

Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen
Sektion Dermatologische Onkologie

**Untersuchungen zur Migration und Invasion von
Melanomzellen in vitro**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Uder, Laura Maria Friederike

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Garbe

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Eßmann

Tag der Disputation: 17.12.2020

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	8
1 Einleitung	9
1.1 Das maligne Melanom	9
1.1.1 Epidemiologie	9
1.1.2 Ätiopathogenese	11
1.1.3 Diagnosestellung	12
1.1.4 Klassifizierung, Stadien	13
1.1.5 Subtypen	15
1.1.6 Therapie	16
1.2 Zellmigration	18
1.3 GDF-15	20
1.4 DPPIV	25
1.5 MMP-9	27
1.6 MIF	29
1.7 Vorarbeiten	31
1.8 Fragestellung, Zielsetzung	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Serumproben	32
2.2 Zellkulturmethoden	33
2.2.1 Zelllinien	33
2.2.2 Zellkultur	33
2.3 Migrationsversuche	36
2.4 Zellproliferation	39
2.5 Zellzyklus	40
2.6 Invasion Assay	42
2.7 Cytokine Array	45
2.8 GDF-15 ELISA	48
2.9 Statistik	51
3 Ergebnisse	52
3.1 Migration	52
3.2 Zellproliferation	62
3.3 Zellzyklus	66

3.4	Invasion	68
3.5	Seren mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung	72
3.5.1	Cytokine Array	72
3.5.2	GDF-15 ELISA	74
4	Diskussion	76
4.1	Auswahl der Zelllinien	76
4.2	Migration	77
4.3	Zellproliferation	79
4.3.1	DPPIV	79
4.3.2	MMP-9	81
4.3.3	GDF-15	81
4.3.4	MIF	82
4.4	Zellzyklus	84
4.4.1	DPPIV	84
4.4.2	MMP-9	85
4.4.3	GDF-15	85
4.4.4	MIF	86
4.5	Invasion	87
4.5.1	DPPIV	88
4.5.2	MMP-9	88
4.5.3	GDF-15	88
4.5.4	MIF	89
4.6	Seren mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung	90
4.6.1	Cytokine Array	90
4.6.2	DPPIV	90
4.6.3	MMP-9	95
4.6.4	GDF-15	97
4.6.5	MIF	99
4.6.6	GDF-15 ELISA	101
4.7	Schlussfolgerungen	102
5	Zusammenfassung	104
6	Literaturverzeichnis	106
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	123
8	Danksagung	124

Abkürzungsverzeichnis

4-IPP	MIF-Inhibitor 4-iodo-6-phenyl-pyrimidine
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	Akral-lentiginöses Melanom
CD44	Cluster of differentiation 44
CDK4	Cell Division Protein Kinase 4
CXCR 2	C-X-C chemokine receptor type 2
CXCR 4	C-X-C chemokine receptor type 4
DPPIV/CD26	Dipeptidylpeptidase 4 /Cluster of Differentiation 26
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FAP- α	Fibroblast activation protein alpha
FCS	Fetal Calf Serum
g	Erdbeschleunigung
GDF-15	Growth differentiation factor 15
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
LDH	Lactatdehydrogenase
LMM	Lentigo-maligna Melanom
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAT	mesenchymal-amöboide Transition
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
MLCK	Myosin light chain kinase
MMP-9	Matrixmetalloprotease -9
NM	Noduläres Melanom
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RNAi	RNA-Interferenz
ROCK	Rho-associated protein kinase
rpm	rounds per minute

shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
TGF- β	Transforming growth factor β
UICC	Union internationale contre le Cancer (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des malignen Melanoms (nach AJCC 2017)	13
Tabelle 2: Migrationsassay von BLM-Melanomzellen nach Stimulation mit humanen Seren, ausgewählte Serumproben	60
Tabelle 3: Mittlere Pixeldichte ausgewählter Zytokine in Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung	72

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Insert (culture-Insert, Ibi, München, Deutschland)	37
Abb. 2: Zellrasen nach Zugabe von Seren nach 0h bzw. 20h (5fache Vergrößerung)	38
Abb. 3: Zellspheroide von BLM-Melanomzellen nach 0 Stunden (links) bzw. 6 Tagen (rechts).	44
Abb. 4: Cytokine Array (Proteome Profiler Array, R&D Systems, Minneapolis, USA) nach Entwicklung	47
Abb. 5: Cytokine Array (Proteome Profiler Array, R&D Systems, Minneapolis, USA)	47
Abb. 6: Migrationsassay von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen nach Behandlung mit humanen Seren	53
Abb. 7: Migrationsassay von BLM-Melanomzellen nach Inkubation mit 10% FCS, 10% humanen Seren gesunder Probanden sowie Melanompatienten in den Stadien I-IV	55
Abb. 8: Migrationsassay von BLM- Melanomzellen (2 Kohorten)	57
Abb. 9: Migrationsassay von SKMEL28- Melanomzellen (2 Kohorten)	59
Abb. 10: Zellproliferation von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen	63
Abb. 11: Anzahl vitaler bzw. nicht vitaler BLM- und SKMEL28-Melanomzellen pro Milliliter	65
Abb. 12: Zellzyklusanalyse von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen nach Behandlung mit Seren	67
Abb. 13: Invasion ratio von BLM- Melanomzellen nach Behandlung mit humanen Seren	68
Abb. 14: Invasion ratio von BLM- (A), MALME-3M- (B)-, SKMEL5- (C), LOX IMVI- (D), M14- (E), SKMEL2- Melanomzellen (F) nach Behandlung mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV (20%) unterteilt nach Stärke der Migrationshemmung	71
Abb. 15: Mittlere Pixeldichte von Zytokinen enthalten in Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung (Human XL Cytokine Array)	73
Abb. 16: GDF-15 Konzentrationen in humanen Seren (in pg/ml)	74
Abb. 17: GDF-15 Konzentrationen in humanen Seren (in pg/ml) mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung	75

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

1.1.1 Epidemiologie

Das maligne Melanom ist eine häufige, von Melanozyten ausgehende Tumorerkrankung.

Am häufigsten wird das kutane Melanom beschrieben.

Weitere Lokalisationen sind unter anderem Meningen, Schleimhäute sowie die Augen. [1] [2]

Melanome treten bei Kaukasiern meist am Körperstamm auf. Häufig handelt es sich um superfiziell-spreitende Melanome (SSM) oder noduläre Melanome (NM). Bei Afroamerikanern treten Melanome häufig an der Akren auf.

Es zeigen sich außerdem häufig dickere Tumore, ein höheres Tumorstadium, häufiger Ulzerationen und positive Wächterlymphknoten bei Erstdiagnose verglichen mit Kaukasiern. [3]

Bei Menschen mit dunklerer Pigmentierung treten Melanome seltener auf, was eventuell durch die größere Menge an Melanin in den obersten Hautschichten bedingt ist, die für einen höheren natürlichen UV-Schutz sorgt. [4]

Melanome treten bei Afrikanern und Asiaten häufig an nicht-pigmentierten Körperstellen wie etwa palmar, plantar, subungual und mucosal auf. [5]

Weltweit tritt das Melanom in Neuseeland und Australien am häufigsten auf mit Inzidenzraten von 50-60 pro 100.000 Einwohner und Jahr. [6]

Die meisten Fälle in Europa liegen in Skandinavien vor. [4] Am wenigsten Fälle von Melanomen treten dagegen in Südeuropa auf, was vermutlich durch die dunklere Pigmentierung der Bevölkerung dort bedingt ist. [7]

Innerhalb Deutschlands zeigt sich ein geringeres Auftreten von Melanomen in Süddeutschland verglichen mit Norddeutschland. [8]

Die Inzidenz- und Mortalitätsraten des Melanoms sind steigend.

Von 1970 bis 2012 kam es in Deutschland zu einem etwa siebenfachen Anstieg der Inzidenz des Melanoms. [9]

Die Mortalitätsrate stieg bei Männern von 2,6 auf 4,1 pro 100.000 Personen und Jahr und bei Frauen von 2,3 auf 3 pro 100.000 Personen und Jahr von 1999 bis 2012 an. [6]

Da Melanome häufig früh lymphogen und hämatogenen metastasieren, haben diese eine schlechte Prognose. Das Melanom macht etwa 90% der Todesfälle durch Hauttumore aus. [10, 11]

2008 erfolgte in Deutschland schließlich die Einführung des Hautkrebs-Screenings. [12, 13]

Für das Jahr 2015 wurde für Deutschland eine Inzidenzrate von 19,6 für Frauen und 9,7 für Männer, jeweils pro 100.000 Personen, altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung gezeigt. Für 2016 wurde für Deutschland eine Inzidenzrate von 19,6 für Frauen und 9,7 für Männer, jeweils pro 100.000 Personen, altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung gezeigt. Eine Prognose für 2020 geht von einer Inzidenzrate von 20,7 für Frauen und 21,3 für Männer, jeweils pro 100.000 Personen, altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung aus.

Die Mortalitätsrate lag 2015 bei 1,6 je 100.000 Personen bei Frauen beziehungsweise 2,8 pro 100.000 bei Männern. 2016 lag sie bei 1,5 je 100.000 Personen bei Frauen beziehungsweise 2,7 pro 100.000 bei Männern.

Für 2020 wird mit einer Mortalitätsrate von 1,6 je 100.000 Personen bei Frauen beziehungsweise 2,4 pro 100.000 bei Männern gerechnet.

Die relative Überlebensrate bis 5 Jahre nach Erstdiagnose, in Deutschland 2015-2016, betrug bei Frauen im Mittel 93% und bei Männern 91%. Die relative Überlebensrate bis 10 Jahre nach Erstdiagnose betrug im Mittel 92% bei Frauen und 88% bei Männern. [14]

1.1.2 Ätiopathogenese

Melanome werden als multifaktorielle Erkrankungen betrachtet, die sowohl durch eine genetische Disposition als auch durch Umweltfaktoren entstehen. Bezogen auf die Umwelt stellt die Exposition gegenüber UV-Strahlen, insbesondere eine starke intermittierende Sonnenexposition einen entscheidenden Risikofaktor dar. [15] Das maligne Melanom tritt allerdings auch an Körperstellen auf, die nicht der Sonne ausgesetzt sind. [10]

Ein Marker für intensive intermittierende Sonnenexposition sind Sonnenbrände, die insbesondere bei Auftreten in der Kindheit das Melanomrisiko erhöhen, während eine chronische Sonnenexposition aktinische Keratosen und nicht-melanozytäre Hauttumore begünstigt. [16]

UV-Exposition durch Solarien kann einen Risikofaktor darstellen [17], ebenso wie die Psoralen-UV-A-Radiophotochemotherapie [18].

Man geht davon aus, dass sich die Sensibilität gegenüber exogenen Einflüssen bezogen auf verschiedene Personengruppen unterscheidet und somit auch das Risiko zu erkranken. [19]

Zu den persönlichen Risikofaktoren zählt die Zahl der melanozytären Nävi. Diese bestehen aus Melanozyten oder Nävuszellen und können von Geburt an oder im Lauf des Lebens auftreten. Etwa 25% der Melanome stehen in Verbindung mit einem bestehenden Nävus. [20] [21-24] Das Melanomrisiko korreliert positiv mit der Anzahl der Nävi und ist zudem abhängig von der Größe sowie der Art der Nävi [25-27], wobei das Risiko mit zunehmender Größe der Nävi steigt. [28]

Zudem ist eine positive Familienanamnese in Bezug auf Melanome, insbesondere bei erstgradig Verwandten, mit einem erhöhten Risiko verbunden.

[10] Eine genetische Disposition, wie unter anderem bei Vorliegen des Li-Fraumeni-Syndroms stellt ebenfalls einen Risikofaktor dar. [29]

Äußerliche Merkmale wie beispielsweise ein heller Hauttyp erhöhen das Risiko ebenfalls. [30]

Als weiterer Risikofaktor wurde eine Immunsuppression beschrieben. [31]

1.1.3 Diagnosestellung

Um die Mortalität des malignen Melanoms zu reduzieren, wird das frühe Erkennen als entscheidend angesehen. Die Prognose von Melanomen nimmt mit zunehmender Tiefe des Tumors ab.

Maligne Melanome können durch ihre meist kutane Lage mithilfe von nicht-invasiven Methoden diagnostiziert werden, wobei die pathologische Untersuchung weiterhin den Goldstandard darstellt.

Die Untersuchungen der Haut, auch durch den Patienten selbst, ist dabei eine geeignete Methode, um Melanome und Vorläuferläsionen zu identifizieren. [32, 33]

1985 wurden die ABCDE Kriterien entwickelt um Melanome in frühen Stadien klinisch zu erkennen. Diese Kriterien beinhalten Asymmetrie, Border irregularity (Unregelmäßige Begrenzung), Color variation (uneinheitliche Pigmentierung), Diameter (Durchmesser) >6mm sowie Evolving (Erhabenheit über Hautniveau). [34, 35]

Darüber hinaus wurden sieben Kriterien entwickelt, anhand derer die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei einer Läsion um ein Melanom handelt, abgeschätzt werden kann. Hierbei handelt sich um eine seltener verwendete Methode als die ABCDE Kriterien. [36]

Das sogenannte Zeichen des hässlichen Entleins bedeutet, dass sich eine maligne Läsion von ihren Nachbarläsionen unterscheidet. [37]

Zur Diagnose des Melanoms werden verschiedene optische Geräte eingesetzt wie etwa das Dermatoskop, welches durch optische Vergrößerung das Erkennen morphologischer Strukturen vereinfacht. [38]

1.1.4 Klassifizierung, Stadien

Die Stadieneinteilung des malignen Melanoms erfolgt anhand der TNM-Klassifikation des AJCC (American Joint Committee on Cancer). Es werden histopathologische Kriterien berücksichtigt, jedoch nicht Alter, Geschlecht und Lokalisation. [39] Die TNM-Klassifikation umfasst die Tumorausdehnung (T), Klassifikation der befallenen Lymphknoten (N) sowie die Art der Fernmetastasierung (M). Anhand der TNM-Klassifikation werden die Tumoren in prognostische Stadien nach UICC (Union internationale contre le Cancer) eingeteilt. [40]

Tabelle 1: Stadieneinteilung des malignen Melanoms (nach AJCC 2017)

Pathologische (p) (links) bzw. klinische (c) Stadieneinteilung (rechts) nach Tumorausdehnung (T), befallenen Lymphknoten (N), Art der Fernmetastasierung (M) [41, 42]

Pathologische Stadieneinteilung (pTNM Stadien nach AJCC 2017)			
Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IA	T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIA	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIB	T0	N1b, N1c	M0
IIIC	T0	N2b, N2c, N3b oder N3c	M0
IIIA	T1a/b–T2a	N1a oder N2a	M0

Klinische Stadieneinteilung (cTNM Stadien nach AJCC 2017)			
Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIA	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	Jedes T, Tis	N1	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Pathologische Stadieneinteilung (pTNM Stadien nach AJCC 2017)			
Stadium	T	N	M
IIIB	T1a/b–T2a	N1b/c oder N2b	M0
IIIB	T2b/T3a	N1a–N2b	M0
IIIC	T1a–T3a	N2c oder N3a/b/c	M0
IIIC	T3b/T4a	Jedes N N1	M0
IIIC	T4b	N1a–N2c	M0
IIID	T4b	N3a/b/c	M0
IV	Jedes T, Tis	Jedes N	M1

Es wurden verschiedene prognostische Faktoren ermittelt.

Sowohl das Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose als auch die Lokalisation des Melanoms haben einen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf. [43]

Die Tumordicke nach Breslow stellt ebenfalls einen wichtigen prognostischen Faktor dar. [44] Zudem spielt die Tumordicke eine Rolle bei der Einteilung der Tumorstadien. [39]

Es werden fünf Invasionslevel nach Clark unterschieden, mit zunehmender Invasion von Level I bis V, die ebenfalls einen Einfluss auf die Prognose haben. [2]

Seit einigen Jahren werden auch Ulzerationen durch die Tumorklassifikationen abgebildet. [45] Hierbei handelt es sich um einen Gewebedefekt, der bis in die Dermis oder Subkutis reicht und nicht narbenfrei abheilt. Ulzerierende Melanome sind dicker, tiefer und häufig mit Metastasierung assoziiert, so dass man bei Vorliegen einer Ulzeration von einem aggressiven Tumortyp ausgehen kann. [46] Eine Ulzeration ist somit ein wichtiger, allerdings prognostisch ungünstiger Faktor, wobei nicht die Tiefe, sondern die Breite der Ulzeration von Bedeutung ist. [46, 47]

1.1.5 Subtypen

Man unterscheidet vier Subtypen des Melanoms.

Das superfiziell spreitende, das noduläre, das Lentigo-maligne und das akrolentiginöse Melanom.

Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) ist die häufigste Form. Es ist assoziiert mit intermittierender Sonnenexposition, stellt etwa 70% der Fälle dar und ist häufig an den Beinen von Frauen oder am Rücken von Männern lokalisiert. [29]

Noduläre Melanome (NM) machen etwa 5% der Fälle aus und sind häufig am Körperstamm oder an den Extremitäten bei Patienten zwischen 50 und 60 Jahren, gehäuft bei Männern, zu finden. Durch häufige Ulzerationen sowie eine ausschließlich vertikale Wachstumsphase wachsen sie schneller und metastasieren häufiger. [29]

Lentigo-maligna-Melanome (LMM) machen etwa 4-15% der Fälle aus. Sie korrelieren, anders als NM und SSM, mit Langzeit-Sonnenexposition und zunehmendem Alter und befinden sich häufig an Nacken oder Kopf. [48]

Akral-lentiginöse Melanome (ALM) sind eher selten. Sie machen etwa 5% der Fälle bei hellhäutigen Menschen aus. Sie sind allerdings die verbreitetste Form bei asiatischen, hispanischen und afrikanischen Patienten. Häufig sind ältere Patienten, meist Frauen, betroffen. ALM tritt meist auf der unbehaarten Haut von Fingern, Handflächen und Fußsohlen auf. [29]

Sonderformen des Melanoms sind unter anderem das amelanotische Melanom und Schleimhautmelanome, die etwa 5% der Melanome ausmachen [1] sowie Ballonzellmelanome, Myxoid-, Rhabdoid-, und osteogenetische Melanome [49].

1.1.6 Therapie

Die Therapie von Melanomen hängt vom jeweiligen Stadium der Erkrankung ab.

In frühen Stadien sollten maligne Melanome unter kurativer Intention radikal exzidiert werden. Dabei werden Sicherheitsabstände zum Tumorrand empfohlen, die vom Stadium des Tumors sowie der Tumordicke nach Breslow abhängen. [50]

Ab einer Tumordicke von 1mm sollte eine Wächterlymphknotenbiopsie erfolgen. Eine Biopsie wird zudem bei bestimmten Risikofaktoren wie etwa einer Ulzeration auch bei geringerer Tumordicke empfohlen. [51, 52] [53]

Sollte eine Lymphknotenmetastasierung vorliegen, die bildgebend oder histologisch gesichert ist, wird eine Lymphknotendissektion empfohlen. Das jeweilige Vorgehen unterscheidet sich je nach betroffenen Lokalisationen. [54]

Die Indikation zur postoperativen Bestrahlung wird anhand verschiedener Kriterien, unter anderem bei Befall von drei Lymphknoten, gestellt. [55-57]

Das Angebot einer adjuvanten Interferontherapie kann im Stadium IIA [58, 59] und sollte im Stadium IIB/C erfolgen [60, 61].

Lokoregionäre Metastasen sollten reseziert werden, sofern kein Hinweis auf Fernmetastasen vorliegt und eine R0-Resektion der Metastasen möglich scheint. Bei Satelliten- und In-transit-Metastasen kann eine lokale Bestrahlung zur lokalen Tumorkontrolle durchgeführt werden. [62, 63]

Sollten Satelliten- oder In-transit-Metastasen nicht operabel sein, können lokale Verfahren wie die intratumorale Injektion von Interleukin 2 angewandt werden. [64-68]

Bei Patienten mit einem Melanom ab dem Stadium IIIB sollte dieses auf eine BRAF-Mutation untersucht werden. Bei BRAF-Wildtyp sollte auf NRAS getestet werden. Bei ALM und Melanomen der Mukosa sollte auch c-kit untersucht werden. Für diese Mutationen liegen spezifische Inhibitoren vor.

Bei Vorliegen von Fernmetastasen sollte ebenfalls die Möglichkeit einer Resektion überprüft werden. [69-71]

Im Stadium III A-D wird bei einer BRAF- Mutation eine Therapie mit einem BRAF-Inhibitor wie etwa Vemurafenib oder Dabrafenib in Kombination mit einem MEK-Inhibitor wie Trametinib oder Binimetinib empfohlen. Zudem ist eine anti-PD1-Antikörpertherapie möglich. [72-76] Eine Mutation in BRAF liegt bei etwa 40–60 % der Fälle vor, in 90% liegt dabei eine BRAFV600E-Mutation vor. [77]

Sollten die Metastasen nicht resezierbar sein, besteht die Möglichkeit einer Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren.

PD1-Antikörper oder deren Kombination mit Ipilimumab zeigen dabei gegenüber einer alleinigen Therapie mit Ipilimumab ein verlängertes progressionsfreies Überleben. In der Monotherapie zeigen PD1-Antikörper zudem gegenüber Ipilimumab ein verlängertes Gesamtüberleben. [78-82]

Bei Ipilimumab handelt es sich um einen CTLA-4-Inhibitor (zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Antigen 4- Inhibitor), der die T-Zellfunktion verstärkt. [76, 78] Nivolumab und Pembrolizumab stellen PD1- Antikörper dar, die über eine Blockade des PD1-Rezeptors die Inaktivierung von T-Zellen hemmen. [76, 79, 81]

Sollte eine BRAF-/MEK-Inhibitor- Therapie oder eine Therapie mit PD1- Antikörpern nicht möglich sein, stellt die Monochemotherapie mit Dacarbazin eine Option dar. [83-85]

Es besteht zudem die Möglichkeit einer Polychemotherapie, wodurch höhere Ansprechraten als bei der Monochemotherapie gezeigt wurden ohne das mediane Gesamtüberleben signifikant zu verbessern. [86]

1.2 Zellmigration

Ein grundlegender Vorgang der Metastasierung von Malignomen ist die Migration der Tumorzellen. Hierbei handelt es sich um einen komplexen Vorgang, der durch mechanische und chemische Signale gesteuert wird.

Die Mechanismen von Tumorzellen bei der Migration ähneln denen benigner Zellen etwa bei der Wundheilung oder Embryogenese. [87]

Um zu migrieren verändern Zellen ihre Gestalt hin zu einer länglichen Form und binden über Integrinrezeptoren an die extrazelluläre Matrix (ECM) [88]. Es entsteht eine Zugkraft, die die Zelle schließlich bewegt. [87, 89] Es wurde gezeigt, dass in Tumorzellen promigratorische Signale überwiegen. [90]

Die extrazelluläre Matrix (ECM) erfüllt wichtige Funktionen im Rahmen der Zellmigration. [91] Nimmt die Festigkeit der ECM zu, führt dies zu einer veränderten Integrin- und ERK-Signalübertragung, was den malignen Phänotyp der Zellen verstärkt [92]. Integrine verbinden die ECM mit dem Zellzytoskelett. [93] Matrixmetalloproteasen bauen die interstitielle Matrix ab [94], erleichtern so die Zellmigration [95] und können lösliche Zytokine aktivieren, freisetzen [96] und mittels Zytokingradienten die Richtung der Migration beeinflussen [97]. MT1-MMP kann TGF- β in den Tumorzellen aktivieren [98] und so das Zellwachstum beeinflussen.

Beteiligt an der Migration sind zudem aktivierte Stromafibroblasten, auch Tumor-assoziierte Fibroblasten (cancer associated fibroblasts, CAF) [99] genannt, sowie Tumor-assoziierte Stromazellen (cancer-associated stromal cells) [100] [101].

Die Anordnung der Kollagenfasern um den Tumor spielt sowohl in vitro [102] als auch in vivo eine Rolle bezüglich der Richtung der Zellinvasion und -migration. [103]

Neben mechanischen Signalen sind auch chemische Signale an der Zellmigration beteiligt.

Die Migration von Tumorzellen kann von Gradienten löslicher Moleküle gelenkt werden [104].

In der Tumorumgebung sind unter anderem Fibroblasten, Zellen des Immunsystems und Endothelzellen beteiligt. [105] Zudem stellt die interstitielle Flüssigkeit ein wichtiges Transportmedium für Nährstoffe und Signalmoleküle dar [106, 107] und hat Einfluss auf die Fibroblastenfunktion, Matrixreorganisation [108] und die Migration von Fibroblasten [109].

Es sind verschiedene Signalwege, unter anderem der Rho- [110] und der PI3K-Signalweg beteiligt an der Zellmigration. [111] Zudem wirken der RAC-, ROCK- und MLCK- Signalweg fördernd auf die Zellmigration. [112-115] Auch EGF und IGF-1 stimulieren die Migration. [116]

Tumorzellen können sowohl einzeln als auch in Zellverbänden migrieren. Je geringer die Zelldifferenzierung, desto häufiger tritt Migration einzelner Zellen auf. [117] Die Migration einzelner Zellen kann als amöboide [118], mesenchymale [119] [120] und kettenförmige [121, 122] Migrationsart erfolgen.

Die Bewegung von Zellverbänden findet auch während der Embryogenese statt, unter anderem bei der Bildung des Neuralrohrs. [123] In vitro wurde gezeigt, dass Zellen aus Tumorzelllinien als Aggregate mit einer Gruppe von sehr mobilen Zellen an der Spitze migrieren können. [124]

In Studien wurde demonstriert, dass Zellen auf den Verlust von Fähigkeiten zum Beispiel durch den Einsatz von MMP-Inhibitoren reagieren können, indem sie Ausweichstrategien wie die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) [117] oder die mesenchymal-amöboide Transition (MAT) [125] entwickeln.

Dies wird als Plastizität bezeichnet.

1.3 GDF-15

Der Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) ist ein Mitglied der TGF- β Superfamilie [126, 127].

Die TGF- β Familie hat tumorfördernde und -hemmende Fähigkeiten und ist an entzündlichen und apoptotischen Signalwegen beteiligt. [126, 127]

Sie reguliert Zellproliferation, Zelladhäsion, das Immunsystem und Angiogenese. [128].

GDF-15 ist unter verschiedenen Bezeichnungen bekannt, unter anderem als Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1) [129], Placental Transforming Growth Factor β (PTGF- β) [130], Nonsteroidal Anti-inflammatory drug-activated Gene-1 (NAG-1) [131, 132], Prostate-Derived Factor (PDF) und Placental Bone morphogenetic protein (PLAB) [133].

GDF-15 wird als 62kDa intrazelluläres Protein synthetisiert. [134]

Es wird in hohen Konzentrationen in der menschlichen Plazenta exprimiert.

Während einer Schwangerschaft zeigen sich deutlich erhöhte Serumspiegel.

Daher wird einer Rolle bei der embryonalen Einnistung und der

Plazentafunktion vermutet. [135] In geringerem Maß wird es in epithelialen

Zellen anderer Organe wie zum Beispiel in der Prostata, Kolon und Gehirn, [131, 136], Leber, Lunge, Nieren und Neuroepithel exprimiert. [137] [138] [132]

Der Referenzbereich für GDF-15 wird in der Literatur mit 0,2 bis 1,2ng/ml angegeben. Anders als etwa TGF- β wird GDF-15 nicht in signifikanter Menge von zirkulierenden Blutplättchen oder anderen Blutzellen produziert. Es kann daher einfach und zuverlässig in Serum oder Plasma gemessen werden. [139]

GDF-15 ist beteiligt an der Zellproliferation und Zellzyklusregulation. Zudem besteht ein Zusammenhang zu Zelldifferenzierung sowie zu

Apoptosevorgängen. [137] [138] Es ist mit den Tumorsignalwegen p53, MITF, PI3K/AKT verbunden. [126, 140, 141]

GDF-15 kann die Entwicklung unter anderem von Melanomen und Magenkarzinomen begünstigen. [126, 142]

Es zeigte sich eine erhöhte GDF-15 Expression in Zusammenhang mit einer Aktivierung von Makrophagen. [129] Bei akuten Organverletzungen, Entzündung und malignen Erkrankungen steigt die Expression ebenfalls deutlich an. [143-145] [146]

GDF-15 ist unter anderem bei Prostata-, Mamma-, Lungen-, Kolonkarzinomen [147, 148], Magentumoren und Melanomen überexprimiert. [148-152] [138] [153] [154, 155]

Mit einer erhöhten Expression in Tumorzellen können erhöhte Proteinspiegel im Serum von Patienten auftreten. [147, 148, 156, 157]

Erhöhte GDF-15 Serumspiegel wurden bei Patienten mit unter anderem duktalem Pankreaskarzinom, ampullärem Adenokarzinom, cholangiozellulärem Karzinom, Mamma-, kolorektalen- und Prostatakarzinom gezeigt. [156-158]

Die Überexprimierung von GDF-15 zeigt sich nicht nur bei metastasierten Mamma-, Kolon- und Prostatakarzinomen sondern auch bei den jeweiligen Primärtumoren und bei Tumorzelllinien [156, 159] wie unter anderem bei den Tumorzelllinien und -geweben von Mamma-, Magen-, oralem Plattenepithelzellkarzinomen, Glioblastom, Prostata-, Zervixkarzinomen und Kolonkarzinomen. [147, 160] [161] [162] [163] [164] [156]

Die Rolle von GDF-15 in der Tumorentstehung und -entwicklung ist wenig verstanden. GDF-15 hat tumorhemmende und proapoptotische Aktivitäten in vitro und in vivo gezeigt. [140]

Es ist an der Proliferation, Migration, Apoptose und Angiogenese [148, 158, 165, 166] beteiligt sowie an gesteigerten Immunantworten [129] [144].

Einige Studien vermuten, dass GDF-15 eine tumorsupprimierende Funktion hat, durch Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose [167] und Hemmung der Angiogenese in unterschiedlichen epithelialen und nicht-epithelialen Tumoren [134, 141], während andere auf ein onkogenes Potential hinweisen. [130, 167, 168] Es wurden sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte von GDF-15 auf Tumorzellen und eine Vielzahl möglicher Signalwege beschrieben. [127, 167, 169] Diese gegensätzlichen Effekte von GDF-15 auf die Tumorbilogie könnten von der Tumorart und dem Stadium der Erkrankung beeinflusst werden. [143]

Erhöhte zirkulierende GDF-15 Spiegel, die mit einem schlechteren klinischen Outcome einhergehen, zeigten sich bei Endometriumkarzinomen [170], Prostatakarzinomen [150], Pankreaskarzinomen [171] und kolorektalen Karzinomen [166], Schilddrüsen-, Pankreas-, Magen-, Ovarialkarzinomen [143, 150, 153, 161, 172], oralen Plattenepithelzellkarzinomen [173] [174].

Die GDF-15 Expression ist ein unabhängiger prognostischer Prädiktor bei Ovarialkarzinompatienten, wobei die GDF-15 Konzentration in der Ergussflüssigkeit positiv mit der Expression in Ovarialkarzinomzellen korreliert. [175]

Erhöhte Serumspiegel von GDF-15 wurden bei Patienten mit metastasiertem Prostata-, Kolon- und Mammakarzinomen im Vergleich zu gesunden Kontrollen berichtet. [156] Die Serumkonzentration von GDF-15 steigt mit der Progression von normalem Kolonepithel zum Adenom, Karzinom und Metastasierung an. [148] Hohe GDF-15 Spiegel, sowohl in Plasma als auch in Tumorgewebe, bei kolorektalen Karzinomen gehen einher mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer Abnahme des Gesamtüberlebens [162, 166, 176].

