

Aus dem Walter Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor:
Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

Molekulare Metastasierungsmechanismen von
B16 Melanomzellen in der Lunge

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marion Sandra San Nicoló

aus
Bozen (I)

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Georg Enders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Carola Berking
Prof. Dr. Dolores J. Schendel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2012

**FÜR MEINE GROBELTERN
FÜR MEINE ELTERN**

Inhalt

INHALT	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. DEFINITION.....	1
1.2. EPIDEMIOLOGIE.....	2
1.3. PHASEN DES METASTASIERUNGSVORGANGS.....	4
1.3.1. Mobilisierung	5
1.3.2. Intravasation.....	8
1.3.3. Extravasation und Ansiedlung.....	9
1.4. DAS METASTATISCHE MIKROMILIEU	11
1.5. ZIELSETZUNG	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. ZELLEN.....	14
2.1.1. Tumorzellkultivierung.....	14
2.1.2. Endothelzellkultur.....	15
2.1.3. Zellmarkierung	16
2.1.4. Transiente Geninhibition – siRNA Transfektion	17
2.2. DAS MAUS-MODELL	18
2.2.1. Tiere.....	19
2.2.2. Injektion der Tumorzellen.....	19
2.2.3. Lungenentnahme.....	19
2.2.4. Konservierung der Präparate.....	20
2.3. IMMUNHISTOCHEMIE.....	21
2.3.1. Präparate.....	21
2.3.2. Immunfluoreszenz	21
2.3.3. Fluoreszenz-Mikroskopie	23
2.3.4. Konfokale Mikroskopie.....	24
2.4. GENANALYSEN UND IMMUNASSAY.....	25
2.4.1. RNA-Isolierung.....	25
2.4.2. cDNA Synthese	26
2.4.3. PCR-Amplifikation	26
2.4.4. Agarose Gel-Elektrophorese	27
2.4.5. Illumina® Array.....	28
2.4.6. Immunassay – ELISA.....	29
2.5. STATISTIK.....	29
3. ERGEBNISSE.....	30
3.1. CHARAKTERISIERUNG DER TUMORZELLANSIEDLUNG.....	30
3.1.1. Beobachtung im Zeitverlauf.....	30
3.1.2. Lokalisation der Ansiedlung.....	34
3.1.3. Art der Ansiedlung.....	39
3.2. INTRINSISCHE UND EXTRINSISCHE FUNKTIONEN DER TUMORZELLE	45
3.2.1. VEGF-A.....	47
3.2.2. PGF	49
3.3. DAS PULMONALE MIKROMILIEU.....	50
3.3.1. VEGF-R ₂ ⁺ Zellen.....	50
3.3.2. Von Willebrandt Faktor.....	52
3.3.3. Fibronektin	54
3.3.4. VEGF-R ₁ ⁺ BMPCs.....	56
3.4. BEEINFLUSSUNG DER METASTASIERUNG	61
3.5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	68

4. DISKUSSION	69
4.1 CHARAKTERISIERUNG DER TUMORZELL-ANSIEDLUNG.....	70
4.1.1. <i>Der Arrest: adhäsiv vs. mechanisch</i>	71
4.2. DIE METASTASIERENDE TUMORZELLE.....	74
4.2.1. <i>Die Rolle von VEGF und PGF – Sekretionsprodukte der Tumorzelle</i>	74
4.2.2. <i>Thrombozytenadhäsion – eine Schutzmaßnahme</i>	78
4.3. DAS PULMONALE MIKROMILIEU.....	79
4.3.1. <i>Der Einfluss der Umgebung auf die Tumorzelle</i>	79
4.3.2. <i>Die Rolle von Fibronektin bei der Metastasierung</i>	80
4.3.3. <i>Die Rolle der VEGF-R₁ positiven Zellen</i>	82
4.4. DAS MODELL DER (PRÄ)METASTATISCHEN NISCHE.....	86
4.5. THERAPEUTISCHER AUSBLICK.....	87
5. ZUSAMMENFASSUNG	89
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	92
7. LITERATURVERZEICHNIS	94
8. DANKSAGUNG	105

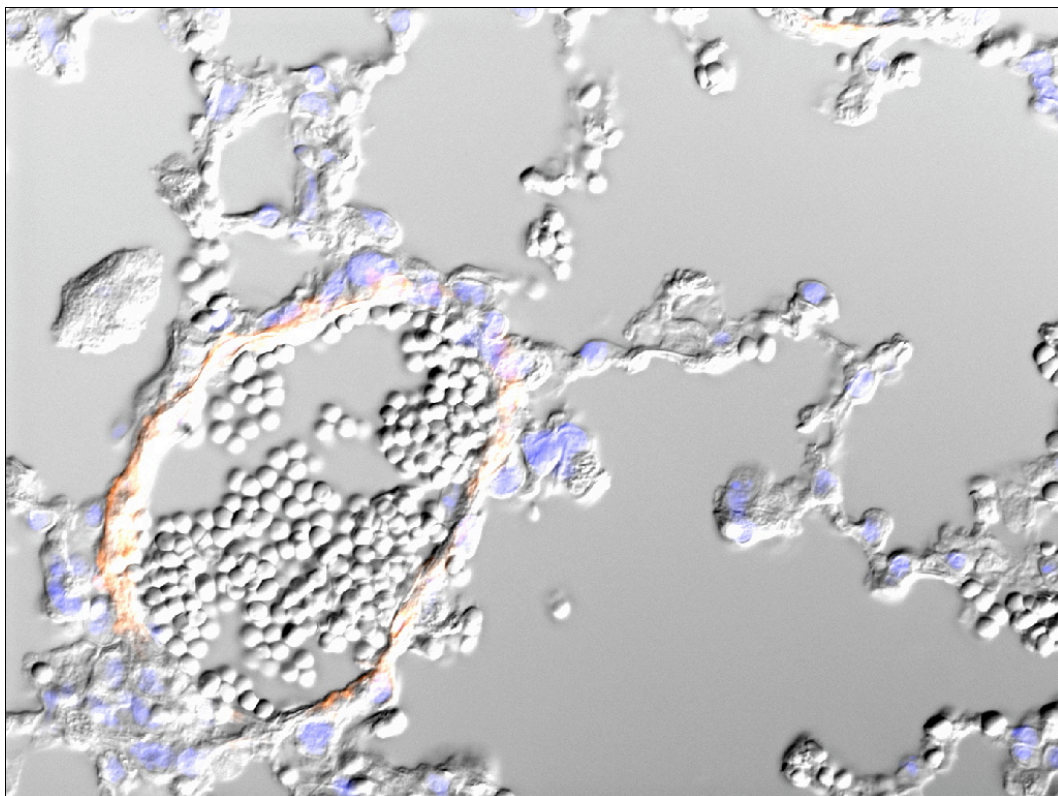


Abbildung 0.1 *Lichtmikroskopische Aufnahme der murinen Lunge in 400facher Vergrößerung*
Immunhistochemische Darstellung der Gefäßwand (α -SMA, rot) mit intraluminalen Erythrozyten und der Zellkerne (Hoechst, blau).

1. Einleitung

„An attempt is made in this paper to consider ‚metastasis‘ in malignant disease, and to show that the distribution of the secondary growth is not a matter of chance. “

(S. Paget, Lancet 1889)

Die Diagnose einer metastasierenden Tumorerkrankung ist für Patienten ein stark prognose-limitierender Faktor. Während lokale Primärtumore in vielen Fällen durch moderne Therapiekonzepte gut zu behandeln sind, impliziert das Vorhandensein von Metastasen einen aufwendigen und für den Patienten belastenden Therapieansatz.

Pathophysiologisch betrachtet ist die Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung ein charakteristisches Merkmal maligner Tumoren. Die Malignität wird hierbei vor allem durch eine rasche Proliferationsleistung, die Widerstandsfähigkeit gegenüber Zelltodsignalen und des Entkommens vor dem Immunsystem bestimmt.

Die Metastasierung ist ein komplexer Prozess, der seit mehreren Jahrzehnten Gegenstand medizinischer Forschung ist und dessen Verständnis zu bedeutenden neuen Therapiekonzepten führen wird.

1.1. Definition

Die Metastasierung (gr. „μεταστασις“) beschreibt den Vorgang der Wanderung von Tumorzellen und ihrer Absiedlung in peripheren, nicht Tumorzell-heimischen Organen. Die Zellen lösen sich dabei vom Primärtumor, begeben sich auf Wanderschaft und formen an einem entfernten Ort sog. Mikrometastasen². Die „*filiae*“ (lat. Tochterzellen) entwickeln in der neuen Umgebung einen dem Primärtumor histologisch ähnlichen Zweittumor, der in den meisten Fällen zu einem klinisch stark limitierenden Faktor wird.

Als Ausbreitungswege der wandernden Tumorzelle bieten sich an:

a) Der Blutweg – hämatogene Metastasierung:

Z.B. Bronchial-CA, Malignes Melanom, Prostata-CA.

b) Die Lymphe – lymphogene Metastasierung:

Z.B. Mamma-CA, Malignes Melanom.

c) Die Metastasierung entlang benachbarter Strukturen – Metastasierung per continuitatem:
Z.B. Krukenbergtumor, Ovarial-CA.

Der Weg der Metastasierung ist von Tumorart zu Tumorart unterschiedlich und hängt wesentlich von den örtlichen Begebenheiten des Primär- bzw. Sekundärtumors ab.

1.2. Epidemiologie

Die Metastasierung eines Primärtumors ist nach wie vor die Hauptursache von Morbidität und Mortalität bei den meisten Tumorpatienten und geht mit einer deutlichen Prognoseverschlechterung einher. Man geht heute davon aus, dass lokale Tumoren für lediglich 10% der Krebs bedingten Todesfälle verantwortlich sind, während die verbleibenden 90% auf Metastasen und die dadurch bedingten klinischen Komplikationen zurückzuführen sind ³ („*The biology of Cancer*“, *Garland Science, R. Weinberg 2007*).

Im Falle des malignen Melanoms sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate von 97% bei einem lokoregionären Tumorleiden auf unter 10% im fernmetastasierten Stadium ⁴ (vgl. Tab. 1.1 des *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*).

Tabelle 1.1 AJCC Stadieneinteilung des malignen Melanoms
(nach Balch et al., JCO 2009 ⁴).

Stadium	Primärtumor (Tumordicke)	Regionäre Lymphknoten	Fernmetastase	5-Jahres- Überlebensrate
0	pTis	N0	M0	
I a	pT1a (≤ 1 mm)	N0	M0	97%
I b	pT1b	N0	M0	
	pT2a (1,01-2 mm)	N0	M0	
II a	pT2b	N0	M0	82%
	pT3a (2,01-4 mm)	N0	M0	79%
II b	pT3b	N0	M0	68%
	pT4a (> 4 mm)	N0	M0	71%
II c	pT4b	N0	M0	53%

III a	pT1-4a	N1a	M0	78%
	pT1-4a	N2a	M0	
III b	pT1-4b	N1a	M0	59%
	pT1-4b	N2a	M0	
	pT1-4a	N1b	M0	
	pT1-4a	N2b	M0	
	pT1-4a	N2c	M0	
IIIc	pT1-4b	N1b	M0	40%
	pT1-4b	N2b	M0	
	pT1-4b	N2c	M0	
	jedes pT	N3	M0	
IV	jedes pT	jedes N	M1	62-33% (1-Jahres- Überlebensrate)

Im frühen Stadium der Erkrankung bleibt die Chirurgie die Therapie der Wahl ⁵. Im weiter fortgeschrittenen Tumorstadium, insbesondere bei disseminierter Erkrankung, sind adjuvante Tumorthérapien indiziert ⁶⁻⁸. Einen besonderen Stellenwert nimmt die Immuntherapie mit Interferon (IFN)- α 2b und Interleukin (IL)-2 sowie neuerdings die Blockade des zytotoxischen T-Lymphozyt-Antigens-4 (CTLA-4) durch den monoklonalen Antikörper Ipilimumab ein. Dieser induziert eine T-Zell-vermittelte Immunantwort und führt zu einer signifikanten Prognoseverbesserung ^{9, 10}. Auch die zielgerichtete Therapie durch den selektiven BRAF-Kinase-Inhibitor Vemurafenib verbesserte in einer klinischen Phase III-Studie die Überlebensraten signifikant ^{11, 12}.

Die genannten Therapieformen kommen erst sekundär, d.h. nach bereits klinisch manifesten Metastasen, zum Einsatz. Zu diesem Zeitpunkt muss davon ausgegangen werden, dass der Tumor schon ubiquitär im Körper gestreut hat (Abb. 1.1, 1.2). Ein wichtiger wissenschaftlicher Ansatz ist folglich die Prävention der Metastasierung. Denn trotz bedeutender Fortschritte in der Früherkennung und Versorgung von Tumorerkrankungen, nimmt ein Therapieansatz im metastasierten Stadium nach wie vor einen mehr palliativen als kurativen Stellenwert ein.

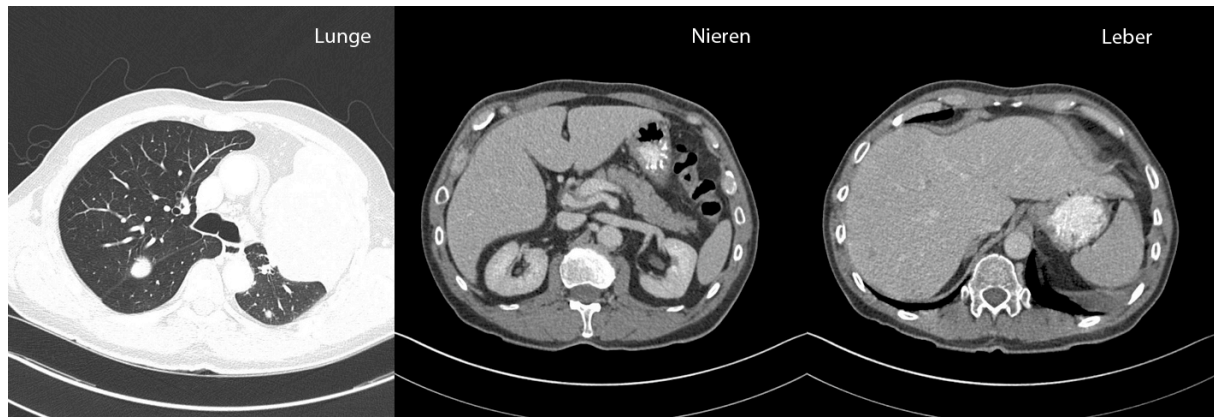


Abbildung 1.1 Fallbeispiel: Fulminanter Metastasierungsverlauf bei Patient H.G. 67 Jahre (ED Malignes Melanom 08/2008)

Computertomographie mit Kontrastmittel der Lunge, bzw. des Abdomens mit Verdacht auf einzelne pulmonale sowie hepatische Metastasen (Aufnahme 03/2009).



Abbildung 1.2 Verlaufskontrolle 06/2009

Deutliche Progredienz der Metastasierung mit Verdacht auf multiple filiae pulmonal, abdominal und ossär. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jacky, Universitätsspital Zürich)

So bleibt die Metastasierung ein klinisch hochrelevantes Problem und der „beängstigendste Aspekt der Onkologie“ (I.J. Fidler, 1990 special lecture¹³).

1.3. Phasen des Metastasierungsverlaufs

Tumormetastasierung entsteht durch den Ablauf verschiedener pathologischer Prozesse, die eine Absiedlung der Zellen in entfernten Organen ermöglichen¹⁴⁻¹⁶. Eine Tumorzelle muss sich vom epitheloiden Zellverband lösen und durch die umgebende Matrix wandern, um dann schließlich auf hämatogenem oder lymphogenem Weg zu metastasieren. Dort erfolgt der Austritt aus der Blutbahn, die Extravasation und die Ansiedlung auf neuem Boden (Abb. 1.3).

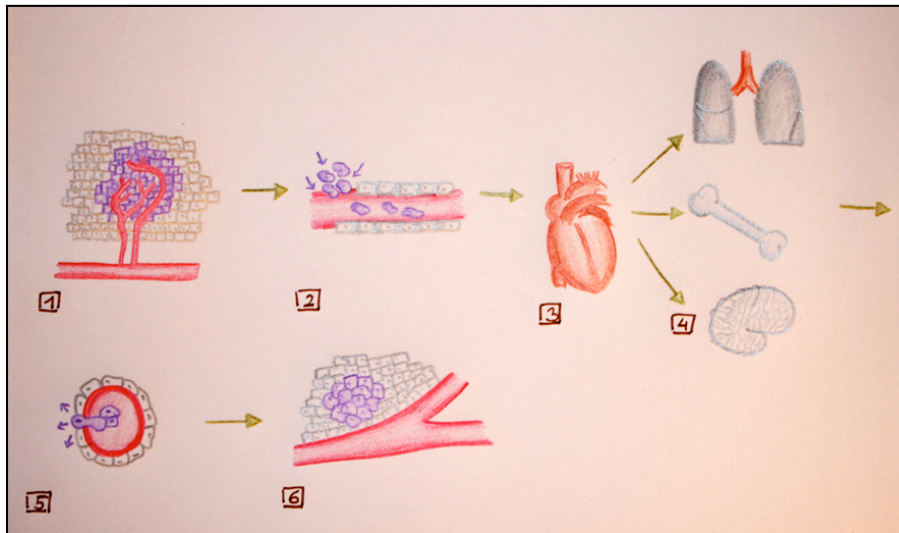


Abbildung 1.3 Metastasierungs-Ablauf

1 Primärtumor; 2 Lokale Invasion/ Intravasation; 3 Transport über Blutkreislauf; 4 Arrest in den Mikro-Gefäßen verschiedener Organe; 5 Entfernte Extravasation; 6 Bildung von Mikro- und Makrometastasen

1.3.1. Mobilisierung

Nachdem mehr als 80% der letalen Krebserkrankungen auf Karzinome, d.h. Entartung von Epithelzellen, zurückzuführen sind, sei hier die „Mobilisierung“ beispielhaft an epitheloiden Neoplasien erläutert.

Epithelzellen werden unter physiologischen Bedingungen durch die extrazellulären Domänen von Cadherinen (*Adherens Junctions*) zu einem Zellverband zusammengehalten (Abb. 1.4)

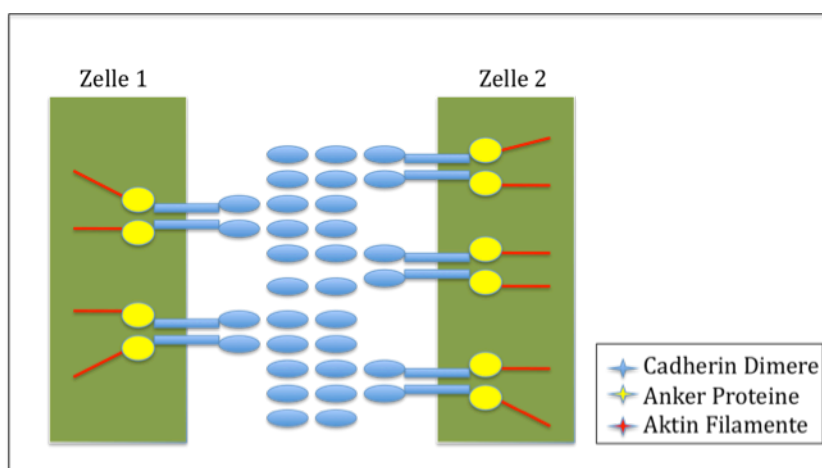


Abbildung 1.4 Adhäsionsmoleküle

Zwischen den Endothelzellen finden sich Catherin-Dimere, welche über Ankerproteine und zytoskelettale Aktin-Filamente die Zell-Zell-Verbindung herstellen. (Modifiziert nach “The biology of Cancer”, Garland Science, R. Weinberg 2007)

Der erste Schritt im Prozess der Metastasierung ist die Aneignung invasiven Wachstums der Primärtumorzellen. Dabei lösen sich die randständigen Zellen (sog. „*invasive front*“) vom epitheloiden Verband und nehmen mesenchymale Eigenschaften an, welche eine wesentliche Verminderung der zellulären Adhäsion und eine erhöhte Dynamik implizieren¹⁷. Um diesen entscheidenden Schritt initiieren zu können, ändern die Zellen ihren Phänotyp. Epithelzellen vollziehen die EMT (Epitheliale Mesenchymale Transition)^{18, 19}. Die EMT – vor allem aus der Embryologie und Wundheilung bekannt – geht mit dem Verlust von Zytokeratinen, epithelialen Adhäsionsmolekülen (wie z.B. E-Cadherin) und der Polarität der Epithelzellen einher und bringt die Expression mesenchymaler Gene, die Sekretion verschiedener Proteasen (z.B. Matrixmetalloproteasen: MMP-2, MMP-3, MMP-9)^{20, 21} sowie von Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) mit sich^{22, 23}.

Von besonderer Bedeutung für die Invasivität des Tumors scheint der Verlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin zu sein²⁴⁻²⁶. Die Ektodomänen der E-Cadherine zweier anliegender Epithelzellen bilden homodimere Bindungen, die über die beiden intrazellulären Moleküle α - und β - Catenin an das Aktinzytoskelett binden (Abb. 1.5). Dies ermöglicht stabile Zellverbindungen und stellt die Integrität des epithelialen Zellverbandes dar. Durch Ausschaltung der CDH1-Gen-Expression und somit Unterdrückung des E-Cadherins im Falle invasiver Karzinome zerfällt diese starke Bindung. Damit erlangt die Zelle erhöhte Motilität und ein maligner Phänotyp wird forciert.

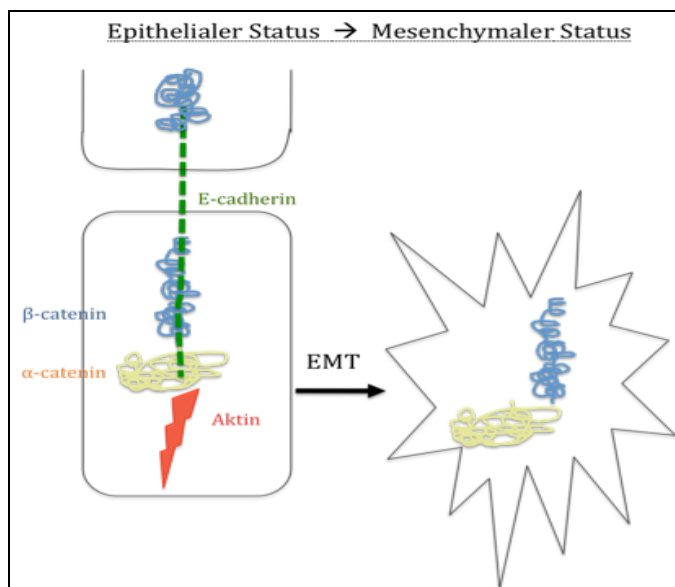


Abbildung 1.5 EMT an der invasiven Front eines Tumors¹

Die Abbildung zeigt den Übergang vom epithelialen Zustand über den Verlust des E-Cadherins zum mesenchymalen Zustand der Epithelzellen.

Im speziellen Fall der Melanozyten, besitzen diese durch E-Cadherin einen wichtigen Bindungspartner für anliegende Keratinozyten. Durch Suppression von E-Cadherin und Akquisition von N-Cadherin – welches unter physiologischen Bedingungen von Fibroblasten exprimiert wird – erwerben Melanozyten die Fähigkeit an umliegendes Stroma zu binden und sich somit ihren Weg durch die extrazelluläre Matrix (ECM) zu bahnen (Abb. 1.6).

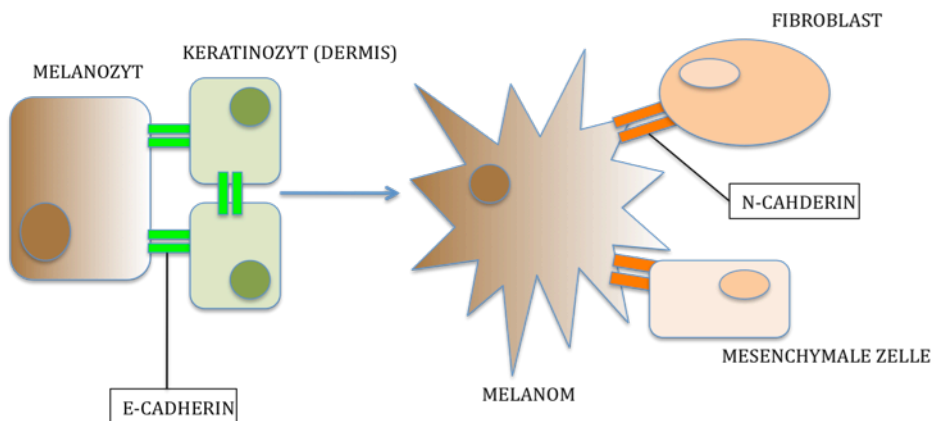


Abbildung 1.6 Cadherin-Veränderung bei entartenden Melanozyten

Das melanozytäre Adhäsionsmolekül E-Cadherin wird supprimiert, das fibroblastäre N-Cadherin forciert und eine Anbindung an Matrix bei der Metastasierung folglich ermöglicht. (Modifiziert nach „The biology of Cancer“, Garland Science, R. Weinberg 2007)

Ein weiterer Faktor der mobilitätssteigernden Tumoradaptation ist die Amplifikation des NEDD9-Gens (Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 9²⁷) – wie sie beim humanen metastasierenden Melanom zu finden ist. NEDD9 beinhaltet ein Adaptorprotein²⁸, welches fokale Kontaktstellen bildet. Diese fokalen Kontaktstellen ermöglichen anders als stabile, reife Adhäsionsmoleküle eine transiente, dynamische Adhäsion und begünstigen somit ebenfalls Mobilität und Invasion²⁹.

