cathepsins could be detected during the invasion of connective tissue, whereas during penetration of basement membranes only active cathepsins but not MMPs were observed. Reduction of the invasion of high-invasive cells through basement membranes was obtained upon inhibition of cathepsin B activity, thus underlining the involvement of this protease in early invasion processes.

We have further characterized the expression and cellular localization of cathepsin B and its endogenous inhibitors in *in vitro* cultures of melanoma cells using a reconstructed matrix composed of native collagen type I fibrils. In absence of contacts with extracellular collagen type I, intermediate- and high-invasive, but not low invasive melanoma cells, displayed not only increased intracellular cathepsin B levels but also extracellular protein release. Upon contact of the cells to native collagen fibrils, we observed increased extracellular localization of mature cathepsin B. The increased extracellular localization was mediated by  $\beta 1$  integrin subunit as shown by inhibition experiments with inhibitory anti- $\beta 1$  integrin antibodies.

In addition, inhibition of MMPs and serine proteases in these three-dimensional culture systems, resulted in the inhibition of both, procathepsin B secretion / processing and lysosomal exocytosis. These results indicate that both MMPs and serine proteases are required for cell-collagen interaction leading to regulation of cathepsin B localization.

Cell-collagen interactions also regulated the synthesis of the endogenous inhibitors cystatin B and C in all cell lines analyzed, independently of their invasive potential. However, an imbalance of the cathepsin / inhibitor ratio was observed only in high-invasive melanoma cells thus resulting in an imbalance that can lead to intra- and

extracellular increase in protease activity. By LDS-zymography, detecting enzymatic activity of cathepsins, we could demonstrate that high-invasive melanoma cells, besides to active cathepsin B, also secrete active cathepsin L. The presence of both active cathepsins further contributes to the imbalance between cathepsins and endogenous inhibitors.

The results gained on the molecular mechanisms involved in tumor cell-ECM mediated regulation of cathepsin B synthesis, secretion and activity, highlight the role of lysosomal cysteine proteases in tumor cell invasion and outline new aspects for the development of melanoma therapies.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien stammten, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Amersham Biosciences (Braunschweig), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Merck Biosciences Ltd. (Schwalbach / Ts.), peQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) und SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH (Taufkirchen).

#### 6.1.2 Gewebe

Paraffinmaterial humaner maligner Melanome, Metastasen und Pigmentnävi stammten aus der Abteilung für Dermatologie der Universitätsklinik zu Köln und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. C. Mauch zur Verfügung gestellt.

#### 6.1.3 Zellkulturmaterialien

Die allgemeinen Zellkulturmaterialien wurden von der Firma Greiner (Solingen) bezogen. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) stammte von der Firma Gibco BRL (Invitrogen, Karlsruhe), RPMI 1640 Medium und fötales Kälberserum von der Firma PAA Laboratories GmbH (Paschig, Österreich). Die Zusätze L-Glutamin und Penicillin / Streptomycin, sowie die nicht essentiellen Aminosäuren wurden bei der Firma Biochrom AG (Berlin) eingekauft.

#### 6.1.4 Kits und weitere Materialien

BCA Protein Assay	Pierce, Rockford, IL, USA
DAKO® Faramount Aqueous Mounting Medium	DAKO, Hamburg
Immu-Mount	Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA
Tissue-Tek® O.C.T.™	Sakura, Zoeterwoude, The Netherlands
peqGOLD 100bp DNA-Leiter	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
0,16-1,77 kb RNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD Protein-Marker	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD TriFast™	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Nylonmembran	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Ladderman™ Labeling Kit	TaKaRa Europe S.A., Gennevilliers, France
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences, Braunschweig
E.Z.N.A. Cycle Pure	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ECL™ Western Blotting	
Detection Reagents	Amersham Biosciences, Braunschweig
Hybond-C Extra™	Amersham Biosciences, Braunschweig
ULTRAhyb™	Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK
Protease Inhibitor Cocktail	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen

### 6.1.5 Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, in bidestilliertem Wasser angesetzt und, wenn möglich, autoklaviert.

100x Denhards	2% (v/v) Ficoll, 2% (x/v) Polyvinylpyrrolidon, 2% (w/v) BSA
10x DNA-Probenpuffer	67% (w/v) Saccharose, 0,42% (w/v) Bromphenolblau
10x SDS-Laufpuffer	250mM Tris, 2,5M Glycin, 1% (w/v) SDS; pH 8,3
18S Hybridisierungspuffer	5x Denhards, 0,5% (w/v) SDS, 35% (v/v) Formamid, 6x SSC
20x SSC	3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat; pH 7,0
Laemmli-Probenpuffer	50mM Tris, 100mM DTT, 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) Glycerol; pH 6,8
Anodenpuffer 1 (Western Blot)	0,3M Tris, 20% (v/v) MeOH; pH 10,4
Anodenpuffer 2 (Western Blot)	25mM Tris, 20% (v/v) MeOH; pH 10,4
Coomassie R-250 Färbelösung	0,25% (w/v) Coomassie Blue R-250, 10% (v/v) MeOH, 7% (v/v) Essigsäure
Coomassie R-250 Färbelösung (für LDS-Zymogramme)	0,25% (w/v) Coomassie Blue R-250, 45% (v/v) MeOH, 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie G-250 Färbelösung (für <i>in situ</i> Zymogramme)	0,1% (w/v) Coomassie Blue R-250, 45% (v/v) MeOH, 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung (für SDS-Gele)	50% (v/v) MeOH, 7% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung (für LDS-Zymogramme)	10% (v/v) MeOH, 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung (für <i>in situ</i> Zymogramme)	20% (v/v) MeOH, 10% (v/v) Essigsäure

Kathodenpuffer (Western Blot)	40mM 6-Aminohexansäure, 20% (v/v) MeOH; pH 7,6
PBS	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,4mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,4mM KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4
TAE	40mM Tris, 2mM EDTA; pH 8,0
TBS	20mM Tris, 137mM NaCl; pH 7,6
TBS-T	20mM Tris, 137mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20; pH 7,6
Trypsin / EDTA	0,1% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA
LDS-Gelpuffer	0,6M BisTris, 0,6M HOAc; pH 5,67
LDS-Probenpuffer	25mM BisTris, 25mM HOAc, 2% (w/v) LDS, 15% (v/v) Glycerol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,05% (w/v) Phenolrot, +/- 5mM Cystein und 2,5mM EDTA
Kathodenpuffer (LDS-PAGE)	0,14M MES, 56mM BisTris, 0,1% (w/v) LDS; pH 5,8
Anodenpuffer (LDS-PAGE)	0,1M MES, 0,1M BisTris

### 6.1.6 Antikörper

Tabelle 6.1: Auflistung aller verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Klon	Quelle
anti-human Cathepsin B CB 59	Maus	4B11	Dr. E. Weber, Institut für Physiologische Chemie, Martin Luther Universität, Halle-Wittenberg
anti-human Cathepsin B Ab 7430	Maus	3E1	Abcam, Cambridgeshire, UK
anti-human Cathepsin L	Maus	CLP 1/36	Mo Bi Tec, Göttingen
anti-human Cystatin A	Maus	WR 23/2/3/3	Dr. E. Weber, Institut für Physiologische Chemie, Martin Luther Universität, Halle-Wittenberg
anti-human Cystatin B	Maus	RJMW 2E7	Dr. E. Weber, Institut für Physiologische Chemie, Martin Luther Universität, Halle-Wittenberg
anti-human Cystatin C	Ziege	P-14	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-human Aktin	Kaninchen	C11	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen
anti-human HMB45	Maus	HMB45	DAKO, Hamburg
anti-Rind S-100	Kaninchen		DAKO, Hamburg
anti-human $\beta$ 1-Integrin	Maus	4B4	Coulter Corp., Hialeah, FL, USA

anti-human $\beta$ 1-Integrin	Ratte	mAb13	BD Pharmingen™, Heidelberg
anti-human $\alpha$ 2-Integrin	Maus	P1E6	Chemicon International, Hofheim
anti-human $\alpha$ 2-Integrin	Maus	6F1	Prof. Dr. B. Coller, Rockefeller University, New York, USA
anti-human $\alpha$ 2-Integrin	Maus	12F1	Prof. Dr. V. L. Woods Jr., University of California, San Diego, USA
anti-human $\alpha$ 2-Integrin	Kaninchen		Chemicon International, Hofheim
anti-human $\alpha$ 11-Integrin	Kaninchen		Prof. Dr. D. Gullberg, Uppsala University, Uppsala, Schweden
anti-human Kollagen IV	Maus	Col-94	BioGenex, San Ramon, CA, USA
anti-human Laminin 5 $\alpha$ 3	Maus	BM165	Dr. M. Aumailley, ZMMK, Universität zu Köln
anti-human pan-Cadherin pep-1	Kaninchen		Dr. C. Niessen, ZMMK, Universität zu Köln; Choi et al., 1990
HRP-konjugiert anti-Maus	Kaninchen		DAKO, Hamburg
HRP-konjugiert anti-Kaninchen	Schwein		DAKO, Hamburg
HRP-konjugiert anti-Ziege	Kaninchen		DAKO, Hamburg
DAKO-Cytomation EnVision System-AP Anti-Kaninchen / Maus	Ziege		DAKO, Hamburg

### 6.1.7 Proteine und Enzyme

Cathepsin B, human, Leber	Merck Biosciences Ltd., Schwalbach / Ts.
Cathepsin L, human, Leber	Merck Biosciences Ltd., Schwalbach / Ts.
Cystatin C, human, Urin	Merck Biosciences Ltd., Schwalbach / Ts.
Kollagen Typ I, fötale Kalbshaut	IBFB, Leipzig
Kollagenase Typ I	CellSystems® Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen
SuperScript™II RNase H-Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Taq-DNA-Polymerase	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
RAD, Cyclo (Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val)	Bachem, Weil am Rhein
RGD, Cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)	Bachem, Weil am Rhein

### 6.1.8 Oligonucleotide

Folgende Oligonucleotide wurden von der Firma Thermo Electron Corporation (Ulm) synthetisiert.