GDF-15 kann verwendet werden, um lymphatische Metastasierung bei kolorektalen Karzinomen zu erkennen. [177] Es wurde zudem ein Zusammenhang zwischen GDF-15 und Lebermetastasierung bei kolorektalen Karzinomen beschrieben. [178]

Bei Magenkarzinomen wurde gezeigt, dass GDF-15 tumorförderndes Potenzial hat, mit einer Korrelation von höheren Spiegeln mit invasiveren Phänotypen. [142]

Bei Prostatakarzinomen ist GDF-15 ein Marker für die Tumorprogression [179] sowie mit einer schlechten Prognose bei hohen Serumspiegeln verbunden. [180] In vivo reduzierte GDF-15 Überexpression die Tumorbildung, erhöhte aber die Metastasierung des Prostatakarzinoms in einem Tiermodell. [181]

Weitere Funktionen scheint GDF-15 bei Entzündungen, kardiovaskulären Erkrankungen und Adipositas zu haben. [182] [183, 184]

GDF-15 kann die Knorpelbildung in frühen Stadien der enchondralen Knochenbildung induzieren [131], die Proliferation früher hämatopoetischer Vorläuferzellen inhibieren [185] und wirkt als neutropher Faktor. [186] Zudem ist GDF-15 ein zentraler Regulator des Appetits bei Anorexie und des Gewichtsverlustes assoziiert mit malignen Erkrankungen. [187]

Die Entwicklung der Metastasierung bei Melanomen wurde mit der Expression von Mitgliedern der TGF- β Superfamilie in Zusammenhang gebracht. [188, 189] TGF- β wirkt vermutlich als ein negativer Wachstumsregulator bei epithelialen Zellen. Tumorzellen weisen oft eine erhöhte Produktion von TGF- β Isoformen auf, was auf eine Rolle von TGF- β bei der Tumorzellinvasion und Metastasierung hindeutet. [190]

Normale Melanozyten sind sehr empfindlich gegenüber einer Hemmung durch exogenes TGF- β , wohingegen Melanomzellen relativ resistent sind. [191] TGF- β erhöht zudem das Überleben von Melanomzellen, indem es den bindegewebigen Umbau fördert. [192]

GDF-15 mRNA wird in Melanozyten durch UV-Bestrahlung induziert. [126]

GDF-15 zeigt eine hohe Expression in Melanomen und Melanomzelllinien, insbesondere bei metastasierten Tumoren. [126, 193, 194] [140] Die GDF-15 Expression steigt dabei von benignen Nävi über primäre zu metastasierten Melanomen [126, 195], mit einer Überexpression in etwa 67% der aggressiven Melanome, was von erhöhten Proteinspiegeln im Serum von Patienten begleitet wird, verglichen mit Melanozyten sowie gesunden Kontrollprobanden. [196]

Zudem zeigte sich ein Zusammenhang von niedrigen GDF-15 Expressionsspiegeln mit einem längeren progressionsfreien Überleben, verglichen mit dem Überleben bei hoher GDF-15 Expression. [195]

Patienten mit Melanomen im Stadium IV mit nachweisbarem Tumor hatten höhere GDF-15 Spiegel als Patienten im tumorfreien Stadium IV oder tumorfreien Stadium III. sGDF-15 $\geq 1,5\text{ng/ml}$ war assoziiert mit einem reduzierten Gesamtüberleben bei Patienten im Stadium III/IV.

Im Stadium IV mit bestehenden Tumormanifestationen zeigte sich eine Korrelation von sGDF-15 mit dem Gesamtüberleben. [197]

GDF-15 wurde es als Tumormarker für das metastasierte Melanom in Betracht gezogen. [126] Der Einsatz von Tumormarkern aus dem Serum von Patienten dient dazu, metastasierte Erkrankungen frühzeitig zu erkennen und eine Therapie einzuleiten, in der Hoffnung das Überleben zu verlängern. [198] [71] [199]

Eine Inhibierung von GDF-15 mittels short hairpin RNA (shRNA) zeigte eine Hemmung der Melanomentwicklung im Mausmodell, beeinflusste aber nicht das Zellwachstum. Es ist mit dem mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalweg verbunden. [126]

Kluger et al. zeigten, dass unter anderem GDF-15 verwendet werden kann, um Patienten mit einem Melanom im resezierten Stadium I/II von Patienten im Stadium IV mit vorhandenen Tumoren zu unterscheiden und es im Stadium IV deutlich erhöht ist. [200]

1.4 DPPIV

Die Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV/CD26) kann auf viele Wachstumsfaktoren und Zytokine wirken. Es wurden onkogene, aber auch tumorsupprimierende Eigenschaften beschrieben. [201] [202-205]

Die DPPIV/CD26 übt eine proteolytische Funktion aus [206, 207]. Viele regulatorische Peptide werden durch das Enzym gespalten und inaktiviert. [208] Es ist an Immunantworten [209] sowie an verschiedenen Signalwegen durch seine Assoziation mit FAP- α , CXCR4 (Chemokin-Rezeptor 4) beteiligt. [210, 211]

DPPIV/CD26 kann die Umgebung des Tumors durch seine Interaktion mit der extrazellulären Matrix beeinflussen. [212] Es bindet an extrazelluläre Matrixproteine, wie etwa Kollagen und Fibronectin und wirkt dadurch auf die Zelladhäsion und Metastasierung. [213]

DPPIV/CD26 kann auf der Membran verschiedener Zelltypen verankert sein, aber auch als lösliche Form auftreten. [208] sDPPIV/sCD26 kommt in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten vor und wird auch in das Kulturmedium von Zelllinien sezerniert. [214] [215] Es könnte somit ein wichtiger Tumormarker bei verschiedenen Malignomen, unter anderem bei malignen Melanomen [216], Lungenkarzinomen [217], Magenkarzinomen [218], kolorektalen Karzinomen [219, 220], Prostatakarzinomen [221] und malignen Mesotheliomen [222] sein.

Mehrere Studien haben die Veränderung von DPPIV/CD26 bei Malignomen untersucht. [208, 215, 216, 223] Bei einigen malignen Erkrankungen wurden erhöhte Enzymspiegel, bei anderen erniedrigte Enzymspiegel nachgewiesen. So wurde eine reduzierte DPPIV-Serumaktivität bei Patienten mit metastasierten Prostatakarzinomen [221] gezeigt.

Bei Untersuchungen von Zervixkarzinomzellen zeigte sich ebenfalls eine reduzierte DPPIV/CD26 Enzymaktivität in Tumorzelllinien, verglichen mit benignen Zelllinien.[214] Eine Überexpression von DPPIV/CD26 konnte hingegen bei Ovarialkarzinomzellen gezeigt werden. [205]

Eine Abnahme von DPPIV zeigte sich bei Melanomen, kolorektalen Karzinomen, Prostata-, Endometrium-, Nierenkarzinomen, hämatologischen Neoplasien und Lungen- sowie Plattenepithelkarzinomen der Haut. Eine verstärkte DPPIV Expression wurde gezeigt bei Astrozytomen, T und B Lymphomen und Leukämien, gastrointestinalen Stromatumoren, follikulären Schilddrüsenkarzinomen. [208]

Während der malignen Transformation von Melanozyten wurde eine reduzierte Expression von CD26 gezeigt, die Expression fehlte bei primären und metastasierten Melanomzellen. [202, 224-227]

DPPIV/CD26 wurde als Tumorsuppressor, unter anderem bei Melanomen [202, 225], Gliomen [212], Neuroblastomen [228], Ovarialkarzinomen [203, 229, 230], Endometriumkarzinomen [231], Prostatakarzinomen [232] und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) [233] beschrieben. Andere Studien haben die Expression mit einer Zunahme des malignen Verhaltens unter anderem bei Ewing-Sarkomen [234], hämatologischen Neoplasien [235, 236], malignen Mesotheliomen [237] und kolorektalen Karzinomen [238] in Verbindung gebracht.

Bei kolorektalen Karzinomen wurde eine signifikante Abnahme der Enzymspiegel in Zusammenhang mit den Krankheitsstadien festgestellt. Die sCD26-Isoform könnte damit ein vielversprechender Biomarker sein. [239, 240]

Ein bekannter Inhibitor von DPPIV ist Sitagliptinphosphat, welches als Antidiabetikum eingesetzt wird.[214] [241, 242]

1.5 MMP-9

Bei den Matrix Metalloproteasen (MMPs) handelt es sich um eine Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, welche aus mehr als 20 Mitgliedern besteht. [243] Ein Mitglied dieser Familie ist die Matrix Metalloprotease 9 (MMP-9), welches auch als Gelatinase B bezeichnet wird. [244, 245]

MMP-9 kann unter anderem von Neutrophilen, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen [246] sowie durch Tumor- oder Stromazellen der Tumorumgebung gebildet werden. [247] [248-250]

MMP-9 wird als Prä-Proenzym synthetisiert, als inaktives pro-MMP-9 sezerniert und durch proteolytische Spaltung aktiviert. [246, 251]

Es ist an der proteolytischen Spaltung von extrazellulärer Matrix (ECM) sowie Umbauvorgängen der ECM beteiligt und spaltet intrazelluläre Substrate [252-254] sowie verschiedene Plasmamembranproteine [246, 251, 255-260] [261]. MMP-9 wurde auch im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben. [262-264]

MMPs sind an Entzündungsprozessen und an der Wundheilung beteiligt. [255, 265]

MMP-9 kann die Tumorumgebung beeinflussen und spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion, Metastasierung, Angiogenese von Tumoren. [266-269] [268]

Es fördert die Besiedlung von metastatischen Nischen und die Tumorprogression. [261, 270] Zudem kann MMP-9 Kollagen Typ IV und somit Basalmembranen, die zu einem Großteil hieraus bestehen, spalten [258, 271, 272], was die Tumorinvasion und Metastasierung erleichtert. [268, 273]

Bei Malignomen konnten erhöhte Serumspiegel des MMP-9 im Vergleich zu gesunden Probanden gezeigt werden, unter anderem bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom [274], Zervixkarzinom [275-277], Ovarialkarzinom [278, 279] oder Osteosarkom [280].

Bei Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) waren sowohl die Serumspiegel von MMP-9 als auch die Spiegel im Pankreassekret erhöht. [281]

Auch immunhistochemisch ließ sich eine erhöhte MMP-9 Expression in Geweben von Zervixkarzinomen [282] sowie Mammakarzinomen [283-285] nachweisen. Eine schlechtere Prognose zeigte sich bei Patienten mit Zervixkarzinom [275-277] und Osteosarkom [286] im Fall einer MMP-9 Expression.

MMP-9 Expression war im Fall von Mammakarzinomen mit lymphatischer Metastasierung und dem Stadium der Erkrankung verbunden. [285] Es zeigte sich bei aggressiven und metastasierten Formen. [244, 245]

Es wurde gezeigt, dass bindegewebiges MMP-9 assoziiert ist mit geringerem Rezidiv-freiem Überleben. [249, 287] Mehrere in vivo Studien mit Mausmodellen haben gezeigt, dass MMP-9 möglicherweise die Metastasierung von Tumoren fördert, wenn es von Bindegewebszellen exprimiert wird. [288, 289]

Zu MMP-9 aus Tumorzellen zeigen einige Studien die Expression als negativen prognostischen Faktor [249, 285, 290] mit einer Korrelation seiner starken Expression mit häufigerer lymphatischer Metastasierung [290, 291], Fernmetastasierung [249] und geringerem Rezidiv-freiem Überleben [248, 249]. Andere Berichte zeigen eine Verbindung zwischen der MMP-9 Expression und einem vorteilhaften Outcome von bestimmten Patientensubgruppen. [250, 287]

Klinische Studien mit MMP-Inhibitoren haben bislang jedoch keine bahnbrechenden Erfolge in Bezug auf die Hemmung der Metastasierung gezeigt. Beschrieben wurden eine mangelnde Spezifität und ausgeprägte Nebenwirkungen der Inhibitoren. [292]

1.6 MIF

Der Macrophage migration Inhibitory Factor (MIF) hemmt die zufälligen Bewegungen von Makrophagen. Das Zytokin wird unter anderem vom Epithel-, Endothelzellen und Makrophagen synthetisiert. [293]

Es ist an Erkrankungen wie Atherosklerose, systemischer Lupus erythematodes, Psoriasis und Diabetes beteiligt. [294, 295]

Es ist unter anderem bei Lungen-, kolorektalen, Mamma-, Prostatakarzinomen überexprimiert.

MIF ist an der Tumorprogression sowie an der Regulation der Zellproliferation, Zellinvasion [296-300] [301-303], des Zellüberlebens [297, 304-307] und der Angiogenese unter anderem bei Melanomen beteiligt [308] [309].

Die angiogenetischen Signalwege beeinflussen auch myeloische Zellen, so dass MIF auch auf Immunzellen wirkt und hierdurch auch Immunantworten beeinflusst. [310]

Als Hauptmechanismus ist eine Bindung an den CD74-Rezeptor beschrieben. [311] Die Beteiligung anderer Rezeptoren wie etwa des Chemokin-Rezeptors CXCR 4, CXCR2 oder CD44-Rezeptor ist ebenfalls beschrieben. [312] [304] Die Bindung von MIF an den CD74-Rezeptor führt zu einem Komplex mit dem Co-Rezeptor CD44 an der Zelloberfläche, wodurch der MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg aktiviert wird. Durch eine reduzierte Cyclin D1- und CDK4-Expression, sowie ein Anstieg der p27 Spiegel wird die Zellzyklusprogression verlangsamt. [313]

Es wurde eine deutlich höhere Expression von MIF mRNA und des MIF-Proteins in humanen Melanomzelllinien und in melanozytären Tumoren als in humanen kulturierten Melanozyten gezeigt. [308, 314] Eine Überexpression von MIF zeigte sich besonders in Melanomzelllinien mit aggressivem Phänotyp mit einem hohen proliferativen und Migrationspotential. Die Expression von MIF war in Metastasen von kutanen Melanomen etwa drei mal höher als in den Primärläsionen. [315]

Melanompatienten wiesen deutlich höhere MIF Spiegel im Serum auf als gesunde Kontrollprobanden. [316]

Studien zeigten, dass MIF aus Melanozyten freigesetzt wird, wenn diese niedrigen UV-Dosen ausgesetzt werden. Somit variiert die Expression von MIF physiologisch entsprechend der Pigmentierung der Haut von Patienten und den Umweltfaktoren. [317]

Bei Melanompatienten im Stadium III korrelierte die MIF Proteinexpression der Tumore negativ mit dem Überleben. [318] Kein Zusammenhang zeigte sich zwischen der MIF Expression und der Prognose von Patienten mit einem primären Melanom. [304] Höhere MIF-Spiegel waren jedoch mit einem schnelleren Rezidiv bei metastasierten Melanomen verknüpft. [319]

Zudem soll MIF die epithelial-zu-mesenchymale Transition induzieren und die Aggressivität des Tumors insbesondere die Invasionsfähigkeit bei duktalem Adenokarzinomen des Pankreas (PDAC) steigern. [302, 303]

In einer Studie zeigte sich, dass MIF häufig bei PDAC überexprimiert ist [320] [301, 303] [321, 322] und dies die Tumorprogression fördert [320] und das Überleben der Patienten nach Tumorresektion reduziert. [303]

1.7 Vorarbeiten

Da die individualisierte Therapie in der Onkologie immer mehr im Fokus steht, wurden Patientenseren betrachtet, um individuelle Unterschiede ausfindig zu machen und zu untersuchen.

Im Zuge anderer Untersuchungen fiel der Einfluss von humanen Seren auf die Migration der Melanomzelllinien BLM und SKMEL28 auf.

1.8 Fragestellung, Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, Faktoren, die die Migration und somit die Metastasierung von Melanomzellen beeinflussen, in einem Pool von Patienten zu identifizieren, um möglicherweise in Zukunft prognostische Faktoren zu entwickeln.

Dazu sollten im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Beeinflussen humane Seren die Zellproliferation, Zellvitalität und Invasionsfähigkeit von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen?
2. Inwiefern unterscheiden sich Seren von gesunden Probanden und Melanompatienten in verschiedenen Stadien in Bezug auf ihre Auswirkung auf die Zellmigration?
3. Welche Zytokine, enthalten in den humanen Seren von Melanompatienten im Stadium IV, beeinflussen die Migration der BLM- und SKMEL28-Melanomzellen?

2 Material und Methoden

2.1 Serumproben

Für die durchgeführten Versuche wurden Serumproben von Patienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen verwendet.

Dazu wurde Patienten mit malignem Melanom im Stadium IV, die im Rahmen ihrer Therapie oder Nachsorge in der Universitäts-Hautklinik Tübingen behandelt wurden, ein zusätzliches Serumröhrchen (S-Monovette 7,5ml Z, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen. Dies fand im Rahmen von Routineblutentnahmen statt, so dass keine zusätzliche Blutentnahme erfolgte.

Zusätzlich wurde Patienten ohne Melanom, ebenfalls im Rahmen ihrer Behandlung in der Universitäts-Hautklinik Tübingen, ein zusätzliches Serumröhrchen abgenommen.

Dieses Vorgehen wurde durch ein Ethikvotum der Universität Tübingen genehmigt (524/2012/BO2).

Alle Tätigkeiten erfolgten unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki.

Die Serumproben wurden nach Abnahme kühl gelagert und 10min bei 1000rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Serum, das heißt der Überstand, abpipettiert, aliquotiert und bei - 20°C gelagert.

Jede Probe wurde maximal zwei Mal aufgetaut und danach verworfen.

2.2 Zellkulturmethoden

2.2.1 Zelllinien

Für die Versuche wurden die humanen Melanomzelllinien BLM (van Muijen, University Hospital Nijmegen, Nijmegen, Niederlande) [323, 324] und SKMEL28 (American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 USA) verwendet.

Die Invasionsversuche wurden zudem zusätzlich mit den humanen Melanomzelllinien MALME-3M, SKMEL2, SKMEL5, LOX IMVI und M14 (American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 USA) durchgeführt.

2.2.2 Zellkultur

Alle Tätigkeiten fanden stets unter der Sterilbank und unter sterilen Bedingungen statt, um eine Kontamination der Zellen unter anderem mit Bakterien zu vermeiden.

Die Zellen (BLM und SKMEL28) wurden in Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und kultiviert. Sie wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid und einer Luftfeuchtigkeit von 100% aufbewahrt. Die Zellen wurden regelmäßig mikroskopiert und bei etwa 80%iger Konfluenz des Zellrasens am Boden der Zellkulturflasche gesplittet. Dies war alle zwei Tage der Fall.

Zur Kultivierung der Zellen wurde RPMI 1640 Medium (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Dieses wurde mit 10% fetalem Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS, Biochrom, Berlin, Deutschland), 1% L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) versetzt. Wird im Folgenden nichts anderes beschrieben, so wurde die eben beschriebene Zusammensetzung des Mediums verwendet.

Zellen splitten:

Die Zellen wurden regelmäßig mikroskopiert und bei etwa 80%iger Konfluenz des Zellrasens am Boden der Zellkulturflasche (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gesplittet. Dies fand alle zwei Tage statt.

Das alte Medium wurde zu diesem Zweck vorsichtig aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen einmal mit 5ml PBS (Phosphate Buffered Saline, Biochrom, Berlin, Deutschland), also mit phosphatgepufferter Salzlösung, gewaschen. Hierzu pipettierte man die Lösung in die Zellkulturflasche und schwenkte diese vorsichtig. Im Anschluss wurde das PBS wieder abgesaugt und 1ml Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin, Deutschland) in die Flasche pipettiert.

Nach einer fünfminütigen Inkubation der Zellen im Brutschrank (bei 37°C, 95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid, 100% Luftfeuchtigkeit) nahm man mit 5ml Medium die vom Boden der Zellkulturflasche gelösten Zellen auf und überführte sie in ein 15ml-Falctontube. Zuvor kontrollierte man, dass sich der Zellrasen durch das Hinzufügen der Trypsin-/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst hatte.

Das Falcontube wurde dann für 5min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5ml frischem Medium resuspendiert. Man pipettierte dann 1ml der resuspendierten Lösung in eine neue Zellkulturflasche und füllte diese mit 10ml frischem Medium auf.

Die Zellen wurden nun erneut im Brutschrank inkubiert.

Zellen zählen:

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen wie zuvor beschrieben gesplittet. Dabei wurden die gesplitteten Zellen in 5ml Medium resuspendiert. Es wurden 10µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt.

Die Neubauer-Zählkammer setzt sich aus 4 Großquadraten à 16 Kleinquadraten zusammen.

Die gezählte Anzahl der Zellen in all diesen Quadraten wurde dann durch vier dividiert und mit 1×10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

Zu beachten ist hierbei, dass man bei einer vorherigen Verdünnung der Zelllösung den Verdünnungsfaktor in der Berechnung berücksichtigen muss.

Wurde die Lösung im Verhältnis 1:3 verdünnt, so muss die gezählte Zellzahl mit 3×10^4 multipliziert werden, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

Die Vitalität der Zellen kann durch eine Färbung mit Trypanblau, zum Beispiel in der Verdünnung 1:10, sichtbar gemacht werden. Nicht vitale Zellen stellen sich lichtmikroskopisch blau dar.

Zellen einfrieren:

Um Zellen einzufrieren wurden sie wie bereits beschrieben gesplittet. Dabei nahm man die gelösten Zellen mit Medium auf und überführte sie in ein 15ml Falcontube, um sie dann 5min bei 1200rpm zu zentrifugieren.

Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1ml Einfriermedium, bestehend aus 90% FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen (Kryoröhrchen,) überführt. Die Einfrierröhrchen sollten zunächst 1-2 Tage bei -20°C gelagert werden und können danach bei -80°C über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Möchte man Zellen langfristig aufbewahren, sollten diese in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Um Zellen aufzutauen, wurde das Kryoröhrchen aus -80°C oder aus Stickstoff möglichst rasch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Danach wurden die Zellen in ein 15ml Falcontube mit 10ml Medium pipetiert, um sie 5min bei 1200rpm zu zentrifugieren. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Zellkulturflaschen wurden dann wie bereits erwähnt in einem Brutschrank inkubiert.

2.3 Migrationsversuche

Ziel dieses Versuches war es, das Migrationsverhalten von Zellen, die mit FCS beziehungsweise mit humanen Seren behandelt wurden, zu untersuchen. Diese Versuche wurden ebenfalls mit den Zelllinien BLM und mit SKMEL28 durchgeführt.

Es wurden zwei unabhängige Kohorten gebildet.

Bei der Verwendung der BLM-Melanomzellen wurden in der ersten Kohorte 19 Seren gesunder Probanden sowie 14 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet. In der zweiten Kohorte wurden 18 Seren gesunder Probanden und 19 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet.

Dieses Vorgehen wurde mit den SKMEL28-Melanomzellen ebenfalls durchgeführt. Die erste Kohorte bestand aus 21 Seren gesunder Probanden sowie 13 Seren von Melanompatienten im Stadium IV. Für die zweite Kohorte wurden 21 Seren gesunder Probanden sowie 19 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet.

Für die Migrationsversuche wurden die Zellen zunächst gesplittet und auf die Zahl von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml gebracht bei einem Gesamtvolumen von 1,5ml pro Slide.

Es wurden μ -Slides 8 Well (Ibidi, München, Deutschland) verwendet.

In jedes well der Slides wurde mittig ein Insert (culture-Insert, Ibidi, München, Deutschland) plaziert. Ein solches Insert besteht aus zwei Kammern, welche durch einen Steg getrennt sind und haftet an der Unterseite fest am Boden des Slides. Man kann somit Zellen in zwei Felder aussäen, die durch einen zellfreien Streifen, hier als Steg bezeichnet, voneinander getrennt sind.

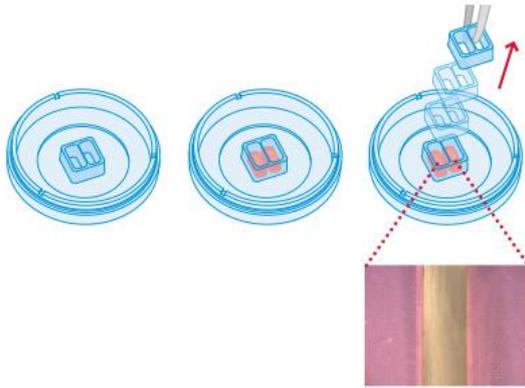


Abb. 1: Insert (culture-Insert, Ibidi, München, Deutschland)

nach

https://ibidi.com/img/cms/products/labware/open_removable/E_8XXXX_CI_2Well/IN_8XXXX_CI_2Well.pdf [Zugriff 20.10.2019]

Insert bestehend aus zwei Kammern, so dass nach Aussäen der Zellen zwei Felder, getrennt durch einen zellfreien Streifen vorliegen.

In jede Kammer des Inserts wurden nun 70µl der zuvor hergestellten Zellsuspension pipettiert. Die Slides wurden 24h im Brutschrank inkubiert, damit die Zellen an den Boden der Slides adhären konnten.

Am nächsten Tag wurden die Inserts entfernt und das Medium vorsichtig aus den wells abgesaugt.

Die Inserts (Ibidi, München, Deutschland) wurden über Nacht in eine 80%ige Ethanollösung gelegt, getrocknet und ein weiteres Mal verwendet.

In die wells der Slides pipettierte man dann frisches Medium ohne FCS, welches auch als Kontrolle ohne Serumzusatz belassen.

Das Medium der übrigen wells wurde mit 10% FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland) oder 10% humanem Serum versetzt, so dass ein Gesamtvolumen von 250µl je well entstand. In die wells mit Serumzusatz wurde 90% Medium ohne FCS (225µl) sowie 10% Serum (25µl) gegeben.

Diese Stimulation der Zellen stellte den Zeitpunkt 0 dar und wurde unter dem Lichtmikroskop mit 5facher-Vergrößerung fotografiert.

Wenn der Steg in der FCS-Kontrolle nicht mehr sichtbar war, also ein geschlossener Zellrasen vorlag, in der Regel nach 20 Stunden, wurden die Slides erneut fotografiert.

Initial wurden auch Serumkonzentrationen von 5%, 10% und 20% verwendet. Alle weiteren Versuche wurden mit einem Serumzusatz von 10% durchgeführt, um einen möglichst geringen Verbrauch humaner Seren zu erzielen und eine Vergleichbarkeit zum Kulturmedium der Zellen, welches 10% FCS enthielt, zu gewährleisten.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit ImageJ (NIH, Bethesda, USA).

Die weiteren Berechnungen erfolgten mit Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Das Bild der wells zum Zeitpunkt 0 wurde in ImageJ (NIH, Bethesda, USA) vermessen und das Resultat in Pixel angegeben. Es wurde jeweils die Gesamtfläche der FCS-Kontrolle jedes Slides gemessen, sowie der Anteil des zellfreien Stegs jedes wells zum Zeitpunkt 0 sowie nach 20h.

Der Anteil des zellfreien Stegs nach 20h dividiert durch den Anteil des zellfreien Stegs zum Zeitpunkt 0 wurde berechnet. Die Abnahme des zellfreien Stegs (bar reduction) nach 20h, bezogen auf den Zeitpunkt 0, wurde in Prozent angegeben.



FCS/Humanes Serum 0h FCS 20h

Humanes Serum 20h

Abb. 2: Zellrasen nach Zugabe von Seren nach 0h bzw. 20h (5fache Vergrößerung)

Zellrasen nach Behandlung mit 10% FCS bzw. 10% humanem Serum nach 0h sowie 20h.

2.4 Zellproliferation

Zur Bestimmung der Zellproliferation unter Einfluss von FCS oder humanem Serum gesunder Probanden bzw. Seren von Melanompatienten im Stadium IV wurden die Zelllinien BML und SKMEL28 verwendet.

Es wurden 10 Seren gesunder Probanden sowie 10 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet. Insgesamt wurden 12 Einzelwerte nach Stimulation mit FCS sowie jeweils 30 Einzelwerte nach Stimulation mit den humanen Seren ermittelt. Aus diesen Einzelwerten wurden dann die Mittelwerte der 3 Gruppen gebildet.

Es wurden 10 000 Zellen in jedes well einer 24-well-Platte ausgesät bei einem Endvolumen von 250µl pro well. Die Zellen wurden 24h in einem Brutschrank inkubiert, so dass sie adhären konnten.

Danach wurde das Medium vorsichtig aus den wells entfernt und frisches Medium ohne FCS beziehungsweise versetzt mit 10% FCS oder 10% humanem Serum hinzugefügt, so dass wieder ein Gesamtvolumen von 250µl pro well entstand.

Nach weiteren 20-24h erfolgte dann die Zellzahlbestimmung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer.

Jeder Versuchsansatz wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt.

Zudem wurde die Anzahl der vitalen Zellen bzw. nicht vitaler Zellen pro Milliliter bestimmt. Es wurden ebenfalls BLM- sowie SKMEL28-Melanomzellen verwendet und die Zellen mit 10% FCS, 10% Seren gesunder Probanden sowie mit 10% Seren von Melanompatienten im Stadium IV behandelt.

Jeder Versuchsansatz wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt.

Es wurden 10 Seren gesunder Probanden sowie 10 Seren von Melanompatienten verwendet. Insgesamt wurden 12 Einzelwerte nach Stimulation mit FCS sowie jeweils 30 Einzelwerte nach Stimulation mit den humanen Seren ermittelt. Aus diesen Einzelwerten wurden dann die Mittelwerte der beschriebenen Gruppen gebildet.

2.5 Zellzyklus

Ziel dieses Versuches war es, die Auswirkungen einer Behandlung mit FCS beziehungsweise humanen Seren gesunder Probanden sowie Seren von Melanompatienten im Stadium IV auf den Zellzyklus von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen zu untersuchen. Zur Analyse des Zellzyklus wurde der NC-250™ NucleoCounter® (ChemoMetec, Allerød, Dänemark) verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend des durch den Hersteller empfohlenen Protokolls.

Es wurden jeweils 10 Proben nach Behandlung mit 10% FCS bzw. mit 10% Serum gesunder Probanden oder 10% Serum von Melanompatienten im Stadium IV analysiert. Aus den Ergebnissen wurden Mittelwerte gebildet und der Anteil der Zellen in den jeweiligen Stadien des Zellzyklus in Prozent angegeben. Es wurden 20 000 Zellen in jedes well einer 24-well Platte ausgesät. Die Zellen wurden nach 24h mit 10% FCS bzw. humanem Serum stimuliert.

Nach weiteren 24h erfolgte die Analyse des Zellzyklus.

Die Analyse des Zellzyklus erfolgte anhand des Protokolls „Two-step Cell Cycle Analysis“ (ChemoMetec, Allerød, Dänemark).

Es wurden die im Kit enthaltenen Reagenzien verwendet. Das Medium wurde aus den wells abgesaugt. Im Anschluss daran wurden diese mit jeweils 3ml PBS gewaschen. Das PBS wurde danach entfernt und 0,25ml Lösung 10 (enthält 10µg/ml DAPI) hinzugegeben. Die Lösung 10 mit DAPI wurde angesetzt, indem man zum Beispiel 20µl Lösung 12 zu 980µl Lösung 10 hinzufügte.

Nach 5 Minuten Inkubation der Zellen bei 37°C wurden die Zellen resuspendiert. In jedes well pipettierte man nun noch jeweils 0,25ml Lösung 11.

Für die Messungen im Nucleocounter wurde ein 8-chamber slide (NC-Slide A8) verwendet. 10µl der hergestellten Zellsuspension wurden in eine der acht Kammern des Slides gegeben.

Man platzierte den Slide im NucleoCounter NC-250 und wählte das Programm „2-Step Cell Cycle Assay“, Sample unit NC-Slide A8.

Die Zellfluoreszenz wurde nun quantifiziert und es Histogramme zum DNA-Inhalt erstellt.

Durch die erstellten Histogramme können die Zellen der verschiedenen Stadien des Zellzyklus voneinander abgegrenzt werden und der Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus (subG1-, G1-, G2/M-, S-Phase) in Prozent angegeben werden.

2.6 Invasion Assay

Zur Testung der Invasionsfähigkeit von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen unter Einfluss von Seren gesunder Probanden sowie Seren von Melanompatienten im Stadium IV wurde der 96 Well 3D Spheroid BME Cell Invasion Assay (Cultrex®, Trevigen, Gaithersburg, USA) durchgeführt. Der Durchführung des Versuchs erfolgte anhand des dem Assay beiliegenden Protokolls.