Das Zusammenspiel zwischen intrinsischen Tumoraktivitäten und extrinsischen Funktionen von Fibroblasten und Makrophagen führen also zu vermehrter Mobilität und Möglichkeit der Invasion und Intravasation.

1.3.2. Intravasation

Als Intravasation bezeichnet man den Vorgang, bei dem die Tumorzelle sich durch das Endothel hindurch den Weg in das Lymph- oder Gefäßsystem bahnt und somit Möglichkeit zur systemischen Ausbreitung findet^{30,31}.

In der Blutbahn findet die wandernde Tumorzelle eine unwirtliche Umgebung vor. Strömungsscherkräfte, fehlende Integrinbindungen („*death upon detachment*“) sowie das Vorhandensein von Immunzellen erschweren ein Überleben der Tumorzelle, bzw. eines Tumorzellverbandes und führen in den meisten Fällen zur „Anoikis“, der epithelialen Apoptose durch Zelladhäsionsverlust (gr. „Heimatlosigkeit“)^{32,33}.

Nguyen et al.³⁴ prägten den Begriff der *intrinsischen* und *extrinsischen Tumorfunktionen*. Die intrinsischen Tumorfunktionen beschreiben all jene Fähigkeiten der Tumorzelle, durch Adaptation und Modifikation ihrer Genetik der *Anoikis* zu entgehen. Anders als gesunde Zellen besitzen metastasierende Tumorzellen somit durch diese genetische Instabilität und Heterogenität vermehrt phänotypische Attribute (z.B. die Aneignung mesenchymaler Eigenschaften durch EMT), die ein Überleben unter besonderen Bedingungen ermöglichen.

Zu den extrinsischen Funktionen gehört die Manipulation ihrer Umgebung. Z.B. aggregieren Plättchen an die Tumorzelle und schützen die maligne Zelle vor den Noxen im Blut, vor allem aber vor dem körpereigenen Immunsystem^{35,36}. Ein weiteres Beispiel wäre die Induktion des *Capillary Leak*, der vermehrten Gefäßdurchlässigkeit, durch den von der Tumorzelle exprimierten VEGF-Faktor.

Trotz dieser Schutzmechanismen überleben nur sehr wenige Zellen das Eindringen in fremde Organsysteme. Diese Ineffizienz der Metastasierung³⁷⁻³⁹ konnte in Experimenten mehrfach belegt werden. In-vivo-Mikroskopie und *cell-fate-analyses* zeigten die erfolgreichen ersten Schritte der Metastasierung, d.h. das Proliferationsverhalten des Primärtumors, die Ausbreitung über die Basalmembran hinaus und das Erreichen des Gefäß- und Lymphsystems. Die darauf folgenden Schritte zeigten jedoch massive Zellverluste bei der intraluminalen Ausbreitung, Ansiedlung und Proliferation im neuen Organ⁴⁰⁻⁴².

Bei Injektion von radioaktiven murinen B16-Melanomzellen, beobachtete I.J. Fidler, dass 24h post injectionem nur mehr 1% der Zellen im Umlauf waren und 0,1% letztlich Metastasen bildeten^{43, 44}. Ähnliches wurde von Luzzi et. al. bewiesen, der durch In-vivo-Video-Mikroskopie und Immunhistochemie zeigen konnte, dass 2% der mesenterial injizierten

Zellen Mikrometastasen in der Leber formten und lediglich 0,02% letale Makrometastasen bildeten ⁴⁵.

Diese und andere Beobachtungen ermöglichen folgende Schlussfolgerungen:

- 1) Die Präsenz von Tumorzellen im Blut darf nicht mit Metastasen gleichgesetzt werden (Goldmann 1897), weil die meisten dieser Zellen noch im Blut absterben (Iwasaki 1915).
- 2) Nur Tumorzellen, die Mechanismen besitzen im Blut zu überleben, können entfernte Metastasen bilden.

Douma et al. konnten z.B. zeigen, dass gewisse Tumorzellen zum Überleben einen autokrinen Mechanismus nützen, um dem programmierten Zelltod zu entgehen ⁴⁶. Durch die Produktion von TrkB, welches durch die Protein-Kinasen AKT/PKB ³⁵ agiert, können DNA-zerstörende Caspasen in ihrer Aktivität gehemmt und der Zelltod vermieden werden. Caspasen sind Kalzium-abhängige Cystein-Proteasen, die Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten und somit die Apoptose der Zelle induzieren.

Die erfolgreiche Intravasation ist folglich Voraussetzung für die systemische Ausbreitung der Tumorzellen. Blutbahn und Lymphgefäße ermöglichen eine Ausstreuung der Zellen in den gesamten Organismus. Nach Arrest im entfernten Kapillarbett kommt es zur Ansiedlung der Tumorzelle und eine Extravasation in einem dem Primärtumor entfernten Gebiet wird ermöglicht.

1.3.3. Extravasation und Ansiedlung

1889 veröffentlichte Stephen Paget eine Beobachtung, in der er die wandernde Tumorzelle mit einem Samen verglich: „*When a plant goes to seed, its seeds are carried in all directions; but they can only live and grow if they fall on congenial soil*“ ⁴⁷. Demnach siedeln sich Tumorzellen nur in einer anatomischen Umgebung an, die ihren Bedürfnissen angepasst ist. Demgegenüber postulierte J. Ewing 1928 die Idee, dass Metastasierung allein durch die Kreislaufanatomie und das Hängenbleiben der Tumorzelle im nächsten Kapillarbett zu erklären sei. „*Genius loci*’, or the particular susceptibility of a tissue to develop secondary tumors, is an interesting phase of study of metastases. (...) *The mechanism of the circulation*

will doubtless explain most of these peculiarities, for there is as yet no evidence that any one parenchymatous organ is more adapted than others to the growth of embolic tumor cells.”

In einer klinischen Studie widerlegten Tarin et al. Ewings Theorie als alleinige Ursache: Patienten mit malignem Aszites wurde als palliative Maßnahme eine Drainage in das venöse System gelegt mit der Folge einer massiven Tumorzellverschleppung. Die Patienten wurden im Zeitverlauf beobachtet und anders als durch Ewing postuliert, kam es nur in seltenen Fällen zur Entwicklung von Lungenmetastasen – dem ersten nachgeschalteten Kapillarbett ⁴⁸.

Empirische Daten belegen die Tatsache, dass Neoplasien bestimmte Metastasierungseigenschaften aufweisen („*organ tropism*“): Lungenkarzinome metastasieren häufig in die umgebenden Lymphknoten sowie ins Gehirn; Prostata-Tumore metastasieren in die Wirbelkörper und gastrointestinale Tumore in Lymphknoten, Leber und Lunge (Tab. 1.2).

Tabelle 1.2 Metastasierungsmuster solider Tumoren (nach D. Nguyen & J. Massagué ³⁴).

Primärtumor	Prädilektionsstelle für Metastasen
Lungen-CA	SCLC metastasiert sehr schnell und in mannigfaltiger Form. NSCLC metastasiert meist in die kontralaterale Lunge, Gehirn, Leber und Knochen.
Mamma-CA	V.a. Knochen- und Lungenmetastasen. ER-positive Tumoren bevorzugt in Knochen, ER- negative Tumoren metastasieren aggressiver in viszerale Organe. Dieses Verhalten ist zurückzuführen auf die Ursprungszelle: ER-positive Tumorzellen stammen von luminalen Progenitorzellen ab; ER-negative von Zellen in basalen Schichten.
Prostata-CA	Metastasiert fast ausschließlich in den Knochen, indem sich osteoblastische Läsionen formen, welche sich mit mineralisierter Knochenmatrix füllen (im Unterschied zur osteolytischen Metastase bei Mamma-CA).
Colon-CA	Der Blutfluss über die mesenterischen Gefäße ermöglicht Metastasen vor allem in der Leber sowie dem Peritoneum. Es finden sich aber auch Lungenmetastasen.

Ovarial-CA	Lokale Ausbreitung im Peritoneum; selten Metastasen in anderen Organen.
Pankreas-CA	Aggressive Ausbreitung in die Leber und umgebende viszerale Organe.

Inwieweit Kreislaufanatomie und Organbeschaffenheiten demnach eine Rolle spielen, ist Gegenstand aktueller Forschung und soll durch die Charakterisierung molekularer Metastasierungsmechanismen von B16 Maus-Melanomzellen in der Lunge weiter beleuchtet werden. Besonderes Augenmerk galt dabei dem pulmonalen Mikromilieu, dessen Beschaffenheit und dessen Modifizierung in der Interaktion mit der metastatischen Zelle.

1.4. Das metastatische Mikromilieu

Nach dem *seed and soil* -Prinzip von S. Paget stellt das metastatische Mikromilieu (*metastatic microenvironment*) den Boden dar, welcher Metastasierung in einer dem Primärtumor entfernten Umgebung ermöglicht. Das Vorhandensein überlebens- und wachstumsfördernder Maßnahmen – oder lediglich das Fehlen von Tumorzell-abtötenden Faktoren begünstigen das Anwachsen der Tumorzelle im fremden Organ. Das Mikromilieu bietet somit als Nische optimale Bedingungen zur Ansiedlung und Proliferation der Tumorzelle.

Das Mikromilieu wird geprägt von lokalen Endothel-Beschaffenheiten, eingewanderten Zellen (z.B. Thrombozyten, Monozyten, Endotheliale Vorläuferzellen), Plasmaproteinen (z.B. Fibronectin, Fibrinogen, von Willebrand Faktor) und Tumorzelleigenen Faktoren wie VEGF, PGF und Chemokinen.

Das Endothel stellt eine natürliche Schranke im Prozess der Metastasierung dar. Intaktes, reifes Endothel exprimiert wenige Adhäsionsmoleküle und erschwert somit eine Extravasation und Transmigration durch die maligne Zelle. Die Tumorzelle kann das Endothel aber mittels Mediatoren stimulieren (z.B. TNF α , IL $_1\beta$). Desweiteren kann die Tumorzelle permeabilitätserhöhende Faktoren wie z.B. VEGF-A sezernieren. VEGF-A wird als essentieller Bestandteil der hämatogenen Metastasierung beschrieben⁴⁹⁻⁵¹ und soll an dieser Stelle näher erläutert werden.

Die Familie der „Vascular Endothelial Growth“ Faktoren schließt mehrere Mitglieder ein: VEGF-A (primär als vascular permeability factor (VPF) beschrieben ⁵²), PGF (placenta growth factor), VEGF-B,-C,-D,-E (Lymph-Angiogenese) und *snake venom* VEGF ⁴⁹.

VEGF-A ist ein Schlüsselfaktor in der physiologischen Angiogenese (Embryologie, Wachstum und Reproduktionsfunktionen) sowie der pathologischen Gefäßneubildung bei Tumoren und ophthalmologischen Neovaskularisationen. Über die Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGF-R₁(Flt) und VEGF-R₂ (Flk/KDR) induziert es die oben genannten Funktionen. Die Permeabilitätserhöhung erfolgt dabei fast ausschließlich durch den VEGF-R₂ ⁵³, welcher an Src-Kinasen gebunden ein Auflösen der VE-Cadherin- β -Catenin Komplexe und somit der Endothel-Verbindungen bewirkt. VEGF kann durch Erweiterung, bzw. Unterbrechung der endothelialen Zelladhäsion die Endothel-Barriere verringern und so den Austritt von Flüssigkeit oder Zellen ermöglichen. Dies kann man z.B. bei akuten kardial oder cerebral ischämischen Ereignissen beobachten, wo es nach dem Insult zu einem postischämischen Ödem kommt ^{50, 54}. Im Kontext einer Neoplasie könnte die VEGF-induzierte Durchlässigkeit des Endothels eine erleichterte Extravasation der Tumorzellen in der Peripherie bewirken und eine Metastasierung forcieren. Weis et al. konnten bei der Gabe eines Flk-Inhibitors eine Reduktion der pulmonalen Metastasen von ca. 50% bewirken (p<0,001 ⁵⁰)

Im Hinblick auf die Metastasierung muss also ein besonderes Augenmerk auf die Induktion der Gefäßpermeabilität gelegt werden. Exprimiert eine Tumorzelle vor Ort VEGF, kann es zu einer Endothel-Unterbrechung ⁵⁵ mit Freilegung der darunterliegenden Basalmembran kommen. Fibronectin, Kollagen und von Willebrand Faktor bieten sodann die Möglichkeit zur Anheftung durch aktivierte Thrombozyten ⁵⁶ oder im Blutstrom befindliche Tumorzellen ⁵⁰.

Das Vorkommen einer pro-metastatischen Nische ist folglich eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche hämatogene Metastasierung. Sie ist eine Schlüsselstelle in der Ausbreitung der Tumorerkrankung und soll in der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert werden. Mithilfe eines Mausmodells, bei dem Tumorzellen intravenös injiziert werden, wurde die Nischenbildung im Zeitverlauf untersucht. Die Veränderungen wurden histologisch und mittels Expressionsanalysen von relevanten Genen ausgewertet. Diese Arbeit sollte so einen Beitrag zum Verständnis der Mechanismen der frühen hämatogenen Metastasierung liefern.

1.5. Zielsetzung

Eine fruchtbare Interaktion zwischen metastasierender Tumorzelle und dem Mikromilieu im Zielorgan sind Voraussetzungen für eine erfolgreiche Metastasierung.

Nur durch die genaue Untersuchung der prometastatischen Faktoren sowie das Verständnis der lokalen Veränderungen am Schauplatz zukünftiger Metastasen können therapeutische Targets erforscht und eine Prognoseverbesserung für die Patienten erzielt werden.

Zielsetzung dieser Arbeit war es deshalb, neue Erkenntnisse über die frühen Vorgänge der Metastasierung in der Lunge zu gewinnen. In einem Mausmodell wurde die Metastasierung ab dem Zeitpunkt der Intravasation (d.h. durch i.v. Gabe von B16-Melanomzellen) simuliert. In streng determinierten Zeitfenstern wurden im Akutversuch Lungenentnahmen durchgeführt und die zellulär-histologischen Veränderungen in der prä- und postmetastatischen Lunge quantifiziert und visualisiert.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit befasste sich demnach mit der Charakterisierung der frühen molekularen Metastasierungsmechanismen in der Lunge. Insbesondere galt es folgende Fragen zu untersuchen:

- 1) Wie ist der Ablauf der hämatogenen Metastasierung in der Lunge?
- 2) Welche Hintergründe bedingen die Ansiedlung? Kommt es zu einem mechanischen Arrest oder adhären die Tumorzellen im Kapillarbett?
- 3) Welche Zellen und Faktoren charakterisieren das pulmonale Mikromilieu?
- 4) Inwieweit interagieren die Tumorzellen und das Lungengewebe?
- 5) Gibt es Möglichkeiten die frühen Metastasierungs-Phasen therapeutisch zu beeinflussen?

2. Material und Methoden

Für die Erörterung der Fragestellung wurde ein Modell ausgewählt bei dem C57/BL6-Mäusen murine B16/D5-Melanomzellen in die Schwanzvene injiziert werden. Der Metastasierungsprozess wurde im Anschluss an Lungenpräparaten untersucht.

2.1. Zellen

Für alle Versuche wurden murine B16/D5-Zelllinien verwendet, die wir von B. Fox (Earl Chiles Res. Foundation, Portland Oregon) bekommen haben. Die Tumorzellen wurden in Medien kultiviert (Kap. 2.1.1), für die immunhistochemischen Versuche markiert (Kap. 2.1.3) und für die Frage der Prävention von Metastasen genetisch modifiziert (Kap. 2.1.4).

2.1.1. Tumorzellkultivierung

Die Zellen wurden für die Langzeitlagerung in einem speziellen Aufbewahrungsmedium bei -80°C gelagert (Tab. 2.1).

Tabelle 2.1 *Aufbewahrungsmedium für B16/D5-Tumorzellen*

45% FBS	Fetal Bovine Serum, Invitrogen
45% RPMI-Medium	RPMI 1640, BioWhittaker™
10% DMSO	Merck

Nach dem vorsichtigen Auftauen wurden die Zellen für die weitere Verarbeitung in einem Kulturmedium mit RPMI 1640-Medium (Tab. 2.2) suspendiert. Die Tumorzellkultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Sobald die Zellen subkonfluent waren, wurden sie mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA Lösung (PAA Laboratories, Pasching) aus dem Zellverband gelöst.

Nach Zugabe von 10 ml RPMI/FBS, welches die Trypsin-Wirkung neutralisiert, wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer (Optik Labor) gezählt und anschließend auf die

gewünschte Konzentration eingestellt. Für die in-vivo-Versuche wurde versucht, die Zellen aus derselben Passage zu verwenden.

Tabelle 2.2 Kulturmedium der B16/D5-Tumorzellen

RPMI +	10% FBS	Fetal Bovine Serum, Invitrogen
	0,4‰ β Mercaptoethanol	
	1% NEAA 100X	BioWhittaker™
	1% Na-Pyruvat	BioWhittaker™
	1% L-Glutamine	BioWhittaker™

2.1.2. Endothelzellkultur

Um die Interaktion von B16/D5-Zellen mit Endothelzellen in vitro zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Endothelzelllinien verwendet:

- 1) bEnd3 Zellen
- 2) T17b Zellen

bEnd3 Zellen (MPI Bad Nauheim) sind murine Endothelzellen aus dem Gehirn, die in RPMI gehalten wurden. Sie stellen eine reife Zelllinie dar, deren Interaktion mit Tumorzellen untersucht wurde.

T17b Zellen sind murine embryonale endotheliale Progenitorzellen (EPC). Sie wurden von Dr. A. Hatzopoulos (damals Institut für Hämatologie, Helmholtzzentrum München) bezogen und in DMEM + 10% FCS Medium aufbewahrt.

Zu einem endothelialen Monolayer (6-Well-Platte) wurden 1×10^5 Tumorzellen hinzugegeben. Im Zeitverlauf (1, 2 und 12 Stunden) wurde die Adhäsion der Tumorzellen mikroskopisch beurteilt. In einem weiteren Versuch wurden fluoreszenz-markierte (CFDA) Tumorzellen zu den Endothellayern gegeben und die Adhäsion über konfokale Mikroskopie verfolgt. Die Endothelzellen wurden über eine Actinfärbung mit Phalloidin markiert.

2.1.3. Zellmarkierung

2.1.3.1. *DiI Markierung*

„DiI“ ist ein langkettiger Karbozyanin-Farbstoff, der durch seine lipophile Eigenschaft vor allem zur Plasma-Membranfärbung geeignet ist. Chemisch handelt es sich hierbei um das 1,1'-diindoleyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin Perchlorat.

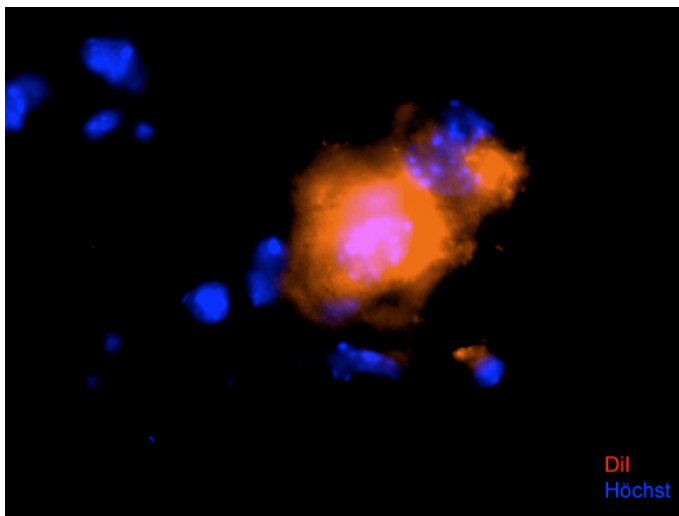


Abbildung 2.1

Immunhistochemische Anfärbung der B16/D5 Melanomzellen mit DiI,

Der Fluoreszenzfarbstoff DiI (Molecular Probes[®]) wurde mit Komplettmedium (1:100) zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt. Danach wurde er gefiltert und zu den B16/D5-Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ für eine Stunde. Die Zellen wurden daraufhin gewaschen, abzentrifugiert und in Kulturmedium (Tab. 2.2) re-suspendiert.

Vor Injektion der Tumorzellen wurden sie *in vitro* auf ihre Färbeeigenschaften geprüft.

2.1.3.2. *CMFDA Markierung*

Bei dem Fluoreszenzfarbstoff Cell Tracker[™] Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate, Invitrogen – Molecular Probes[™]) handelt es sich um einen intrazellulären Farbstoff, der mit Thiolen interagiert. Bei Applikation diffundiert der Farbstoff frei durch die Zellmembran, doch einmal intrazellulär, wird er verstoffwechselt und garantiert durch stabile Thioether-Bindungen gute Langzeitmarkierungen.

Protokoll nach Molecular Probes®:

B16/D5-Zellen wurden für 45 Min. mit „Cell Tracker™ dye working solution“ inkubiert. Diese Arbeitslösung wurde aus der Stocklösung von 10 mM Cell Tracker™ Green CMFDA gewonnen und in einer Endkonzentration von 5 µM Serum-freiem-Medium zugegeben. Nach dem Abzentrifugieren und der Zugabe von frischem Medium erfolgten eine weitere Inkubation bei 37°C und ein Waschgang mit PBS.

Vor Aufnahme der CMFDA-markierten B16/D5-Zellen in die Versuchsreihe, wurden sie auf ihre Färbeeigenschaften *in vitro* geprüft. Dabei konnten die gut fluoreszierenden Eigenschaften auch nach 72 h nachgewiesen werden.

2.1.4. Transiente Geninhibition – siRNA Transfektion

Die Hemmung der Genexpression erfolgte mit Hilfe der siRNA (small interfering RNA oder auch silencing RNA genannt). Dabei handelt es sich um einen 20-25 Nukleotid langen, doppelsträngigen RNA-Strang, welcher mit der zellulären mRNA interagieren (Abb. 2.2). Durch die Anheftung der transfizierten siRNA an die komplementäre mRNA wird die Translation des gewünschten Genabschnitts verhindert und führt somit zur hochspezifischen Ausschaltung eines Gens (Abb. 2.3)⁵⁷⁻⁵⁹.

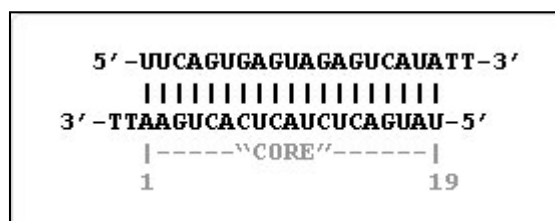


Abbildung 2.2

Typischer siRNA-Doppelstrang: 21 Nukleotide lang, mit 2 DNA Basenpaare im Überhang(TT) (www.invitrogen.com)

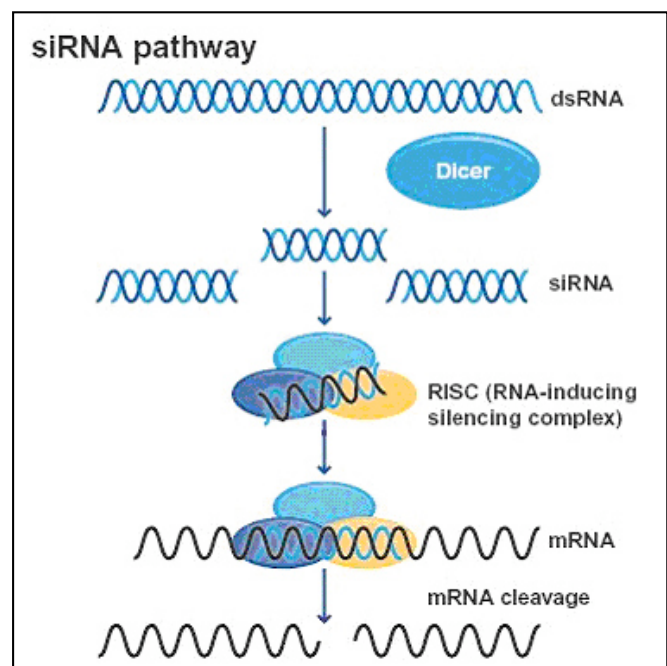


Abbildung 2.3

siRNA Wirkungspfad (www.abcam.com)

Die Synthese der „Stealth™ siRNA duplex oligonucleotides“ wurde bei Invitrogen – life technologies in Auftrag gegeben. Folgende small interfering RNAs wurden den Melanomzellen transfiziert:

siRNA für PGF1	-CCUGUCUGCUGGGAACAACUCAACA- -UGUUGAGUUGUUGUCCCAGCAGACAGG-
siRNA für PGF2	-GAAUACCCUGAUGAGGUGUCUCACA- -UGUGAGACACCUCAUCAGGGUAUUC-
siRNA für PGF 3	-UCUCAGGAUGUGCUCUGUGAAUGCA- -UGCAUUCACAGAGCACAUCCUGAGA-
siRNA für VEGFA	-CCCGACGAGAUAGAGUACAUCUUCA- -UGAAGAUGUACUCUAUCUCGUCGGG-

Die Transfektion der B16/D5-Melanomzellen wurde nach dem folgenden Protokoll mit Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) durchgeführt. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte angesetzt und über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% je 300 pmol RNA pro Well (bzw. 150+150 pmol bei der Kombination von siRNA für VEGF und PGF) zugegeben. Am dritten Tag wurden die Zellen trypsinisiert und resuspendiert und standen für die Injektion zur Verfügung.