Table 6.2: Zusammenfassung der verwendeten Primer bzw. Oligonucleotide

	Primer forward / reverse	NCBI Zugangsnummer	Produkt
<b>Cathepsin B</b>	5'-CTGGTCAACTATGTCAACAAACGG-3' 5'-GAAGTCCGAATACACAGAGAAAGC-3'	NM_001908	690bp
<b>Cystatin A</b>	5'-GAAATCCAGGAGATTGTTGATAAGG-3' 5'-CATGACTCAGTAGCCAGTTGAAGG-3'	NM_005213	305bp
<b>Cystatin B</b>	5'-ACCCAGCGCCTACTTGG-3' 5'-GGAAGAGAAATGCAAAAGCAGC-3'	NM_000100	537bp
<b>Cystatin C</b>	5'-AGCCAGCAACGACATGTACC-3' 5'-GCTACTATTTTATTGCAGGAGGTGG-3'	BC013083	509bp
<b>GAPDH</b>	5'-TCATGACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-GCCAAATTCGTTGTCATACCAGGAAATGA-3'	BC023632	486bp
<b>18S rRNA</b>	5'-ACGGTATCTGATCGTCTTCAACC-3'	Carlson et al., 1993	

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 6.2.1.1 Zellkulturen

Humane dermale Fibroblasten konnten nach Auspflanzen von ca. 2cm<sup>2</sup> großen Normalhaut-Biopsien isoliert und vermehrt werden. Keratinozyten (HaCaT) wurden freundlicherweise von Prof. N. Fusenig (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Alle Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), welches mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 2mM Glutamin, 0,01% (w/v) L-Ascorbinsäure und jeweils 100 U/ml Streptomycin und Penicillin angereichert war, als Monolayer Kulturen in Plastikpetrischalen kultiviert. Jurkat (ATCC Nr. TIB-152) Zellen wuchsen als Suspensionskultur in RPMI 1640 Medium, das mit den gleichen Zusätzen wie oben beschrieben, versetzt war. Das Passagieren der Fibroblasten, HaCaT und Jurkat Zellen wurden nach einem Verhältnis von 1:2 durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mittels Trypsinisierung bei 37°C in einer 0,1% (w/v) Trypsin / 0,02% (w/v) EDTA Lösung abgelöst und in einer Verdünnung von 1:2 ausgesät.

Vier humane Melanomzelllinien wurden in den nachfolgenden Experimenten untersucht: die hoch-invasive Zelllinie MV3 (van Muijen et al., 1991) und die intermediär bzw. niedrig-invasiven Zelllinien SKmel28 (Carey et al., 1976; Luca et al., 1995), SKmel23 (Carey et al., 1976; Herlyn et al., 1985) und WM164 (Herlyn et al., 1990). Die Zelllinien MV3 und WM164 stammen ursprünglich aus Metastasen humaner Melanome, wohingegen die Zelllinien SKmel28 und SKmel23 aus Primärtumoren isoliert wurden. Alle Melanomzelllinien wurden in RPMI 1640 Medium, angereichert mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 2mM Glutamin, jeweils 100mM aller nicht essentiellen Aminosäuren und jeweils 100 U/ml Streptomycin und Penicillin, als Monolayer Kulturen in Plastikpetrischalen kultiviert. Das Passagieren der Zellen wurde, wie bereits oben beschrieben, durch Trypsinisierung durchgeführt.

Alle oben aufgeführten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer H<sub>2</sub>O gesättigten Atmosphäre kultiviert. Die Zellviabilität wurde durch die Trypan Blau Ausschluss Methode bestimmt, bei der eine 0,2% (w/v) Trypan Blau Lösung verwendet wurde (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen).

#### **6.2.1.2 Kultivierung von Zellen auf einer Kollagenbeschichtung und in dreidimensionalen Kollagengelen**

Für eine Beschichtung mit monomerem, nicht fibrillärem Kollagen Typ I (1D) wurden Kulturschalen mit einer 100µg/ml Kollagenlösung in 0,1% (v/v) Essigsäure durch Inkubation bei 4°C über Nacht präpariert. Mit fibrillärem Kollagen Typ I beschichtete Kulturschalen (2D) und 3D Kollagengele wurden, wie bereits zu einem früheren Zeitpunkt von Mauch et al. (1988) beschrieben, angefertigt. Hierzu wurde in Essigsäure gelöstes Kollagen Typ I und 10x RPMI 1640 Medium in einem Verhältnis von 1:10 vermischt und mittels Zugabe von 0,1N NaOH neutralisiert, was die Formation von Kollagenfibrillen ermöglichte (Endkonzentration des Kollagens, 1mg/ml). Zellen wurden entweder auf 1D- oder 2D-beschichtete Kulturschalen ( $3,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) oder in 3D Kollagengelen eingesät ( $3,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>3</sup>). Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurden die beschichteten Kulturschalen und die Kollagengele dreimal gründlich mit PBS gewaschen und mit serumfreien Medium für weitere 24 Stunden inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die auf unbeschichteten (Monolayer) Plastikpetrischalen unter denselben Kulturbedingungen kultiviert wurden.

Für Inhibitionsstudien in 3D Kollagengelen wurden den Kollagen-Zell Suspensionen, vor der Polymerisation des Kollagens, Proteaseinhibitoren zugegeben. Folgende Inhibitoren wurden in den aufgeführten Endkonzentrationen eingesetzt: E-64 (10µM, Serva, Heidelberg), CA-074 (10µM, Merck Biosciences Ltd., Schwalbach / Ts.), 1,10-Phenanthrolin (5mM, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen), Pefabloc® SC

(0,1mM und 0,25mM, Serva, Heidelberg) und Pepstatin A (1-20 $\mu$ M, Serva, Heidelberg). Kontrollexperimente wurden mittels Zugabe von Methanol, dem Lösungsmittel von Pepstatin A (0,68% (v/v)) und 1,10-Phenanthrolin (0,5% (v/v)), durchgeführt. Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurden die Kollagengele dreimal gründlich mit PBS gewaschen und für weitere 24 Stunden in serumfreien Medium und erneut zugegebenen Inhibitoren inkubiert.

Für Blockierungsexperimente wurden die Zellen von konfluenten Monolayer Kulturen trypsinisiert, zentrifugiert (5min, 272 x g) und in komplettem Medium aufgenommen. Vor der Inkorporation in 3D Kollagengele wurden die Zellen in Gegenwart von Integrin Antikörpern (4,5 $\mu$ g / 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen) bzw. zyklischen RGD- oder RAD-Peptiden (100 $\mu$ M / 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen) für 30min bei 37°C präinkubiert. Isotyp IgG Kontrollexperimente wurden mit 4,5 $\mu$ g / 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen gereinigtem IgG1 (Chemicon International, Hofheim) bzw. IgG2ak (BD Pharmingen™, Heidelberg) angesetzt.

### **6.2.2 Invasion von Melanomzelllinien in deepidermisierte humane Haut**

Das *in vitro* Modell zur Beobachtung des Invasionsverhaltens von Melanomzelllinien in humaner deepidermisierte Haut, beschrieben von Denhoyer et al. (2003), wurde, wie im Folgenden dargestellt, modifiziert. Die verwendete humane Normalhaut stammte, nach Patienteneinwilligung, aus Reduktionsoperationen der Brust bzw. des Abdomens. Die Haut wurde von umliegendem Fettgewebe befreit und vitale Zellen durch drei Zyklen Einfrieren in flüssigem N<sub>2</sub> / Auftauen bei 37°C, lysiert. Hautstanzen ( $\varnothing$  1cm) wurden entnommen und bei 56°C in PBS für 10min inkubiert, um die Epidermis abzulösen. Diese Hautstücke wurden auf Metallnetze aus rostfreiem Stahl als Träger platziert, die eine Inkubation der Hautgewebe an der Luft-Medium Grenze ermöglichten. Dabei wurden die Gewebe so orientiert, dass die Zellen auf der dermalen Seite eingesät werden konnten, um das Invasionsverhalten in die Dermis zu analysieren. In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen direkt auf die Basalmembran eingesät und somit die Fähigkeit der Zellen die Basalmembran zu durchbrechen getestet. Pro Hautstanze wurden jeweils 1 x 10<sup>5</sup> Zellen in 5 $\mu$ l Medium aufgesetzt und über 14 bzw. 21 Tage inkubiert, wobei alle 48 Stunden ein Mediumwechsel erfolgte. Darauf folgend wurden die Hautkomposite jeweils in zwei Hälften geteilt; eine Hälfte wurde in Tissue-Tek® O.C.T.™ eingebettet und in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren, die andere Hälfte, in Formalin (3,7% (v/v) Formaldehyd, 0,1% (v/v) Glutardialdehyd, 0.1mM CaCl<sub>2</sub> in PBS) fixiert und in Paraffin eingebettet.

Für Inhibitionsstudien wurden die Hautkomposite in Gegenwart spezifischer Proteaseinhibitoren inkubiert, die dem Medium alle 48 Stunden frisch zugefügt wurden.

Dabei wurde sowohl der Cysteinproteaseninhibitor E-64 als auch der spezifische Cathepsin B Inhibitor CA-074 jeweils in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt.

### **6.2.3 Immunohistochemische Methoden**

Immunohistochemische Untersuchungen wurden an 6-8µm starken Kryo- und Paraffinschnitten humaner maligner Melanome, Metastasen, Pigmentnävi und der Hautkomposite, die aus den Invasionsversuchen resultierten, durchgeführt. Paraffinmaterial wurde dazu durch Inkubation in Xylol zunächst entwachst, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und zusätzlich demaskiert. Die Demaskierung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben der verwendeten Primäantikörper. Kryoschnitte wurden in eiskaltem Aceton fixiert und in TBS rehydriert. Unspezifische Bindungsstellen wurden in TBS mit 10% (v/v) Ziegennormalserum (DAKO, Hamburg) geblockt. Die Inkubation des Primäantikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C in TBS mit 1% (v/v) Ziegennormalserum. Folgende Primäantikörper wurden in der jeweils angegebenen Endkonzentration verwendet (s. auch Kap. 6.1.6): Maus anti-Cathepsin B Ab 7430-3E1 (2µg/ml), Maus anti-Kollagen IV Col-94 (gebrauchsfertige Lösung), Maus anti-Laminin 5 α3 BM165 (Tunggal et al., 2002), Maus anti-HMB45 (gebrauchsfertige Lösung) und Kaninchen anti-S-100 (gebrauchsfertige Lösung). Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5min in TBS gewaschen, und die zu untersuchenden Proteine mittels DAKO-Envision, nach Herstellerangaben, detektiert. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Gegenfärbungen der Zellkerne bzw. des Zytoplasmas wurden mit Hämatoxilin / Eosin (H&E) angefertigt. Nach dem Eindecken der Schnitte mit DAKO® Faramount Aqueous Mounting Medium, wurden Fotos der Färbungen mit einer Nikon Digital Kamera OXM1200F am Lichtmikroskop (Nikon Eclipse E800) und unter zu Hilfenahme der Lucia Image Processing Software vorgenommen werden.

### **6.2.4 Molekularbiologische Methoden**

Alle nicht aufgeführten Methoden wurden nach Herstellerangaben oder nach Standardprotokollen (Sambrook, Fritsch und Maniatis, 1989) durchgeführt.

#### **6.2.4.1 RNA Isolation**

Die gesamte RNA aus HaCaT Zellen, Jurkat Zellen oder aus den verwendeten Melanomzelllinien, zuvor kultiviert als Monolayer, 1D-, 2D-Kulturen oder innerhalb von 3D-Kollagengelen, wurde mittels peqGOLD TriFast™ nach Herstellerangaben isoliert

(peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen). 2D- und 3D-Kollagengele wurden vor der RNA Extraktion mechanisch durch 10 x Aufziehen der Proben durch 20G Kanülen zerkleinert. Die Konzentration an isolierter RNA wurde durch photometrische Messungen der optischen Dichte bei 260nm bestimmt ( $OD_{260} \times 40 = \mu\text{g/ml RNA}$ ). Die Reinheit und Integrität der RNA wurde mittels Formaldehyd Agarosegelelektrophorese (s. Kap. 6.2.4.4) kontrolliert.