Es wurden je Gruppe jeweils 12 verschiedene Seren verwendet.

Dieser Assay erstreckte sich über mehrere Tage, die hier als Tag 0, Tag 3 und Tag 6 bezeichnet werden. Er wurde nach einem dem Kit beiliegenden Protokoll durchgeführt.

Die Zellen wurden, wie im Kapitel Zellkulturmethoden beschrieben, ausgesät, gesplittet und gezählt. Man verwendete 3000 Zellen pro well in einer 96 well Platte.

An Tag 0 stellte man eine Zellsuspension her, bestehend aus den verwendeten Zellen, Zellkulturmedium (RPMI 1640, Gibco, Thermo Scientific Waltham, USA) und der Spheroid Formation ECM (im Kit enthalten).

Je well verwendete man 5µl der 10x Spheroid Formation ECM. Diese wurde auf Eis gelagert langsam aufgetaut, bis sie etwa 4°C hatte. Man gab nun die Zellen (3000 Zellen/well) in Zellkulturmedium hinzu, so dass ein Gesamtvolumen von 50 µl pro well entstand. Das Zellkulturmedium sollte ebenfalls etwa 4°C haben.

Von dieser Zellsuspension wurden nun 50µl in jedes well der 96well-Platte pipettiert und dann für 3min bei 200xg bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Im Anschluss wurde die Platte bei 37°C in einem Zellkulturinkubator 72h lang inkubiert, um die Bildung der Zellspheroide fördern.

An Tag 3 wurde die 96 well-Platte 15 Minuten lang auf Eis gelagert, um die wells zu kühlen.

Danach pipettierte man in jedes well 50µl unverdünnte Invasion Matrix (im Kit enthalten), wobei man stets auf Eis arbeitete.

Die Invasion Matrix musste zuvor ebenfalls langsam auf Eis aufgetaut werden, bis sie flüssig war. Dabei sollte man sie vorsichtig schwenken und darauf achten, dass sie keine Luftblasen enthält.

Die Platte wurde nun bei 300xg 5min in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen und die Spheroide in den wells zu zentrieren.

Anschließend inkubierte man die Platte eine Stunde lang im Zellkulturinkubator (bei 37°C).

Danach fügte man jedem well 100µl Zellkulturmedium (RPMI 1640, Gibco, Thermo Scientific Waltham, USA) hinzu, welches zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde.

Es wurde sowohl Medium ohne Zusätze als auch Medium mit Serumzusatz verwendet. Als Serumzusatz wurde hier die doppelte Konzentration im Vergleich zu anderen Versuchen, wie etwa bei den Migrationsversuchen, verwendet. Dies wurde im Protokoll des Kits empfohlen, da die Spheroide in der Invasion Matrix eingebettet sind und dies zu einer Veränderung des Gesamtvolumens führt.

Es wurde also 20% Serum verwendet, was bedeutete, dass in jedes well 80µl Medium ohne FCS und 20µl Serum pipettiert wurde.

Die 96 well Platte wurde nun erneut bei 37°C für 6 Tage inkubiert.

Jedes well wurde unmittelbar vor dieser Inkubation, nach 3 Tagen und nach 6 Tagen fotografiert, wozu das 4x Objektiv von Zeiss verwendet wurde.

Die Analyse der Bilder erfolgte mit AxioVision (Zeiss, Jena, Deutschland). Die Fläche der entstandenen Zellspheroiden wurde an Tag 0, sowie nach 3 Tagen und 6 Tagen vermessen und in μm^2 angegeben.

Hieraus wurde die Invasion ratio berechnet, indem die Fläche des Zellspheroids nach 6 Tagen durch jene nach 3 Tagen dividiert wurde. Dies erfolgte in Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

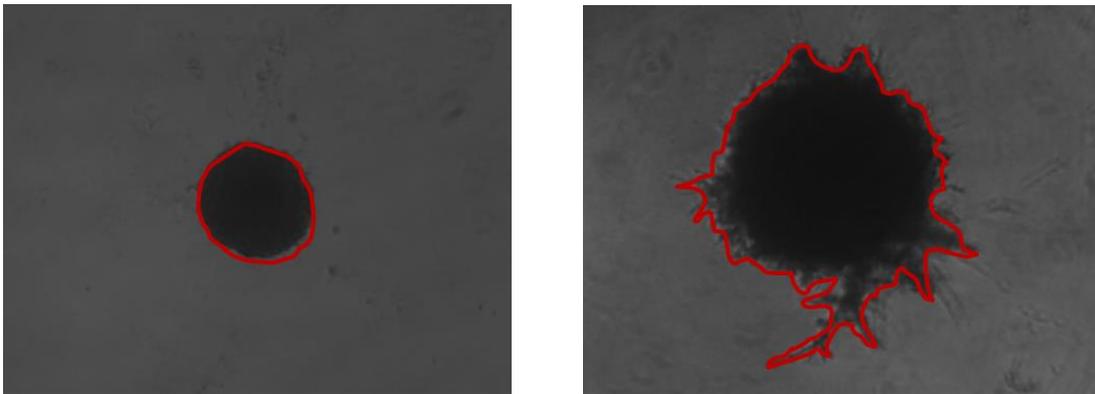


Abb. 3: Zellspheroiden von BLM-Melanomzellen nach 0 Stunden (links) bzw. 6 Tagen (rechts).

Die Grafik zeigt Zellspheroiden nach Behandlung von BLM-Melanomzellen mit 20% Serum gesunder Probanden bzw. 20% Serum von Melanompatienten im Stadium IV, fotografiert nach 0h bzw. 6 Tagen mit 5facher Vergrößerung.

Die rot umrandete Fläche wurde mithilfe von AxioVision (Zeiss, Jena, Deutschland) in μm^2 gemessen.

2.7 Cytokine Array

Zur Analyse der Zytokine verschiedener Seren wurde das Human XL Cytokine Array Kit (Proteome Profiler Array, R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet.

Der Versuch wurde nach einem Protokoll, welches zu dem verwendeten Kit empfohlen wurde, durchgeführt.

Es wurden jeweils 5 Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit geringer Migrationshemmung bzw. 5 Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit hoher Migrationshemmung gemischt.

Eine geringe Migrationshemmung bedeutet hierbei eine Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) bei Verwendung von BLM-Melanomzellen von über 60%, eine hohe Migrationshemmung eine bar reduction unter 60%. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte in mittlerer Pixeldichte.

Die verwendeten Serumproben wurden bei -20°C gelagert und unmittelbar vor den Versuchen aufgetaut.

Im Kit enthalten waren 4 Nitrocellulose-Membranen, von denen jede mit 102 verschiedenen Antikörpern, jeweils in Duplikaten, beladen war.

Die Membranen dürfen nur mit Handschuhen und Pinzetten berührt werden, um eine Kontamination unter anderem mit Speichel zu vermeiden.

Der Versuch wurde in einer 4-well Multi-dish durchgeführt, so dass später in jedes well eine Membran platziert werden konnte.

Zunächst wurden 2ml Puffer 6 in jedes well pipettiert. Dieser diente als blockierender Puffer. In jedes well wurde nun eine Membran, mit der Nummer der Membran nach oben, gelegt. Die Platte wurde danach eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert.

In dieser Zeit bereitete man die verwendeten Proben vor. Für jede Membran wurde ein Gesamtvolumen von 1,5ml verwendet und dazu Serum mit Puffer 6 verdünnt. Nach einer Stunde wurde der Puffer aus den wells entfernt und die vorbereiteten Probenlösungen hineinpipettiert. Die Platte wurde mit dem Deckel verschlossen und über Nacht bei 2-8°C auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurde jede Membran in einen Plastikbehälter platziert, der 20ml Waschpuffer enthielt. Der Waschpuffer musste zuvor verdünnt werden, wozu 40ml Waschpufferkonzentrat mit 960ml deionisiertem Wasser gemischt wurden. Die Membranen wurden 10min lang gewaschen und währenddessen auf einen Schüttler gestellt. Es wurden drei dieser Waschvorgänge durchgeführt. Die 4-well Multi-dish wurde währenddessen mit deionisiertem Wasser gespült und getrocknet.

Für jeden Ansatz mischte man 30µl des Detection Antibody Cocktail mit 1,5ml 1x Puffer 4/6 und pipettierte in jedes well 1,5ml dieser Lösung.

Der Puffer 4/6 bestand aus 4ml Puffer 4 und 8ml Puffer 6. Um die Antikörperlösung herzustellen, wurde zuvor der Antikörper-Cocktail in 200µl deionisiertem Wasser rekonstituiert.

Die Membranen ließ man nach dem Waschen abtropfen und legte sie dann wieder in den 4-well Multi-dish, der die Antikörperlösung enthielt.

Die verschlossene Platte inkubierte man eine Stunde lang auf einem Schüttler. Im Anschluss wusch man die Membranen erneut wie zuvor beschrieben.

Danach legte man die Membranen erneut in den 4-well Multi-dish und pipettierte in jedes well 2ml 1x Streptavidin-HRP.

Die verschlossene Platte inkubierte man 30 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Membranen gewaschen, wie es bereits zu Beginn beschrieben wurde.

Danach ließ man möglichst viel überschüssigen Waschpuffer abtropfen und platzierte die Membranen, mit der Nummer nach oben, auf einer Folie.

Auf jede Membran pipettierte man nun 1ml des Chemi Reagent Mix, so dass die Membranen komplett bedeckt waren. Hierzu mischte man maximal 15 Minuten vor Verwendung Chemi Reagent 1 und 2 zu gleichen Teilen und bewahrte die Lösung lichtgeschützt auf. Die Membranen wurden nun von der Plastikfolie bedeckt, möglichst ohne Luftblasen zu enthalten und eine Minute inkubiert. Im Anschluss entfernte man überschüssiges Chemi Reagent und legte die mit der Folie umhüllten Membranen in eine Entwickler-Kassette. Die Membranen wurden dann zwischen 1 und 10 Minuten einem Film ausgesetzt.

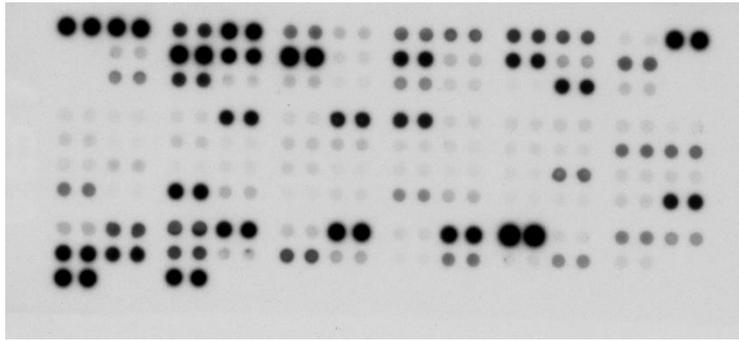


Abb. 4: Cytokine Array (Proteome Profiler Array, R&D Systems, Minneapolis, USA) nach Entwicklung

Cytokine Array, beladen mit 102 verschiedenen Antikörpern (jeweils in Duplikaten) nach Entwicklung.

Die Position positiver Antikörper-Felder konnte auf dem entwickelten Film mittels einer Vorlage, die man darüberlegen konnte, identifiziert werden.

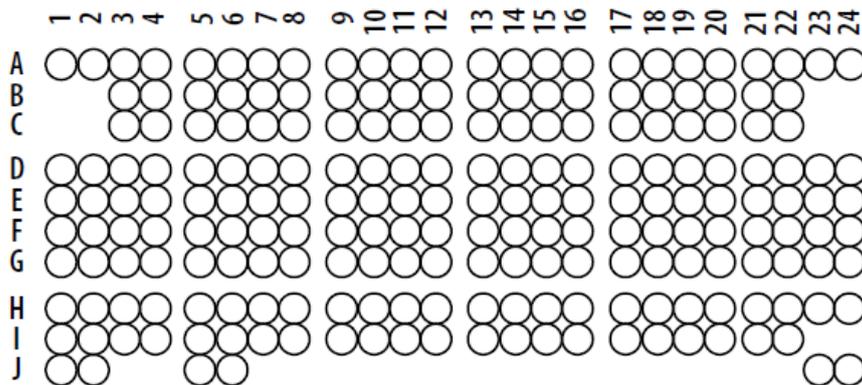


Abb. 5: Cytokine Array (Proteome Profiler Array, R&D Systems, Minneapolis, USA)

Transparente Folie zur Identifizierung der Koordinaten der Antikörperfelder.

Die Auswertung erfolgte durch Messung der Pixeldichte der einzelnen Felder. Hierzu wurden die entwickelten Filme eingescannt und dann mittels ImageJ (NIH, Bethesda, USA) analysiert. Es wurde die Pixeldichte der Negativkontrolle vom Wert eines jeden Feldes subtrahiert, um so einen Rückschluss auf die Expression zu ziehen. Da jedes Zytokin als Duplikat vorhanden war, wurde der Mittelwert bestimmt.

2.8 GDF-15 ELISA

Um die GDF-15 Konzentration in humanen Seren zu bestimmen, wurde der Human GDF-15 Immunoassay, Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet.

Der ELISA wurde entsprechend dem Protokoll durchgeführt.

Es wurden 10 verschiedene Seren gesunder Probanden und 30 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet.

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die humanen Seren von Patienten mit einem Melanom im Stadium IV wurden zudem nach ihrer Stärke der Migrationshemmung von BLM-Melanomzellen unterteilt. Gruppe 1 zeigte eine geringe Migrationshemmung, das heißt eine bar reduction > 60%, Gruppe 2 eine hohe Migrationshemmung mit einer bar reduction < 60%.

Es wurden 13 Seren mit hoher Migrationshemmung und 17 Seren mit geringer Migrationshemmung verwendet. Die Bestimmungen wurden jeweils als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zunächst stellte man die GDF-15 Standardreihe her. Dazu wurde der GDF-15-Standard mit 1ml Calibrator Diluent RD5-20 rekonstituiert, so dass die entstehende Stammlösung eine GDF-15 Konzentration von 15 000pg/ml enthielt. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde in den ersten Ansatz 900µl Calibrator Diluent RD5-20 und in alle weiteren 500µl pipettiert. Insgesamt wurden 8 Ansätze hergestellt.

Es wurden nun 500µl der GDF-15 Stammlösung in Ansatz 1 pipettiert. Dieser wurde gründlich durchmischt und dann 500µl dieses Ansatzes in Ansatz 2 pipettiert, von dort 500µl in Ansatz 3 und so weiter. Es entstanden acht Ansätze mit den GDF-15 Konzentrationen 1500pg/ml, 750pg/ml, 375pg/ml, 188pg/ml, 93,8pg/ml, 46,9pg/ml und 23,4pg/ml. Als Nullwert wurde Calibrator Diluent RD5-20 verwendet. Der ELISA wurde in einer im Kit enthaltenen 96 well-Platte durchgeführt.

Man pipettierte 100µl Assay Diluent RD1-9, der zuvor auf Raumtemperatur gebracht und gut gemischt wurde, in jedes well.

Nun fügte man je well 50µl des Standards bzw. Serum hinzu. Die verwendeten Serumproben wurden zuvor vierfach in Calibrator Diluent RD5-20 verdünnt. Die Platte wurde nun mit einer Folie verschlossen und bei Raumtemperatur zwei Stunden auf einem Schüttler inkubiert.

Im Anschluss wurde die Flüssigkeit aus den wells abgesaugt und dann die Platte gewaschen. Pro well wurden hierzu 400µl Waschpuffer hinzugegeben. Dies wurde vier mal durchgeführt.

Das Waschpufferkonzentrat wurde zuvor auf Raumtemperatur erwärmt und 20ml davon in deionisiertem Wasser verdünnt, so dass man 500ml verdünnten Waschpuffer erhielt. Nach jedem Waschen musste die Flüssigkeit komplett aus den wells entfernt werden. Nach dem letzten Waschen wurde die Platte zusätzlich vorsichtig auf sauberen Papiertüchern ausgeklopft.

Danach wurden 200µl humanes GDF-15 Konjugat (im Kit enthalten) in jedes well pipettiert und die Platte erneut verschlossen eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Waschvorgang wie oben beschrieben durchgeführt.

Es wurden im Anschluss 200µl Substratlösung pro well hinzugefügt. Die Substratlösung setzte sich zu gleichen Teilen aus den Farblösungen A und B (im Kit enthalten) zusammen, die maximal 15 Minuten vor Verwendung gemischt und lichtgeschützt aufbewahrt wurden.

Die 96 well-Platte wurde nun 30 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Danach pipettierte man 50µl Stopplösung in jedes well, wodurch sich die Farbe in den wells von blau zu gelb änderte. Innerhalb von 30 Minuten konnte nun die optische Dichte der wells bestimmt werden. Hierzu wurde ein microplate reader, der auf 450nm eingestellt war, verwendet.

Die Auswertung erfolgte mittels Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Da es sich um Doppelbestimmungen handelte, wurden jeweils die Mittelwerte berechnet und davon die durchschnittliche optische Dichte des Nullstandards subtrahiert. Zudem wurde eine Standardkurve aus der GDF-15 Standardreihe erstellt. Hierzu erstellte man ein Diagramm mit den logarithmisch aufgetragenen humanen GDF-15 Konzentrationen (in pg/ml) auf der X-Achse und der optischen Dichte auf der Y-Achse, die ebenfalls logarithmisch aufgetragen wurden.

Mithilfe einer Regressionsanalyse konnte dann eine Gerade erstellt werden, so dass die GDF-15 Konzentrationen der Serumproben mittels der angegebenen Formel bestimmt werden konnten. Da die Proben verdünnt wurden, mussten die aus der Standardkurve abgelesenen Konzentrationen jeweils mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

2.9 Statistik

Die Auswertung der Versuche wurde mittels Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA), ImageJ (NIH, Bethesda, USA) und AxioVision (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt.

Zur Durchführung statistischer Tests und Erstellung von Grafiken wurde GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Migration

Es wurde das Migrationsverhalten von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen unter Einfluss von FCS, Seren gesunder Probanden sowie Seren von Melanompatienten im Stadium IV untersucht.

Die Abnahme der zellfreien Stegbreite (bar reduction) nach 20h wurde berechnet und in Prozent angegeben.

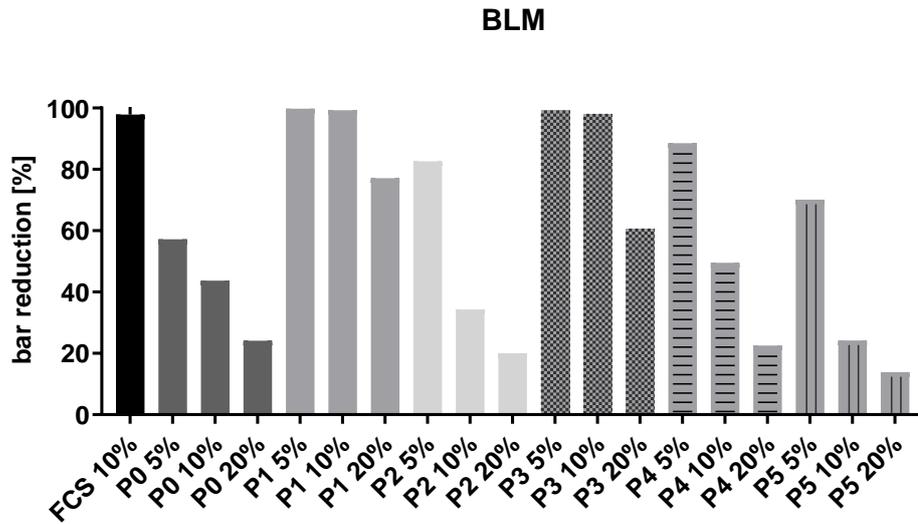
Initial wurden Serumkonzentrationen von 5%, 10% und 20% verwendet.

Alle weiteren Versuche wurden mit einem Serumzusatz von 10% durchgeführt.

Es zeigte sich sowohl bei Verwendung von SKMEL28- als auch bei Verwendung von BLM-Melanomzellen eine Abnahme der Fläche des zellfreien Steges (bar reduction) bei Einsatz höherer Serumkonzentrationen.

Je höher die Serumkonzentration (5%, 10% und 20%) war, desto geringer fiel die Abnahme der Stegbreite aus.

A



B

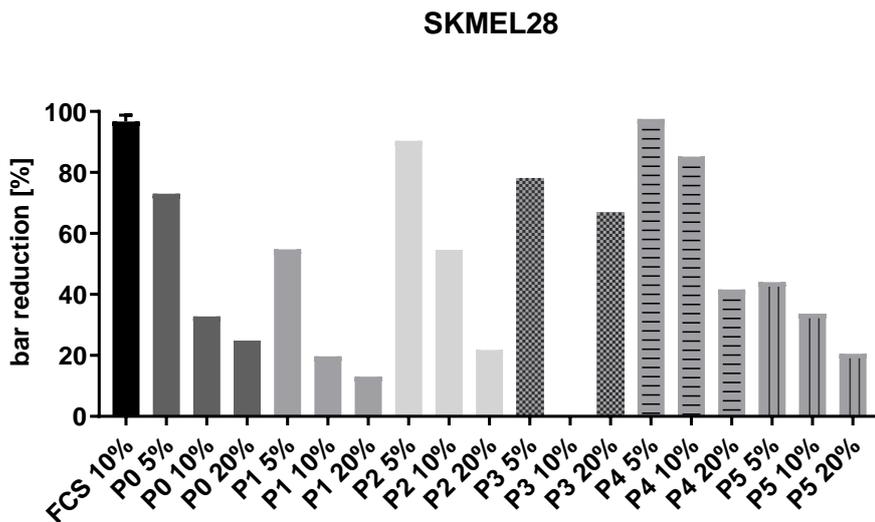


Abb. 6: Migrationsassay von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen nach Behandlung mit humanen Seren

A: Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction, in Prozent) nach Stimulation von BLM-Melanomzellen mit 10% FCS sowie 5%, 10% sowie 20% humanem Serum.

B: Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction, in Prozent) nach Stimulation von SKMEL28-Melanomzellen mit 10% FCS sowie 5%, 10% sowie 20% humanem Serum.

Es wurden die Serumproben P0 bis P5 verwendet. Diese Proben stammen von Melanompatienten im Stadium IV.

Zudem wurde das Migrationsverhalten von BLM- Melanomzellen unter Einfluss von 10% FCS, 10% Serum gesunder Probanden sowie 10% Serum von Melanompatienten in den Stadien I bis IV untersucht. Die Abnahme der zellfreien Stegbreite (bar reduction) nach 20h wurde berechnet und in Prozent angegeben.

Es zeigte sich keine signifikante Änderung der zellfreien Stegbreite (bar reduction) nach Behandlung der BLM-Melanomzellen mit FCS im Vergleich zu einer Behandlung mit Seren gesunder Probanden, Melanompatienten im Stadium I oder II.

Nach Behandlung der Zellen mit Seren von Melanompatienten im Stadium III zeigte sich eine signifikante Abnahme der zellfreien Stegbreite (bar reduction) von 72,6% im Vergleich zu einer bar reduction nach Behandlung mit Seren gesunder Probanden (bar reduction 87,7%, *** $p= 0,0006$ Mann Whitney test). Zudem ergab sich eine signifikante Reduktion der zellfreien Stegbreite (bar reduction) nach Behandlung der Zellen mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV von 67% im Vergleich zu einer bar reduction nach Behandlung mit Seren gesunder Probanden (bar reduction 87,7%, *** $p= 0,0008$ Mann Whitney test).

Die Reduktion der zellfreien Stegbreite (bar reduction) nach Behandlung mit Seren von Melanompatienten im Stadium III bzw. IV war ebenfalls signifikant im Vergleich zur bar reduction nach Behandlung mit FCS (bar reduction 90,9%, **** $p<0,0001$ Mann Whitney test).

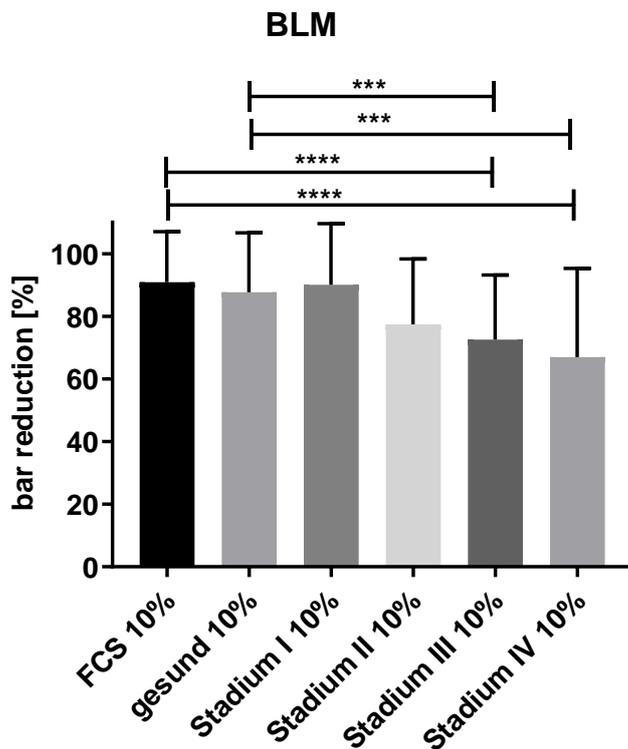


Abb. 7: Migrationsassay von BLM-Melanomzellen nach Inkubation mit 10% FCS, 10% humanen Seren gesunder Probanden sowie Melanompatienten in den Stadien I-IV

Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction, in Prozent) nach Stimulation von BLM-Melanomzellen mit 10% FCS, 10% Serum gesunder Probanden sowie 10% Serum von Melanompatienten in den Stadien I, II, III bzw. IV.

Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardabweichung.

Es wurden 30 Seren gesunder Probanden, 22 Seren von Melanompatienten im Stadium I, 15 Seren von Patienten im Stadium II, 25 Seren von Melanompatienten im Stadium III und 30 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet.

(Vergleich nach Stimulation mit Seren im Stadium III bzw. gesunder Probanden:

*** $p = 0,0006$; Vergleich nach Stimulation mit Seren im Stadium IV bzw. gesunder Probanden: *** $p = 0,0008$; p**** $p < 0,0001$, Mann Whitney test).

Es wurden nun zwei unabhängige Kohorten gebildet.

Bei der Verwendung der BLM-Melanomzellen wurden in der ersten Kohorte 19 Seren gesunder Probanden sowie 14 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet. In der zweiten Kohorte wurden 18 Seren gesunder Probanden und 19 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet.

Die Ergebnisse der ersten Kohorte zeigten, dass die Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) nach Stimulation der BLM-Melanomzellen mit humanen Seren von Melanompatienten im Stadium IV signifikant niedriger war, als nach Stimulation der Zellen mit humanen Seren gesunder Probanden. Der p-Wert betrug 0,0031 (Mann Whitney test).

Die bar reduction nach Behandlung mit humanen Seren von Melanompatienten im Stadium IV war zudem signifikant niedriger, als nach Behandlung der Zellen mit FCS (p-Wert <0,0001, Mann Whitney test).

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der bar reduction nach Behandlung der Zellen mit FCS und der Behandlung der Zellen mit Seren gesunder Probanden.

Auch bei der zweiten Kohorte zeigte sich nach Inkubation der BLM-Melanomzellen mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV eine signifikante Verminderung der bar reduction im Vergleich zu einer Inkubation der Zellen mit humanen Seren gesunder Probanden (p-Wert <0,0001, Mann Whitney test), sowie eine signifikante Abnahme der bar reduction im Vergleich zu einer Behandlung mit FCS (p-Wert <0,0001, Mann Whitney test).

Erneut zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der bar reduction nach Behandlung der Zellen mit FCS und der Behandlung der Zellen mit Seren gesunden Probanden.

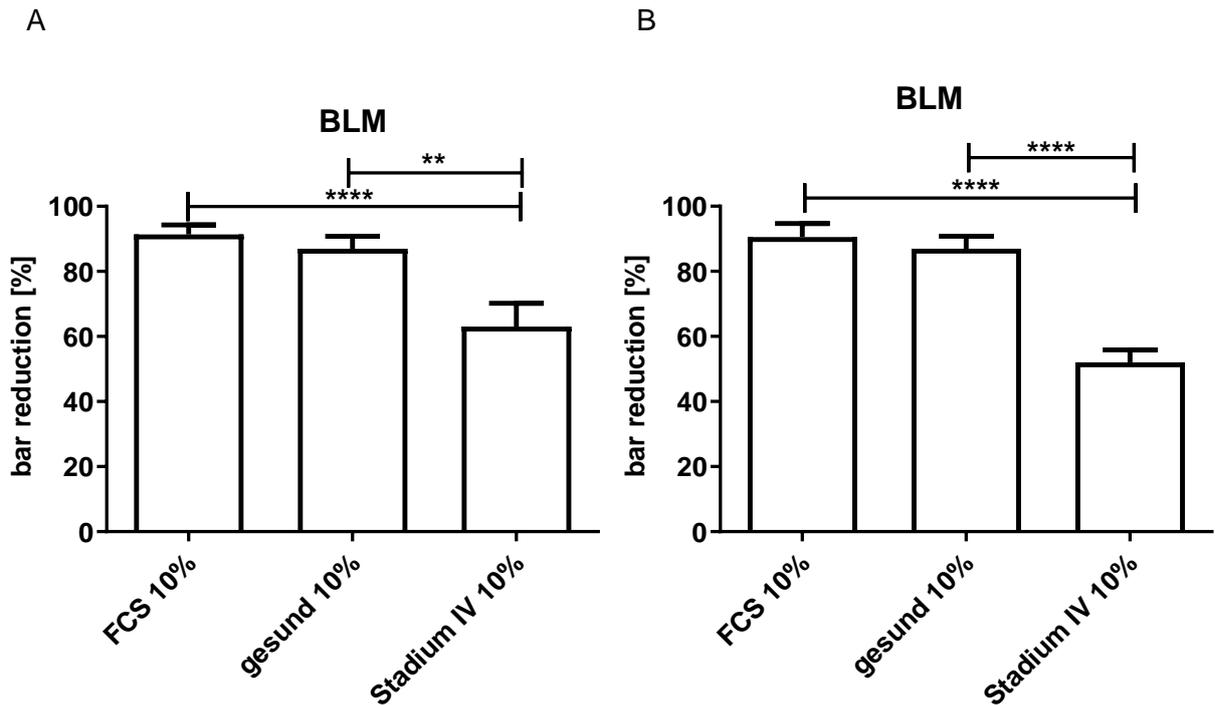


Abb. 8: Migrationsassay von BLM- Melanomzellen (2 Kohorten)

A: Kohorte 1: Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction, in Prozent) nach Stimulation von BLM-Melanomzellen mit 10% FCS, 10% humanem Serum gesunder Probanden bzw. 10% Serum von Melanompatienten im Stadium IV. Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardabweichung. Es wurden 19 Seren gesunder Probanden sowie 14 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet. ** $p= 0,0031$, **** $p<0,0001$ (Mann Whitney test)

B: Kohorte 2: Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction, in Prozent) nach Stimulation von SKMEL28-Melanomzellen mit 10% FCS, 10% humanem Serum gesunder Probanden bzw. 10% Serum von Melanompatienten im Stadium IV. Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardabweichung. Es wurden 18 Seren gesunder Probanden und 19 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet. **** $p<0,0001$ (Mann Whitney test)

Dieses Vorgehen wurde mit SKMEL28-Melanomzellen ebenfalls durchgeführt. Die erste Kohorte bestand aus 21 Seren gesunder Probanden sowie 13 Seren von Melanompatienten im Stadium IV. Für die zweite Kohorte wurden 21 Seren gesunder Probanden sowie 19 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet.