2.2. Das Maus-Modell

Zur Erforschung der frühen Metastasierungs-Mechanismen bedienten wir uns eines etablierten Modells, bei dem Tumorzellen peripher injiziert werden⁶⁰⁻⁶². Die Tumorzellen erreichen nach Injektion in die murine Schwanzvene über den kleinen Kreislauf das Lungengefäßnetz. Die pulmonale Metastasierung (Abb. 2.4) wurde daraufhin untersucht.

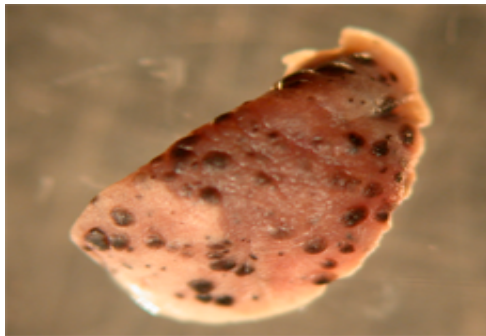


Abbildung 2.4 Murine Metastasenlunge

12 Tage nach i.v. Injektion von B16/D5 Tumorzellen

2.2.1. Tiere

In allen Versuchen wurden C57Bl6-Mäuse (C57/Bl6) (Charles River, Sulzfeld) verwendet. Die Tiere waren in Käfigen von 2-5 Tieren untergebracht. Die Tierversuche waren in dieser Form durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ: 209.1/211-2531-96-04 und 52.2-1-54-2531-20-08).

2.2.2. Injektion der Tumorzellen

Die B16/D5-Tumorzellen wurden in PBS suspendiert und in einer Lösung von 2×10^5 TZ/100 μ l in die Schwanzvene der C57Bl6 Mäuse injiziert. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass das Volumen komplett i.v. gegeben wurde. Dies war an einer widerstandslosen Injektion ersichtlich. Mäuse mit unsicherem Injektionserfolg wurden sofort aus dem Versuch genommen. Alle anderen Mäuse wurden in den Käfig zurückgegeben und zur weiteren Versuchsbeobachtung in den Tierstall gestellt.

2.2.3. Lungenentnahme

Die Lungenentnahme erfolgt je nach Versuchsdesign an den Tagen 0–12.

Die Tiere wurden hierfür mit ca. 200 μ l Ketamin/Rompun Anästhesie analgosediert (Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn GmbH; Rompun[®], Bayer Vital GmbH; im Verhältnis 2:1). Die narkotisierten Mäuse wurden in Rückenlage gelagert und an allen vier Extremitäten fixiert. Nach Inzision entlang des Rippenbogens und Freipräparation des Diaphragmas erfolgte die Thoraxeröffnung von kaudal. Nach beidseitiger Costotomie medioclavikulär und

Fixierung des Sternums vom Thorax weg erfolgte die eigentliche Freipräparation der Lungen (Abb. 2.5). Es kam zur Tötung der Tiere durch Entbluten.

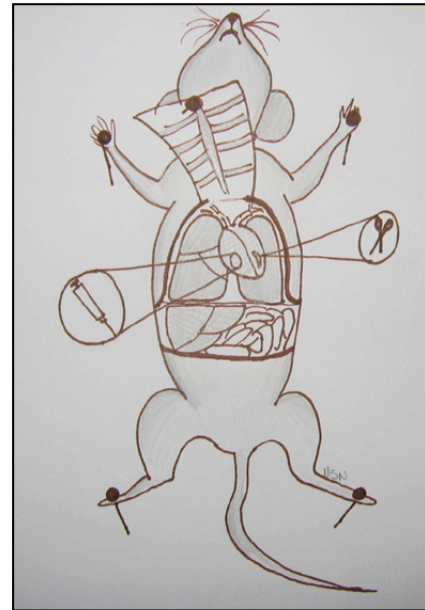


Abbildung 2.5

Schematische Darstellung der Maus-Präparation

Die Lungenperfusion erfolgte in Abhängigkeit von der weiteren Verarbeitung mit NaCl 0,9%, Paraformaldehyd 4% oder Alsever Lösung 10% (Alsever's Solution, Sigma Aldrich Company). Durch Abklemmung der hilusnahen Aorta thoracica und Vena cava und Injektion der Flüssigkeit in den rechten Ventrikel, wurden die Lungengefäße vollständig perfundiert. Die Flüssigkeitsausleitung erfolgte über eine Inzision des linken Ventrikels.

Das Mediastinum wurde in toto entnommen und nach Durchtrennung der zu- und abführenden Gefäße wurden die beiden Lungenflügel herauspräpariert und konserviert.

2.2.4. Konservierung der Präparate

Rechter Lungenflügel: Konservierung in RNALater[®] (Ambion) bei 4°C, bzw. -20°C zur molekularbiologischen Weiterverarbeitung.

Linker Lungenflügel: Konservierung in Paraformaldehyd 4% min. 24h bei 4°C; Einbettung in Tissue Tek[®] O.C.T.[™] Compound (Sakura Finetek Europa B.V.) in 10x10x5mm Cryomold[®] (Tissue Tek[®]) „Biopsy“-Behälter und anschließend 5 Min. Lagerung auf Trockeneis. Die Langzeit-Konservierung erfolgte im Kühlraum bei -80°C.

2.3. Immunhistochemie

2.3.1. Präparate

Die histologischen Schnitte wurden mit einem Kryo-Stat (Microm GmbH, Walldorf Deutschland) bei einer Objekt-Temperatur von -20°C und einer Schnitt-Temperatur von -21°C angefertigt. Sie waren zwischen 7 und 10 µm dick. Zur weiteren Verarbeitung wurden sie auf Polylysine[®] beschichtete Objektträger (Menzel) gelegt und unter Ausschluss von Licht aufbewahrt.

2.3.2. Immunfluoreszenz

2.3.2.1. Gefäße

Die Gefäßdarstellung erfolgte mittels LEL (Lycopersicon Esculentum Lectin), einem Glykoprotein, welches am Kohlenhydrat-Rezeptor der Endothelien bindet. LEL wurde als LEL-Biotin Lösung (100 µg LEL Biotin in 100 µl NaCl) i.v. gegeben. Nach ca. 10 Minuten Perfusionszeit im Kreislauf erfolgte die Thoraxeröffnung der Maus mit anschließender NaCl oder PAH Perfusion des kleinen Kreislaufs (s. oben).

2.3.2.2. Lunge

Bei der Lunge handelt es sich um ein äußerst delikates Gewebe, das durch die alveolare Septierung eine Herausforderung für die Balance zwischen optimaler Fixierung und ausreichender Antigenfreilegung darstellt.

Nach Austestung der Vorbehandlung mit Proteinase K sowie Puffer verschiedener pH-Werte, wurde ein Färbeprotokoll entwickelt, das eine ausreichende Fixierung durch Paraformaldehyd zulässt und gleichzeitig eine Antigenmaskierung verhindert.

Zur Detektion der untersuchten Zellen und Faktoren mittels Fluoreszenz wurde das folgende Färbeprotokoll angewandt:

1. Fixierung der Präparate für mindestens 24h in Paraformaldehyd 4%.
2. Vorbehandlung der histologischen Schnitte durch Einlegen in kochenden Tris EDTA Puffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH9).
3. Nach Abkühlen der Schnitte Einlegen in destilliertes Wasser für 3x2 Sekunden.

4. Es folgte die Behandlung mit dem Detergens Triton (0,1% in PBS) und die Antigenblockade mit M.O.M. (1 Trp./ 1,25ml).
5. Danach Auftragen der Erstantikörper in 2 Schritten:
 - a) Bei 4 °C über Nacht: Melanoma-AK oder S100-AK
 - b) Anschließend bei Raumtemperatur für eine Stunde: VEGF-R1 (1:250), VEGF-R2 (1:100), VEGF-R2-ph (1:100), FN (1:400) oder vWF (1:200)
6. Die Markierung mit den Zweitantikörpern (1:200) fand für zwei Stunden bei Raumtemperatur statt. Verwendete Zweitantikörper waren: Alexa 488 anti mouse, Alexa 488 anti rabbit, Alexa 546 anti mouse und Alexa 546 anti rabbit.
7. Zum Schluss wurde eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 (1:400) durchgeführt.

Alle Antikörper wurden in folgender Lösung verwendet: PBS; 5% Affenserum; 0,025% Tween.

Nach Abschluss des Färbevorganges wurden die Objektträger mit NaCl gespült und mit je zwei Tropfen Immuno Select[®] beschichtet. Die Präparate wurden mit 24x50 mm Deckgläsern (Menzel-Gläser[®]) abgedeckt.

Tabelle 2.3 *Verwendete Antikörper und Materialien im Färbevorgang*

Melanoma	Monoclonal Mouse Anti-Human Melanoma Clone: PNL2 (Dako Cytomation), N1601
S100	Anti Rabbit S100 (Dako Cytomation), Z0311
VEGF-R1	Rab mAb to VEGF Receptor 1 Y103 (abcam), ab32152
VEGF-R2	Rb pAb to VEGEF Receptor 2 (abcam), ab2349
VEGF-R2-ph	Rb pAb to VEGF Receptor 2 phospho Y951 (abcam), ab38473
FN	Polyclonal Rabbit Anti-Human Fibronectin (Dako Cytomation), A0245
vWF	Von Willebrand Faktor (Dako), A0082
α -SMA	Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4 (Dako Cytomation), M0851
Hoechst	Hoechst 33342, bzw. Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich)
	Alexa Fluor [®] 488 chicken anti-rabbit IgG (H+L), (Molecular Probes)
	Alexa Fluor [®] 488 goat anti-mouse IgG (H+L), (Molecular Probes)

Alexa Fluor [®] 546 goat anti-rabbit IgG (H+L), (Molecular Probes)	
Alexa Fluor [®] 488 goat anti-mouse IgG (H+L), (Molecular Probes)	
Triton [®] X-100	Triton Sigma Ultra (Sigma-Aldrich), T9284
M.O.M. [™]	Mouse IgG Blocking Reagent (Vector), MKB-2213
Mol.Prob.	Image-IT [™] FX Signal Enhancer (Molecular Probes), I36933
Tween [®]	Tween 20 (Sigma-Aldrich), P1379
Immuno Select [®]	Anti Fading Mounting Medium (Dianova), AKS-38447)
Trizma [®] Base	Trizma Base (Sigma), T-1503
NaCl	Natriumchlorid-Lösung 0,81% (Apotheke Innenstadt Uni München)
PFA	Paraformaldehyd 4% (in PBS pH7, Apotheke Innenstadt Universität München)

2.3.3. Fluoreszenz-Mikroskopie

Nach Abschluss des Färbevorganges wurden die Präparate mit dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Alle Aufnahmen wurden mit dem Axiophot[®] Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) durchgeführt und mittels einer hochauflösenden Kamera (AxioCam[®] MRm, Zeiss) digitalisiert. Das hierzu verwendete Programm war Axio Vision Rel. 4.6 (Carl Zeiss).

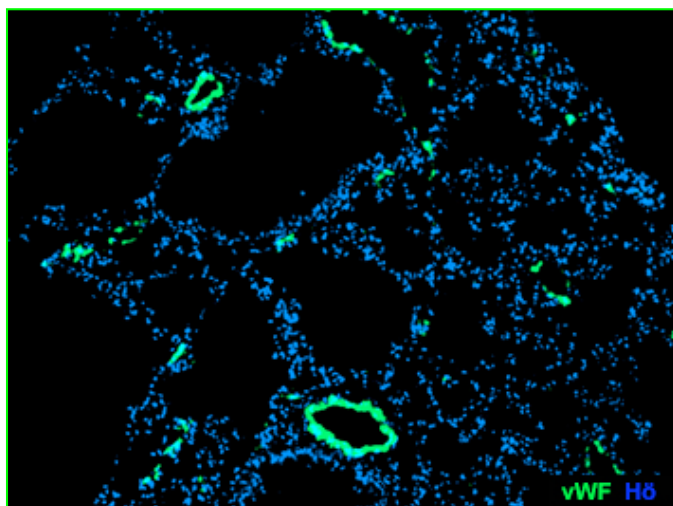


Abbildung 2.6

Übersichtsaufnahme einer Mauslunge. Kernfärbung mit Höchst (blau), Endothelfärbung mit von Willebrand Faktor (grün)

Zur Modulierung der Fluoreszenz-Intensität wurde FluoArc-brightness[®] (Zeiss) im Mikroskop zwischengeschaltet.

Tabelle 2.4 *Objektive*

5x/0,15	Plan-Neofluar (Zeiss), 440321
10x/ 0,13	Plan-Neofluar (Zeiss), 440331
40x/ 0,75	Plan-Neofluar (Zeiss), 440351
100x/ 1,3 Öl*	Plan-Neofluar (Zeiss), 440481

*Immersol[™] (Zeiss), 518F

Tabelle 2.5 *Filter*

Rot	F36-750 HC m FISH Sp. Red
Grün	F36-720 HC-m FISH Sp. Green
Blau	F36-513 HC-Set Dapi

2.3.4. Konfokale Mikroskopie

Alle konfokal angefertigten Fluoreszenzaufnahmen wurden mit freundlicher Unterstützung von S. Dietzel an dem Leica TCS SP5 Mikroskop im Walter Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin durchgeführt. Die digitale Weiterverarbeitung erfolgte mittels Leica Microsystems LAS AF Lite.

Die Lungenpräparate wurden mit dem Cryostat in einer Schichtdicke von 10-50 µm geschnitten. Im Anschluss wurden sie immunhistochemisch mittels Antikörper gegen vWF und die Tumorzellen markiert.

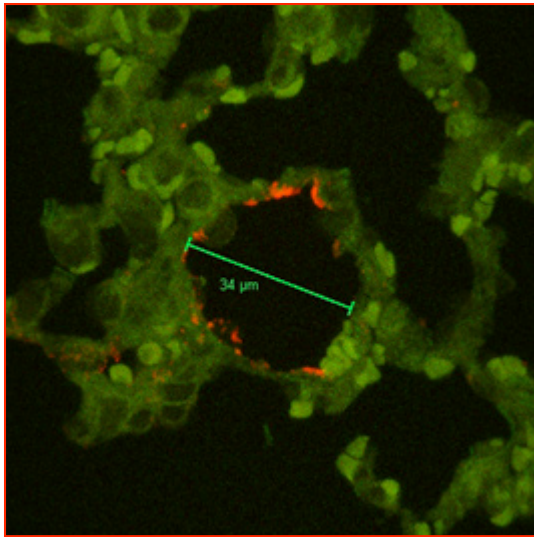


Abbildung 2.7

Lungenalveolen mit Anschnitt eines großen Gefäßes
(Antikörperfärbung gegen von Willebrand Faktor, rot)

2.4. Genanalysen und Immunassay

2.4.1. RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurden ca. 30 mg mit RNALater[®] (Ambion) konserviertes Lungengewebe verwendet. Dieses wurde nach Zugabe von 600 µl Lysis-Puffer (RA1 mit 1% β-Mercaptoethanol, Fa. Macherey-Nagler) für 30-60 Sek. homogenisiert (Heidolph Homogenisator) und stand als Flüssigkeit zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

Die RNA-Isolierung selbst erfolgte dann nach dem Protokoll des RNA II Kit NucleoSpin[®] (Macherey-Nagler) über die Bindung an eine Säulenmatrix. Das Eluat mit H₂O enthält dabei die gesamte RNA. Diese wurde mittels Spektrophotometrie und Agarose-Gel-Elektrophorese (Kap. 2.4.4) auf die RNA-Qualität geprüft.

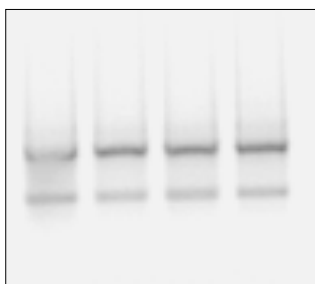


Abbildung 2.8

Agarose Gel-Elektrophorese. RNA von
Mauslungen, 2 Tage p.i.; n=4

Bei der photometrischen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen wurde 1 AU (Absorptions Einheit) = 40 µg/ml RNA eingesetzt und der Absorptionsquotient $A_{260/280}$ sollte zwischen 1.9 und 2.1 in 10 mM Tris-Puffer liegen. War dieses RNA-Reinheitskriterium nicht erreicht (z.B. durch Kontamination mit Proteinen) oder lag die RNA-Konzentration unter 150 µg/ml, wurde die RNA-Isolierung wiederholt.

Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.4.2. cDNA Synthese

Zur Herstellung von 30 µl cDNA wurden 2 µg RNA mit DMDC-Wasser auf ein Volumen von 19,5 µl verdünnt und bei 75°C für 3 Min. inkubiert. Nach Zugabe von je 10,5 µl eines „Synthese“-Mixes (Tab. 2.6) erfolgte die erneute Inkubation für 60 Min. bei 37°C und darauf folgende 10 Min. bei 95°C. Die so gewonnene cDNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

Tabelle 2.6 *cDNA-Synthese-Mix*

cDNA-Synthese-Mix	1,0 µl	45 µM Oligo p(dT) ₁₅ -Primer (Roche Diagnostics, Mannheim)
	6,0 µl	5x First-Strand-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe)
	1,5 µl	10 mM dNTP-Mix (Eppendorf, Hamburg)
	1,0 µl	30 U/µl Rnase-Inhibitor (Eppendorf, Hamburg)
	1,0 µl	200 U/µl M-MLV-RT (Invitrogen, Karlsruhe)
	10,5 µl	+ RNA

2.4.3. PCR-Amplifikation

Zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden 3 µl cDNA in einem Ansatz (Tab. 2.7) von 47 µl suspendiert und durch Zugabe eines Tropfens Öl vor dem Verdunsten im Cycler geschützt. Es folgte die Weiterverarbeitung durch den Robo Cycler[®] (Stratagene) mit der Prädenaturierung der cDNA bei 94°C für 60 Sek. Je nach Primer schloss sich eine x-fache Abfolge von Denaturierung (45 Sek., 94°C), Annealing (45. Sek., Temperatur je nach Primer) und Elongation (60 Sek., 72°C) an. Abschließend erfolgte eine 10-minütige Elongation bei 72°C.

Tabelle 2.7 *Second-strand PCR-Ansatz*

Second-strand PCR-Ansatz	5,0 µl	10 x PAN-PCR-Puffer (PAN-Systems GmbH)
	1,5 µl	50 mM MgCl ₂ (PAN-Systems GmbH)
	37,8 µl	DMDC-H ₂ O
	0,5 µl	10 mM dNTP-Mix (Eppendorf)
	Je 1,0 µl	20 µM Primer-Verdünnung (ff/r)
	0,2 µl	5 U/µl PAN-DNA-Polymerase (PAN-Systems GmbH)
	47,0 µl	+ 3 µl cDNA (= 0,2 µg RNA)

Für die Auswertung der amplifizierten Fragmente erfolgte die Auftrennung im Agarose-Gel (0,8-1,2%) für 60-90 Min. bei 90V und 70mA (Kap. 2.4.4). Als Referenzwert im Gel liefen je 5 µl MassRuler[®] Express DNA Ladder LR mit (Fa. Fermentas, Fragmentgrößen 1000-700-500-300-200-100 bP).

Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde das Gel unter die UV-Lampe (254nm, Fa. Bachofer, Reutlingen, Kamera: CCD Video Camera Module, Fa. Kaiser, Stuttgart) gelegt und mithilfe der Analyseprogramme BioCapt und Bio Profil (Bio 1D) wurden die Ergebnisse der RT-PCR digital verarbeitet und ausgewertet.

2.4.4. Agarose Gel-Elektrophorese

Für die Agarose Gel-Elektrophorese wurde ein Gel mit 1,25%iger Agarose zusammen mit 1x TAE Puffer aufgekocht und nach Zugabe von GelRed in die Formen gegossen. Die Kämme wurden daraufhin zur Formung von Taschen gesteckt und das Gel mit 1x TAE Puffer überschichtet. Nach ca. 30 Min. wurden die Taschen mit je 0,5 µg RNA, bzw. 10 µl cDNA zusammen mit einem Gel-Loading-Puffer beladen. Bei DNA-Auswertungen wurde außerdem noch ein Marker (Kap. 2.4.3) als Referenzwert aufgetragen (Abb. 2.9).

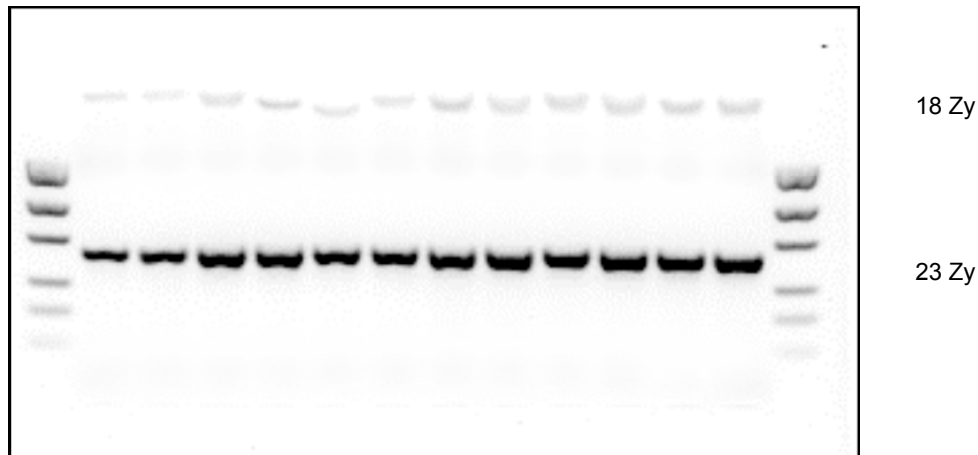


Abbildung 2.9 Agarose Gel-Elektrophorese für GAPDH, 438 bp, (18, 23 Zyklen)
 Marker: MassRuler® Express DNA Ladder LR (Fragmentgrößen 1000-700-500-300-200-100 bp)

Tabelle 2.8 Verwendete Materialien der Agarose Gel Elektrophorese

1,25% Agarose	Agarose LE, Analytical Grade (Promega Corporation, Madison, USA)
1x TAE-Puffer	2M Tris-Acetat; 0,05 M EDTA; ph 8,3
Gel Red 10.000 in DMSO	Biotrend, 41002
MassRuler® ExpressDNA Ladder, LR Forward	Fermentas – Life Sciences, SM1263
10 mM Tris Puffer	
Agarose Gel - Lauf	Pulsed Power Supply PPS 200-1D (MWG-Biotech GmbH, Ebersberg)
Spektrometrie	Biophotometer (Eppendorf)

2.4.5. Illumina® Array

Nach Isolierung der RNA (Kap. 2.4.1) erfolgte die cRNA-Synthese mit einer Biotin Markierung sowie das Hybridisieren mit genspezifischen Nukleotiden auf Mikrobeads nach dem Protokoll des Herstellers (Sentrix Mouse-6 Expression Beadchips (Illumina; San Diego)). Die Testung wurde am Institut für Tumorbiologie und Tumorimmunologie der Medizinischen Klinik II in Köln (Dr. S. Debey-Pascher) durchgeführt.

2.4.6. Immunassay – ELISA

Für die Messung der Faktoren VEGFA (R&D, MMV00, Quantikine VEGF ELISA Mouse), PGF (R&D, MP200, Quantikine PlGF2 ELISA Mouse) und proANP (Bioss Diagnostica Eching, BI 20892, proANP ELISA) im murinen Plasma wurden kommerziell erhältliche ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) entsprechend dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Die Messung der Farbreaktion erfolgte mit dem ELISA Reader EAR 400 AT der Firma SLT/TECAN (Crailsheim). Die Auswertung der Standardkurven und die Bestimmung der Konzentration erfolgte mit dem Programm EASY FIT (SLT).

2.5. Statistik

Statistische Analysen wurden mit dem Programm SigmaPlot® 10 für Windows durchgeführt. Dabei wurden nicht parametrische Tests (z.B. Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) für nicht normalverteilte Werte, bzw. univariate Varianzanalyse-Tests (ANOVA) eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ angesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Tumorzellansiedlung

Zur Charakterisierung des frühen Metastasierungsverhaltens von Melanomzellen wurden je 2×10^5 B16/D5-Zellen in die Schwanzvenen von Mäusen injiziert. Nach der Injektion verteilten sich die Tumorzellen durch die Blutbahn im gesamten Körper und siedelten sich im Verlauf in verschiedenen Organen an. In nachfolgenden Experimenten wurde die Ansiedlung der Melanomzellen in der Lunge in einem Zeitfenster von 2 Stunden bis 12 Tage mittels Molekulargenetik und Immunhistochemie verfolgt und der Mechanismus der frühen Metastasenansiedlung charakterisiert.