#### **6.2.4.2 Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)**

RT-PCR wurde nach Herstellerangaben der reversen Transkriptase (SuperScript™II RNase H-Reverse Transcriptase, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) durchgeführt. 2µg der isolierten RNA wurden unter der Verwendung von oligo d/T Primern (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in einem Gesamtvolumen von 20µl revers transkribiert. Danach wurden 2µl der generierten cDNA unter zu Hilfenahme spezifischer Primer für Cathepsin B, Cystatin A, B, C und GAPDH (s. Kap. 6.1.8), für die PCR Amplifikation eingesetzt. Die Amplifikation von GAPDH cDNA wurde als Positivkontrolle jeder PCR Reaktion durchgeführt, wohingegen Negativkontrollen für jedes Primerpaar durch den Ausschluss der entsprechenden cDNA angesetzt wurden. Die spezifische Amplifikation der cDNA Fragmente wurde mit 30 Zyklen der Denaturierung (94°C, 30sec), Annealing (54°C, Cathepsin B; 58°C, Cystatin A und GAPDH; 59°C, Cystatin B; 62°C, Cystatin C; 30sec) und Extension (72°C, 40sec, Cathepsin B; 20sec, Cystatin A; 30sec, Cystatin B, C und GAPDH) erreicht. Die Größe der PCR Produkte wurden auf 1,2% (w/v) Agarosegelen in TAE mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid kontrolliert. Anschließend wurden die cDNA Fragmente mittels E.Z.N.A. Cycle-Pure (peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und durch Sequenzierung überprüft. Charakterisierte Amplifikationsprodukte für Cathepsin B und L, Cystatin A, B und C wurden als cDNA Sonden in Northern Blot Analysen verwendet (s. Kap. 6.2.4.4).

#### **6.2.4.3 Radioaktive DNA Markierung**

Die radioaktive Markierung der cDNA Sonden wurde mit Hilfe des Ladderman™ Labeling Kits (TaKaRa Europe S.A., Gennevilliers, France), das auf dem von Feinberg und Vogelstein (1983) vorgestellten Prinzip des *Random Priming* basiert, nach Herstellerangaben durchgeführt. 20ng der cDNA wurden in Gegenwart von 1,85 MBq [ $\alpha$  <sup>32</sup>P]-dCTP (spezifische Aktivität >111 TBq/mmol) markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch eine Ethanol-fällung entfernt. Nach der Fällung bei -20°C für 30min und Zentrifugation (15min, 13000 x g) wurde die markierte cDNA in

bidestilliertem Wasser resuspendiert und der radioaktive Einbau in einem  $\beta$ -Zerfallszähler (Beckman, München) bestimmt.

Das 18S Oligonukleotid (1pmol) wurde mit rekombinanter Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT; Gibco BRL, Eggenstein) markiert.

#### 6.2.4.4 Northern Blot Analyse

5 bis 10 $\mu$ g isolierte RNA wurden in 0,02M MOPS, 6M Formaldehyd, 50% (v/v) Formamid, 50 $\mu$ g/ml Ethidiumbromid, 5% (v/v) Glycerol, 0,1M EDTA, 0,04% (w/v) Bromphenolblau, 0,04% (w/v) Xylencyanol bei 68°C für 10min denaturiert (Sudbeck *et al.* 1994). Die denaturierten RNA-Proben wurden mittels Formaldehyd Agarosegelelektrophorese (1% (w/v) Agarose in MOPS Laufpuffer (0,02M MOPS, 5mM NaOAc, 0,1mM EDTA) und 1M Formaldehyd) aufgetrennt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel in 2x SSC getränkt und die RNA für 16 Stunden mittels 20x SSC auf positiv geladene Nylonmembranen (peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) transferiert. Anschließend wurden die Membranen zur Fixierung der RNA in einem UV-Crosslinker (Stratagene, Heidelberg) bestrahlt und zur Kontrolle des Transfers mit Methylenblau-Lösung (0,04% (w/v) Methylenblau, 0,5M NaOAc) gefärbt. Durch Prähybridisierung (1h, 42°C) in ULTRAhyb™ (Ambion) bzw. 18S-Hybridisierungslösung (für 18S rRNA) wurden alle unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Für die Hybridisierung wurden die denaturierten (95°C, 5min), <sup>32</sup>P-markierten cDNA Sonden (s. Kap. 6.2.4.3) zu der ULTRAhyb™ Lösung dazugegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert. Hybridisierungen mit 18S rRNA, welche zur Standardisierung eingesetzt wurde, erfolgten in 18S-Hybridisierungslösung über Nacht bei 45°C.

Hybridisierte Membranen wurden einmal in 2x SSC, 0,1% (w/v) SDS für 15min und anschließend in 0,1x SSC, 0,1% (w/v) SDS bei 42°C bzw. 45°C für 15min gewaschen. Erfolgreiche Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurde auf Hyperfilm™ ECL Röntgenfilmen (Amersham Biosciences, Braunschweig) bei -80°C abgelichtet. Die Intensitäten der Banden, die den analysierten Transkripten entsprachen, wurden durch densitometrische Analysen quantifiziert und hinsichtlich der Intensitäten der 18S rRNA Signale normalisiert. Für die densitometrische Auswertung wurde das Programm *ImageJ 1.33* verwendet.

## 6.2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 6.2.5.1 Präparation der Zellüberstände, Zellysate und Plasmamembranen

Die serumfreien Überstände der Monolayer, 1D-, 2D- und 3D-Kulturen wurden durch Zentrifugation (5min, 272 x g) von Zelltrümmern und gelösten Zellen befreit. Nach gleicher Zellzahl normalisierte Mengen der Überstände wurden mit Trichloressigsäure (10% (w/v) Endkonzentration) / Triton X 100 (0,1% (v/v) Endkonzentration) präzipitiert, und die resultierenden Proteinpellets in Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Für bestimmte Fragestellungen wurden die Zellüberstände im Vakuum (SpeedVac®, Savant, Farmingdale, NY, USA) mit Hilfe einer Kühlfalle (Refrigerated Condensation Trap RT400, Savant, Farmingdale, NY, USA) konzentriert. Unbehandelte bzw. im Vakuum konzentrierte Überstände wurden für zymographische Analysen eingesetzt (s. 6.2.5.3). Die Zellzahl wurden nach Trypsinisierung (Monolayer Kulturen) oder nach Degradation des Kollagens, durch Inkubation bei 37°C für 10min mit 400 units/ml Kollagenase Typ I (1D, 2D, 3D), bestimmt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS (10min, 420 x g) wurden die Zellen in PBS, welches mit einem Protease Inhibitoren Mix (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen) angereichert war (1mM EDTA, 2mM AEBSF, 130µM Bestatin, 14µM E-64, 1µM Leupeptin, 0,3µM Aprotinin; Endkonzentrationen) resuspendiert. Die absolute Anzahl an lebenden Zellen wurde mittels der Trypan Blue Ausschluss Methode bestimmt (s. Kap. 6.2.1.1).

Zellysate wurden nach Sonifizierung der Zellen auf Eis (3 x 10sec, Zyklus 0,5; 60% Amplitude [126µm, 276W/cm<sup>2</sup>] und anschließender Zentrifugation (5min, 1660 x g) erhalten.

Die Membranpräparation erfolgte nach einer bereits beschriebenen Methode (Zigrino et al., 2001).

### 6.2.5.2 SDS-PAGE und Western / Immunoblot Analyse

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte auf 7,5% (w/v) bzw. 15% (w/v) SDS-Polyacrylamidgelen. Auf Zellzahl normalisierte Zellysate, Plasmamembranen und präzipitierte Zellüberstände wurden in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und vor dem Beladen der Gele 5min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine in einer semy-dry Blotting Kammer nach Herstellerangaben (peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) auf Hybond-C Extra™ Membranen (Amersham Biosciences, Braunschweig) transferiert. Zur Kontrolle des Transfers wurden die Proteine auf den Membranen anschließend mit Ponceau red™ (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen) gefärbt. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T für 30min

wurden die Membranen mit den spezifischen Primärantikörpern (s. auch 6.1.6) für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Alle Antikörper wurden mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T verdünnt. Die entsprechenden Endkonzentrationen betragen: Maus anti-Cathepsin B CB 59-4B11 (2µg/ml), Maus anti-Cathepsin L CLP 1/36 (200ng/ml), Maus anti-Cystatin A WR 23/2/3/3 (200ng/ml), Maus anti-Cystatin B RJMW 2E7 (100ng/ml), Ziege anti-Cystatin C P-14 (4µg/ml), Kaninchen anti-Aktin C11 (6µg/ml), Kaninchen anti-α2 (1:200), Kaninchen anti-α11 (1:1000) und Kaninchen anti-pan-Cadherin pep-1 (1:1000). Anschließend wurden die Membranen 3 x 5min in TBS-T gewaschen und gebundener Primärantikörper mittels entsprechenden, in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T verdünnten, HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (Kaninchen anti-Maus IgG (650ng/ml), Schwein anti-Kaninchen IgG (140ng/ml) und Kaninchen anti-Ziege IgG (250ng/ml); Endkonzentrationen angegeben), detektiert. Gebundene Antikörper wurden durch Chemilumineszenzverstärkung nach Herstellerangaben (ECL™ Western Blotting Detection Reagents; Amersham Biosciences, Braunschweig) sichtbar und auf Hyperfilm™ ECL Röntgenfilmen (Amersham Biosciences, Braunschweig) abgeleuchtet.

### **6.2.5.3 Lithium Dodecylphosphat (LDS)-PAGE und -Zymographie**

Um Proteine unter sauren Umgebungsbedingungen elektrophoretisch aufzutrennen, wurde die Methode der LDS-PAGE angewendet. Die Variante der LDS-Zymographie diente dazu, die gelatinolytische Aktivität von Cysteinproteasen in Zellkulturüberständen (s. 6.2.5.1) zu untersuchen. Die verwendeten Trenngele enthielten 10,7% (w/v) Acrylamid, 0,3% (w/v) Bisacrylamid, 10% (v/v) Glycerol, 0,1% (w/v) Gelatine (Rind, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen), 0,3M BisTris und 0,3M HOAc, pH 5,67. Sammelgele wurden aus 3,9% (w/v) Acrylamid, 0,1% (w/v) Bisacrylamid, 2% (v/v) Glycerol, 0,3M BisTris und 0,3M HOAc, pH 5,67, hergestellt. Die Polymerisationsreaktion der Acrylamidkomponenten wurde durch Zugabe von Riboflavin (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen), TEMED und mittels 30min UV Einwirkung induziert. Überstände aus Zellkulturen in 3D Kollagengelen wurden vor der Elektrophorese in LDS-Probenpuffer aufgenommen. Aus humaner Leber gereinigtes Cathepsin B bzw. Cathepsin L (Merck Biosciences Ltd., Schwalbach / Ts.) dienten jeweils als Positivkontrollen. LDS-PAGE und -Zymographie wurden bei 120V und Wasserkühlung, unter Verwendung der entsprechenden Kathoden- und Anodenpuffer durchgeführt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die LDS-Gele, die keine Gelatine enthielten, für Immunoblot Analysen eingesetzt (s. Kap. 6.2.5.2), wohingegen die LDS-Zymogramme in 2,5% (v/v) Triton X-100, 50mM NaOAc, 100mM NaCl, pH 5,5 + 10mM Cystein (Serva, Heidelberg) für 20min inkubiert wurden, um das LDS auszuwaschen. In einem zweiten Waschschrift wurde dann das Detergenz

entfernt, bevor das Zymogramm in Substratpuffer (50mM NaOAc, 100mM NaCl, pH 5,5 + 10mM Cystein und 5mM EDTA) über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zymogramme mit Coomassie Blue R-250 gefärbt und in Entfärbelösung entfärbt, um gelatinolytische Aktivität erkennbar zu machen.

