

Sektion für Molekulare Onkologie
Institut für Experimentelle Tumorforschung
Krebszentrum Nord - CCC
(geschäftsführender Direktor Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



***IN VITRO* – UNTERSUCHUNG ZUR WIRKSAMKEIT DES
MATRIXMETALLOPROTEINASEINHIBITORS TRIAZIN TF 17-2
AM BEISPIEL
CHOLANGIOZELLULÄRER KARZINOMZELLEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
ANNE GUTSCHE
aus Altenburg
Kiel 2010

Sektion für Molekulare Onkologie
Institut für Experimentelle Tumorforschung
Krebszentrum Nord - CCC
(geschäftsführender Direktor Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

***IN VITRO* – UNTERSUCHUNG ZUR WIRKSAMKEIT DES
MATRIXMETALLOPROTEINASEINHIBITORS TRIAZIN TF 17-2
AM BEISPIEL
CHOLANGIOZELLULÄRER KARZINOMZELLEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
ANNE GUTSCHE
aus Altenburg
Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Kalthoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2010

zum Druck genehmigt: 03.11.2010

gezeichnet: Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Cholangiozelluläres Karzinom (CCC)	1
1.2. Therapiestrategien	3
1.3. Matrixmetalloproteinasen (MMP`s)	4
1.4. Synthetische MMP-Inhibitoren (MMPI) in der humanen Krebstherapie	8
1.5. TF 17-2	10
1.6. Organspezifische Fibroblasten („stellate cells“)	12
1.7. Kultursysteme	14
1.8. Ziele der Arbeit	16
2. Material & Methoden	17
2.1. Material	17
2.2. Zellkultur	17
2.2.1. Zelllinien: RPMI 7451, KiF5 und humane Gallenblasenfibroblasten (hGBF)	17
2.2.1.1. Lösungen und Medien	18
2.2.2. Auftauen	18
2.2.3. Kultivieren und Passagieren von Zellen	19
2.2.4. Zählen von Zellen	19
2.2.5. Einfrieren von Zellen	20
2.3. Isolierung von humanen Gallenblasenfibroblasten	20
2.4. Morphologische Charakterisierung von humanen Gallenblasenfibroblasten	21
2.4.1. Vorbereitung zur Immunfluoreszenz (Aussaat auf Coverslips und Fixierung)	21
2.4.2. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	21
2.4.3. Konfokale Laserscanningmikroskopie	22
2.5. <i>In vitro</i> - Experimente	22
2.5.1. Monolayer Kokulturen	23
2.5.2. Kolorimetrischer Zellvitalitätstest (Ez4U)	23
2.5.3. Untersuchung zur DNA-Neusynthese (³ H-Thymidin-Assay)	24

2.5.4.	Untersuchung zur Fragmentierung von DNA (Jam-Assay)	25
2.5.5.	Untersuchung zur Invasivität der Cholangiokarzinomzellen (Invasionsassay)	25
2.6.	Biochemische Methoden	26
2.6.1.	Herstellung von Überständen und Lysaten	27
2.6.2.	Proteinbestimmung	27
2.6.3.	Westernblot	28
2.6.4.	Gelzymographie	31
2.7.	Statistik	32
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Isolierung und Charakterisierung von humanen Gallenblasenfibroblasten	33
3.2.	Effekt von TF17-2 auf die Zellvitalität	36
3.2.1.	Kolorimetrischer Zellvitalitätstest (Ez4U)	36
3.2.2.	Untersuchung zur DNA-Neusynthese (³ H-Thymidin-Assay)	38
3.2.3.	Untersuchung zur Fragmentierung von DNA (Jam-Assay)	40
3.3.	Einfluss von TF17-2 auf die MMP-Proteinexpression	42
3.3.1.	Westernblot	43
3.3.2.	Gelzymographie	45
3.4.	Invasionsassay	48
4.	Diskussion	53
5.	Zusammenfassung	63
6.	Literaturverzeichnis	65
7.	Anhang	72
8.	Danksagung	83
9.	Lebenslauf	84

BSA	Bovines Serum Albumin
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ERC	Endoskopisch retrograde Cholangiographie
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fötales Kälber Serum
hGBF	Humane Gallenblasenfibroblasten
IL	Interleukin
KIF-5	Kieler (Vorhaut-)Fibroblasten Linie 5
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMPI	Matrixmetalloproteinase Inhibitor
MRT	Magnetresonanztomographie
MT-MMP`s	Membrangebundene MMP`s
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PSC	Primär sklerotisierende Cholangitis
RPM	Rounds per minute
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Cell Culture Medium
RPMI 7451	Cholangiokarzinomzelllinie
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SMA	Smooth muscle actin
TBS	TRIS buffered saline
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
uPA	Urokinase-Typ-plasminogenaktivator

1. Einleitung

1.1. Cholangiozelluläres Karzinom

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) ist ein seltener Tumor, der vom Gallengangssystem ausgeht und etwa 5-10% der primären Lebermalignome ausmacht. Zum CCC gehören das intrahepatische und extrahepatische Cholangiokarzinom, das perihiläre Gallengangskarzinom, auch Klatskintumor genannt, das Gallenblasenkarzinom und das Papillenkarzinom. Es handelt sich in der Regel um Adenokarzinome, die eine drüsige Differenzierung zeigen und Muzin sezernieren.

Der Tumor metastasiert bevorzugt auf lymphogenem Wege [Tannapfel et al. 2001].

Die Inzidenz des Cholangiokarzinoms variiert je nach geographischer Region zwischen 1-7,3/100000 Einwohner [Schmielau et al. 1997]. Männer erkranken häufiger als Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 55 Jahren.

Als Risikofaktoren des CCC gelten Choledochus- bzw. intrahepatische Gallensteine, zystische Gallenwegsveränderungen, parasitäre Erkrankungen des Gallenwegssystems (Leberegel, Trematoden), kongenitale Fibrose, Thoriumdioxid (Thorotrast[®] - Kontrastmittel, α -Strahler) und chemische Substanzen wie Dioxine und Nitrosamine. Zudem stehen Medikamente wie Isoniacid, Methyldopa, orale Kontrazeptiva und andere Steroide im Verdacht, das relative Risiko für das Cholangiokarzinom zu erhöhen. [Schmielau et al. 1997; Tannapfel et al. 2001] Desweiteren haben sich die Colitis ulcerosa und die primär sklerotisierende Cholangitis (PSC) als wichtige Risikofaktoren herauskristallisiert. Das Risiko eines Patienten mit PSC in den ersten 10 Jahren nach Diagnosestellung an einem CCC zu erkranken liegt bei 30% [Ito et al. 1988; Rosen et al. 1991; Silvain et al. 1995].

Interessanterweise ist die Gallenflüssigkeit in der Lage EGF-Rezeptoren zu aktivieren. Dies geschieht über die Produktion von TGF α und kann somit auch zur Erklärung eines vermehrten Zellwachstums herangezogen werden [Su et al. 2001; Werneburg et al. 2003]. Aus ersten Studien geht zudem hervor, dass das Stroma eine wichtige Bedeutung für die Progression der Tumorerkrankung hat. Hieraus lassen sich Verbindungen zu den Matrixmetalloproteinasen und anderen Substanzen der extrazellulären Matrix herstellen, die eventuell in Zukunft als Marker eingesetzt werden können. [Karadag et al. 2008].

Tumormarker wie CA 19-9, CEA und CA 50 können erhöht sein und eignen sich dann zur Verlaufsbeobachtung oder Therapiekontrolle [Schmielau et al. 1997].

Das Leitsymptom des CCC ist ein zumeist schmerzloser Ikterus. Es können Pruritus, abdominelle Schmerzen, Inappetenz mit ungewolltem Gewichtsverlust, Fieber, Schüttelfrost und selten eine schmerzlose, palpable Gallenblase (Courvoisiersches Zeichen) hinzukommen.

Laborchemisch ist eine Erhöhung der Cholestaseparameter (γ -Glutamyltransferase, alkalische Phosphatase, Gesamtbilirubin) typisch. Zusätzlich kann es zu einer Anämie, Hypalbuminämie und verlängerten Prothrombinzeit in Folge der schleichenden Leberfunktionsstörung kommen. Die Diagnosesicherung gelingt häufig erst in fortgeschrittenem Stadium mittels bildgebender Verfahren wie der Sonographie, der Computertomographie, der Magnetresonanztomographie (MRT) und der Magnetresonanztomographie-Cholangio-Pankreatikographie (MRCP). Invasive diagnostische Verfahren sind die endoskopisch retrograde Cholangiographie (ERC) und die perkutane transhepatische Cholangiographie (PTC).

Die Sonographie ist hierbei ein weiterer Schritt zur Differenzierung des Verschlussikterus. In aller Regel stellt sich ein nicht zirrhotisch verändertes Lebergewebe mit einer proximal des Verschlusses bestehenden Gallengangsdilatation dar. Distale Cholangiokarzinome lassen sich aufgrund von Überlagerungsartefakten selten sonographisch darstellen. Sie lassen sich bevorzugt mit der ERC diagnostizieren. In den letzten Jahren hat aber auch die Cholangio-Magnetresonanztomographie (MRT) stark an Bedeutung gewonnen und gehört heute zum Goldstandard. Besteht der dringende Verdacht auf ein Cholangiokarzinom, kann mittels Kontrastmittel das Gallengangssystem dargestellt werden. Malignitätskriterien wie z.B. das exophytische (in die Gallenwege) Wachstum von Tumoren, sowie unregelmäßige Tumorbegrenzung können so beurteilt werden. Die Computertomographie dient im Besonderen der Diagnostik und Beurteilung der Tumorausdehnung in Gallengänge, Leber und hiliäre Gefäße sowie der Fernmetastasen.

Zur histologischen Sicherung können Feinnadelaspirationsbiopsien (ultraschallgesteuert), Knipsbiopsien, sowie zytologische Untersuchungen der Gallenflüssigkeit erfolgen. Es besteht das Risiko der Tumorstreuung, sodass bei kurativem Therapieansatz auf eine präoperative Histologie verzichtet werden sollte. [Schmielau et al. 1997; Witzigmann et al. 2008]

1.2. Therapiestrategien

Intrahepatische Gallengangskarzinome haben auch bei chirurgisch möglicher Intervention eine sehr schlechte Prognose. Häufig kann durch strangförmige Ausbreitung des Tumors und Infiltration in benachbarte Gefäßstrukturen keine R0-Resektion erreicht werden. Extrahepatische Karzinome, wie auch der sogenannte Klatskin-Tumor, weisen dagegen eine wesentliche bessere Prognose auf. Die Resektionsraten liegen hier bei 20-50%, wobei die Raten der R0-Resektion zwischen 40-85% schwanken. Bei den proximalen Cholangiokarzinomen stellt die Leberteileresektion mit Entfernung der ableitenden Gallenwege die Methode der Wahl dar. Distale Gallengangskarzinome erfordern ein chirurgisches Vorgehen ähnlich den Verfahren zur Resektion von Tumoren des Pankreaskopfes oder der Ampulla Vateri. Nach chirurgischer Resektion wurden durchschnittliche Überlebenszeiten von 12-24 Monaten erzielt [Schmielau et al. 1997; Weber et al. 2007].

Leider ist das CCC im Anfangsstadium häufig asymptomatisch, so dass die meisten Patienten bei Diagnosestellung inoperabel sind. Bei Inoperabilität werden Palliativmaßnahmen (externe und intraoperative Strahlentherapie, Stents, biliodigestive Anastomosen etc.) eingesetzt, um den Abfluss der Gallenflüssigkeit zu gewährleisten und damit die Lebensqualität zu verbessern [Kaiser et al. 2008, Witzigmann et al. 2008]. Die durchschnittliche Überlebenszeit für inoperable Tumore beträgt je nach Stadium etwa 8 bis 15 Monate [Weber et al. 2007].

Eine Lebertransplantation wird aufgrund der hohen Rezidivrate, bedingt durch die notwendige Immunsuppression, im Allgemeinen abgelehnt [Pichlmayer et al. 1995].

Neuere Daten belegen allerdings, dass für bestimmte Patientengruppen (z.B. intrahepatisches Cholangiokarzinom ohne hiliäre Beteiligung) die Lebertransplantation in Zukunft wieder eine Therapieoption darstellen könnte [Sotiropoulos et al. 2008]. Seit 2007 wurden die Richtlinien zur Lebertransplantation für Patienten mit Cholangiokarzinomen nach Artikel 16 des Transplantationsgesetzes geändert. So wurde die Lebertransplantation für Patienten mit nicht resektablen kleinen (<3cm) M0 Tumoren, deren Malignität durch Zytologie oder Biopsie gezeigt werden konnte, ermöglicht. Studien der Mayo Clinic (Rochester/USA) favorisierten eine neoadjuvante Radiochemotherapie vor geplanter Lebertransplantation und erzielten bei einem sehr selektierten Patientengut von 38 Personen mit kleinen nodal negativen Tumoren eine 5-JÜR von 82% [Witzigmann et al. 2008].

Eine standardisierte Chemotherapie existiert allerdings zurzeit nicht. Einige wenige Studienergebnisse mit einer adjuvanten Kombinationstherapie aus Mitomycin C und 5-Fluorouracil lassen erste Hinweise auf eine bessere Prognose erkennen. Die 5-Jahres-Überlebensraten steigen auf 27% [Takada et al. 2002]. Auch Grüntee-Extrakte (Wirkstoff Epigallocatechin-gallate), als adjuvante Wirkverstärker einer Chemotherapie mit Gemcitabine, 5-FU oder Mitomycin C, geben in ersten *in vitro* und *in vivo* Experimenten neue Hoffnung auf ein längeres Gesamtüberleben [Lang et al. 2009].

Einzelfallberichten zufolge gibt es aber trotz inoperabler Ausgangssituation einige Langzeitüberlebende. So berichten Takemura et al. über einen Patienten mit lokal weit fortgeschrittenem Tumorgeschehen, der dank oraler Chemotherapie (tegafur-uracil) und externer Radiatio (50,4Gy) bereits 11 Jahre komplikationsarm überlebte [Takemura et al. 2008].

1.3. Matrixmetalloproteinasen (MMP`s)

Die Matrixmetalloproteinasen (MMP`s) sind Zn^{2+} - und Ca^{2+} -abhängige Endopeptidasen. Sie werden auch Matrixine genannt und gehören zu einer großen Gruppe von Proteasen, der „Metzincin Superfamilie“. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind Adamalysine, Seralysine und Astacins.

MMP`s wurden erstmals von Gross und Lapiere 1962 bei Experimenten zur Kaulquappen-Metamorphose beschrieben [Gross & Lapiere 1962].

Innerhalb von 40 Jahren wurden weitere Enzyme dieser Familie gefunden und charakterisiert. Als bislang letztes Mitglied der MMP`s wurde 2001 MMP-28 entdeckt [Lohi et al. 2001].

Es wurde von Ries 1995 vorgeschlagen die MMP`s entsprechend ihrer Substratspezifität in verschiedene Gruppen zu unterteilen [Ries et al. 1995]:

Gruppen	MMP's
spezifische Kollagenasen	MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18
Gelatinasen	MMP-2, MMP-9, MMP-22
Stromalysierende MMP's (Stromelysine)	MMP-3, MMP-10, MMP-11
Matrilysine	MMP-7, MMP-26
Elastasen	MMP-12
Membrangebundene MMP's (MT-MMP's)	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25
unspezifische Proteasen	MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27, MMP-28

Tab. 1.3.1: Einteilung der Matrixmetalloproteinasen nach ihrer Substratspezifität.

MMP's lassen sich durch die folgenden Eigenschaften charakterisieren:

Ihnen allen gemeinsam ist das Vorhandensein eines Zinkatoms im aktiven Zentrum [Schröder et al. 2001; Fischer et al. 2004]. Die katalytische Domäne, die durch ein Zink-Bindungsmotiv charakterisiert ist, enthält drei Histidin-Reste, die eine koordinative Bindung mit dem Zink-Ion eingehen.

Des Weiteren lassen sich Glutaminsäurereste nachweisen, denen eine wichtige Rolle im katalytischen Prozess zugestanden wird. Über eine so genannte Hinge-Region (Scharnier) ist die katalytische Domäne mit der Haemopexin Domäne verbunden [Kuzuya et al. 2003].

Bei fast allen MMP's lässt sich diese Region, die für die Erkennung von Oberflächenrezeptoren und für die Substratspezifität verantwortlich gemacht wird, nachweisen, wobei die Strukturähnlichkeit zum Häm-bindenden Protein namensgebend ist.

Die MMP's werden als Proenzyme sezerniert und durch die Abspaltung der 'Leader'-sequenz aktiviert. Diese enthält das konservierte Sequenzmotiv PRCGVPNPD. Mutationen in dieser Region könnten zu Spontanaktivierungen führen.

Zusätzlich wird die MMP-Sekretion auf verschiedenen Ebenen modifiziert. So induziert beispielsweise die vermehrte Ausschüttung von IL-1 die Transkription und sorgt damit für eine gesteigerte Expression von diversen MMP's [Conca et al. 1989; Fini et al. 1998].

Modulatorischen Einfluss hat nachweislich auch TGF- β 1. In Untersuchungen u.a. am cholangiozellulären Karzinom konnten sowohl inhibitorische [Ramont et al. 2003] als auch stimulatorische Effekte auf die Synthese von MMP's und Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) gezeigt werden [Menke et al. 2002; Lu et al. 2003].

Bei der Aktivierung von MMP's handelt es sich um ein komplexes Geschehen, das noch nicht vollständig aufgeklärt und verstanden ist. Ein Modell ist in Abb. 1.3.1 dargestellt.

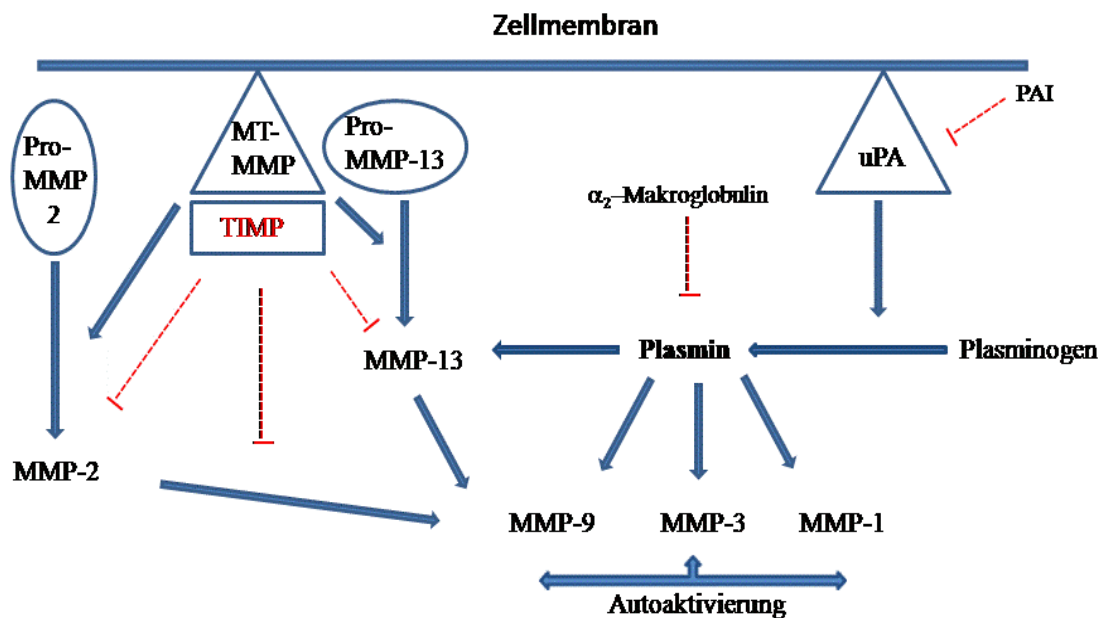


Abb. 1.3.1: Extrazelluläre Aktivierungskaskade der MMP's (Autoaktivierung, Aktivierung durch Plasmin, uPA und Membranständige MMP's) und Möglichkeiten der endogenen Hemmung (PAI, TIMP und α_2 -Makroglobulin). (Abb. weiterentwickelt nach Schröder 2001.)

Ein spezifischer Aktivator ist die Serinprotease uPA (Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator), die über die Spaltung von Plasminogen zu Plasmin MMP-1, -3, -9 und -13 aktiviert. Membranständige Formen wie z.B. MT-1 MMP (MMP-14) können die Proenzyme von MMP-2 oder MMP-13 aktivieren [Knauper et al. 1998]. Hierbei scheint die transmembrane Domäne eine wichtige Rolle sowohl bei der Verankerung der Enzyme in der Zellmembran als auch bei der Aktivierung anderer MMP's zu spielen [Sato et al. 1997].

Untersuchungen lassen zudem den Schluss zu, dass es eine Autoaktivierung von aktiven und inaktiven MMP's untereinander gibt [Cowell et al. 1998].

Um das Gleichgewicht zwischen Abbau und Aufbau der EZM aufrechtzuerhalten, existieren endogene unspezifische Inhibitoren wie z.B. das Alpha₂-Makroglobulin - ein „Akutphase“ – Protein, oder der Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI), der durch die Hemmung von pro-uPA / uPA die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin verhindern kann. Desweiteren gibt es spezifischere MMP-Inhibitoren (TIMP - tissue inhibitors of metalloproteinases), die über die Bildung eines MMP-Inhibitor-Komplexes die Substratbindung verhindern [Hornebeck 2003; Murphy 2003].

MMP's sind in der Lage native oder denaturierte Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) zu spalten. Dies kann physiologisch z.B. während der Embryogenese, Entzündungs- oder Wundheilungsprozessen stattfinden oder sich im Rahmen pathologischer Abläufe widerspiegeln, wenn es sich um Tumormetastasierung oder die Entstehung der Rheumatoiden Arthritis und des Lungenemphysems handelt [Clark et al. 2003].

Die Vorgänge bei der Metastasierung von Tumoren sind in vielen Studien untersucht worden. Eine erhöhte MMP-Aktivität konnte unter anderem in Tumorgewebe von kolorektalen, Lungen-, Mamma- und Pankreaskarzinomen festgestellt werden [Hewitt et al. 1991; Yamamoto et al. 2001; Campo et al. 1992].

Hierbei scheint die Menge und Aktivität, der im Tumorgewebe nachgewiesenen MMP's, mit der Aggressivität und Invasivität der Karzinome zu korrelieren. Weiterhin wird ein Ungleichgewicht zwischen MMP's und ihren natürlichen Inhibitoren für die metastatische Potenz von Tumoren verantwortlich gemacht [Jo Chae et al. 2004; Xiao et al. 2004].

Die Fähigkeit der MMP's verschiedene Komponenten der EZM zu zersetzen, ermöglicht es den Tumorzellen die Basalmembran zu durchbrechen und Zugang zum intravasalen oder intralymphatischen Raum zu erlangen. Von hier aus können die Tumorzellen in den gesamten Organismus gelangen, um zumeist über Sinusoide der Leber oder Kapillaren der Lunge die Blutbahn wieder zu verlassen bzw. über die Lymphbahnen den nächstgelegenen Lymphknoten zu erreichen. Nach Migration in das örtliche Bindegewebe kommt es zur Vermehrung der Zellen und zur Entstehung einer Metastase [Waxman et al. 1992; Murray et al. 2004].

Große Bedeutung wird den MMP's auch bei der Neoangiogenese und Tumervaskularisation beigemessen, vor allem MT1-MMP, MMP-2 und MMP-9 sollen bei diesen Prozessen eine wichtige Rolle spielen [Lakka et al. 2003; Chantrain et al. 2004; Kondo et al. 2004]. Die proteolytische Aktivität dieser Matrixmetalloproteinasen ermöglicht nicht nur die Tumorzellmigration, sondern auch das Einsprossen neuer Gefäße, durch eine erhöhte vaskuläre Permeabilität und eine gesteigerte Sekretion proangiogenetischer Moleküle in Tumorzellen und aktivierten Makrophagen (MMP-9, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α und TGF- α) [Bauvois 2004].

1.4. Synthetische MMP-Inhibitoren (MMPI) in der humanen Krebstherapie

Nach Entdeckung der MMP's und ihrer physiologischen Inhibitoren versuchte man synthetische Inhibitoren herzustellen, um auf diesem Wege neue Substanzen für die onkologische Therapie zu entwickeln. Zunächst nahm man an, dass vorwiegend Karzinomzellen für die Produktion von MMP's verantwortlich waren und diese eine wichtige Funktion bei Metastasierungsvorgängen und Tumorinvasion inne hatten.

Es wurden MMPI produziert, die *in vitro* und in Tiermodellen Effektivität demonstrieren konnten [Nelson et al. 2000].

Der erste in dieser Form entwickelte und in einer klinischen Phase I – Studie eingesetzte synthetische MMPI war Batimastat (BB94) der Firma British Biotech [Eccles et al. 1996]. Doch aufgrund der chemischen Eigenschaften war BB94 nicht oral applizierbar und wies eine geringe *in vivo* - Stabilität auf.

Die Weiterentwicklung brachte Marimastat hervor [Rosemurgy et al. 1999; Miller et al. 2002]. Es hatte deutlich bessere chemische Eigenschaften, enttäuschte allerdings in klinischen Phase II - Studien zum Lungen-, Magen- und Ovarialkarzinom durch fehlende Effektivität und ergab keine Überlebensvorteile gegenüber Gemcitabine in einer Studie zum Pankreaskarzinom [Bramhall et al. 2002]. Beide Substanzen besaßen außerdem erhebliche Nebenwirkungen, u.a. im muskuloskeletalen Bereich.

Ein Umdenken in der Strategie führte zur 2. Generation von MMPI, die in ihrer Struktur keine Ähnlichkeit mit endogenen MMPI's aufwiesen. Dazu gehörten Prinomastat (AG3340), Tanomastat (BAY12-9566), Rebimastat (BMS275291) und Periostat [Erlichman et al. 2001; Heath et al. 2001; Liu et al. 2003; Hande et al. 2004].

In klinischen Studien ließen sich wiederum keine signifikanten Überlebensvorteile erkennen und das von der Firma Bayer entwickelte Tanomastat zeigte in Studien zum kleinzelligen Bronchialkarzinom sogar eine geringere Lebenserwartung unter der Behandlung, sodass die Studie vorzeitig abgebrochen werden musste.

Der einzig zugelassene MMPI ist das Periostat, das zur Gruppe der Tetracycline gehört und bei Patienten mit Parodontitis eingesetzt wird.

Erstmals wurde von Basset et al. 1997 beschrieben, dass entzündungs- und tumorumgebende Stromazellen für die Hauptproduktion der MMP's verantwortlich sind. Lokale Fibroblasten werden durch ein endogenes von Tumorzellen produziertes Glykoprotein – EMMPRIN (Extracellular MatrixMetalloProteinase Inducer) zur Synthese von MMP's (vor allem MMP-1, -2, -3) stimuliert [Basset et al. 1997]. Dies führt zum Abbau von Komponenten der Basalmembran, sowie von EZM und somit zur Invasion von Tumorzellen in die unmittelbare Umgebung. Bei Eröffnung von Gefäße und Lymphabflußwegen kommt es zur Metastasierung [Biswas et al. 1995].