3.1.1. Beobachtung im Zeitverlauf

Um den zeitlichen Verlauf der Metastasierung darzustellen, wurden die murinen Lungen an den Tagen 0-12 nach der Tumorzell-Injektion entnommen. Danach wurde der Ablauf der Tumorzellverteilung zum einen immunhistochemisch an Schnittpräparaten dargestellt, zum anderen anhand eines Melanom-spezifischen Markers molekularbiologisch quantifiziert.

Die Auswertung der Anzahl an Melanomzellen in der Lunge erfolgte zunächst mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die metastatischen Läsionen wurden an 6 Mauslungen (3 Gesichtsfelder pro Lungenflügel bei 50facher Vergrößerung; $n=18$) zu definierten Zeitpunkten ($n=3$) ausgezählt. Parallel dazu erfolgte die Quantifizierung des Melanom-spezifischen Proteins „Pmel“ (prämelanosomes Protein) mittels Expressionsanalyse im Zeitverlauf.

Wenn man den Verlauf der Tumorzellanzahl in der Lunge über mehrere Stunden und Tage mittels Fluoreszenzmarkierung beobachtet, erkennt man eine anfängliche Anflutung von Melanomzellen im Zweistundenwert. Einzelne migrierende Zellen wurden zu diesem frühen Zeitpunkt bereits beobachtet (Abb. 3.1). In der Abbildung erkennt man einen Gefäßquerschnitt (rot) im septalen Lungenparenchym. Eine Tumorzelle (grün) wandert durch das Endothel nach extraluminal. Die lichtmikroskopische Aufnahme veranschaulicht das Verhältnis der Zellen zueinander.

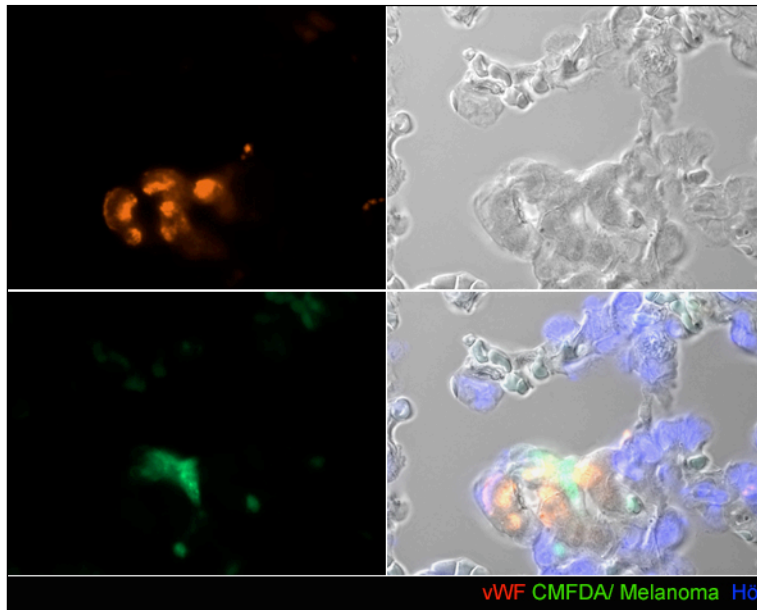


Abbildung 3.1 Migrierende Tumorzelle 2h nach i.v. Injektion.

Histologischer Schnitt aus der Lunge 2 Stunden nach Tumorzellinjektion. Vergrößerung 400fach, Darstellung der Gefäßwand mit Cy3-markierten Antikörpern gegen von Willebrandt Faktor. Die Tumorzellen sind mittels CMFDA grün markiert.

Der anfänglichen Tumorzellanflutung (2-Stunden nach Injektion, $n_{MW} =$ Mittelwert der Tumorzellen/Gesichtsfeld = 39,7) folgt ein drastisches Absinken der Tumorzell-Menge bereits nach 24 Stunden. Einen Tag nach Injektion befanden sich nur noch 5% ($n_{MW}= 2,28$) der primär gezählten Tumorzellen im Lungenparenchym, 48h danach lediglich 0,7% ($n_{MW}= 0,28$) (Abb. 3.2). Dies zeigt eine erhebliche Ineffizienz des frühen Metastasierungsprozesses ab dem Zeitpunkt der intravasal befindlichen Tumorzelle.

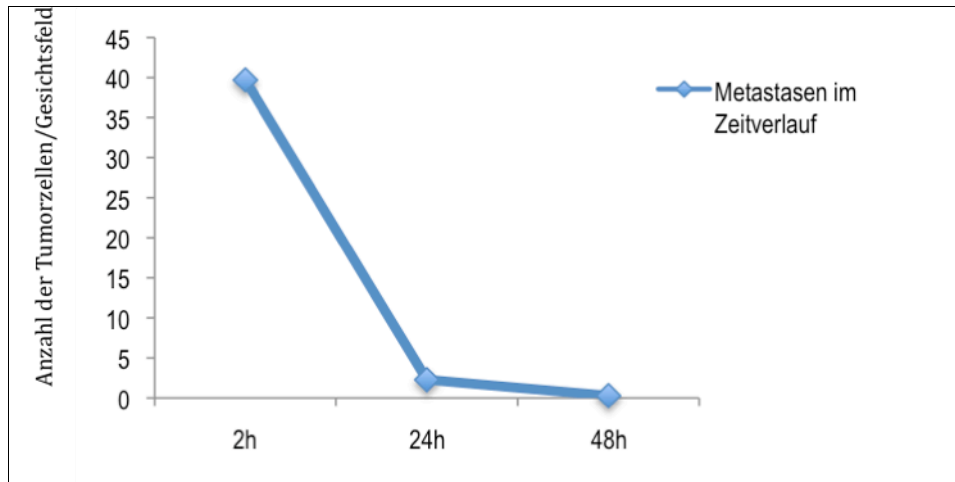


Abbildung 3.2 Histologische Auswertung der Metastasenanzahl von Lungenschnitten am Tag 0-2 nach Injektion

Auszählung der Tumorzellen pro Gesichtsfeld (Vergrößerung: 40x, Schnitte 7µm); pro Tag (n=3) wurden 6 histologische Schnitte von je 3 Tieren (n= 3x6) ausgewertet (n_{Ges}= 3x18).

Relative Tumorzell-Anzahl im Vergleich mit Tag 0 (als 100%): Tag 1: 5,74%, Tag 2: 0,7%

Der weitere Verlauf wurde mit Hilfe der PCR untersucht. Dabei wurde das tumorspezifische Signal Pmel als Maß für die Zahl der Tumorzellen amplifiziert und bezogen auf das house-keeping Gen GAPDH wiedergegeben. Untersucht wurde ab dem Tag 2, da hier die geringste Tumorzellanzahl im Lungenparenchym zu erwarten war. Die Ergebnisse bestätigten die fluoreszenzmikroskopisch beobachtete geringe Anzahl an Tumorzellen. Der Pmel Wert lag am Tag 2 nach Tumorzellinjektion demnach kaum über dem Kontrollwert. Auch Tag 3 weist wenig metastasierende Zellen auf. Erst am 4. Tag post injectionem kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Tumorzellmenge in der Lunge. Am Tag 6 konnten wir eine Zunahme des Pmel Signals in der Lunge – als Ausdruck der Vermehrung der Tumorzellen – auf den 10fachen Wert von Tag 2 beobachten (Abb. 3.3-4).

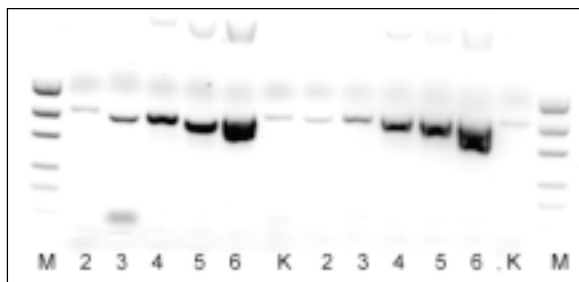


Abbildung 3.3 Agarose Gel

Agarose Gel der PCR Amplifikation von Pmel aus der Lunge von Mäusen am Tag 2-6 nach i.v. Injektion von B16 Tumorzellen. Amplicon von 717 bp. Jedes Produkt entspricht der RNA von 4 Mäusen in 2 getrennten Versuchsansätzen.

Marker: MassRuler® ExpressDNA Ladder LR Forward.

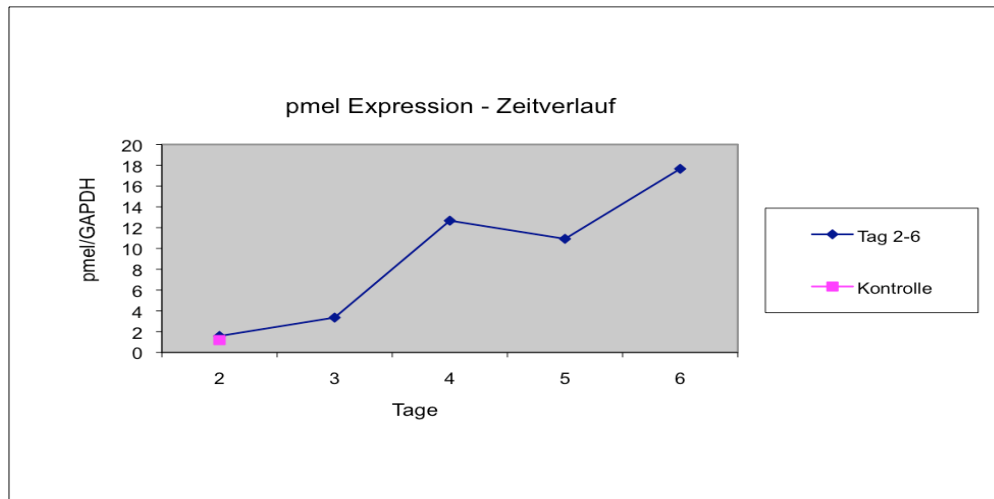


Abbildung 3.4 Verlauf des Pmel-Signals im Zeitverlauf - graphische Auswertung

Auf der y-Achse der Quotient aus pmel/GAPDH, auf der x-Achse der Zeitverlauf in Tagen nach B16/D5 Tumorzellinjektion. Kontrolle: Unbehandelte Mauslunge; Werte 2fach gemessen, n= 4 Mäuse.

Die Graphik zeigt einen deutlichen Anstieg der mPmel-Werte in den Lungen der Versuchstiere über die Zeit.

Im weiteren Verlauf proliferieren die überlebenden Tumorzellen und es kommt zur Ausbildung makroskopisch sichtbarer Metastasen.

Abb. 3.5 zeigt beispielhaft den zeitlichen Verlauf an immunhistologisch gefärbten Präparaten. 2 Stunden nach Injektion finden sich Tumorzellen diffus verstreut im Lungenparenchym. Einen Tag nach der Injektion reduziert sich die Anzahl der Tumorzellen deutlich und bleibt auch am Tag 3 im Wesentlichen unverändert. Im Unterschied dazu demarkiert sich der makroskopisch sichtbare Tumor am Tag 12 deutlich vom Lungenparenchym.

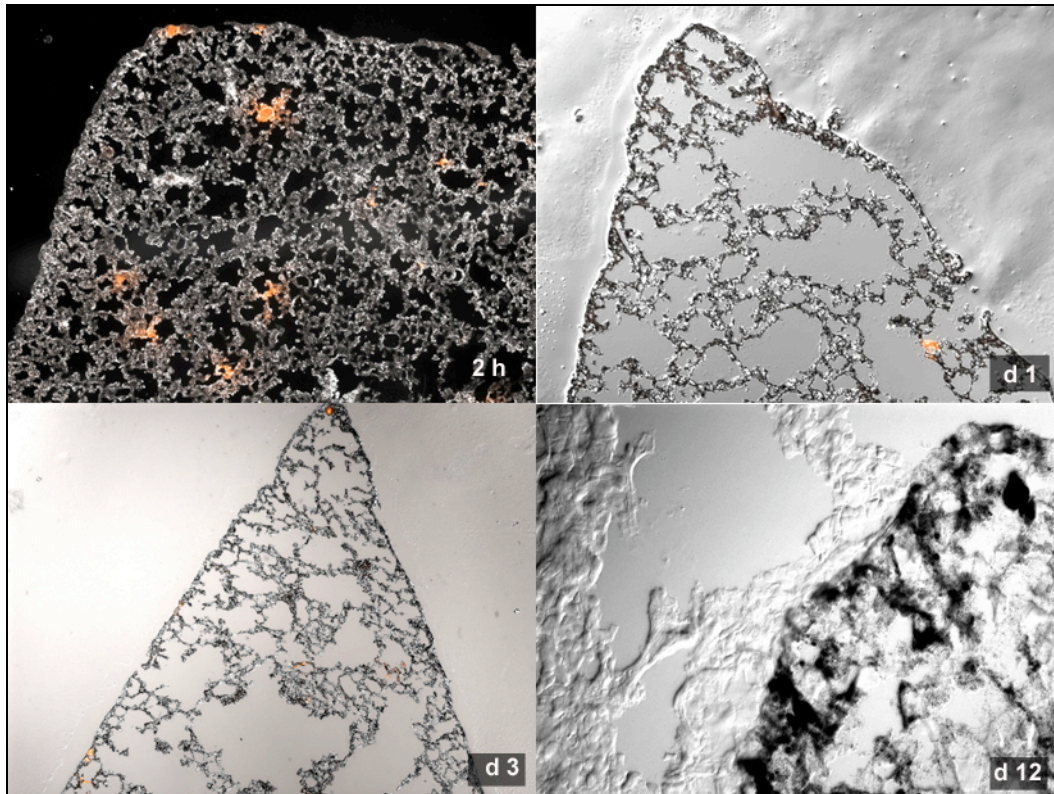


Abbildung 3.5 Histologische Bilder von Mauslungen an den Tagen 0-12 nach Tumorzellinjektion

Die Bilder der Tage 0-3 zeigen Lungenübersichtsaufnahmen (Zeiss Axiophot®, Objektive Plan-Neofluar 50fache Vergrößerung) mit den Tumorzellen in rot (DiI). Am Tag 12 grenzt sich der Tumor durch den hohen Melaningehalt deutlich gegenüber dem Lungenparenchym ab (400fache Vergrößerung).

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass die Tumorzellansiedlung in der Lunge ineffektiv ist. Nur 0,7% der primär gefundenen Tumorzellen waren am Tag 2 noch nachweisbar. Die meisten Zellen scheinen abzusterben. Nur wenige überleben und beginnen im Verlauf zu proliferieren. Was begünstigt also das Überleben dieser Tumorzelle vor Ort? Und welche Metastasierungs-begünstigenden Faktoren fehlen den absterbenden Tumorzellen?

Wir untersuchten die Verteilung der Tumorzellen in der Lunge. Es galt zu erforschen, ob gewisse Lokalisationen innerhalb der Lunge eher Metastasen aufweisen als andere. Gibt es eine präferentielle Ansiedlung?

3.1.2. Lokalisation der Ansiedlung

Durch den pleuranahen Unterdruck und die somit besseren Perfusionsverhältnisse im Lungenparenchym kann angenommen werden, dass sich die Tumorzellen vorwiegend marginal in der Lunge verteilen. Die Übersichtsaufnahmen der angefertigten Lungenpräparate belegen jedoch eine weitgehend homogene Verteilung im gesamten Lappen. Dies ist

exemplarisch sowohl in der 2-Stunden-Aufnahme (Abb. 3.6) wie auch im weiteren Metastasierungsverlauf (Tag 0-3) zu sehen (Abb. 3.5).

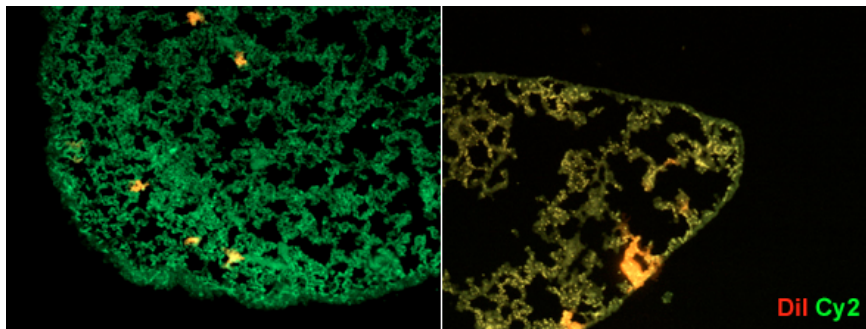


Abbildung 3.6 Tumorzell-Verteilung 2h nach Injektion

Kyroschnitt von der Lunge von Tieren 2 Stunden nach Injektion von Tumorzellen. Die Tumorzellen sind mit DiI markiert, die Lungengefäße mit dem Lektin LEL-Grün. Vergrößerung: 50fach.

Es wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob es innerhalb des Lungenparenchyms präferentielle Tumorzellansiedlungen gibt.

3.1.2.1. Tumorzellen in unmittelbarem O₂-Kontakt

Die Lunge stellt durch ihre anatomische Beschaffenheit mit weitgehend luftgefüllten Räumen ein besonderes Organ der Metastasierung dar. Neben dem Alveolarepithel, das in direktem Kontakt zum Sauerstoff steht, befinden sich im Lungeninterstitium einzelne Fibroblasten, Kollagenfasern, elastische Fasern sowie ein dichtes Netz an Kapillaren. Damit sind die Bedingungen hinsichtlich der Oxygenierung der metastatischen Tumorzelle optimal. Wir untersuchten an histologischen Schnitten die Anzahl der Tumorzellen, die in unmittelbarem Sauerstoffkontakt standen. D.h. wir zählten all jene Tumorzellen, die durch ihre Zellmembran direkt an den Alveolarraum grenzten. Dazu erfolgte eine Auszählung von fluoreszierenden Tumorzellen an 20 histologischen Präparaten unterschiedlicher Tage (0-6) nach Tumorzellinjektion (n= 2-3 Präparate pro Tag). 100 Tumorzellen wurden in diesem Screening geortet. 81% der untersuchten Tumorzellen befanden sich in den Alveolarsepten mit direktem Kontakt zum alveolaren Sauerstoff (Diagramm 3.1, Abb. 3.7) und nur 19% der Zellen im Interstitium oder im und um dem Gefäßlumen.

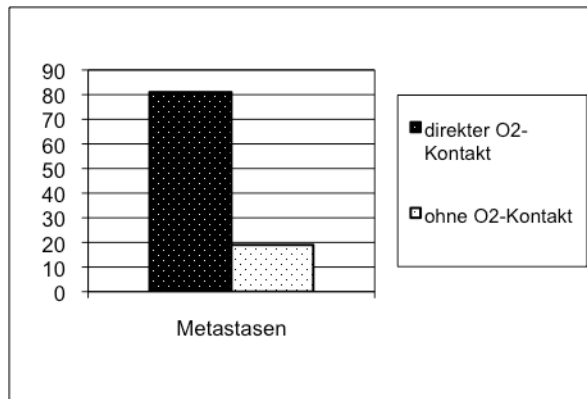


Diagramm 3.1 Verteilung der Metastasen in der Lunge ($n=100$)

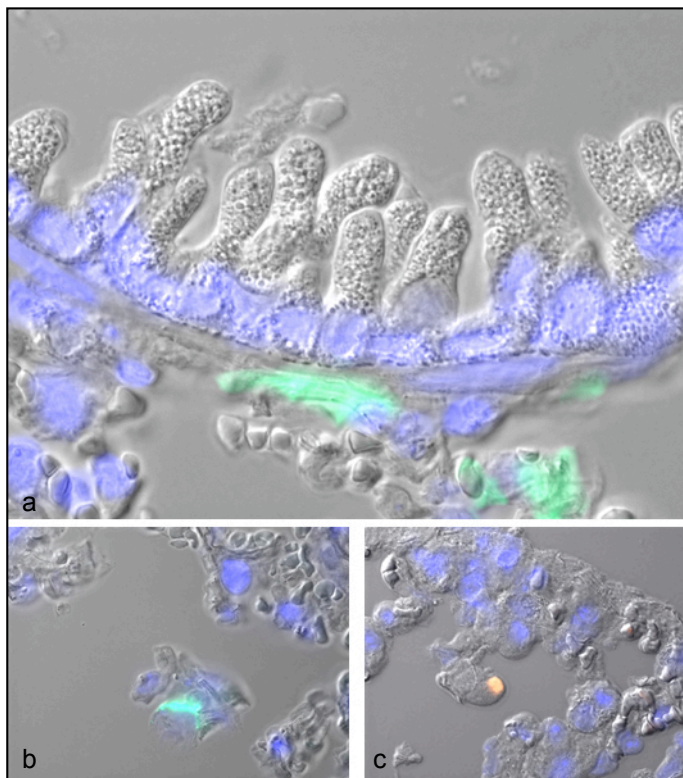


Abbildung 3.7 Histologie der Lunge bei 400facher (b,c), bzw. 1000facher (a) Vergrößerung in der DIC-Darstellung.

Die Tumorzellen befinden sich in direktem Kontakt zum Alveolarraum. **a:** Anschnitt eines Bronchus mit Darstellung der Sekretgranula im respiratorischen Epithel.

Tumorzellfärbung mit CMFDA grün **a, b**; Tumorzellfärbung mit DiI rot **c**; Kernfärbung mit Hoechst blau **a-c**.

3.1.2.2. Tumorzellen in und um Gefäße

Um die Lokalisation der Metastasen genauer definieren zu können, wurden immunhistochemische Färbungen der Endothelien, bzw. der vasalen glatten Muskelzellen vorgenommen. Diese erfolgten mittels LEL (*Lycopersicon Esculentum* Lectin), einem

effektiven Marker von Gefäßendothelien. Abbildung 3.8 zeigt beispielhaft die simultane immunhistochemische Darstellung von Gefäß und Tumorzelle, welche Rückschlüsse auf Lagebeziehungen erlaubt. Des Weiteren wurden Antikörper gegen α -SMA (Smooth Muscle Actin) zur Darstellung der glatten Gefäßwandmuskulatur verwendet und schließlich immunhistochemisch der von Willebrand-Faktor gefärbt. Dieser ist in den Endothelien, aber auch auf/in Thrombozyten zu finden.

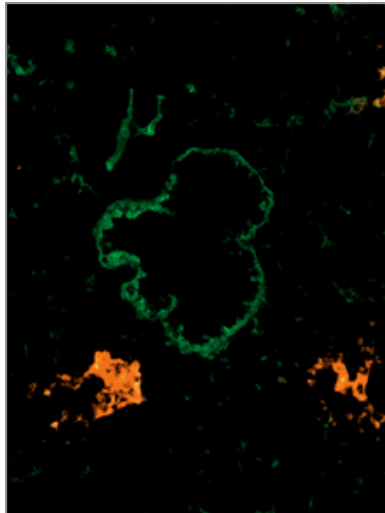


Abbildung 3.8 Immunhistochemische Darstellung von Gefäßwand und Tumorzelle

In diesem Präparat (100fache Vergrößerung) wurden die Gefäße mit LEL-FITC grün markiert, die Tumorzellen waren DiI-rot markiert.

Wie bereits gezeigt, war im frühen Stadium eine homogene Verteilung der Tumorzellen im gesamten Lungensegment vorzufinden. Es konnten nur vereinzelt Tumorzellen in Gefäßnähe dargestellt werden.

Besonders im weiter fortgeschrittenen Metastasierungsstadium (Tag 10-12 nach Injektion der Tumorzellen) wurden bei der Auswertung der histologischen Schnitte größere metastatische Läsionen in unmittelbarer Nähe von Gefäßen beobachtet (Abb. 3.9). Die Tumorzellen wachsen invasiv und relativ zirkulär von einem größeren Lungengefäß ausgehend in das Lungenparenchym. Stellt man nur die Fluoreszenz dar so wird ersichtlich, dass die metastatischen Zellansammlungen 10 bis 12 Tage post injectionem noch über kein eigenes Gefäßsystem verfügen (Abb. 3.9 e,f). Der Gefäßmarker vWF konnte im metastatischen Tumor selber nicht nachgewiesen werden.