Für Inhibitionsstudien wurden entweder 10µM E-64 oder 10µM CA-074 vor der Elektrophorese den zu untersuchenden Proben beigelegt, oder alternativ, wie im Fall von Pepstatin A (100µM), Pefabloc®SC (1mM) und Z-FY-CHO (5µM, Merck Biosciences Ltd., Schwalbach / Ts.), dem Substratpuffer zugefügt (angegeben sind die Endkonzentrationen der jeweiligen Inhibitoren).

Tabelle 6.3: Überblick der Gelkomponenten der LDS-PAGE bzw. –Zymographie

	<b>Trenngel, 15ml PAGE, 11%</b>	<b>Trenngel, 15ml Zymographie, 11%</b>	<b>Sammelgel, 10ml 4%</b>
<b>50% AA, T:50, C: 3</b>	3,3ml	3,3ml	0,8ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,7ml	2,25ml	4ml
<b>LDS-Gelpuffer</b>	7,5ml	7,5ml	5ml
<b>Glycerol</b>	1,5ml	1,5ml	0,2ml
<b>3% (w/v) Gelatine</b>	-	0,45ml	-
<b>TEMED</b>	15µl	15µl	10µl
<b>1% (w/v) Riboflavin</b>	6µl	6µl	10µl

#### 6.2.5.4 *In situ* Zymographie

Die *in situ* Zymographien wurde, mit einigen Modifikationen, nach der von Kurschat et al. (2002) beschriebenen Methode durchgeführt.

Hierzu wurden 70µm starke, 12,5%ige (w/v) Polyacrylamidgele, mit einer Endkonzentration von 1,7% (w/v) Gelatine, auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger (Menzel, Braunschweig) polymerisiert. Um überschüssige Acrylamidmonomere und Katalysatoren zu entfernen, wurden die Objektträger mit den Gelen in bidestilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Gele in Abhängigkeit davon, welche Familie von Proteasen auf ihre gelatinolytische Aktivität hin untersucht wurde, in spezifischen Substratpuffern äquilibriert. Zur Detektion der Aktivität der MMPs wurden die Gele im neutralen pH-Bereich (50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,4) oder zum Nachweis der lysosomalen Cysteinproteasen im sauren pH-Bereich (50mM NaOAc, 100mM NaCl, pH 5,5 + 5mM Cystein und 5mM EDTA) gepuffert. Für die Inhibition der MMPs bzw. Cysteinproteasen wurden in Inhibitionsstudien den Substratpuffern entsprechend 10mM EDTA oder 100µM E-64 (Endkonzentrationen) zugefügt.

Konsequente Kryoschnitte (8µm) der Hautkomposite (s. Kap. 6.2.2) wurden auf die Polyacrylamidgele platziert und für 14 Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne innerhalb der Hautkomposite mit Methyleneblau (0,125% (w/v) Methyleneblau in PBS) sichtbar gemacht. Zusätzliche Kryoschnitte (8µm) wurden mit H&E (s. Kap. 6.2.3) gefärbt. Nach einer genauen Fotodokumentation der Färbungen mit einer Nikon Digital Kamera OXM1200F am Lichtmikroskop Nikon Eclipse E800 (Lucia Image Processing Software) wurden die Schnitte vorsichtig mechanisch entfernt und die Polyacrylamidgele mit Coomassie G-250 gefärbt. Die gelatinolytische Aktivität wurde nach Entfärben der Gele in Entfärbelösung sichtbar gemacht. Die *in situ* Zymogramme wurden an exakt den gleichen Positionen, wie zuvor die entsprechenden Methyleneblau- und H&E-Färbungen, fotografiert (s. o.).

## 7 Literatur

- Abrahamson, M., A.J. Barrett, G. Salvesen, and A. Grubb. 1986. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem.* 261:11282-9.
- Ahram, M., M. Sameni, R.G. Qiu, B. Linebaugh, D. Kirn, and B.F. Sloane. 2000. Rac1-induced endocytosis is associated with intracellular proteolysis during migration through a three-dimensional matrix. *Exp Cell Res.* 260:292-303.
- Allen, J., K. Schomberg, and F. Wojnarowska. 1997. Physicochemical characterization and differentiation of the components of the cutaneous basement membrane zone. *Br J Dermatol.* 137:907-15.
- Andreasen, P.A., R. Egelund, and H.H. Petersen. 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci.* 57:25-40.
- Andrews, N.W. 2000. Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol.* 10:316-21.
- Annabi, B., M. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras, and R. Beliveau. 2001. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J.* 353:547-53.
- Aznavoorian, S., A.N. Murphy, W.G. Stetler-Stevenson, and L.A. Liotta. 1993. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer.* 71:1368-83.
- Bachter, D., C. Michl, H. Buchels, H. Vogt, and B.R. Balda. 2001. The predictive value of the sentinel lymph node in malignant melanomas. *Recent Results Cancer Res.* 158:129-36.
- Baker, K.C., M.A. Taylor, N.J. Cummings, M.A. Tunon, K.A. Worboys, and I.F. Connerton. 1996. Autocatalytic processing of pro-papaya proteinase IV is prevented by crowding of the active-site cleft. *Protein Eng.* 9:525-9.
- Baramova, E.N., K. Bajou, A. Remacle, C. L'Hoir, H.W. Krell, U.H. Weidle, A. Noel, and J.M. Foidart. 1997. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett.* 405:157-62.
- Barrett, A.J. 1986. The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed Biochim Acta.* 45:1363-74.
- Barrett, A.J., and N.D. Rawlings. 2001. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol Chem.* 382:727-33.
- Bechetoille, N., M. Haftek, M.J. Staquet, A.J. Cochran, D. Schmitt, and O. Berthier-Vergnes. 2000. Penetration of human metastatic melanoma cells through an authentic dermal-epidermal junction is associated with dissolution of native collagen types IV and VII. *Melanoma Res.* 10:427-34.
- Berking, C., R. Takemoto, K. Satyamoorthy, R. Elenitsas, and M. Herlyn. 2001. Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin. *Am J Pathol.* 158:943-53.
- Bevec, T., V. Stoka, G. Pungercic, I. Dolenc, and V. Turk. 1996. Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J Exp Med.* 183:1331-8.

- Borradori, L., M. Rybojad, O. Verola, B. Flageul, A. Puissant, and P. Morel. 1990. Pemphigoid nodularis. *Arch Dermatol.* 126:1522-3.
- Brix, K., M. Linke, C. Tepel, and V. Herzog. 2001. Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid. *Biol Chem.* 382:717-25.
- Bromme, D., Z. Li, M. Barnes, and E. Mehler. 1999. Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. *Biochemistry.* 38:2377-85.
- Bromme, D., F.S. Nallaseth, and B. Turk. 2004. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods.* 32:199-206.
- Bromme, D., K. Okamoto, B.B. Wang, and S. Biroc. 1996. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* 271:2126-32.
- Brooks, P.C., S. Stromblad, L.C. Sanders, T.L. von Schalscha, R.T. Aimes, W.G. Stetler-Stevenson, J.P. Quigley, and D.A. Cheresh. 1996. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell.* 85:683-93.
- Buck, M.R., D.G. Karustis, N.A. Day, K.V. Honn, and B.F. Sloane. 1992. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J.* 282 ( Pt 1):273-8.
- Bullard, K.M., M.J. Banda, J.M. Arbeit, E. Bergsland, and D.M. Young. 1997. Human acellular dermal matrix as a novel model of malignant epithelial cell invasion. *Invasion Metastasis.* 17:42-52.
- Bullard, K.M., L. Lund, J.S. Mudgett, T.N. Mellin, T.K. Hunt, B. Murphy, J. Ronan, Z. Werb, and M.J. Banda. 1999a. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann Surg.* 230:260-5.
- Bullard, K.M., J. Mudgett, H. Scheuenstuhl, T.K. Hunt, and M.J. Banda. 1999b. Stromelysin-1-deficient fibroblasts display impaired contraction in vitro. *J Surg Res.* 84:31-4.
- Calkins, C.C., M. Sameni, J. Koblinski, B.F. Sloane, and K. Moin. 1998. Differential localization of cysteine protease inhibitors and a target cysteine protease, cathepsin B, by immunofocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 46:745-51.
- Camper, L., U. Hellman, and E. Lundgren-Akerlund. 1998. Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J Biol Chem.* 273:20383-9.
- Carey, T.E., T. Takahashi, L.A. Resnick, H.F. Oettgen, and L.J. Old. 1976. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:3278-82.
- Carlson, R.O., D.M. Martin, E.L. Feldman, and B.W. Agranoff. 1993. PKC activity and PKC-alpha mRNA content are reduced in serum-derived human neuroblastoma cells without concomitant induction of differentiation. *Exp Cell Res.* 207:340-7.
- Carmeliet, P., L. Moons, R. Lijnen, M. Baes, V. Lemaître, P. Tipping, A. Drew, Y. Eeckhout, S. Shapiro, F. Lupu, and D. Collen. 1997. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet.* 17:439-44.
- Cavallo-Medved, D., and B.F. Sloane. 2003. Cell-surface cathepsin B: understanding its functional significance. *Curr Top Dev Biol.* 54:313-41.