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der bar reduction nach Stimulation der SKMEL28-Melanomzellen mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV im Vergleich zu einer Behandlung der Zellen mit humanen Seren gesunder Probanden (p-Wert erste Kohorte 0,0085, p-Wert zweite Kohorte <0,0001, Mann Whitney test).

Die bar reduction nach Behandlung mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV war zudem signifikant niedriger als nach Inkubation der Zellen mit FCS (erste Kohorte p-Wert 0,0027, zweite Kohorte p-Wert 0,0039, Mann Whitney test). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der bar reduction nach Behandlung der Zellen mit FCS und der Behandlung der Zellen mit Seren gesunder Probanden.

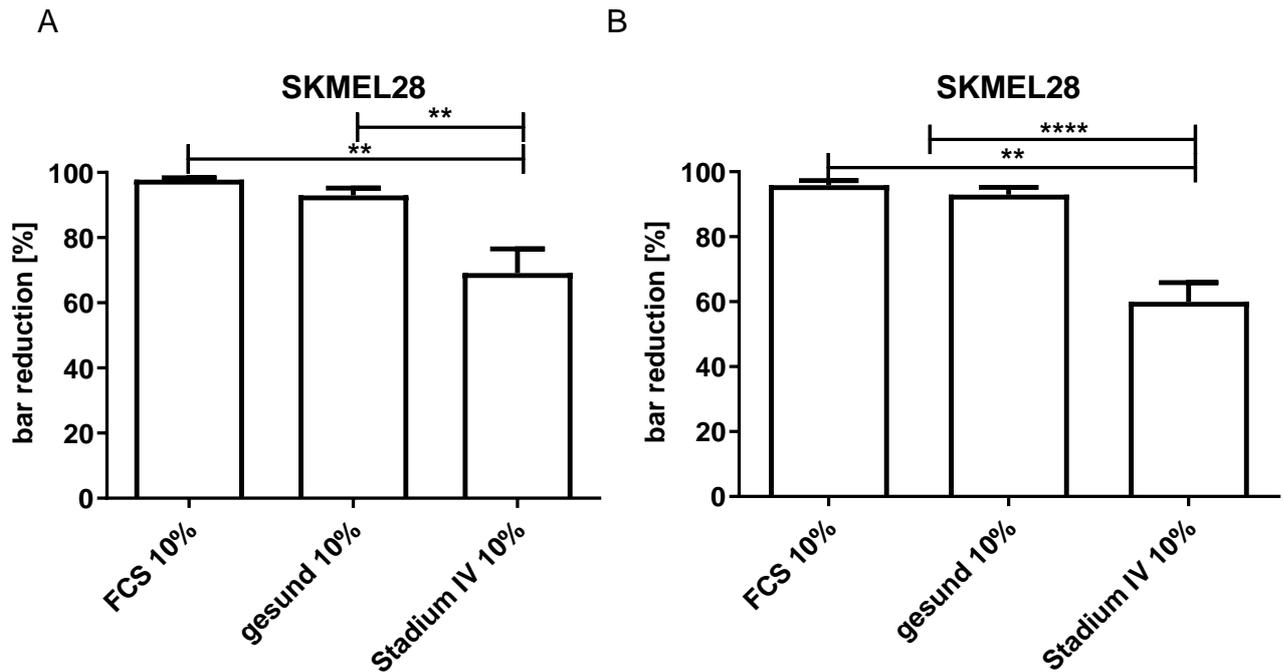


Abb. 9: Migrationsassay von SKMEL28-Melanomzellen (2 Kohorten)

A: Kohorte 1: Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) (in Prozent) nach Stimulation von SKMEL28-Melanomzellen mit 10% FCS, 10% humanem Serum gesunder Probanden bzw. 10% Serum von Melanompatienten im Stadium IV.

Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardabweichung. Es wurden 21 Seren gesunder Probanden sowie 13 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet.

** p=0,0085 (nach Stimulation mit Seren im Stadium IV bzw. Seren gesunder Probanden), **p= 0,0027 (Stimulation mit Seren im Stadium IV bzw. mit FCS)

B: Kohorte 2: Bar reduction (in Prozent) nach Stimulation von SKMEL28-Melanomzellen mit 10% FCS, 10% humanem Serum gesunder Probanden bzw. 10% Serum von Melanompatienten im Stadium IV.

Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardabweichung. Es wurden 21 Seren gesunder Probanden und 19 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet.

** p= 0,0039, **** p<0,0001 (Mann Whitney test)

Es zeigte sich eine große Streuung der Werte in Bezug auf die Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) der getesteten humanen Seren von Melanompatienten im Stadium IV.

Um die Unterschiede zwischen Seren, die die Migration von BLM-Melanomzellen stark beeinflussen und Seren, die dies in geringerem Ausmaß bewirken, wurden die Seren nach Stärke der Migrationshemmung in 2 Gruppen unterteilt.

Gruppe 1 zeigte eine Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) von über 60% und somit eine geringe Migrationshemmung.

In der Gruppe 2 betrug die Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) unter 60%, so dass eine hohe Migrationshemmung vorlag.

Tabelle 2: Migrationsassay von BLM-Melanomzellen nach Stimulation mit humanen Seren, ausgewählte Serumproben

Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction, in Prozent) nach Stimulation von BLM-Melanomzellen mit 10% humanem Serum gesunder Probanden bzw. 10% Serum von Melanompatienten im Stadium IV.

Es wurden ausgewählte Serumproben, deren Ergebnisse in weiterführenden Versuchen verwendet wurden, zusammengestellt. Es handelt sich um Mittelwerte.

Serumprobe Nummer	Stadium	Mittelwert bar reduction [in %]
3	IV	98,1
10	gesund	67,9
11	gesund	92,9
20	IV	70,5
42	IV	86,3
84	IV	46,7
87	IV	42,9
88	IV	37,5
92	IV	88,4
93	IV	64,7
95	IV	32,2
97	IV	50,8
99	IV	66,5

Serumprobe Nummer	Stadium	Mittelwert bar reduction [in %]
100	IV	62,6
101	IIIA	76,2
102	IV	35,5
103	IV	79,4
104	IV	59,3
106	IV	70,8
114	IV	64,5
116	IV	57,5
119	IV	92,0
120	IV	41,1
123	IV	21,8
125	IV	39,5
126	gesund	99,6
127	gesund	99,0
128	gesund	62,1
129	gesund	99,0
130	gesund	78,2
131	gesund	51,8
133	gesund	33,3
165	IV	53,5
166	IV	45,5
167	IV	47,2
168	IV	59,1
169	IV	32,8
171	IV	47,1
173	IV	80,3
175	IV	66,9
176	IV	38,6
178	IV	41,2
179	IV	59,7
182	IV	79,9
183	IV	77,4
195	IV	82,3
207	IV	86,3

3.2 Zellproliferation

Es wurde der Einfluss von FCS beziehungsweise humanen Seren gesunder Probanden bzw. Seren von Melanompatienten im Stadium IV auf die Zellproliferation der Zelllinien BLM und SKMEL28 untersucht.

Für die BLM-Melanomzellen ergab sich ein Mittelwert von 182250 Zellen pro Milliliter nach Stimulation mit FCS sowie von 143167 Zellen pro Milliliter nach Stimulation mit Seren gesunder Probanden bzw. ein Mittelwert von 142063 Zellen pro Milliliter nach Stimulation mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV.

Bei den SKMEL28-Melanomzellen ergab sich ein Mittelwert von 208592 Zellen pro Milliliter nach Stimulation mit FCS, 107940 Zellen pro Milliliter nach Stimulation mit Seren gesunder Probanden und 92089 Zellen pro Milliliter nach Stimulation mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV.

Sowohl BLM- als auch SKMEL28-Melanomzellen zeigten keine signifikante Veränderung der Zellzahl pro Milliliter nach Inkubation der Zellen mit Seren gesunder Probanden im Vergleich zur Zellzahl pro Milliliter nach Behandlung mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV.

Nach Stimulation der Zellen mit humanen Seren zeigte sich eine signifikant reduzierte Zellzahl pro Milliliter im Vergleich zur Zellzahl nach Stimulation mit FCS.

(BLM-Melanomzellen: Nach Stimulation mit FCS im Vergleich zur Stimulation mit Seren gesunder Probanden $p=0,0001$, nach Behandlung mit FCS bzw. Seren von Melanompatienten im Stadium IV: $p=0,0004$, Mann Whitney test; SKMEL28-Melanomzellen $p<0,0001$, Mann Whitney test).

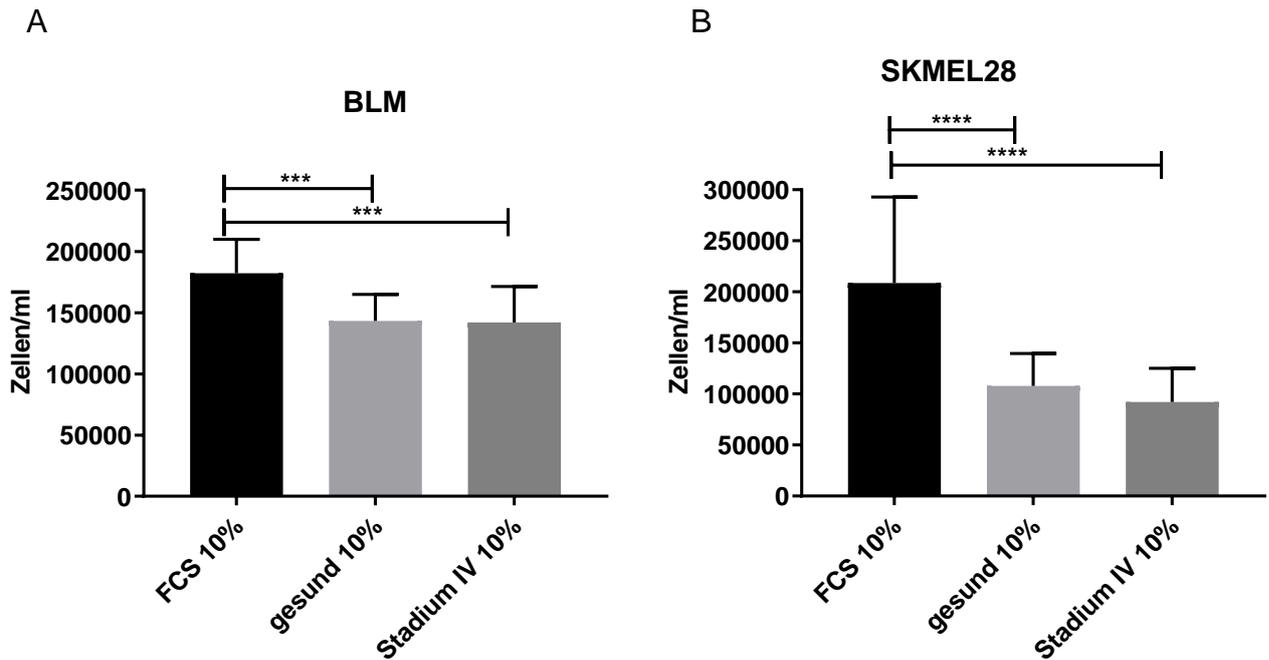


Abb. 10: Zellproliferation von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen

Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Wertegruppe FCS enthält 12 Einzelwerte, die Gruppen der gesunden Probanden bzw. der Melanompatienten im Stadium IV jeweils 30 Einzelwerte.

A: Anzahl BLM-Melanomzellen pro Milliliter nach 24 Stunden Inkubation mit 10% FCS, 10% humanem Serum gesunder Probanden bzw. 10% Serum von Melanompatienten im Stadium IV.

*** $p=0,0004$ nach Inkubation mit FCS bzw. Serum gesunder Probanden bzw. $p=0,0001$ nach Inkubation mit FCS bzw. Serum von Melanompatienten im Stadium IV (Mann Whitney test).

B: Anzahl SKMEL28-Melanomzellen pro Milliliter nach 24 Stunden Inkubation mit 10% FCS, 10% humanem Serum gesunder Probanden bzw. 10% Serum von Melanompatienten im Stadium IV.

**** $p<0,001$ (Mann Whitney test)

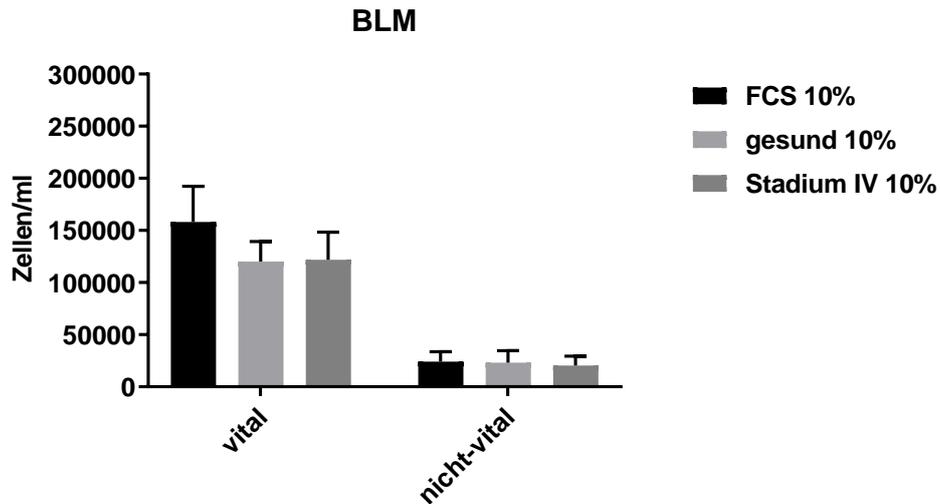
Zudem wurde die Anzahl der vitalen Zellen bzw. nicht vitaler Zellen pro Milliliter nach Behandlung mit 10% FCS, 10% Seren gesunder Probanden und 10% Seren von Melanompatienten im Stadium IV bestimmt. Es wurden ebenfalls BLM- sowie SKMEL28-Melanomzellen verwendet.

Für die BLM-Melanomzellen ergab sich ein Mittelwert von 158100 vitalen bzw. 24125 nicht-vitalen Zellen pro Milliliter nach Stimulation mit 10% FCS. Nach Stimulation mit Seren gesunder Probanden ergaben sich im Mittel 120150 vitale sowie 23020,3 nicht-vitale Zellen pro Milliliter. Nach Stimulation mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV zeigten sich 121780 vitale sowie 20259,3 nicht-vitale Zellen.

Für die SKMEL28-Melanomzellen ergab sich ein Mittelwert von 173633 vitalen bzw. 34875 nicht-vitalen Zellen pro Milliliter nach Stimulation mit 10% FCS. Nach Stimulation mit Seren gesunder Probanden ergaben sich im Mittel 80496,7 vitale sowie 27306,7 nicht-vitale Zellen pro Milliliter. Nach Stimulation mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV zeigten sich 66013,8 vitale sowie 26109 nicht-vitale Zellen.

Es zeigte sowohl bei Verwendung von BLM- als auch bei SKMEL28-Melanomzellen keine signifikante Veränderung der Zahl vitaler bzw. nicht-vitaler Zellen pro Milliliter nach Behandlung mit Seren gesunder Probanden im Vergleich zur Zellzahl nach Behandlung der Zellen mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV.

A



B

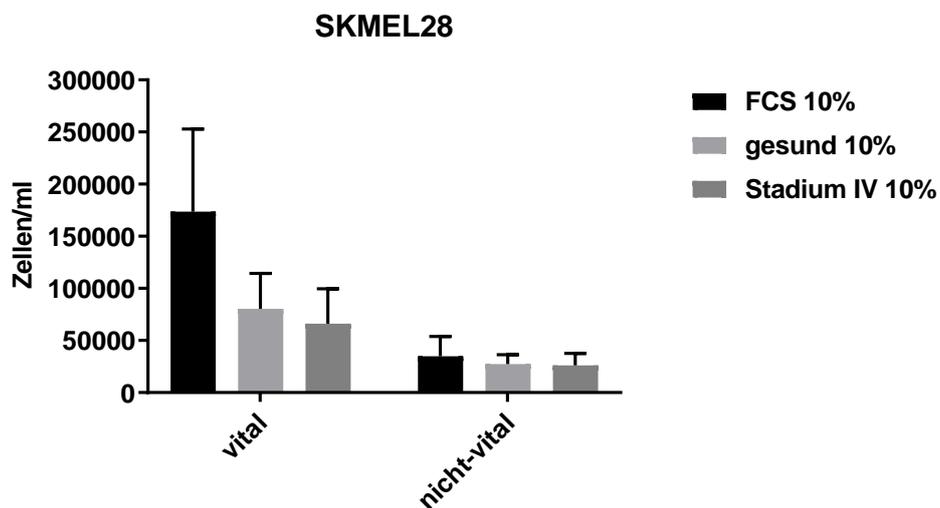


Abb. 11: Anzahl vitaler bzw. nicht vitaler BLM- und SKMEL28-Melanomzellen pro Milliliter

Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Gruppe FCS enthält 12 Einzelwerte, die Gruppen der gesunden Probanden bzw. der Melanompatienten im Stadium IV jeweils 30 Einzelwerte.

A: Anzahl vitaler bzw. nicht vitaler BLM-Melanomzellen pro Milliliter nach 24 Stunden Inkubation mit 10% FCS, 10% humanem Serum gesunder Probanden bzw. 10% Serum von Melanompatienten im Stadium IV

B: Anzahl vitaler bzw. nicht vitaler SKMEL28-Melanomzellen pro Milliliter nach 24 Stunden Inkubation mit 10% FCS, 10% humanem Serum gesunder Probanden bzw. 10% Serum von Melanompatienten im Stadium IV

3.3 Zellzyklus

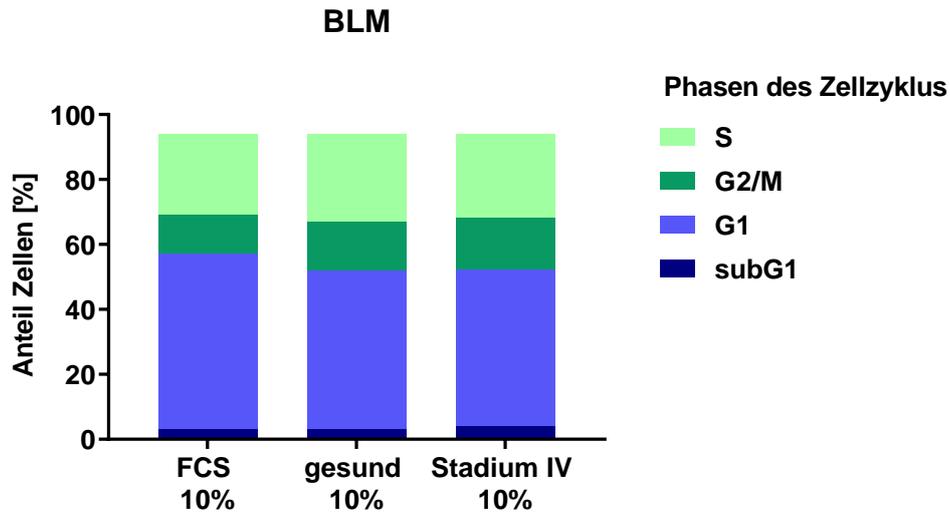
Es wurden die Auswirkungen einer Behandlung mit 10% FCS, 10% humanem Serum gesunder Probanden bzw. 10% Serum von Melanompatienten im Stadium IV auf den Zellzyklus von BLM- und SKMEL28-Zellen untersucht. Zur Analyse des Zellzyklus wurde der NC-250TM NucleoCounter® (ChemoMetec, Allerød, Dänemark) sowie das zugehörige Protokoll verwendet.

Bei Verwendung von BLM-Melanomzellen waren nach Stimulation mit FCS 3% der Zellen in der subG1-, 54% in der G1-, 12% in der G2/M- und 25% in der S-Phase befanden. Nach Stimulation mit Seren gesunder Probanden befanden sich 3% der Zellen in der subG1-, 49% in der G1-, 15% in der G2/M- und 27% in der S-Phase. Nach Stimulation mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV befanden sich 4% der Zellen in der subG1-, 48% in der G1-, 16% in der G2/M- und 26% in der S-Phase.

Bei Verwendung der SKMEL28-Melanomzellen zeigte sich nach Stimulation mit FCS, dass sich 4% der Zellen in der subG1-, 65% in der G1-, 10% in der G2/M- und 11% in der S-Phase befanden. Nach Stimulation mit Seren gesunder Probanden befanden sich 4% der Zellen in der subG1-, 64% in der G1-, 9% in der G2/M- und 9% in der S-Phase. Nach Stimulation mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV befanden sich 3% der Zellen in der subG1-, 67% in der G1-, 7% in der G2/M- und 6% in der S-Phase.

Es zeigte sich keine signifikante Veränderung des Zellzyklus von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen nach Behandlung mit Seren gesunder Probanden bzw. Seren von Melanompatienten im Stadium IV im Vergleich zu einer Behandlung der Zellen mit FCS, insbesondere keine Veränderung der subG1-Phase.

A



B

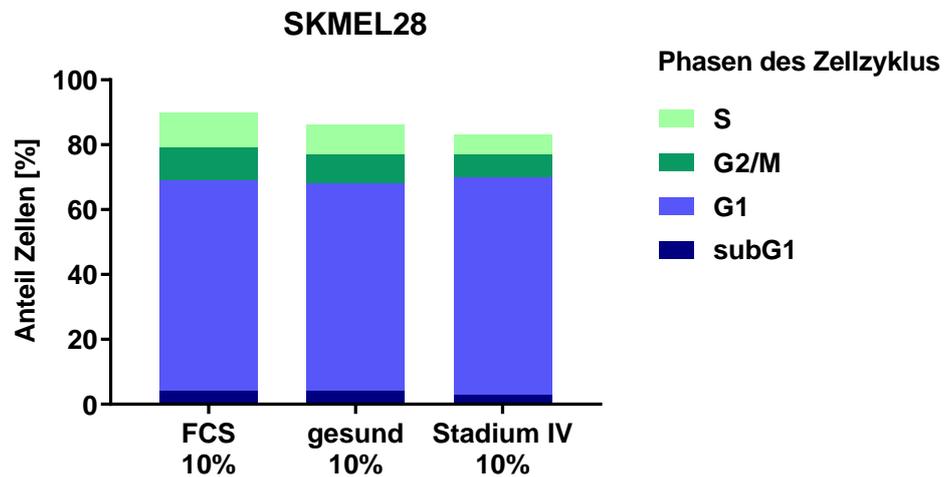


Abb. 12: Zellzyklusanalyse von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen nach Behandlung mit Seren

A: Anteil BLM-Zellen in der subG1-, G1-, G2/M-, S-Phase nach Stimulation mit 10% FCS, 10% humanen Seren gesunder Probanden bzw. 10% Seren von Melanompatienten im Stadium IV in Prozent

B: Anteil SKMEL28-Zellen in der subG1-, G1-, G2/M-, S-Phase nach Stimulation mit 10% FCS, 10% humanen Seren gesunder Probanden bzw. 10% Seren von Melanompatienten im Stadium IV in Prozent

Es handelt sich um Mittelwerte. Jede Gruppe (FCS, humane Seren gesunder Probanden bzw. von Melanompatienten im Stadium IV) setzt sich aus 10 Einzelwerten zusammen. Die Analyse wurde mithilfe des NC-250TM NucleoCounter® (ChemoMetec, Allerød, Dänemark) durchgeführt.

3.4 Invasion

Die Invasionsfähigkeit von BLM-Melanomzellen unter Einfluss von Seren gesunder Probanden bzw. Seren von Melanompatienten im Stadium IV wurde mithilfe des 96 Well 3D Spheroid BME Cell Invasion Assay (Cultrex®, Trevigen, Gaithersburg, USA) untersucht. Die Fläche der entstandenen Zellspheroiden wurde vermessen und in μm^2 angegeben. Hieraus wurde die Invasion ratio berechnet, indem die Fläche des Zellspheroids nach 6 Tagen durch jene nach 3 Tagen dividiert wurde.

Es zeigte sich eine Invasion ratio von 1,13 nach Behandlung der BLM-Melanomzellen mit Seren gesunder Probanden sowie eine Invasion ratio von 1,35 nach Behandlung mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV. Somit zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Invasion ratio nach Behandlung der BLM-Melanomzellen mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV im Vergleich zu den Ergebnissen nach Behandlung der Zellen mit Seren gesunder Probanden ($p=0,0125$, Mann Whitney test).

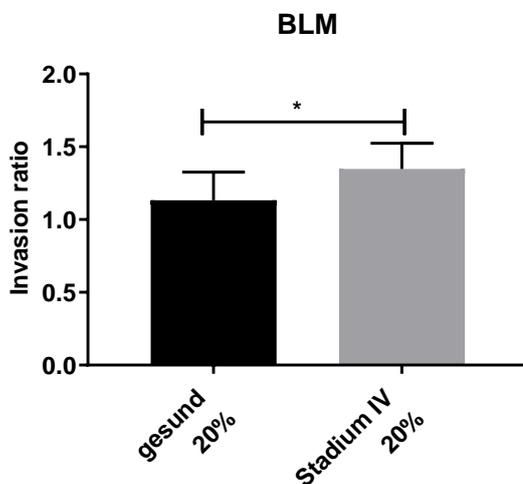


Abb. 13: Invasion ratio von BLM- Melanomzellen nach Behandlung mit humanen Seren

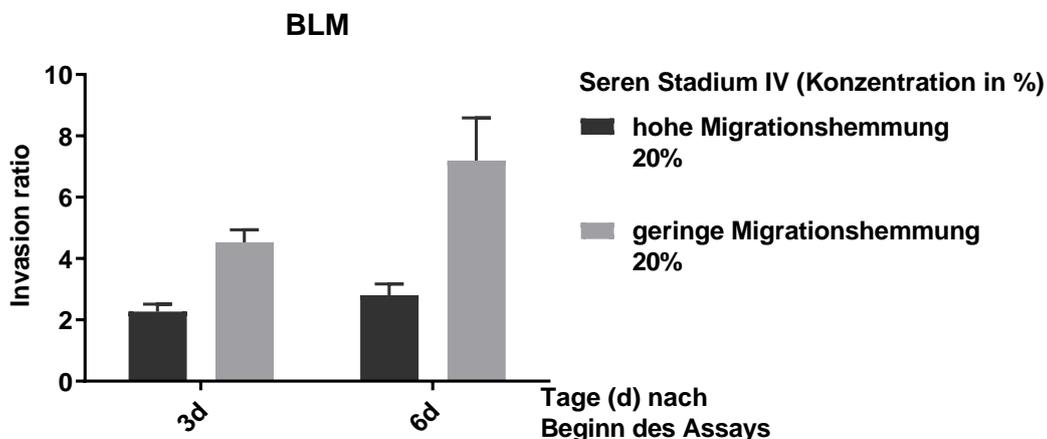
Invasion ratio (Fläche des Zellspheroids in μm^2 nach 6 Tagen dividiert durch die Fläche des Zellspheroids nach 3 Tagen) nach Inkubation mit 20% humanem Serum gesunder Probanden bzw. Serum von Melanompatienten im Stadium IV.

Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardabweichung. Jede Gruppe umfasst 12 Einzelwerte. * $p=0,0125$ (Mann Whitney test)

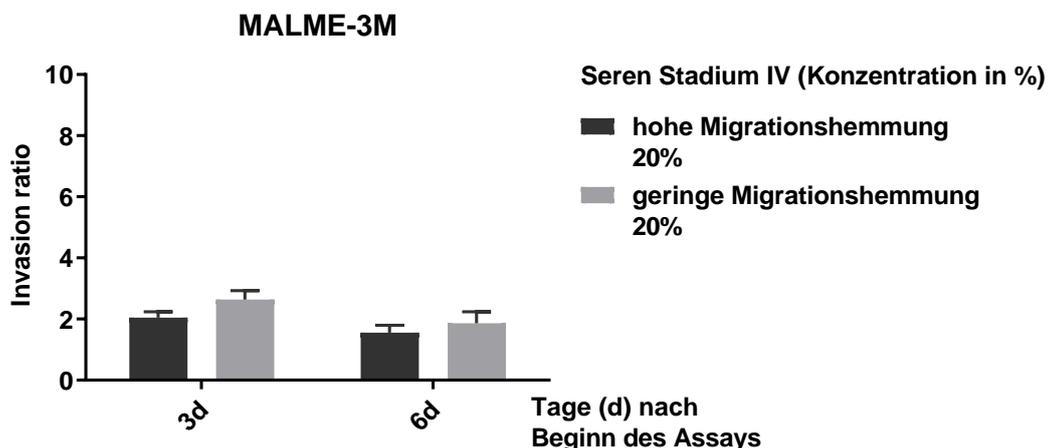
Es wurde zudem die Invasionsfähigkeit weiterer Melanomzellen (BLM- (A), MALME-3M- (B), SKMEL5- (C), LOX IMVI- (D), M14- (E), SKMEL2- (F) Melanomzellen) unter dem Einfluss von Seren von Melanompatienten im Stadium IV, in einer Konzentration von 20%, untersucht.

Die Seren wurden hierbei in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe umfasste Seren, die in den Migrationsassays eine bar reduction <60% und somit eine hohe Migrationshemmung zeigten. Die zweite Gruppe zeigte in diesen Versuchen eine bar reduction >60% und somit eine geringe Migrationshemmung. Es wurde die Ratio der Invasion nach 3 Tagen bzw. 6 Tagen berechnet, indem die Fläche des Zellspheroids (in μm^2) nach 3 Tagen bzw. nach 6 Tagen durch jene zu Beginn des Versuchs dividiert wurde. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Invasionsratio nach Inkubation der Melanomzellen mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV, die sich durch eine hohe bzw. geringe Migrationshemmung auszeichnen.