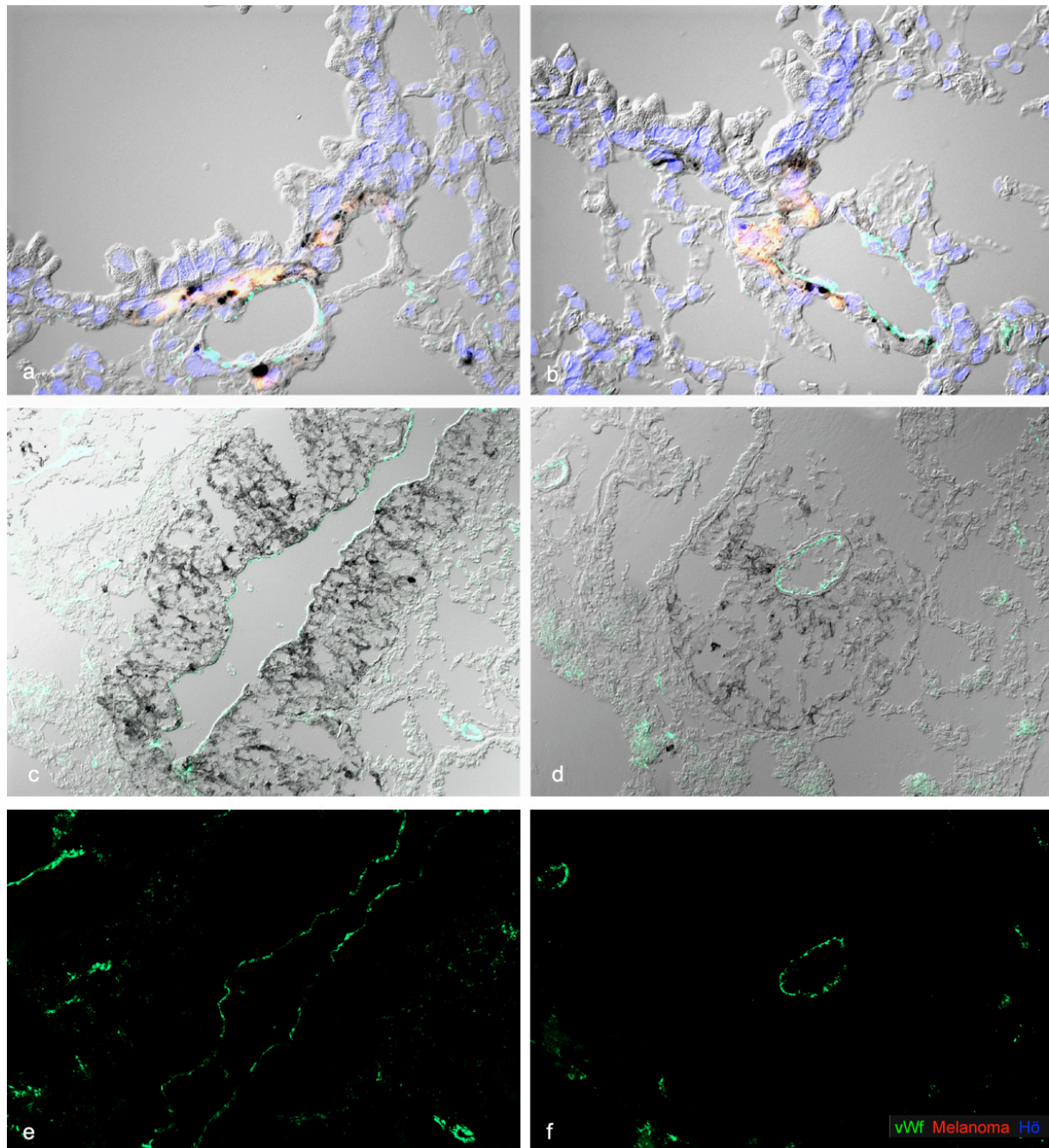


Abbildung 3.9 *Histologische Aufnahme der Lunge zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion.*

- a,b** Wachstum der Tumorzelle (Melanoma-AK, rot) zwischen Lungengefäß (vWF, grün) und Bronchus. Kernfärbung (Hoechst, blau), Tag 10 nach Tumorzellinjektion. Vergrößerung 400fach.
- c,d** Der Melanin-pigmentierte Tumor wächst zirkulär um das Lungengefäß (vWF, grün), Tag 12 nach Tumorzellinjektion. Vergrößerung 100fach.
- e,f** Wie Abb. c,d aber ohne lichtmikroskopische Überlagerung. Man erkennt die fehlende Vaskularisation des Tumors selber. Vergrößerung 100fach.

Die Beobachtung der Lokalisation der Tumorzellansiedlung ergab folglich den Hinweis auf eine homogene Verteilung in der Lunge mit präferentieller Ansiedlung in direktem Kontakt

zum Sauerstoff. Größere metastatische Ansiedlungen scheinen zirkulär um Gefäße zu wachsen und besitzen 12 Tage nach Tumorzellinjektion noch kein eigenes Gefäßnetz.

Im nächsten Schritt wurde die Art der Ansiedlung genauer untersucht.

3.1.3. Art der Ansiedlung

Warum sich Tumorzellen bevorzugt in manchen Organen niederlassen und wie es zur Ansiedlung derselben im neuen Gewebe kommt ist weitgehend ungeklärt. Diskutiert werden sowohl der Vorgang der Adhäsion durch die Tumorzelle, als auch das ortsbedingte mechanische, bzw. anatomische Hängenbleiben derselben.

3.1.3.1. Adhäsion

Die Adhäsion beschreibt einen Prozess, in welchem durch Zell-Zell-Interaktionen Verbindungen zwischen einer primär frei beweglichen Zelle und dem Endothel geschlossen werden. Diese Verbindungen werden oft von Integrinen vermittelt.

Zunächst wurden die Tumorzellen auf das Vorhandensein von Adhäsionsmolekülen untersucht. Die Genanalyse mittels Gene-Array ergab die Expression keiner der klassischen Adhäsionsmoleküle. B16-Melanom-Zellen besitzen weder die in der Leukozyten-Endothel Interaktion wichtigen E- und L- Selektine, noch Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle wie VCAM1 oder CD 54. Lediglich das β 1-Integrin CD 29 als Adhäsionsmolekül an extrazelluläre Matrix sowie F3/TF (Gerinnungs-Faktor III/ Tissue Faktor, Thromboplasmin) konnten nachgewiesen werden (vgl. Tab. 3.1).

Tabelle 3.1 Nachweis klassischer Adhäsionsmoleküle in B16/D5-Zellen

Gene-Array – Angaben in RLU; Ergebnisse sind der Mittelwert aus 3fach Bestimmungen.

CD62P	negativ
CD62E	negativ
CD62L	negativ
CD162	negativ
CD54	negativ
CD106/VCAM1	negativ
CD31	negativ

CD29	4725,22 P
F3/TF	762,72 P

Als Interaktionspartner vor Ort kommen für die Tumorzellen vor allem Endothelzellen in Frage. Zur Charakterisierung dieser wurden deshalb die Expression von Adhäsionsmolekülen in einer etablierten Endothel-Zelllinie (bEnd3) untersucht.

An den reifen Endothelzellen konnten typische Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden. CD31, als *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1), CD 62P als Membranprotein aktivierter Endothelzellen oder CD62E als Adhäsionsmolekül insbesondere von Leukozyten (vgl. Tab. 3.2).

Tabelle 3.2 Nachweis klassischer Adhäsionsmoleküle an bEnd3 Endothelzellen
Gene-Array – Angaben in RLU

CD62P	388,79 P
CD62E	222,92 P
CD62L	negativ
CD162	negativ
CD54	139,05 P
CD106/VCAM1	negativ
CD31	6436,50 P
CD29	3783,76 P
F3/TF	19,94 P

Um nun das Verhalten der Tumorzellen zu simulieren, wurde die Interaktion von Tumorzellen mit Endothelzellen in vitro untersucht. Dazu wurden Tumorzellen mit einem Monolayer von Endothelien in vitro inkubiert und das Verhalten der Tumorzellen beobachtet. Hierbei bestätigt sich die Hypothese der fehlenden Adhäsion. Suspensierte Melanomzellen interagieren nicht mit intakten Endothel-Layern. Die Tumorzellen schwimmen traubenförmig verklumpt auf dem Layer (Abb. 3.10, Abb. 3.11 a,c) und adhäreren nicht.

Doch wie verhält sich die Tumorzell-Endothel-Interaktion wenn man statt reifer, intakter Endothelien deren Vorläuferzellen nimmt und somit den Zustand einer Gefäßreparation simuliert?

Neben der Testung der Adhäsion von Tumorzellen an reife Endothelzellen testeten wir deshalb die Adhäsion an endothelialen Vorläuferzellen (EPC, *endothelial precursor cell*). Der Hintergrund hierfür war die Annahme, dass die Tumorzelle größenbedingt im Kapillarbett hängenbleibt. Dadurch kommt es im Gefäß zu einem postembolischen Schaden, welcher eine Sauerstoff-Minderversorgung des postembolischen Gebiets bewirkt. Es kann zu einer Hypoxie bedingten Leckage des Gefäßendothels kommen. Flüssigkeit kann nun aus der Kapillare in den 3. Raum entweichen, Matrix liegt frei. Dieser Gefäßschaden sollte dann Reparaturmechanismen triggern, die das Einschweben von EPC nach sich ziehen.

EPC werden im Zusammenhang mit endovaskulärer Gefäßreparatur und Wundheilungsprozessen als essentiell beschrieben⁶³. Sie werden aus dem Knochenmark mobilisiert um die Gefäßintegrität wiederherzustellen.

In vitro verändert sich die Interaktion der Zelllinien, wenn man statt reifer „bEnd3“ Endothelien unreife „T17b“ Endothelzell-Vorstufen (EPC) nimmt. Bereits zwei Stunden nach Inokulation der Tumorzellen mit den EPC waren keine freien Tumorzellen mehr im Überstand nachzuweisen. Bei der Untersuchung mit dem konfokalen Mikroskop fiel eine Vernetzung der Zellen untereinander (Abb. 3.11b) auf. Die Tumorzellen wandern durch den endothelialen Layer und durchbrechen diesen (Abb. 3.11d).

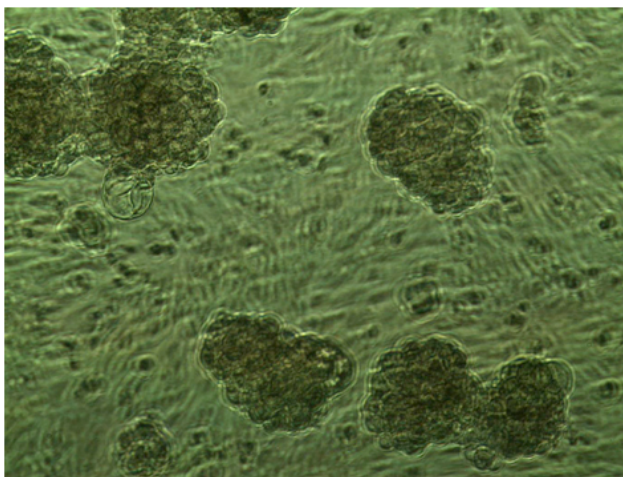


Abbildung 3.10 Phasenkontrastaufnahme der Tumorzell - Endothelinteraktion

In-vitro-Koinkubation von B16/D5-Melanomzellen mit bEnd3 Endothelien. Die Tumorzellen sind als Zellhaufen auf dem intakten Endothel zu sehen. Sie adhären nicht.

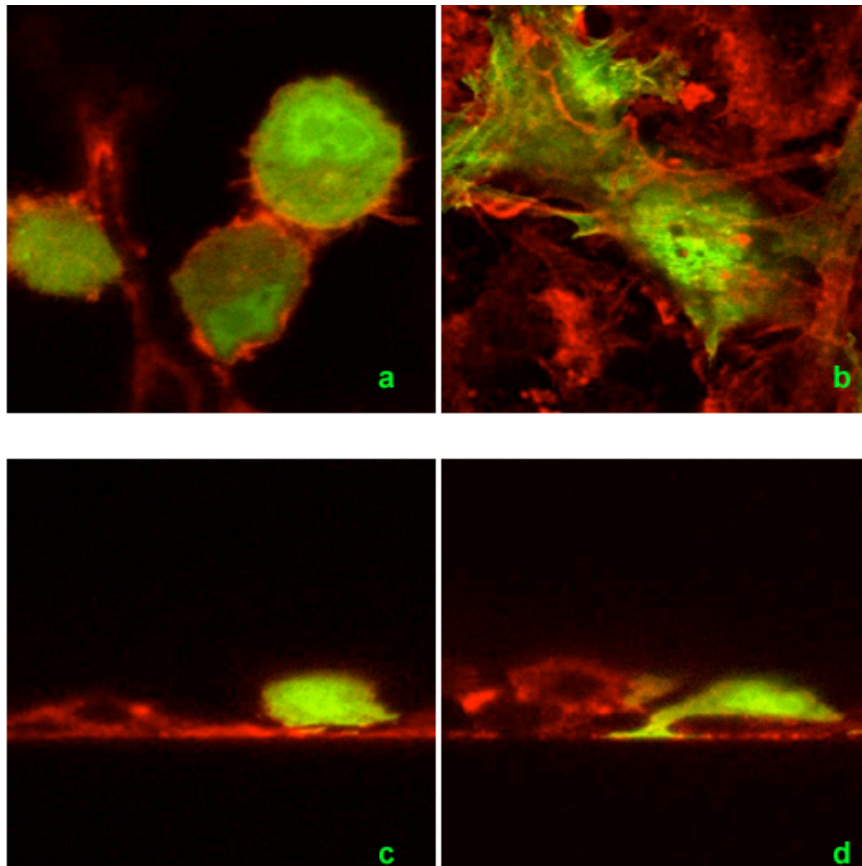


Abbildung 3.11 Konfokal-Mikroskopie der Tumorzell - Endothelinteraktion

a,c Bei reifem bEnd3-Endothel interagieren die Tumorzellen nicht mit dem endothelialen Monolayer.

b,d Bei den endothelialen Vorläuferzellen (EPC) adhären die Tumorzellen am Monolayer. Die Tumorzelle schiebt einen Zellausläufer zwischen die Endothelzellen, als erster Schritt einer Transmigration.

(Tumorzelle B16-D5 - GFP markiert. Endothelzelle - phalloidin/actin, konfokale Fluoreszenzmikroskopie, angefertigt von S. Linder)

Um nun die Gründe für dieses unterschiedliche Adhäsionsverhalten zu untersuchen, wurde eine Expressionsanalyse an den T17b Endothelien durchgeführt (Tab. 3.3). Die klassischen Adhäsionsmoleküle unterschieden sich nicht. Vor allem CD 29 sowie F3/TF (Gerinnungsfaktor III/ Tissue Faktor, Thromboplasmin) konnten jedoch gegenüber den reifen bEnd3-Zellen als deutlich verstärkt exprimiert festgestellt werden.

Tabelle 3.3 *Nachweis klassischer Adhäsionsmoleküle an unreifen T17b Endothelzellen*
Gene-Array – Angaben in RLU

CD62P	negativ
CD62E	negativ
CD62L	negativ
CD162	negativ
CD54	122,14 P
CD106/VCAM1	negativ
CD 31	negativ
CD29	5270,77 P
F3/TF	2654,8 P

CD29 ist nur ein Teil des Integrin-Moleküls (Integrin β -1). Das funktionelle Integrin besteht aus α - und β - Ketten. Im Falle von CD 29 können das α v-Integrin (CD51) oder auch CD 49 als α -Kette fungieren.

Tabelle 3.3 zeigt, dass eine Bindung der Tumorzellen über Fibrinogen/ Fibrin und CD 29 am wahrscheinlichsten ist. Durch F3 kann die Gerinnung in vivo aktiviert werden und eine Adhäsion (z.B. über Fibrinogen) erleichtert werden.

Durch die oben genannten Befunde ist eine Adhäsion der Tumorzelle an intaktes, reifes Endothel unwahrscheinlich. Viel mehr vermuten wir einen mechanischen Arrest, der einen postembolisch hypoxischen Schaden setzt. Dieser Schaden kann zur Matrixfreilegung sowie dem Einschweben endothelialer Vorläuferzellen führen, an welche die Tumorzellen binden können. Eine Adhäsion könnte somit sekundär ermöglicht werden.

3.1.3.2. Mechanischer Arrest

Der Durchmesser einer Kapillare im Endstromgebiet beträgt im Herzmuskel ca. 3-8 μ m und in der menschlichen Lunge rund 10 μ m^{64, 65}. Stellt man dem einen durchschnittlichen Tumorzell-Durchmesser von ca. 12-20 μ m gegenüber, so liegt die Vermutung eines mechanischen Arrests nahe. Abb. 3.12 verdeutlicht diese Größendiskordanz und veranschaulicht exemplarisch das Hängenbleiben der relativ undeformierbaren Tumorzelle.

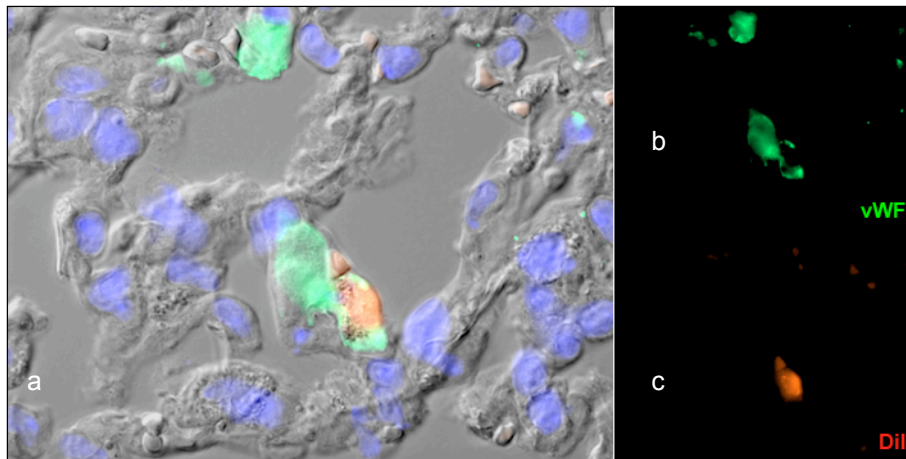


Abbildung 3.12 Histologisches Bild der Lunge in der DIC (a) sowie unter Ausblendung der DIC (b,c).

Nachweis einer intravasal liegenden Tumorzelle (rot), die das Gefäßlumen (grün) durch ihre Größe vollends ausfüllt. Aufnahme 1. Tag post injectionem. Vergrößerung 1000fach.

Die These des mechanischen Arrests impliziert, dass sich die wandernde Tumorzelle wie ein kleiner Embolus in der Lungenstrombahn verhält. Kommt es zum größenbedingten Hängenbleiben derselben führt dies zur ischämischen Läsion des postembolischen Gebietes durch Minderperfusion. Der pulmonale Widerstand kann somit durch diese Microemboli ansteigen.

Funktionell kann man dies durch ANP-Messungen (Atriales Natriuretisches Peptid) nachweisen. ANP, bzw. sein Vorläufer proANP wird in membrangebundenen Granula in den Kardiozyten gespeichert. Erhöhter pulmonaler Widerstand bzw. eine Ventrikelminderfunktion triggern durch eine erhöhte Wandspannung der Atria die Freisetzung von ANP, welche zu Vasodilatation und Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems führt.

In dem Mausmodell zur Untersuchung des frühen metastatischen Geschehens wurde proANP als stabilerer Marker benützt. ANP unterliegt starken Fluktuationen und ist durch seine HWZ von 2,5 Minuten für Langzeituntersuchungen ungeeignet.

In den Versuchen konnte ein signifikanter Anstieg der proANP-Werte nach Injektion der Tumorzellen im Zeitverlauf beobachtet werden. Die Plasmakonzentrationen von proANP wurden bei je 12 Mäusen (n=12) von Tag 0 bis Tag 6 untersucht. Der Plasmawert war dabei im Vergleich zur Kontrolle ab dem 1-Stundenwert erhöht (Diagramm 3.2) und stieg im Zeitverlauf noch an. Eine Signifikanz konnte an 3 Messzeitpunkten (Tag 2, 3 und 6) festgestellt werden.

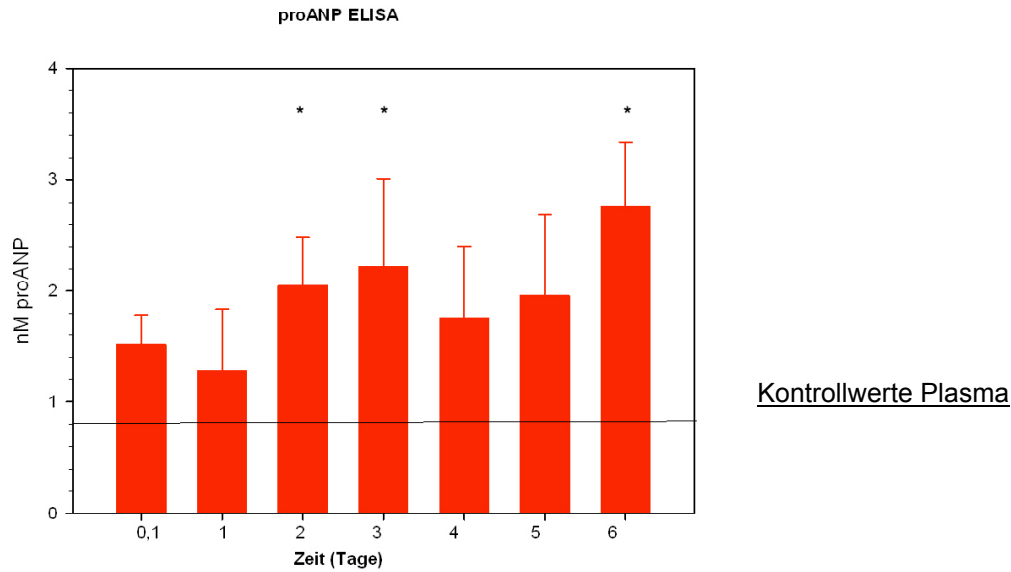


Diagramm 3.2 Konzentrationsverlauf von proANP im Plasma nach Tumorzellinjektion

Signifikanter Anstieg der proANP-Werte an den Tagen 2, 3 und 6 nach Injektion von B16/D5- Tumorzellen. Tumorzellinjektion am Tag 0, Messzeitraum 0,1-6 Tage (x-Achse), Angaben der proANP Werte in nM. Standard 0,9 nM, Referenz des Herstellers 1,4 nM. Kontrolle durch plasmatische proANP-Werte unbehandelter Mäuse (n=5).

Der Anstieg der proANP-Werte im Zeitverlauf zeigt die hämodynamische Bedeutung der Tumorzell-Einschwemmung. Der Tumorzell-Microembolus erhöht demnach durch den mechanischen Arrest den pulmonalen Widerstand. Diese Drucksteigerung im Kapillarbett würde wiederum zu Rechtsherzbelastung und zum Anstieg der ANP-Werte im Serum führen.

Zusammenfassend ergaben die Ergebnisse bis hierher also Hinweise auf ein größenbedingtes Hängenbleiben der Tumorzelle im Lungengefäßnetz bei fehlender Adhäsion.

Überleben und Proliferation sind danach an bestimmte Voraussetzungen der Tumorzelle und des Mikromilieus gebunden (Kap. 1.3.2).

3.2. Intrinsische und extrinsische Funktionen der Tumorzelle

In der Literatur wird das Überleben von Tumorzellen an die Bildung einer Nische geknüpft. Demnach induziert die Tumorzelle vor Ort Veränderungen (z.B. die Sekretion von Faktoren wie VEGF oder PGF), welche ihr die Proliferation und Ansiedelung im neuen Organ ermöglichen.

Ein möglicher Faktor, der die Ansiedlung von B16-Melanomzellen im Zielorgan ermöglicht, ergab sich aus der Expressionsanalyse in Tab. 3.1. Die Analyse von möglichen

Überlebensfaktoren im cDNA Array zeigte für die B16/D5-Tumorzelle eine hohe Expression von F3/ *tissue factor*. Damit besitzt die Tumorzelle thrombogene Eigenschaften und kann durch Aggregatbildung im Blut Microemboli verursachen. Gesundes Endothel bietet keine Andockstelle für die Tumorzelle. Kommt es jedoch zu Endothelschäden z.B. durch einen tumorbedingten Microembolus oder zum Auseinanderweichen der Endothelzellen (sog. *Vascular leak*), bietet dies der metastatischen Zelle die Möglichkeit an Matrix anzuheften. F3/ *tissue factor* aktiviert dabei Thrombin, welches wiederum Fibrin aus Fibrinogen spaltet. Fibrin ermöglicht folglich eine Adhäsion der Tumorzelle an Matrix.

Im Zusammenhang mit dem sog. *Endothelial leak* spielt insbesondere die Sekretion von VEGF-A eine tragende Rolle (Kap. 1.4). Diesbezüglich wurde eine Genexpressionsanalyse bei B16/D5-Melanomzellen durchgeführt, in der die Vertreter der VEGF-Familie untersucht wurden (vgl. Tab. 3.4).

Tabelle 3.4 Genexpression der B16/D5-Melanomzellen
(Angaben in RLU; Werte ≤ 100 entsprechen in der Regel einer fehlenden Expression)

Gene	Accession	EntrezGene	mean_D5
Vegfa	NM_009505.2	22339	1465,17
Vegfb	NM_011697.1	22340	1011,84
Vegfc	NM_009506.1	22341	324,29
Pgf	NM_008827.2	18654	118,03

In der Tabelle wird ersichtlich, dass insbesondere VEGF-A stark von den Tumorzellen exprimiert wird. Die Expressionsanalyse im c-DNA-Array zeigte aber auch, dass VEGF-B und VEGF-C exprimiert werden. Die Rolle dieser Faktoren wird in der Literatur kontrovers diskutiert. VEGF-C werden Funktionen in der Angiogenese und Lymphangiogenese zugeschrieben^{66,67}, VEGF-B soll anti-apoptotisch wirken und damit das Überleben der Zellen sichern⁶⁸.

Wir untersuchten also zunächst die Expression von VEGF-A *in vitro* und *in vivo*.

3.2.1. VEGF-A

In der Diskussion um die „prämetastatische Nische“ wird VEGF als entscheidender Faktor der Metastasierung genannt. Der *Vascular endothelial growth factor* führt zu einer Permeabilitätserhöhung der Endothelien und im Extremfall zum Auseinanderweichen derselben. Zudem spielt er eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese von Makrometastasen⁵¹.

Die Analyse der cDNA zeigte, dass die B16/D5-Zellen VEGF-A hoch exprimieren. Dass dies auch funktionell relevant ist, konnte die Analyse der Sekretion von VEGF durch die B16/D5-Melanomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen.