- Ceilley, E., N. Watanabe, D. Shapiro, P. Verrando, E.A. Bauer, R. Burgeson, R.A. Briggaman, and D.T. Woodley. 1993. Labeling of fractured human skin with antibodies to BM 600/nicein, epiligrin, kalinin and other matrix components. *J Dermatol Sci.* 5:97-103.
- Chapman, H.A., R.J. Riese, and G.P. Shi. 1997. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol.* 59:63-88.
- Chiari, M., P.G. Righetti, A. Negri, F. Cecilian, and S. Ronchi. 1992. Preincubation with cysteine prevents modification of sulfhydryl groups in proteins by unreacted acrylamide in a gel. *Electrophoresis.* 13:882-4.
- Chin, L. 2003. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer.* 3:559-70.
- Choi, Y.S., R. Sehgal, P. McCrea, and B. Gumbiner. 1990. A cadherin-like protein in eggs and cleaving embryos of *Xenopus laevis* is expressed in oocytes in response to progesterone. *J Cell Biol.* 110:1575-82.
- Cohen, C., A. Zavala-Pompa, J.H. Sequeira, M. Shoji, D.G. Sexton, G. Cotsonis, F. Cerimele, B. Govindarajan, N. Macaron, and J.L. Arbiser. 2002. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res.* 8:3728-33.
- Colella, R., and S.F. Casey. 2003. Decreased activity of cathepsins L + B and decreased invasive ability of PC3 prostate cancer cells. *Biotech Histochem.* 78:101-8.
- Corticchiato, O., J.F. Cajot, M. Abrahamson, S.J. Chan, D. Keppler, and B. Sordat. 1992. Cystatin C and cathepsin B in human colon carcinoma: expression by cell lines and matrix degradation. *Int J Cancer.* 52:645-52.
- Cotran, R., V. Kumar, S. Robbins, 1994; Pathologic Basis of Disease, 5<sup>th</sup> edition, Philadelphia.
- Coulombe, R., Y. Li, S. Takebe, R. Menard, P. Mason, J.S. Mort, and M. Cygler. 1996. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human procathepsin L. *Proteins.* 25:398-400.
- Cygler, M., J. Sivaraman, P. Grochulski, R. Coulombe, A.C. Storer, and J.S. Mort. 1996. Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure.* 4:405-16.
- Dalet-Fumeron, V., L. Boudjennah, and M. Pagano. 1996. Competition between plasminogen and procathepsin B as a probe to demonstrate the in vitro activation of procathepsin B by the tissue plasminogen activator. *Arch Biochem Biophys.* 335:351-7.
- Dalet-Fumeron, V., N. Guinec, and M. Pagano. 1993. In vitro activation of pro-cathepsin B by three serine proteinases: leucocyte elastase, cathepsin G, and the urokinase-type plasminogen activator. *FEBS Lett.* 332:251-4.
- Dalton, J.P., K.A. Clough, M.K. Jones, and P.J. Brindley. 1996. Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun.* 64:1328-34.
- Dalton, J.P., K.A. Clough, M.K. Jones, and P.J. Brindley. 1997. The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology.* 114 ( Pt 2):105-12.
- Danen, E.H., T.J. de Vries, R. Morandini, G.G. Ghanem, D.J. Ruiter, and G.N. van Muijen. 1996. E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res.* 6:127-31.
- Dano, K., P.A. Andreasen, J. Grondahl-Hansen, P. Kristensen, L.S. Nielsen, and L. Skriver. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res.* 44:139-266.
- Davies, H., G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R.

- Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, and P.A. Futreal. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 417:949-54.
- Dehrmann, F.M., E. Elliott, and C. Dennison. 1996. Reductive activation markedly increases the stability of cathepsins B and L to extracellular ionic conditions. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 377:391-4.
- Dennhofer, R., P. Kurschat, P. Zigrino, A. Klose, A. Bosserhoff, G. van Muijen, T. Krieg, C. Mauch, and N. Hunzelmann. 2003. Invasion of melanoma cells into dermal connective tissue in vitro: evidence for an important role of cysteine proteases. *Int J Cancer*. 106:316-23.
- Duffy, M.J. 1996. Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res*. 2:613-8.
- Duffy, M.J., D.J. Lynn, A.T. Lloyd, and C.M. O'Shea. 2003. The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications. *Thromb Haemost*. 89:622-31.
- Dumin, J.A., S.K. Dickeson, T.P. Stricker, M. Bhattacharyya-Pakrasi, J.D. Roby, S.A. Santoro, and W.C. Parks. 2001. Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. *J Biol Chem*. 276:29368-74.
- Dupin, E., and N.M. Le Douarin. 2003. Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene*. 22:3016-23.
- Ebert, E., B. Werle, B. Julke, N. Kopitar-Jerala, J. Kos, T. Lah, M. Abrahamson, E. Spiess, and W. Ebert. 1997. Expression of cysteine protease inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in human lung tumor tissue. *Adv Exp Med Biol*. 421:259-65.
- Eble, J.A., R. Golbik, K. Mann, and K. Kuhn. 1993. The alpha 1 beta 1 integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule [alpha 1(IV)]<sub>2</sub> alpha 2(IV). *Embo J*. 12:4795-802.
- Estavillo, D., A. Ritchie, T.G. Diacovo, and M.A. Cruz. 1999. Functional analysis of a recombinant glycoprotein Ia/Ia (Integrin alpha(2)beta(1)) I domain that inhibits platelet adhesion to collagen and endothelial matrix under flow conditions. *J Biol Chem*. 274:35921-6.
- Eves, P., C. Layton, S. Hedley, R.A. Dawson, M. Wagner, R. Morandini, G. Ghanem, and S. Mac Neil. 2000. Characterization of an in vitro model of human melanoma invasion based on reconstructed human skin. *Br J Dermatol*. 142:210-22.
- Feinberg, A.P., and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 132:6-13.
- Felbor, U., B. Kessler, W. Mothes, H.H. Goebel, H.L. Ploegh, R.T. Bronson, and B.R. Olsen. 2002. Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7883-8.
- Felding-Habermann, B., B.M. Mueller, C.A. Romerdahl, and D.A. Cheresh. 1992. Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J Clin Invest*. 89:2018-22.
- Festuccia, C., V. Dolo, F. Guerra, S. Violini, P. Muzi, A. Pavan, and M. Bologna. 1998a. Plasminogen activator system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis*. 16:513-28.

- Festuccia, C., F. Guerra, S. D'Ascenzo, D. Giunciuglio, A. Albin, and M. Bologna. 1998b. In vitro regulation of pericellular proteolysis in prostatic tumor cells treated with bombesin. *Int J Cancer*. 75:418-31.
- Fox, T., E. de Miguel, J.S. Mort, and A.C. Storer. 1992. Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry*. 31:12571-6.
- Friedl, P., K. Maaser, C.E. Klein, B. Niggemann, G. Krohne, and K.S. Zanker. 1997. Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44. *Cancer Res*. 57:2061-70.
- Friedl, P., and K. Wolf. 2003. Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. *Biochem Soc Symp*:277-85.
- Friedlander, M., P.C. Brooks, R.W. Shaffer, C.M. Kincaid, J.A. Varner, and D.A. Cheresh. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science*. 270:1500-2.
- Frohlich, E., B. Schlagenhauff, M. Mohrle, E. Weber, C. Klessen, and G. Rassner. 2001. Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma. *Cancer*. 91:972-82.
- Gaggioli, C., M. Deckert, G. Robert, P. Abbe, M. Batoz, M.U. Ehrenguber, J.P. Ortonne, R. Ballotti, and S. Tartare-Deckert. 2005. HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene*. 24:1423-33.
- Garbe, C., U. Ellwanger, M. Tronnier, E.B. Brocker, and C.E. Orfanos. 2002. The New American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma: a critical analysis based on data of the German Central Malignant Melanoma Registry. *Cancer*. 94:2305-7.
- Gelb, B.D., G.P. Shi, H.A. Chapman, and R.J. Desnick. 1996. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*. 273:1236-8.
- Goel, A., and S.S. Chauhan. 1997. Role of proteases in tumor invasion and metastasis. *Indian J Exp Biol*. 35:553-64.
- Guay, J., J.P. Falguyret, A. Ducret, M.D. Percival, and J.A. Mancini. 2000. Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. *Eur J Biochem*. 267:6311-8.
- Guinec, N., V. Dalet-Fumeron, and M. Pagano. 1993. "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 374:1135-46.
- Guinec, N., M. Pagano, V. Dalet-Fumeron, and R. Engler. 1990. "In vitro" digestion of intact bovine lens capsules by four human lysosomal cysteine-proteinases. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 371 Suppl:239-54.
- Gullberg, D., K.R. Gehlsen, D.C. Turner, K. Ahlen, L.S. Zijenah, M.J. Barnes, and K. Rubin. 1992. Analysis of alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 integrins in cell--collagen interactions: identification of conformation dependent alpha 1 beta 1 binding sites in collagen type I. *Embo J*. 11:3865-73.
- Gullberg, D.E., and E. Lundgren-Akerlund. 2002. Collagen-binding I domain integrins--what do they do? *Prog Histochem Cytochem*. 37:3-54.
- Guncar, G., I. Klemencic, B. Turk, V. Turk, A. Karaoglanovic-Carmona, L. Juliano, and D. Turk. 2000. Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-

- mono-peptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure Fold Des.* 8:305-13.
- Guncar, G., M. Podobnik, J. Pungercar, B. Strukelj, V. Turk, and D. Turk. 1998. Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function. *Structure.* 6:51-61.
- Guncar, G., G. Pungercic, I. Klemencic, V. Turk, and D. Turk. 1999. Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *Embo J.* 18:793-803.
- Hambleton, J., Z. Schwartz, A. Khare, S.W. Windeler, M. Luna, B.P. Brooks, D.D. Dean, and B.D. Boyan. 1994. Culture surfaces coated with various implant materials affect chondrocyte growth and metabolism. *J Orthop Res.* 12:542-52.
- Hanewinkel, H., J. Glossl, and H. Kresse. 1987. Biosynthesis of cathepsin B in cultured normal and I-cell fibroblasts. *J Biol Chem.* 262:12351-5.
- He, C.S., S.M. Wilhelm, A.P. Pentland, B.L. Marmer, G.A. Grant, A.Z. Eisen, and G.I. Goldberg. 1989. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:2632-6.
- Heikkila, P., O. Teronen, M. Moilanen, Y.T. Konttinen, R. Hanemaaijer, M. Laitinen, P. Maisi, G. van der Pluijm, J.D. Bartlett, T. Salo, and T. Sorsa. 2002. Bisphosphonates inhibit stromelysin-1 (MMP-3), matrix metalloelastase (MMP-12), collagenase-3 (MMP-13) and enamelysin (MMP-20), but not urokinase-type plasminogen activator, and diminish invasion and migration of human malignant and endothelial cell lines. *Anticancer Drugs.* 13:245-54.
- Hendrix, M.J., E.A. Seftor, R.E. Seftor, and I.J. Fidler. 1987. A simple quantitative assay for studying the invasive potential of high and low human metastatic variants. *Cancer Lett.* 38:137-47.
- Herlyn, D., D. Iliopoulos, P.J. Jensen, A. Parmiter, J. Baird, H. Hotta, K. Adachi, A.H. Ross, J. Jambrosic, H. Koprowski, and et al. 1990. In vitro properties of human melanoma cells metastatic in nude mice. *Cancer Res.* 50:2296-302.
- Herlyn, M., G. Balaban, J. Bannicelli, D.t. Guerry, R. Halaban, D. Herlyn, D.E. Elder, G.G. Maul, Z. Stepkowski, P.C. Nowell, and et al. 1985. Primary melanoma cells of the vertical growth phase: similarities to metastatic cells. *J Natl Cancer Inst.* 74:283-9.
- Hsu, M.Y., M.J. Wheelock, K.R. Johnson, and M. Herlyn. 1996. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1:188-94.
- Huntington, J.T., J.M. Shields, C.J. Der, C.A. Wyatt, U. Benbow, C.L. Slingluff, Jr., and C.E. Brinckerhoff. 2004. Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem.* 279:33168-76.
- Hussein, M.R., A.K. Haemel, and G.S. Wood. 2003. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. *Eur J Cancer Prev.* 12:93-100.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Illy, C., O. Quraishi, J. Wang, E. Purisima, T. Vernet, and J.S. Mort. 1997. Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J Biol Chem.* 272:1197-202.
- Imokawa, G., Y. Yada, and M. Miyagishi. 1992. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J Biol Chem.* 267:24675-80.