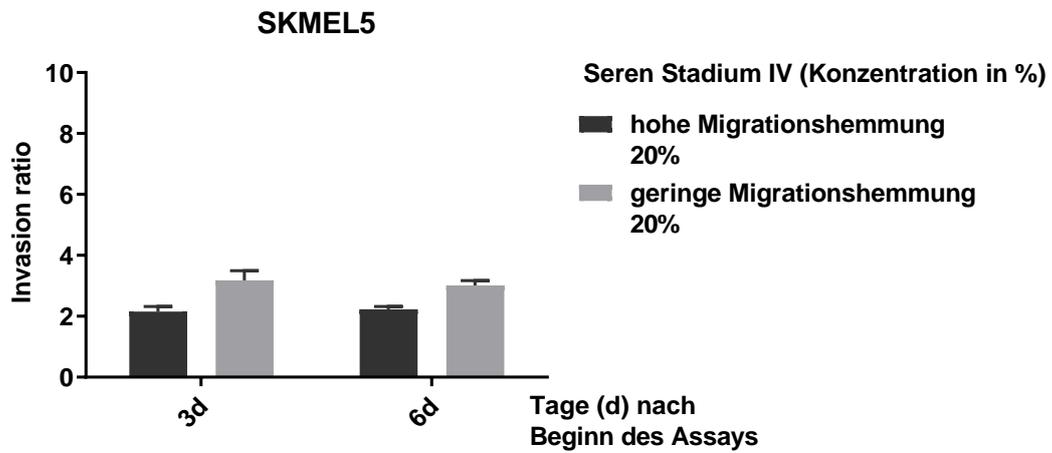
A



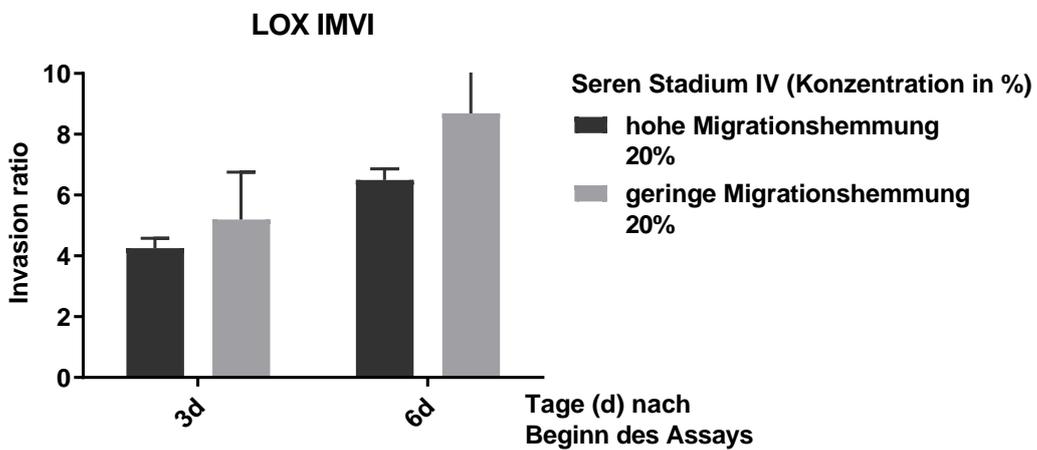
B



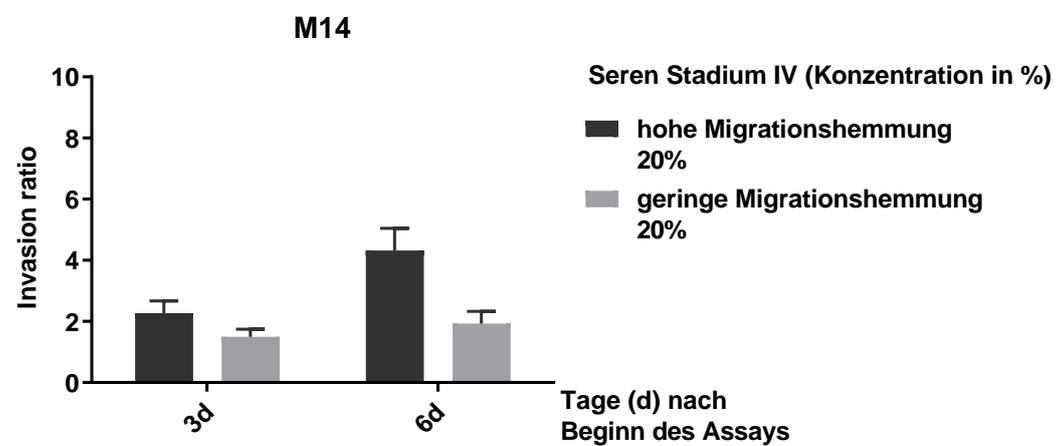
C



D



E



F

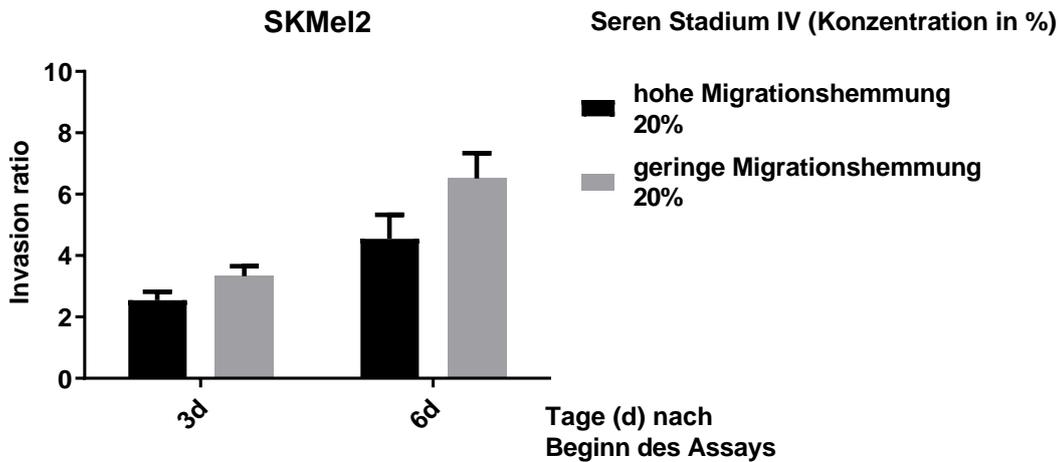


Abb. 14: Invasion ratio von BLM- (A), MALME-3M- (B)-, SKMEL5- (C), LOX IMVI- (D), M14- (E), SKMEL2- Melanomzellen (F) nach Behandlung mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV (20%) unterteilt nach Stärke der Migrationshemmung

3d: Invasion ratio nach 3 Tagen (3d) (Fläche des Zellspheroids in μm^2 nach 3 Tagen dividiert durch die Fläche des Zellspheroids zum Startzeitpunkt) nach Inkubation mit 20% Serum von Melanompatienten im Stadium IV.

6d: Invasion ratio nach 6 Tagen (6d) (Fläche des Zellspheroids in μm^2 nach 6 Tagen dividiert durch die Fläche des Zellspheroids zum Startzeitpunkt) nach Inkubation mit 20% Serum von Melanompatienten im Stadium IV.

Es wurden zwei Gruppen von Seren unterschieden. Die erste Gruppe zeigte in den Migrationsversuchen eine bar reduction <60%, somit eine hohe Migrationshemmung. Die zweite Gruppe ergab eine bar reduction >60%, somit eine geringe Migrationshemmung.

Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardabweichung. Jede Gruppe umfasst 8 Einzelwerte.

3.5 Seren mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung

3.5.1 Cytokine Array

Zur Analyse der Zytokine, welche in Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung enthalten sind, wurde der Human XL Cytokine Array durchgeführt. Dieser war mit 102 Zytokinen jeweils in Duplikaten beladen. Die Ergebnisse wurden in mittlerer Pixeldichte angegeben. Es zeigte sich eine deutliche Abweichung der mittleren Pixeldichte bei Seren mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung insbesondere bei den Zytokinen Aggrecan, DPPIV, GDF-15, IL-4, I-TAC, Kallikrein 3, Leptin, MIF, MMP-9 und ST2.

Tabelle 3: Mittlere Pixeldichte ausgewählter Zytokine in Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung

Es wurden jeweils 5 Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung gepoolt.

Zytokin	Seren mit hoher Migrationshemmung [Mittlere Pixeldichte]	Seren mit geringer Migrationshemmung [Mittlere Pixeldichte]
Aggrecan	3039	3660
DPPIV	3002	3864
GDF-15	4272	2838
IL-4	678	1460
I-TAC	757	1541
Kallikrein 3	777	3075
Leptin	1702	1059
MIF	1220	1687
MMP-9	4035	3616
ST2	2714	1293

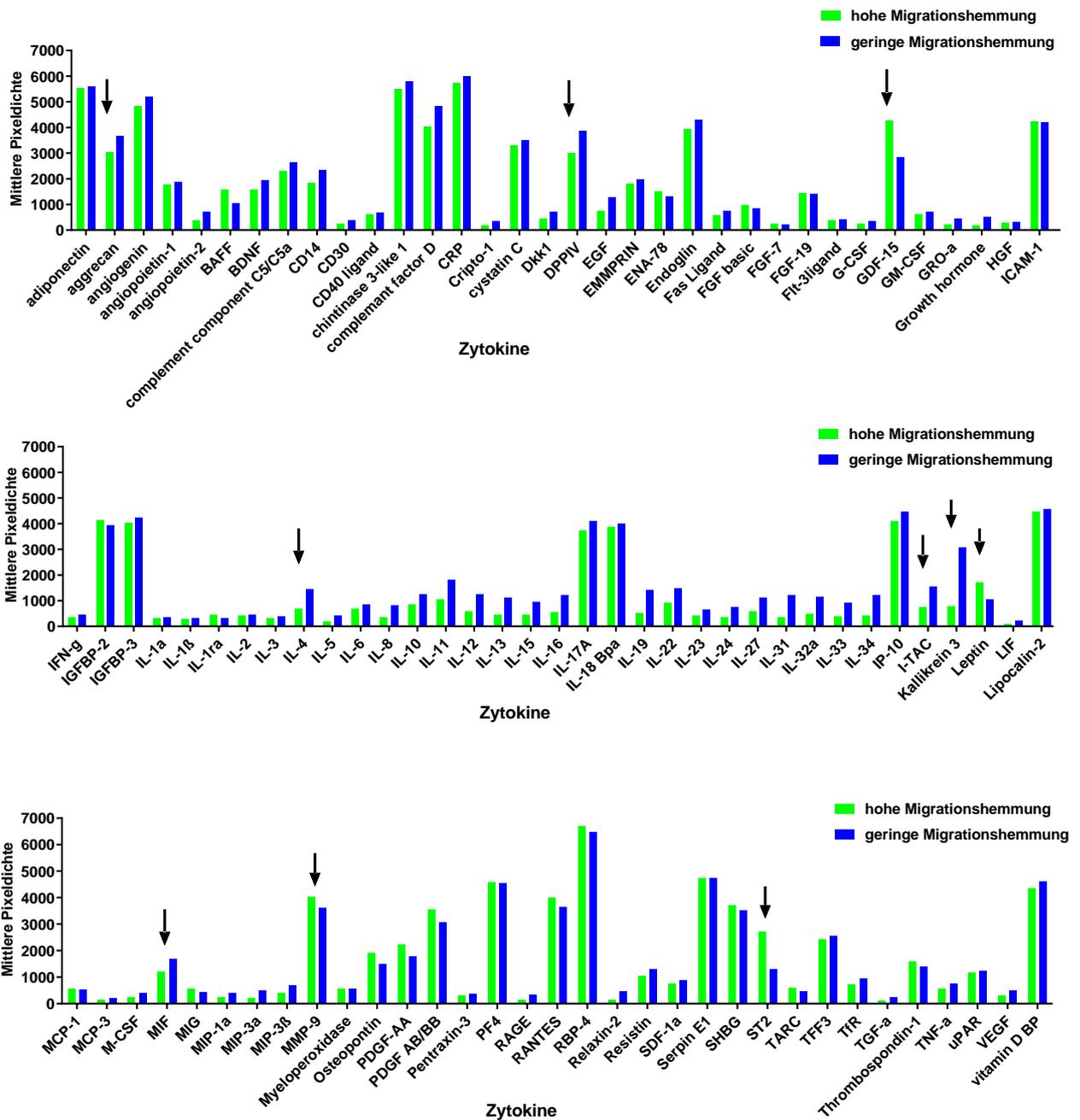


Abb. 15: Mittlere Pixeldichte von Zytokinen enthalten in Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung (Human XL Cytokine Array)

Es wurden je Gruppe jeweils 5 Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung gepoolt.

Angabe der Ergebnisse in mittlerer Pixeldichte.

Der Array war mit 102 Zytokinen in Duplikaten beladen.

3.5.2 GDF-15 ELISA

Die GDF-15 Konzentration in humanen Seren wurde mithilfe des Human GDF-15 Immunoassay, Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) bestimmt.

Es zeigte sich, dass die mittlere GDF-15 Konzentration in humanen Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit 563,29 pg/ml signifikant höher waren, als die GDF-15 Konzentration in humanen Seren gesunder Probanden, die im Mittel 275,13 pg/ml betrug ($p=0,0021$, Mann Whitney test).

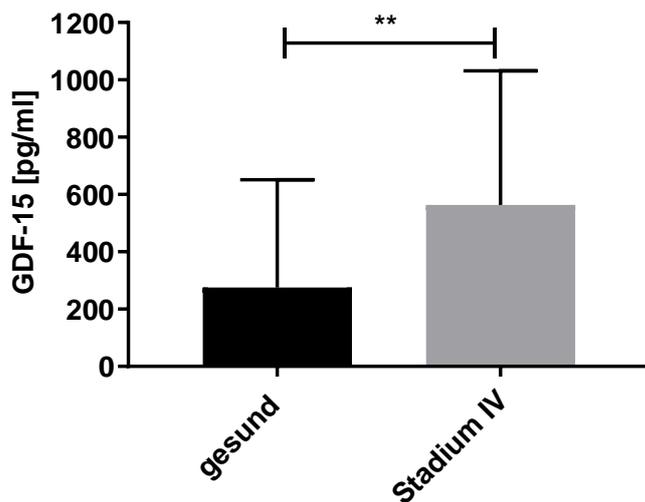


Abb. 16: GDF-15 Konzentrationen in humanen Seren (in pg/ml)

Mittlere GDF-15 Konzentration (in pg/ml) in Seren gesunder Patienten sowie in Seren von Melanompatienten im Stadium IV

Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardabweichung.

Es wurden 10 Seren gesunder Probanden sowie 30 Seren von Melanompatienten im Stadium IV verwendet. Alle Seren wurden als Doppelbestimmung analysiert. Es wurde der Human GDF-15 Immunoassay, Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet.

** $p=0,0021$ (Mann Whitney test)

Die humanen Seren von Patienten mit einem Melanom Stadium IV wurden nun nach ihrem Einfluss auf das Migrationsverhalten von BLM-Melanomzellen in zwei Gruppen unterteilt.

Eine Gruppe zeigte eine Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) um <60% und somit eine hohe Migrationshemmung.

Bei einer weiteren Gruppe betrug die Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) >60%, so dass hier eine geringe Migrationshemmung vorlag.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der GDF-15 Konzentration in humanen Seren in Abhängigkeit ihres Einflusses auf das Migrationsverhalten von BLM-Melanomzellen.

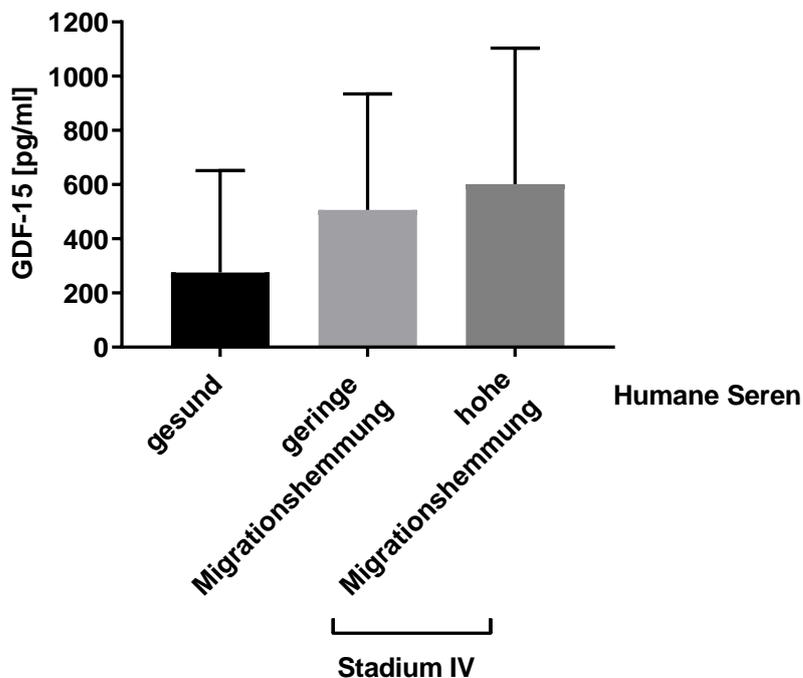


Abb. 17: GDF-15 Konzentrationen in humanen Seren (in pg/ml) mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung

Mittlere GDF-15 Konzentrationen humaner Seren gesunder Probanden sowie von Melanompatienten im Stadium IV. Die Seren der Melanompatienten wurden nach geringer (>60% bar reduction) bzw. hoher (<60% bar reduction) Migrationshemmung unterteilt. Es wurden 13 Seren mit hoher Migrationshemmung und 17 Seren mit geringer Migrationshemmung verwendet. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Migration und teilweise die Invasion von BLM- und SKMEL28 Melanomzellen durch humane Seren von Melanompatienten im Stadium IV beeinflusst werden.

Keinen Einfluss zeigten die humanen Seren jedoch auf die Zellproliferation, Zellvitalität und den Zellzyklus.

Es wurden zudem verschiedene Zytokine mit Auswirkung auf die Zellmigration untersucht. Hier habe ich mich auf die Zytokine DPPIV, MMP-9, GDF-15 und MIF und ihre bislang beschriebene Rolle in Bezug auf Zellproliferation, Zellvitalität, Zellzyklus, Invasion, Migration und Metastasierung bei malignen Erkrankungen fokussiert, deren Einfluss in der Literatur teilweise beschrieben wurde.

4.1 Auswahl der Zelllinien

Für die Versuche wurden die humanen Melanomzelllinien BLM (van Muijen, University Hospital Nijmegen, Nijmegen, Niederlande) und SKMEL28 (American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 USA) verwendet.

Die Invasionsversuche wurden zudem zusätzlich mit den humanen Melanomzelllinien MALME-3M, SKMEL2, SKMEL5, LOX IMVI und M14 (American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 USA) durchgeführt.

4.2 Migration

Es wurde das Migrationsverhalten von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen unter Einfluss von FCS, Seren gesunder Probanden sowie Seren von Melanompatienten im Stadium IV untersucht.

Es zeigte sich sowohl bei Verwendung von SKMEL28- als auch bei Verwendung von BLM-Melanomzellen eine Abnahme der Fläche des zellfreien Steges (bar reduction). Je höher die Serumkonzentration (5%, 10% und 20%) war, desto geringer fiel die Abnahme der Stegbreite aus.

Es zeigte sich, dass die Abnahme der zellfreien Stegbreite (bar reduction) im Stadium III und IV geringer war, als nach Behandlung mit Seren gesunder Probanden oder FCS. Die humanen Seren von Melanompatienten im Stadium III und IV hemmten also die Migration der BLM- und SKMEL28-Zellen.

Es zeigte sich auch eine Tendenz zu geringerer bar reduction im Stadium IV als im Stadium III, das heißt einer abnehmenden Migration von Stadium III zu Stadium IV. Dies war allerdings nicht signifikant.

Die Ergebnisse, dass die Migration nach Behandlung mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV im Vergleich zur Migration nach Behandlung mit Seren von gesunden Probanden abnahm, war unerwartet, da die Annahme war, dass humane Seren mit zunehmendem Stadium einen migrationsfördernden Effekt zeigen. Die Tendenz zu einer abnehmenden Migration von Stadium III zu Stadium IV scheint dennoch logisch, da man erwarten würde, dass sich die Effekte mit zunehmendem Stadium und Tumorlast verstärken. Zudem zeigten sich Hinweise auf konzentrationsabhängige Migrationshemmung.

Bei zwei unabhängigen Kohorten wurde ebenfalls gezeigt, dass die Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) nach Stimulation der BLM- und SKMEL28-Melanomzellen mit humanen Seren von Melanompatienten im Stadium IV signifikant niedriger war, als nach Stimulation der Zellen mit humanen Seren gesunder Probanden.

Die Melanomzellen zeigten nach Stimulation mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV eine geringere Migration als nach Behandlung mit FCS oder Seren gesunder Probanden.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der bar reduction nach Behandlung der Zellen mit FCS und der Behandlung der Zellen mit Seren gesunder Probanden. Die Migration der Melanomzellen wird somit nicht allgemein durch die Behandlung mit humanen Seren beeinflusst.

Durch die Bildung von zwei Kohorten konnte eine höhere Zahl an Probanden und eine größere Vergleichbarkeit durch zwei Versuchsansätze erreicht werden.

Da sich eine große Streuung der Werte in Bezug auf die Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) der getesteten humanen Seren von Melanompatienten im Stadium IV zeigte, wurden diese in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe 1 zeigte eine Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) von über 60% und somit eine geringe Migrationshemmung. In der Gruppe 2 betrug die Abnahme der Fläche des zellfreien Stegs (bar reduction) unter 60%, so dass eine hohe Migrationshemmung vorlag.

4.3 Zellproliferation

Die Zellproliferation von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen wurde untersucht, um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt auf die Migration der Melanomzellen auf einer veränderten Zellproliferation beruht.

Nach Inkubation mit FCS oder humanen Seren gesunder Probanden bzw. Seren von Melanompatienten im Stadium IV zeigte sich keine signifikante Veränderung der Zellzahl pro Milliliter sowohl von BLM- als auch von SKMEL28-Zellen.

Zudem zeigte sich keine signifikante Veränderung der Zahl vitaler bzw. nicht-vitaler Zellen pro Milliliter nach Behandlung von BLM- oder SKMEL28-Zellen mit Seren gesunder Probanden im Vergleich zur Zellzahl nach Behandlung der Zellen mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV.

Somit ist der Einfluss der humanen Seren von Melanompatienten im Stadium IV nicht auf eine veränderte Zellvitalität oder Zellzahl und somit eine veränderte Zellproliferation zurückzuführen.

4.3.1 DPPIV

In der Literatur wurde unter DPPIV eine proliferationshemmende Wirkung bei hohen Konzentrationen beschrieben, jedoch blieben auch manche Zelllinien unbeeinflusst.

Bei LOX- und C8161-Zellen, zwei metastatischen Melanomzelllinien, zeigte sich nach Transfektion mit DPPIV und damit einhergehenden DPPIV-Proteinspiegeln, die vergleichbar mit denen von normalen epidermalen Melanozyten waren, keine Auswirkung auf die Wachstumsraten in der Zellkultur, die Zellmorphologie oder die Koloniebildung. Die Zelllinie OM431, isoliert aus amelanotischen okulären Melanomen, zeigte nach Transfektion mit DPPIV eine reduzierte Koloniebildung. [225]

In vivo zeigten sich im Mausmodell nach Transfektion von MEL-22a und SKMEL-29 Melanomzellen mit DPPIV, vor allem bei hohen DPPIV-Werten eine Abnahme des Tumorwachstums. In vivo nahm die Koloniebildung der MEL-22a Melanomzellen ab.

Es wurden, meist bei mittlerer und hoher DPPIV-Expression, Veränderungen der Zellmorphologie beschrieben. Bei MEL-2a Melanomzellen erinnerten diese an Charakteristiken von gut-differenzierten Melanomzellen. [202] Auch SKOV3-Ovarialkarzinomzellen zeigten bei erhöhten DPPIV-Spiegeln, durch Transfektion der Zellen, eine veränderte Morphologie hin zu rundlichen Zellen mit zunehmender Zell-Zell-Adhäsion. [205]

Bei MEL-2a Zellen mit mittlerer oder hoher DPPIV-Expression zeigte sich eine deutlich längere Zeit bis die Zellen in die logarithmische Wachstumsphase eintraten, sowie eine Hemmung des Wachstums im Anschluss. Die Gesamtzahl der Zellen war bei DPPIV-Expression reduziert. Zellen mit induzierter DPPIV-Expression zeigten einen zunehmenden Verlust der Zellvitalität mit vermehrter Apoptose, die im Verlauf zeitabhängig zunahm. [202]

Nach Transfektion von SKOV3-Ovarialkarzinomzellen zeigte sich die Wachstumsrate unverändert.

Bei der Untersuchung von fünf Zelllinien (HRA, SKOV3, TAOV, NOS4, NOS2) zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der DPPIV-Expression und der Invasionsstärke der Zellen. [205]

In vivo zeigte sich nach intraperitonealer Injektion von SKDPIV-Zellen in Mäuse eine geringere Entwicklung von Tumoren, eine geringere Tumorlast bei Versterben und ein verlängertes Überleben. [205]

4.3.2 MMP-9

Unter Einfluss von MMP-9 sind in der Literatur proliferationsfördernde Wirkungen auf Tumorzellen beschrieben.

Die Überexpression von MMP-9 förderte die Zellproliferation und die Koloniebildung von Gliomzellen. [325]

Untersuchungen von zwei Zelllinien abgeleitet aus Retinoblastomen, zeigten eine signifikante Abnahme der Vitalität der metastatischen Zelllinie Y79 bei Einsatz eines MMP-Inhibitors. [326]

Ebenso führte bei Neuroblastomzellen eine Behandlung mit einem MMP-Inhibitor zu einer Reduktion des Zellwachstums mit einer reduzierten Zahl vitaler Zellen, ohne dass zunehmend tote Zellen auftraten. Die Zugabe von rekombinantem MMP-9 (rMMP-9) steigerte nicht das Zellwachstum. [327]

Nach Behandlung der DU145 Prostatakarzinomzellen mit dem MMP-9 Antisense kam es zu einer reduzierten Zellproliferation. Die Zahl der vitalen Zellen nahm ebenfalls ab. In Mäusen, denen DU145-Zellen injiziert wurde, war das Tumolvolumen nach Behandlung mit dem Inhibitor signifikant kleiner, die Tumorstadiumsrate war reduziert, das Tumorgewicht geringer. [328]

4.3.3 GDF-15

Bei GDF-15 sind sowohl proliferationsfördernde als auch proliferationshemmende Effekte auf Tumorzellen beschrieben.

Nach Zugabe von rekombinantem humanem GDF-15 zu HeLa- und SiHa-Zellen, mit ansonsten geringer GDF-15 Expression, nahm die Proliferation sowie das Zellwachstum dosisabhängig zu. Zudem nahm die Vitalität der Zellen zu. Das Ausschalten von GDF-15 in HT-3 Zellen reduzierte das Zellwachstum und die Zellvitalität.

In vivo kam es im Mausmodell bei Verwendung von HeLa und SiHa nach Transfektion der Zellen mit GDF-15 und damit einhergehender Überexpression zu deutlich größeren Tumoren mit einem höheren Volumen und stärkerem immunhistochemischen Ki67-Nachweis, als Zeichen einer erhöhten Aggressivität der Tumore. [329]

Nach Behandlung von HT1376 und T24-Zellen, Blasenkarzinomzelllinien, mit rekombinanten humanem GDF-15 (rhGDF-15) zeigte sich eine abnehmende Zellproliferation. Nach Transfektion von GDF-15 in HT1376-Zellen und somit entstehender GDF-15 Überexpression kam es zu einer Abnahme der Zellproliferation und einem langsameren Tumorwachstum in vivo im Mausmodell mit geringerer Tumorgöße. Bei T24-Zellen kam es zu einer Hemmung der Zellproliferation und Invasion in vitro. Nach Ausschalten von GDF-15 zeigte sich in vitro eine Zunahme der Invasion von HT1376-Zellen und ein rascheres Tumorwachstum und größere Tumoren in vivo. [330]

4.3.4 MIF

MIF führte bei verschiedenen Untersuchungen zu einer zunehmenden Proliferation von Tumorzellen.

Der MIF-Inhibitor 4-IPP führte bei Behandlung von SCCVII-Zellen, einer Zelllinie abgeleitet aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches, zu einer dosisabhängigen Reduktion der Zellproliferation. [331]

Eine Reduktion der MIF-Expression durch Transfektion von MIF siRNA in den Zelllinien AGS Magenkarzinomzellen, DLD1 Kolorektale Karzinomzellen führte ebenfalls zu einer reduzierten Zellproliferation. [332]

In 5 HCC-Zelllinien (BEL7402, Hep3B, Huh7, HepG2, PLC) zeigte sich eine höhere MIF und Cyclin D1 Expression als in Leberzellen (LO₂), insbesondere die MIF-Expression in PLC- und HepG2-Zellen war deutlich erhöht auch im Vergleich zu den übrigen Zelllinien.

Nach Ausschalten von MIF mittels siRNA kam es zu einer Hemmung der Zellproliferation der PLC- und HepG2-Zellen, in vivo zeigte sich im Mausmodell ein reduziertes Tumorwachstum mit reduziertem Tumolvolumen nach Behandlung mit MIF siRNA. [333]

In den Lungenkarzinomzellen der Zelllinien H460 und A549 wurde eine Überexpression von MIF gezeigt. Eine Behandlung mit MIF siRNA führte zu einer signifikant reduzierten Zellproliferation und Zunahme der Apoptose. [334]

Es wurde eine deutlich erhöhte Konzentration von MIF in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu normalem Kolongewebe gezeigt. In Mäusen mit MIF-Defizienz entwickelten sich doppelt so viele Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe, die zudem deutlich größer waren. [335]

Nach Behandlung der Zellen mit dem spezifischen MIF-Inhibitor (ISO-1) kam es zu einer reduzierten Zellproliferation der invasiven androgen-unabhängigen DU-145 Zellen, die benignen BPH-1 und die nicht-invasiven LNCaP-Zellen wurden nicht beeinflusst.

Das Blockieren der MIF-CD74 Interaktion durch anti-MIF führte zu einer Hemmung der Zellproliferation von DU-145 Zellen und zunehmender Apoptose, BPH-1 und LNCaP-Zellen zeigten keine Veränderung. Dies wurde auch durch Verwendung von MIF RNAi bestätigt. [298]

4.4 Zellzyklus

Die Versuche zum Zellzyklus wurden durchgeführt, um zu untersuchen ob die Behandlung mit FCS, humanem Serum gesunder Probanden bzw. Serum von Melanopatienten im Stadium IV Auswirkungen auf den Zellzyklus von BLM- und SKMEL28-Zellen hat.

Es zeigte sich keine signifikante Veränderung des Zellzyklus von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen nach Behandlung mit Seren gesunder Probanden bzw. Seren von Melanopatienten im Stadium IV im Vergleich zu einer Behandlung der Zellen mit FCS, insbesondere keine Veränderung der subG1-Phase.

Somit ist der Einfluss der Seren auf die Zellmigration nicht auf einen veränderten Zellzyklus mit zum Beispiel vermehrtem Zellzyklusarrest der BLM- oder SKMEL28-Zellen zurückzuführen.

4.4.1 DPPIV

Zu DPPIV liegen Berichte vor, die bei hohen Spiegeln einen hemmenden Einfluss auf den Zellzyklus beschreiben.

So zeigten Untersuchungen mit MEL-2a Melanomzellen bei hoher DPPIV-Expression, die der von normalen Melanozyten entsprach, einen Stillstand des Zellzyklus in der G0/G1 Phase. [202]

4.4.2 MMP-9

MMP-9 wurde als fördernd auf den Zellzyklus beschrieben.

Der Einsatz von MMP-Inhibitoren bei Y79-Zellen, einer metastatischen Zelllinie abgeleitet von Retinoblastomen, führte zu einer signifikant zunehmenden Zellzahl in der G0/G1-Phase. [326]

Bei Neuroblastomzellen zeigte sich eine stärkere immunhistochemische Expression von MMP-9 bei Zellen in Mitose als in ruhenden Zellen mit der höchsten Aktivität in den frühen Stadien der Mitose. MMP-Inhibitoren erhöhten die Zellzahl in der S-Phase und reduzierten diese in der G1-Phase, führten also zu einer fördernden Wirkung auf den Zellzyklus. Durch MMP-9 Inhibitoren nahm die Zellteilung ab und die Zellproliferation war beeinträchtigt. Makrophagen aus dem Knochenmark von Ratten zeigten ähnliche Ergebnisse. [327]

4.4.3 GDF-15

GDF-15 zeigte eine fördernde Wirkung auf den Progress des Zellzyklus.

Nach Behandlung von HUVEC mit rekombinantem humanen GDF-15 kam es zunehmend zum Übergang von Zellen in die S-Phase. [336]

Nach Transfektion der Zervixkarzinomzellen HeLa- und SiHa-Zellen mit GDF-15 und damit einhergehender GDF-15 Überexpression kam es zu einer abnehmenden Zellzahl in der G0/G1-Phase und einem vermehrten Übergang von Zellen in die S-Phase, so dass der Zellzyklus beschleunigt wurde. [329]

Bei den Mammakarzinomzelllinien BT474 und JIMT1 zeigte sich eine niedrige Expression von GDF-15, während MDA-MB-231 Zellen eine hohe endogene Expression zeigten. Eine Überexpression von GDF-15 in BT474-Zellen nach Transfektion führte zu einer Zunahme der Zellzahl in der S-Phase.

Zudem zeigte sich bei GDF-15 Überexpression eine veränderte Regulation von epithelialen und mesenchymalen Markern, einhergehend mit einer Veränderung des Phänotyps der Zellen hin zu einem mesenchymalen Zustand. [337]

4.4.4 MIF

MIF führte zu einem beschleunigten Fortschreiten des Zellzyklus, manche Zelllinien zeigten sich jedoch unbeeinflusst.