Dieses neue Verständnis für MMP's macht deutlich, weshalb die klinischen Studien zum Marimastat, Prinomastat und Tanomastat Ende der '90 Jahre nicht so erfolgreich verliefen wie erwartet. Die o.g. Substanzen wurden bei Patienten eingesetzt, die weit fortgeschrittene Tumorerkrankungen aufwiesen, also in einem Stadium indem eine Tumorausbreitung bereits stattgefunden hatte.

Desweiteren waren erhebliche Nebenwirkungen aufgetreten, die durch das erweiterte Wissen, um die Funktion der MMP's im Bereich der Neoangiogenese, Wundheilungs- und weiteren endogenen Prozessen erklärbar wurden.

Neue Studiendesigns mit diesen Substanzen sollten laut Zucker et al. 2004 in frühen Stadien von Krebserkrankungen in Kombination mit einer Standard-Chemotherapie durchgeführt werden. In Phasen der lokalen Invasion und ggf. Mikrometastasierung von malignen Tumoren könnten die synthetischen MMPI's ihre erwartete Wirkung entfalten.

1.5. TF 17-2

Karzinome von Lunge, Magen, Bauchspeicheldrüse, Gallenblase und Prostata hingegen haben nach wie vor eine schlechte Prognosen, da sie häufig resistent gegen die üblichen Chemotherapeutika sind und zumeist in späten Stadien diagnostiziert werden. Deshalb ist es wichtig neue Wege zu gehen, um wirksame Substanzen zu entdecken und zu entwickeln.

Da MMP's eine zentrale Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Malignomen spielen, stellt ihre Inhibition weiterhin einen möglichen Ansatz in der onkologischen Therapie dar.

Am Anfang eines langen Entwicklungsprozesses stand das Interesse möglichst viel über die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und MMP's zu erfahren und aus den gewonnenen Erkenntnissen „maßgeschneiderte“ Inhibitoren zu erzeugen.

Die Herstellung eines neuen Inhibitorstyps basiert nunmehr auf der genauen Kenntnis von Enzymstrukturen. Durch die Klonierung und Expression rekombinanter katalytischer Domänen einiger MMP's (MMP-8, MMP-9, MT1-MMP, MMP-13), sowie anschließender Prozessierung der aktiven Enzymdomänen wurden die Voraussetzungen für Kristallisationsstudien geschaffen.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse erfolgte die Entwicklung von MMP-Inhibitoren auf der Basis des Heterozyklus 1,3,4-Thiadiazin. Mittels Röntgenstrukturanalyse wurde der Bindungsmodus für Derivate des 1,3,4-Thiadiazins im Komplex des katalytischen Zentrums von MMP-8 (neutrophile Kollagenase) aufgeklärt. Die Bindung erfolgt an beiden Seiten der Substratbindungstaschen und zeigt einen exzeptionellen Bindungsmodus über den exozyklischen Stickstoff zum zentralen Zinkatom und eine Wasserstoffbrückenbindung zum Schwefel [Schröder et al. 2001] (s.o. Abb. 1.5.1).

Ausgehend von diesen neuen Erkenntnissen des spezifischen Inhibitor designs wurde durch T. Fischer (Arbeitsgruppe Prof. Tschesche, Bielefeld) ein neuer Inhibitorstyp mit einem 1,2,4 – Triazin Heterozyklus als Bindungsmotiv entwickelt. Diese Substanz weist als kompetitiver Inhibitor K_i -Werte im mikro- bis nanomolaren Bereich auf und konnte in Voruntersuchungen seine gute *in vitro* und *in vivo* Stabilität beweisen [Fischer et al. 2004].

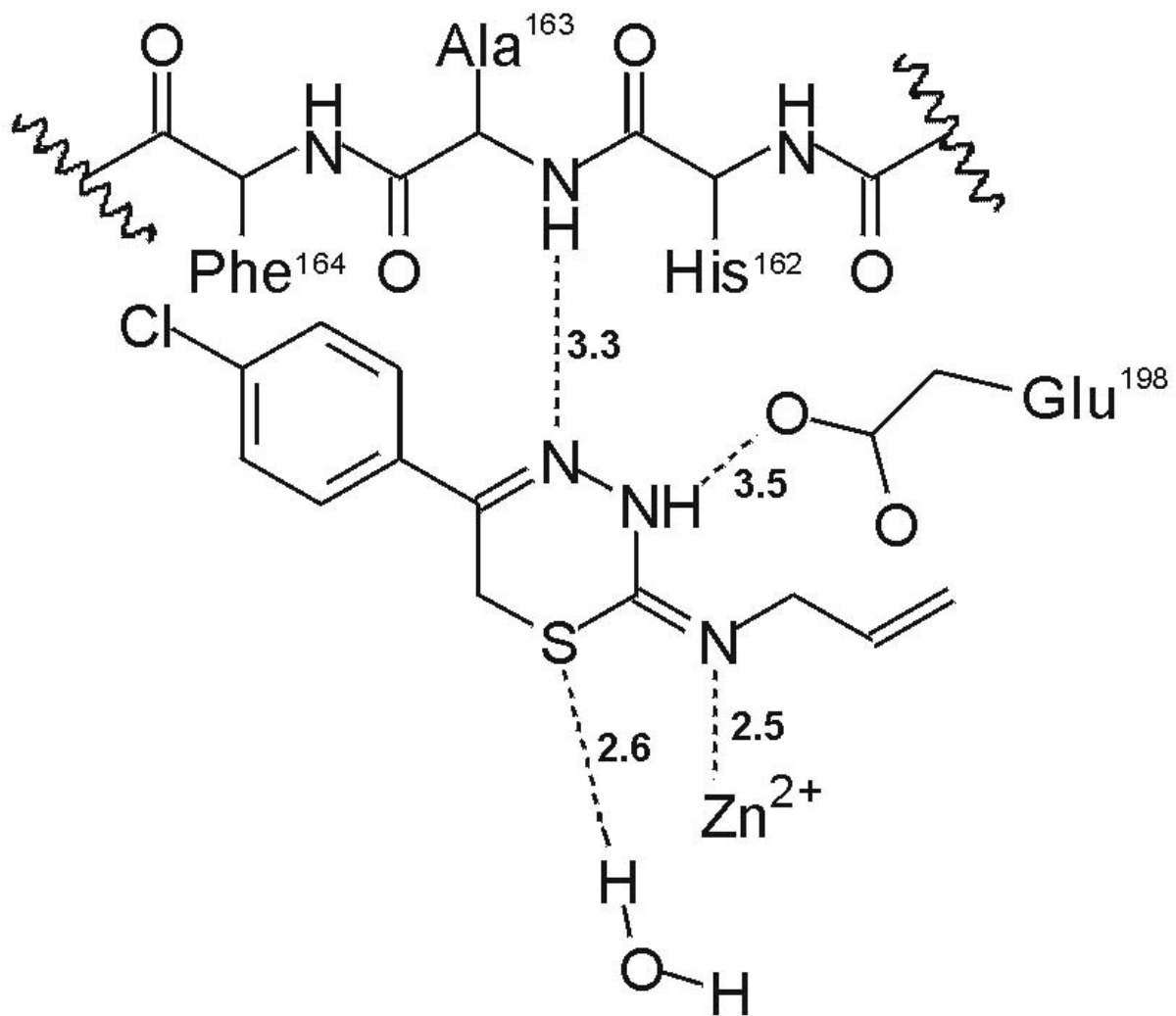
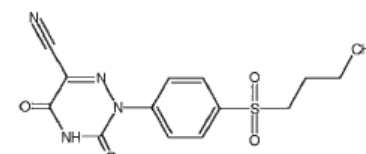


Abb. 1.5.1: 1,3,4-Thiadiazin – Bindungsmodus zum zentralen Zinkatom und Wasserstoffbrückenbindungen zum Schwefel- und Stickstoffatom [Schröder et al. 2001].

Die Aktivität von TF17-2 (2-[4-butylylsulfonyl]phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril) wurde anhand von biochemischen Methoden in zellfreien Systemen getestet. Hierzu wurden entweder MMP's als Gesamtprotein (MMP-7) oder als gekürzte Variante, welche die katalytische Domäne beinhaltet (cd), verwendet [Fischer et al. 2004].

Die biochemische Entwicklung und Testung der molekularen Wirksamkeit von TF17-2 erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Tschesche in Bielefeld [Schröder et al. 2001; Fischer et al. 2004].



	cdMMP-2	MMP-7	cdMMP-8	cdMMP-9	cdMMP-12	cdMMP-13	cdMMP-14
K_m [μ M]	9.1	1.9	5.9	1.8	27.3	7.5	6.8
K_i [μ M]	28.00	0.05	4.00	10.80	14.90	2.50	0.22

Abb. 1.5.2: K_m -Werte und K_i -Werte für verschiedene MMP's und des Inhibitor TF17-2. Links oben ist die chem. Struktur des MMP-Inhibitors TF17-2 angegeben (Abb. nach Kapischke et al. 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass MMP-7 und MMP-14 (MT1-MMP) bereits bei Inhibitorkonzentrationen im nanomolaren Bereich erfolgreich gehemmt werden konnten. MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-12 und MMP-13 wurden im mikromolaren Bereich inhibiert. MMP-2 wurde bei einer TF17-2 – Konzentration von 28 μ M inhibiert, das ist in dieser Testanordnung die höchste Inhibitorkonzentration, die bestimmt werden konnte.

Somit verfügt diese Substanzklasse über ein hervorragendes therapeutisches Entwicklungspotential. [Fischer et al. 2004; Kapischke et al. 2008]

1.6. Organspezifische Fibroblasten („stellate cells“)

Die ursprüngliche Annahme nur Tumorzellen wären zur MMP-Sekretion befähigt, ließ sich bei näherer Betrachtung nicht lange aufrechterhalten. Schon bald zeigte sich, dass die ortsständigen Stromazellen sowie einwandernde Immunzellen nicht nur zur Produktion von Kollagen und anderen Bestandteilen der EZM imstande sind, sondern auch proteolytische Enzyme sezernieren können. Im Zusammenhang mit einem Tumorgeschehens lassen sich die Stromazellen zur vermehrten Sekretion von MMP's stimulieren [Silvain et al. 1995; Bloomston et al. 2002; Bhowmick et al. 2004]. Sie produzieren nachweislich MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-11 und MMP-13. Für die MMP-9 und MMP-7 - Produktion sind hauptsächlich die Entzündungs- und Tumorzellen selbst verantwortlich. Eine Überproduktion

von Zytokinen wie IL-1, TNF- α u.a. im Gewebe kann durch inflammatorisch/toxische Einflüsse (z.B. Risikofaktoren des Cholangiokarzinoms siehe oben) hervorgerufen werden. Es erfolgt die Umwandlung hin zum so genannten „reaktiven Stroma“ [Coussens et al. 2002; Apte et al. 2004; Jackson et al. 2006].

Desweiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Tumor-Stroma-Interaktion einen Einfluss auf die Wirksamkeit bestimmter Krebstherapien ausübt. So wird von Mürköster et al. beschrieben, dass im Kokultivierungsmodell von Pankreaskarzinomzellen mit Fibroblasten versus der Einzelkultur eine Chemoresistenz gegenüber Etoposid nachweisbar war [Mürköster et al. 2004].

Stromazellen sind demnach ein wichtiger Faktor in der Entstehung, Progression und Aggressivität von Tumoren. Die per definitionem malignen Karzinomzellen können die Produktion der MMP's in den benignen Zellen modulieren.

Eine spezielle Art von Stromazellen, die organspezifischen Fibroblasten oder auch „stellate cells“, scheinen von besonderer Bedeutung für die oben genannten Vorgänge zu sein.

Diese Zellart, erstmals als Ito-Zelle (heute hepatische Sternzelle) in der Leber beschrieben, zeichnet sich durch die Bildung von ausgeprägten Zellfortsätzen aus, die die Zelle zur Migration befähigen. Zusätzlich sind sie in der Lage Vitamin A zu speichern, sowie EZM zu produzieren [Bhowmick et al. 2004]. Man erkannte, dass z.B. die durch Alkohol verursachten Leberzellschäden /-nekrosen zur Einwanderung von Immunzellen führen. Es werden Interleukine und Zytokine freigesetzt und die Ito-Zellen zur Umdifferenzierung in Myofibroblasten stimuliert. Dieser Prozess endet in einer ungezügelter Synthese von Kollagenen und anderen extrazellulären Matrixanteilen und ist für die Entstehung der Leberfibrose verantwortlich [Friedman et al. 1994].

Nachdem dieser Mechanismus entdeckt worden war, versuchte man „stellate cells“ auch in anderen Organen zu identifizieren. Man fand diese „fibroblast-like-cells“ unter anderem in der Lunge, der Bauchspeicheldrüse, in nervalen Geweben, im Knochen und im Bindegewebe [Bachem et al. 1998].

1997 wurde die Isolation von periazinären fibroblasten-ähnlichen Zellen aus der menschlichen Bauchspeicheldrüse von Saotome et al. 1997 beschrieben. Sie zeigten Charakteristika von aktivierten Myofibroblasten, wie die Expression von α -SMA (α -smooth muscle actin), und die Synthese von EZM Proteinen wie Kollagen I, III, Fibronectin, Desmin und Laminin. Einige Zeit später konnten Zellen aus humanem und murinem Pankreas isoliert werden, die Vitamin A speicherten und damit hepatischen Sternzellen (HSC) ähnlich waren [Bachem et al. 1998; Kruse et al. 2001].

Der Aktivierungsprozess der Zellen ist gekennzeichnet durch den Verlust der Vitamin A Speicherung in intrazellulären Fetttröpfchen und die zunehmende Expression von α -SMA.

So wurden dann auch an Pankreas Sternzellen (PSC) wichtige Daten in Zusammenhang mit der Expression von MMP's und „stellate cells“ gesammelt. Es konnte gezeigt werden, dass PSC MMP-2, MMP-9, MMP-13, TIMP-1 und TIMP-2 sezernieren [Phillips et al. 2003].

Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass „stellate cells“ im Rahmen von Entzündungsprozessen oder Tumorprogression eine aktive Rolle zukommt.

Am Modell des Pankreaskarzinoms konnten bereits konkrete Interaktionen zwischen Karzinomzellen und PSC gezeigt werden, die die These der parakrinen Stimulation der „stellate cells“ durch die Tumorzellen unterstützen [Bachem et al. 1998, 2005; Löhner M et al. 2001]. Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte in Experimenten zur Tumorzellmigration der Interaktion zwischen Tumorzellen und ortsständigen Fibroblasten Rechnung getragen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daraufhin eine experimentelle Anordnung gewählt, die Cholangiokarzinomzellen und humanen Gallenblasenfibroblasten, sowie deren Interaktion *in vitro* analysiert.

1.7. Kultursysteme

Ein Tumor *in vivo* ist umgeben von ortständigen Fibroblasten und extrazellulärer Matrix. Es kommt durch Aussenden von Botenstoffen zur Anlockung von Killerzellen und Makrophagen und damit möglichst zu einer Zerstörung der Tumorzellen.

Kann dies nicht bewerkstelligt werden, kommt es im weiteren Verlauf in vielen Fällen durch das Einwandern von Zellen zu einer Tumor umgebenden Fibrose. Noch nicht abschließend geklärt werden konnte die Frage, ob sich der Organismus auf diese Weise vom Tumor „abschotten“ möchte oder der Tumor sich durch diese Reaktion dem Einfluss des Immunsystems begrenzt entziehen kann [Coussens et al. 2002].

Wie bereits erwähnt gibt es zahlreiche Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Fibroblasten, die bedeutsam in den Prozess der MMP-Produktion und den Abbau von EZM eingreifen. Um diesen Effekt *in vitro* zu simulieren, kultivierte man Fibroblastenzellen und Tumorzellen in einem Kulturgefäß als adhärenzte Kokultur. Hierbei entsteht durch den direkten Kontakt zwischen beiden Zellarten eine umfangreiche Beeinflussung der Tumorzellen durch die Fibroblasten und umgekehrt. [Hauptmann et al. 2003; Sato et al. 2004]

Desweiteren existieren Versuchsanordnungen bei denen kein direkter Kontakt zwischen zwei Zelltypen (epithelial und mesenchymal) besteht, die aber durch ihre sezernierten Faktoren kommunizieren können. Solche Versuche kann man unter anderem mit sogenannten „Transwells“ gewährleisten. Es handelt sich um Filter-ähnliche Einsätze für Zellkulturschalen. Hierbei kultiviert man eine Zelllinie wie gewohnt in der Zellkulturschale, die andere im Transwell. Die Zelllinien sind räumlich voneinander getrennt, die produzierten Proteine allerdings haben durch die winzigen Poren der Transwells Kontakt mit den Zellen der jeweils anderen Zelllinie, sodass eine wechselseitige Beeinflussung möglich ist.

Ein ähnlicher Effekt lässt sich durch das Kultivieren einer Zelllinie mit den Überständen einer anderen Zelllinie simulieren. Es kommt jedoch nicht zu wechselseitiger „Kommunikation“ zwischen den Zelllinien, wie oben beschrieben, sondern zu einer einseitigen Stimulation durch sezernierte Botenstoffe.

Die Zellen werden auch in normalerweise gebräuchlichen Einzelkulturen gezüchtet, um einen Vergleich zur Kokultur zu erhalten. Hierbei kultiviert man in einem Kulturgefäß nur die Zellen einer Zelllinie. Die Herstellung von 3D-Zellaggregationen (Sphäroide) in einer Suspensionskultur ist möglich. Zellen orientieren sich dabei um eine frei bewegliche Matrix (z.B. Methylzellulose) herum und sind nicht wie in üblichen Zellkulturen adhärenz. Sie bilden kleine Zellklümpchen, die in besonderem Maße die *in vivo* Situation widerspiegeln [Santini et al. 1999; Sipos et al. 2002].

1.8. Ziele der Arbeit

Da sich das cholangiozelluläre Karzinom durch seine unbefriedigenden Langzeitergebnisse, sei es nach radikal-chirurgischer oder medikamentös onkologischer Therapie, auszeichnet, soll in den hier vorgestellten Untersuchungen ein weiterer Ansatz zu einer möglichen zukünftigen adjuvanten Therapie untersucht werden.

Das heutige Wissen über Vorgänge bei der Metastasierung von Tumoren weist den MMP's eine zentrale Rolle zu. Auch wenn in der Vergangenheit einige inhibitorische Substanzen in klinischen Studien nicht überzeugen konnten, so bleibt doch der Ansatz der MMP-Inhibition prinzipiell bestehen. Neue Erkenntnisse und Grundlagenforschungen auf dem Gebiet der MMP's, sowie die Herstellung „maßgeschneiderter“ Inhibitoren, eröffnen die Möglichkeit neue Maßnahmen zur adjuvanten Therapie zu untersuchen.

In der hier vorliegenden Arbeit soll dabei den oben genannten Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und ansässigen Fibroblasten durch die Variation von Wachstumsbedingungen Rechnung getragen werden. Die Modulation der Bedingungen durch Zugabe des Wachstumsfaktors TGF- β 1 oder des neu entwickelten MMP-Inhibitors (TF17-2) soll in folgenden Experimenten untersucht werden:

- Isolierung und Charakterisierung von humanen Gallenblasenfibroblasten, sowie Etablierung als Zelllinie
- Zellvitalitätsexperimente zur Einschätzung einer wachstumshemmenden bzw. toxischen Wirkung des neuen MMP-Inhibitors auf Tumorzellen und Fibroblasten
- Kokultivierung von Tumorzellen und Fibroblasten, sowie Untersuchung zum Einfluss dieser Kultivierungsbedingungen auf die Zellvitalität unter Zugabe des MMP-Inhibitors TF17-2
- Einfluss des neuen MMP-Inhibitors TF 17-2 auf die MMP- Proteinexpression und – sezernierung
- Nachweis der MMP-inhibierenden Wirkung im Invasionsassay

2. Material und Methoden

2.1. Material

PBS - T- Puffer (1fach): 140mM NaCl, 6,5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄ und 2,5mM KCl
auf 10l aqua dest. auffüllen, 0,1% Tween 20

TBS -T- Puffer (20fach): 160g NaCl, 4g KCl, 60g Tris, auf 1000ml aqua dest. auffüllen, anschließend auf einen pH von 7,4 mit konzentrierter HCl einstellen, steril filtrieren 0,1% Tween 20 auf 1000ml TBS-Puffer (1fach)

2.2. Zellkultur

2.2.1. Zelllinien: RPMI 7451, KiF5 und humane Gallenblasenfibroblasten (hGBF)

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um Zellen menschlichen Ursprungs. RPMI 7451 entstammte aus einem cholangiozellulären Karzinom, eine Zelllinie, die in der Weltliteratur weit verbreitet ist und ein schnelles Wachstum aufweist [Silvain et al. 1995]. Die humanen Gallenblasenfibroblasten wurden frisch aus einer Gallenblase isoliert, kultiviert und als neue Zelllinie etabliert (siehe 2.3 Isolierung von humanen Gallenblasenfibroblasten).

Die KiF5-Zellen entsprechen einer Vorhautfibroblastenzelllinie, die am Kieler Institut für Experimentelle Tumorforschung, Sektion für Molekulare Onkologie etabliert wurde [Kapischke et al. 2008].

2.2.1.1. Lösungen und Medien

Kulturmedien:

<u>RPME-1640 Medium:</u>	Invitrogen, Deutschland 1mM Natriumpyruvat, 2mM Glutamat, 50ml fötales Kälberserum (FCS, GIBCO)
<u>Fibroblasten-Medium:</u>	Fibroblast Growth Medium Kit, Promocell, Deutschland 1mM Natriumpyruvat, 2mM Glutamat, 10% FCS Supplement: 5µg/ml Insulin, 1ng/ml basic Fibroblast Factor, 50ng/ml Amphotericin B, 50µg/ml Gentamicin
<u>DMEM-Medium (low glucose):</u>	PAA Laboratories, Austria 1mM Natriumpyruvat, 2mM Glutamat, 10% FCS, 20mM HEPES, 2µg/ml Gentamicin, 2,5µg/ml Amphotericin B
<u>PBS - Puffer (1fach):</u>	140mM NaCl, 6,5mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5mM KH ₂ PO ₄ und 2,5mM KCl
<u>Trypsin-EDTA-Lösung:</u>	Trypsin, Invitrogen, Deutschland 5ml Trypsin-EDTA-Lösung auf 45ml PBS-T

2.2.2. Auftauen

Die zu kultivierenden Zellen wurden als Aliquots in DMSO in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, bei Raumtemperatur (RT) auf Eis aufgetaut, in Zentrifugationsröhrchen überführt und mit Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden drei Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert und die DMSO-haltigen Überstände abgesaugt. Die Pellets wurden dann in je 15 ml Medium resuspendiert und auf kleine Zellkulturflaschen (Nunc, Deutschland) ausgesät. Anschließend wurden sie in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-haltiger Luft und gesättigtem Wasserdampf kultiviert.

2.2.3. Kultivieren und Passagieren der Zellen

Für die Zellkultur wurden verschiedene Medien eingesetzt. Das für die Cholangiokarzinomzellen und die KiF5-Zellen verwandte Medium war RPMI 1640 mit 10% FCS. Die primären Gallenblasenfibroblasten wurden in speziellem Fibroblastenmedium (Promocell) kultiviert.

Alle 2 Tage wurden die Zellen mikroskopisch begutachtet, um die Konfluenz oder ein eventuelle Kontaminationen beurteilen zu können.

Ab einer Zelldichte von 70-80% wurden die Kulturen passagiert. Nachdem die Zellkulturen mit sterilem PBS-Puffer gewaschen worden sind, erfolgte die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden durch Zugabe von 10ml Trypsin-EDTA-Lösung für 5-10min auf eine große Zellkulturflasche mit einer Fläche von 175cm². Die nun nicht mehr adhärenen Zellen wurden zur Inaktivierung des Trypsins mit FCS-haltigem Medium versehen, in ein steriles Zentrifugenröhrchen (50ml, Falcon) überführt und drei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Nun konnte man die Zellen im Verhältnis 1:2 (hGBF und KiF5) bis zu 1:4 (RPMI 7451) auf Zellkulturflaschen neu aussäen oder zur Vorbereitung von Experimenten die Zellzahl ermitteln.

2.2.4. Zählen von Zellen

Das Zählen der Zellen fand in dem automatischen Zellzähler CASY 1 (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) statt. Dazu entnahm man 50µl der vorher gut resuspendierten Zellen und pipettierte sie in spezielle Zählröhrchen, die mit 5ml der CasyTon-Lösung befüllt waren. Diese Zählröhrchen wurden nochmals auf dem Rüttler gut durchgemischt und danach in die Zählapparatur gestellt. Hierin wurde ein bestimmtes Volumen der Zellflüssigkeit aufgesogen, die enthaltenen Zellen wurden beim Passieren einer Lichtschranke gezählt und auf 1ml hochgerechnet.

2.2.5. Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen einer 70-80% konfluenten großen Zellkulturflasche trypsinisiert, zentrifugiert und das Pellet mit je 3ml 10% DMSO in FCS resuspendiert und je ca. 1ml in sterile 1,5 ml Nunc Röhrchen gefüllt. Die Nunc Röhrchen wurden vor dem Einfrieren in einem auf 4 °C temperierten Einfrierbehälter vorgekühlt und bald darauf in einem –80 °C Gefrierschrank eingefroren. Später wurden die Aliquots in die Stickstoffbehälter überführt und in flüssigen Stickstoff bei –196 °C aufbewahrt.

Die Zellen wurden vierteljährlich und vor dem Einfrieren auf Kontamination mit Mycoplasmen getestet. Dies geschah mittels PCR von 48h - Mediumüberständen.

2.3. Isolierung von humanen Gallenblasenfibroblasten

Die Isolierung der Gallenblasenfibroblasten erfolgte aus Gallenblasen von Patienten, die aufgrund eines Steinleidens cholezystektomiert wurden. Die Patienten waren über die Weiterverwendung von Teilen ihrer Gallenblase informiert und stimmten dem Vorhaben zu. Die Proben wurden anonymisiert und die Fibroblastenkulturen der einzelnen Spender kombiniert um individuelle Abweichungen auszuschließen [Kapischke 2005].

Das Präparat wurde unter sterilen Zellkulturbedingungen von Mucosa und Serosa befreit und mit einem Skalpell in ca. 2x2mm große Stücke geschnitten. Diese wurden in eine Kulturschale mit 6 Vertiefungen überführt und jeweils in einen Tropfen Patientenserum (Citratserum) gesetzt. Danach wurde jedem Gewebestückchen (Explantat) ca. 5µl ThromborelS® (Dade-Behring, Marburg, Deutschland) zugegeben, um das Plasma zu koagulieren. Auf diese Weise wurden die Explantate fixiert. Anschließend wurden 2ml antibiotikahaltiges DMEM-Medium hinzugefügt und die Platten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Mittels Phasenkontrastmikroskopie wurde in den darauf folgenden Tagen ein Auswachsen von fibroblastenartigen Zellen aus dem Gewebe beobachtet, die mit Verlängerung der Kulturzeit einen dichten Zellrasen bildeten. Das Medium wurde in regelmäßigen Abständen gewechselt, und die Kultur aufrechterhalten bis die adhärennten Zellen nach 2-3 Wochen vom Gewebe befreit und mittels Trypsin-EDTA-Lösung von der Platte abgelöst wurden. Die Zellen wurden vereinzelt, auf Zellkulturflaschen mit 25 cm² Fläche ausgesät und in Fibroblastenmedium kultiviert.