- Ishidoh, K., and E. Kominami. 1995. Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 217:624-31.
- Ishidoh, K., and E. Kominami. 1998. Gene regulation and extracellular functions of procathepsin L. *Biol Chem.* 379:131-5.
- Johansson, N., M. Ahonen, and V.M. Kahari. 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci.* 57:5-15.
- Jovin, T.M. 1973a. Multiphasic zone electrophoresis, IV. Design and analysis of discontinuous buffer systems with a digital computer. *Ann N Y Acad Sci.* 209:477-96.
- Jovin, T.M. 1973b. Multiphasic zone electrophoresis. 3. Further analysis and new forms of discontinuous buffer systems. *Biochemistry.* 12:890-8.
- Jovin, T.M. 1973c. Multiphasic zone electrophoresis. I. Steady-state moving-boundary systems formed by different electrolyte combinations. *Biochemistry.* 12:871-9.
- Jovin, T.M. 1973d. Multiphasic zone electrophoresis. II. Design of integrated discontinuous buffer systems for analytical and preparative fractionation. *Biochemistry.* 12:879-90.
- Kageshita, T., A. Yoshii, T. Kimura, K. Maruo, T. Ono, M. Himeno, and Y. Nishimura. 1995. Biochemical and immunohistochemical analysis of cathepsins B, H, L and D in human melanocytic tumours. *Arch Dermatol Res.* 287:266-72.
- Khouri, H.E., C. Plouffe, S. Hasnain, T. Hirama, A.C. Storer, and R. Menard. 1991. A model to explain the pH-dependent specificity of cathepsin B-catalysed hydrolyses. *Biochem J.* 275 ( Pt 3):751-7.
- Kirschke, H., A.J. Barrett, and N.D. Rawlings. 1995. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile.* 2:1581-643.
- Klein, C.E., D. Dressel, T. Steinmayer, C. Mauch, B. Eckes, T. Krieg, R.B. Bankert, and L. Weber. 1991. Integrin alpha 2 beta 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *J Cell Biol.* 115:1427-36.
- Kobayashi, H., M. Schmitt, L. Goretzki, N. Chucholowski, J. Calvete, M. Kramer, W.A. Gunzler, F. Janicke, and H. Graeff. 1991. Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA). *J Biol Chem.* 266:5147-52.
- Koblinski, J.E., J. Dosesco, M. Sameni, K. Moin, K. Clark, and B.F. Sloane. 2002. Interaction of human breast fibroblasts with collagen I increases secretion of procathepsin B. *J Biol Chem.* 277:32220-7.
- Konduri, S.D., N. Yanamandra, K. Siddique, A. Joseph, D.H. Dinh, W.C. Olivero, M. Gujrati, G. Kouraklis, A. Swaroop, A.P. Kyritsis, and J.S. Rao. 2002. Modulation of cystatin C expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells. *Oncogene.* 21:8705-12.
- Kos, J., and T.T. Lah. 1998. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep.* 5:1349-61.
- Kos, J., B. Stabuc, A. Schweiger, M. Krasovec, N. Cimerman, N. Kopitar-Jerala, and I. Vrhovec. 1997. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 3:1815-22.
- Krause, T., and G.A. Turner. 1999. Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metastasis.* 17:183-92.

- Kronick, P., B. Maleeff, and R. Carroll. 1988. The locations of collagens with different thermal stabilities in fibrils of bovine reticular dermis. *Connect Tissue Res.* 18:123-34.
- Kuhn, K., and J. Eble. 1994. The structural bases of integrin-ligand interactions. *Trends Cell Biol.* 4:256-61.
- Kurschat, P., C. Wickenhauser, W. Groth, T. Krieg, and C. Mauch. 2002. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. *J Pathol.* 197:179-87.
- Kurschat, P., P. Zigrino, R. Nischt, K. Breitkopf, P. Steurer, C.E. Klein, T. Krieg, and C. Mauch. 1999. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. *J Biol Chem.* 274:21056-62.
- Lah, T.T., M. Kokalj-Kunovar, B. Strukelj, J. Pungercar, D. Barlic-Maganja, M. Drobnic-Kosorok, L. Kastelic, J. Babnik, R. Golouh, and V. Turk. 1992. Stefins and lysosomal cathepsins B, L and D in human breast carcinoma. *Int J Cancer.* 50:36-44.
- Lakka, S.S., C.S. Gondi, N. Yanamandra, W.C. Olivero, D.H. Dinh, M. Gujrati, and J.S. Rao. 2004. Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene.* 23:4681-9.
- LaLonde, J.M., B. Zhao, C.A. Janson, K.J. D'Alessio, M.S. McQueney, M.J. Orsini, C.M. Debouck, and W.W. Smith. 1999. The crystal structure of human procathepsin K. *Biochemistry.* 38:862-9.
- Langholz, O., D. Rockel, C. Mauch, E. Kozłowska, I. Bank, T. Krieg, and B. Eckes. 1995. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol.* 131:1903-15.
- Lenarcic, B., and T. Bevec. 1998. Thyropins--new structurally related proteinase inhibitors. *Biol Chem.* 379:105-11.
- Li, G., K. Satyamoorthy, and M. Herlyn. 2001. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* 61:3819-25.
- Liaw, Y.S., C.J. Yu, C.T. Shun, Y.C. Lee, S.H. Kuo, K.T. Luh, and P.C. Yang. 2001. Expression of integrins in human cultured mesothelial cells: the roles in cell-to-extracellular matrix adhesion and inhibition by RGD-containing peptide. *Respir Med.* 95:221-6.
- Linebaugh, B.E., M. Sameni, N.A. Day, B.F. Sloane, and D. Keppler. 1999. Exocytosis of active cathepsin B enzyme activity at pH 7.0, inhibition and molecular mass. *Eur J Biochem.* 264:100-9.
- Linnevers, C., S.P. Smeekens, and D. Bromme. 1997. Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8+ T-lymphocytes. *FEBS Lett.* 405:253-9.
- Loffek, S., P. Zigrino, P. Angel, B. Anwald, T. Krieg, and C. Mauch. 2005. High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1alpha and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms. *J Invest Dermatol.* 124:638-43.
- Luca, M., S. Xie, M. Gutman, S. Huang, and M. Bar-Eli. 1995. Abnormalities in the CDKN2 (p16INK4/MTS-1) gene in human melanoma cells: relevance to tumor growth and metastasis. *Oncogene.* 11:1399-402.
- Ludwig, T., H. Munier-Lehmann, U. Bauer, M. Hollinshead, L. Ovitt, P. Lobel, B. Hoflack. 1994. Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose-6-phosphate receptor-deficient fibroblasts. *EMBO J.* 15: 3430-7.

- Mach, L., K. Stuwe, A. Hagen, C. Ballaun, and J. Glossl. 1992. Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *Biochem J.* 282 ( Pt 2):577-82.
- Mai, J., D.M. Waisman, and B.F. Sloane. 2000. Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim Biophys Acta.* 1477:215-30.
- Mason, R.W. 1989. Interaction of lysosomal cysteine proteinases with alpha 2-macroglobulin: conclusive evidence for the endopeptidase activities of cathepsins B and H. *Arch Biochem Biophys.* 273:367-74.
- Mason, R.W., S. Gal, and M.M. Gottesman. 1987. The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L. *Biochem J.* 248:449-54.
- Mason, R.W., and S.D. Massey. 1992. Surface activation of pro-cathepsin L. *Biochem Biophys Res Commun.* 189:1659-66.
- Matrisian, L.M., and G.T. Bowden. 1990. Stromelysin/transin and tumor progression. *Semin Cancer Biol.* 1:107-15.
- Mauch, C., B. Adelman-Grill, A. Hatamochi, and T. Krieg. 1989. Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three-dimensional contact with collagen. *FEBS Lett.* 250:301-5.
- Mauch, C., A. Hatamochi, K. Scharffetter, and T. Krieg. 1988. Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp Cell Res.* 178:493-503.
- McGrath, M.E., J.L. Klaus, M.G. Barnes, and D. Bromme. 1997. Crystal structure of human cathepsin K complexed with a potent inhibitor. *Nat Struct Biol.* 4:105-9.
- McIntyre, G.F., and A.H. Erickson. 1991. Procathepsins L and D are membrane-bound in acidic microsomal vesicles. *J Biol Chem.* 266:15438-45.
- McIntyre, G.F., and A.H. Erickson. 1993. The lysosomal proenzyme receptor that binds procathepsin L to microsomal membranes at pH 5 is a 43-kDa integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10588-92.
- McIntyre, G.F., G.D. Godbold, and A.H. Erickson. 1994. The pH-dependent membrane association of procathepsin L is mediated by a 9-residue sequence within the propeptide. *J Biol Chem.* 269:567-72.
- McQueney, M.S., B.Y. Amegadzie, K. D'Alessio, C.R. Hanning, M.M. McLaughlin, D. McNulty, S.A. Carr, C. Ijames, J. Kurdyla, and C.S. Jones. 1997. Autocatalytic activation of human cathepsin K. *J Biol Chem.* 272:13955-60.
- Meier, F., K. Satyamoorthy, M. Nesbit, M.Y. Hsu, B. Schitteck, C. Garbe, and M. Herlyn. 1998. Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci.* 3:D1005-10.
- Mignatti, P., and D.B. Rifkin. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73:161-95.
- Montcourrier, P., P.H. Mangeat, G. Salazar, M. Morisset, A. Sahuquet, and H. Rochefort. 1990. Cathepsin D in breast cancer cells can digest extracellular matrix in large acidic vesicles. *Cancer Res.* 50:6045-54.
- Montcourrier, P., P.H. Mangeat, C. Valembois, G. Salazar, A. Sahuquet, C. Duperray, and H. Rochefort. 1994. Characterization of very acidic phagosomes in breast cancer cells and their association with invasion. *J Cell Sci.* 107 ( Pt 9):2381-91.
- Mort, J.S., and D.J. Buttle. 1997. Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol.* 29:715-20.