Nach Behandlung von SCCVII-Zellen, Plattenepithelkarzinomzellen von Kopf- und Halsplattenepithelkarzinomen, mit einem MIF-Inhibitor, kam es zu einer vermehrten Anzahl von Zellen in der G2/M-Phase. [331]

Es wurde gezeigt, dass MIF und Cyclin D1 in Proben aus HCCs überexprimiert sind. Der Zellzyklus zeigte sich nach Ausschalten von MIF unbeeinflusst, es kam aber zu einer zunehmenden Apoptose der Zellen. [333]

4.5 Invasion

Es wurde die Invasionsfähigkeit von BLM-Melanomzellen unter Einfluss von Seren gesunder Probanden bzw. Seren von Melanompatienten im Stadium IV mithilfe des 96 Well 3D Spheroid BME Cell Invasion Assay (Cultrex®, Trevigen, Gaithersburg, USA) untersucht. Die Fläche der entstandenen Zellspheroide wurde vermessen und in μm^2 angegeben sowie die Invasion ratio berechnet, indem die Fläche des Zellspheroids nach 6 Tagen durch jene nach 3 Tagen dividiert wurde.

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Invasion ratio nach Behandlung der BLM-Melanomzellen mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV im Vergleich zu den Ergebnissen nach Behandlung der Zellen mit Seren gesunder Probanden. Dies bedeutet, dass sich die Zellspheroide nach Behandlung mit Seren von Patienten im Stadium IV in gleicher Zeit stärker vergrößerten als nach Behandlung mit Seren gesunder Probanden. Dies entsprach dem erwarteten Ergebnis, da es sich bei den Tumoren im Stadium IV um invasive Tumore in einem weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium handelt.

Bei den weiteren Versuchen zur Invasionsfähigkeit wurden weitere Melanomzelllinien (BLM-, MALME-3M-, SKMEL5-, LOX IMVI-, M14-, SKMEL2-Melanomzellen) verwendet. Hierbei wurde das Verhalten der Zellen unter der Behandlung mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV, in einer Konzentration von 20%, untersucht. Die Seren waren zuvor mittels Migrationsversuchen in zwei Gruppen mit hoher oder geringer Migrationshemmung unterteilt worden.

Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Invasionsratio nach Inkubation der Melanomzellen mit Seren von Melanompatienten im Stadium IV, die sich durch eine hohe bzw. geringe Migrationshemmung auszeichnen.

4.5.1 DPPIV

DPPIV zeigte bei hoher Expression eine Hemmung der Tumorzellinvasion. Nach Transfektion von LOX und C8161-Zellen, zwei metastatischen Melanomzelllinien, mit DPPIV zeigte sich eine signifikante Reduktion der Invasion im Matrigel Invasion Assay. Die DPPIV Expression führte zu DPPIV-Proteinspiegeln, die vergleichbar mit denen von normalen epidermalen Melanozyten waren. [225]

Bei Ovarialkarzinomzellen (SKOV3, HRA, SKOV3, TAOV, NOS4, NOS2) zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der DPPIV-Expression und der Invasionsstärke der Zellen sowie mit ihrem metastatischen Potential in vivo. [205]

4.5.2 MMP-9

In der Literatur wurde beschrieben, dass MMP-9 die Tumorzellinvasion fördert. Das MMP-9 Antisense führte bei DU145 Prostatakarzinomzellen zu einer Abnahme der Zellinvasion im Matrigel-Ansatz. [328]

4.5.3 GDF-15

Zu GDF-15 finden sich in der Literatur gegensätzliche Berichte, die sowohl eine invasionsfördernde als auch eine invasionshemmende Wirkung beschreiben. Die Überexpression von GDF-15 nach Transfektion von Mammakarzinomzellen (BT474-Zellen mit pCMVmyc-GDF15) induzierte die epithelial-mesenchymale Transition, steigerte die Spiegel von MMP-2 und MMP-9 und erhöhte die Invasion der Zellen, was mittels einer Boyden chamber nachgewiesen wurde. Nach Behandlung der Zellen mit einem MMP-Inhibitor (GM6001) nahm die Invasivität der GDF-15 überexprimierenden Zellen ab.

Das Ausschalten von GDF-15 mittels siRNA führte zu einer reduzierten Mammakarzinomzellinvasion. GDF-15 führte hier in einer hohen Expression zu einer zunehmenden Tumorzellinvasion. [337]

Nach Transfektion von GDF-15 in HT1376-Zellen, abgeleitet aus metastatischen Blasenkarzinomzellen, und somit entstehender GDF-15 Überexpression kam es zu einer Abnahme der Invasion in vitro sowie einem verlangsamten Tumorwachstum im Mausmodell in vivo mit geringerer Tumorgröße. Nach Ausschalten von GDF-15 zeigte sich in vitro eine Zunahme der Invasion von HT1376-Zellen. Auch bei den T24-Zellen kam es bei GDF-15 Überexpression zu einer Hemmung der Zellproliferation und Invasion in vitro. [330] Hier zeigte sich also eine Hemmung der Invasion der Tumorzellen bei hoher GDF-15 Expression.

4.5.4 MIF

Zu MIF finden sich mehrere Berichte über eine Förderung der Tumorzellinvasion.

Nach Behandlung von invasiven androgen-unabhängige DU-145 Prostatakarzinomzellen mit einem MIF-Antikörper kam es zu einer Abnahme der Zellinvasion im Chamber Matrigel Invasion Assay. [298]

Nach Behandlung mit humanem rekombinanten MIF nahm die Invasion der Nasopharynxkarzinomzelllinien CNE-1 und CNE-2 zu, was mittels eines Transwell chamber gezeigt wurde. [338]

Mittels eines in vitro Invasion Assay (Boyden chamber) wurde gezeigt, dass eine Behandlung von SCCVII-Zellen, Plattenepithelkarzinomzellen von Kopf- und Hals-Tumoren, mit 4-IPP zu einer reduzierten Invasion führt. [331]

4.6 Seren mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung

4.6.1 Cytokine Array

Zur Analyse der Zytokine, welche in Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung enthalten sind, wurde der Human XL Cytokine Array durchgeführt. Dieser war mit 102 Zytokinen jeweils in Duplikaten beladen.

Es zeigte sich eine deutliche Abweichung der mittleren Pixeldichte von verschiedenen Zytokinen bei Seren mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung.

Im Folgenden wurde auf die Zytokine DPPIV, MMP-9, GDF-15 und MIF und ihre bislang beschriebene Rolle in Bezug auf Migration und Metastasierung bei malignen Erkrankungen fokussiert.

4.6.2 DPPIV

Im Cytokine Array zeigte sich, dass die mittlere Pixeldichte von DPPIV bei Seren mit hoher Migrationshemmung mit 3002 geringer war, als bei Seren mit geringer Migrationshemmung und einer mittleren Pixeldichte von 3864. Dies legt den Schluss nahe, dass höhere DPPIV-Spiegel mit einer verstärkten Zellmigration einhergehen und DPPIV somit eine tumorfördernde Wirkung besitzt.

Dies stimmt mit Berichten aus der Literatur überein, die die Expression von DPPIV/CD26 in Zusammenhang gebracht haben mit einer onkogenen Wirkung mit verstärkter Migration und Invasionsfähigkeit von Tumorzellen unter anderem bei Ewing-Sarkomen [234], hämatologischen Neoplasien [235, 236], malignen Mesotheliomen [237] und kolorektalen Karzinomen [238].

Patienten mit einem kolorektalen Karzinom zeigten höhere DPPIV/CD26 Serumspiegel als gesunde Probanden, insbesondere bei Vorliegen von Metastasen. [220]

Die DPPIV/CD26 Expression korrelierte positiv mit dem Tumorstadium sowie negativ mit dem Gesamtüberleben. [339] DPPIV/CD26 kann im Serum während der Nachsorge bestimmt werden, um die Tumoraggressivität zu untersuchen und Rezidive frühzeitig zu erkennen. [219] [340] DPPIV/CD26 ist auch ein Merkmal auf CD133+ kolorektalen Karzinomzellen, ein Merkmal von CSC (cancer stem cell, Krebsstammzellen). [238, 341]

Eine Zellpopulation, die vermutlich an der Metastasierung beteiligt ist, wird ebenfalls durch DPPIV gekennzeichnet. Im Tiermodell lösten DPPIV/CD26+ Zellen Lebermetastasen aus. [238] Wurden die Metastasen im Mausmodell mit dem DPPIV-Inhibitor Vidagliptin behandelt, kam es zu einem supprimierenden Effekt auf die Metastasen. [342] Zellen mit DPPIV/CD26 Expression zeigten eine verstärkte Zellmigration, Zellinvasion und Adhäsion, unter anderem an Kollagen Typ I und Fibronectin. [238] [236]

Wichtig für die Metastasierung von DPPIV/CD26+-Zellen bei kolorektalen Karzinomen scheint die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zu sein. [238]

Bei Ewing-Sarkomen wirkt DPPIV/CD26 bei verstärkter Expression tumorfördernd, indem es die Apoptose hemmt. [343] [344]

Proben aus benignem Mesothelgewebe zeigen keine DPPIV/CD26 Expression im Gegensatz zu einer hohen Expression in Geweben des malignen Mesothelioms. [345] Die Expression unterscheidet sich auch je nach histologischem Subtyp des Mesothelioms. [346]

DPPIV/CD26 konnte bei Patienten mit malignem Mesotheliom sowohl im Serum als auch in der Pleuraflüssigkeit nachgewiesen werden, so dass es eventuell in der Diagnostik der Erkrankung eingesetzt werden könnte. [222]

DPPIV/CD26 scheint die Adhäsion der Mesotheliomzellen an Fibronectin und Kollagen Typ I zu fördern. [345]

Es ist auch ein Merkmal der Krebsstammzellen (CSC) des malignen Mesothelioms, neben CD9. [347, 348]

DPPIV/CD26 und CD9 sind mit verantwortlich für die Zellproliferation, Invasion, Migration der Mesotheliomzellen und Onkogenese, was durch Versuche mit ihren Antikörpern und der Ausschaltung der entsprechenden Gene, auch in in vivo Versuchen, gezeigt wurde. [237] Ein verlängertes Überleben zeigte sich bei Einsatz eines CD26 Antikörpers bei in vivo Versuchen. [345]

Die Expression von DPPIV/CD26 korreliert mit dem Ansprechen auf eine Chemotherapie. [346]

DPPIV/CD26 ist bei verschiedenen malignen T-Zellerkrankungen ein Hinweis auf eine schlechte Prognose und ein geringes Überleben, wie etwa bei T-Lymphoblastischen Lymphomen (T-LBL). [349, 350] In vivo Versuche zeigten, dass mit einer verstärkten Expression die Invasion der Zellen zunahm und sich ein kürzeres Überleben zeigte. [235] Bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) ist DPPIV/CD26 ein Marker der leukämischen Stammzellen. Patienten mit CML unter Therapie mit Vidagliptin, einem DPPIV-Inhibitor zeigten reduzierte BCR/ABL1 Spiegel. [344]

Es wurde aber auch beschrieben, dass DPPIV/CD26 eine Rolle als Tumorsuppressor besitzt.

Entsprechende Berichte finden sich unter anderem zu Melanomen [202, 225], Gliomen [212], Neuroblastomen [228], Ovariakarzinomen [203, 229, 230], Endometriumkarzinomen [231], Prostatakarzinomen [232] und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) [233].

DPPIV/CD26 ist in Melanozyten stärker exprimiert als in Melanomzellen. [227] Während der Melanomprogression zeigte sich der Verlust der DPPIV/CD26-Expression auf RNA-Ebene. [351] Der Verlust der DPPIV/CD26 Expression machte die Zellen unabhängig von Wachstumsfaktoren. [226] Steigerte man die Expression von DPPIV/CD26 auf die höheren Spiegel von Melanozyten, reduzierte dies die Tumorigenität von humanen Melanomzelllinien. [202] Bei Ovariakarzinomen ist die DPPIV/CD26 Expression signifikant höher als in benignen Geweben. [352, 353] Zelllinien mit einer höheren DPPIV/CD26 Expression sind dabei invasiver, als Zelllinien mit einer geringeren Expression.

Das Vorhandensein von DPPIV/CD26 in Ovarialkarzinomzelllinien reduzierte signifikant die Migration und Invasion, die Injektion von DPPIV/CD26-exprimierenden Zellen reduzierte die Verbreitung von Tumoren im Mausmodell. [203]

Zellen mit DPPIV/CD26 Expression zeigten morphologische Veränderungen wie eine engere Zell-Zell-Adhäsion und eine reduzierte Expression von MMP-2 und MT1-MMP, welche mit der Invasion und Metastasierung von Zellen verbunden sind. [203, 230]

Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) zeigten eine sehr geringe Expression an DPPIV/CD26, im Vergleich zu einer hohen Expression durch normale Lungenzellen. [233, 354] Eine verstärkte Expression von DPPIV/CD26 in Tumorzellen hemmte das Zellwachstum und führte zu einer Kontakthemmung der Zellen. DPPIV/CD26 Zellen konnten zudem die Tumorigenität hemmen und wurden in Zusammenhang mit verstärkter Apoptose, einem Stillstand des Zellzyklus sowie einer reduzierten Zellmigration beschrieben. [233] DPPIV/CD26 im Serum von Patienten könnte als Instrument zur Diagnose des Lungenkarzinoms eingesetzt werden. [217]

Die Expression von DPPIV/CD26 war in Zellen des Adenokarzinoms des Endometriums geringer als normalen Endometriumzellen. Die Expression nahm mit zunehmendem Stadium weiter ab. [355]

Die Proliferationsrate nahm nach Transfektion mit DPPIV/CD26 in humanen Endometriumkarzinomzellen ab. Unter hypoxischen Bedingungen nahm die Zellmigration, Zellinvasion sowie Angiogenese bei nicht vorhandener DPPIV/CD26 Expression zu. [356]

Der DPPIV/CD26-Spiegel im Serum von Patienten mit einem metastasierten Prostatakarzinom zeigte sich geringer als bei gesunden Personen oder Patienten mit einem nicht-metastasiertem Prostatakarzinom. [221] Die DPPIV/CD26 Aktivität in Prostatakarzinomgeweben war höher als in Geweben von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) [357], signifikant erhöhte Spiegel von DPPIV und CXCR4 waren in Prostatakarzinomgeweben auch im Vergleich zu normalen Geweben feststellbar. [358]

Eine Behandlung mit DPPIV-Inhibitoren beschleunigte im Tiermodell die Tumorentwicklung. [359]

Zervixkarzinomzellen zeigen eine geringere DPPIV/CD26-Enzymaktivität, verglichen mit nicht-Tumorzelllinien. Eine geringere Expression verstärkte die Migration der Zelllinien. Der Einsatz des DPPIV-Inhibitors Sitagliptinphosphat führt zu einer zunehmenden Zellmigration und abnehmender Zelladhäsion. [214]

Zelllinien des Neuroblastoms zeigen eine sehr geringe DPPIV/CD26 Expression, im Gegensatz zu Strukturen der Neuralleiste. Die geringe Expression führt zu einer Zunahme der Metastasierung.[228] [360] Eine erhöhte Expression von DPPIV/CD26 in Neuroblastomzellen führte zu morphologischen Veränderungen, die die malignen Eigenschaften der Zellen reduzierten, wie etwa die Migration und Invasion. Als DPPIV-Inhibitor wurde Diprotin A eingesetzt, der diese Effekte teilweise aufhob. [228]

Bei Gliomen wurde gezeigt, dass die Überexpression von DPPIV/CD26 das Wachstum der Tumore hemmt. Bei einer hohen DPPIV/CD26 Expression nahm die Zellproliferation in Zellkulturen ab. [212] Die Expression von DPPIV/CD26 korrelierte positiv mit der Überlebenszeit von Patienten mit einem Gliom. [361] Die Expression von DPPIV/CD26 korrelierte invers mit der Zelladhäsion und Zellmigration. Ähnliches wurde auch für das Gliomwachstum im Mausmodell gezeigt. [212]

4.6.3 MMP-9

Im Cytokine Array zeigte sich, dass die mittlere Pixeldichte von MMP-9 bei Seren mit hoher Migrationshemmung mit 4035 höher war, als bei Seren mit geringer Migrationshemmung und einer mittleren Pixeldichte von 3616. Eine Zunahme der MMP-9 Spiegel geht hier mit einer geringeren Migration einher. Dies lässt den Schluss zu, dass ein hoher MMP-9 Spiegel eine tumorsupprimierende Wirkung hat.

In der Literatur wurde die Expression von MMP-9 als Merkmal für ein vorteilhaftes Outcome von bestimmten Patientensubgruppen beschrieben, mit einem verbesserten Gesamtüberleben oder Rezidiv-freiem Überleben [250, 287], was ein Hinweis auf eine tumorsupprimierende Wirkung sein könnte.

Meist sind hohe MMP-9 Spiegel allerdings in Zusammenhang mit tumorfördernden Wirkungen beschrieben.

Erhöhte Serumspiegel von MMP-9 wurden bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) [274], Zervixkarzinom [275-277], Ovarialkarzinom [278, 279] und Osteosarkom [280] im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet. Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) zeigten erhöhte MMP-9 Spiegel im Serum sowie im Pankreassekret. [281]

Eine erhöhte Expression zeigte sich bei Patienten mit Zervixkarzinom in immunhistochemischen Färbungen [282]. Der immunhistochemische Nachweis von MMP-9 ging bei Patienten mit Zervixkarzinom mit einer schlechteren Prognose einher. [275-277] Patienten mit einem Osteosarkom zeigten bei MMP-9 Expression eine erhöhte Mortalitätsrate während der Nachsorge. [286] Mammakarzinomzellen zeigten eine signifikant höhere MMP-9 Expression verglichen mit gesundem Mammagewebe. [283, 285] Die Expression war mit dem histologischen Subtyp verknüpft, wobei eine Überexpression meist mit triple-negativen und HER2-positiven Mammakarzinomen sowie lymphatischer Metastasierung einherging. [362]

Es zeigte sich eine Korrelation der MMP-9 und MMP-2 Expression mit lymphatischer Metastasierung und dem Tumorstadium [285] sowie eine Assoziation von MMP-9 mit aggressiven und metastasierten Mammakarzinomen, verbunden mit einer schlechten Prognose. [244, 245]

MMP-9 wird überwiegend von Tumorzellen exprimiert, seltener durch Stromazellen. Dies wurde bei Untersuchungen an Mammakarzinomzellen gezeigt. [249, 250, 285, 287] MMP-9 aus Bindegewebszellen ist dabei verbunden mit einem geringeren Rezidiv-freien Überleben. [249, 287]

Der Zusammenhang von MMP-9 aus Tumorzellen und der Prognose ist kontrovers. Die Expression von MMP-9 wird als negativer prognostischer Faktor [285, 290, 291] mit unter anderem geringerem Rezidiv-freien Überleben [248, 249], Assoziation mit Lymphknotenmetastasierung [290, 291] und Fernmetastasierung [249] beschrieben. Bei Mammakarzinomen zeigte MMP-9 einen Einfluss auf die Invasion, Metastasierung und Vaskularisierung von triple-negativen Mammakarzinomen. Ein Ausschalten von MMP-9 bei in vivo Versuchen hielt die pulmonale Metastasierung an. [266]

Auch Studien mit Mausmodellen zeigten bei Verwendung von Melanom- und Lungenkarzinomzellen sowie Implantation von MMP-9 exprimierenden Knochenmark eine tumorfördernde Wirkung der MMP-9 Expression, die unter anderem zu einer verstärkten Metastasierung führte. [288, 289]

Bei den vom Retinoblastom abgeleiteten Zelllinien Y79, als metastatische Zelllinie, und Weri-1 als nicht-metastatische Zelllinie, zeigte sich nach Zugabe eines MMP-9 Inhibitors eine signifikante Reduktion der Migration durch eine Membran bei beiden Zelllinien. Zudem zeigte sich eine reduzierte Migration der Y79-Zellen nach Hinzufügen der Inhibitoren im Wundheilungsassay. Y79-Zellen zeigten eine höhere Expression von MMP-2 und MMP-9 als Weri-1 Zellen, was vermutlich das maligne Zellverhalten verstärkt. [326]

Es wurden bereits klinische Studien mit MMP-Inhibitoren ohne überzeugende Erfolge bezüglich einer Hemmung der Metastasierung durchgeführt. Zudem kam es zu schweren Nebenwirkungen, möglicherweise durch die teilweise geringe Spezifität der Inhibitoren. [292]

4.6.4 GDF-15

Der Cytokine Array zeigte, dass die mittlere Pixeldichte von GDF-15 bei Seren mit hoher Migrationshemmung mit 4272 höher war, als bei Seren mit geringer Migrationshemmung mit einer mittleren Pixeldichte von 2838.

GDF-15 hat hier also in höherer Konzentration eine migrationshemmende Wirkung und somit mutmaßlich tumorsupprimierende Wirkung.

In der Literatur wurden bei Gliomzelllinien zelltypspezifische Wirkungen gezeigt, so dass dies die Abweichungen von den Ergebnissen dieser Arbeit erklären könnte.

Die Expression von GDF-15 ist in nicht-aggressiven Neurogliomzellen (H4) im Vergleich zu aggressiven Gliomzelllinien (SW1088, A172) erhöht. Eine Behandlung mit rhGDF-15 führte zu einer verstärkten Migration und Invasion in H4-Zellen. Der gegensätzliche Effekt zeigte sich bei den aggressiven Gliomzelllinien. Bei Zellen mit mittlerer Expression von GDF-15 zeigten sich nicht-signifikante Veränderungen.

Das Ausschalten von GDF-15 hemmte die Zellmigration von A172-Zellen, ohne Einfluss auf die H4-Zellen. [363] Nach Ausschalten der GDF-15 Genexpression zeigte sich keine Veränderung der Gliomzellebensfähigkeit, die Migration und Invasion der Zellen war jedoch reduziert. Eine Behandlung der Zellen mit rhGDF-15 verstärkte die Zellmigration und -invasion. [364]

Es sind auch tumor-supprimierende Eigenschaften von GDF-15 in Gliomzellen beschrieben. [365, 366]

In der Literatur sind meist tumorfördernde Wirkungen von GDF-15 beschrieben. Es wurde gezeigt, dass GDF-15 die Invasion und das Wachstum unter anderem bei Prostata- und Kolonkarzinomen reguliert. Ebenso wurde es bei Mamma-, Pankreaskarzinomen und Lebertumoren beschrieben. [162, 367-370]

Bei Mammakarzinomen zeigte sich ein positiver GDF-15 Score verbunden mit einem hohen Tumorgrad. [337] Bei Mammakarzinomzellen wurde in vitro gezeigt, dass das Ausschalten von RSU-1 zur Herunterregulation von GDF-15 führt und die Invasion von Tumorzellen hemmt, was durch humanes rekombinantes GDF-15 (hrGDF-15) aufgehoben werden konnte.

Dieser Mechanismus wurde durch eine Veränderung der Genexpression verschiedener Gene wie PARVA, ROCK-1, Fascin-1 begleitet, die alle an der Organisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind. [371]

Andere Untersuchungen zeigen, dass GDF-15 die Zellinvasion bei Mammakarzinomzellen vermittelt. [337] Durch die Behandlung mit GDF-15 veränderten sich die Zellen hin zu kugelförmigeren Zellen, bei sonst eher länglichen MDA-MB-231 Zellen. Es gab keine Hinweise auf eine Veränderung der Zellvitalität durch GDF-15. [371]

Erhöhte GDF-15 Spiegel wurden sowohl im Liquor als auch im Serum von Glioblastompatienten nachgewiesen. [372] [370] Die Expression variierte je nach histologischer Subgruppe. [163, 364] Hohe Spiegel zeigten sich verbunden mit einem reduzierten Überleben. [163, 364] GDF-15 unterstützt den malignen Phänotyp von Glioblastomen [163, 372] und ist an der lokalen immunsuppressiven Umgebung beteiligt. [372]

Diese Funktion wird auch durch Berichte unterstützt, die zeigen, dass GDF-15 Immunantworten gegen Hepatomzellen hemmt [373] und Myokardschäden durch eine Hemmung der Immunzellinfiltration nach einem Infarkt verhindert. [374]

BKMI20 wurde bereits in Studien mit Mausmodellen oder Phase I Studien verwendet, um Patienten mit soliden Tumoren wie Pankreas-, Kolon- oder Mamma-Karzinom und erhöhten GDF-15 Serumspiegeln zu behandeln. [153, 375-377]

GDF-15 führt ebenfalls zu verstärkter Metastasierung unter anderem von Kolonkarzinomzellen [378] und Prostatakarzinomzellen mittels RhoA [370]. Ein Rezeptor für GDF-15 ist der GDNF-family receptor a-like (GFRAL) [379, 380].

4.6.5 MIF

Die Ergebnisse des Cytokine Array zeigten, dass die mittlere Pixeldichte von MIF bei Seren mit hoher Migrationshemmung mit 1220 geringer war als bei Seren mit geringer Migrationshemmung mit 1687.

Höhere Konzentrationen von MIF scheinen also mit einer Zunahme der Migration einherzugehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit Beobachtungen aus der Literatur überein, die ebenfalls eine tumorfördernde Funktion von MIF beschreiben.

MIF ist bekannt als pro-inflammatorisches Zytokin, das in Zusammenhang mit einer verstärkten Krebsprogression sowie Entzündungsreaktionen steht [301-303] sowie an der Regulation von Zellwachstum und -überleben beteiligt ist [297, 304-306].

Eine Überexpression von MIF wurde unter anderem bei Melanomen [308] [314] [316], Lungen-, kolorektalen Karzinomen, Mamma-, Prostatakarzinomen [296-300] und bei duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) [320] [321, 322] beschrieben.

Bei Melanomen war die Expression von MIF in humanen Melanomzelllinien im Vergleich zu Melanozyten erhöht, sowohl in Bezug auf die mRNA als auch auf das Protein [308], insbesondere bei Melanomzelllinien mit starker Migration und Proliferation [315]. Bei malignen kutanen melanozytären Tumoren war die MIF RNA Expression ebenfalls signifikant höher als bei benignen Tumoren. [314] Metastasen von Melanomen zeigten eine höhere Expression als Primärtumore. [315] Im Serum von Melanompatienten war der MIF-Spiegel erhöht im Vergleich zu gesunden Probanden. [316] Die Sekretion von MIF aus Melanomzellen erfolgte nach Behandlung mit UV-Licht, was eine Variation der Expression von MIF entsprechend der Pigmentierung von Patienten und Umweltfaktoren bedeutet. [317]

Die Expression von MIF korreliert nicht mit der Prognose von Patienten mit einem primären Melanom [304], aber mit einem geringeren Gesamtüberleben und rezidivfreien Überleben bei Melanompatienten im Stadium III [318]. Höhere Spiegel von MIF gingen zudem mit einem rascheren Rezidiv bei metastasierten Melanomen einher. [319] In vivo Versuche zeigten, dass das Ausschalten von MIF im Mausmodell eine pulmonale Metastasierung von Melanomen verhindert. [310]

Bei Melanompatienten wurden im Blut zirkulierende Tumorzellen (CTCs) nachgewiesen, welche unter anderem MIF exprimieren, so dass dies zur Identifizierung von Patienten mit aggressiven Erkrankungen verwendet werden könnte. [381] Die Fusion von Makrophagen mit Tumorzellen kann zur Bildung von Melanommetastasen führen, die ebenfalls häufig MIF exprimieren. [382]

Bei Melanomzellen ist die MIF-Expression in vivo für die Angiogenese und Vaskularisierung von Tumoren verantwortlich. [308] [309]

Bei den Nasopharynxkarzinomzelllinien CNE-1 und CNE-2 wurde mittels Wundheilungsversuchen gezeigt, dass die Migration der Zellen durch die Behandlung mit humanem rekombinanten MIF zunahm. [338]

Bei duktalem Adenokarzinomen des Pankreas (PDAC) zeigte sich ebenfalls eine Überexpression von MIF [320] [321, 322] in Verbindung mit einer verstärkten Tumorprogression, Metastasierung sowie einer reduzierten Apoptose. [320] [301, 303, 321]

Ein Ausschalten der Expression führte zu einer abnehmenden Zellinvasion in vitro sowie einer zunehmenden Zellzahl in der G1-Phase. [320] Zudem ist beschrieben, dass MIF die epithelial-zu-mesenchymale Transition induziert und die Aggressivität des Tumors im Fall von PDAC steigert. [302, 303]

4.6.6 GDF-15 ELISA

Die GDF-15 Konzentration in humanen Seren wurde mithilfe des Human GDF-15 Immunoassay, Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) bestimmt.

Es zeigte sich, dass die mittlere GDF-15 Konzentration in humanen Seren von Melanompatienten im Stadium IV mit 563,29 pg/ml signifikant höher war, als die GDF-15 Konzentration in humanen Seren gesunder Probanden, die im Mittel 275,13 pg/ml betrug.

Eine erhöhte Konzentration von GDF-15 im Serum von Melanompatienten im Stadium IV wurde in der Literatur beschrieben, auch höhere Werte im Vergleich zu Patienten im Stadium II wurden beschrieben. [197, 200]

Die humanen Seren von Patienten mit einem Melanom Stadium IV wurden nun nach ihrem Einfluss auf das Migrationsverhalten von BLM-Melanomzellen in zwei Gruppen unterteilt.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der GDF-15 Konzentration in humanen Seren in Abhängigkeit ihres Einflusses auf das Migrationsverhalten von BLM-Melanomzellen.

4.7 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit zeigt, dass die Migration von BLM- und SKMEL-28 Melanomzellen sowie die Invasion von BLM-Melanomzellen durch die Behandlung mit humanen Seren beeinflusst werden.

Es wurde eine signifikante Reduktion der zellfreien Stegbreite (bar reduction) nach Behandlung der Zellen mit Seren von Melanopatienten im Stadium IV bzw. im Stadium III im Vergleich zu einer Behandlung mit Seren gesunder Probanden gezeigt, so dass die humanen Seren in fortgeschrittenem Tumorstadium die Zellmigration hemmen. Zudem zeigte sich eine signifikante Zunahme der Invasion von BLM-Zellen unter der Behandlung der Zellen mit Seren von Melanopatienten im Stadium IV im Vergleich zu einer Behandlung der Zellen mit Seren gesunder Probanden. Keinen Einfluss zeigten die humanen Seren auf die Zellzahl, Zellvitalität und Zellzyklus von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen. Die Invasion von BLM-, MALME-3M-, SKMEL5-, LOX IMVI-, M14-, SKMEL2-Melanomzellen unter Einfluss von Seren von Melanopatienten im Stadium IV in Abhängigkeit der Migrationsstärke war ebenfalls nicht signifikant verändert.

Der Cytokine Array zeigte insbesondere bei Aggrecan, DPPIV, GDF-15, IL-4, I-TAC, Kallikrein 3, Leptin, MIF, MMP-9 und ST2 Unterschiede der mittleren Pixeldichte von Seren mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung. Die GDF-15 Konzentration in humanen Seren von Melanopatienten im Stadium IV war signifikant höher als in humanen Seren gesunder Probanden, ohne Unterschiede der Konzentration in Abhängigkeit des Einflusses der humanen Seren im Stadium IV auf das Migrationsverhalten von BLM-Melanomzellen. Die gezeigten Ergebnisse sind zum Teil in der Literatur beschrieben. Es zeigen sich aber auch neue oder konträre Ergebnisse. Vergleiche mit Ergebnissen aus der Literatur sind nur eingeschränkt möglich, da hier zumeist andere Entitäten untersucht wurden. Auch in Untersuchungen zu Melanomen wurden meist andere Melanomzelllinien als in dieser Arbeit verwendet. In früheren Studien wurde zudem beschrieben, dass das Verhalten der Tumorzellen abhängig von der Zellart sein kann. [365, 366]

Der Vergleich von in vitro und in vivo Versuchen ist zudem aufgrund der sehr unterschiedlichen Versuchsgestaltung schwierig.