Zur Charakterisierung der Zelllinien wurden diese auf Deckgläschen ausgesät, um sie mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung zu untersuchen.

2.4. Morphologische Charakterisierung von humanen Gallenblasenfibroblasten

2.4.1. Vorbereitung zur Immunfluoreszenz (Aussaat auf Coverslips und Fixierung)

Um die hGBF zu charakterisieren, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Dafür wurden runde sterile Coverslips (Deckgläschen) (coverslips, Ø 18mm, Dr. Junghans Medical, Deutschland) in Kulturschalen mit 12 Vertiefungen eingelegt. Die zu untersuchenden Zellen wurden trypsiniert, zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und gezählt. Je 300.000 Zellen wurden pro Deckgläschen ausgesät und für 24h im 37°C Brutschrank inkubiert. Nach 24h in Kultur wurden die Zellen mit PBS + 0,1% Azid gewaschen und durch Zusatz von 1ml eiskaltem Methanol für 10min bei -20°C im Gefrierschrank fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen für 2x5min mit TBS gewaschen und für mind. 1h (bei RT) blockiert.

TBS: 25mM Tris HCL, pH 7.4, 140 mM NaCl

Blockierungslösung: TBS, 0,1% BSA, 0,2% Glycin

2.4.2. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Es wurde eine Doppel- oder Dreifach-Färbung durchgeführt. hierzu wurden die primären Antikörper gegen Markerproteine in TBS kombiniert und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde 3x10min mit TBS gewaschen. Die Fluoreszenzfarbstoff - gekoppelten Sekundärantikörper wurden kombiniert mit Bisbenzimid für 1h bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Wiederum wurde 3x10min mit TBS gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschen mit Eindeckmedium (SlowFade light, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) auf Objektträgern fixiert und bis zur weiteren Untersuchung dunkel im Kühlschrank gelagert.

Primärantikörper: Maus anti- α SMA (alpha smooth muscle actin), 1:500
Kaninchen anti-Desmin 1:50
Ziege anti-Vimentin, 1:400
Alle Primärantikörper waren von Sigma (USA).

Sekundärantikörper: Esel anti-Maus AlexaFluor 555, 1:1000 (Molecular Probes)
Esel anti-Kaninchen AlexaFluor 488, 1:1000 (Molecular Probes by Invitrogen, UK)
Esel anti-Ziege CY5, 1:250 (Dianova, Deutschland)
Bisbenzimid 0.5mg/ml, 1:400 (Sigma, USA)

2.4.3. Konfokale Laserscanningmikroskopie

Die Analyse erfolgte mit einem LSM510 Laser Scanning Mikroskop der Fa. Carl Zeiss (Jena). Die Immunhistochemische Untersuchung, sowie die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten und wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau PhD Marie Luise Kruse.

2.5. *In vitro* - Experimente

Um die Zytotoxizität von TF17-2 zu untersuchen, wurden verschiedene *in vitro* Tests (Ez4U, ³H-Thymidin-Assay und Jam-Assay) durchgeführt. Zur einheitlichen Auswertung wurde der Experimentalansatz immer nach dem gleichen Schema angesetzt:
Mediumkontrolle, 30 μ M TF17-2, 60 μ M TF17-2, 300 μ M TF17-2 und 3mM TF17-2.

2.5.1. Aussaat: Monolayer

Kokulturen

Für die Toxizitätstests sollte die Fibroblastensuspension 200.000 Zellen pro ml, die Tumorzellsuspension 100.000 Zellen pro ml und die Kokultur 200.000 Fibroblasten plus 100.000 Tumorzellen pro ml enthalten. Je 100µl wurden dann in jede Vertiefung (20.000, 10.000 oder 30.000 Zellen/Vertiefung) einer 96-Loch-Kulturplatte ausgesät und 24h im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit sterilem PBS gespült und mit dem MMP-Inhibitor TF17-2 in Gegenwart von Medium inkubiert. Das Inhibitorgranulat wurde dazu in DMSO gelöst. 3,6mg TF17-2 auf 30µl DMSO ergab eine 300mM konzentrierte Stammlösung des Inhibitors. Durch eine Verdünnungsreihe stellte man mit RPMI-Medium folgende Inhibitor-Konzentrationen her: 3mM, 300µM, 60µM, 30µM.

Neben einer Mediumkontrolle (RPMI-Medium) wurden nun diese TF17-2 Konzentrationen zu den Zellen pipettiert und für weitere 24h inkubiert.

Um eine Kokultur zu erhalten, wurden 20.000 Fibroblasten plus 10.000 RPMI 7451 zusammen in ein Mikrotiterplattenwell gegeben. Unter diesen Kulturbedingungen haben die Tumorzellen direkten Kontakt zu den Fibroblasten erhalten und somit eine *in vivo* - ähnliche Situation erzeugt, bei der sich die Zellen gegenseitig beeinflussen.

2.5.2. Kolorimetrischer Zellvitalitätstest (Ez4U)

Der Ez4U-Assay ist ein nicht radioaktiver Zytotoxizitätstest. Es ist eine Methode zum Nachweis der Zellvitalität. In lebenden Zellen kann aufgrund einer Farbänderung von aufgenommenen Tetrazoliumsalzen und Umwandlung in Formazonderivate die mitochondriale Enzymaktivität nachgewiesen werden (Ez4U, Biomol, Deutschland).

Das Prinzip beruht auf der Reduktion von Tetrazolium, was zu einer intensiv roten Farbentwicklung führt, die fotometrisch gemessen werden kann.

Die Zellen wurden in RPMI-1640 Medium, welches 10% FCS enthielt, in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen über Nacht kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und es wurde neues Medium (FCS-frei oder mit 10% FCS) mit TF17-2 in

verschiedenen Konzentrationen zugegeben und für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Im Falle der Inkubation über 48 Stunden wurde das Medium mit dem Inhibitor nach 24 Stunden erneuert. Danach wurde je 10µl Ez4U-Lösung (Ez4U-Kit, Biomol) pro Vertiefung hinzugegeben und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Absorption bei 450nm wurde mit Hilfe eines Photometers (Sunrise, Deutschland) gemessen. Die Ergebnisse wurden prozentual zur Kontrollgruppe berechnet.

2.5.3. Untersuchung zur DNA – Neusynthese (³H-Thymidin-Assay)

Mit dieser Methode wird die DNA-Neusynthese mittels Radioaktivitätseinbau (³H- markiertes Thymidin) untersucht. Mit dieser Methode können vitale sich teilende Zellen beurteilt werden.

Es wurden Zellsuspensionen mit Kultur-Medium 10% FCS hergestellt, die in 96well Platten über Nacht kultiviert wurden. Danach wurde das Kultur-Medium abgesaugt und die Zellen mit dem MMP-Inhibitor behandelt. Nach 18h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit ³H-Thymidin für 6h radioaktiv markiert. Dazu wurden 50µl ³H-Thymidin in 1ml RPMI-Medium (Starvierungsmedium) aufgenommen und je 10µl dieser Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände abgesaugt und die Platten 2x mit PBS-Puffer gespült. Dann gab man 100µl 0,1% SDS je Vertiefung hinzu, um die Zellen zu lysieren und die Stimulation zu stoppen. Die Platten wurden dann ca. 30min bei 37°C inkubiert.

Anschließend erntete man die Zellüberreste. Hierfür wurde das Vakuum im Zell-Harvester (Skatron, Lier, Norwegen) eingeschaltet, die Filtermatten beschriftet, eingelegt und genau justiert. Die Filtermatten wurden 1x mit aqua dest. vorgespült. Im Anschluß wurde eine Kulturplatte auf eine Filtermatte geerntet, 2x „heiß“ (herauswaschen der überschüssigen Radioaktivität) und 3x „kalt“ (zusätzliche Reinigung, keine überschüssige Radioaktivität vorhanden) gewaschen. Die bei Raumtemperatur getrockneten Filtermatten wurden in eine Folientüte gelegt, mit 2,5ml Szintillationslösung (Betaplant Scint Wallac, GMI, USA) gleichmäßig durchtränkt und eingeschweißt. Der Filterbeutel wurde in eine Kassette eingelegt und in den Flüssigkeitsszintillationszähler (Wallace, Programm 1, Dauer ca. 45min pro Platte) geschoben. Die Radioaktivitätswerte wurden in counts per minute (cpm) angegeben.

2.5.4. Untersuchung zur Fragmentierung von DNA (Jam-Assay)

Der Jam-Assay erfasst die DNA-Fragmentierung als Merkmal der Apoptose. Es wird getestet, ob es durch Zugabe des Inhibitors zu einem vermehrten Zelltod der Zellen kommt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nur hochmolekulare (intakte)³H-markierte DNA an den Filtermatten haften bleibt und kleinere ³H-markierte DNA-Fragmente (bedingt durch den Apoptose induzierten DNA-Abbau) weggespült werden.

Das Herstellen der Zellsuspensionen und das Aussäen auf die Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen geschahen analog zum ³H-Thymidin-Assay.

Nach 24h Inkubation im 37°C Brutschrank wurden die Zellen für 6h radioaktiv markiert (Vorgehen siehe ³H-Thymidin-Test). Danach wurden die Überstände abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS-Puffer gespült, anschließend wurden sie für 24h mit dem MMP-Inhibitor im Standardmedium bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit fügte man in jede Vertiefung 100µl 0,1% SDS hinzu und inkubierte noch einmal für 30min. Entsprechend des Vorgehens beim ³H-Thymidin-Assay werden die Zellüberreste geerntet und die noch enthaltene Radioaktivität gemessen.

2.5.5. Untersuchung zur Invasivität der Cholangiokarzinomzellen (Invasionsassay)

Für die Untersuchung des Invasionsverhaltens von Zellen stehen unterschiedlich gut etablierte Systeme zur Verfügung. In der Literatur häufig verwendet, werden experimentelle Ansätze, in denen die Zellen in einem Zweikammersystem räumlich voneinander getrennt sind und chemotaktisch miteinander kommunizieren, sogenannter „Boyden chamber assay“ [Boyden 1962]. Ein weiterer, ursprünglich für Endothelzellen entworfener Test, stellte die Grundlage für die folgenden Experimente dar [Casey et al 2003].

100.000 Fibroblasten (KIF5) wurden auf Platten mit 24 Vertiefungen ausgesät und im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis ein geschlossener Fibroblastenrasen („monolayer“) entstanden war. Nach Absaugen des Mediums und Spülung mit PBS-Puffer, wurden die Fibroblasten mit 500µl DMSO für eine Stunde im Brutschrank fixiert und permeabilisiert.

Die Kontrolle der Konfluenz, auch während der Permeabilisierung erfolgte mittels Mikroskopie. Anschließend wurde das DMSO abgesaugt und der Zellrasen wiederum mit Puffer gespült.

Auf die Schicht toter Zellen wurden nun je well 10.000 Tumorzellen (RPMI 7451) ausgesät und mit 500µl der MMP-Inhibitor-Lösung (TF17/2 in 3mM, 300µM, 60µM, 30µM Konzentration, Medium-Kontrolle je 0%FCS und eine Negativ-Kontrolle mit 10% FCS-Medium) für 24h, 48h und 72h inkubiert.

Die MMP-Inhibitor Inkubationslösungen für 48h und 72h wurden täglich vorsichtig abgesaugt, gespült und frische Inhibitor-Lösungen aufgetragen. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen, die Vertiefungen vorsichtig mit 1ml PBS gespült und 500µl 0,2% Trypanblaulösung (Sigma, USA) dazugegeben. Diese wurde für 10min inkubiert und danach wieder abgesaugt. Die permeabilisierten Fibroblasten wurden dabei im Gegensatz zu den lebenden Tumorzellen blau angefärbt. Es entstanden Invasionshöfe in der Fibroblastenschicht, deren Größe mit der proteolytischen Aktivität der Cholangiokarzinomzellen in Beziehung gesetzt. Die Platten wurden fotografiert (Axio-Vision, Zeiss, Deutschland) und die Invasionshöfe um die RPMI 7451-Zellen herum mit dem Programm Scion Image (Scion Inc., USA) ausgewertet [Casey et al. 2003].

2.6. Biochemische Methoden

Zur Herstellung von Überständen und Lysaten wurden 300.000 Fibroblasten (hGBF und KiF5) und 100.000 Tumorzellen (RPMI 7451) in Einzelkultur oder als Kokultur auf eine Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät und über 24h im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde ein Teil der Zellen mit dem MMP-Inhibitor TF17-2 (100µM/ml Starvierungsmedium), TGF-β (2ng/ml Starvierungsmedium) oder Starvierungsmedium (Mediumkontrolle) für 24h inkubiert.

Zur einheitlichen Auswertung der gelelektrophoretischen Untersuchungen wurde immer ein einheitliches Schema genutzt: Fibroblasten – hGBF oder KiF5 - (Mediumkontrolle, TGF-β, TF17-2), dann die Tumorzellen (Mediumkontrolle, TGF-β, TF17-2) und zum Schluss die Kokulturen (Mediumkontrolle, TGF-β, TF17-2) aufgetragen werden.

Um zu zeigen, dass die Zellen überhaupt stimulationsfähig sind, integrierten wir eine Stimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF-β in den Experimentaufbau.

2.6.1. Herstellung von Überständen und Lysaten

Die Zellkulturplatten mit den inkubierten Zellen wurden nach Ablauf der 24h auf Eis gelagert, der Überstand abgenommen, zentrifugiert und in beschriftete Röhrchen überführt, die bei -20°C eingefroren wurden. Zur eigentlichen Lyse wurden die Zellen nun mit 100µl eiskaltem RIPA-Puffer je Vertiefung für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, das Lysegemisch in Eppendorf Röhrchen überführt und zur Homogenisierung durch eine Spritze zehnmal aspiriert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -20 °C.

RIPA- Puffer: 0,1%SDS, 1% IGEPAL CA630, 0,5% Na- deoxycholat, mit PBS auf Endvolumen auffüllen, pro 50ml Endvolumen 1 CompleteTM- Protease-Inhibitor-Cocktail

CompleteTM-Protease-Inhibitor-Cocktail: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Nonidet[®]P40, 0,5% Natriumdesoxycholat, Protease-Inhibitoren (Roche, Schweiz)

2.6.2. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein kommerzieller Proteinassay der Firma Pierce (Rockford, Il, USA) verwendet.

Es wurde zuerst ein BSA Standardverdünnungsreihe auf eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) aufgetragen, außerdem führte man für alle Lysate und Überstände eine 4 fache Bestimmung durch. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 200µl BCA-Reagenz A/B (50:1) aufgefüllt, für 30min bei 37°C inkubiert und bei 562nm im Spektrophotometer (Sunrise, Deutschland) gemessen.

2.6.3. Westernblot

a) Probenvorbereitung

Die Konzentration der Lysate wurde mittels Proteinbestimmung ermittelt, daraufhin wurden 20µg Protein aus dem Lysat in ein beschriftetes Eppendorf – Röhrchen (0,5ml) überführt. Hinzugegeben wurden weiterhin 4fach Lämmli-Puffer (8µl) und RIPA-Puffer (auf 30µl aufgefüllt), zum Angleichen des Probenvolumens, sodass am Ende jedes Röhrchen 20µg Protein/ 30µl enthielt. Bei 95°C wurden die Proben nun erhitzt und somit denaturiert, kurz anzentrifugiert und aufgetragen.

b) Gel beladen & SDS-PAGE („Sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“)

- Proteinaufspaltung nach ihrer Größe im elektrischen Feld.

Zwei Fertiggele (4-20% Tris-Glycin, Amersham, UK) wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt. Bis zum Oberrand ließ man Laufpuffer zwischen die Gelplatten fließen. Nun wurde die Kammer bis zur Markierung mit Laufpuffer aufgefüllt und die Kämme aus den Gelen entfernt. Die Taschen wurden mit Laufpuffer gespült, um eventuelle Gelreste zu entfernen.

Jedes Gel hatte 10 Taschen, in die erste Tasche wurde jeweils der Marker pipettiert (Rainbow-Molekulargewichtsmarker, Amersham, UK), er diente der Kontrolle der Proteingrößen. Im Anschluss wurden die denaturierten Proben luftblasenfrei in die restlichen Taschen pipettiert. Die Proteine wurden nun 90min in einem elektrischen Feld (120V) nach ihrem Molekulargewicht getrennt.

c) Blotten

- Proteinübertragung auf eine Membran.

Für das Blotten („Abklatsch“) wurden zuerst Filterpapier und PVDF-Membranen (Whatman) zugeschnitten. Membranen wurden beschriftet und für 30sec in einer Schale mit Methanol benetzt, anschließend in destilliertem Wasser rehydriert.

Die durchgelaufenen Gele wurden aus der Elektrophorese-Apparatur entfernt, die Plastikplatten mit einem Spatel abgehoben und das Gel mit einem Skalpell vom Rand getrennt.

In einer mit Blottingpuffer gefüllten Schale weichte man Schaumgummimatten ein. Eine Matte wurde auf den Gelträger (Sandwich-Halterung) kathodenwärts aufgebracht.

Darauf folgten ein Filterpapier, das Gel und die Membran. Anschließend wurde wieder ein Filterpapier und eine Schaumgummimatte aufgelegt und alles luftblasenfrei mit dem anodenwärts gerichteten Gelträger verschlossen.

Der Gelträger wurde in die mit Blottingpuffer gefüllte Blotkammer eingespannt. Die Proteine aus der Gelmatrix werden nun im Eisbad 1h bei 400mA auf die Membran übertragen.

d) Blockieren

- Maskierung aller unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran.

Nach dem Blotten wurden die Membranen über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer inkubiert.

e) Detektieren

- Markierung ausgewählter Proteine mittels AK-Bindung.

Am nächsten Tag wurde die Membran mit PBS-T gespült und der Primärantikörper (Primär-Ak) angesetzt (9ml PBS-T, 1ml Blockierungspuffer und Antikörpervolumen nach Herstellerangaben). Die Blotmembran mit dem Primärantikörper wurde für 1h bei RT geschwenkt. Anschließend wurde 3x15min mit PBS-T gewaschen. Analog zum Primär-Ak wurde der Sekundärantikörper (Maus, Kaninchen) angesetzt und ebenfalls für 30min-1h bei RT geschwenkt. Der Waschvorgang wurde wie oben erwähnt wiederholt.

f) Entwickeln

- Visualisierung der markierten Proteine.

Zum Entwickeln wurde die Membran in eine Plastikhülle gelegt, die ECL-Entwicklerlösung (ECL™, Amersham, UK) vorbereitet, indem man Lösung A mit Lösung B im gleichen Verhältnis mischt, und dann gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 90sec wurde die Hülle geschlossen und in eine lichtundurchlässige Kassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde bei Rotlicht ein Röntgenfilm (Hyperfilm™, Amersham, UK) aufgelegt und nach 30-90sec entwickelt.

Lämmli-Puffer (4fach): 1,25 ml Tris/HCl (2 M), 8 ml SDS (10%), 308,5 mg Dithiotreitol (DTT), 2,02 ml Glycerin, 2 mg Bromphenolblau

Laufpuffer (10fach): 30,29g Tris- Base, 144,19g Glycin, 10g SDS (Natriumdodecylsulfat), auf 1000ml mit aqua dest. auffüllen

Blottingpuffer (10fach): 12,11 g Tris Base, 14,26 g Glycin, auf 1000ml mit aqua dest. auffüllen

Gebrauchslösung: 700ml aqua dest., 200ml Methanol, 100ml 10facher Blottingpuffer

Blockierungspuffer: 2,5g Magermilchpulver auf 50ml PBS-T

Antikörper:

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Sek.- Antikörper
β- Aktin	1: 20 000	Sigma, USA	Anti-Maus
MMP- 2	1: 200	Oncogene (IM33L),USA	Anti-Maus
MMP- 9	1: 500	Cell Signaling (3852), USA	Anti-Kaninchen
MT1- MMP	1: 2 000	Chemicon (AB 815), USA	Anti-Kaninchen
uPA	1: 1000	Oncogene (IM13L), USA	Anti-Maus

Die Westernblotgele wurden folgendermaßen beladen: Fibroblasten (Kontrolle, TGF-β, TF17-2), Tumorzellen (Kontrolle, TGF-β, TF17-2) und Kokultur (Kontrolle, TGF-β, TF17-2). Um einen besseren Vergleich zu erzielen, wurden die Cholangiokarzinomzellen (RPMI 7451) mit einer gewebefremden Fibroblastenzelllinie (KiF5) und mit organgleichen Fibroblasten (hGBF) kokultiviert.

2.6.4. Gelzymographie

Das Prinzip der Gelzymographie basiert darauf, dass, die zu den Gelatinasen gehörenden, MMP's (MMP-2, MMP-9) in einem Gel, welches als Substrat 0,1% Gelatine enthält, im elektrischen Feld zum Ort entsprechend ihres Molekulargewichtes laufen und dort als Gelatinasen das Substrat zersetzen. Durch die anschließende Färbung werden die verdauten Gelbereiche als weiße (nicht gefärbte) Banden dargestellt.

Zur Herstellung von Zymogrammen wurden die Überstände (FCS-freies Medium) der stimulierten Zellen verwendet. Diese wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenauftragspuffer (Novex Tris Glycin SDS) vermischt und 20µl dieser nicht erhitzten Mischung in eine Geltasche (10% Novex-Polyacrylamidgel, Invitrogen, Deutschland) pipettiert. In der Elektrophoresekammer lief das Zymographiegel 90min bei 121V im elektrischen Feld. Anschließend ließ man das Gel 30min in Renaturierungspuffer auf der Wippe schwenken und stellte es in Entwicklungspuffer über Nacht bei 60°C in den Brutschrank. Am darauf folgenden Tag wurde das Zymographiegel in Coomassielösung 45min lang blau eingefärbt und dann kurz in den Entfärber gelegt, um die durch die Gelatineverdauung entstandenen Banden sichtbar zu machen.

Coomassie- Färbung: 0,25% Coomassie Brilliant Blau (Sigma, USA), in Methanol 450ml, Essigsäure 100ml, H₂O 450ml

Entfärber: Methanol 450ml, Essigsäure 100ml, H₂O 450ml

Renaturierungspuffer: 2,5% Triton X-100 in Aqua dest.

Entwicklungspuffer: 5mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl pH 8

2.7. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS[®] 17.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Eine Versuchsanordnung bestand, wie bereits oben erwähnt, aus einer Kontrollreihe ohne Inhibitorzusatz und jeweils 4 Ansätzen mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (30 μ M, 60 μ M, 300 μ M und 3mM). Die Kontrollanordnung ist auf 100% gesetzt worden, die weiteren Testansätze wurden in Prozent zur Kontrolle berechnet. Mit Hilfe des SPSS Programms wurden Standardabweichungen und Signifikanzen ermittelt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Levene und Student T-Tests bestimmt. Ein p-Wert von $p < 0,05$ galt als signifikant. Es wurden für die statistischen Auswertungen jeweils 3-4 Einzelexperimente (n) herangezogen (Ez4U n=3, ³H-Thymidin-Assay n=3, Jam-Assay n=4).

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung und Charakterisierung von humanen Gallenblasenfibroblasten

Die Hauptproduzenten von Extrazellulär-Matrix sind Fibroblasten, die entsprechend desmoplastischer Reaktionen in Tumoren eine wesentliche Rolle spielen. Dieser Aspekt hat dazu geführt, humane Gallenblasenfibroblasten zu isolieren und in ihrer Interaktion mit Cholangiokarzinomzellen zu untersuchen.

Für die Isolierung von Fibroblasten aus der Gallenblase wurde das Auswachsen von Zellen aus Gewebe-Explantaten verwendet, wie es für Pankreasfibroblasten/-sternzellen beschrieben wurde [Kruse et al. 2001].

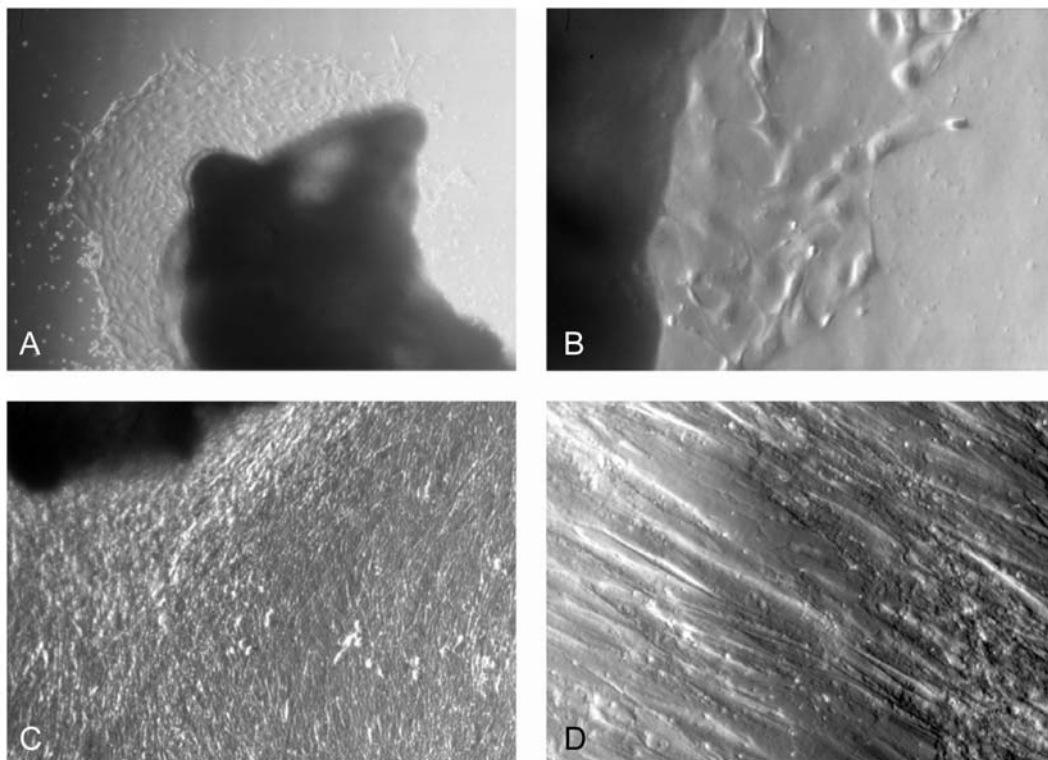


Abb. 3.1.1: Isolierung humaner Gallenblasenfibroblasten (hGBF), (A-B) Auswachsen einzelner Zellen aus einem Gallenblasenexplantat, (C-D) dichter Zellrasen von hGBF nach 3 Wochen Zellkultur (Auflichtmikroskopie: A - 50x Vergrößerung, C - 100x Vergrößerung, B+D - 200x Vergrößerung) Die photographischen Aufnahmen wurden von Frau PhD ML Kruse angefertigt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. – weitere Erklärungen siehe Text

In Abb. 3.1.1 ist die Sequenz der Vorgänge in der Explantatkultur dargestellt. Abb. 3.1.1A zeigt ein Gewebestückchen mit einem Saum von auswachsenden Zellen nach wenigen Tagen in Kultur. Die typische dreieckige bis spindelige Form der auswachsenden Zellen mit ausgeprägten Zellfortsätzen, die die Bewegung der Zellen darstellen, ist in Abb. 3.1.1B in einer stärkeren Vergrößerung zu sehen. Abb.3.1.1C zeigt ein Gewebestück mit einem dichten Rasen ausgewachsener Zellen und Abb. 3.1.1D zeigt die langgestreckte Spindelform der Zellen an der Wachstumsfront nach drei Wochen in Kultur.