Die Sekretion von VEGF-A durch die Tumorzellen *in vitro* wurde mittels ELISA im Zeitverlauf gemessen. 2×10^5 B16/D5-Zellen wurden ausgesät. Nach 24h und 48h wurde der Überstand abgenommen und der VEGF-Sekretionswert bestimmt. Es zeigte sich dabei ein signifikanter Anstieg auf im Mittel 200 pg/ml im 24h-Wert und 1200 pg/ml im 48h-Wert (Abb. 3.13).

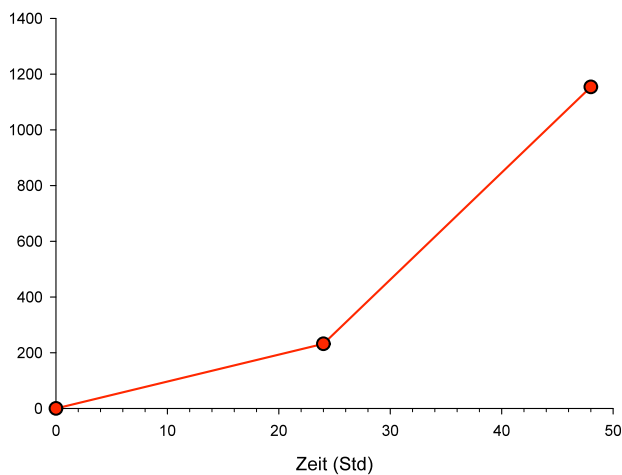


Abbildung 3.13 Verlauf der VEGF Konzentration im Überstand kultivierter B16/D5 Tumorzellen
Zeitverlauf Tag 0-2, Werte gemessen in pg/ml, Angaben als Mittelwert von 3fach Bestimmungen.

Für die Relevanz dieser Beobachtungen in der Zellkultur wurde dann VEGF-A im Plasma von Mäusen nach Tumorzellinjektion gemessen (Abb. 3.14). Gesunden Mäusen wurden B16/D5-Melanomzellen *i.v.* injiziert. Daraufhin erfolgten Blutabnahmen an den Tagen 0-6. Dabei stieg die VEGF-A Konzentration bereits 2 Stunden nach Injektion auf Werte von $51 \pm$

4,6 pg/ml. Im weiteren Verlauf war VEGF-A bei den Versuchstieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren an vier Messzeitpunkten signifikant erhöht (Tag 1: 59,9 pg/ml, Tag 4: 61,1 pg/ml, Tag 5: 53,9 pg/ml).

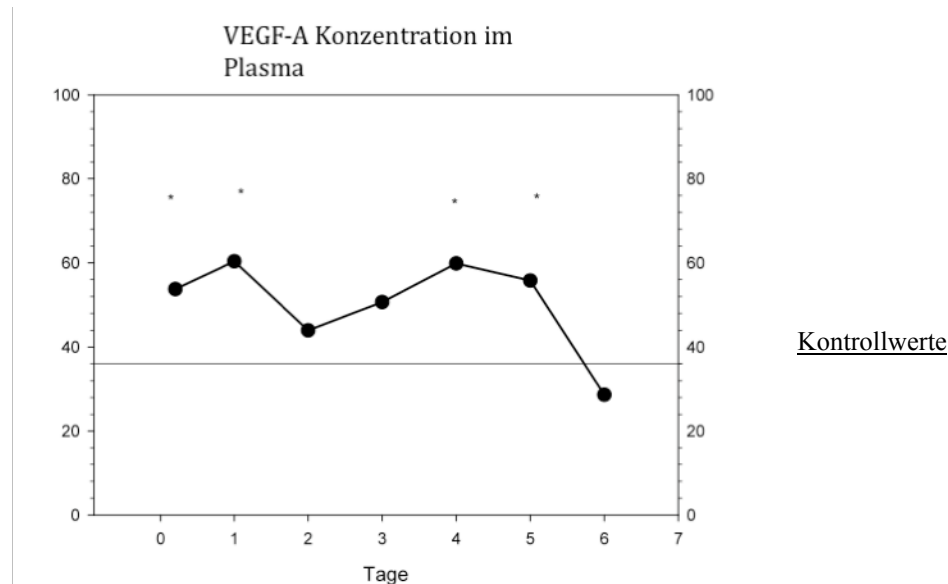


Abbildung 3.14 VEGF-A Plasmakonzentration nach Tumorzellinjektion

Zu jedem Zeitpunkt wurden n= 6 Mäuse ausgewertet, Angaben in pg/ml. Die Messung erfolgte mit Doppelwerten. Es zeigten sich an 4 Messzeitpunkten signifikant erhöhte Werte der VEGF-A-Konzentration.

Hiermit konnte die Expression sowie die Sekretion von VEGF-A in vitro und in vivo gezeigt werden. In vitro zeigte sich dabei die steigende Sekretion von VEGF über die Zeit. In vivo bestanden signifikant erhöhte Werte an mehreren Messzeitpunkten, wobei hier eine mögliche VEGF-Sekretion durch das Endothel Einfluss auf die Werte haben könnte.

Das Vorhandensein von VEGF könnte der Tumorzelle vor Ort die Nischenbildung sowie die Emigration und Proliferation im fremden Organ ermöglichen.

Im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen wird neben VEGF die Funktion von PGF vermehrt in der Literatur genannt⁶⁹. So berichten Kaplan et al., dass PGF ebenso wichtig wie VEGF für die Nischenbildung sei. Aus diesem Grund untersuchten wir PGF – als weiteren Vertreter der VEGF-Superfamilie – hinsichtlich seiner Rolle bei der Nischenbildung.

3.2.2. PGF

Der Placenta derived growth factor wurde erstmals 1991 in humaner Plazenta entdeckt⁷⁰ und wird während des gesamten Gestationszyklus exprimiert. PGF ist in seiner Struktur dem VEGF-A ähnlich⁷¹ und bindet an den VEGF-Rezeptor-1, nicht jedoch an den VEGF-Rezeptor-2. Während eine Suppression von PGF in der Embryonalentwicklung keine Folgeschäden mit sich trägt, scheint es bei der Angiogenese nach ischämischen Insulten, bei Entzündungen, Wundheilung und Tumormetastasierung eine entscheidende Rolle zu spielen⁶⁹. Auslöser für die PGF Sekretion ist ähnlich wie für VEGF die Hypoxie.

Betrachtet man die ankommende Tumorzelle als Microembolus, kann es zu Ischämie – welche wiederum einen Anstieg von PGF durch Hypoxie triggert – kommen. Der Nachweis von PGF im Plasma (Abb. 3.15) der Mäuse ergab einen Peak zwei Stunden post injectionem mit einem daraufhin abflachenden Wert, der knapp über der Nachweisgrenze liegt. Dieser bleibt über die Zeit relativ konstant und ist nur an einem weiteren Messzeitpunkt (Tag 3) signifikant höher als der Kontrollwert.

Angemerkt sei, dass es sich im Vergleich zu dem oben aufgeführten VEGF-A um deutlich geringere Konzentrationen handelt.

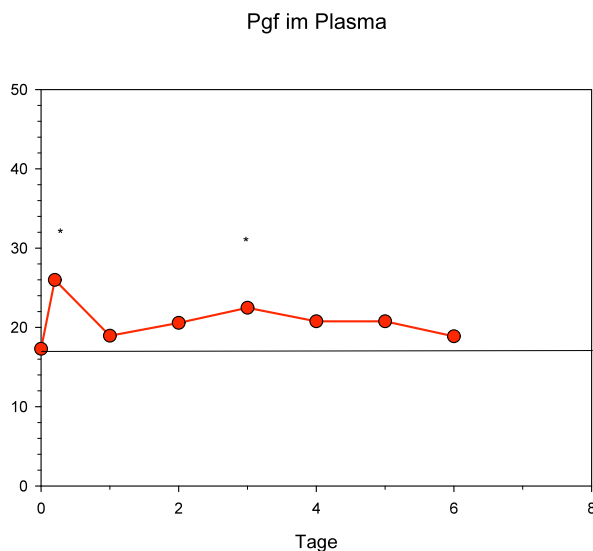


Abbildung 3.15 PGF Konzentration im Plasma

Zu jedem Zeitpunkt wurden n= 6 Mäuse ausgewertet, Angaben in pg/ml. Signifikant erhöhte Werte an 2 Messzeitpunkten.

Die Tumorzelle kann demnach ihre unmittelbare Umgebung durch Sekretion der Faktoren VEGF-A und PGF vor allem im frühen Stadium der metastatischen Ansiedlung beeinflussen.

Sie induziert lokale Veränderungen und schafft ein Mikromilieu, welches es im Folgenden zu untersuchen galt.

3.3. Das pulmonale *Mikromilieu*

Nach dem „Seed and soil“-Prinzip von Sir Paget, trägt nicht nur die Tumorzelle selber zur Schaffung metastasierungs-begünstigender Bedingungen bei, sondern auch das umliegende Lungengewebe. Insbesondere tumor-assoziierte Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten, VEGF- R_1^+ Knochenmark-Vorläuferzellen und Makrophagen spielen laut Kaplan et al. eine entscheidende Rolle in der Sekretion prometastatischer Faktoren (Wachstumsfaktoren, Chemokine, Fibrinogen ecc.) und der Bereitstellung eines idealen Mikromilieus⁷².

Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die prämetastatische Nische⁷³ und die darin vorkommenden Faktoren in einem i.v. Modell genauer untersucht.

Insbesondere wurden folgende Faktoren untersucht:

- 1) VEGF- R_2^+ Endothel Vorläuferzellen
- 2) Von Willebrand Faktor
- 3) Fibronektin
- 4) VEGF- R_1^+ Knochenmark Vorläuferzellen (BMPC)

3.3.1. VEGF- R_2^+ Zellen

Der VEGF-Rezeptor-2 wird von Gefäß- und Lymph-Endothelzellen sowie Megakaryozyten und hämatopoetischen Stammzellen an ihrer Zellmembran exprimiert⁷⁴. Ein Anstieg von VEGF- R_2 in der Nische kann demnach durch das Einwandern VEGF- R_2^+ -Zellen oder durch die lokale Induktion von VEGF- R_2 z.B. auf dem Endothel stattfinden. Dabei ist der Signalweg über VEGF-Rezeptor-2 verantwortlich für die mitogenen, angiogenen und permeabilitätserhöhenden Effekte des VEGF-A⁵³.

Zur Überprüfung des Vorkommens von VEGF- R_2 wurde zuerst in der PCR die Expression der RNA überprüft. Beobachtet man den Verlauf der VEGF- R_2 -Expression (Abb. 3.16) über die Zeit, so zeigte sich folgender Verlauf:

Nach Tumorgabe (2 h) liegt die VEGF- R_2 -Expression marginal über jener einer Kontroll-Lunge. Bei dem Zweistundenwert handelt es sich um den Zeitraum, in dem die Tumorzellen

größtenteils intravasal vorliegen und noch keine embolischen Gefäßschäden zu erwarten sind (vgl. ANP Werte Diagramm 3.2). 24 Stunden später wird ein Peak der VEGF-R₂-Expression erreicht, der dreifach erhöht im Vergleich zur Kontrolllunge ist. Dieser Peak könnte in etwa mit dem Zeitpunkt einer embolisch bedingten, lokalen Freisetzung von VEGF-A durch die Tumorzelle korrelieren.

Der weitere Verlauf weist nicht signifikant erhöhte Werten im Vergleich mit einer gesunden Mauslunge (Abb. 3.16) auf. Am Tag drei und vier bestehen Werte im Bereich der Kontrolllunge, an Tag 5 kommt es zu einem diskreten Wiederanstieg der Expressionswerte, welche im folgenden wieder abfallen.

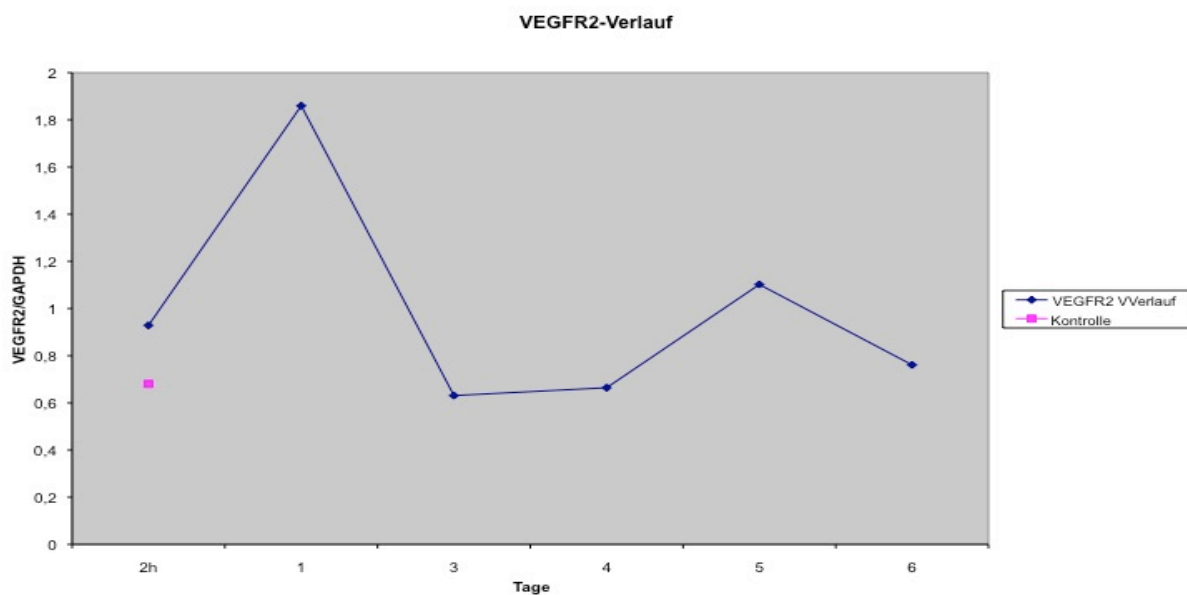


Abbildung 3.16 PCR Expressionsanalyse der VEGF-R₂-Expression in der Lunge an den Tagen 0-6 nach Tumorzellinjektion

Angaben des densitometrischen Signals aus VEGFR₂/GAPDH über 6 Tage. Proben von jeweils 3 Mäusen (n=3) pro Messzeitpunkt der Tage 0, 1, 3, 4, 5 und 6 als Mittelwert von 2fach Bestimmungen. Kontrolle durch eine unbehandelte Mauslunge (Kontrollwert unabhängig von der Zeit).

Die PCR-Analyse der B16/D5-Tumorzellen zeigte, dass diese selbst keinen VEGF-R₂ exprimieren. Ein Einwandern von VEGF-R₂⁺-Zellen ließ sich in den immunhistochemischen Analysen weder im frühen noch im späteren Metastasierungsstadium in den Lungen nachweisen. So befanden sich keine VEGF-R₂⁺-Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft der Tumorzellmetastase.

Man kann also anhand oben gezeigter Daten vermuten, dass der Peak an VEGF-R₂ 24 Stunden nach Tumorzellgabe am ehesten durch eine Induktion der VEGF-R₂-Expression am Endothel entsteht.

3.3.2. Von Willebrandt Faktor

Eine Extravasation der Tumorzelle ist durch die VEGF-A-induzierte Gefäßdurchlässigkeit vorstellbar. Aber auch kleine Gefäßverletzungen hypoxischer oder auch arteriosklerotischer Genese führen zum Auseinanderweichen der Endothelzellen und zur Freilegung der extrazellulären Matrix.

Wir untersuchten die pulmonal-metastatische Umgebung auf ein vermehrtes Vorkommen von vWF. Von Willebrand Faktor findet sich in Granula des Endothels und der Thrombozyten und gilt als Marker für endotheliale Läsionen. Er wird in Endothelzellen und Megakaryozyten gebildet und bei deren Schädigung freigesetzt. Funktionell spielt er bei der Gerinnung (Plasmaträger von Faktor XIII) und Thrombozytenaktivierung eine entscheidende Rolle^{75, 76}.

Mit von Willebrand Faktor sollte daher die Integrität von pulmonalen Gefäßen, die Lage der Tumorzelle im und zum Gefäß sowie die Interaktion der Tumorzelle mit Thrombozyten untersucht werden.

Abb. 3.17 zeigt exemplarisch von Willebrand Faktor-markierte Gefäßanschnitte.

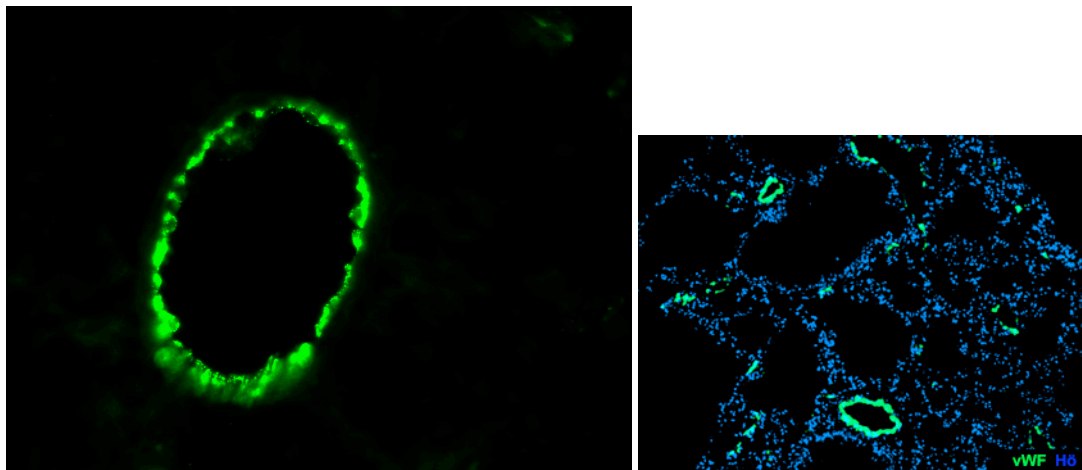


Abbildung 3.17 Histologie der Lungen mit Anfärbung von Gefäßanschnitten

Die Abbildungen zeigen die Markierung von Lungengefäßen mit vWF (grün).

Links: Lungenarterie in 400facher Vergrößerung. Rechts: Übersichtsaufnahme der Lunge in 100facher Vergrößerung mit immunhistochemischer Kernfärbung (Hoechst, blau).

In unseren Aufnahmen konnten vor allem große und mittlere Lungengefäße gut dargestellt werden (Abb. 3.17, 3.9). Der vWF demarkierte diese klar gegenüber dem Lungenparenchym (Abb. 3.9, 3.12).

Eine Mehranreicherung von vWF in Tumorzellnähe konnte nicht beobachtet werden. Weder im Zusammenhang mit einem möglichen hypoxischen Gefäßschaden aufgrund des Hängenbleibens der Tumorzelle, noch im Sinne einer Thrombozytenaggregation um die Tumorzelle.

Um eine höhere räumliche Auflösung zu erhalten, wurde versucht, die Interaktion der Tumorzelle mit dem Endothel oder der Matrix durch konfokale Mikroskopie darzustellen. Konfokale Mikroskopie bietet im Lungenkapillarbett durch ihre hohe axiale Auflösung die Möglichkeit der Aufnahme von vielen Bildern in verschiedenen Schärfenebenen. Es entsteht damit ein scharfes, dreidimensionales Bild der quervernetzten Lungengefäße⁷⁷.

Unsere Untersuchungen zeigten die Lage einzelner Tumorzellen im Lungengefäßbett. Ein verstärktes Signal von vWF in Tumorzellnähe konnte auch hier nicht dargestellt werden. Thrombozyten zeigten sich als punktförmig fluoreszierend, jedoch wurde kein vermehrtes Vorkommen um die Tumorzellen gesichtet (Abb. 3.18).

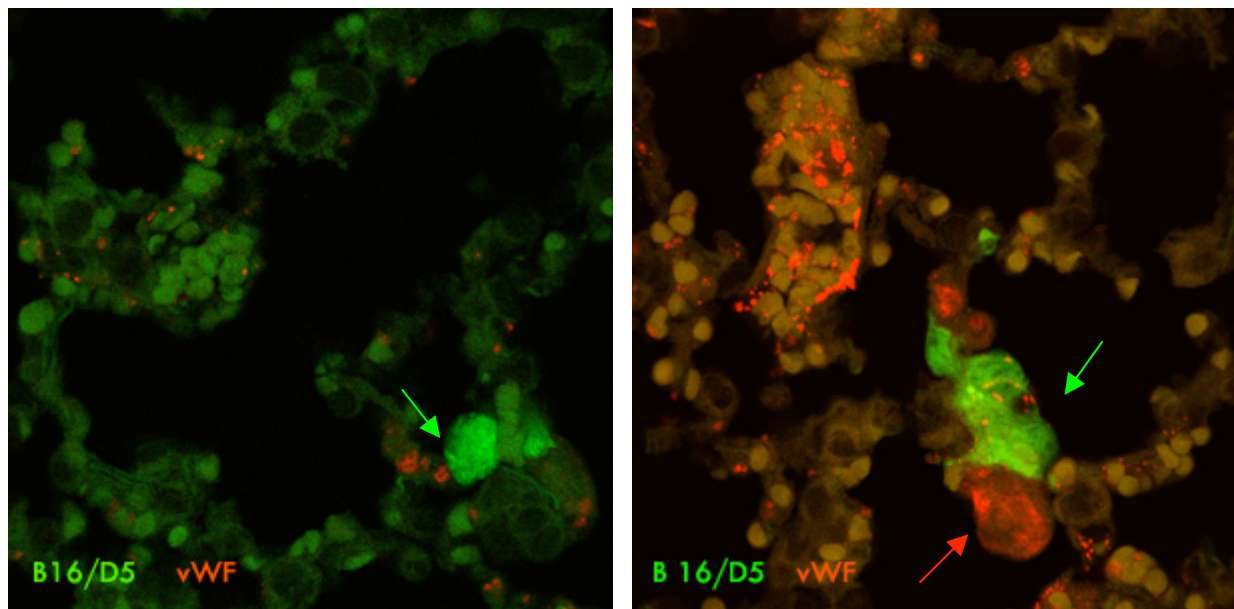


Abb 3.18 Lungengefäßanschnitte (Konfokalmikroskopie)

Tumorzellen in den Alveolarsepten. Eine klare Zuordnung von Lungenkapillaren ist anhand dieser Bilder nicht möglich. Die Bilder zeigen stark grün leuchtende Tumorzellen (Pfeil), einzeln rot fluoreszierende Thrombozyten sowie im rechten Bild eine intraalveolär befindliche Zelle (Pfeil rot), z.B. Makrophage⁷⁸ in Tumorzellnähe.

In unserem Modell war folglich keine eindeutige Interaktion von vWF mit den metastatischen Melanomzellen im frühen Stadium der Metastasierung quantifizierbar.

Als weitere Faktoren der Tumornische werden Fibrinogen, Matrixproteine und Fibronectin beschrieben. Diese galt es im Weiteren zu untersuchen.

3.3.3. Fibronectin

Fibronectin ist ein Multidomänen-Protein, welchem vielseitige Funktionen zugeschrieben werden: Kontrolle der Genexpression, Modulation des Zellzyklus, Apoptose und Proliferation sowie Vermittlung von Zelladhäsion und Beweglichkeit⁷⁹. Fibronectin wird zum einen in der Leber produziert und in löslicher Form ans Plasma abgegeben, zum anderen kommt es als zellgebundenes, unlösliches Protein vor (z.B. bei Fibroblasten). In der Lunge findet man es demnach intra- aber auch extravasal exprimiert.

In dem Modell der prämetastatischen Nische von Kaplan et al.⁷³ wird postuliert, dass der Primärtumor VEGF sezerniert, welches in der Lunge zur Mehranreicherung von Fibronectin führt. Kaplan et al. implantierten an den Maus-Extremitäten einen subkutanen Tumor und beobachteten eine Akkumulation von Fibronectin am Ort zukünftiger Metastasen.

In unserem Modell wurden die Tumorzellen i.v. verabreicht und die Lunge an histologischen Schnitten mittels Anti-Fibronectin-Antikörpern auf vermehrte Fibronectin-Ansammlungen in Tumorzellnähe untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass es im frühen Metastasierungsstadium (Tag 0-6) zu keiner vermehrten Fibronectinanreicherung um die Tumorzelle herum kommt (n= 19 Lungenschnitte; Gesichtsfelder pro Schnitt ≥ 10). Lediglich einzelne Fibronectin-positive Zellen, z.B. Fibroblasten, wurden in Tumorzellnähe nachgewiesen (Abb. 3.19).

Je größer die Mikrometastase war, umso eher fand sich Fibronectin in deren Nähe. Ab Tag 10, wo bereits makrometastatische Befunde zu beobachten sind, wurde eine „Umhüllung“ der Metastase durch Fibronectin (Abb. 3.19, 3.20) mehrfach beobachtet. Dementsprechend bestand eine klare Abkapselung der Metastase zum gesunden Lungenparenchym.