Zudem wurden die Migrations- und Invasionsversuche unter Einfluss von humanen Seren in der Literatur sowie die Einteilung der Seren in zwei Gruppen entsprechend ihrer Migrationshemmung im Fall von BLM-Zellen bislang nicht beschrieben, so dass hier keine Vergleiche zur Literatur möglich sind. In der Literatur wurden außerdem häufig Invasionsversuche mit Transwell Assays durchgeführt, während in dieser Arbeit ein 3D-Modell verwendet wurde, so dass aufgrund des sehr unterschiedlichen Ansatzes die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse nur eingeschränkt verglichen werden können. Die Migrationsversuche dieser Arbeit wurden im Unterschied zu vielen anderen Arbeiten mit Inserts durchgeführt, im Gegensatz zu den häufig verwendeten scratch assays, die einen Steg im Zellrasen mittels einer Pipette oder ähnlichem schaffen. Durch die Inserts kann ein Steg mit einer definierten Fläche in der Mitte der wells geschaffen werden und der entstandene Zellrasen wird nicht beschädigt, so dass eine, möglicherweise durch die Zellverletzung verursachte, Aktivierung von Signalwegen vermieden werden kann.

Diese Arbeit wurde an einer kleinen Stichprobe humaner Seren sowie größtenteils an zwei humanen Melanomzelllinien durchgeführt, weshalb es interessant wäre, die beschriebenen Versuche mit einer größeren Anzahl von Seren und Zelllinien zu wiederholen. Der Cytokine Assay wurde mit gepoolten humanen Seren durchgeführt, die auch im selben Stadium der Erkrankung eine unterschiedliche Tumorlast und dadurch ein unterschiedliches Profil an Zytokinen aufweisen können. Ein Serum war zudem irrtümlicherweise im Stadium III. Eine Wiederholung des Cytokine Assay wäre daher interessant, um eine größere Anzahl von Werten zu erheben.

Die Zytokine DPPIV, MMP-9, GDF-15 und MIF stellen interessante Faktoren dar, deren Funktion und Wirkungsweise teilweise noch kontrovers ist und deren weitere Erforschung im Hinblick auf die Migration und Metastasierung von Tumorzellen und Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten und Biomarker weiterverfolgt werden sollte.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, Faktoren in humanen Seren, die die Migration und somit die Metastasierung von Melanomzellen beeinflussen, in einem Pool von Patienten zu identifizieren, um möglicherweise in Zukunft prognostische Faktoren zu entwickeln und die Therapie des Melanoms zu verbessern.

Es wurden Serumproben von Patienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen mit einem malignen Melanom im Stadium IV und von Patienten ohne Melanom verwendet. Zudem wurden die humanen Melanomzelllinien BLM, SKMEL28, MALME-3M, SKMEL2, SKMEL5, LOX IMVI und M14 eingesetzt.

Es zeigte sich sowohl bei BLM- als auch SKMEL28-Melanomzellen eine signifikante Reduktion der zellfreien Stegbreite (bar reduction) nach Behandlung der Zellen mit Seren von Melanopatienten im Stadium IV bzw. im Stadium III im Vergleich zu einer Behandlung mit Seren gesunder Probanden. Zudem kam es zu einer signifikanten Zunahme der Invasion von BLM-Zellen unter der Behandlung der Zellen mit Seren von Melanopatienten im Stadium IV im Vergleich zu einer Behandlung der Zellen mit Seren gesunder Probanden.

Keinen Einfluss zeigten die humanen Seren auf die Zellzahl, Zellvitalität und den Zellzyklus von BLM- und SKMEL28-Melanomzellen.

Die Invasionsfähigkeit der BLM-, MALME-3M-, SKMEL5-, LOX IMVI-, M14-, SKMEL2- Melanomzellen unter Einfluss von Seren von Melanopatienten im Stadium IV, unterschieden in zwei Gruppen von Seren mit geringer und hoher Migrationshemmung bei BLM-Zellen, blieb ebenfalls unbeeinflusst.

Der Cytokine Array zeigte insbesondere bei den Zytokinen Aggrecan, DPPIV, GDF-15, IL-4, I-TAC, Kallikrein 3, Leptin, MIF, MMP-9 und ST2 eine deutliche Abweichung der mittleren Pixeldichte zwischen Seren mit geringer bzw. hoher Migrationshemmung.

In dieser Arbeit fokussierte man sich auf die Zytokine DPPIV, MMP-9, GDF-15 und MIF.

Es zeigte sich eine geringere mittlere Pixeldichte von DPPIV bei Seren mit hoher Migrationshemmung als bei Seren mit geringer Migrationshemmung. Höhere DPPIV-Spiegel führten in dieser Arbeit zu einer verstärkten Zellmigration.

Ein hoher MMP-9 Spiegel ging mit einer reduzierten Zellmigration einher. GDF-15 hatte hier in höherer Konzentration eine migrationshemmende Wirkung während höhere Konzentrationen von MIF mit einer Zunahme der Zellmigration einhergingen.

Im GDF-15 ELISA war die mittlere GDF-15 Konzentration in humanen Seren von Melanompatienten im Stadium IV signifikant höher als die GDF-15 Konzentration in humanen Seren gesunder Probanden. Kein signifikanter Unterschied der GDF-15 Konzentration zeigte sich zwischen Seren mit hoher und geringer Migrationshemmung.

Die Migrationsversuche dieser Arbeit wurden mit Inserts durchgeführt, die im Gegensatz zu den häufiger verwendeten scratch assays, welche eine Lücke in einem Zellrasen mittels einer Pipette schaffen, den Zellrasen nicht beschädigen und so möglicherweise Signalwege aktivieren und zudem eine definierte zellfreie Fläche generieren.

Da diese Arbeit eine kleine Stichprobe an humanen Seren betrachtet, wäre die Durchführung der Versuche an einer größeren Stichprobe interessant. Zudem wurden die Migrations- oder Invasionsversuche mit humanen Seren in dieser Form bislang nicht beschrieben.

Es wurden außerdem meist andere Entitäten oder Melanomzelllinien verwendet, so dass Entität- oder zellspezifische Unterschiede nicht ausgeschlossen werden können.

Daher wäre es interessant, die Versuche dieser Arbeit mit weiteren Zelllinien durchzuführen.

Bei den untersuchten Zytokinen DPPIV, MMP-9, GDF-15 und MIF handelt es sich um spannende Faktoren, deren Einfluss auf die Metastasierung und Prognose von Melanomen und anderen Malignomen weiterverfolgt werden sollte, um neue Therapieansätze zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

Im aktuellen Dokument sind keine Quellen vorhanden.

1. Garbe, C., et al., *Short German guidelines: malignant melanoma*. J Dtsch Dermatol Ges, 2008. **6 Suppl 1**: p. S9-s14.
2. Clark, W.H., Jr., et al., *The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin*. Cancer Res, 1969. **29**(3): p. 705-27.
3. Mahendraraj, K., et al., *Malignant Melanoma in African-Americans: A Population-Based Clinical Outcomes Study Involving 1106 African-American Patients from the Surveillance, Epidemiology, and End Result (SEER) Database (1988-2011)*. Medicine (Baltimore), 2017. **96**(15): p. e6258.
4. Garbe, C. and A. Blum, *Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2001. **14**(5): p. 280-90.
5. Collins, R.J., *Melanoma in the Chinese of Hong Kong. Emphasis on volar and subungual sites*. Cancer, 1984. **54**(7): p. 1482-8.
6. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland 2007/2008*. 2012, Robert Koch-Institut. p. 136.
7. Moehrle, M. and C. Garbe, *Does mountaineering increase the incidence of cutaneous melanoma? A hypothesis based on cancer registry data*. Dermatology, 1999. **199**(3): p. 201-3.
8. Katalinic, A., U. Kunze, and T. Schafer, *Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer)*. Br J Dermatol, 2003. **149**(6): p. 1200-6.
9. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015, Robert Koch-Institut. p. 156.
10. Rager, E.L., E.P. Bridgeford, and D.W. Ollila, *Cutaneous melanoma: update on prevention, screening, diagnosis, and treatment*. Am Fam Physician, 2005. **72**(2): p. 269-76.
11. Brochez, L. and J.M. Naeyaert, *Understanding the trends in melanoma incidence and mortality: where do we stand? Eur J Dermatol*, 2000. **10**(1): p. 71-5; quiz 76.
12. Elwood, J.M., *Screening for melanoma and options for its evaluation [see comment]*. J Med Screen, 1994. **1**(1): p. 22-38.
13. Breitbart, E.W., et al., *Systematic skin cancer screening in Northern Germany*. J Am Acad Dermatol, 2012. **66**(2): p. 201-11.
14. Koch-Institut, R. and G.d.e.K.i.D. e.V., *Krebs in Deutschland 2015/2016*. 2019.
15. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure*. Eur J Cancer, 2005. **41**(1): p. 45-60.
16. Elwood, J.M., et al., *Etiological differences between subtypes of cutaneous malignant melanoma: Western Canada Melanoma Study*. J Natl Cancer Inst, 1987. **78**(1): p. 37-44.
17. *The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review*. Int J Cancer, 2007. **120**(5): p. 1116-22.
18. Stern, R.S., *The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA*. J Am Acad Dermatol, 2001. **44**(5): p. 755-61.
19. Pflugfelder, A., et al., *Malignant melanoma S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma"*. J Dtsch Dermatol Ges, 2013. **11 Suppl 6**: p. 1-116, 1-126.
20. Bevona, C., et al., *Cutaneous melanomas associated with nevi*. Arch Dermatol, 2003. **139**(12): p. 1620-4; discussion 1624.
21. Breitbart, M., et al., *Ultraviolet light exposure, pigmentary traits and the development of melanocytic naevi and cutaneous melanoma. A case-control study of the German Central Malignant Melanoma Registry*. Acta Derm Venereol, 1997. **77**(5): p. 374-8.
22. Garbe, C., et al., *Associated factors in the prevalence of more than 50 common melanocytic nevi, atypical melanocytic nevi, and actinic lentiginos: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(5): p. 700-5.
23. Clark, W.H., Jr., et al., *A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma*. Hum Pathol, 1984. **15**(12): p. 1147-65.

24. Kruger, S., et al., *Epidemiologic evidence for the role of melanocytic nevi as risk markers and direct precursors of cutaneous malignant melanoma. Results of a case control study in melanoma patients and nonmelanoma control subjects.* J Am Acad Dermatol, 1992. **26**(6): p. 920-6.
25. Halpern, A.C., et al., *Dysplastic nevi as risk markers of sporadic (nonfamilial) melanoma. A case-control study.* Arch Dermatol, 1991. **127**(7): p. 995-9.
26. Grob, J.J., et al., *Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma.* Cancer, 1990. **66**(2): p. 387-95.
27. Holly, E.A., et al., *Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma.* J Am Acad Dermatol, 1987. **17**(3): p. 459-68.
28. Watt, A.J., S.V. Kotsis, and K.C. Chung, *Risk of melanoma arising in large congenital melanocytic nevi: a systematic review.* Plast Reconstr Surg, 2004. **113**(7): p. 1968-74.
29. Markovic, S.N., et al., *Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis.* Mayo Clin Proc, 2007. **82**(3): p. 364-80.
30. Titus-Ernstoff, L., et al., *Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk.* Int J Cancer, 2005. **116**(1): p. 144-9.
31. Rigel, D.S. and J.A. Carucci, *Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century.* CA Cancer J Clin, 2000. **50**(4): p. 215-36; quiz 237-40.
32. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors.* Eur J Cancer, 2005. **41**(14): p. 2040-59.
33. Rigel, D.S., J. Russak, and R. Friedman, *The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs.* CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 301-16.
34. Robinson, J.K. and R. Turrisi, *Skills training to learn discrimination of ABCDE criteria by those at risk of developing melanoma.* Arch Dermatol, 2006. **142**(4): p. 447-52.
35. Friedman, R.J., D.S. Rigel, and A.W. Kopf, *Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin.* CA Cancer J Clin, 1985. **35**(3): p. 130-51.
36. MacKie, R.M., *Clinical recognition of early invasive malignant melanoma.* Bmj, 1990. **301**(6759): p. 1005-6.
37. Scope, A., et al., *The "ugly duckling" sign: agreement between observers.* Arch Dermatol, 2008. **144**(1): p. 58-64.
38. Neila, J. and H.P. Soyer, *Key points in dermoscopy for diagnosis of melanomas, including difficult to diagnose melanomas, on the trunk and extremities.* J Dermatol, 2011. **38**(1): p. 3-9.
39. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification.* J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
40. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM.* Ann Surg Oncol, 2010. **17**(6): p. 1471-4.
41. Gershenwald, J.E. and R.A. Scolyer, *Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond.* Ann Surg Oncol, 2018. **25**(8): p. 2105-2110.
42. Gershenwald, J.E., et al., *Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual.* CA Cancer J Clin, 2017. **67**(6): p. 472-492.
43. Garbe, C., et al., *Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients.* Cancer, 1995. **75**(10): p. 2484-91.
44. Leiter, U. and C. Garbe, *Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight.* Adv Exp Med Biol, 2008. **624**: p. 89-103.
45. Eigentler, T.K., et al., *Impact of ulceration in stages I to III cutaneous melanoma as staged by the American Joint Committee on Cancer Staging System: an analysis of the German Central Malignant Melanoma Registry.* J Clin Oncol, 2004. **22**(21): p. 4376-83.
46. Balch, C.M., et al., *The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma.* Cancer, 1980. **45**(12): p. 3012-7.
47. In 't Hout, F.E., et al., *Prognostic importance of the extent of ulceration in patients with clinically localized cutaneous melanoma.* Ann Surg, 2012. **255**(6): p. 1165-70.

48. Duncan, L.M., *The classification of cutaneous melanoma*. Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(3): p. 501-13, ix.
49. Rastrelli, M., et al., *Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification*. In Vivo, 2014. **28**(6): p. 1005-11.
50. Sladden, M.J., et al., *Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(4): p. Cd004835.
51. Valsecchi, M.E., et al., *Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in patients with melanoma: a meta-analysis*. J Clin Oncol, 2011. **29**(11): p. 1479-87.
52. Kunte, C., et al., *Prognostic factors associated with sentinel lymph node positivity and effect of sentinel status on survival: an analysis of 1049 patients with cutaneous melanoma*. Melanoma Res, 2010. **20**(4): p. 330-7.
53. Sondak, V.K., et al., *Evidence-based clinical practice guidelines on the use of sentinel lymph node biopsy in melanoma*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2013.
54. Morton, D.L., et al., *Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic*. Ann Surg, 1991. **214**(4): p. 491-9; discussion 499-501.
55. Agrawal, S., et al., *The benefits of adjuvant radiation therapy after therapeutic lymphadenectomy for clinically advanced, high-risk, lymph node-metastatic melanoma*. Cancer, 2009. **115**(24): p. 5836-44.
56. Bibault, J.E., et al., *Adjuvant radiation therapy in metastatic lymph nodes from melanoma*. Radiat Oncol, 2011. **6**: p. 12.
57. Henderson, M.A., et al., *Adjuvant lymph-node field radiotherapy versus observation only in patients with melanoma at high risk of further lymph-node field relapse after lymphadenectomy (ANZMTG 01.02/TROG 02.01): 6-year follow-up of a phase 3, randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(9): p. 1049-1060.
58. Pehamberger, H., et al., *Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma*. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. J Clin Oncol, 1998. **16**(4): p. 1425-9.
59. Grob, J.J., et al., *Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases*. French Cooperative Group on Melanoma. Lancet, 1998. **351**(9120): p. 1905-10.
60. Garbe, C., et al., *Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects*. Oncologist, 2011. **16**(1): p. 5-24.
61. Mocellin, S., et al., *Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(7): p. 493-501.
62. van der Zee, J. and J. Overgaard, *Hyperthermia classic commentary: 'Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology' by J. Overgaard, D. Gonzalez Gonzalez, M.C.C.H. Hulshof, G. Arcangeli, O. Dahl, O. Mella & S.M. Bentzen, International Journal of Hyperthermia 1996;12:3-20*. Int J Hyperthermia, 2009. **25**(5): p. 335-7.
63. Chadha, M., et al., *Role of brachytherapy in malignant melanoma: a preliminary report*. J Surg Oncol, 1990. **43**(4): p. 223-7.
64. Spratt, D.E., et al., *Efficacy of skin-directed therapy for cutaneous metastases from advanced cancer: a meta-analysis*. J Clin Oncol, 2014. **32**(28): p. 3144-55.
65. Mali, B., et al., *Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: a systematic review and meta-analysis*. Eur J Surg Oncol, 2013. **39**(1): p. 4-16.
66. Byrne, C.M., et al., *Treatment of metastatic melanoma using electroporation therapy with bleomycin (electrochemotherapy)*. Melanoma Res, 2005. **15**(1): p. 45-51.
67. Weide, B., et al., *High response rate after intratumoral treatment with interleukin-2: results from a phase 2 study in 51 patients with metastasized melanoma*. Cancer, 2010. **116**(17): p. 4139-46.
68. Sersa, G., et al., *Electrochemotherapy with cisplatin: clinical experience in malignant melanoma patients*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(3): p. 863-7.

69. Brand, C.U., et al., *Prolonged survival of 2 years or longer for patients with disseminated melanoma. An analysis of related prognostic factors.* Cancer, 1997. **79**(12): p. 2345-53.
70. Leo, F., et al., *Lung metastases from melanoma: when is surgical treatment warranted?* Br J Cancer, 2000. **83**(5): p. 569-72.
71. Sanki, A., R.A. Scolyer, and J.F. Thompson, *Surgery for melanoma metastases of the gastrointestinal tract: indications and results.* Eur J Surg Oncol, 2009. **35**(3): p. 313-9.
72. Robert, C., et al., *Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib.* N Engl J Med, 2015. **372**(1): p. 30-9.
73. Long, G.V., et al., *Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial.* Lancet, 2015. **386**(9992): p. 444-51.
74. Larkin, J., et al., *Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma.* N Engl J Med, 2014. **371**(20): p. 1867-76.
75. Long, G.V., et al., *Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma.* N Engl J Med, 2014. **371**(20): p. 1877-88.
76. Ugurel, S., et al., *Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies-update 2017.* Eur J Cancer, 2017. **83**: p. 247-257.
77. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer.* Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
78. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.* N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
79. Larkin, J., F.S. Hodi, and J.D. Wolchok, *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma.* N Engl J Med, 2015. **373**(13): p. 1270-1.
80. Robert, C., et al., *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation.* N Engl J Med, 2015. **372**(4): p. 320-30.
81. Robert, C., et al., *Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma.* N Engl J Med, 2015. **372**(26): p. 2521-32.
82. Robert, C., et al., *Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study.* Lancet Oncol, 2019. **20**(9): p. 1239-1251.
83. Hauschild, A., et al., *Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial.* Lancet, 2012. **380**(9839): p. 358-65.
84. Flaherty, K.T., et al., *Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma.* N Engl J Med, 2012. **367**(2): p. 107-14.
85. Robert, C., et al., *Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma.* N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2517-26.
86. McDermott, D.F., et al., *Double-blind randomized phase II study of the combination of sorafenib and dacarbazine in patients with advanced melanoma: a report from the 11715 Study Group.* J Clin Oncol, 2008. **26**(13): p. 2178-85.
87. Friedl, P. and E.B. Brocker, *The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix.* Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(1): p. 41-64.
88. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.* Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
89. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process.* Cell, 1996. **84**(3): p. 359-69.
90. Alper, O., et al., *Epidermal growth factor receptor signaling and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells.* J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(18): p. 1375-84.
91. Bissell, M.J., et al., *The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast.* Differentiation, 2002. **70**(9-10): p. 537-46.
92. Paszek, M.J., et al., *Tensional homeostasis and the malignant phenotype.* Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 241-54.
93. Alenghat, F.J. and D.E. Ingber, *Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins.* Sci STKE, 2002. **2002**(119): p. pe6.
94. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-74.
95. Friedl, P. and K. Wolf, *Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion.* Cancer Res, 2008. **68**(18): p. 7247-9.

96. Lee, S., et al., *Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors*. J Cell Biol, 2005. **169**(4): p. 681-91.
97. Fleury, M.E., K.C. Boardman, and M.A. Swartz, *Autologous morphogen gradients by subtle interstitial flow and matrix interactions*. Biophys J, 2006. **91**(1): p. 113-21.
98. Mu, D., et al., *The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1*. J Cell Biol, 2002. **157**(3): p. 493-507.
99. Sappino, A.P., et al., *Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues*. Int J Cancer, 1988. **41**(5): p. 707-12.
100. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
101. Pollard, J.W., *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 71-8.
102. Provenzano, P.P., et al., *Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion*. BMC Med, 2006. **4**(1): p. 38.
103. Wang, W., et al., *Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling*. Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 6278-88.
104. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
105. Li, H., X. Fan, and J. Houghton, *Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 805-15.
106. Swartz, M.A. and M.E. Fleury, *Interstitial flow and its effects in soft tissues*. Annu Rev Biomed Eng, 2007. **9**: p. 229-56.
107. Jain, R.K., *Transport of molecules in the tumor interstitium: a review*. Cancer Res, 1987. **47**(12): p. 3039-51.
108. Ng, C.P., B. Hinz, and M.A. Swartz, *Interstitial fluid flow induces myofibroblast differentiation and collagen alignment in vitro*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 20): p. 4731-9.
109. Shi, Z.D., et al., *Interstitial flow promotes vascular fibroblast, myofibroblast, and smooth muscle cell motility in 3-D collagen I via upregulation of MMP-1*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(4): p. H1225-34.
110. Moissoglu, K. and M.A. Schwartz, *Integrin signalling in directed cell migration*. Biol Cell, 2006. **98**(9): p. 547-55.
111. Levental, K.R., et al., *Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling*. Cell, 2009. **139**(5): p. 891-906.
112. Itoh, K., et al., *An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells*. Nat Med, 1999. **5**(2): p. 221-5.
113. Clark, E.A., et al., *Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC*. Nature, 2000. **406**(6795): p. 532-5.
114. Sahai, E., M.F. Olson, and C.J. Marshall, *Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility*. Embo j, 2001. **20**(4): p. 755-66.
115. Kaneko, K., et al., *Myosin light chain kinase inhibitors can block invasion and adhesion of human pancreatic cancer cell lines*. Pancreas, 2002. **24**(1): p. 34-41.
116. Brooks, P.C., et al., *Insulin-like growth factor receptor cooperates with integrin alpha v beta 5 to promote tumor cell dissemination in vivo*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1390-8.
117. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
118. Yumura, S., H. Mori, and Y. Fukui, *Localization of actin and myosin for the study of ameboid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence*. J Cell Biol, 1984. **99**(3): p. 894-9.
119. Tester, A.M., et al., *MMP-9 secretion and MMP-2 activation distinguish invasive and metastatic sublines of a mouse mammary carcinoma system showing epithelial-mesenchymal transition traits*. Clin Exp Metastasis, 2000. **18**(7): p. 553-60.
120. Polette, M., et al., *Association of fibroblastoid features with the invasive phenotype in human bronchial cancer cell lines*. Clin Exp Metastasis, 1998. **16**(2): p. 105-12.
121. El Fahime, E., et al., *In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity*. Exp Cell Res, 2000. **258**(2): p. 279-87.

122. Jacques, T.S., et al., *Neural precursor cell chain migration and division are regulated through different beta1 integrins*. *Development*, 1998. **125**(16): p. 3167-77.
123. Davidson, L.A. and R.E. Keller, *Neural tube closure in Xenopus laevis involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension*. *Development*, 1999. **126**(20): p. 4547-56.
124. Friedl, P., et al., *Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro*. *Cancer Res*, 1995. **55**(20): p. 4557-60.
125. Wolf, K., et al., *Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis*. *J Cell Biol*, 2003. **160**(2): p. 267-77.
126. Boyle, G.M., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 is overexpressed in malignant melanoma and is associated with tumorigenicity*. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(2): p. 383-91.
127. Zimmers, T.A., et al., *Growth differentiation factor-15: induction in liver injury through p53 and tumor necrosis factor-independent mechanisms*. *J Surg Res*, 2006. **130**(1): p. 45-51.
128. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. *Cell*, 2008. **134**(2): p. 215-30.
129. Bootcov, M.R., et al., *MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(21): p. 11514-9.
130. Li, P.X., et al., *Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(26): p. 20127-35.
131. Paralkar, V.M., et al., *Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(22): p. 13760-7.
132. Bottner, M., et al., *Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues*. *Cell Tissue Res*, 1999. **297**(1): p. 103-10.
133. Hromas, R., et al., *PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1354**(1): p. 40-4.
134. Barone, G., et al., *MDM2-p53 interaction in paediatric solid tumours: preclinical rationale, biomarkers and resistance*. *Curr Drug Targets*, 2014. **15**(1): p. 114-23.
135. Moore, A.G., et al., *The transforming growth factor-ss superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(12): p. 4781-8.
136. Bottner, M., et al., *Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1)*. *Gene*, 1999. **237**(1): p. 105-11.
137. Breit, S.N., et al., *The TGF-beta superfamily cytokine, MIC-1/GDF15: a pleiotrophic cytokine with roles in inflammation, cancer and metabolism*. *Growth Factors*, 2011. **29**(5): p. 187-95.
138. Wang, X., S.J. Baek, and T.E. Eling, *The diverse roles of nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene (NAG-1/GDF15) in cancer*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **85**(5): p. 597-606.
139. Brown, D.A., et al., *Antibody-based approach to high-volume genotyping for MIC-1 polymorphism*. *Biotechniques*, 2002. **33**(1): p. 118-20, 122, 124 passim.
140. Yamashita, T., A. Yoneta, and T. Hida, *Macrophage inhibitory cytokine-1: a new player in melanoma development*. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(2): p. 262-4.
141. Albertoni, M., et al., *Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1*. *Oncogene*, 2002. **21**(27): p. 4212-9.
142. Lee, D.H., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system*. *Cancer Res*, 2003. **63**(15): p. 4648-55.
143. Bauskin, A.R., et al., *Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(10): p. 4983-6.
144. Fairlie, W.D., et al., *MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation*. *J Leukoc Biol*, 1999. **65**(1): p. 2-5.

145. Hsiao, E.C., et al., *Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(10): p. 3742-51.
146. Eling, T.E., et al., *NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis*. J Biochem Mol Biol, 2006. **39**(6): p. 649-55.
147. Buckhaults, P., et al., *Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 6996-7001.
148. Brown, D.A., et al., *MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(7): p. 2642-50.
149. Baek, K.E., et al., *Upregulation and secretion of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in gastric cancers*. Clin Chim Acta, 2009. **401**(1-2): p. 128-33.
150. Brown, D.A., et al., *Macrophage inhibitory cytokine 1: a new prognostic marker in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(21): p. 6658-64.
151. Kadara, H., et al., *Induction of GDF-15/NAG-1/MIC-1 in human lung carcinoma cells by retinoid-related molecules and assessment of its role in apoptosis*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(5): p. 518-22.
152. Youns, M., T. Efferth, and J.D. Hoheisel, *Transcript profiling identifies novel key players mediating the growth inhibitory effect of NS-398 on human pancreatic cancer cells*. Eur J Pharmacol, 2011. **650**(1): p. 170-7.
153. Mimeault, M. and S.K. Batra, *Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer*. J Cell Physiol, 2010. **224**(3): p. 626-35.
154. Koopmann, J., et al., *Serum markers in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma: macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA19-9*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(2): p. 442-6.
155. Welsh, J.B., et al., *Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(16): p. 5974-8.
156. Welsh, J.B., et al., *Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3410-5.
157. Koopmann, J., et al., *Serum macrophage inhibitory cytokine 1 as a marker of pancreatic and other periampullary cancers*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(7): p. 2386-92.
158. Yang, G., et al., *Variations in NAG-1 expression of human gastric carcinoma and normal gastric tissues*. Exp Ther Med, 2014. **7**(1): p. 241-245.
159. Liu, T., et al., *Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(16): p. 5034-40.
160. Park, J.Y., et al., *Expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 (NAG-1) inversely correlates with tumor progression in gastric adenomas and carcinomas*. J Cancer Res Clin Oncol, 2008. **134**(9): p. 1029-35.
161. Blanco-Calvo, M., et al., *Circulating levels of GDF15, MMP7 and miR-200c as a poor prognostic signature in gastric cancer*. Future Oncol, 2014. **10**(7): p. 1187-202.
162. Wallin, U., et al., *Growth differentiation factor 15: a prognostic marker for recurrence in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2011. **104**(10): p. 1619-27.
163. Shnaper, S., et al., *Elevated levels of MIC-1/GDF15 in the cerebrospinal fluid of patients are associated with glioblastoma and worse outcome*. Int J Cancer, 2009. **125**(11): p. 2624-30.
164. Zhang, L., et al., *Expression of growth differentiation factor 15 is positively correlated with histopathological malignant grade and in vitro cell proliferation in oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2009. **45**(7): p. 627-32.
165. Kaur, S., et al., *Potentials of plasma NGAL and MIC-1 as biomarker(s) in the diagnosis of lethal pancreatic cancer*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55171.
166. Mehta, R.S., et al., *A prospective study of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) and risk of colorectal cancer*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(4): p. dju016.
167. Baek, S.J., et al., *Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(4): p. 901-8.
168. Ferrari, N., et al., *The transforming growth factor-beta family members bone morphogenetic protein-2 and macrophage inhibitory cytokine-1 as mediators of the*

- antiangiogenic activity of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(12): p. 4610-9.
169. Mimeault, M., S.L. Johansson, and S.K. Batra, *Marked improvement of cytotoxic effects induced by docetaxel on highly metastatic and androgen-independent prostate cancer cells by downregulating macrophage inhibitory cytokine-1*. Br J Cancer, 2013. **108**(5): p. 1079-91.
170. Staff, A.C., et al., *Elevated plasma growth differentiation factor-15 correlates with lymph node metastases and poor survival in endometrial cancer*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(14): p. 4825-33.
171. Wang, X., et al., *Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1/GDF15) as a novel diagnostic serum biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 578.
172. Staff, A.C., et al., *Growth differentiation factor-15 as a prognostic biomarker in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2010. **118**(3): p. 237-43.
173. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 9-29.
174. Yang, C.Z., et al., *GDF15 is a potential predictive biomarker for TPF induction chemotherapy and promotes tumorigenesis and progression in oral squamous cell carcinoma*. Ann Oncol, 2014. **25**(6): p. 1215-22.
175. Zhang, Y., et al., *Elevated growth differentiation factor 15 expression predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients*. Tumour Biol, 2016. **37**(7): p. 9423-31.
176. Mehta, R.S., et al., *Association Between Plasma Levels of Macrophage Inhibitory Cytokine-1 Before Diagnosis of Colorectal Cancer and Mortality*. Gastroenterology, 2015. **149**(3): p. 614-22.
177. Xue, H., et al., *Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach*. J Proteome Res, 2010. **9**(1): p. 545-55.
178. Barderas, R., et al., *In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(6): p. 1602-20.
179. Bauskin, A.R., et al., *The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome*. Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2330-6.
180. Selander, K.S., et al., *Serum macrophage inhibitory cytokine-1 concentrations correlate with the presence of prostate cancer bone metastases*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(3): p. 532-7.
181. Husaini, Y., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) slows cancer development but increases metastases in TRAMP prostate cancer prone mice*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43833.
182. Unsicker, K., B. Spittau, and K. Kriegelstein, *The multiple facets of the TGF-beta family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1*. Cytokine Growth Factor Rev, 2013. **24**(4): p. 373-84.
183. Ago, T. and J. Sadoshima, *GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein*. Circ Res, 2006. **98**(3): p. 294-7.
184. Brown, D.A., et al., *Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study*. Lancet, 2002. **359**(9324): p. 2159-63.
185. Detmer, K., et al., *Lineage-restricted expression of bone morphogenetic protein genes in human hematopoietic cell lines*. Blood Cells Mol Dis, 1999. **25**(5-6): p. 310-23.
186. Strelau, J., et al., *Growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 is a novel trophic factor for midbrain dopaminergic neurons in vivo*. J Neurosci, 2000. **20**(23): p. 8597-603.
187. Johnen, H., et al., *Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1333-40.
188. Reed, J.A., et al., *Expression of transforming growth factor-beta 2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion. Implications for tumor progression*. Am J Pathol, 1994. **145**(1): p. 97-104.
189. Rothhammer, T., et al., *Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration*. Cancer Res, 2005. **65**(2): p. 448-56.
190. Derynck, R., R.J. Akhurst, and A. Balmain, *TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression*. Nat Genet, 2001. **29**(2): p. 117-29.