Die auf diese Weise gewonnenen Zellen wurden weiter charakterisiert, um das Vorliegen glatter Muskelzellen auszuschließen, da die Gallenblase einen hohen Anteil an glatten Muskelzellen in der Tunica muscularis aufweist. Dies erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung für Markerproteine wie für hepatische Sternzellen (HSC) und Pankreasfibroblasten/-sternzellen beschrieben [Apte et al. 1998, Bachem et al. 1998, Kruse et al. 2001]. Abb. 3.1.2 zeigt die Färbung für Desmin, einem Intermediärfilamentprotein, das auch in HSC gefunden wird, die Alpha-Isoform des Glattmuskelaktins (α SMA) als Marker für die myofibroblastäre Differenzierung und Vimentin als Marker für Zellen mesenchymalen Ursprungs. Gefärbt wurden Zellen nach der 1.Passage, d.h. nach Zellvereinzlung (A-F) und nach mindestens 3 Wochen in Kultur (G-I). Es wurde deutlich, dass nach der 1.Passage alle Zellen positiv waren für Desmin (grün) und Vimentin (blau) wie in Abb.3.1.2 A zu sehen. Nur ein sehr geringer Anteil der Zellen zeigte eine Reaktivität für α SMA (rot), wie in Abb.3.1.2 D zu sehen. Daraus lässt sich schließen, dass die schnell mobilisierbaren Zellen fibroblastären Charakter aufweisen und keine glatten Muskelzellen aus der Tunica muscularis darstellen. Nach mehreren Wochen in Einzelzellkultur verändert sich das Erscheinungsbild der Zellen. In der indirekten Immunfluoreszenzfärbung für Desmin und α SMA zeigt sich, dass alle Zellen mehr oder weniger positiv für α SMA sind. In Abb 3.1.2 G-I ist neben der Positivität für α SMA (rot) auch die eher ausgebreitete Form der Zellen mit ausgeprägten Stressfasen (rot), die die Zellmorphologie stützen, zu sehen. Diese kulturbedingte Aktivierung der Differenzierung in myofibroblastäre Zellen ist auch für hepatische Sternzellen und Pankreasfibroblasten/-sternzellen bekannt.

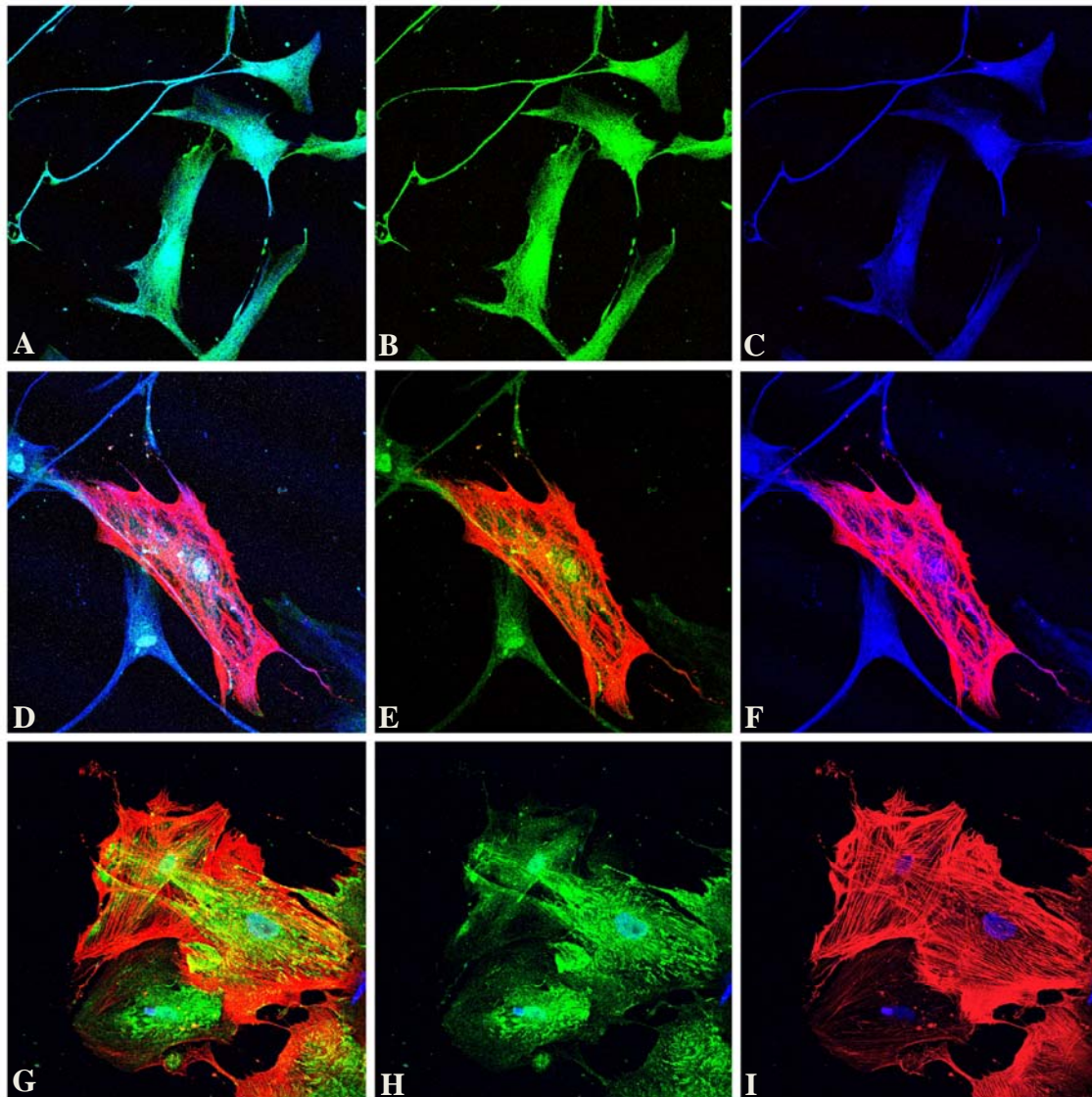


Abb.3.1.2: Differenzierung humaner Gallenblasenfibroblasten und deren Charakterisierung mittels spezifischer Markerproteine. Humane Gallenblasenfibroblasten nach 1.Passage / Vereinzelung (A-F), und nach weiteren 3 Wochen Zellkultur (G-I), indirekte Immunfluoreszenzfärbung für Desmin (grün), Vimentin (blau) und α SMA (rot). A-C zeigt eine Zellgruppe, die die Markerproteine Desmin und Vimentin exprimiert. D-F zeigt eine Zellgruppe der gleichen Passage, in der eine Zelle sowohl für Desmin und Vimentin, als auch für α SMA positiv ist. G-I zeigt Zellen in denen alle 3 Markerproteine von der Mehrzahl der Zellen exprimiert werden (Vergrößerung 400fach). Die photographischen Aufnahmen und immunhistochemischen Färbungen wurden von Frau PhD ML Kruse angefertigt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.2. Effekt von TF17-2 auf die Zellvitalität

TF17-2 ist ein neu entwickelter ein MMP-Inhibitor, der MMP-2, -7, -8, -9, -12, -13 und -14 hemmt. Jenseits dieser Wirkung sollte der Einfluss auf die Vitalität der behandelten Zellen in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit getestet werden.

Deshalb wurden verschiedene *in vitro* Tests durchgeführt. Dazu gehörten ein Vitalitätstest auf kolorimetrischer Basis, ein Verfahren zur Bestimmung der DNA-Neusynthese durch ³H-Thymidin-Einbau, sowie ein Assay zur Ermittlung der DNA-Fragmentierung als Zeichen der Apoptose.

TF17-2 wurde in DMSO gelöst. Vorhergehende Untersuchungen zu Pancreaskarzinomzellen ergaben keine Beeinträchtigungen der zellulären Wachstums durch den Lösungsmittler [Kapischke et al. 2008]

3.2.1. Kolorimetrischer Zellvitalitätstest (Ez4U)

Der kolorimetrische Test (Ez4U), der auf der Proportionalität von Mitochondrienaktivität und Zellzahl beruht, wurde nach dem Protokoll der Firma Biomol durchgeführt. Die Abbildungen 3.2.1a und 3.2.1b zeigen die gemessenen OD-Werte als Prozent der Kontrolle, d.h. der Wert der unbehandelten Zellen, der im Durchschnitt für RPMI 7451 bei OD=1,36, für KiF5 bei OD=1,41 und für die Kokultur bei OD=1,39 lag, wurde als 100% gesetzt.

Nach 24h zeigten sich für Konzentration bis 300µM TF17-2 für die Zelllinien KiF5 und RPMI 7451 nichtsignifikante Abweichungen von der Kontrolle. Auch die Kokultur der beiden Zelllinien führte zu diesem Ergebnis. Wie in Abbildung 3.2.1 a und b zu sehen, konnte erst bei einer Inhibitorkonzentration von 3mM eine signifikante Reduktion (bis zu 40% bei KiF5, $p < 0,001$; t-test) der Zellvitalität in der adhärenen Einzelzellkultur festgestellt werden. Dahingehend beläuft sich in der Kokultur die Abweichung zur Kontrolle auf etwa 10% ($p = 0,96$; t-test).

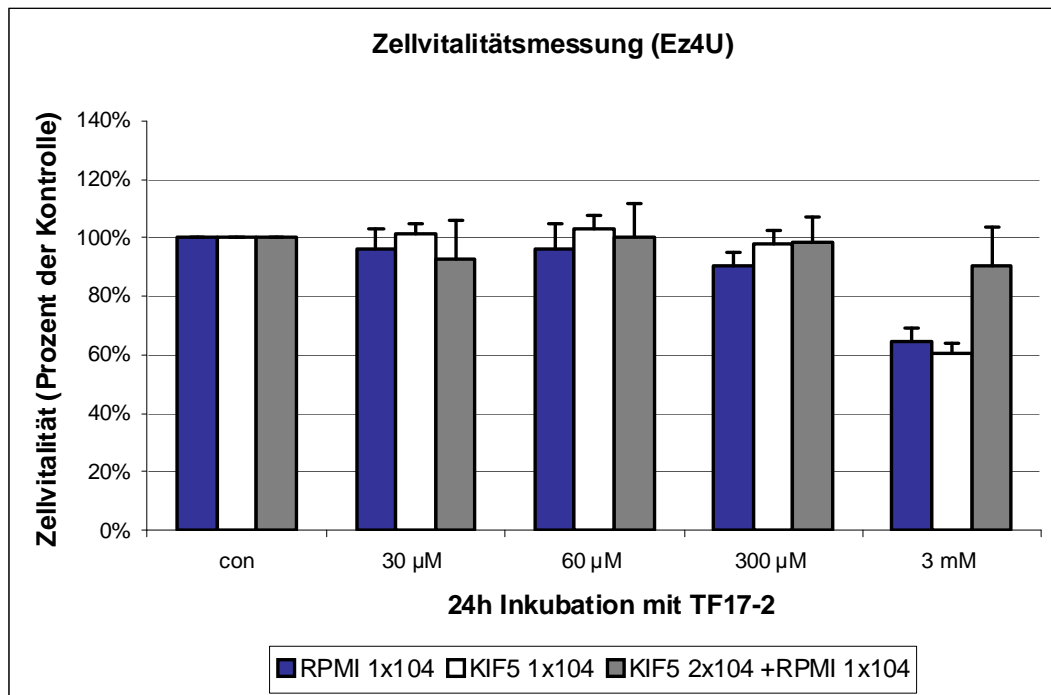


Abb. 3.2.1a: Zellvitalitätstest (Ez4U) an 10.000 Zellen RPMI 7451, 10.000 Zellen KiF5 und der Kokultur (20.000 Zellen KiF5 und 10.000 Zellen RPMI 7451) mit unterschiedlichen Konzentrationen TF17-2 über 24h.

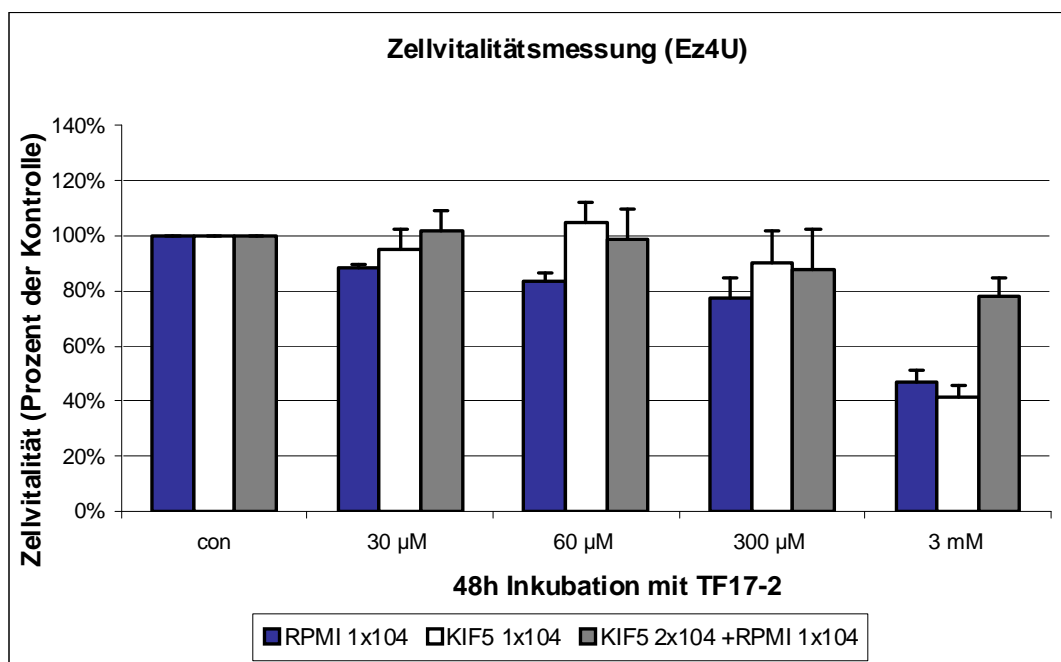


Abb. 3.2.1b: Zellvitalitätstest (Ez4U) an 10.000 Zellen RPMI 7451, 10.000 Zellen KiF5 und der Kokultur (20.000 Zellen KiF5 und 10.000 Zellen RPMI 7451) mit unterschiedlichen Konzentrationen TF17-2 über 48h. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Beim Vergleich der für 24h (a) und 48h (b) inkubierten Zellen fiel keine signifikante Zellvitalitätsseinschränkung bei Konzentrationen von 30 μ M und 60 μ M auf. In Abb. 3.2.1 b ist ein Zeiteffekt der Inkubation zu sehen. Mit steigender Konzentration nahm die Vitalität und Proliferationsfähigkeit der Fibroblasten kontinuierlich ab, die Fibroblasten schränkten ihre mitochondriale Aktivität bei einer TF17-2-Konzentration von 300 μ M um ca. 10% ($p=0,66$; t-test) und bei einer 3mM-InhibitorKonzentration um ca. 60% ($p<0,001$; t-test) ein.

Die Tumorzellen wiesen schon bei 300 μ M eine signifikante Proliferationseinschränkung von etwa 20% ($p<0,001$; t-test) auf und bei der 3mM-InhibitorKonzentration konnte eine signifikante Abnahme um ca. 50% ($p<0,001$; t-test) beobachtet werden. Wiederum zeigte sich für die Kokultur bei einer 3mM-InhibitorKonzentration eine Dezimierung der Zellproliferation um 20% ($p=0,049$; t-test).

Daraus kann man schließen, dass der Inhibitor TF17-2 in Dosierungen von Konzentrationen $<300\mu$ M und den angegebenen Zeiträumen weder für humane Fibroblasten, noch für Tumorzellen toxisch ist.

Dieser Vitalitätstest zeigte auch für die humanen Gallenblasenfibroblasten (hGBF) keine signifikante Reduktion der Proliferationsrate (Anhang Tab. 1).

3.2.2. Untersuchung zur DNA-Neusynthese (3 H-Thymidin-Assay)

Der Methyl- 3 H-Thymidineinbau lag in den unbehandelten Kontrollen im Durchschnitt bei 81000cpm für RPMI 7451, bei 8530cpm für die hGBF, bei 72000cpm für die Kokultur hGBF und RPMI 7451, bei 9800cpm für KiF5 und bei 45000cpm für die Kokultur KiF5 und RPMI 7451. Diese Werte wurden als 100% gesetzt.

In Abb. 3.2.2a sind die Ergebnisse für RPMI 7451-Tumorzellen und die humanen Gallenblasenfibroblasten dargestellt. Nach 24h Inkubation mit TF17-2 zeigte sich für RPMI 7451 eine konstante aber nicht signifikante Abnahme der DNA-Neusynthese bis zu einer InhibitorKonzentration von 300 μ M. Die hGBF zeigten eine konstante, aber nicht signifikante Zunahme der DNA-Neusynthese bis 300 μ M. Die Kokulturen schienen ebenfalls unempfindlich gegenüber den InhibitorKonzentrationen bis 300 μ M zu sein und reagierten mit einer minimalen Zunahme der Proliferation.

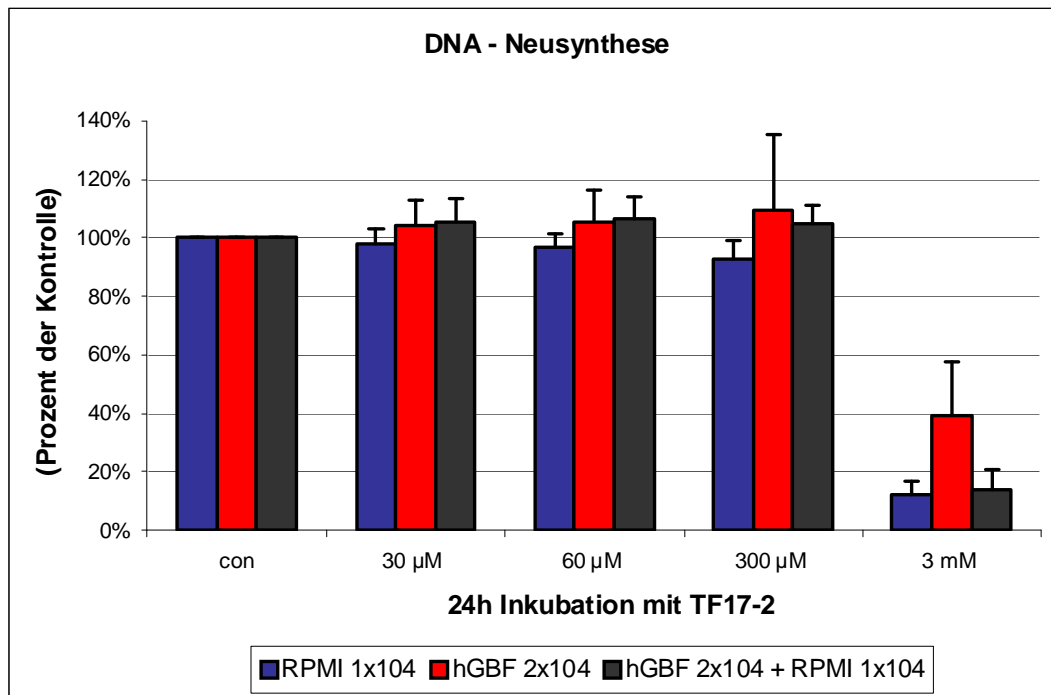


Abb. 3.2.2a: Test zur Beurteilung der DNA-Neusynthese (^3H -Thymidin-Assay) an 10.000 Zellen RPMI 7451, 20.000 Zellen hGBF und der Kokultur (20.000 Zellen hGBF und 10.000 Zellen RPMI 7451) mit unterschiedlichen Konzentrationen TF17-2 über 24h.

Bei einer Konzentration von 3mM TF17-2 sank die DNA-Neusynthese signifikant auf etwa 12% ($p < 0,001$; t-test) bei den RPMI –Tumorzellen und auf etwa 17% ($p = 0,002$; t-test) in der Kokultur. Auch die hGBF-Kultur reagierte mit einer Einschränkung der DNA-Neusynthese um 60% ($p = 0,521$; t-test).

In Abb. 3.2.2b sind die Ergebnisse für RPMI 7451-Tumorzellen und die Vorhautfibroblasten KiF5 dargestellt. Nach 24h Inkubation mit TF17-2 zeigte sich für RPMI 7451 eine konstante aber nichtsignifikante Abnahme der DNA-Neusynthese bis zu einer Konzentration von 300µM, wie schon in den Versuchsanordnungen mit den hGBF. Die KiF5 zeigten eine schwankende nichtsignifikante Abnahme der DNA-Neusynthese bis 300µM. Die Kokulturen erschienen unempfindlich. Bei einer Konzentration von 3mM TF17-2 sank die DNA-Neusynthese signifikant auf etwa 15% ($p = 0,001$; t-test) bei den RPMI –Tumorzellen, auf etwa 30% ($p = 0,020$; t-test) bei den KiF5 und auf etwa 18% ($p = 0,001$; t-test) bei der Kokultur (siehe Anhang Tab. 7.2).

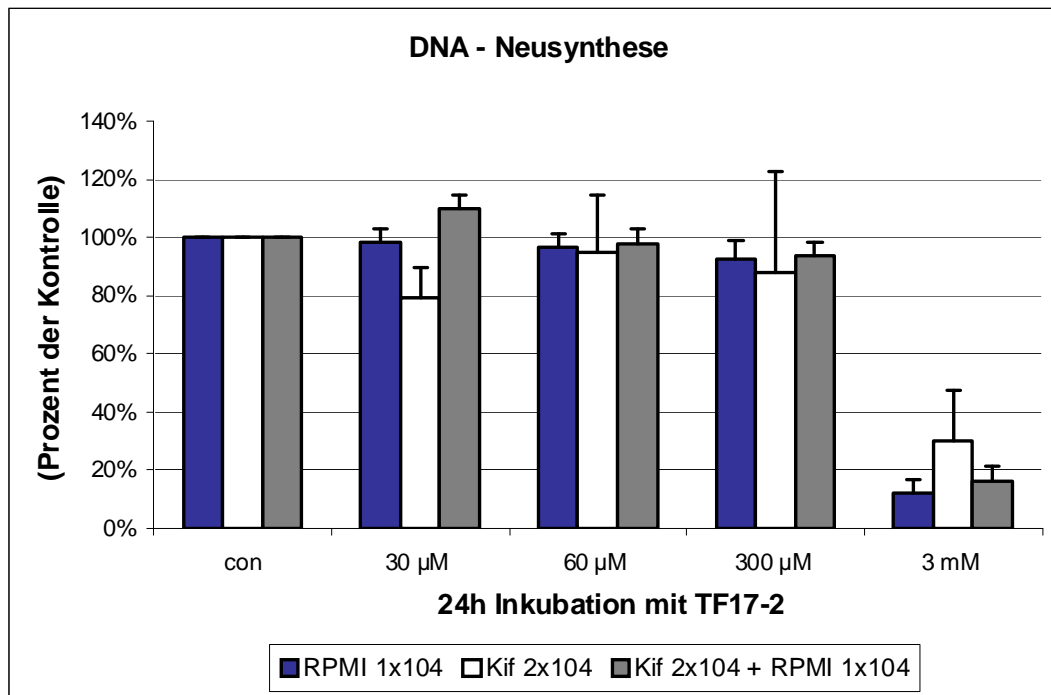


Abb. 3.2.2b: Test zur Beurteilung der DNA-Neusynthese (^3H -Thymidin-Assay) an 10.000 Zellen RPMI 7451, 20.000 Zellen KiF5 und der Kokultur (20.000 Zellen KiF5 und 10.000 Zellen RPMI 7451) mit unterschiedlichen Konzentrationen TF17-2 über 24h.

Die Ergebnisse des kolorimetrischen Vitalitätstest korrelieren mit den Bestimmungen der DNA-Neusynthese.

3.2.3. Untersuchung zur Fragmentierung von DNA (Jam-Assay)

Die DNA-Fragmentierung als Zeichen der Apoptose wurde mittels Jam-Assay bestimmt.

Der Anteil unfragmentierter DNA lag in den unbehandelten Kontrollen im Durchschnitt bei 56000cpm für RPMI 7451, bei 4800cpm für die hGBF bei 21000cpm für die Kokultur hGBF und RPMI 7451, bei 5000cpm für KiF5 und bei 11000cpm für die Kokultur KiF5 und RPMI 7451. Diese Werte wurden als 100% gesetzt.

In Abb. 3.2.3a werden die Daten der Versuchsanordnung mit RPMI 7451 und den hGBF dargestellt. Es zeigten sich nichtsignifikante Abnahmen der intakten DNA für niedrige TF17-2 Konzentrationen, mit einer deutlichen Sensitivität der primären humanen Gallenblasenfibroblasten im unteren Konzentrationsbereich von 30-60µM.

Bei einer Konzentration von 3mM TF17-2 wurde jedoch deutlich, dass die Zellen im Zellzyklus arretierten, aber nicht apoptotisch starben, da die Zellaktivität und die DNA-Neusynthese zurückgingen, jedoch keine DNA-Fragmentierung auftrat. Sowohl die Cholangiokarzinom-zellen als auch die Kokultur zeigten bei Konzentrationen bis 300 μ M nur eine minimale DNA-Fragmentierung, die daher nicht signifikant ist.

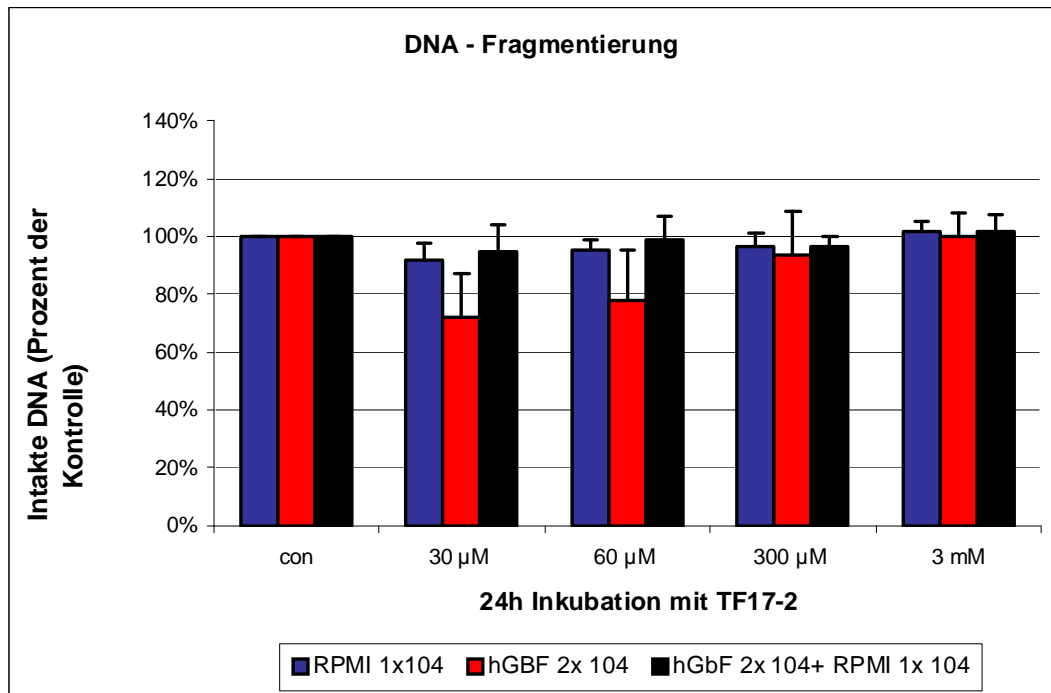


Abb. 3.2.3a: Test zur Beurteilung der DNA-Fragmentierung (Jam-Assay) an 10.000 Zellen RPMI 7451, 20.000 Zellen hGBF und der Kokultur (20.000 Zellen hGBF und 10.000 Zellen RPMI 7451) mit unterschiedlichen Konzentrationen TF17-2 über 24h.