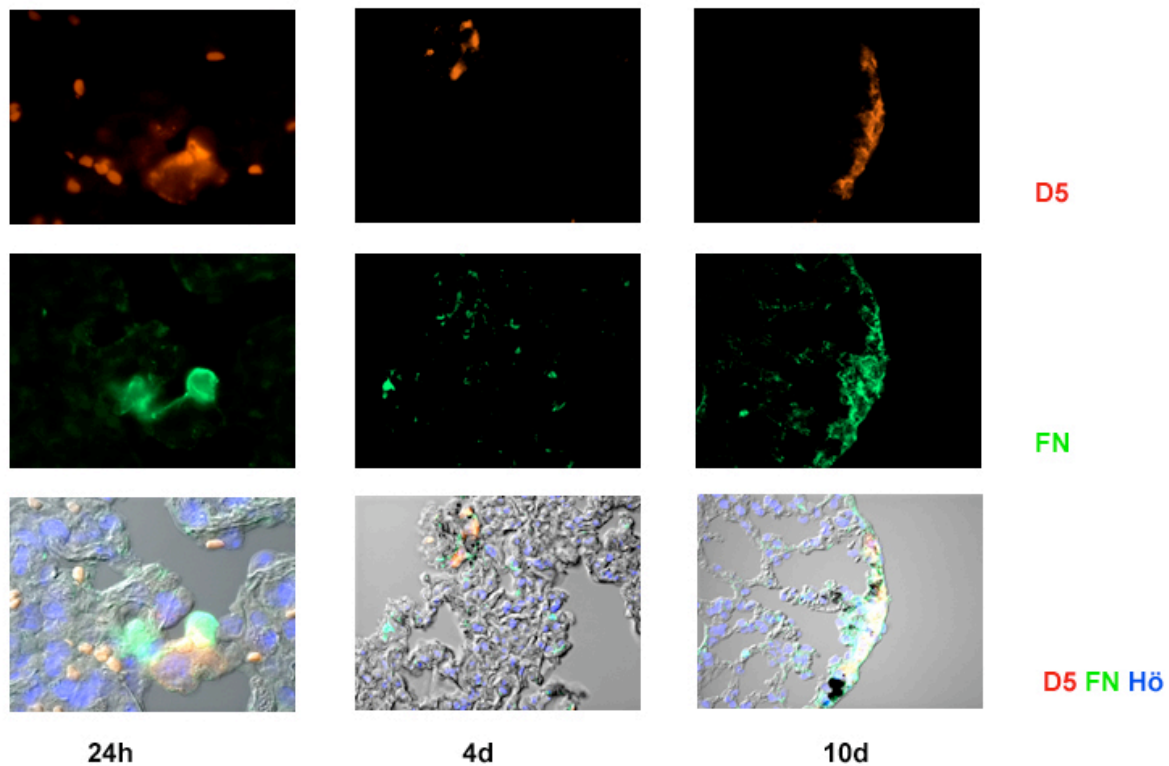


Abbildung 3.19 Histologische Bilder der Lunge an den Tagen 1-10

- 1. Spalte: 24 Stunden nach Injektion: Einzelnachweis einer Fibronektin-exprimierenden Zelle (grün, z.B. Fibroblast) in Tumorzellnähe (rot).
 - 2. Spalte: 4 Tage nach Injektion: Beginnende Mehranreicherung von Fibronektin um die Tumorzelle.
 - 3. Spalte: 10 Tage nach Injektion: Deutliche Mehranreicherung von Fibronektin an der Metastase (Melanin schwarz, Antikörperfärbung rot).
- Rot: B16/D5-Tumorzelle (Melanom-AK) und Autofluoreszenz der Erythrozyten, grün: Fibronektin-AK, blau: Kernfärbung (Hoechst); Vergrößerung 100-400fach.

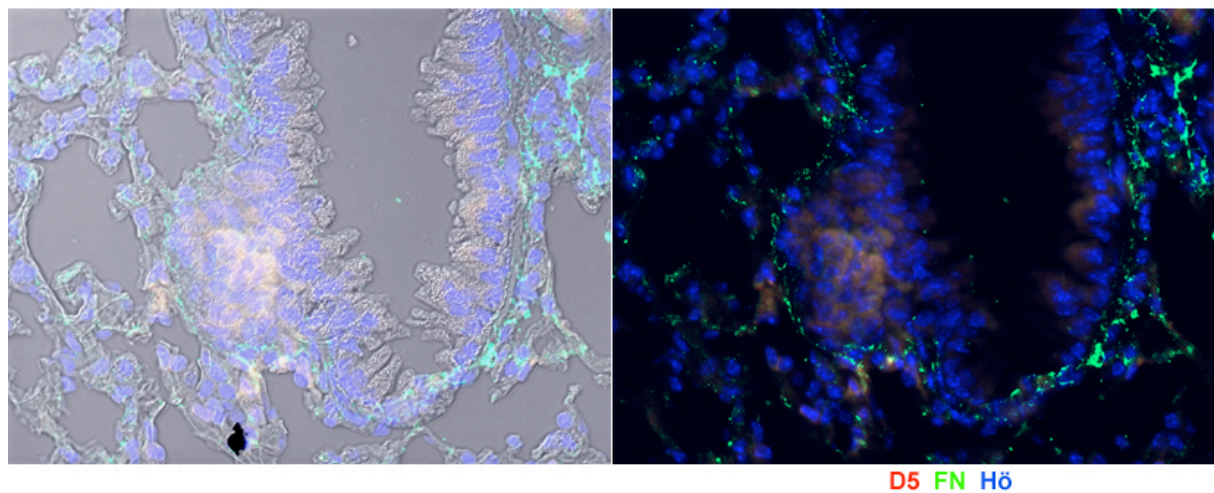


Abbildung 3.20 Histologie der Lunge am 6. Tag nach Tumorzellinjektion

Die Abbildung verdeutlicht die klare Umsäumung der bronchusnahen Metastase (Melanom, rot) mit Fibronektin (grün). Kernfärbung (Hoechst, blau). Vergrößerung 100fach.

Zusammenfassend findet sich in unserem Modell also initial keine Fibronectin-Ansammlung in Tumorzell-Nähe – auch kein plasmatisches Fibronectin. Kommt es zu einer Ansiedlung und Proliferation der B16/D5-Zellen, steigt das Signal für Fibronectin um den Tumor.

Neben Fibronectin, als pulmonal-struktureller Komponente, wurden zelluläre Komponenten im Zusammenhang mit der Metastasierung beschrieben. In ihrem Modell postulierten Kaplan et al.⁷³, dass der Primärtumor die Ansiedlung von Knochenmark-Vorläufer-Zellen am Ort der Metastasierung induziert. Diese sind VEGF-R₁-positiv und gelten als wichtiger Beitrag zur Bildung der prämetastatischen Nische und zum Überleben der Tumorzellen.

3.3.4. VEGF-R₁⁺ BMPCs

Die aus dem Knochenmark kommenden VEGF-Rezeptor-1-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen bereiten laut Kaplan et al. durch Cluster-Bildung ein *Micoenvironment* für die ankommende Tumorzelle vor. Als Indikator dieser Einwanderung benutzten wir die lokale Expression von VEGF-R₁, welche vor allem bei einem frühen Anstieg als Hinweis auf die Einwanderung zu sehen war.

In der Expressionsanalyse zeigten sich signifikant erhöhte Werte 2 Stunden post injectionem mit einem Peak 24 Stunden danach. An den folgenden Tagen kam es zu konstanten Messwerten der VEGF-R₁-Expression, welche diskret über den Werten der Kontrolllunge lagen (Abb. 3.21).

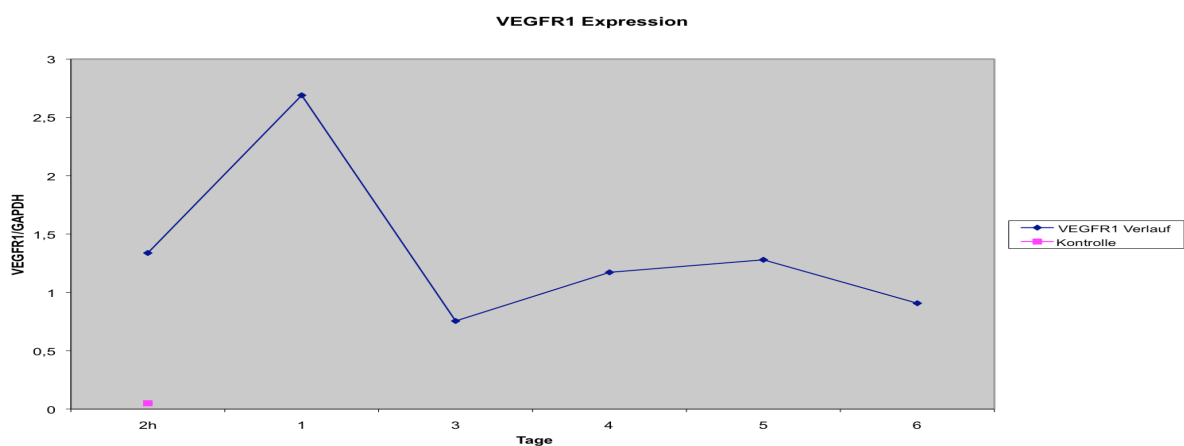


Abbildung 3.21 PCR-Expressionsanalyse von VEGF-R₁ in der Lunge an den Tagen 0-6 nach Tumordinjektion

Der VEGF-R₁-Expressions-Verlauf zeigt einen Peak 1 Tag nach Injektion und einen hochnormalen Verlauf an den Folgetagen. Angaben des densitometrischen Signals aus VEGFR₁/GAPDH über 6 Tage. Angaben als Mittelwert von 2fach Bestimmungen (n=3/d) pro Messzeitpunkt (Tag 0,1,3,4,5 und 6). Kontrolle durch eine unbehandelte Mauslunge (Kontrollwert unabhängig von der Zeit).

Neben der VEGF-R₁-Expression können die Knochenmark-Vorläuferzellen auch über eine Analyse von c-kit beschrieben werden. C-Kit gilt als Marker hämatopoetischer Vorläuferzellen, Mastzellen und Melanomzellen, bzw. Melanozyten.

Zunächst wurde ein Gene-Array zur Quantifizierung der c-kit Expression an den B16/D5 Melanomzellen durchgeführt (Tab. 3.5). Dabei zeigte sich eine Expression an mindestens einem Abschnitt (Oligonukleotid-Probe).

Tabelle 3.5 *Nachweis von c-kit an B16/D5-Zellen*

Gene-Array – Angaben in RLU; Ergebnisse sind der Mittelwert aus 3fach Bestimmungen, Angabe von drei verschiedenen Oligonukleotid-Proben (Werte ≤ 100 entsprechen in der Regel einer fehlenden Expression).

c-kit	95
c-kit	107,51
c-kit	305,58

In der Expressionsanalyse von c-Kit und VEGF-R₁ in der murinen Lunge steigt c-Kit in den ersten 24 Stunden stark an. Danach verläuft die Expression nur mehr leicht progredient bis zum Tag 8. Im Vergleich dazu erfährt die VEGF-R₁-Expression 24 Stunden nach Tumorzellinjektion einen Peak und einen weiteren am Tag 8. Insgesamt beobachtet man aber einen ähnlichen Anstieg der beiden Faktoren in der murinen Lunge (Abb. 3.22).

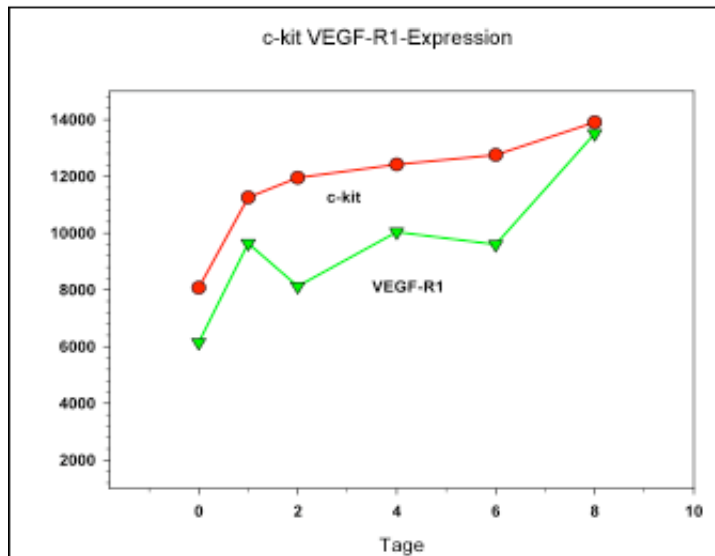


Abbildung 3.22 Expressionsanalyse von c-kit und VEGF-R₁ über die Zeit

Die Graphik zeigt einen annähernd gleichen Expressionsverlauf für c-kit als Marker von Knochenmark-vorläuferzellen und VEGF-R₁. $n = 30 = 6_{\text{Prob}} \times 5_{\text{Mess}}$. Angaben der densitometrisch ermittelten relativen Lichteinheiten (RLU) über die Zeit.

In der Darstellung werden die Werte als relative Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) angegeben. Im Unterschied dazu wurde in Abbildung 3.21 die Intensität an VEGF-R₁ als Dichtewert in Relation zum House-keeping-Gen GAPDH wiedergegeben.

Ergänzend wurde ein weiterer Peak der VEGF-R₁-Expression am Tag 8 festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt kann man bereits von makroskopisch sichtbaren Metastasen in der Mauslunge ausgegangen werden.

Das Vorkommen von VEGF-R₁ in der Lunge wurde auch in der Immunhistochemie untersucht. Dabei konnte dieser Verlauf nicht dargestellt werden.

Im Verlauf der frühen Metastasenentwicklung waren keine Unterschiede in der Anzahl VEGF-R₁-positiver Zellen zu sehen. Diese waren gleichmäßig (spärlich) über die Gewebeschnitte verteilt und zeigten keine Vermehrung um Metastasen.

Erst zu späteren Zeitpunkten (Tag 10) konnte eine Aufnahme gemacht werden, wo es zu vermehrter VEGF-R₁-Anreicherung in Melanomzellnähe kommt. Die Aufnahme zeigt aber weniger VEGF-R₁-exprimierende Knochenmark-Vorläuferzellen, welche sich um die Tumorzelle ansammeln, sondern eher eine Expression des VEGF-R₁ an der Zellmembran der Tumorzellen selber (Abb. 3.23).

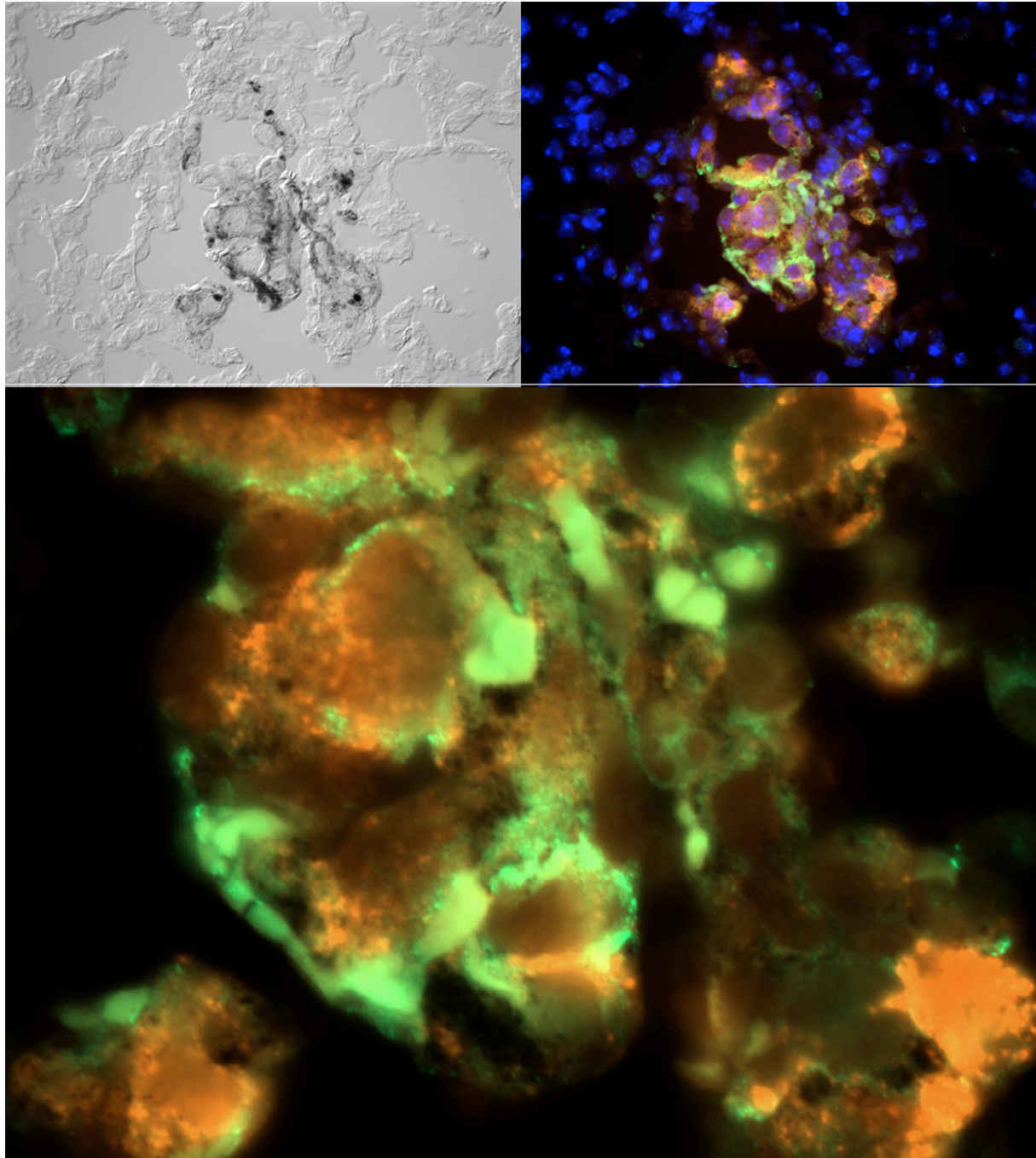


Abbildung 3.23 Histologie der Lunge am Tag 10 nach Tumorzellinjektion

Abbildungen im Uhrzeigersinn:

- 1) Übersichtsaufnahme der Melanommetastase im Lungenparenchym. Sie ist bereits lichtmikroskopisch durch den hohen Melaningehalt klar abzugrenzen.
- 2) Fluoreszenzmikroskopische Übersicht in 400facher Vergrößerung. Man erkennt die Tumorzellen (rot) mit randständigen VEGF-R₁-Signalen (grün). Die Zellkerne sind blau fluoreszierend.
- 3) Tumorzelle mit VEGF-R₁-positiven Signalen in 1000facher Vergrößerung. Klares randständiges Signalehancement von VEGF-R₁

Die Tumorzellen wurden folglich *in vitro* auf die Expression von VEGF-R₁ untersucht. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine deutliche Anreicherung von VEGF-R₁ an der Zellmembran der B16/D5-Tumorzellen (Abb. 3.24).

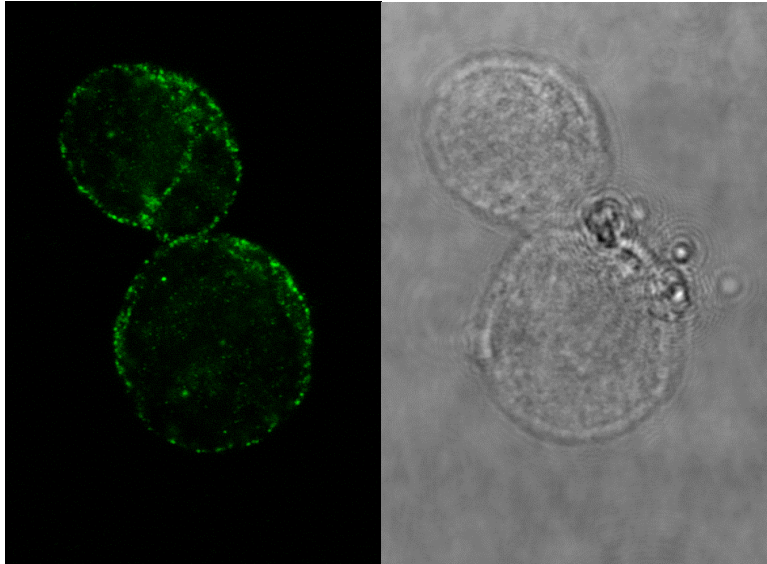


Abbildung 3.24 VEGF-Rezeptoren-1 an der Zellmembran von B16/D5-Tumorzellen
 Immunhistochemische Darstellung der Tumorzellen *in vitro*, VEGF-R₁ (grün).

Im Gene-Array zeigte sich eine geringe Expression von VEGF-R₁ an den Tumorzellen (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6 Nachweis von VEGF-R₁ an B16/D5-Zellen

Gene-Array – Angaben in RLU; Ergebnisse sind der Mittelwert aus 3fach Bestimmungen, Angabe von zwei verschiedenen Oligonukleotid-Proben (Werte ≤ 100 entsprechen in der Regel einer fehlenden Expression).

VEGF-R ₁	104,55
VEGF-R ₁	97,79

Der in Abb. 3.22 gezeigte Verlauf der VEGF-R₁- Expression in der Lunge könnte folglich mit der initialen Anhäufung der VEGF-R₁-positiven Tumorzellen erklärt werden und kann nicht – wie von Kaplan et al. beschrieben – mit dem Vorkommen von Knochenmarkvorläuferzellen direkt korreliert werden. Die Expressionsanalyse ergab einen simultanen Anstieg der Marker für Knochenmark-Vorläuferzellen und VEGF-R₁. Die immunhistochemischen Aufnahmen erhärtet aber den Verdacht auf eine direkte Expression von VEGF-R₁ an den Tumorzellen.

Die bisherigen Befunde beleuchten den Ablauf der frühen Metastasierung und zeigen Faktoren, welche einen wichtigen Einfluss auf diese zu haben scheinen. Die Tumorzellen bleiben demnach im Wesentlichen mechanisch im Kapillarbett hängen. Dies scheint durch die Bildung von Aggregaten, die Vermittlung von Gerinnungsfaktoren und Plättchen sowie durch Fibronektin begünstigt zu werden. Die weiteren Schritte beinhalten dann die Proliferation und Emigration der Tumorzelle. Letzteres kann durch die Sekretion von VEGF-A oder MMP (Matrixmetalloproteinasen) begünstigt werden. Die hier eingesetzten B16/D5-Tumorzellen können selbst hohe Mengen an VEGF-A sezernieren. Es lag deshalb nahe, den Einfluss von VEGF-A auf die Bildung von lokalen Metastasen zu untersuchen.

3.4. Beeinflussung der Metastasierung

Die Metastasierung stellt ein komplexes Zusammenspiel aus Tumorzelle und ihrer Umgebung dar. Durch die Sekretion von VEGF-A und PGF durch die Tumorzelle wird vor allem im frühen Stadium der Metastasierung das pulmonale Mikromilieu beeinflusst: Ein Gefäß-Leck kann induziert werden und die Transmigration der Tumorzelle wird ermöglicht⁵⁰.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse führten zu einem Versuchsansatz, bei dem die Sekretion von VEGF und PGF gezielt blockiert wurde:

Mittels siRNA (small interfering RNA) wurde die Expression der beiden Faktoren geblockt. B16/D5-Zellen wurden mit siRNA transfiziert und damit die mRNA des Zielgens spezifisch abgebaut. Durch diese Verringerung des VEGF/PGF-Genprodukts konnten Rückschlüsse auf deren physiologische Relevanz bei der Metastasierung gewonnen werden.

Den Mäusen wurden B16/D5-Melanom-Zellen i.v. verabreicht, welche nach siRNA Transfektion kein VEGF und PGF exprimierten. Jeweils 3 bis 4 Mäuse ($n_{\text{Ges}}=14$) bekamen VEGF siRNA, PGF siRNA oder die Kombination aus VEGF/PGF siRNA Melanomzellen über die Schwanzvene. Die Kontrollgruppe erhielt unveränderte B16/D5-Melanomzellen.

Am 12. Tag post injectionem wurden die Lungen entnommen. Der rechte Lungenflügel diente zur molekularbiologischen Untersuchung, während der linke für die Auszählung der Metastasen und zur histologischen Weiterverarbeitung in Formaldehyd konserviert wurde. Die metastatischen Läsionen wurden makroskopisch ausgezählt.

Insgesamt konnte durch die Blockade der VEGF und PGF Signalwege ein signifikanter Rückgang der Metastasen gezeigt werden (Abb. 3.25-28). Besonders wirkungsvoll war die

Kombination der siRNA-Transfektion für VEGF und PGF. Hier kam es zur deutlichen Metastasen-Reduktion, welche auch makroskopisch deutlich ersichtlich war (Abb. 3.28).

Im Folgenden sind Beispiele aufgezeigt, welche die eindrückliche Metastasenreduktion im Vergleich zur Kontrolllunge darstellen. Links gezeigt (a) ist das makroskopische Bild der Tumurlungen, rechts (b) die dazugehörige Pmel Expressionsanalyse.