191. Krasagakis, K., et al., *Desensitization of melanoma cells to autocrine TGF-beta isoforms*. J Cell Physiol, 1999. **178**(2): p. 179-87.
192. Berking, C., et al., *Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling*. Cancer Res, 2001. **61**(22): p. 8306-16.
193. Riker, A.I., et al., *The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis*. BMC Med Genomics, 2008. **1**: p. 13.
194. Talantov, D., et al., *Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(20): p. 7234-42.
195. Mauerer, A., et al., *Identification of new genes associated with melanoma*. Exp Dermatol, 2011. **20**(6): p. 502-7.
196. Huh, S.J., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 regulates melanoma vascular development*. Am J Pathol, 2010. **176**(6): p. 2948-57.
197. Weide, B., et al., *High GDF-15 Serum Levels Independently Correlate with Poorer Overall Survival of Patients with Tumor-Free Stage III and Unresectable Stage IV Melanoma*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(12): p. 2444-2452.
198. McLoughlin, J.M., et al., *Treatment options for limited or symptomatic metastatic melanoma*. Cancer Control, 2008. **15**(3): p. 239-47.
199. Mosca, P.J., et al., *Can surgeons improve survival in stage IV melanoma?* J Surg Oncol, 2008. **97**(5): p. 462-8.
200. Kluger, H.M., et al., *Plasma markers for identifying patients with metastatic melanoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(8): p. 2417-25.
201. Beckenkamp, A., et al., *DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy?* Tumour Biol, 2016. **37**(6): p. 7059-73.
202. Wesley, U.V., et al., *A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells*. J Exp Med, 1999. **190**(3): p. 311-22.
203. Kajiyama, H., et al., *Prolonged survival and decreased invasive activity attributable to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma*. Cancer Res, 2002. **62**(10): p. 2753-7.
204. Kajiyama, H., et al., *Involvement of DPPIV/CD26 in epithelial morphology and suppressed invasive ability in ovarian carcinoma cells*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1086**: p. 233-40.
205. Kikkawa, F., et al., *Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1751**(1): p. 45-51.
206. Morimoto, C. and S.F. Schlossman, *The structure and function of CD26 in the T-cell immune response*. Immunol Rev, 1998. **161**: p. 55-70.
207. De Meester, I., et al., *CD26, let it cut or cut it down*. Immunol Today, 1999. **20**(8): p. 367-75.
208. Cordero, O.J., F.J. Salgado, and M. Nogueira, *On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(11): p. 1723-47.
209. Dang, N.H., et al., *Cell surface modulation of CD26 by anti-1F7 monoclonal antibody. Analysis of surface expression and human T cell activation*. J Immunol, 1990. **145**(12): p. 3963-71.
210. Havre, P.A., et al., *The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 1634-45.
211. Herrera, C., et al., *Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19532-9.
212. Busek, P., et al., *Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(5): p. 738-47.
213. Cheng, H.C., M. Abdel-Ghany, and B.U. Pauli, *A novel consensus motif in fibronectin mediates dipeptidyl peptidase IV adhesion and metastasis*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 24600-7.
214. Beckenkamp, A., et al., *Differential Expression and Enzymatic Activity of DPPIV/CD26 Affects Migration Ability of Cervical Carcinoma Cells*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0134305.

215. Eric-Nikolic, A., et al., *Serum DPPiV activity and CD26 expression on lymphocytes in patients with benign or malignant breast tumors*. Immunobiology, 2011. **216**(8): p. 942-6.
216. Matic, I.Z., et al., *Serum activity of DPPiV and its expression on lymphocytes in patients with melanoma and in people with vitiligo*. BMC Immunol, 2012. **13**: p. 48.
217. Blanco-Prieto, S., et al., *Serum calprotectin, CD26 and EGF to establish a panel for the diagnosis of lung cancer*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0127318.
218. Boccardi, V., et al., *Serum CD26 levels in patients with gastric cancer: a novel potential diagnostic marker*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 703.
219. De Chiara, L., et al., *Postoperative serum levels of sCD26 for surveillance in colorectal cancer patients*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107470.
220. de la Haba-Rodriguez, J., et al., *Soluble dipeptidyl peptidase IV (CD-26) in serum of patients with colorectal carcinoma*. Neoplasma, 2002. **49**(5): p. 307-11.
221. Nazarian, A., et al., *Inhibition of circulating dipeptidyl peptidase 4 activity in patients with metastatic prostate cancer*. Mol Cell Proteomics, 2014. **13**(11): p. 3082-96.
222. Fujimoto, N., et al., *Clinical significance of soluble CD26 in malignant pleural mesothelioma*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115647.
223. de Andrade, C.F., et al., *CD26/DPPiV cell membrane expression and DPPiV activity in plasma of patients with acute leukemia*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2009. **24**(3): p. 708-14.
224. Roesch, A., et al., *Loss of dipeptidyl peptidase IV immunostaining discriminates malignant melanomas from deep penetrating nevi*. Mod Pathol, 2006. **19**(10): p. 1378-85.
225. Pethiyagoda, C.L., D.R. Welch, and T.P. Fleming, *Dipeptidyl peptidase IV (DPPiV) inhibits cellular invasion of melanoma cells*. Clin Exp Metastasis, 2000. **18**(5): p. 391-400.
226. Morrison, M.E., et al., *A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1135-43.
227. Houghton, A.N., et al., *Cell surface antigens of human melanocytes and melanoma. Expression of adenosine deaminase binding protein is extinguished with melanocyte transformation*. J Exp Med, 1988. **167**(1): p. 197-212.
228. Arscott, W.T., et al., *Suppression of neuroblastoma growth by dipeptidyl peptidase IV: relevance of chemokine regulation and caspase activation*. Oncogene, 2009. **28**(4): p. 479-91.
229. Kikkawa, F., et al., *Increased adhesion potency of ovarian carcinoma cells to mesothelial cells by overexpression of dipeptidyl peptidase IV*. Int J Cancer, 2003. **105**(6): p. 779-83.
230. Kajiyama, H., et al., *Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells*. Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2278-83.
231. Mizokami, Y., et al., *Stromal cell-derived factor-1alpha-induced cell proliferation and its possible regulation by CD26/dipeptidyl peptidase IV in endometrial adenocarcinoma*. Int J Cancer, 2004. **110**(5): p. 652-9.
232. Wesley, U.V., M. McGroarty, and A. Homoyouni, *Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway*. Cancer Res, 2005. **65**(4): p. 1325-34.
233. Wesley, U.V., S. Tiwari, and A.N. Houghton, *Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells*. Int J Cancer, 2004. **109**(6): p. 855-66.
234. Lu, C., et al., *Dipeptidyl peptidases as survival factors in Ewing sarcoma family of tumors: implications for tumor biology and therapy*. J Biol Chem, 2011. **286**(31): p. 27494-505.
235. Havre, P.A., et al., *CD26 expression on T cell lines increases SDF-1-alpha-mediated invasion*. Br J Cancer, 2009. **101**(6): p. 983-91.
236. Sato, T., et al., *CD26 regulates p38 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of integrin beta1, adhesion to extracellular matrix, and tumorigenicity of T-anaplastic large cell lymphoma Karpas 299*. Cancer Res, 2005. **65**(15): p. 6950-6.

237. Okamoto, T., et al., *CD9 negatively regulates CD26 expression and inhibits CD26-mediated enhancement of invasive potential of malignant mesothelioma cells*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86671.
238. Pang, R., et al., *A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(6): p. 603-15.
239. Cordero, O.J., et al., *Potential of soluble CD26 as a serum marker for colorectal cancer detection*. World J Clin Oncol, 2011. **2**(6): p. 245-61.
240. De Chiara, L., et al., *Serum CD26 is related to histopathological polyp traits and behaves as a marker for colorectal cancer and advanced adenomas*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 333.
241. Scott, L.J., *Sitagliptin: A Review in Type 2 Diabetes*. Drugs, 2017. **77**(2): p. 209-224.
242. Shawky, L.M., et al., *The Biological Impacts of Sitagliptin on the Pancreas of a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus: Drug Interactions with Metformin*. Biology (Basel), 2019. **9**(1).
243. Klein, T. and R. Bischoff, *Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases*. Amino Acids, 2011. **41**(2): p. 271-90.
244. McGowan, P.M. and M.J. Duffy, *Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database*. Ann Oncol, 2008. **19**(9): p. 1566-72.
245. Dufour, A., et al., *Small-molecule anticancer compounds selectively target the hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9*. Cancer Res, 2011. **71**(14): p. 4977-88.
246. Vandooren, J., P.E. Van den Steen, and G. Opdenakker, *Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013. **48**(3): p. 222-72.
247. Radisky, E.S. and D.C. Radisky, *Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion*. Rev Endocr Metab Disord, 2007. **8**(3): p. 279-87.
248. Li, H.C., et al., *Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **88**(1): p. 75-85.
249. Vizoso, F.J., et al., *Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer*. Br J Cancer, 2007. **96**(6): p. 903-11.
250. Scorilas, A., et al., *Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients*. Br J Cancer, 2001. **84**(11): p. 1488-96.
251. Reinhard, S.M., K. Razak, and I.M. Ethell, *A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 280.
252. Cauwe, B. and G. Opdenakker, *Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2010. **45**(5): p. 351-423.
253. Jobin, P.G., G.S. Butler, and C.M. Overall, *New intracellular activities of matrix metalloproteinases shine in the moonlight*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017. **1864**(11 Pt A): p. 2043-2055.
254. Hill, J.W., et al., *Intranuclear matrix metalloproteinases promote DNA damage and apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation in neurons*. Neuroscience, 2012. **220**: p. 277-90.
255. Stamenkovic, I., *Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 448-64.
256. Farina, A.R. and A.R. Mackay, *Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression*. Cancers (Basel), 2014. **6**(1): p. 240-96.
257. Fiore, E., et al., *Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Oncogene, 2002. **21**(34): p. 5213-23.
258. Hou, H., et al., *High matrix metalloproteinase-9 expression induces angiogenesis and basement membrane degradation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after cerebral infarction*. Neural Regen Res, 2014. **9**(11): p. 1154-62.

259. Hsu, C.C., et al., *Interplay of N-Cadherin and matrix metalloproteinase 9 enhances human nasopharyngeal carcinoma cell invasion*. BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 800.
260. Kim, Y.H., H.J. Kwon, and D.S. Kim, *Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)-dependent processing of betaig-h3 protein regulates cell migration, invasion, and adhesion*. J Biol Chem, 2012. **287**(46): p. 38957-69.
261. Bjorklund, M. and E. Koivunen, *Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1755**(1): p. 37-69.
262. Yabluchanskiy, A., et al., *Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease*. Physiology (Bethesda), 2013. **28**(6): p. 391-403.
263. Rahimi, Z., et al., *Functional Promoter Polymorphisms of MMP-2 C-735T and MMP-9 C-1562T and Their Synergism with MMP-7 A-181G in Multiple Sclerosis*. Immunol Invest, 2016. **45**(6): p. 543-52.
264. Ram, M., Y. Sherer, and Y. Shoenfeld, *Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases*. J Clin Immunol, 2006. **26**(4): p. 299-307.
265. Parks, W.C., C.L. Wilson, and Y.S. Lopez-Boado, *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 617-29.
266. Mehner, C., et al., *Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer*. Oncotarget, 2014. **5**(9): p. 2736-49.
267. Xu, D., et al., *Matrix metalloproteinase-9 regulates tumor cell invasion through cleavage of protease nexin-1*. Cancer Res, 2010. **70**(17): p. 6988-98.
268. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.
269. Bruni-Cardoso, A., et al., *Osteoclast-derived matrix metalloproteinase-9 directly affects angiogenesis in the prostate tumor-bone microenvironment*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(4): p. 459-70.
270. Kaplan, R.N., et al., *VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 820-7.
271. Misko, A., T. Ferguson, and L. Notterpek, *Matrix metalloproteinase mediated degradation of basement membrane proteins in Trembler J neuropathy nerves*. J Neurochem, 2002. **83**(4): p. 885-94.
272. Ozdemir, E., et al., *Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas*. J Urol, 1999. **161**(4): p. 1359-63.
273. Gialeli, C., A.D. Theocharis, and N.K. Karamanos, *Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting*. Febs j, 2011. **278**(1): p. 16-27.
274. Blanco-Prieto, S., et al., *Relevance of matrix metalloproteases in non-small cell lung cancer diagnosis*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 823.
275. Zajkowska, M., et al., *Human Plasma Levels of Vascular Endothelial Growth Factor, Matrix Metalloproteinase 9, and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1 and Their Applicability as Tumor Markers in Diagnoses of Cervical Cancer Based on ROC Analysis*. Cancer Control, 2018. **25**(1): p. 1073274818789357.
276. Zajkowska, M., et al., *Plasma levels and diagnostic utility of macrophage-colony stimulating factor, matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as tumor markers in cervical cancer patients*. Tumour Biol, 2018. **40**(7): p. 1010428318790363.
277. Lubowicka, E., et al., *[The plasma levels and diagnostic utility of matrix metalloproteinase-9 and CA 125 in cervical cancer patients]*. Pol Merkur Lekarski, 2017. **43**(253): p. 10-14.
278. Li, L.N., et al., *Prognostic value of MMP-9 in ovarian cancer: a meta-analysis*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(7): p. 4107-13.
279. Hu, X., et al., *Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion*. Arch Gynecol Obstet, 2012. **286**(6): p. 1537-43.
280. Wang, J., et al., *Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in osteosarcoma: review and meta-analysis*. Clin Chim Acta, 2014. **433**: p. 225-31.
281. Tian, M., et al., *Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 241.

282. Li, Y., et al., *Matrix metalloproteinase-9 is a prognostic marker for patients with cervical cancer*. *Med Oncol*, 2012. **29**(5): p. 3394-9.
283. Cao, D., et al., *Serial analysis of gene expression of lobular carcinoma in situ identifies down regulation of claudin 4 and overexpression of matrix metalloproteinase 9*. *Breast Cancer Res*, 2008. **10**(5): p. R91.
284. Roomi, M.W., et al., *Distinct patterns of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in normal human cell lines*. *Oncol Rep*, 2009. **21**(3): p. 821-6.
285. Li, H., et al., *The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis*. *Oncol Lett*, 2017. **14**(5): p. 5865-5870.
286. Liu, Y., et al., *Matrix metalloproteinase 9 expression and survival of patients with osteosarcoma: a meta-analysis*. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 2017. **26**(1).
287. Pellikainen, J.M., et al., *Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(22): p. 7621-8.
288. Itoh, T., et al., *Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice*. *Clin Exp Metastasis*, 1999. **17**(2): p. 177-81.
289. Acuff, H.B., et al., *Analysis of host- and tumor-derived proteinases using a custom dual species microarray reveals a protective role for stromal matrix metalloproteinase-12 in non-small cell lung cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(16): p. 7968-75.
290. Wu, Z.S., et al., *Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(9): p. 2050-6.
291. Hao, L., et al., *Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer*. *Cancer Lett*, 2007. **253**(1): p. 34-42.
292. Coussens, L.M., B. Fingleton, and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations*. *Science*, 2002. **295**(5564): p. 2387-92.
293. Conroy, H., L. Mawhinney, and S.C. Donnelly, *Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)--the potential missing link*. *Qjm*, 2010. **103**(11): p. 831-6.
294. Santos, L.L. and E.F. Morand, *Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine in RA, SLE and atherosclerosis*. *Clin Chim Acta*, 2009. **399**(1-2): p. 1-7.
295. Sanchez-Zamora, Y.I. and M. Rodriguez-Sosa, *The role of MIF in type 1 and type 2 diabetes mellitus*. *J Diabetes Res*, 2014. **2014**: p. 804519.
296. He, X.X., et al., *Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer*. *Mol Med*, 2009. **15**(1-2): p. 1-10.
297. Richard, V., et al., *Involvement of macrophage migration inhibitory factor and its receptor (CD74) in human breast cancer*. *Oncol Rep*, 2014. **32**(2): p. 523-9.
298. Meyer-Siegler, K.L., et al., *Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(12): p. 8730-9.
299. Kindt, N., et al., *Macrophage migration inhibitory factor in head and neck squamous cell carcinoma: clinical and experimental studies*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013. **139**(5): p. 727-37.
300. Rendon, B.E., et al., *Regulation of human lung adenocarcinoma cell migration and invasion by macrophage migration inhibitory factor*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(41): p. 29910-8.
301. Guo, D., et al., *D-dopachrome tautomerase is over-expressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and acts cooperatively with macrophage migration inhibitory factor to promote cancer growth*. *Int J Cancer*, 2016. **139**(9): p. 2056-67.
302. Yang, S., et al., *A Novel MIF Signaling Pathway Drives the Malignant Character of Pancreatic Cancer by Targeting NR3C2*. *Cancer Res*, 2016. **76**(13): p. 3838-50.
303. Funamizu, N., et al., *Macrophage migration inhibitory factor induces epithelial to mesenchymal transition, enhances tumor aggressiveness and predicts clinical outcome in resected pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(4): p. 785-94.
304. Oliveira, C.S., et al., *Macrophage migration inhibitory factor engages PI3K/Akt signalling and is a prognostic factor in metastatic melanoma*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 630.
305. Wang, C., et al., *Macrophage migration inhibitory factor promotes osteosarcoma growth and lung metastasis through activating the RAS/MAPK pathway*. *Cancer Lett*, 2017. **403**: p. 271-279.

306. Bifulco, C., et al., *Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor*. *Curr Pharm Des*, 2008. **14**(36): p. 3790-801.
307. Lue, H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity*. *Oncogene*, 2007. **26**(35): p. 5046-59.
308. Shimizu, T., et al., *High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **264**(3): p. 751-8.
309. Amin, M.A., et al., *Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase*. *Circ Res*, 2003. **93**(4): p. 321-9.
310. Yaddanapudi, K., et al., *Control of tumor-associated macrophage alternative activation by macrophage migration inhibitory factor*. *J Immunol*, 2013. **190**(6): p. 2984-93.
311. Kindt, N., et al., *Involvement of CD74 in head and neck squamous cell carcinomas*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014. **140**(6): p. 937-47.
312. Dessein, A.F., et al., *Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells*. *Cancer Res*, 2010. **70**(11): p. 4644-54.
313. Leng, L., et al., *MIF signal transduction initiated by binding to CD74*. *J Exp Med*, 2003. **197**(11): p. 1467-76.
314. Miracco, C., et al., *Macrophage migration inhibitory factor protein and mRNA expression in cutaneous melanocytic tumours*. *Int J Oncol*, 2006. **28**(2): p. 345-52.
315. Rumpler, G., et al., *Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes*. *Exp Dermatol*, 2003. **12**(6): p. 761-71.
316. Yasasever, V., et al., *Macrophage migration inhibitory factor in cancer*. *Cancer Invest*, 2007. **25**(8): p. 715-9.
317. Lopez, S., et al., *Comparison of the Transcriptional Profiles of Melanocytes from Dark and Light Skinned Individuals under Basal Conditions and Following Ultraviolet-B Irradiation*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0134911.
318. Guyonneau, L., et al., *Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(8): p. 3396-403.
319. Ekmekcioglu, S., et al., *Inflammatory Marker Testing Identifies CD74 Expression in Melanoma Tumor Cells, and Its Expression Associates with Favorable Survival for Stage III Melanoma*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(12): p. 3016-24.
320. Wang, D., et al., *Upregulation of macrophage migration inhibitory factor promotes tumor metastasis and correlates with poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Oncol Rep*, 2018. **40**(5): p. 2628-2636.
321. Denz, A., et al., *Inhibition of MIF leads to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells*. *J Surg Res*, 2010. **160**(1): p. 29-34.
322. Tan, L., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is overexpressed in pancreatic cancer tissues and impairs insulin secretion function of beta-cell*. *J Transl Med*, 2014. **12**: p. 92.
323. Van Muijen, G.N., et al., *Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cells xenografted into nude mice*. *Clin Exp Metastasis*, 1991. **9**(3): p. 259-72.
324. Lockshin, A., et al., *Exceptional lethality for nude mice of cells derived from a primary human melanoma*. *Cancer Res*, 1985. **45**(1): p. 345-50.
325. Xue, Q., et al., *High expression of MMP9 in glioma affects cell proliferation and is associated with patient survival rates*. *Oncol Lett*, 2017. **13**(3): p. 1325-1330.
326. Webb, A.H., et al., *Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in in vitro models of retinoblastoma*. *BMC Cancer*, 2017. **17**(1): p. 434.
327. Sans-Fons, M.G., et al., *Matrix metalloproteinase-9 and cell division in neuroblastoma cells and bone marrow macrophages*. *Am J Pathol*, 2010. **177**(6): p. 2870-85.
328. London, C.A., et al., *A novel antisense inhibitor of MMP-9 attenuates angiogenesis, human prostate cancer cell invasion and tumorigenicity*. *Cancer Gene Ther*, 2003. **10**(11): p. 823-32.

329. Li, S., et al., *GDF15 promotes the proliferation of cervical cancer cells by phosphorylating AKT1 and Erk1/2 through the receptor ErbB2*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 80.
330. Tsui, K.H., et al., *Growth differentiation factor-15: a p53- and demethylation-upregulating gene represses cell proliferation, invasion, and tumorigenesis in bladder carcinoma cells*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12870.
331. Kindt, N., et al., *Pharmacological inhibition of macrophage migration inhibitory factor interferes with the proliferation and invasiveness of squamous carcinoma cells*. Int J Oncol, 2013. **43**(1): p. 185-93.
332. Bandres, E., et al., *microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(7): p. 2281-90.
333. Huang, X.H., et al., *Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppressed cyclin D1 expression and hepatocellular carcinoma cell proliferation*. Oncotarget, 2014. **5**(14): p. 5570-80.
334. Guo, Y., et al., *Functional disruption of macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppresses proliferation of human H460 lung cancer cells by caspase-dependent apoptosis*. Cancer Cell Int, 2013. **13**(1): p. 28.
335. Pacheco-Fernandez, T., et al., *Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes the Interaction between the Tumor, Macrophages, and T Cells to Regulate the Progression of Chemically Induced Colitis-Associated Colorectal Cancer*. Mediators Inflamm, 2019. **2019**: p. 2056085.
336. Wang, S., et al., *Growth differentiation factor 15 promotes blood vessel growth by stimulating cell cycle progression in repair of critical-sized calvarial defect*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9027.
337. Peake, B.F., et al., *Growth differentiation factor 15 mediates epithelial mesenchymal transition and invasion of breast cancers through IGF-1R-FoxM1 signaling*. Oncotarget, 2017. **8**(55): p. 94393-94406.
338. Pei, X.J., et al., *Increased expression of macrophage migration inhibitory factor and DJ-1 contribute to cell invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma*. Int J Med Sci, 2014. **11**(1): p. 106-15.
339. Lam, C.S., et al., *Prognostic significance of CD26 in patients with colorectal cancer*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e98582.
340. Larrinaga, G., et al., *Dipeptidyl-peptidase IV activity is correlated with colorectal cancer prognosis*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119436.
341. Grunt, T.W., et al., *Prominin-1 (CD133, AC133) and dipeptidyl-peptidase IV (CD26) are indicators of infinite growth in colon cancer cells*. Am J Cancer Res, 2015. **5**(2): p. 560-74.
342. Jang, J.H., et al., *Suppression of lung metastases by the CD26/DPP4 inhibitor Vildagliptin in mice*. Clin Exp Metastasis, 2015. **32**(7): p. 677-87.
343. Tilan, J.U., et al., *Hypoxia shifts activity of neuropeptide Y in Ewing sarcoma from growth-inhibitory to growth-promoting effects*. Oncotarget, 2013. **4**(12): p. 2487-501.
344. Kitlinska, J., et al., *Differential effects of neuropeptide Y on the growth and vascularization of neural crest-derived tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1719-28.
345. Inamoto, T., et al., *Humanized anti-CD26 monoclonal antibody as a treatment for malignant mesothelioma tumors*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(14): p. 4191-200.
346. Aoe, K., et al., *CD26 overexpression is associated with prolonged survival and enhanced chemosensitivity in malignant pleural mesothelioma*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(5): p. 1447-56.
347. Ghani, F.I., et al., *Identification of cancer stem cell markers in human malignant mesothelioma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **404**(2): p. 735-42.
348. Yamazaki, H., et al., *Characterization of cancer stem cell properties of CD24 and CD26-positive human malignant mesothelioma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **419**(3): p. 529-36.
349. Dang, N.H., et al., *T-large granular lymphocyte lymphoproliferative disorder: expression of CD26 as a marker of clinically aggressive disease and characterization of marrow inhibition*. Br J Haematol, 2003. **121**(6): p. 857-65.

350. Carbone, A., et al., *The expression of CD26 and CD40 ligand is mutually exclusive in human T-cell non-Hodgkin's lymphomas/leukemias*. *Blood*, 1995. **86**(12): p. 4617-26.
351. McGuinness, C. and U.V. Wesley, *Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV), a candidate tumor suppressor gene in melanomas is silenced by promoter methylation*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 2435-43.
352. Zhang, M., et al., *Expression levels of seprase/FAPalpha and DPPIV/CD26 in epithelial ovarian carcinoma*. *Oncol Lett*, 2015. **10**(1): p. 34-42.
353. Zhang, M.Z., Y.H. Qiao, and Z.H. Suo, *[Correlation of DPPIV expression with clinicopathological features and prognosis in epithelial ovarian carcinoma]*. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2008. **30**(11): p. 848-52.
354. Asada, Y., et al., *Expression of dipeptidyl aminopeptidase IV activity in human lung carcinoma*. *Histopathology*, 1993. **23**(3): p. 265-70.
355. Khin, E.E., et al., *Dipeptidyl peptidase IV expression in endometrial endometrioid adenocarcinoma and its inverse correlation with tumor grade*. *Am J Obstet Gynecol*, 2003. **188**(3): p. 670-6.
356. Tan, C.W., et al., *CD26/DPPIV down-regulation in endometrial stromal cell migration in endometriosis*. *Fertil Steril*, 2014. **102**(1): p. 167-177.e9.
357. Wilson, M.J., et al., *Dipeptidylpeptidase IV activities are elevated in prostate cancers and adjacent benign hyperplastic glands*. *J Androl*, 2000. **21**(2): p. 220-6.
358. Lu, Z., et al., *Expression of CD26 and CXCR4 in prostate carcinoma and its relationship with clinical parameters*. *J Res Med Sci*, 2013. **18**(8): p. 647-52.
359. Russo, J.W., et al., *Downregulation of Dipeptidyl Peptidase 4 Accelerates Progression to Castration-Resistant Prostate Cancer*. *Cancer Res*, 2018. **78**(22): p. 6354-6362.
360. Russell, H.V., et al., *CXCR4 expression in neuroblastoma primary tumors is associated with clinical presentation of bone and bone marrow metastases*. *J Pediatr Surg*, 2004. **39**(10): p. 1506-11.
361. Mares, V., et al., *Compartment- and malignance-dependent up-regulation of gamma-glutamyltranspeptidase and dipetidylpeptidase-IV activity in human brain gliomas*. *Histol Histopathol*, 2012. **27**(7): p. 931-40.
362. Yousef, E.M., et al., *MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 609.
363. Louca, M., V. Gkretsi, and T. Stylianopoulos, *Coordinated Expression of Ras Suppressor 1 (RSU-1) and Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) Affects Glioma Cell Invasion*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(8).
364. Codo, P., et al., *Control of glioma cell migration and invasiveness by GDF-15*. *Oncotarget*, 2016. **7**(7): p. 7732-46.
365. Yoshioka, H., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1/GDF15) expression is increased by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(48): p. 33129-37.
366. Kadowaki, M., et al., *DNA methylation-mediated silencing of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1/GDF15) in glioma cell lines*. *Int J Cancer*, 2012. **130**(2): p. 267-77.
367. Kalli, M., et al., *Solid Stress Facilitates Fibroblasts Activation to Promote Pancreatic Cancer Cell Migration*. *Ann Biomed Eng*, 2018. **46**(5): p. 657-669.
368. Xu, Q., et al., *Growth differentiation factor 15 induces growth and metastasis of human liver cancer stem-like cells via AKT/GSK-3beta/beta-catenin signaling*. *Oncotarget*, 2017. **8**(10): p. 16972-16987.
369. Sasahara, A., et al., *An autocrine/paracrine circuit of growth differentiation factor (GDF) 15 has a role for maintenance of breast cancer stem-like cells*. *Oncotarget*, 2017. **8**(15): p. 24869-24881.
370. Senapati, S., et al., *Overexpression of macrophage inhibitory cytokine-1 induces metastasis of human prostate cancer cells through the FAK-RhoA signaling pathway*. *Oncogene*, 2010. **29**(9): p. 1293-302.
371. Gkretsi, V., et al., *Inhibition of Breast Cancer Cell Invasion by Ras Suppressor-1 (RSU-1) Silencing Is Reversed by Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15)*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(1).
372. Roth, P., et al., *GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(15): p. 3851-9.

373. Zhou, Z., et al., *Growth differentiation factor-15 suppresses maturation and function of dendritic cells and inhibits tumor-specific immune response*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78618.
374. Kempf, T., et al., *GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice*. Nat Med, 2011. **17**(5): p. 581-8.
375. Yang, S., et al., *NVP-BKM120 inhibits colon cancer growth via FoxO3a-dependent PUMA induction*. Oncotarget, 2017. **8**(47): p. 83052-83062.
376. Li, Z., et al., *Synergistic Antitumor Effect of BKM120 with Prima-1Met Via Inhibiting PI3K/AKT/mTOR and CPSF4/hTERT Signaling and Reactivating Mutant P53*. Cell Physiol Biochem, 2018. **45**(5): p. 1772-1786.
377. Bedard, P.L., et al., *A phase Ib dose-escalation study of the oral pan-PI3K inhibitor buparlisib (BKM120) in combination with the oral MEK1/2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in patients with selected advanced solid tumors*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(4): p. 730-8.
378. Li, C., et al., *GDF15 promotes EMT and metastasis in colorectal cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(1): p. 860-72.
379. Breit, S.N., V.W. Tsai, and D.A. Brown, *Targeting Obesity and Cachexia: Identification of the GFRAL Receptor-MIC-1/GDF15 Pathway*. Trends Mol Med, 2017. **23**(12): p. 1065-1067.
380. Yang, L., et al., *GFRAL is the receptor for GDF15 and is required for the anti-obesity effects of the ligand*. Nat Med, 2017. **23**(10): p. 1158-1166.
381. Clawson, G.A., et al., *Circulating tumor cells in melanoma patients*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41052.
382. Clawson, G.A., et al., *Macrophage-tumor cell fusions from peripheral blood of melanoma patients*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0134320.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitäts-Hautklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Claus Garbe durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Dr. rer.nat. Seema Noor (wissenschaftliche Mitarbeiterin) in Zusammenarbeit mit mir.

Die Migrationsversuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Seema Noor von mir eigenständig durchgeführt. Die ersten Migrationsversuche wurden durch Frau Dr. Seema Noor durchgeführt.

Die Versuche zum Zellzyklus sowie zur Zellproliferation wurden durch Frau Dr. Seema Noor durchgeführt.

Die übrigen Versuche (Invasion, Cytokine Array, GDF-15 ELISA) wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 02.03.2020

8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Claus Garbe für die Möglichkeit zur Promotion in der Dermatologischen Onkologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen und die Betreuung dieser Arbeit.

Ein ganz herzlicher Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Seema Noor für die ausführliche Einarbeitung in die Labormethoden und dass sie mir stets mit Rat und Tat während der gesamten Promotion zur Seite gestanden ist.

Zudem möchte ich allen Mitarbeitern des Labors für dermatologische Onkologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen für ihre Unterstützung danken.

Vielen Dank auch meiner Familie.