Abb. 3.2.3b zeigt die Ergebnisse des Versuchsansatzes mit RPMI 7451 und den Vorhautfibroblasten KiF5. Im Konzentrationsbereich bis 300 μ M traten für beide Zelllinien nichtsignifikante Abnahmen der intakten DNA auf, wohingegen bei einer 3mM-Inhibitorkonzentration keinerlei DNA-Fragmentierung mehr nachzuweisen war.

Summarisch kann festgehalten werden, dass TF17-2 keine toxische Wirkung auf die untersuchten Zellen hat. Der Rückgang der Zellaktivität im kolorimetrischen Zellvitalitätsassay bei höheren Konzentrationen des MMP-Inhibitors wurde durch die Ergebnisse der DNA-Neusynthese-Bestimmung unterstützt, aber eine Apoptose der Zellen konnte im Jam-Assay nicht festgestellt werden (siehe Anhang Tab. 7.3).

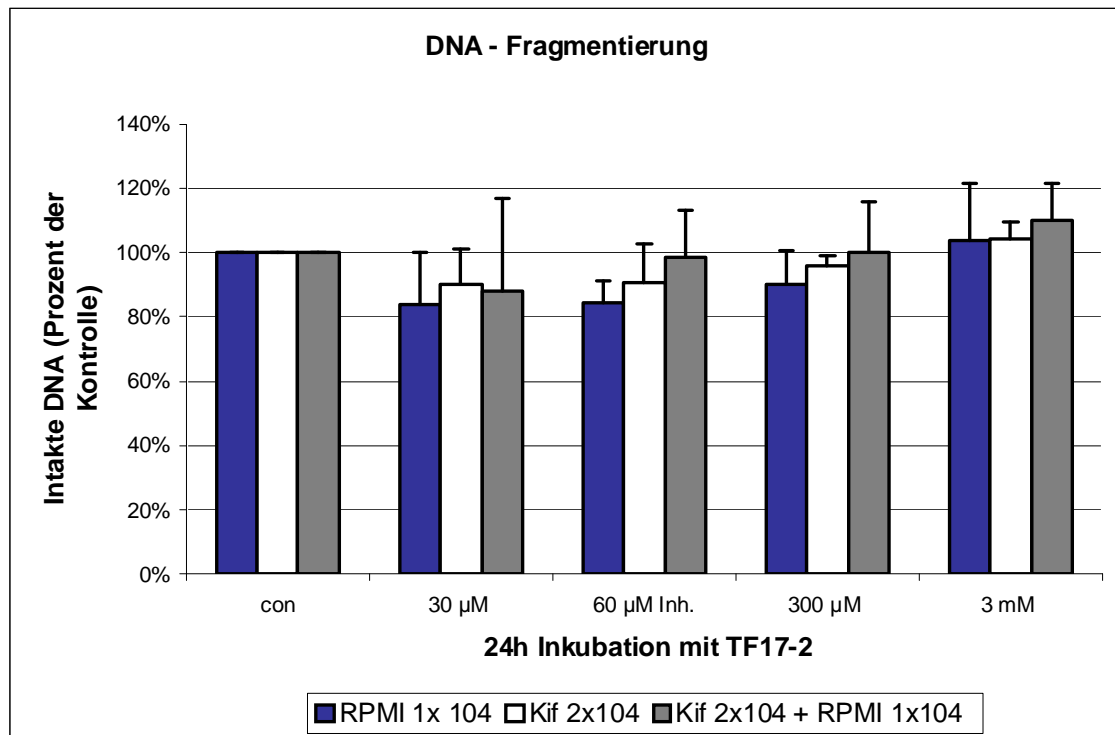


Abb. 3.2.3b: Test zur Beurteilung der DNA-Fragmentierung (Jam-Assay) an 10.000 Zellen RPMI 7451, 20.000 Zellen KiF5 und der Kokultur (20.000 Zellen KiF5 und 10.000 Zellen RPMI 7451) mit unterschiedlichen Konzentrationen TF17-2 über 24h.

3.3. Einfluss von TF17-2 auf die Proteinexpression

Es wurden Westernblotanalysen und Zymographien durchgeführt, um den Einfluss von TF17-2 auf die Proteinexpression zu ermitteln.

Die Westernblotanalyse erlaubt im Vergleich zur Zymographie auch die Beurteilung der MMP-Proformen. Durch die Herstellung von Zelllysaten wird der Inhalt der Zellen analysiert (inaktive Formen von Sekretionsproteinen), im Gegensatz dazu erhält man bei der Auswertung von Überständen in der Zymographie ein Bild von den bereits sezernierten aktiven MMP's.

Die immortalisierten Tumorzellen haben eine gegenüber den Fibroblasten erhöhte Teilungsrate, sodass diese Tatsache bei der Aussaat der Zellen (300.000 Fibroblasten, 100.000 Tumorzellen, Kokultur 300.000 Fibroblasten + 100.000 Tumorzellen) berücksichtigt wurde.

Nach folgender Formel berechnet sich die Proteinkonzentration pro Zelle:

$$\text{Proteinkonzentration in } \mu\text{g} = \frac{\text{Proteinmenge } \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{Lysispuffer in } \mu\text{l} \text{ (Fibroblasten \& Kokultur 80}\mu\text{l, RPMI 60}\mu\text{l)}}{\text{Anzahl der ausgesähten Zellen (siehe oben)}}$$

Für die Fibroblasten (KiF5 und hGBF) errechnete sich so eine Proteinkonzentration pro Zelle von ca. 300-350pg. Für die Tumorzellen ergaben sich nach dieser Berechnung allerdings Werte von ca. 600pg Protein "pro Zelle". Aufgrund der hohen Teilungsrate der Tumorzellen und im Vergleich zu den Fibroblasten geringeren Größe, kann eine Verdopplung der RPMI-Zellen (ca. 200.000 Zellen pro well) innerhalb von 24h angenommen werden. Somit muß für die folgenden Untersuchungen von einem Verhältnis von Fibroblasten zu Tumorzellen von 1,5:1 ausgegangen werden (Tab.7.4a+b im Anhang). In den Kokulturen ist aufgrund der hohen Zellaussaat der „Konkurrenzdruck“ zwischen den Zellen höher. Die Teilungsrate sank. Ein etwas höherer Proteingehalt von 350-380pg „pro Zelle“ spricht aber auch hier für eine Vermehrung von Zellen, sodass man von einem Verhältnis von 3 bzw. 2 :1 ausgehen kann.

3.3.1. Westernblot

Es wurden vor allem MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP (MMP-14) untersucht, weil diese Matrixmetalloproteinasen die am häufigsten untersuchten und am besten bekannten MMP's sind. Zudem kommt ihnen in der Aktivierungskaskade und somit auch bei der Aktivierung anderer MMP's eine Schlüsselstellung zu. Außerdem kam ein uPA - spezifischer Antikörper zum Einsatz, da uPA in der Lage ist MMP's zu aktivieren. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge diente β -Aktin. Mit Hilfe des Rainbow-Markers konnte die Zuordnung der jeweiligen Banden zu ihrem dazu gehörigen Molekulargewicht erfolgen.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Fibroblastenzelllinien deutliche Mengen an MMP-2 produzierten, wohingegen RPMI 7451 keine MMP-2-Expression zeigte. Interessanterweise ließ sich aber eine MMP-2-Produktion bei den Cholangiokarzinomzellen durch die Zugabe von TGF- β 1 stimulieren. Auch bei den Fibroblasten war eine stärkere MMP-2-Expression unter TGF- β 1-Stimulation erkennbar. Die Behandlung von TF17-2 hatte keine oder nur geringe Auswirkungen auf die Expression.

Die Stärke der Kokulturbanden entsprach in etwa denen der Fibroblasten. Signifikante Unterschiede ergaben sich hier nicht.

Deutlich zu erkennen war außerdem eine Expression von MMP-9 in den Cholangiokarzinomzellen. Auch hier fand eine Hochregulierung durch TGF- β 1 statt. KiF5-Zellen exprimieren sehr wenig MMP-9. Auch die hGBF zeigten insgesamt sehr schwache Banden, doch schien die Expression höher zu sein, als bei den KiF5. Die Kokulturen zeigten keine Bande auf Molekulargewicht von MMP-9.

Für die membranständige Variante der untersuchten MMP's (MT1-MMP) ließen sich ähnliche Ergebnisse wie für MMP-9 erzielen. RPMI 7451 exprimierte MT1-MMP. Durch TGF- β 1 konnte auch hier eine leichte Stimulation der MT1-MMP Expression erzielt werden. Auf RNA-Ebene (kommerzieller RNA-Test-Kit) konnte allerdings eine MT1-MMP Expression für alle verwendeten Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

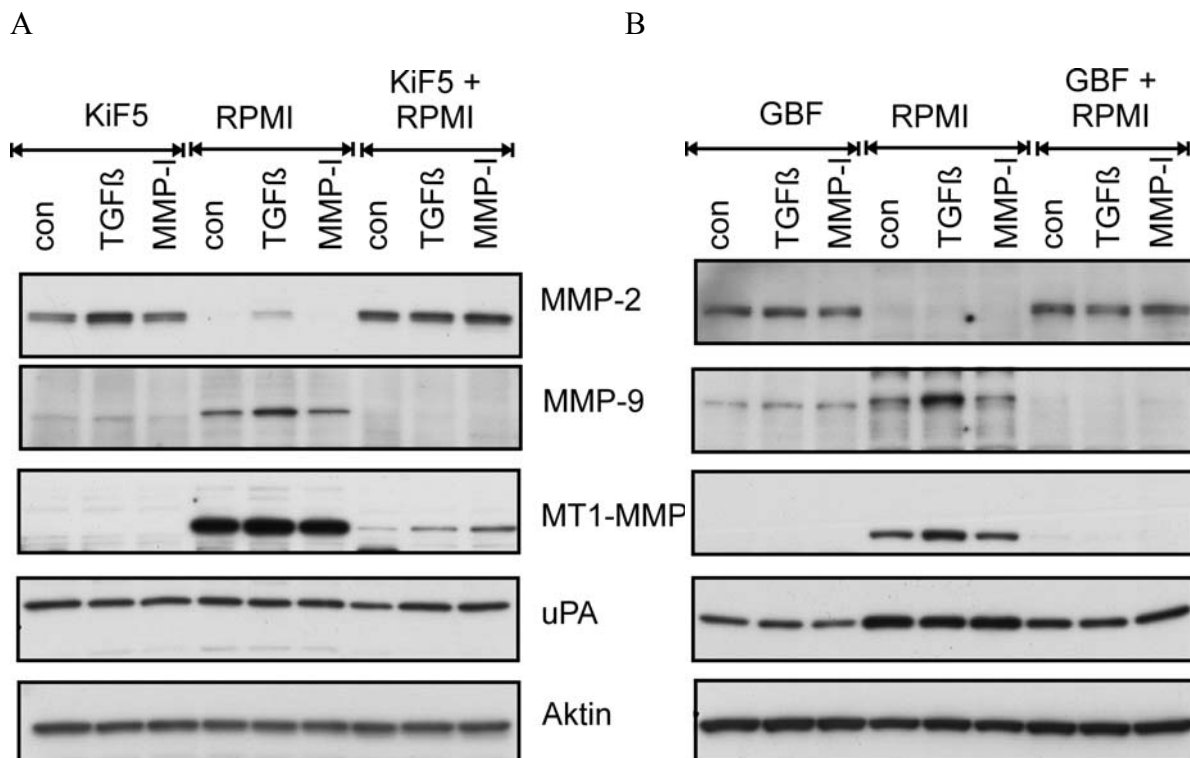


Abb. 3.3.1: Gegenüberstellung der Westernblotanalysen der Zelllinien KiF5/RPMI-7451(A) und hGBF/RPMI-7451 (B). Darstellung jeweils einer Kontrolle (con) und eines Stimulationsansatzes mit TGF- β 1 und TF17-2. Nachweis von MMP-2(72kDa), MMP-9 (92kDa), MT1-MMP(65kDa), uPA (52kDa) und β -Aktin (42kDa). Weitere Erläuterungen im Text, sowie im Anhang Abb.7.1

Die Expression von uPA erfolgte bei KiF5 und primären Gallenblasenfibroblasten in etwa gleichem Ausmaß, wohingegen RPMI 7451 etwas mehr uPA exprimierten. Es konnte hierbei weder eine Stimulation durch TGF- β 1, noch durch den MMP-Inhibitor TF17-2 gezeigt werden. Zusammenfassend lassen die bisherigen Ergebnisse nicht den Schluss zu, dass die Proteinexpression durch den MMP-Inhibitor TF17-2 beeinflusst wird.

3.3.2. Gelzymographie

Es sollte im Rahmen eines Versuches geklärt werden, wie sich die Stimulation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor TGF- β 1 über die Zeit auswirkt. Am Beispiel von RPMI sind die Ergebnisse in Abb. 3.3.2.1 dargestellt.

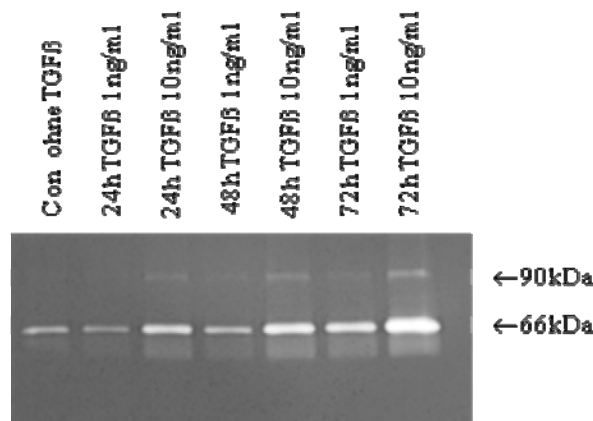


Abb. 3.3.2.1: Zunahme der MMP-2 und MMP-9 Expression durch Stimulation mit TGF- β 1 in der Zymographie. RPMI 7451-Zellen wurden über unterschiedliche Zeiträume (24-72h) mit Konzentrationen von 1ng/ml oder 10ng/ml TGF- β 1 stimuliert. Darstellung der aktiven Formen von MMP-2 (66kDa) und MMP-9 (84kDa) mit deutlichem Stimulationseffekt über die Zeit und Konzentration.

Die Zellen wurden über unterschiedlich lange Zeiträume 24h-72h mit 1ng/ml oder 10ng/ml TGF- β 1 inkubiert. Anschließend wurden gleiche Mengen an Überstand aufgetragen. Man sieht, dass sowohl MMP-2 als auch MMP-9 durch TGF- β 1 stimulierbar waren, wobei höhere Mengen TGF- β 1 eine deutlich höhere Aktivität der MMP's hervorriefen. Waren die Banden für die über 24h mit 1ng/ml TGF- β 1 stimulierte Zellfraktion noch kaum unterscheidbar von denen der Kontrolle, zeigten sich ab einer Inkubationszeit von 48h schon eine deutliche Zunahme in der Bandenintensität. Gekoppelt mit diesem Zeiteffekt konnte daraufhin für die

10ng/ml TGF- β 1-Konzentration bei 72h eine sehr starke Bande für MMP-2 und MMP-9 dargestellt werden.

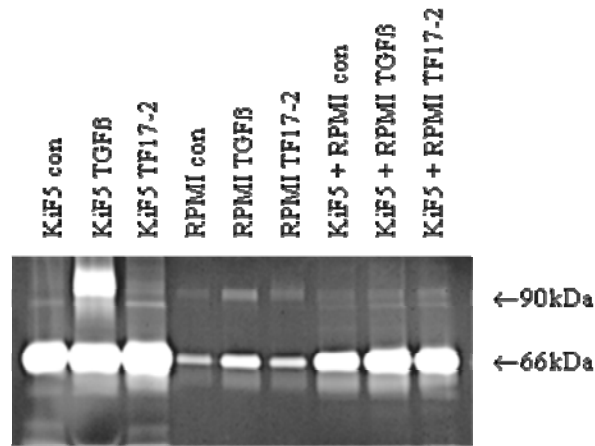


Abb. 3.3.2.2: Zymographie von KiF5, RPMI 7451 und der Kokultur unter Stimulation von TGF- β 1 und TF17/2. Darstellung der aktiven Formen von MMP-2 (Bande bei 66kDa) und MMP-9 (Bande bei 90kDa).

In Abb. 3.3.2.2 werden die Ergebnisse der Gelzymographien mit den Cholangiokarzinomzellen und den KiF5-Zellen gezeigt.

Die RPMI 7451 – Zellen produzierten im Vergleich zu den Fibroblasten deutlich weniger MMP-2, dessen aktive Form ein Molekulargewicht von 66kDa aufweist. Es konnten auch hier für die RPMI-Zellen durch die TGF- β 1-Stimulation deutlich stärkere Banden für MMP-2 und MMP-9 im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Allerdings schien die MMP-9-Aktivität in den Cholangiokarzinomzellen (im Gegensatz zur Westernblotanalyse) geringer zu sein als in den Fibroblasten. KiF5 exprimiert unter TGF- β 1 – Stimulation besonders viel MMP-9. Bei genauer Betrachtung ließen sich v.a. in der Kokultur zwei kurz aufeinander folgende Banden um die 90kDa ermitteln. Das Molekulargewicht der Proform betrug 92kDa, das der aktiven Form 84kDa, was diesen Ergebnissen entsprach (s. Tabelle 3.3.2.1).

In Abb. 3.3.2.3 werden die Daten für die RPMI-Zellen und die primären Gallenblasenfibroblasten dargestellt.

Die hGBF zeichneten sich durch eine sehr starke MMP-2-Aktivität aus, wobei kein Unterschied zwischen den Vorhautfibroblasten und den Gallenblasenfibroblasten zu sehen war. Auf Höhe von etwa 85kDa stellte sich eine schmale Bande dar, die MMP-9 entspricht. Es ist kaum eine Stimulation durch TGF- β 1 zu erkennen.

Die Ergebnisse für die RPMI-Einzelkultur stimmten mit den Daten aus Abb. 3.3.2.2 weitgehend überein.

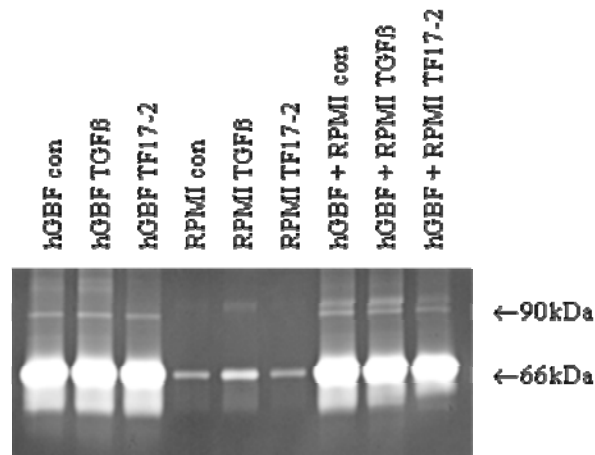


Abb. 3.3.2.3: Zymographie von hGBF, RPMI 7451 und der Kokultur unter Stimulation von TGF- β 1 und TF17/2. Darstellung der aktiven Formen von MMP-2 (Bande bei 66kDa) und MMP-9 (Bande bei 90kDa).

In der Kokultur konnte auch in diesem Ansatz eine Doppelbande nachgewiesen werden.

Ein Einfluss des MMP-Inhibitors TF17-2 konnte für keine der Zelllinien in der Zymographie gezeigt werden.

Tabelle 3.3.2.1: Molekulargewicht der MMP's:

Antikörper gegen	Proform	Aktive Form
MMP- 2	72kDa	66kDa
MMP- 9	92kDa	84kDa
MT1- MMP	65kDa	63kDa
uPA	52kDa	33kDa
β -Aktin		42kDa

Die Auswertung der Zymographien ergab demnach, dass für alle untersuchten Zelllinien MMP-2 und MMP-9 (Gelatinasen) nachgewiesen werden konnten.

3.4. Invasionsassay

Zur Untersuchung der Invasivität der Cholangiokarzinomzellen wurde ein modifizierter Invasionsassay von Casey et al. verwendet [Casey et al. 2003]. Das Augenmerk liegt dabei auf Protease (dazu gehören die MMP's) vermittelten, rein lokalen Proteolysevorgängen, wobei aufgrund der Testbedingungen nur bei größeren Unterschieden eine signifikante Aussage zu treffen ist.

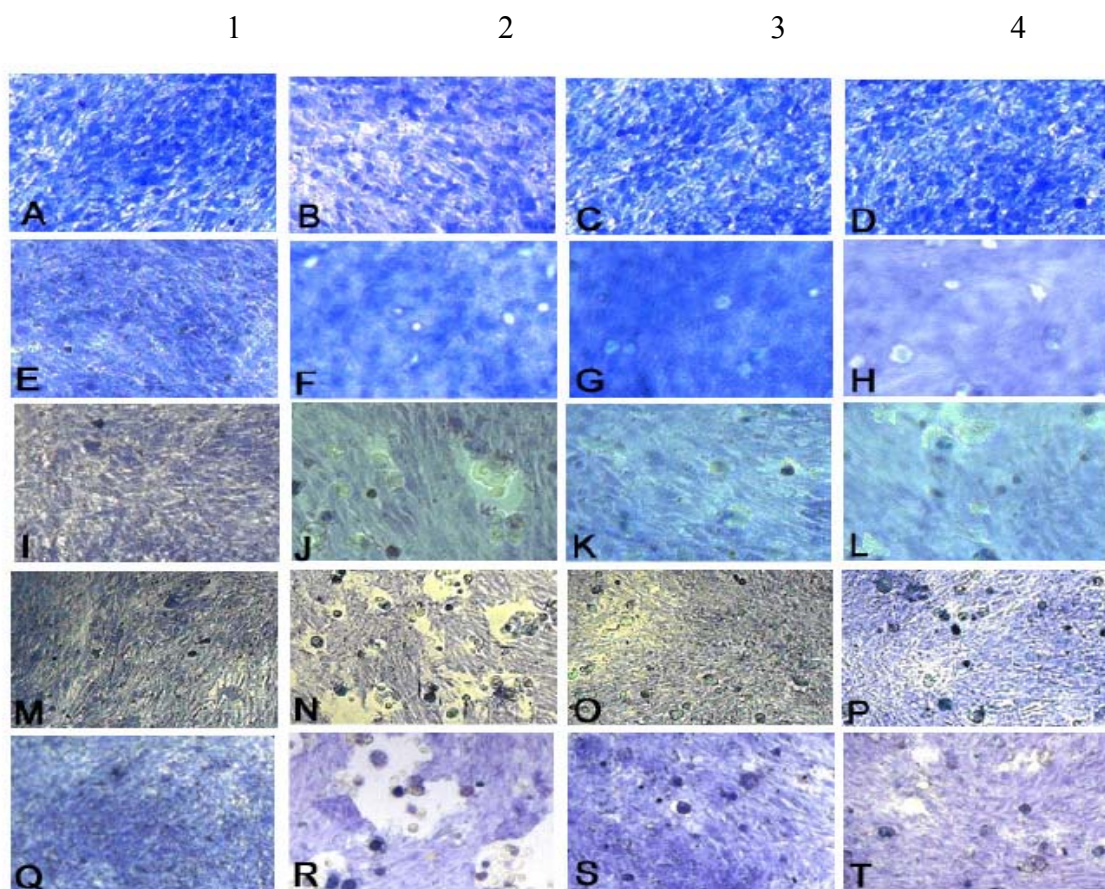


Abb. 3.4.1: Invasionsassay zur Demonstration der Wirksamkeit des MMPI TF17-2 auf die Invasivität von RPMI 7451. Ausgesät wurden auf dem permeabilisierter KiF5-Fibroblastenrasen je 150.000 RPMI 7451 Zellen/well (200x Vergrößerung). Spalte 1 repräsentiert den intakten Fibroblasten-Monolayer ohne RPMI-Zellen (Kontrolle), Spalte 2 Monolayer mit RPMI-Aussaat ohne MMPI, dargestellt werden die Versuchsanordnungen mit Zugabe des MMPI TF17-2 in Konzentrationen von 300 μ M (Spalte 3) und 30 μ M (Spalte 4). A-D Zellen nach Anwachsen über Nacht, E-H nach weiteren 24h, I-L nach 48h, M-P nach 72h und Q-T nach 96h Wachstum. Mit der Behandlung wird nach Anwachsen der Zellen begonnen (G-H).

Der mit DMSO permeabilisierte Fibroblastenmonolayer färbt sich mit Trypanblau an, während die lysierten Areale und zugesetzten Fibroblasten bzw. Tumorzellen keine Blaufärbung aufweisen. Die Größe der Invasionshöfe korreliert dabei mit der proteolytischen Aktivität der Zellen.

Nach 24-stündiger Inkubation von Cholangiokarzinomzellen in unbehandeltem Medium waren kaum Anzeichen einer Proteolyse zu erkennen. Es zeigten sich minimale Invasionshöfe. Erst nach 72h-96h ließ sich eine deutliche Tumorzellinvasion beschreiben. In Anwesenheit des Inhibitors waren die Invasionshöfe signifikant kleiner.

Schon bei einer Konzentration von 30µM TF17-2 wurde die Proteolyse effektiv unterdrückt (Abb. 3.4.1).