- Mort, J.S., and A.D. Recklies. 1986. Interrelationship of active and latent secreted human cathepsin B precursors. *Biochem J.* 233:57-63.
- Muentener, K., A. Willmann, R. Zwicky, B. Svoboda, L. Mach, and A. Baici. 2005. Folding competence of N-terminally truncated forms of human procathepsin B. *J Biol Chem.* (Epub ahead of print).
- Murphy, G., R. Ward, J. Gavrilovic, and S. Atkinson. 1992. Physiological mechanisms for metalloproteinase activation. *Matrix Suppl.* 1:224-30.
- Musil, D., D. Zucic, D. Turk, R.A. Engh, I. Mayr, R. Huber, T. Popovic, V. Turk, T. Towatari, N. Katunuma, and et al. 1991. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *Embo J.* 10:2321-30.
- Nagler, D.K., A.C. Storer, F.C. Portaro, E. Carmona, L. Juliano, and R. Menard. 1997. Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry.* 36:12608-15.
- Nakagawa, T., W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J.A. Villadangos, H. Ploegh, C. Peters, and A.Y. Rudensky. 1998. Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science.* 280:450-3.
- Nakagawa, T.Y., W.H. Brissette, P.D. Lira, R.J. Griffiths, N. Petrushova, J. Stock, J.D. McNeish, S.E. Eastman, E.D. Howard, S.R. Clarke, E.F. Rosloniec, E.A. Elliott, and A.Y. Rudensky. 1999. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity.* 10:207-17.
- Nakagawa, T.Y., and A.Y. Rudensky. 1999. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev.* 172:121-9.
- Nesbit, M., H.K. Nesbit, J. Bennett, T. Andl, M.Y. Hsu, E. Dejesus, M. McBrien, A.R. Gupta, S.L. Eck, and M. Herlyn. 1999. Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes. *Oncogene.* 18:6469-76.
- Nishikawa, H., Y. Ozaki, T. Nakanishi, K. Blomgren, T. Tada, A. Arakawa, and K. Suzumori. 2004. The role of cathepsin B and cystatin C in the mechanisms of invasion by ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 92:881-6.
- Nishimura, Y., J. Amano, H. Sato, H. Tsuji, and K. Kato. 1988. Biosynthesis of lysosomal cathepsins B and H in cultured rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.* 262:159-70.
- Ntayi, C., S. Lorimier, O. Berthier-Vergnes, W. Hornebeck, and P. Bernard. 2001. Cumulative influence of matrix metalloproteinase-1 and -2 in the migration of melanoma cells within three-dimensional type I collagen lattices. *Exp Cell Res.* 270:110-8.
- Okajima T., T. Tanabe, T. Yasuda. 1993. Nonurea sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with high-molarity buffers for the separation of proteins and peptides. *Anal Biochem.* 211 (2):293-300.
- Olsen, J.G., A. Kadziola, C. Lauritzen, J. Pedersen, S. Larsen, and S.W. Dahl. 2001. Tetrameric dipeptidyl peptidase I directs substrate specificity by use of the residual pro-part domain. *FEBS Lett.* 506:201-6.
- Park, H.Y., V. Russakovsky, Y. Ao, E. Fernandez, and B.A. Gilchrist. 1996. Alpha-melanocyte stimulating hormone-induced pigmentation is blocked by depletion of protein kinase C. *Exp Cell Res.* 227:70-9.
- Perlis, C., and M. Herlyn. 2004. Recent advances in melanoma biology. *Oncologist.* 9:182-7.
- Pham, C.T., and T.J. Ley. 1999. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:8627-32.

- Pilcher, B.K., J.A. Dumin, B.D. Sudbeck, S.M. Krane, H.G. Welgus, and W.C. Parks. 1997. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol.* 137:1445-57.
- Pisoni, R.L., T.L. Acker, K.M. Lisowski, R.M. Lemons, and J.G. Thoene. 1990. A cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: possible role in supporting lysosomal proteolysis. *J Cell Biol.* 110:327-35.
- Plow, E.F., T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J.W. Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 275:21785-8.
- Podobnik, M., R. Kuhelj, V. Turk, and D. Turk. 1997. Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 Å resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen. *J Mol Biol.* 271:774-88.
- Premzl, A., V. Zavasnik-Bergant, V. Turk, and J. Kos. 2003. Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp Cell Res.* 283:206-14.
- Puyraimond, A., R. Fridman, M. Lemesle, B. Arbeille, and S. Menashi. 2001. MMP-2 colocalizes with caveolae on the surface of endothelial cells. *Exp Cell Res.* 262:28-36.
- Ravanko, K., K. Jarvinen, J. Helin, N. Kalkkinen, and E. Holtta. 2004. Cysteine cathepsins are central contributors of invasion by cultured adenosylmethionine decarboxylase-transformed rodent fibroblasts. *Cancer Res.* 64:8831-8.
- Ravanti, L., J. Heino, C. Lopez-Otin, and V.M. Kahari. 1999. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 274:2446-55.
- Reinheckel, T., J. Deussing, W. Roth, and C. Peters. 2001. Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol Chem.* 382:735-41.
- Rocheffort, H. 1992. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol.* 31:125-30.
- Rocheffort, H., F. Capony, and M. Garcia. 1990. Cathepsin D: a protease involved in breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 9:321-31.
- Rocheffort, H., and E. Liaudet-Coopman. 1999. Cathepsin D in cancer metastasis: a protease and a ligand. *Apmis.* 107:86-95.
- Rodriguez, A., P. Webster, J. Ortego, and N.W. Andrews. 1997. Lysosomes behave as Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol.* 137:93-104.
- Roth, W., J. Deussing, V.A. Botchkarev, M. Pauly-Evers, P. Saftig, A. Hafner, P. Schmidt, W. Schmahl, J. Scherer, I. Anton-Lamprecht, K. Von Figura, R. Paus, and C. Peters. 2000. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *Faseb J.* 14:2075-86.
- Rousselet, N., L. Mills, D. Jean, C. Tellez, M. Bar-Eli, and R. Frade. 2004. Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human melanoma cells by anti-cathepsin L single chain variable fragment. *Cancer Res.* 64:146-51.
- Rowan, A.D., P. Mason, L. Mach, and J.S. Mort. 1992. Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J Biol Chem.* 267:15993-9.
- Rozhin, J., D. Robinson, M.A. Stevens, T.T. Lah, K.V. Honn, R.E. Ryan, and B.F. Sloane. 1987. Properties of a plasma membrane-associated cathepsin B-like cysteine proteinase in metastatic B16 melanoma variants. *Cancer Res.* 47:6620-8.

- Rozhin, J., M. Sameni, G. Ziegler, and B.F. Sloane. 1994. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res.* 54:6517-25.
- Rozhin, J., R.L. Wade, K.V. Honn, and B.F. Sloane. 1989. Membrane-associated cathepsin L: a role in metastasis of melanomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 164:556-61.
- Rozman, J., J. Stojan, R. Kuhelj, V. Turk, and B. Turk. 1999. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Lett.* 459:358-62.
- Ruoslahti, E., and M.D. Pierschbacher. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238:491-7.
- Saftig, P., E. Hunziker, O. Wehmeyer, S. Jones, A. Boyde, W. Rommerskirch, J.D. Moritz, P. Schu, and K. von Figura. 1998. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:13453-8.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sameni, M., E. Elliott, G. Ziegler, P.H. Fortgens, C. Dennison, and B.F. Sloane. 1995. Cathepsin B and D are Localized at the Surface of Human Breast Cancer Cells. *Pathol Oncol Res.* 1:43-53.
- Sameni, M., K. Moin, and B.F. Sloane. 2000. Imaging proteolysis by living human breast cancer cells. *Neoplasia.* 2:496-504.
- Satyamoorthy, K., G. Li, M.R. Gerrero, M.S. Brose, P. Volpe, B.L. Weber, P. Van Belle, D.E. Elder, and M. Herlyn. 2003. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.* 63:756-9.
- Satyamoorthy, K., G. Li, B. Vaidya, D. Patel, and M. Herlyn. 2001. Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. *Cancer Res.* 61:7318-24.
- Schechter, I., and A. Berger. 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun.* 27:157-62.
- Schweiger, A., B. Stabuc, T. Popovic, V. Turk, and J. Kos. 1997. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of total cathepsin H in human tissue cytosols and sera. *J Immunol Methods.* 201:165-72.
- Shi, G.P., R.A. Bryant, R. Riese, S. Verhelst, C. Driessen, Z. Li, D. Bromme, H.L. Ploegh, and H.A. Chapman. 2000. Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med.* 191:1177-86.
- Shi, G.P., J.A. Villadangos, G. Dranoff, C. Small, L. Gu, K.J. Haley, R. Riese, H.L. Ploegh, and H.A. Chapman. 1999. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity.* 10:197-206.
- Shimizu, Y., G.A. Van Severter, K.J. Horgan, and S. Shaw. 1990. Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature.* 345:250-3.
- Sivaraman, J., M. Lalumiere, R. Menard, and M. Cygler. 1999. Crystal structure of wild-type human procathepsin K. *Protein Sci.* 8:283-90.
- Sivaraman, J., D.K. Nagler, R. Zhang, R. Menard, and M. Cygler. 2000. Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J Mol Biol.* 295:939-51.
- Sloane, B.F. 1996. Suicidal tumor proteases. *Nat Biotechnol.* 14:826-7.

- Sloane, B.F., K. Moin, M. Sameni, L.R. Tait, J. Rozhin, and G. Ziegler. 1994a. Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene. *J Cell Sci.* 107 ( Pt 2):373-84.
- Sloane, B.F., K. Moin, T.T. Lah. 1994b. Regulation of lysosomal endopeptidases in neoplasia. in Pretlow T.G., Pretlow T.P., etc. *Biochemical and Molecular Aspects of Selected Cancers*, San Diego, Academic Press. 411-466.
- Sloane, B.F., J. Rozhin, K. Johnson, H. Taylor, J.D. Crissman, and K.V. Honn. 1986. Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:2483-7.
- Smalley, K.S. 2003. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer.* 104:527-32.
- Smith, J.W., R.S. Piotrowicz, and D. Mathis. 1994. A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins. *J Biol Chem.* 269:960-7.
- Sokol, J.P., and W.P. Schiemann. 2004. Cystatin C antagonizes transforming growth factor beta signaling in normal and cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2:183-95.
- Somoza, J.R., J.T. Palmer, and J.D. Ho. 2002. The crystal structure of human cathepsin F and its implications for the development of novel immunomodulators. *J Mol Biol.* 322:559-68.
- Somoza, J.R., H. Zhan, K.K. Bowman, L. Yu, K.D. Mortara, J.T. Palmer, J.M. Clark, and M.E. McGrath. 2000. Crystal structure of human cathepsin V. *Biochemistry.* 39:12543-51.
- Storer, A.C., and R. Menard. 1994. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244:486-500.
- Stypmann, J., K. Glaser, W. Roth, D.J. Tobin, I. Petermann, R. Matthias, G. Monnig, W. Haverkamp, G. Breithardt, W. Schmahl, C. Peters, and T. Reinheckel. 2002. Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:6234-9.
- Szpaderska, A.M., and A. Frankfater. 2001. An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Res.* 61:3493-500.
- Tada, A., I. Suzuki, S. Im, M.B. Davis, J. Cornelius, G. Babcock, J.J. Nordlund, and Z.A. Abdel-Malek. 1998. Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ.* 9:575-84.
- Takada, Y., and W. Puzon. 1993. Identification of a regulatory region of integrin beta 1 subunit using activating and inhibiting antibodies. *J Biol Chem.* 268:17597-601.
- Tang, A., M.S. Eller, M. Hara, M. Yaar, S. Hirohashi, and B.A. Gilchrest. 1994. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci.* 107 ( Pt 4):983-92.
- Tao, K., N.A. Stearns, J. Dong, Q.L. Wu, and G.G. Sahagian. 1994. The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys.* 311:19-27.
- Tomasek, J.J., N.L. Halliday, D.L. Updike, J.S. Ahern-Moore, T.K. Vu, R.W. Liu, and E.W. Howard. 1997. Gelatinase A activation is regulated by the organization of the polymerized actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 272:7482-7.
- Toomes, C., J. James, A.J. Wood, C.L. Wu, D. McCormick, N. Lench, C. Hewitt, L. Moynihan, E. Roberts, C.G. Woods, A. Markham, M. Wong, R. Widmer, K.A. Ghaffar, M. Pemberton, I.R. Hussein, S.A. Temtamy, R. Davies, A.P. Read, P. Sloan, M.J. Dixon,