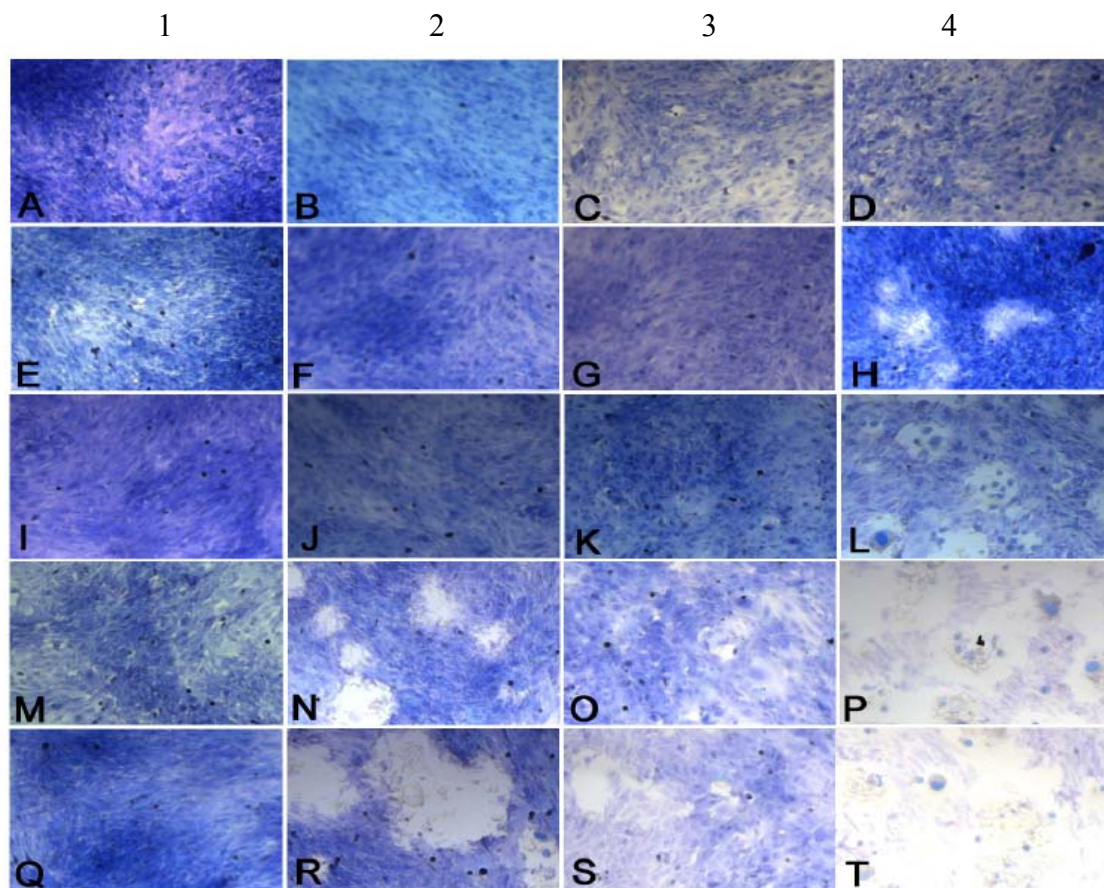


Abb. 3.4.2: Invasionsassay zur Demonstration der Wirksamkeit des MMPI TF17-2 auf die Invasivität von RPMI 7451 und hGBF. Kokultivierung von RPMI 7451 und hGBF auf dem Fibroblastenmonolayer (200x Vergrößerung). Spalte 1 intakter Fibroblastenmonolayer (Kontrolle), Spalte 2 Monolayer mit Aussaat von 150.000 RPMI 7451-Zellen/well, Spalte 3 Monolayer mit Aussaat von 150.000 hGBF-Zellen/well, Spalte 4 Kokultivierung von 50.000 RPM I-Zellen/well und 100.000 hGBF-Zellen/well. A-D Zellen nach Anwachsen über Nacht, E-H nach weiteren 24h, I-L nach 48h, M-P nach 72h und Q-T nach 96h Wachstum.

Die gemeinsame Kultivierung von Gallenblasenfibroblasten und RPMI 7451-Zellen, die der *in vivo* Situation am ehesten entsprechende Versuchsanordnung, führte zu einer erheblich stärkeren und deutlich schnelleren Proteolyse. Bereits nach 24h waren proteolytische Areale im Fibroblastenrasen zu erkennen. Nach 48h konfluieren die Invasionshöfe miteinander, um nach 72h nur noch von einzelnen blauen Zellinseln unterbrochen zu werden. (Abb. 3.4.2)

Die Gallenblasenfibroblasten in der Monokultur zeichneten sich durch eine geringe proteolytische Potenz aus. Vereinzelt Invasionshöfe konnten nach 72h gesehen werden. So lässt sich die massive Proteolyse in der Kokultur nur durch einen synergistischen Effekt beider Zelllinien erklären, denn hGBF und RPMI produzieren große Mengen an MMP's.

Dieser optische Eindruck kann mit einer Messung der proteolytischen Areale mittels des Scion Image[®]-Programms verifiziert werden (Abb. 3.4.3).

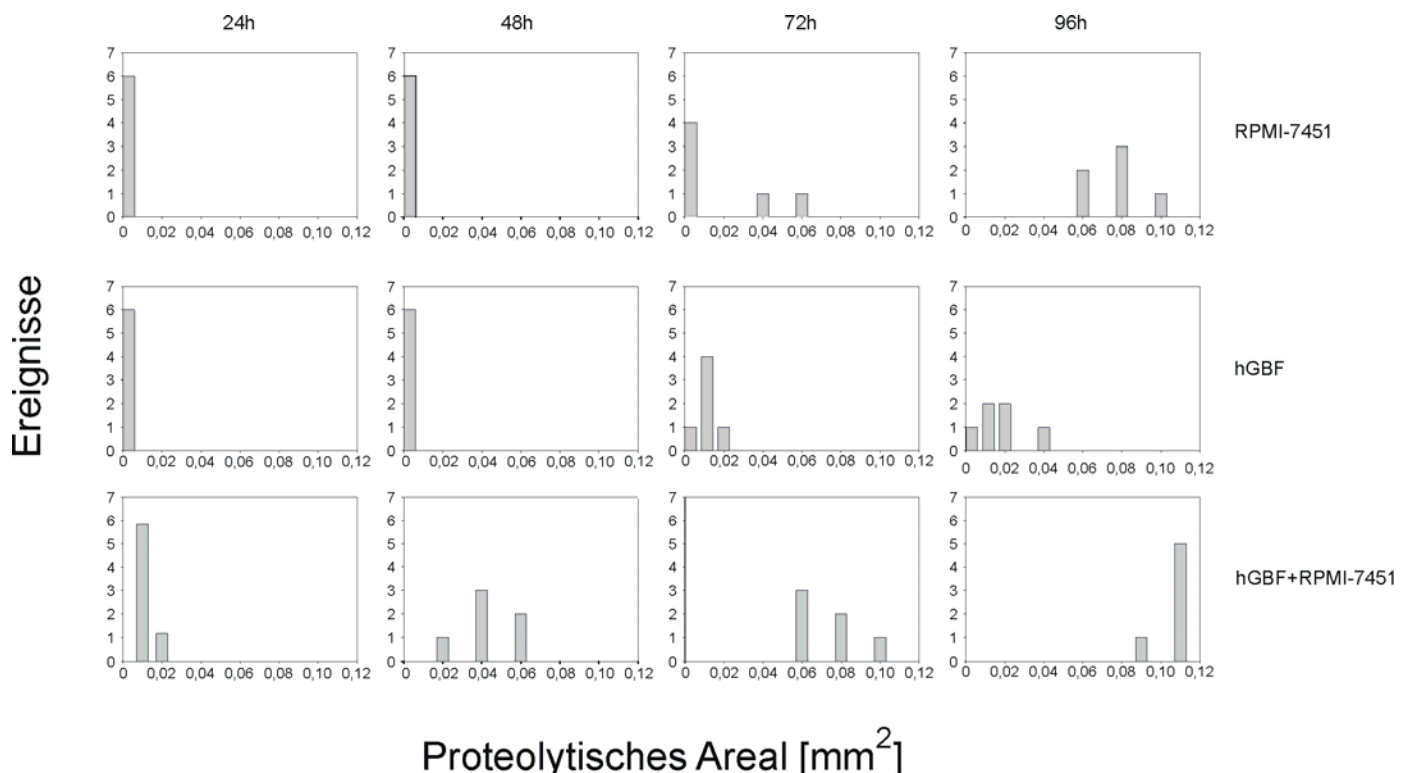


Abb. 3.4.3: Größenbestimmung und Anzahl der im Invasionsassay entstandenen proteolytischen Areale in mm² mit der Scion Image[®] Software. Die Messungen erfolgen jeweils nach 24h, 48h, 72h und 96h für die Zelllinien RPMI-7451, hGBF und deren Kokultur hGBF + RPMI-7451 (nach der Habilitationsschrift von M. Kapischke 2005).

Die Analyse der proteolytischen Areale ergab für alle drei Versuchsanordnungen eine Größenzunahme der Invasionshöfe über die Zeit. Die Tumorzelllinie RPMI-7451 zeigte nach 72h Inkubation einige proteolytische Areale von $0,04\text{mm}^2$ bis $0,06\text{mm}^2$. Nach 96h hatte die durchschnittliche Größe der Invasionshöfe bereits $0,08\text{mm}^2$ betragen. Die Fibroblastenzelllinie hGBF zeigte nach 72h einige Invasionshöfe, die im Mittel unter $0,02\text{mm}^2$ groß waren und nach 96h ein Maximum von $0,04\text{mm}^2$ erreichten.

In der Kokultur beider Zelllinien konnten synergistische Effekte sichtbar gemacht werden. Hier konnte man bereits nach 48h Invasionsareale von im Mittel $0,04\text{mm}^2$ erkennen, die nach 72h eine durchschnittliche Größe von $0,078\text{mm}^2$ und nach 96h von $0,11\text{mm}^2$ aufwiesen.

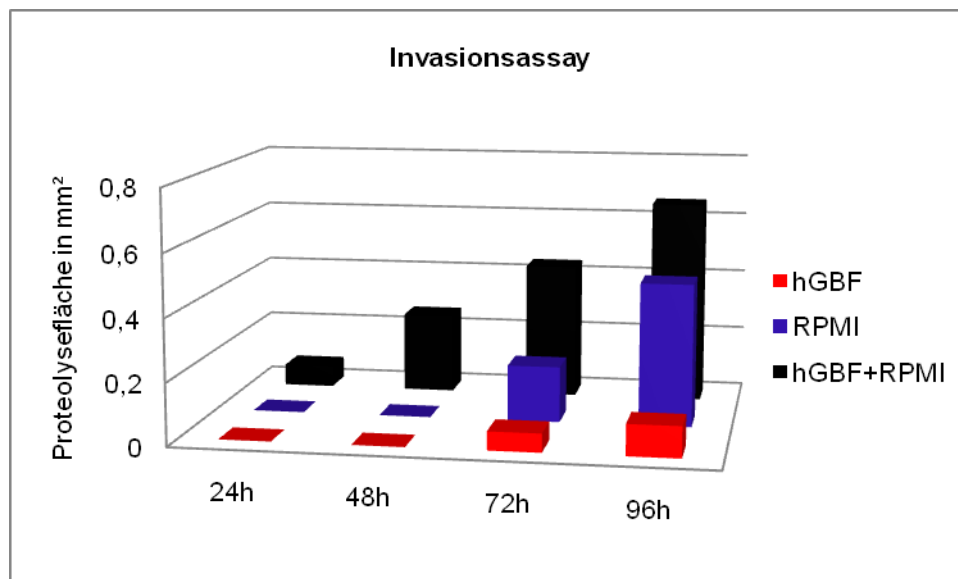


Abb. 3.4.4: Berechnung der Gesamtfläche der proteolytischen Areale in mm^2 über die Zeiträume von 24h, 48h, 72h und 96h für die Zelllinien RPMI-7451, hGBF und deren Kokultur hGBF + RPMI-7451. Die Daten wurden anhand der Scion Image® Auswertungen erstellt (s.o.).

Addierte man die Invasionshöfe pro Gesichtsfeld zu den verschiedenen Zeiträumen (24h, 48h, 72h und 96h), ergab sich daraus die Gesamtfläche der proteolytischen Areale für die jeweilige Zelllinie. Es wurde sichtbar, dass nach 24h bzw. 48h die RPMI-7451 - Zellen und die humanen Gallenblasenfibroblasten keine proteolytischen Bezirke erzeugt hatten. Die Kokultur dieser beiden Zelllinien nach 24h eine Gesamtfläche von $0,07\text{mm}^2$ und nach 48h von $0,26\text{mm}^2$ lysiert hatte. Im weiteren Verlauf zeigte sich das die Cholangiokarzinomzelllinie im Vergleich zu den Gallenblasenfibroblasten ein deutlich höheres proteolytisches Potential besaß.

Während nach 96h nur 0,1mm² des permeabilisierten Fibroblastenrasens durch die hGBF lysiert werden konnte, so war nach 96h die proteolytische Gesamtfläche der RPMI-Zellen mit 0,46mm² um mehr als das Vierfache größer. Eine Gesamtfläche der Invasionshöfe von 0,66mm² nach 96h konnte die Kokultur aufweisen.

Eine wechselseitige Aktivierung der Proteasen und eine Stimulation der MMP-Sekretion durch die Bedingungen der Kokultivierung muss somit angenommen werden. Auch unter diesen Bedingungen erwies sich der MMP-Inhibitor TF 17-2 als sehr wirkungsvoll (siehe Abb. 3.4.1).

Die Reversibilität der MMPI Wirkung wurde über eine ähnliche Versuchsanordnung bewiesen. Unter den oben beschriebenen Bedingungen wurden RPMI 7451 – Zellen in Monokultur über 72h mit 3mM TF 17-2 inhibiert. Das inhibitorhaltige Medium wurde täglich vorsichtig erneuert. Nach 72h wurde MMPI–haltiges Medium gegen MMPI-freies Medium ausgetauscht und das Invasionspotential beobachtet.

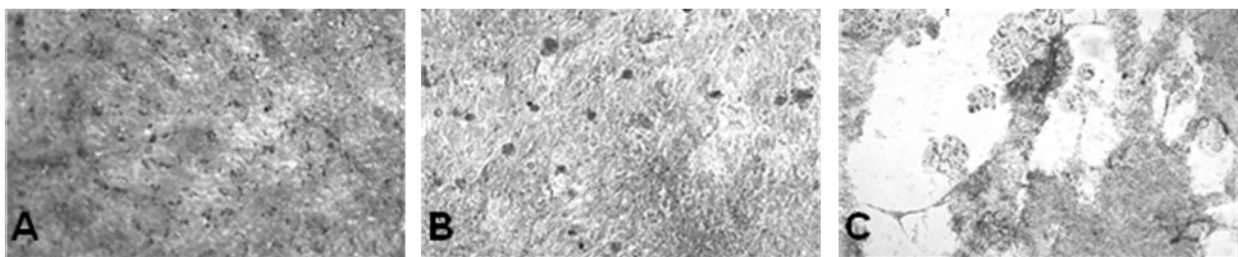


Abb. 3.4.5: Invasionsassay zur Demonstration der Reversibilität des MMPI TF17-2 (200x Vergrößerung). A KiF5-Fibroblastenmonolayer mit der Aussaat von 150.000 RPMI 7451-Zellen nach Anwachsen über Nacht. B Versuchsanordnung nach Zugabe einer 3mM TF17-2-Lösung über 72h. C Versuchsanordnung nach weiteren 72h ohne den MMPI TF17-2

Mikroskopisch waren deutliche Invasionshöfe zu erkennen, die denen einer 2-tägigen Kontrollanordnung entsprachen (Abb. 3.4.5). Damit konnte gezeigt werden, dass selbst unter der Behandlung mit einer hohen Konzentration des Inhibitors TF17-2 die Tumorzellen überlebt haben, um im Anschluss das Substrat aktiv lysieren zu können.

4. Diskussion

Die Prognose für Patienten mit cholangiozellulären Karzinomen ist trotz radikaler Operationstechniken und Fortschritten in der chemotherapeutischen Behandlung weiterhin schlecht. Es ist wichtig, gerade für Tumoren mit solch schlechten Aussichten, neue Therapiemaßnahmen zu entwickeln und zu etablieren.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass MMP's an vielen physiologischen Vorgängen, unter anderem dem Knochenstoffwechsel [Everts et al. 2006], der Brustdrüsenentwicklung [Sternlicht 2006] und der postpartalen Uterusinvolution [Balbin et al. 1998], aber auch pathologischen Abläufen, wie z.B. der Arteriosklerose [Kuzuya et al. 2003], der rheumatoiden Arthritis [Clark et al. 2003] oder der Metastasierung von Krebserkrankungen [Roy et al. 2009] im menschlichen Körper beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde gerade in den letzten Jahren intensiv auf diesem Gebiet geforscht. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der möglichen Inhibition von MMP's durch einen neu synthetisierten MMP-Inhibitor. Im Speziellen wird die MMP-vermittelte Invasivität von Cholangiokarzinomzellen unter *in vitro* – Bedingungen untersucht.

Eine mögliche Inhibition der Matrixmetalloproteinasen erschien erstrebenswert. Der anfänglichen Begeisterung und guten Ergebnissen *in vitro* und in Tierexperimenten, folgten ernüchternde klinische Studien mit verschiedenen synthetisch hergestellten MMP-Inhibitoren [Brown et al. 2000; Coussens et al. 2002; Ramnath et al. 2004].

Zucker et al. analysierten die durchgeführten klinischen Studien und zeigten, weshalb die Ergebnisse unbefriedigend waren [Zucker et al. 2000]. Der überwiegende Teil der Studien wurde an Patienten durchgeführt, die zum Teil erhebliche lokal-infiltrierende Tumormassen und/oder bereits Fernmetastasen aufwiesen.

Man weiß heute, dass MMP's größtenteils von tumorumgebenden ortsständigen Fibroblasten sezerniert werden. Tumorzellen induzieren die MMP-Produktion in den Stroma-Zellen durch Zytokine und sogenannte EMMPRIN's (extracellular matrix metalloproteinase inducer). MMP's wiederum können sich gegenseitig aktivieren, führen zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren, können Bestandteile der Basalmembran zerstören und ermöglichen so die Zellmigration und das Tumorwachstum.

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass MMP-Inhibitoren in frühen Stadien einer Krebserkrankung zur Anwendung kommen sollten, um Prozesse wie Mikrometastasierung und beginnende lokale Invasion zu unterbinden [Zucker et al. 2000].

Desweiteren wurde in mehreren Studien auf die beträchtlichen Nebenwirkungen hingewiesen. In einer Studie zur adjuvanten Therapie des frühen Mamma-Karzinoms führte dies zum Studienabbruch bei etwa einem Drittel der Patientinnen [Miller et al. 2004].

Der Ansatz zur adjuvanten Therapie mit MMP-Inhibitoren bleibt dennoch bestehen. Die neue Generation der MMP-Inhibitoren wurde auf der Basis genauester Grundkenntnisse der Struktur und Funktion verschiedener MMP's hergestellt.

Der in dieser Arbeit untersuchte MMP-Inhibitor TF 17-2, der in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Tschesche in Bielefeld entwickelt und für diese Experimente bereitgestellt wurde, gehört zu dieser neuen Generation von MMP-Inhibitoren.

Die Basis zur Entwicklung dieses neuen Inhibitors wurde durch Klonierungs- und Expressionsexperimente und nachfolgender Aufklärung der MMP-Enzymstrukturen gelegt. Anhand der Kristallisationsstudien wurden die katalytischen Domänen von mehreren MMP's genauer untersucht und analysiert.

Am vielversprechendsten zeigte sich eine Substanzgruppe, die basierend auf dem Heterozyklus von 1,2,4-Triazin entwickelt wurde. Es handelt sich bei TF 17-2 um einen potenten kompetitiven Inhibitor vom Triazintyp, der Ki-Werte im mikro- bis nanomolaren Bereich aufweist und über eine gute Stabilität verfügt [Schröder et al. 2001; Kapischke et al. 2008].

Im Wesentlichen wurden die Matrixmetalloproteinasen MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP untersucht, sowie zusätzlich uPA. Es handelt sich dabei um die bekanntesten und am häufigsten untersuchten MMP's. MT1-MMP und uPA sind zudem an der Aktivierung von MMP's beteiligt.

Die Stimulierbarkeit der Zellen wurde außerdem mit TGF- β 1 überprüft. TGF- β 1 konnte sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte auf die MMP-Expression ausüben [Hazelbag et al. 2002; Benckert et al. 2003].

Es sollte im weiteren Verlauf der Funktion von Stromazellen bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren Rechnung getragen werden. Sicher erwiesen ist, dass Stromazellen den größten Anteil an Proteasen im Tumorgewebe sezernieren. Es werden vor allem MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-11 und MMP-13 von Stromazellen sezerniert. Tumorzellen oder den Tumor infiltrierende Entzündungszellen sind für die Bildung von MMP-9 verantwortlich [Coussens et al. 2002; Bhowmick et al. 2004]. Karzinomzellen sind in der Lage die Expression von MMP's in Stromazellen durch Interleukine und Zytokine zu modulieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Isolierung von humanen Gallenblasenfibroblasten etabliert [in Anlehnung an Kruse et al. 2001].

Die Isolierung der Gallenblasenfibroblasten erfolgte aus nicht tumorös veränderten, frisch extrahierten Gallenblasen. Die unter Zellkulturbedingungen gewonnenen Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert. Es ließen sich für diese Zellen die Markerproteine Desmin, Vimentin und α -SMA nachweisen. Diese Ergebnisse bestätigten, dass es sich um Gallenblasenfibroblasten handelte. Nach längerer Kultivierungszeit zeigte sich eine Differenzierung in myofibroblastäre Zellen, wie sie auch für hepatische Sternzellen und Pankreasfibroblasten/-sternzellen beschrieben wurde [Friedman 1993; Apte et al. 1998; Bachem et al. 1998]. Dies war die wichtige Grundlage, um in Kokultivierungsexperimenten die Interaktionen zwischen Gallenblasenfibroblasten und Cholangiokarzinomzellen zu untersuchen (organotope Kokultivierung).

Desweiteren wurde nachgewiesen, dass der MMP-Inhibitor TF17-2 keine toxischen Effekte auf die zu untersuchenden Zellen hat. Hierzu wurden Untersuchungsanordnungen mit Zellen in Monokultur, sowie in Kokultur verwendet. Kokultivierungsexperimente bestehend aus Tumorzellen und (wenn möglich organotopen) Fibroblasten spiegelten die Situation eines *in vivo* wachsenden Tumors wieder. Die Aussaat der Zellen in der Kokultur wurde so bemessen, dass die Zahl der Fibroblasten immer höher gewählt war als die der Tumorzellen, um der Situation eines frühen Malignoms möglichst nahe zu kommen. Desweiteren sollte anhand dieser ersten Experimente eine mögliche Dosierung des MMP-Inhibitors gefunden und für weitere Untersuchungen festgelegt werden. TF-17-2 war in Konzentrationen im niedrigen zweistelligen Bereich bereits sehr effektiv (30 μ M), sodass höhere Dosierungen aufgrund der Verträglichkeit mit getestet wurden (300 μ M und 3mM) [Kapischke et al. 2008].

Im Weiteren sollte nachgewiesen werden, dass der MMPI TF17-2 seine „antitumoralen“ Effekte nicht aufgrund möglicher Formen des Zelltodes ausübt (z.B. Apoptose und Nekrose). Daher wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um die Zelltoxizität des Inhibitors einschätzen zu können.

Wirkungen des Lösungsvermittlers DMSO konnten in Kontrollexperimenten ausgeschlossen werden (Kapischke 2005).

Zur Toxizitätsbeurteilung wurde unter anderem ein kolorimetrischer Zellvitalitätstest verwendet, bei dem die mitochondriale Enzymaktivität durch die Umwandlung eines Farbstoffes mittels Extinktion gemessen wurde.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der Inhibitor TF17-2 in Dosierungen von $< 300\mu\text{M}$ weder für die untersuchten humanen Fibroblasten, noch für die verwendeten Tumorzellen toxisch war.

Eine Extinktionsabnahme von 20-60% je nach untersuchtem Zelltyp bei einer Inhibitorkonzentration von 3mM im Vergleich zum Kontrollansatz ließ jedoch die Frage offen, ob es sich um einen Aktivitätsverlust durch Proliferationsstopp oder durch Apoptose handelte. Um dieser Frage nachzugehen wurden anschließend weitere Experimente durchgeführt.

Eine weitere Methode zur Zellvitalitätsbestimmung ist der ^3H -Thymidin-Assay. Mit dieser Methode wird die DNA-Neusynthese untersucht. Ein Maß für die Zellproliferation ist der Einbau des Tritium markierten Thymidins in das Genom.

Nach 24h Inkubation mit TF17-2 zeigte sich für RPMI 7451, KiF5 und die hGBF eine nicht signifikante Änderung der DNA-Neusynthese bis zu einer Inhibitorkonzentration von $300\mu\text{M}$. Die jeweiligen Kokulturen, RPMI + hGBF und RPMI + KiF5, schienen gänzlich unempfindlich auf diese TF17-2 – Konzentrationen zu reagieren. Bei einer Konzentration von 3mM TF17-2 sank die DNA-Neusynthese signifikant auf etwa 20% bei den RPMI – Tumorzellen, auf etwa 50% bei den hGBF und auf etwa 20% in der Kokultur. Ähnliches zeigte sich für die Vorhautfibroblasten KiF5. Hier sank die DNA – Neusyntheserate auf etwa 30% und auf etwa 20% in der Kokultur mit RPMI.

Das bedeutete, dass die Zellen entweder bei einer Inhibitorkonzentration von 3mM ihre Proliferation stoppten, oder aber in Apoptose über gingen. Um diesen Sachverhalt endgültig zu klären, schloss sich ein Test zur DNA-Fragmentierung an.

Der Jam-Assay misst den Anteil der radioaktiv markierten DNA, der nicht durch apoptotische Vorgänge fragmentiert wird. Es wird also die intakte DNA lebender Zellen evaluiert.

Die Untersuchungen sollten klären, ob es durch Zugabe des MMP-Inhibitors zu einem vermehrten Zelltod kommt.

Es zeigten sich nichtsignifikante Abnahmen der intakten DNA für niedrige TF17-2 Konzentrationen, wobei anzumerken ist, dass die primären Gallenblasenfibroblasten im unteren Konzentrationsbereich offensichtlich deutlich sensibler reagierten als KiF5 und RPMI-Zellen. Bei 3mM TF17-2 Konzentration jedoch wurde deutlich, dass die Zellen im Zellzyklus arretierten, jedoch nicht starben, da keine DNA-Fragmentierung auftrat.

Summarisch kann festgehalten werden, dass TF17-2 keine toxische Wirkung auf die untersuchten Zellen hat. Der Rückgang der Aktivität im Zellvitalitätsassay bei höchsten TF17-2-Konzentrationen wurde durch die Proliferationseinschränkung im DNA-Neusynthese-Test unterstützt. Ein Absterben der Zellen konnte allerdings im Jam-Assay nicht festgestellt werden. Es kam folglich zu einer Hemmung der Zellproliferation mit Reduktion des mitochondrialen Stoffwechsels.

In weiterführenden Experimenten sollte der Einfluss von TF17-2 auf die Proteinexpression der MMP's untersucht werden.

Die Westernblotanalyse erlaubt die Beurteilung der MMP-Pro-Formen, während die Gelzymographien einen Eindruck der bereits sezernierten aktiven MMP's vermitteln.

Unsere bisherigen Untersuchungen ließen darauf schließen, dass TF17-2 insgesamt nur sehr geringe bzw. keine Auswirkungen auf die Bandenstärken im Westernblot und den Zymographien haben. Auch unter den Bedingungen der Kokultivierung zeigten sich unter TF17-2 keine hemmenden Effekte sowohl auf die Expression der (inaktiven) Pro-Formen, wie sie im Westernblot dargestellt werden kann, als auch auf die der sezernierten aktiven MMP's, die sich durch die Zymographie darstellen lassen.

Im Einzelnen konnte nachgewiesen werden, dass beide Fibroblastenzelllinien deutliche Mengen an MMP-2 produzierten, wohingegen die Tumorzelllinie RPMI 7451 kein bzw. sehr wenig MMP-2 exprimiert. Durch die Zugabe von TGF- β 1 ließen sich die Fibroblasten zu einer noch stärkeren MMP-2 Expression stimulieren. Zusätzlich konnte unter TGF- β 1-Stimulation auch bei den Cholangiokarzinomzellen die MMP-2-Produktion hochreguliert werden.

Deutlich zu erkennen war die Expression von MMP-9 in den Cholangiokarzinomzellen. Auch hier fand eine Hochregulierung durch TGF- β 1 statt. KiF5 und hGBF zeigten insgesamt eine sehr schwache MMP-9 Expression, die auch durch TGF- β 1 kaum stimuliert wurde. Auch MT1-MMP wurde hauptsächlich von RPMI 7451 exprimiert.

In der Kokultur könnte das weitgehende Fehlen von Banden für MMP-9 und MT1-MMP auf einen Verdünnungseffekt aufgrund der 3-fachen Zellzahl der Fibroblasten zurückzuführen sein. Im Westernblot konnte durch die Zugabe des Wachstumsfaktors TGF- β 1 Modulationen in der Bandenstärke dargestellt werden. Um diese interessanten Ergebnisse zu bestätigen, schloss sich ein TGF- β 1-Stimulationstest in der Zymographie an. Am Beispiel von RPMI werden diese in Abb. 3.3.2.1 dargestellt.

Die Zellen wurden über unterschiedlich lange Zeiträume 24h-72h mit 1ng/ml oder 10ng/ml TGF- β 1 inkubiert, anschließend wurden gleiche Mengen an Überstand aufgetragen. Man sieht deutlich, dass sowohl MMP-2 (Größe 66kDA) als auch MMP-9 (Größe 90kDA) durch TGF- β 1 stimulierbar waren, wobei höhere Mengen TGF- β 1 über einen langen Zeitraum auch die höchste Expression von MMP's hervorriefen. Hier unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit andere Beobachtungen, die einen positiven Effekt von TGF- β 1 bei der Cholangiokarzinogenese beschreiben [Su et al. 2001; Benckert et al. 2003].

MMP-2 und MMP-9 (Gelatinase A und B) zersetzen vor allem Kollagen Typ IV, Laminin und Gelatin, die als Komponenten der Basallamina eine wichtige Barriere für die Tumorzellmigration darstellen. MMP-2 wird durch MT1-MMP aktiviert, welches hauptsächlich von Tumorzellen exprimiert wird. MMP-9 wird plasminvermittelt durch uPA aktiviert.

Die Auswertung der Zymographien ergab, dass für alle untersuchten Zelllinien MMP-2 und MMP-9 in unterschiedlichen Mengen nachgewiesen werden konnten.

Wie in den Westernblotanalysen produzierten die RPMI 7451-Zellen im Vergleich zu den Fibroblasten weniger MMP-2. Die Fibroblastenzelllinien sezernierten große Mengen an MMP-2, wobei kein Unterschied zwischen den KiF5-Zellen, die als Zelllinie bereits langfristig etabliert ist, und den primären Gallenblasenfibroblasten zu erkennen war.

Das Molekulargewicht der MMP-9-Proform beträgt 92kDa, das der aktiven Form 84kDa. In den Cholangiokarzinomzellen zeigte sich eine deutliche MMP-9-Expression auf Höhe von 92kDa, die durch TGF- β 1 stimuliert werden konnte. Die hGBF und die KiF5 sezernierten etwas weniger MMP-9, aber offensichtlich hauptsächlich die aktive MMP-9-Form. Da in dem Coomassie blau gefärbten Gel helle Banden mit dem Molekulargewicht der aktiven und inaktiven MMP-9-Form dargestellt werden konnten, bleibt zu vermuten, dass unter experimentellen Bedingungen beide Proteine (die sezernierte aktive Form und die inaktive Proform in situ) in der Lage waren die Gelatine zu verdauen. Diese zwei kurz aufeinander folgenden Banden ließen sich auch in der Kokultur darstellen.

Die Wirksamkeit des MMP-Inhibitors TF17-2 konnte im Fibroblasten-Invasionsassay unter Beweis gestellt werden. In leicht abgewandelter Form des von Casey et al. 2003 beschriebenen Tests, gewährt dieses Experiment einen Eindruck von der proteolytischen Aktivität der Zellen. Grundlage war ein permeabilisierter Fibroblastenmonolayer, auf den die jeweiligen Zellen direkt ausgesät wurden. Somit konnte die direkte Zell-Zellinteraktion, wie sie auch in tumorösem Gewebe stattfindet, beurteilt werden.

Primär ging es nicht darum, die einzelnen an der Proteolyse beteiligten MMP's zu unterscheiden und die selektive Wirkung des Inhibitors auf die jeweiligen Proteasen zu testen, als vielmehr einen Gesamteindruck von der Wirksamkeit zu gewinnen.

In einem Testansatz über 72h ohne Inhibitor konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Aktivität der Cholangiokarzinomzellen zu großen Invasionshöfen im Fibroblastenrasen geführt hatte. Die Größe der Invasionshöfe korrelierte dabei mit der proteolytischen Aktivität der Zellen. Die Kokultivierung von Gallenblasenfibroblasten und Cholangiokarzinomzellen führte zu einer wesentlich ausgeprägteren und schnelleren Proteolyse des Fibroblastenmonolayers.

Wie schon in den oben geschilderten Experimenten deutlich wurde, exprimierten Fibroblasten an sich schon erhebliche Mengen MMP's, so dass hier synergistische Prozesse bei der Sekretion und Aktivierung der Proteasen angenommen werden müssen.

Diese Ergebnisse bestätigen Erkenntnisse aus verschiedenen Arbeiten zur Problematik der Tumor-Stroma-Interaktion [Basset et al. 1997; Hauptmann et al. 2003; Bhowmick et al. 2004].

In Versuchsanordnungen mit dem MMP-Inhibitor wurde belegt, dass dieser in der Lage war, die proteolytische Wirkung der Zellen zu hemmen. Im Vergleich zur Mediumkontrolle waren die Invasionshöfe nach einem Zeitraum von 3 Tagen bei allen Konzentrationen des MMP-Inhibitors TF17-2 kleiner und bei einer Dosis von 3mM waren überhaupt keine Invasionshöfe mehr zu erkennen. Eine Dosis von 30µM war dabei ähnlich wirkungsvoll wie eine Konzentration von 300µM TF17-2. Auch in der Kokultur konnte eine effektive Hemmung der Proteolyse nachgewiesen werden.

Im H³-Thymidinassay, sowie im Jam-Assay wurde bereits gezeigt, dass die Zellen unter der Einwirkung des Inhibitors nicht starben, sondern in eine stabile Ruhephase des Zellzyklus übergangen, in der keine DNA-Syntheseleistungen der Zellen erbracht werden mussten.

Hier bot sich nun nochmals die Möglichkeit die bereits erhobenen Ergebnisse zu bestätigen. Um zu beweisen, dass die Wirkung des Inhibitors reversibel ist, wurden die Zellen über 72h mit einer Dosis von 3mM TF17-2 stimuliert. Anschließend wurden diese Zellen über weitere 3 Tage mit normalem Zellkultur-Medium inkubiert. Mikroskopisch waren danach deutliche Invasionshöfe zu erkennen, die denen einer 2-tägigen Kontrollanordnung entsprachen.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Inhibitor vor allem die durch MMP's vermittelte Invasivität der Tumorzellen beeinflusst, selbst aber für die Zellen nicht toxisch ist und auch massive Nebenwirkungen des Lösungsmittlers DMSO vernachlässigt werden können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen zusammenfassend folgende Schlüsse zu:

- Die verwendeten Konzentrationen des MMP-Inhibitors TF17-2 wirken nicht toxisch auf humane Zelllinien.
- Der Inhibitor zeigt keine nachweisbare Wirkung auf die Proteinexpression und Sezernierung der MMP-Proformen.
- Im Invasionsassay kann ein biologischer Effekt auf die Invasivität gezeigt werden. Die MMP-vermittelte proteolytische Aktivität der Tumorzellen kann schon durch eine geringe Dosierung (30µM) des MMPI TF17-2 blockiert werden.
- Die Wirkung des MMPI TF17-2 ist im Invasionsassay reversibel.
- Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Stromazellen spielen eine große Rolle bei der MMP-Expression und -Aktivierung. Im Invasionsassay führt diese Interaktion zwischen RPMI-7451 und hGBF zu einem deutlich aggressiveren Verhalten des Tumormodells, gekennzeichnet durch die hohe proteolytische Potenz. Der Modellansatz der Kokultivierung sollte in zukünftigen *in vitro* Untersuchungen regelmäßigen Einsatz finden, da dieses Vorgehen der Situation *in vivo* am ehesten entspricht.
- Die Kokultivierung hat keinen Einfluss auf die Wirksamkeit des MMP-Inhibitors TF 17-2. Auch eine verstärkte Invasivität, wie sie am Invasionsassay dargestellt wurde, konnte durch den Inhibitor wirksam unterdrückt bzw. inhibiert werden.

Ausblick in die Zukunft und längerfristige Perspektiven:

- Die am Zellmodell erhobenen Daten für das cholangiozelluläre Karzinom sollten in *in vivo* Experimenten bestätigt werden (in Anlehnung an Tierexperimente anderer Karzinome, z.B. Pancreaskarzinom) [Kapischke, Pries 2008].

Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente legen nahe, dass z.B. im Tierexperiment auf eine orthotope Inokulation des Tumors geachtet werden sollte, da diese Versuchsanordnungen ein scheinbar deutlich aggressiveres Tumorverhalten aufweisen und humanen Gallenblasenkarzinomen damit besser entsprechen würden. Es müsste demnach zunächst eine Tierexperiment etabliert werden, indem keine subkutane Inokulation der Tumorzellen erfolgt, sondern ein Zugangsweg zu den Gallebildenden/-transportierenden Gängen der murinen Kleintierleber gefunden wird. Hierzu wird die Etablierung bzw. Weiterentwicklung eines orthotopen Tiermodells notwendig [Egberts et al. 2007].

- In zusätzlichen Untersuchungen könnte zudem die Interaktion von TF17-2 und gängigen Chemotherapeutika untersucht werden, da der MMP-Inhibitor in der adjuvanten Therapie nur im Rahmen einer Kombinationstherapie verschiedener Wirkstoffklassen Anwendung finden sollte [Zucker et al. 2000].

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein neuer MMP-Inhibitor auf der Basis des Heterozyklus 1,2,4-Triazin TF 17-2 in seiner Wirkung auf Cholangiokarzinomzellen, Gallenblasenfibroblasten aus der Primärkultur, sowie auf schnell wachsende Vorhautfibroblasten (KiF5) getestet.

Das Cholangiokarzinom ist eine maligne Tumorerkrankung, deren Prognose insgesamt sehr schlecht ist. Im Anfangsstadium verläuft sie häufig asymptomatisch, so dass die meisten Patienten bei Diagnosestellung ein bereits fortgeschrittenes Tumorleiden aufweisen. Es existiert derzeit keine standardisierte Chemotherapie. Deshalb ist es gerade für Tumoren mit solch schlechten Aussichten wichtig, neue Therapiemaßnahmen zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Gewinnung von primären Gallenblasenfibroblasten aus Teilen nicht tumorös veränderter Gallenblasen. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen wurden sie charakterisiert und anschließend kultiviert.

Der Effekt des neuen MMP-Inhibitors TF17-2 auf die Zellvitalität wurde mit Hilfe eines kolorimetrischen Proliferationstestes, eines Verfahrens zur Bestimmung der DNA-Neusynthese durch ³H-Thymidin-Einbau, sowie eines Assays zur Ermittlung der DNA-Fragmentierung als Zeichen der Apoptose (Jam-Assay) dargestellt. Diese Versuche führten zu dem Ergebnis, dass TF17-2 in Konzentrationen von 30µM, 60µM und 300µM zu keinen signifikanten Einschränkungen der Zellvitalität führten. Ab einer Konzentration von 3mM MMP-Inhibitorlösung ließ sich eine 20-60%ige Zellvitalitätseinschränkung nachweisen. Hierbei handelte es sich nicht um apoptotische Vorgänge, wie anhand der fehlenden DNA-Fragmentierung im Jam-Assay gezeigt werden konnte, sondern um die Hemmung der Zellproliferation mit Reduktion des mitochondrialen Stoffwechsels. Wie in den Ez4U-Tests und den ³H-Thymidin-Assays (v.a. für die KiF5-Zellen) zu sehen, erwiesen sich die Zellen in einer direkten Kokultur von Tumorzellen und Fibroblasten gegenüber den Einflüssen des MMP-Inhibitors resistenter, als die Einzelkultur der jeweiligen Zelllinien.

Der Einfluss von TF17-2 auf die Proteinexpression der MMP's wurde mittels Westernblotanalyse dargestellt. Zur Beurteilung der aktivierten sezernierten MMP's wurden Zymographien durchgeführt. Es fiel auf, dass sich in der Zymographie auch in gewissem Maße Banden auf Höhe der Proformen darstellen ließen. So gewinnt man einen Eindruck vom Verhältnis der sezernierten aktivierten, als auch der Proformen der MMP's.

Insgesamt zeigten sich auch hier keine oder nur sehr geringe Auswirkungen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass der Inhibitor keinen Einfluss auf die Expression der sezernierten MMP's hatte.

Die Wirksamkeit des MMP-Inhibitors TF17-2 ließ sich in einem modifizierten Invasionsassay demonstrieren. Grundlage für dieses Experiment bildete ein permeabilisierter Fibroblastenrasen, auf den die zu untersuchenden Zellen direkt ausgesät wurden. Die proteolytische Aktivität der Zellen stellte sich anhand der durch den Fibroblastenverdau entstandenen Invasionshöfe dar. Es konnte hierbei eine sehr effektive MMP-Inhibition gezeigt werden. Die Tumorzellinvasion konnte schon durch eine sehr niedrige Dosierung des Inhibitors blockiert werden und war vollständig reversibel.

Somit ließ sich eine *in vitro* Aktivität des MMP- Inhibitors TF17-2 erfolgreich nachweisen.

Zur weiteren Evaluation der Wirksamkeit des MMP-Inhibitors TF17-2 stehen Untersuchungen am Tiermodell noch aus. Zudem wäre es sinnvoll TF17-2 in Kombination mit gängigen Chemotherapeutika zunächst *in vitro* und später am Tiermodell (*in vivo*) zu untersuchen.

1. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS (1998) Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation and culture. *Gut* 43:128-133
2. Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS (2004) Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 29:179-187
3. Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G. (1998) Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 115(2):421-32.
4. Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G.(2005) Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*. 2005 Apr; 128(4):907-21.
5. Balbín M, Fueyo A, Knäuper V, Pendás AM, López JM, Jiménez MG, Murphy G, López-Otín C (1998) Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *J Biol Chem*. Sep 11; 273(37):23959-68.
6. Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq JP, Rio MC (1997) Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol* 15:535-541
7. Bauvois B (2004) Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene* 23:317-329
8. Benckert C, Jonas S, Cramer T, Von Marschall Z, Schafer G, Peters M, Wagner K, Radke C, Wiedenmann B, Neuhaus P, Hocker M, Rosewicz S (2003) Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 63:1083-1092
9. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432:332-337
10. Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 55:434-439
11. Bloomston M, Shafii A, Zervos EE, Rojiani A, Rosemurgy AS (2002) MMP-2 and TIMP-1 are derived from, not in response to, pancreatic cancer. *J Surg Res* 102:35-38
12. Boyden S. (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorpho-nuclear leucocytes. *J Exp Med*. Mar 1;115:453-66
13. Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW (2002) Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer* 86:1864-1870
14. Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M, Buckels JA (2002) A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 87:161-167
15. Brown PD (2000) Ongoing trials with matrix metalloproteinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 9:2167-2177

16. Campo E, Merino MJ, Tavassoli FA, Charonis AS, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA (1992) Evaluation of basement membrane components and the 72 kDa type IV collagenase in serous tumors of the ovary. *Am J Surg Pathol* 16:500-507
17. Casey RC, Koch KA, Oegema TR, Jr., Skubitz KM, Pambuccian SE, Grindle SM, Skubitz AP (2003) Establishment of an in vitro assay to measure the invasion of ovarian carcinoma cells through mesothelial cell monolayers. *Clin Exp Metastasis* 20:343-356
18. Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, Groshen S, Ye W, Shalinsky DR, Werb Z, Coussens LM, DeClerck YA (2004) Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer Res* 64:1675-1686
19. Clark IM, Parker AE (2003) Metalloproteinases: their role in arthritis and potential as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 7:19-34
20. Conca W, Kaplan PB, Krane SM (1989) Increases in levels of procollagenase messenger RNA in cultured fibroblasts induced by human recombinant interleukin 1 beta or serum follow c-jun expression and are dependent on new protein synthesis. *J Clin Invest* 83:1753-1757
21. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295:2387-2392
22. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867
23. Eccles SA, Box GM, Court WJ, Bone EA, Thomas W, Brown PD (1996) Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94). *Cancer Res* 56:2815-2822
24. Cowell S, Knäuper V, Stewart ML, D'Ortho MP, Stanton H, Hembry RM, Lo C; Pez-Oti N, Renolds JJ, Murphy G (1998) Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem. J.* 331, 453±458
25. Egberts JH, Schniewind B, Schafmeyer C, Kruse ML, Sipos B, Fändrich F, Kalthoff H, Tepel J (2007) Establishment of a novel orthotopic xenograft model of human gallbladder carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* 24(3):141-148
26. Erlichman C, Adjei AA, Alberts SR, Sloan JA, Goldberg RM, Pitot HC, Rubin J, Atherton PJ, Klee GG, Humphrey R (2001) Phase I study of the matrix metalloproteinase inhibitor, BAY 12-9566. *Ann Oncol* 12:389-395
27. Everts V, Korper W, Hoeben KA, Jansen ID, Bromme D, Cleutjens KB, Heeneman S, Peters C, Reinheckel T, Saftig P, Beertsen W (2006) Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone. *J Bone Miner Res.* Sep; 21(9):1399-408.
28. Fini ME, Cook JR, Mohan R (1998) Regulation of MMP gene expression. In: Parks WC, Mecham RP (eds) Matrix Metalloproteinases. *Academic Press, San Diego*, p 299-356
29. Fischer T. (2004) Design und Synthese von Matrix Metalloproteinase Inhibitoren mit 1,2,4-Triazin-Grundgerüst. *Dissertation, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld*
30. Friedman SL (1993) The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 328:1828-1835
31. Friedman SL, Yamasaki G, Wong L (1994) Modulation of transforming growth factor beta receptors of rat lipocytes during the hepatic wound healing response. Enhanced binding and reduced gene expression accompany cellular activation in culture and in vivo. *J Biol Chem* 269:10551-10558

32. Gross J, Lapiere C (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 1014–22.
33. Hande KR, Collier M, Paradiso L, Stuart-Smith J, Dixon M, Clendeninn N, Yeun G, Alberti D, Binger K, Wilding G (2004) Phase I and pharmacokinetic study of prinomastat, a matrix metalloprotease inhibitor. *Clin Cancer Res* 10:909-915
34. Hauptmann S, Siegert A, Berger S, Denkert C, Kobel M, Ott S, Siri A, Borsi L (2003) Regulation of cell growth and the expression of extracellular matrix proteins in colorectal adenocarcinoma: a fibroblasttumor cell coculture model to study tumor-host interactions in vitro. *Eur J Cell Biol* 82:1-8
35. Hazelbag S, Gorter A, Kenter GG, van den Broek L, Fleuren G (2002) Transforming growth factor-beta1 induces tumor stroma and reduces tumor infiltrate in cervical cancer. *Hum Pathol* 33:1193-1199
36. Heath EI, O'Reilly S, Humphrey R, Sundaresan P, Donehower RC, Sartorius S, Kennedy MJ, Armstrong DK, Carducci MA, Sorensen JM, Kumor K, Kennedy S, Grochow LB (2001) Phase I trial of the matrix metalloproteinase inhibitor BAY12-9566 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 48:269-274
37. Hewitt RE, Leach IH, Powe DG, Clark IM, Cawston TE, Turner DR (1991) Distribution of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in colorectal tumours. *Int J Cancer* 49:666-672
38. Hornebeck W (2003) Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol Biol* 51:569-573
39. Ito Y, Kojiro M, Nakashima T, Mori T (1988), Pathomorphologic characteristics of 102 cases of thorostrast-related hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and hepatic angiosarcoma. *Cancer* 62:1153–1162
40. Jackson L, Evers BM (2006) Chronic inflammation and pathogenesis of GI and pancreatic cancer. *Cancer Treat Res.* 130:39-65.
41. Jo Chae K, Rha SY, Oh BK, Koo JS, Kim YJ, Choi J, Park C, Park YN (2004) Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in intraductal and nonintraductal growth type of cholangiocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 99:68-75
42. Kaiser GM, Frühauf NR, Lang H, Sauerwein W, Sotiropoulos GC, Zöpf T, Grabellus F, Wittig A, Oldhafer KJ, Malagó M, Broelsch CE (2008) Impact of intraoperative radiotherapy (IORT) on survival of patients with unresectable hilar cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 55(88):1951-4
43. Kapischke M (2005); *In vitro* und *in vivo*-Testung einer neuen Klasse synthetischer Matrix-Metalloproteinase Inhibitoren als Therapeutikum für das duktales Adenokarzinom des exokrinen Pankreas und das cholangiozelluläre Karzinom. *Habilitationsschrift, Lübeck*
44. Kapischke M, Fischer T, Tiessen K, Tschesche H, Bruch HP, Kalthoff H, Kruse ML (2008) Characterisation of a novel matrix metalloproteinase inhibitor on pancreatic adenocarcinoma cells in vitro and in an orthotopic pancreatic cancer model in vivo. *Int J Oncol* 32(1): 273-282
45. Kapischke M, Pries A (2008) Animal models of pancreatic cancer for drug research. *Expert opinion on Drug Discovery* Vol. 3, No. 10, Pages 1177-1188.

46. Karadag N, Kirimlioglu H, Isik B, Yilmaz S, Kirimlioglu V (2008) Expression of matrix metalloproteinases in gallbladder carcinoma and their significance in carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008 Jan 25
47. Knäuper V, Murphy G (1998) Membrane-type matrix metalloproteinases and cell surface-associated activation cascades for matrix metalloproteinases. In: Parks WC, Mecham RP (eds) *Matrix Metalloproteinases. Academic Press, San Diego*, p 199-218
48. Kondo M, Asai T, Katanasaka Y, Sadzuka Y, Tsukada H, Ogino K, Taki T, Baba K, Oku N (2004) Anti-neovascular therapy by liposomal drug targeted to membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Int J Cancer* 108:301-306
49. Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, Fölsch UR, Schäfer H, Schmidt WE (2001) Isolation, long-term culture, and characterization of rat pancreatic fibroblastoid/stellate cells. *Pancreas* 23:49-54
50. Kuzuya M, Iguchi A (2003) Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb* 10:275-282
51. Lang M, Henson R, Braconi C, Patel T (2009) Epigallocatechin modulates chemotherapy-induced apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Liver Int.* 29(5):670-7
52. Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS (2003) Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth. *Cancer Res* 63:2454-2461
53. Liu J, Tsao MS, Pagura M, Shalinsky DR, Khoka R, Fata J, Johnston MR (2003) Early combined treatment with carboplatin and the MMP inhibitor, prinomastat, prolongs survival and reduces systemic metastasis in an aggressive orthotopic lung cancer model. *Lung Cancer* 42:335-344
54. Löhr M, Schmidt Ch, Ringel J, Kluth M, Müller P, Nizze H, Jesnowski R (2001) Transforming growth factor-b1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Research* 61, 550–555
55. Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC (2001) Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem.* Mar 30; 276(13):10134-44.
56. Lu JP, Mao JQ, Li MS, Lu SL, Hu XQ, Zhu SN, Nomura S (2003) In situ detection of TGF betas, TGF beta receptor II mRNA and telomerase activity in rat cholangiocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 9:590-594
57. Menke A, Adler G (2002) TGFbeta-induced fibrogenesis of the pancreas. *Int J Gastrointest Cancer* 31:41-46
58. Miller KD, Gradishar W, Schuchter L, Sparano JA, Cobleigh M, Robert N, Rasmussen H, Sledge GW (2002) A randomized phase II pilot trial of adjuvant marimastat in patients with early-stage breast cancer. *Ann Oncol* 13:1220-1224
59. Miller KD, Saphner TJ, Waterhouse DM, ChenTT, Rush-Taylor A, Sparano JA, Wolff AC, Cobleigh MA, Galbraith S, Slegde GW (2004) A randomized phase II feasibility trail of BMS-275291 in patients with early stage breast cancer. *Clin Cancer Research* 10(6):1971-5
60. Mürkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H (2004) Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res* 64:1331-1337

61. Murphy G, Knäuper V, Lee MH, Amour A, Worley JR, Hutton M, Atkinson S, Rapti M, Williamson R (2003) Role of TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) in pericellular proteolysis: the specificity is in the detail. *Biochem Soc Symp* 70:65-80
62. Murray D, Morrin M, McDonnell S (2004) Increased invasion and expression of MMP-9 in human colorectal cell lines by a CD44- dependent mechanism. *Anticancer Res* 24:489-494
63. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18:1135-1149
64. Phillips PA, Wu MJ, Kumar RK, Doherty E, McCarroll JA, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV (2003) Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut*. 52(5):677-82
65. Phillips PA, McCarroll JA, Park S, Wu MJ, Pirola R, Korsten M, Wilson JS, Apte MV (2003) Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut*. 52(2):275-82
66. Pichlmayer R, Lamesch P, Weimann A, Tusch G, Ringe B (1995) Surgical treatment of cholangiocellular carcinoma. *World J Surg* 19: 83-88
67. Ramnath N, Creaven PJ (2004) Matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Oncol Rep* 6:96-102
68. Ramont L, Pasco S, Hornebeck W, Maquart FX, Monboisse JC (2003) Transforming growth factor-beta1 inhibits tumor growth in a mouse melanoma model by down-regulating the plasminogen activation system. *Exp Cell Res* 291:1-10
69. Ries C., Petrides P. E. (1995) Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol. Chem.*;376:345–355.
70. Rosemurgy A, Harris J, Langleben A, Casper E, Goode S, Rasmussen H (1999) Marimastat in patients with advanced pancreatic cancer: a dose-finding study. *Am J Clin Oncol* 22:247-252
71. Rosen CB, Nagorney DM, Wiesner RH, Coffey Jr. RJ, LaRusso NF (1991) Cholangiocarcinoma complicating primary sclerosing cholangitis. *Ann Surg* 213:21–25
72. Roy R, Yang J, Moses MA (2009) Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol*. Nov 1;27(31):5287-97.
73. Saotome T, Inoue H, Fujimiya M, Fujiyama Y, Bamba T (1997) Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast-like cells derived from human pancreatic acini. *Pancreas*. 14(4):373-82.
74. Santini MT, Rainaldi G (1999) Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 67:148-157
75. Sato H, Okada Y, Seiki M (1997) Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion. *Thromb Haemost* 78:497-500
76. Sato H, Seiki M (1996) Membrane-type matrix metalloproteinases (MTMMPs) in tumor metastasis. *J Biochem* 119:209-215
77. Sato N, Maehara N, Goggins M (2004) Gene expression profiling of tumor-stromal interactions between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts. *Cancer Res* 64:6950-6956
78. Schmielau J, Klempnauer J, Schmiegel W (1997) Cholangiokarzinome. *Der Internist* 38: 970-976
79. Schröder J (2001) Design and Synthesis of Matrix Metalloproteinase Inhibitors derived from a 6H-1,3,4-Thiadiazine Scaffold. *Dissertationsschrift Bielefeld*