- and N.S. Thakker. 1999. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nat Genet.* 23:421-4.
- Tuckwell, D., D.A. Calderwood, L.J. Green, and M.J. Humphries. 1995. Integrin alpha 2 I-domain is a binding site for collagens. *J Cell Sci.* 108 ( Pt 4):1629-37.
- Tunggal, L., J. Ravaux, M. Pesch, H. Smola, T. Krieg, F. Gaill, T. Sasaki, R. Timpl, C. Mauch, and M. Aumailley. 2002. Defective laminin 5 processing in cylindroma cells. *Am J Pathol.* 160:459-68.
- Turk, B., I. Dolenc, E. Zerovnik, D. Turk, F. Gubensek, and V. Turk. 1994. Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site. *Biochemistry.* 33:14800-6.
- Turk, B., D. Turk, and V. Turk. 2000. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta.* 1477:98-111.
- Turk, D., and G. Guncar. 2003. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 59:203-13.
- Turk, D., G. Guncar, M. Podobnik, and B. Turk. 1998. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem.* 379:137-47.
- Turk, D., V. Janjic, I. Stern, M. Podobnik, D. Lamba, S.W. Dahl, C. Lauritzen, J. Pedersen, V. Turk, and B. Turk. 2001a. Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases. *Embo J.* 20:6570-82.
- Turk, D., M. Podobnik, R. Kuhelj, M. Dolinar, and V. Turk. 1996. Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett.* 384:211-4.
- Turk, D., M. Podobnik, T. Popovic, N. Katunuma, W. Bode, R. Huber, and V. Turk. 1995. Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0-A resolution: A basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors. *Biochemistry.* 34:4791-7.
- Turk, V., and W. Bode. 1991. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 285:213-9.
- Turk, V., B. Turk, and D. Turk. 2001b. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *Embo J.* 20:4629-33.
- Turkenburg, J.P., M.B. Lamers, A.M. Brzozowski, L.M. Wright, R.E. Hubbard, S.L. Sturt, and D.H. Williams. 2002. Structure of a Cys25-->Ser mutant of human cathepsin S. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 58:451-5.
- Twining, S.S. 1994. Regulation of proteolytic activity in tissues. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 29:315-83.
- van der Flier, A., and A. Sonnenberg. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305:285-98.
- van der Stappen, J.W., A.C. Williams, R.A. Maciewicz, and C. Paraskeva. 1996. Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. *Int J Cancer.* 67:547-54.
- van Muijen, G.N., K.F. Jansen, I.M. Cornelissen, D.F. Smeets, J.L. Beck, and D.J. Ruiter. 1991. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer.* 48:85-91.
- Velling, T., M. Kusche-Gullberg, T. Sejersen, and D. Gullberg. 1999. cDNA cloning and chromosomal localization of human alpha(11) integrin. A collagen-binding, I domain-

- containing, beta(1)-associated integrin alpha-chain present in muscle tissues. *J Biol Chem.* 274:25735-42.
- Waghray, A., D. Keppler, B.F. Sloane, L. Schuger, and Y.Q. Chen. 2002. Analysis of a truncated form of cathepsin H in human prostate tumor cells. *J Biol Chem.* 277:11533-8.
- Walsh, F.S., and P. Doherty. 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:425-56.
- Wayner, E.A., W.G. Carter, R.S. Piotrowicz, and T.J. Kunicki. 1988. The function of multiple extracellular matrix receptors in mediating cell adhesion to extracellular matrix: preparation of monoclonal antibodies to the fibronectin receptor that specifically inhibit cell adhesion to fibronectin and react with platelet glycoproteins Ic-IIa. *J Cell Biol.* 107:1881-91.
- Willenbrock, F., and K. Brocklehurst. 1985. A general framework of cysteine-proteinase mechanism deduced from studies on enzymes with structurally different analogous catalytic-site residues Asp-158 and -161 (papain and actinidin), Gly-196 (cathepsin B) and Asn-165 (cathepsin H). Kinetic studies up to pH 8 of the hydrolysis of N-alpha-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginine 2-naphthylamide catalysed by cathepsin B and of L-arginine 2-naphthylamide catalysed by cathepsin H. *Biochem J.* 227:521-8.
- Willstätter, R., E. Bamann. 1929. Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukozyten. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 180: 127-143.
- Wiltfang, J., N. Arold, and V. Neuhoff. 1991. A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100,000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. *Electrophoresis.* 12:352-66.
- Yan, S., and B.F. Sloane. 2003. Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. *Biol Chem.* 384:845-54.
- Yap, A.S., W.M. Brieher, and B.M. Gumbiner. 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:119-46.
- Zhao, B., C.A. Janson, B.Y. Amegadzie, K. D'Alessio, C. Griffin, C.R. Hanning, C. Jones, J. Kurdyla, M. McQueney, X. Qiu, W.W. Smith, and S.S. Abdel-Meguid. 1997. Crystal structure of human osteoclast cathepsin K complex with E-64. *Nat Struct Biol.* 4:109-11.
- Zigrino, P., C. Drescher, and C. Mauch. 2001. Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of alpha2beta1 integrins. *Eur J Cell Biol.* 80:68-77.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Thomas Krieg betreut worden.

Köln, den 17. März 2005

Anke Klose

## Teilpublikationen

Dennhofer, R., P. Kurschat, P. Zigrino, **A. Klose**, A. Bosserhoff, G. van Muijen, T. Krieg, C. Mauch, and N. Hunzelmann. 2003. Invasion of melanoma cells into dermal connective tissue in vitro: evidence for an important role of cysteine proteases. *Int J Cancer*. 106:316-23.

**A. Klose**, A. Wilbrand-Hennes, P. Zigrino, E. Weber, T. Krieg, C. Mauch\*, N. Hunzelmann\*. Contact of High-Invasive but not Low-Invasive Melanoma Cells to Native Collagen I Induces the Release of Mature Cathepsin B (Submitted). \* equal contributors

## Abstracts

**A. Klose**, R. Denhöfer, A. Wilbrand-Hennes, G. van Muijen, T. Krieg, C. Mauch, N. Hunzelmann. Differential Activity of Matrix Metalloproteinases and Cysteine Proteases in Melanoma Cell Lines Cultured in an *In Vitro* Invasion System. Abstracts of the XXX. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), 27 February – 01 March 2003, Frankfurt, Germany. Archives of Dermatological Research 294 (10-11):506.

**A. Klose**, A. Wilbrand-Hennes, G. van Muijen, T. Krieg, C. Mauch, N. Hunzelmann. Contact of High-Invasive but not Low-Invasive Melanoma Cells to Collagen I Induces Increased Secretion of Pro- and Mature Cathepsin B. Abstracts of the XXXI. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), 26-28 February 2004, Dresden, Germany. Archives of Dermatological Research 295 (8-9):376.

**A. Klose**, A. Wilbrand-Hennes, P. Zigrino, E. Weber, T. Krieg, C. Mauch\*, N. Hunzelmann\*. Interaction of High-Invasive Melanoma Cells with Native Collagen I via  $\beta 1$  Integrin Regulates the Activity of Extracellular Cathepsin B. Abstracts of the XXXII. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), 03-05 March 2005, Innsbruck, Austria. Archives of Dermatological Research 296 (9):387. \* equal contributors

## Lebenslauf

### Daten zur Person

**Name:** Anke Klose  
**Geburtsdatum:** 28-03-75  
**Geburtsort:** Solingen

### Ausbildung

**09/1981 - 08/1985** Katholische Grundschule Leichlingen  
**08/1985 - 06/1994** Städtisches Gymnasium Leichlingen  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife  
**10/1994 - 03/1995** Studium an der Rheinischen Fr. Wilhelms Universität Bonn  
Studiengang: Agrarwissenschaften  
**10/1995 - 07/1999** Studium an der Universität zu Köln  
Studiengang: Biologie, angestrebter Abschluss: Diplom  
**07/1999** Mündliche Diplomprüfungen:  
Hauptfach: **Biochemie**  
1. Nebenfach: **Genetik**  
2. Nebenfach: **Organische Chemie**  
**09/1999 - 12/2000** Diplomarbeit am Institut für Biochemie unter der Anleitung von Prof. Dr. Helmut W. Klein an der Universität zu Köln mit dem Thema „**Modifizierung der künstlich dimeren Insulinrezeptorkinase-Domäne**“  
**21-12-2000** Abschluss des Hochschulstudiums als **Diplombiologin**  
**03/2001 - 08/2001** Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie an der Universität zu Köln  
**01/2002 – 06/2005** Promotion für das Fach **Biochemie** unter der Anleitung von Prof. Dr. Thomas Krieg, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln. Die Arbeiten wurden im Labor von Prof. Dr. Cornelia Mauch und Prof. Dr. Nicolas Hunzelmann in der Abteilung für Dermatologie und Venerologie der Universitätsklinik zu Köln durchgeführt. Thema der Dissertation: „**Tumor-Matrix Interaktionen: Ihre Bedeutung für die Regulation der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin B am Beispiel des malignen Melanom**“

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Krieg, Frau Prof. Dr. Cornelia Mauch und Herrn Prof. Dr. Nicolas Hunzelmann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln, für die interessante Themenstellung sowie für ihr stetiges Interesse und die kritischen Diskussionen während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Helmut W. Klein danke ich herzlich für die langjährige Unterstützung, die Betreuung der Arbeit seitens der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät und für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Thomas Langer danke ich für die Übernahme des Drittgutachtens.

Außerdem danke ich insbesondere Herrn Prof. Dr. Ekkehard Weber für die kooperative Zusammenarbeit und die wertvollen Diskussionen.

Astrid Wilbrand-Hennes danke ich für die hervorragende technische und einzigartige, persönliche Unterstützung, die ausgesprochen gute Zusammenarbeit und ihre ansteckende gute Laune, die mich immer wieder ermutigt hat.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Paola Zigrino, Dr. Stefanie Löffek, Dr. Barbara Leutgeb und Dr. Thorsten Peters für ihre ständige wissenschaftliche und persönliche Hilfe, endlose Gespräche und viele unvergessliche Momente.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Laboratorien der Hautklinik, der Biochemie und, im Besonderen, allen Mitarbeitern der AG Mauch bedanken, die durch ihre Hilfsbereitschaft und die herzliche Atmosphäre wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

I would like to thank Dr. Saša Jenko Kokalj and Dr. Gregor Gunčar for their hospitality and a wonderful time in Slovenia. Außerdem möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und allen Freunden für ihre ausdauernde, moralische Rückenstärkung bedanken.

Der Dank an meine Mutter und an Rainer lässt sich nicht in Worte fassen. Es ist unmöglich, eure permanente Unterstützung und euer unendliches Verständnis gebührend zu belohnen.