80. Schröder J, Henke A, Wenzel H, Brandstetter H, Stammeler HG, Stammeler A, Pfeiffer WD, Tschesche H (2001) Structure-based design and synthesis of potent matrix metalloproteinase inhibitors derived from a 6H-1,3,4-thiadiazine scaffold. *J Med Chem* 44:3231-3243
81. Schröder J, Wenzel H, Stammeler HG, Stammeler A, Neumann B, Tschesche H (2001) Novel heterocyclic inhibitors of matrix metalloproteinases: three 6H-1,3,4-thiadiazines. *Acta Crystallogr C* 57:593-596
82. Silvain C, Zeevi A, Saidman S, Duquesnoy RJ, Van Thiel DH (1995) Phenotypic and functional characteristics of colonic lymphocytes isolated from patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease. *Hepatology* 42:250-258
83. Sipos B, Weber D, Ungefroren H, Kalthoff H, Zühlendorff A, Luther C, Torok V, Klöppel G (2002) Vascular endothelial growth factor mediated angiogenic potential of pancreatic ductal carcinomas enhanced by hypoxia: an in vitro and in vivo study. *Int J Cancer* 102:592-600
84. Sotiropoulos GC, Kaiser GM, Lang H, Molmenti EP, Beckebaum S, Fouzas I, Sgourakis G, Radtke A, Bockhorn M, Nadalin S, Treckmann J, Niebel W, Baba HA, Broelsch CE, Paul A (2008) Liver Transplantation as a Primary Indication for Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Single-Center Experience. *Transplant Proc.*40(9):3194-5
85. Sternlicht MD (2006) The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research* 2006, 8:201
86. Su WC, Shiesh SC, Liu HS, Chen CY, Chow NH, Lin XZ (2001) Expression of oncogene products HER2/Neu and Ras and fibrosis-related growth factors bFGF, TGF-beta, and PDGF in bile from biliary malignancies and inflammatory disorders. *Dig Dis Sci* 46:1387-1392
87. Takada T, Amano H, Yasuda H, Nimura Y, Matsushiro T, Kato H, Nagakawa T, Nakayama T (2002) Is postoperative adjuvant chemotherapy useful for gallbladder carcinoma? A phase III multicenter prospective randomized controlled trial in patients with resected pancreaticobiliary carcinoma. *Cancer* 95:1685-1695
88. Takemura N, Kokudo N, Imamura H, Takazawa Y, Sano K, Sugawara Y, Nakagawa K, Ohtomo K, Makuuchi M (2008) Eleven-year survivor of unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma treated using long-term UFT therapy. *Hepatology* 55(88):1997-9
89. Tannapfel A., Wittekind C. (2001), Anatomy and pathology of intrahepatic and extrahepatic bileduct tumors. *Der Pathologe*, 22:114-123
90. Trauzold A, Röder Ch, Sipos B, Karsten K, Arlt A, Jiang P, Martin-Subero JI, Siegmund D, Mürköster S, Pagerols Raluy L, Siebert R, Wajant H, Kalthoff H (2005) CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. *Faseb J Apr*; 19(6):620-2.
91. Van Lint P, Libert C (2007). Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 82 (6): 1375–81.
92. Waxman J, Wasan H (1992) The architecture of cancer. *Bmj* 305:1306-1307
93. Weber A, Landrock S, Schneider J, Stangl M, Neu B, Born P, Classen M, Rösch T, Schmid RM, Prinz Ch (2007) Long-term outcome and prognostic factors of patients with hilar cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 13(9): 1422-1426

94. Werneburg NW, Yoon JH, Higuchi H, Gores GJ (2003) Bile acids activate EGF receptor via a TGF- α -dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:26
95. Witzigmann H, Lang H, Lauer H (2008) Guidelines for palliative surgery of cholangiocarcinoma. *HPB* 10: 154-160
96. Witzigmann H, Wiedmann M, Wittekind Ch, Mössner J, Hauss J (2008) Therapeutical Concepts and Results for Klatskin Tumors. *Dtsch Arztebl Int*; 105(9): 156–61
97. Xiao M, Zhou NX, Huang ZQ, Lu YL, Chen LH, Wang DJ, Chang WL (2004) The ratio of MMP-2 to TIMP-2 in hilar cholangiocarcinoma: a semi-quantitative study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 3:599-602
98. Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Adachi Y, Fukushima H, Sasaki S, Mukaiya M, Hirata K, Imai K (2001) Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression. *J Clin Oncol* 19:1118-1127
99. Zucker S, Cao J, Chen WT (2000) Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 19:6642-665

Tabelle 7.1a: Ergebnisse des Vitalitätstest (Ez4U) mit RPMI 7451

Zelldichte [Zellen/Vertiefung]	Inkubationszeit [h]	TF17-2 Konzentration [μ M]	Prozent der Kontrolle \pm SD	p-Wert (t-test n=3)
RPMI 7451 ohne FCS				
10.000	24	30	92 \pm 5	0,228
		60	93 \pm 8	0,504
		300	88 \pm 4	0,004
		3000	61 \pm 4	<0,001
	48	30	88 \pm 1	<0,001
		60	86 \pm 3	<0,001
		300	79 \pm 4	<0,001
		3000	48 \pm 4	<0,001
20.000	24	30	103 \pm 7	0,216
		60	99 \pm 4	0,927
		300	99 \pm 3	0,437
		3000	89 \pm 5	<0,001
	48	30	100 \pm 2	0,678
		60	101 \pm 3	0,255
		300	98 \pm 3	0,925
		3000	85 \pm 5	<0,001
RPMI 7451 mit FCS				
10.000	24	30	94 \pm 4	0,554
		60	93 \pm 9	0,495
		300	90 \pm 6	0,173
		3000	61 \pm 4	<0,001
	48	30	91 \pm 5	0,004
		60	86 \pm 3	<0,001
		300	80 \pm 6	<0,001
		3000	49 \pm 4	<0,001
20.000	24	30	99 \pm 8	0,757
		60	98 \pm 5	0,926
		300	97 \pm 5	0,857
		3000	90 \pm 5	0,060
	48	30	98 \pm 3	0,614
		60	99 \pm 3	0,775
		300	98 \pm 4	0,467
		3000	85 \pm 6	<0,001

Tabelle 7.1b: Ergebnisse des Vitalitätstest (Ez4U) mit KiF5

Zelldichte [Zellen/Vertiefung]	Inkubationszeit [h]	TF17-2 Konzentration [μ M]	Prozent der Kontrolle \pm SD	p-Wert (t-test n=3)
KiF5 ohne FCS				
10.000	24	30	93 \pm 9	0,237
		60	102 \pm 10	0,571
		300	95 \pm 9	0,463
		3000	63 \pm 6	<0,001
	48	30	97 \pm 7	0,646
		60	97 \pm 10	0,807
		300	100 \pm 7	0,668
		3000	43 \pm 5	<0,001
20.000	24	30	102 \pm 6	0,237
		60	100 \pm 4	0,633
		300	99 \pm 2	0,986
		3000	78 \pm 6	<0,001
	48	30	100 \pm 3	0,473
		60	98 \pm 3	0,879
		300	99 \pm 7	0,770
		3000	73 \pm 3	<0,001
KiF5 mit FCS				
10.000	24	30	95 \pm 8	0,239
		60	97 \pm 10	0,559
		300	95 \pm 8	0,186
		3000	62 \pm 6	<0,001
	48	30	94 \pm 9	0,209
		60	100 \pm 8	0,651
		300	100 \pm 7	0,674
		3000	43 \pm 5	<0,001
20.000	24	30	103 \pm 6	0,282
		60	101 \pm 6	0,475
		300	100 \pm 5	0,577
		3000	77 \pm 6	<0,001
	48	30	102 \pm 6	0,418
		60	102 \pm 4	0,349
		300	100 \pm 5	0,817
		3000	73 \pm 3	<0,001

Tabelle 7.1c: Ergebnisse des Vitalitätstest (Ez4U) mit humanen Gallenblasenfibroblasten

Zelldichte [Zellen/Vertiefung]	Inkubationszeit [h]	TF17-2 Konzentration [μ M]	Prozent der Kontrolle \pm SD	p-Wert (t-test n=3)
Gallenblasenfibroblasten (hGBF) ohne FCS				
10.000	24	30	101 \pm 3	0,787
		60	99 \pm 4	0,795
		300	101 \pm 3	0,601
		3000	88 \pm 9	0,032
	48	30	100 \pm 4	0,363
		60	99 \pm 6	0,947
		300	100 \pm 4	0,632
		3000	89 \pm 10	0,096
20.000	24	30	99 \pm 3	0,852
		60	101 \pm 3	0,430
		300	99 \pm 4	0,875
		3000	88 \pm 9	0,063
	48	30	102 \pm 3	0,268
		60	102 \pm 3	0,121
		300	99 \pm 3	0,836
		3000	100 \pm 3	0,802
hGBF mit FCS				
10.000	24	30	100 \pm 5	0,823
		60	100 \pm 11	0,993
		300	99 \pm 3	0,702
		3000	85 \pm 6	0,050
	48	30	100 \pm 5	0,876
		60	98 \pm 7	0,591
		300	100 \pm 2	0,342
		3000	90 \pm 1	0,021
20.000	24	30	102 \pm 4	0,745
		60	99 \pm 11	0,123
		300	103 \pm 1	0,743
		3000	90 \pm 6	0,045
	48	30	100 \pm 3	0,667
		60	99 \pm 2	0,510
		300	100 \pm 3	0,910
		3000	98 \pm 5	0,410

Tabelle 7.1d: Ergebnisse des Vitalitätstest (Ez4U) für die Kokulturen

Zelldichte [Zellen/Vertiefung]	Inkubationszeit [h]	TF17-2 Konzentration [μ M]	Prozent der Kontrolle \pm SD	p-Wert (t-test n=3)
ohne FCS				
20.000 KiF5 + 10.000 RPMI7451	24	30	109 \pm 11	0,531
		60	112 \pm 7	0,309
		300	104 \pm 9	0,508
		3000	100 \pm 6	0,963
	48	30	109 \pm 3	0,333
		60	108 \pm 5	0,513
		300	102 \pm 4	0,899
		3000	80 \pm 4	0,049
ohne FCS				
20.000 hGBF + 10.000 RPMI7451	24	30	94 \pm 7	0,110
		60	97 \pm 8	0,500
		300	97 \pm 5	0,297
		3000	90 \pm 5	0,004
	48	30	98 \pm 5	0,506
		60	98 \pm 5	0,573
		300	87 \pm 11	0,130
		3000	78 \pm 7	<0,001

Tabelle 7.2a: Ergebnisse des H₃-Thymidin-Assays mit RPMI 7451 und hGBF

Zelldichte [Zellen/Vertiefung]	Inkubationszeit [h]	TF17-2 Konzentration [µM]	Prozent der Kontrolle±SD	p-Wert (t-test n=3)
RPMI 7451				
5.000	24	30	90±6	0,133
		60	92±1	0,011
		300	86±6	0,043
		3000	6±2	<0,001
10.000	24	30	98±5	0,527
		60	96±5	0,377
		300	93±6	0,113
		3000	12±5	0,001
Gallenblasenfibroblasten (hGBF)				
5.000	24	30	124±35	0,357
		60	114±25	0,425
		300	106±4	0,046
		3000	91±24	0,590
20.000	24	30	104±9	0,490
		60	106±11	0,479
		300	110±26	0,551
		3000	82±42	0,521
RPMI 7451 + hGBF				
1.000 RPMI + 4.000 hGBF	24	30	80±6	0,031
		60	90±7	0,133
		300	101±27	0,925
		3000	7±1	<0,001
10.000 RPMI + 20.000 hGBF	24	30	106±8	0,314
		60	107±7	0,193
		300	105±7	0,282
		3000	14±7	0,002

Tabelle 7.2b: Ergebnisse des H₃-Thymidin-Assays mit RPMI 7451 und KiF5

Zelldichte [Zellen/Vertiefung]	Inkubationszeit [h]	TF17-2 Konzentration [μM]	Prozent der Kontrolle±SD	p-Wert (t-test n=3)
RPMI 7451				
5.000	24	30	90±6	0,133
		60	92±1	0,011
		300	86±6	0,043
		3000	6±2	<0,001
10.000	24	30	98±5	0,527
		60	96±5	0,377
		300	93±6	0,113
		3000	12±5	0,001
KiF5				
5.000	24	30	131±23	0,076
		60	121±30	0,361
		300	122±3	<0,001
		3000	30±17	0,002
20.000	24	30	80±10	0,071
		60	95±20	0,708
		300	88±35	0,610
		3000	30±18	0,020
RPMI 7451 + KiF5				
1.000 RPMI + 4.000 KiF5	24	30	101±27	0,935
		60	122±20	0,203
		300	124±10	0,015
		3000	44±31	0,035
10.000 RPMI + 20.000 KiF5	24	30	110±5	0,068
		60	98±5	0,580
		300	93±5	0,158
		3000	16±5	0,001

Tabelle 7.3a: Ergebnisse des Jam-Assays mit RPMI 7451 und hGBF

Zelldichte [Zellen/Vertiefung]	Inkubationszeit [h]	TF17-2 Konzentration [μ M]	Prozent der Kontrolle \pm SD	p-Wert (t-test n=4)
RPMI 7451				
5.000	24	30	90 \pm 9	0,219
		60	96 \pm 8	0,392
		300	99 \pm 6	0,779
		3000	106 \pm 8	0,331
10.000	24	30	92 \pm 6	0,061
		60	95 \pm 4	0,150
		300	97 \pm 4	0,274
		3000	102 \pm 4	0,678
Gallenblasenfibroblasten (hGBF)				
5.000	24	30	83 \pm 10	0,104
		60	87 \pm 8	0,380
		300	95 \pm 11	0,686
		3000	99 \pm 18	0,923
20.000	24	30	72 \pm 15	0,100
		60	78 \pm 16	0,007
		300	93 \pm 18	0,824
		3000	100 \pm 8	0,958
RPMI 7451 + hGBF				
1.000 RPMI + 4.000 hGBF	24	30	95 \pm 12	0,643
		60	108 \pm 14	0,342
		300	106 \pm 9	0,495
		3000	105 \pm 12	0,659
10.000 RPMI + 20.000 hGBF	24	30	95 \pm 10	0,063
		60	99 \pm 8	0,605
		300	97 \pm 4	0,355
		3000	102 \pm 6	0,521

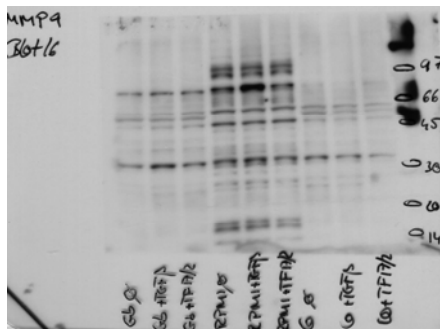
Tabelle 7.3b: Ergebnisse des Jam-Assays mit RPMI 7451 und KiF5

Zelldichte [Zellen/Vertiefung]	Inkubationszeit [h]	TF17-2 Konzentration [μ M]	Prozent der Kontrolle \pm SD	p-Wert (t-test n=4)
RPMI 7451				
5.000	24	30	78 \pm 19	0,270
		60	81 \pm 5	<0,001
		300	95 \pm 27	0,598
		3000	105 \pm 6	0,510
10.000	24	30	84 \pm 17	0,268
		60	84 \pm 7	0,056
		300	90 \pm 10	0,373
		3000	104 \pm 18	0,728
KiF5				
5.000	24	30	87 \pm 5	0,034
		60	95 \pm 15	0,860
		300	95 \pm 12	0,503
		3000	104 \pm 10	0,380
20.000	24	30	90 \pm 11	0,181
		60	91 \pm 12	0,294
		300	96 \pm 3	0,018
		3000	104 \pm 5	0,363
RPMI 7451 + KiF5				
1.000 RPMI + 4.000 KiF5	24	30	81 \pm 16	0,226
		60	78 \pm 33	0,006
		300	82 \pm 14	0,183
		3000	90 \pm 17	0,001
10.000 RPMI + 20.000 KiF5	24	30	87 \pm 20	0,034
		60	85 \pm 26	0,860
		300	83 \pm 32	0,131
		3000	86 \pm 42	0,192

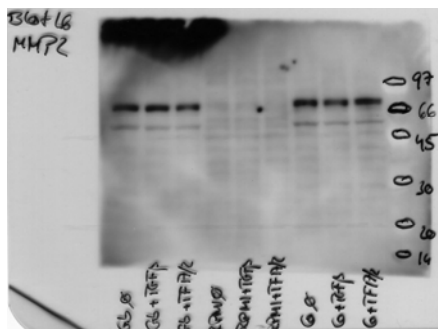
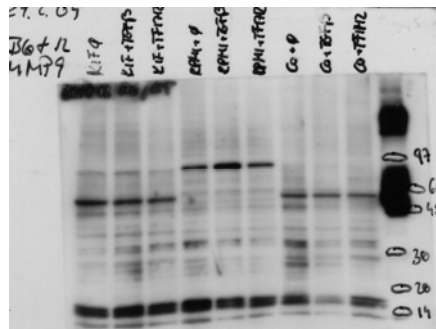
Abb. 7.1b: Westernblotergebnisse für MMP-9 und MMP-2 (vergleiche auch Abb.: 3.3.1)

hGBF + RPMI + Kokultur (Blot 16)

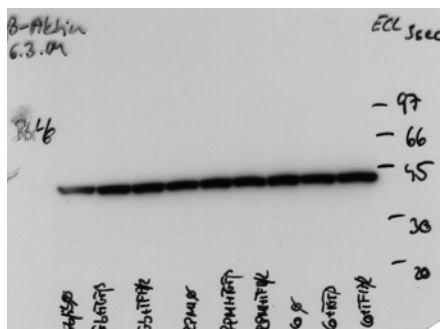
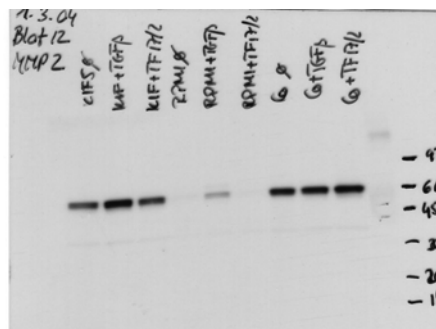
KiF5 + RPMI + Kokultur (Blot 12)



MMP-9



MMP-2



β-Actin

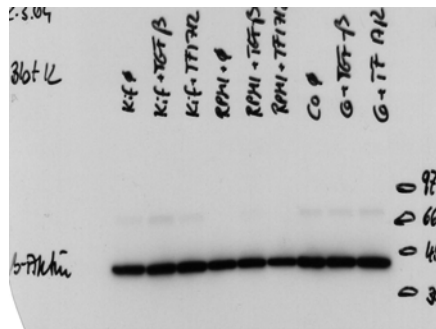
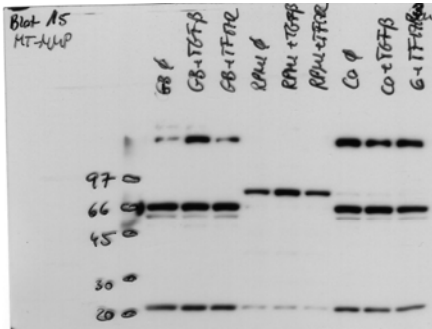


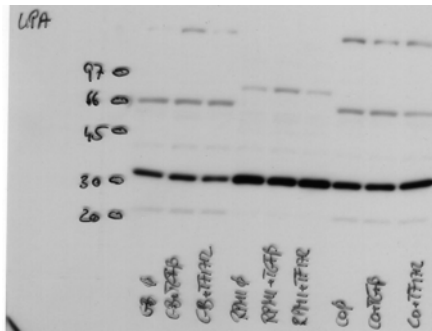
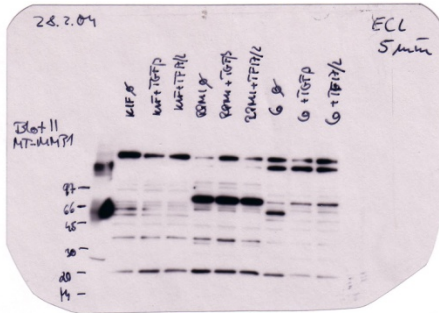
Abb. 7.1b: Westernblotergebnisse für MT1-MMP und uPA (vergleiche auch Abb.: 3.3.1)

hGBF + RPMI + Kokultur (Blot 15)

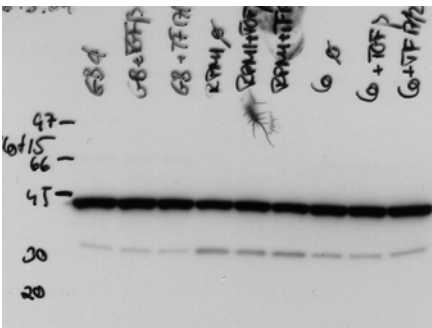
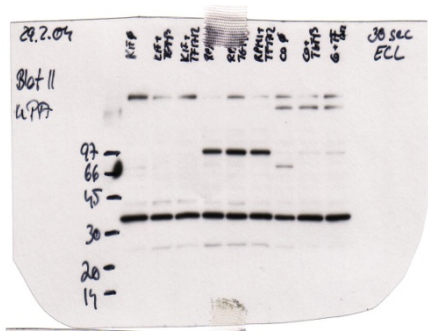
KiF5 + RPMI + Kokultur (Blot 11)



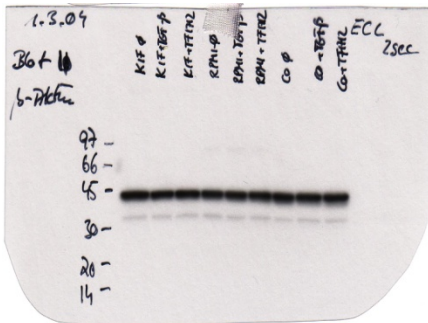
MT1-MMP



uPA



β-Actin



Tab. 7.4a: Zellproteinberechnung der Lysate für die oben aufgeführten Westernblots 11 + 12

Protein- bestimmung Blot 11 & 12	KiF5	KiF5+ TGFβ	KiF5+ TF17-2	RPMI	RPMI+ TGFβ	RPMI+ TF17-2	KiF5+ RPMI	KiF5+ RPMI+ TGFβ	KiF5+ RPMI+ TF17-2
Protein µg/µl	1,44	1,33	1,3	1,03	0,99	1,11	1,78	1,88	1,97
∅ Proteinmenge pro Zelle in ng	0,384	0,365	0,347	0,618	0,594	0,666	0,356	0,376	0,394

Tab. 7.4b: Zellproteinberechnung der Lysate für die oben aufgeführten Westernblots 15 + 16

Protein- bestimmung Blot 15 & 16	hGBF	hGBF+ TGFβ	hGBF+ TF17-2	RPMI	RPMI+ TGFβ	RPMI+ TF17-2	hGBF+ RPMI	hGBF+ RPMI+ TGFβ	hGBF+ RPMI+ TF17-2
Protein µg/µl	1,12	1,13	1,0	0,92	1,36	0,97	1,8	1,76	1,93
∅ Proteinmenge pro Zelle in ng	0,299	0,301	0,267	0,552	0,816	0,582	0,36	0,352	0,368

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2003 bis März 2006 in der Sektion für Molekulare Onkologie am Institut für Experimentelle Tumorforschung, Krebszentrum Nord – CCC, der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Kalthoff für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die nötigen finanziellen Mittel. Dankbar bin ich außerdem für seine Gesprächsbereitschaft und Interesse an meiner Dissertation.

Zu Dank bin ich auch Herrn PD Dr. Matthias Kapischke (St. Georg Krankenhaus, Hamburg) für die Betreuung meiner Arbeit verpflichtet. Er hatte auch im Rahmen seiner Habilitation ein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und sorgte etliche Male für die notwendige Motivation, wenn die tägliche klinische Tätigkeit kaum Zeit ließ, die wissenschaftliche Arbeit voranzutreiben.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Frau PhD Marie-Luise Kruse (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel). Sie führte im Rahmen dieser Dissertation nicht nur die immunhistochemischen Experimente und Mikroskopien der Primärkultur durch, sondern diskutierte wissenschaftliche Fragestellungen und zeigte neue Wege auf. Ihre fortwährende Unterstützung und Geduld waren in den letzten Jahren Gold wert.

Dank gebührt ebenfalls Herrn Prof. Harald Tschesche und seinem wissenschaftlichen Team der Universität Bielefeld für die Entwicklung und Bereitstellung des Inhibitors TF17-2, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Danken möchte ich Frau Katrin Tiessen (Klinikum Itzehoe), die mir immer eine gute Freundin und „Mitdotorandin“ war und ist. Die gemeinsame Zeit im Labor war sehr interessant, lehr- und „kaffchenreich“.

„Last but not least“ möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken, ohne die meine Ausbildung nicht möglich gewesen wäre und die mich immer verständnis- und liebevoll unterstützt hat. Mein ganz spezieller Dank gilt meinem Verlobten Henning, der mir während der gesamten Studien- und Promotionszeit motivierend und hilfsbereit zur Seite stand.

Curriculum vitae

Name	Anne Gutsche
Geboren am	10. Juli 1980
Geburtsort	Altenburg (Thüringen)
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig
Schullaufbahn	<i>1987 – 1993</i> 22. Grundschule, Frankfurt an der Oder <i>1993 – 2000</i> Karl Liebknecht Gymnasium, Frankfurt an der Oder <i>2000</i> Abitur (Note 1,6)
Studium	<i>Oktober 2000 – Dezember 2006</i> Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Note 1,83) <i>09. Dezember 2006</i> Erhalt der ärztlichen Approbation
Auslandsaufenthalte im Rahmen des Studiums	<i>Februar – März 2005</i> : Famulatur in Obstetrics & Gynaecology 3 Wochen, St. Michael's Hospital, University of Bristol, GB <i>April – Mai 2006</i> : Chirurgie Tertial (2 Monate, PJ) North York General Hospital, University of Toronto, Kanada <i>Juni – September 2006</i> : Gynäkologie Tertial (PJ) Kantonsspital Aarau AG, Lehrkrankenhaus der Universität Zürich, Schweiz
Promotion	<i>Seit Oktober 2003</i> In der Sektion für Molekulare Onkologie am Institut für Experimentelle Tumorforschung, Universität S-H, Campus Kiel „ <i>In vitro</i> – Untersuchung zur Wirksamkeit des Matrixmetalloproteinaseinhibitors Triazin TF17-2 am Beispiel cholangiozellulärer Karzinomzellen “
Tätigkeiten	<i>01. April 2007 – dato</i> Assistenzärztin in der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe Kreiskrankenhaus Aschersleben-Staßfurt
Besondere Kenntnisse und Aktivitäten	<i>September-November 2008</i> Teilnahme am Kurs der AGO in Kassel und Erhalt des „Zertifikats zur onkologischen Diagnostik und Therapie – Bereich Gynäkologie“