1) Kontrolle

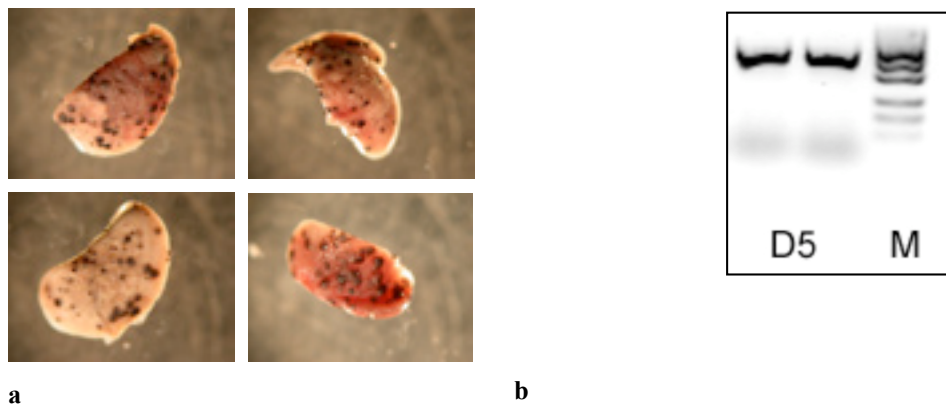


Abbildung 3.25 Kontroll-Lunge

Makroskopisch sichtbare Metastasierung 12 Tage nach B16/D5-Injektion
a Lunge von 4 Versuchsmäusen 12 Tage nach Gabe von B16/D5-Melanomzellen i.v.
b Pmel Expressionsanalyse (Bestimmung im Pool, Doppelwert-Analyse), 20 Zyklen
 n = 4, m-Pmel 717 bP, Marker: MassRuler® ExpressDNA Ladder, LR Forward

2) Ausschaltung von VEGF

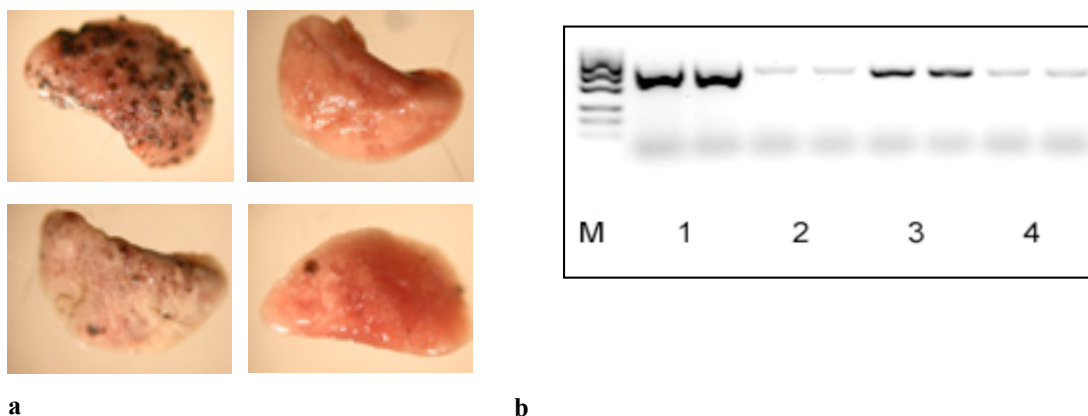


Abbildung 3.26 Hemmung der VEGF-Expression – Metastasenreduktion

Sichtbare Metastasenreduktion durch Ausschaltung von VEGF
a Lunge von 4 Versuchsmäusen 12 Tage nach Gabe von B16/D5-Melanomzellen i.v.. Manipulation der Melanomzellen mit VEGF siRNA
b Pmel Expressionsanalyse (Bestimmung im Pool, Doppelwert-Analyse), 20 Zyklen
 n = 4, m-Pmel 717 bP, Marker: MassRuler® ExpressDNA Ladder, LR Forward

3) Ausschaltung von PGF

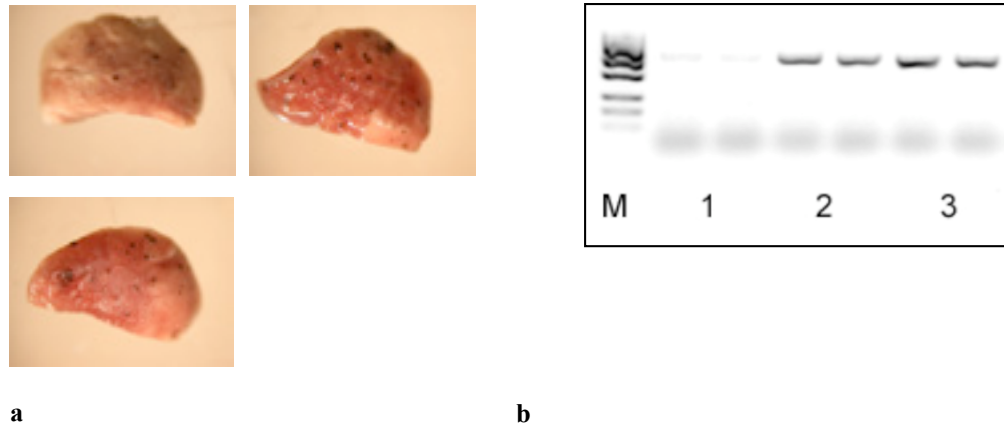


Abbildung 3.27 Hemmung der PGF-Expression - Metastasenreduktion

Sichtbare Metastasenreduktion durch Ausschaltung von PGF

a Lunge von 3 Versuchsmäusen 12 Tage nach Gabe von B16/D5-Melanomzellen i.v.. Manipulation der Melanomzellen mit PGF siRNA

b Pmel Expressionsanalyse (Bestimmung im Pool, Doppelwert-Analyse), 20 Zyklen
n = 3, m-Pmel 717 bP, Marker: MassRuler® ExpressDNA Ladder, LR Forward

4) Ausschaltung von VEGF und PGF

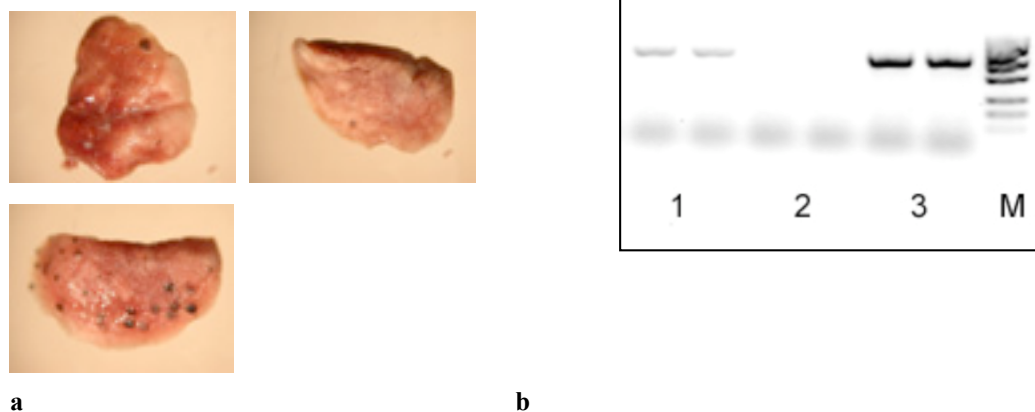


Abbildung 3.28 Metastasenreduktion durch Knockdown von VEGF und PGF

Die Abbildungen zeigen eine deutliche Metastasenreduktion nach Ausschaltung von PGF und VEGF

a Lunge von 3 Versuchsmäusen 12 Tage nach Gabe von B16/D5-Melanomzellen i.v.. Manipulation der Melanomzellen mit PGF und VEGF siRNA

b Pmel Expressionsanalyse (Bestimmung im Pool, Doppelwert-Analyse), 20 Zyklen
n = 3, m-Pmel 717 bP, Marker: MassRuler® ExpressDNA Ladder, LR Forward

Es erfolgte zunächst die Auszählung aller makroskopisch sichtbaren Metastasen an den Mauslungen 12 Tage post injectionem. Diagramm 3.3 zeigt die Anzahl der ausgezählten Metastasen mit Angabe des jeweiligen Mittelwertes. Die Graphik zeigt einen deutlichen

Rückgang der Gesamtmetastasenzahl bei den siRNA-transfizierten Versuchsgruppen. Der Mittelwert der makroskopisch gezählten Metastasen in der Kontrollgruppe lag bei 74 und sank in den Therapiegruppen auf unter 20. Die Gruppe mit siRNA für VEGF weist eine relativ große Streuung der Metastasenzahl auf. Man vergleiche dazu den in der Abb. 3.26 gezeigten Lungenflügel, der multiple metastatische Läsionen hat.

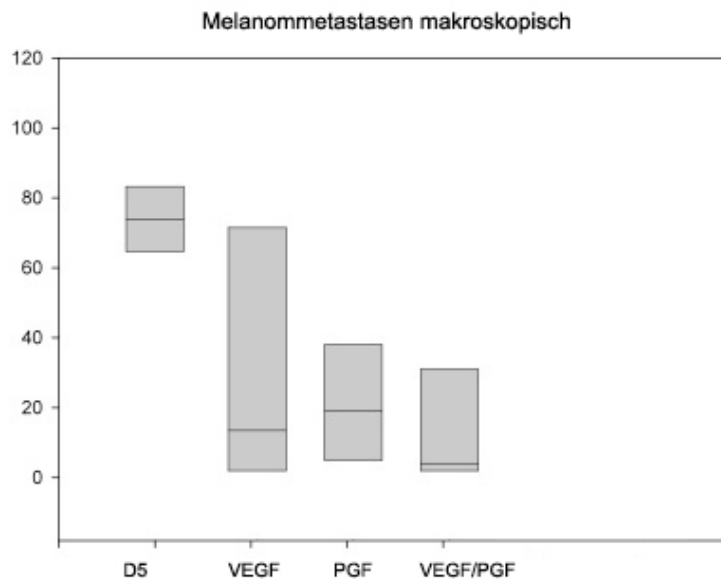


Diagramm 3.3 Makroskopisch sichtbare Melanommetastasen im Lungenparenchym (Gesamtdarstellung)

Auszählung der oberflächlichen Metastasen. Die y-Achse zeigt die Menge der gezählten Läsionen, die x-Achse zeigt die verschiedenen Gruppen. $n_K = 4$, $n_{VEGF} = 4$, $n_{PGF} = 3$, $n_{VEGF/PGF} = 3$

In der Auszählung zeigte sich allerdings, dass es Unterschiede in der Metastasengröße bei den verschiedenen Versuchsgruppen gab. Wir gingen davon aus, dass Mikrometastasen eher von Einzelzellen und Makrometastasen eher von metastatischen Aggregaten gebildet werden. Wir untersuchten also die Hypothese einer zusätzlichen Beeinflussung der Metastasierung durch VEGF und PGF. Zur näheren Differenzierung dieses Einflusses auf das effektive Größenwachstum von Melanomzellen wurde im Diagramm 3.4 zwischen der Metastasengröße ($>$, $<$ 0,5mm) unterschieden. Dabei zeigte sich, dass insgesamt sowohl die Anzahl größerer Metastasen als auch die kleinerer Metastasen durch die Tumorzell-Transfektion mit siRNA deutlich gesenkt werden konnte.

Der Median der Makrometastasen konnte durch Gen-Inhibition auf 22% im Vergleich zur nativen B16/D5-Zell-Lunge gesenkt werden. Der Mittelwert der Metastasenanzahl der Kontrollgruppe lag bei 18, jener der Therapiegruppen bei 4. Die Medianwerte innerhalb der Versuchsreihen divergierten nicht signifikant.

Die Anzahl der Metastasen mit einem Durchmesser $< 0,5$ mm zeigte ebenfalls eine deutliche Reduktion im Vergleich zur Kontrolllunge. Insbesondere bei der Kombination von VEGF und PGF kam es zu einer deutlichen Reduktion der Lungenmetastasenanzahlen von 46 in der Kontrolllunge auf ca. 7 in der Versuchsgruppe (16% des Kontrollmedians). Die Streubreite innerhalb der Versuchsgruppen war im Vergleich zu den größeren Metastasen vermehrt.

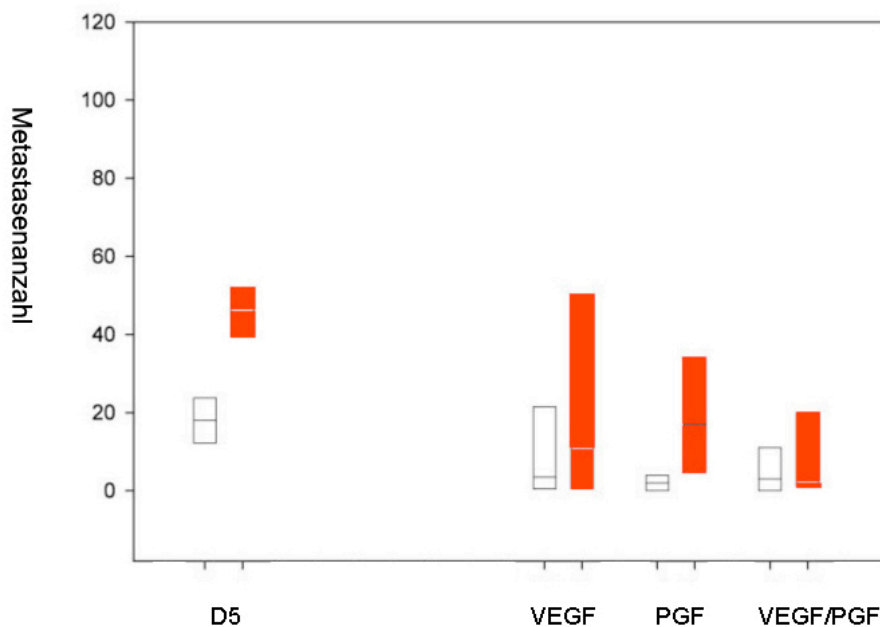


Diagramm 3.4 Makroskopisch sichtbare Melanommetastasen im Lungenparenchym mit Größenunterscheidung

Auszählung an den in Paraformaldehyd 4%-fixierten Präparaten. Die x-Achse zeigt die Menge der gezählten Läsionen, die y-Achse zeigt die verschiedenen Gruppen, wobei der farbige Balken die Metastasen $< 0,5$ mm zeigt.
 $n_K = 4$, $n_{VEGF} = 4$, $n_{PGF} = 3$, $n_{VEGF/PGF} = 3$

Die oben genannten Versuche demonstrieren, dass durch die Ausschaltung der VEGF- und/oder PGF-Expression, bzw. deren Kombination, ein deutlicher Rückgang der makroskopisch sichtbaren Metastasen insgesamt erzielt werden konnte. Insbesondere die Anzahl der Metastasen bei kombinierter Hemmung von PGF und VEGF konnte um ca. 80% im Vergleich zur Kontrolllunge verringert werden.

Die makroskopische Auszählung berücksichtigte nur die oberflächlich gelegenen Metastasen. Zur exakteren Darstellung der Tumorzellreduktion wurde eine Expressionsanalyse von Pmel durchgeführt. Pmel erlaubt als Tumormarker den empfindlichen Nachweis von kleinen Tumorzellansammlungen auch in der Tiefe.

Die Auswertung dieser Querschnittsanalyse ergab eine relative Reduktion der Melanometastasen auf 50% durch Ausschaltung von VEGF, auf 34% durch Ausschaltung von PGF und durch Ausschaltung von VEGF und PEG auf 31% im Vergleich zur Kontrollllunge (vgl. Diagramm 3.5).

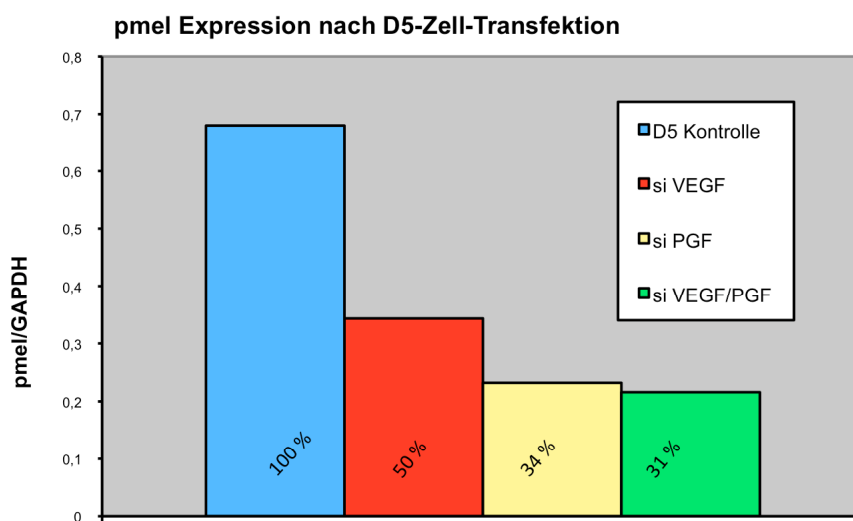


Diagramm 3.5 Expressionsanalyse: Reduktion der pmel Expression nach D5-Zelltransfektion

Prozentuale Angaben in Relation zur Kontrollgruppe. Auf der y-Achse Mengenangabe in pmel/GAPDH, auf der x-Achse die verschiedenen Versuchsgruppen. Relative Reduktion der Metastasen auf 50% (siRNA für VEGF), 34% (siRNA für PGF) und 31% in der Kombination. $n_K = 4$, $n_{VEGF} = 4$, $n_{PGF} = 3$, $n_{VEGF/PGF} = 3$

Diagramm 3.5 zeigt eine Übersicht der prozentualen Abnahme relativ zur B16/D5-Kontrollllunge. Darauf folgte die statistische Auswertung der Pmel-Reduktion im therapeutischen Versuchsansatz (Abb. 3.29). Die Mittelwerte der jeweiligen Versuchsgruppen wurden unter Angabe \pm eines Standardfehlers (SEM) angegeben. Sie zeigen den statistisch signifikanten Rückgang von Pmel als Marker für die Melanomzellen bei siRNA für PGF und siRNA im Kombinationsversuch (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

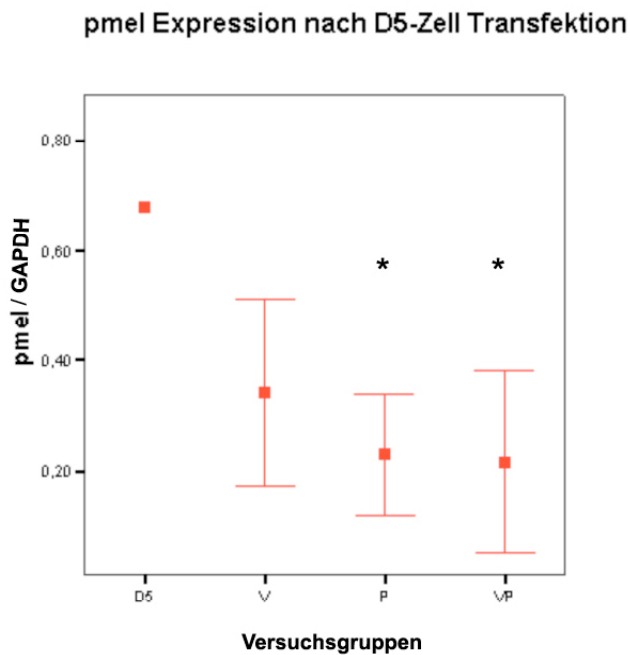


Abb. 3.29 *Pmel-Expression nach D5-Zelltransfektion, Mittelwert für pmel \pm 1 SEM*

Auf der y-Achse Mengenangaben der Expressionsanalyse in pmel/GAPDH, auf der x-Achse die verschiedenen Versuchsgruppen: D5 = Kontrollgruppe, V = VEGF siRNA, P = PGF siRNA, VP = VEGF/PGF siRNA. $n_K = 4$, $n_{VEGF} = 4$, $n_{PGF} = 3$, $n_{VEGF/PGF} = 3$

Statistisch signifikante Metastasenreduktion für PGF siRNA ($p=0,017$) und VEGF/PGF siRNA ($p=0,013$).

Damit konnte die Rolle der Faktoren VEGF und PGF im Zusammenhang mit der Metastasierung dargestellt werden. Die vorhergehenden Versuche zeigten das Vorhandensein dieser Faktoren anhand von Sekretions- und Expressionsprotokollen. Der oben geschilderte therapeutische Ansatz beweist indirekt ihre Wichtigkeit und zeigt einen bedeutenden Ansatzpunkt einer präventiven Therapie bei metastasierenden Tumorerkrankungen.

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

In einem Mausmodell der i.v. Tumorzellgabe als Simulation der hämatogenen Metastasierung wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Ergebnisse gewonnen:

- 1) Die Charakterisierung der Ansiedlung zeigte ein homogenes Verteilungsmuster der metastasierenden Tumorzellen in der Lunge, präferentiell in direktem Kontakt mit dem Alveolarraum. Koloalisationen von Tumorzellnestern und Gefäßen konnten erst zu späteren Zeitpunkten festgestellt werden.
- 2) In der Diskussion um die Art der Ansiedlung konnten adhäsive Prozesse – wie man sie z.B. aus der Zellreihe der Leukozyten kennt – expressionsanalytisch ausgeschlossen werden. Stattdessen zeigten Immunhistochemie und ANP-Untersuchungen Hinweise auf einen mechanischen Arrest der zirkulierenden malignen Zelle.
- 3) Sekretionsanalysen der Melanomzellen ergaben *in vitro* eine progrediente Freisetzung von VEGF. *In vivo* waren die Werte für VEGF-A und PGF im Vergleich zu Kontrolllungen an mehreren Messzeitpunkten im Zeitverlauf signifikant erhöht. Sie sind vermutlich essentielle Faktoren in der Vorbereitung einer Nische.
- 4) Auch die Lunge selber trägt zur Einnistung der Tumorzelle durch die Schaffung eines Mikromilieus bei. VEGF-Rezeptor-1 und -2 -exprimierende Zellen wurden vor allem in der frühen Phase der Metastasierung expressionsanalytisch nachgewiesen; Fibronectin war in unserem Modell in der frühen Metastasierungsphase nicht vermehrt in Tumorzellnähe nachweisbar, scheint aber im späteren Verlauf Metastasen vom Lungenparenchym abzukapseln.
- 5) Diese Ergebnisse führten zu einem therapeutischen Versuchsansatz, in welchem versucht wurde durch gezielte Gen-Inhibition die Metastasierung zu reduzieren oder gar zu unterdrücken. Mittels siRNA wurde die Expression der Zielgene VEGF und PGF in den Melanomzellen verringert. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion der Metastasen in der murinen Lunge.

4. Diskussion

„(...) *In the eyes of many, invasion and metastasis represent the remaining major challenges of basic cancer research.*“ (Robert A. Weinberg, Cambridge, Massachusetts 2006)

Die Metastasierung – der Inbegriff für die Streuung maligner Zellen von einem Primärtumor ausgehend – stellt in der klinischen Betreuung von Tumorpatienten nach wie vor einen entscheidenden Faktor in der Prognose dar. Nach aufwendigen Therapien des Primärtumors können (Mikro)-Metastasen nach Jahren für ein Wiederaufflammen des Krankheitsgeschehens sorgen und den Gesundheitszustand des primär als geheilt angesehenen Patienten massiv beeinflussen. Durch Einbruch in das Gefäßsystem, Ausbreitung über den Blutweg, Ansiedlung und Proliferation in entfernten Gebieten führen Metastasen zu letalen Krankheitsverläufen. Demnach ist es von essentieller Bedeutung, die Metastasierung der Tumorzellen im frühen Stadium zu unterdrücken und die Ansiedlung in entfernten Organen zu verhindern.

Einer der Schlüsselpunkte in der Metastasierung stellt neueren Studien zufolge die Ausbildung einer sogenannten *prämetastatischen Nische* dar ⁷³. Diese soll durch Sekretionsprodukte des Primärtumors entstehen, welche über den hämatogenen Weg ein Mikromilieu am Ort zukünftiger Metastasen initiieren. Dieses Mikromilieu soll eine Umgebung sein in der die wandernde Zelle Bedingungen vorfindet, die ein Überleben und Einnisten ermöglichen.

Ziel dieser Forschungsarbeit war es, die frühen metastatischen Prozesse, insbesondere die Vorbereitung einer (prä)metastatischen Nische, näher zu untersuchen. Hierzu wurden Mäusen Melanomzellen aus der Reihe der B16/D5-Zellen in die Schwanzvene injiziert. In unterschiedlichen Zeitabständen wurden die Mauslungen dann entnommen und molekularbiologisch oder immunhistologisch untersucht. Ein besonderes Augenmerk galt der Bedeutung der beiden Faktoren VEGF und PGF im Zusammenhang mit Metastasierung sowie dem metastatischen Mikromilieu – gebildet unter anderem aus VEGF-R_{1,2}-positiven Zellen, Fibronektin und dem von Willebrand Faktor.

Das B16/D5-Mausmodell ist ein etabliertes Modell der Tumorforschung. Die B16 Melanomzellen stammen von C57/BL6 Mäusen. Sie können in verschiedene Tumorzell-

Subtypen unterteilt werden, welche sich im Wesentlichen durch ihr Metastasierung-Potential und ihre Immunogenität unterscheiden⁸⁰. Das murine B16/D5-Modell ist ein Modell zur Simulation humaner Tumoren. Sämtliche Ergebnisse können folglich nur unter Vorbehalt und unter Berücksichtigung der Unterschiede zur humanen Zellreihe interpretiert werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten B16 Zellen weisen ein aggressives Metastasierungsverhalten auf (Abb. 4.1). Im Unterschied zu den humanen Melanomzellen führen die B16 Zellen innerhalb weniger Wochen zum Tod der Maus. Da sie eine wenig immunogene Tumorzelllinie sind, müssen therapeutische Ansätze hinsichtlich der Immunantwort kritisch interpretiert werden⁸¹.

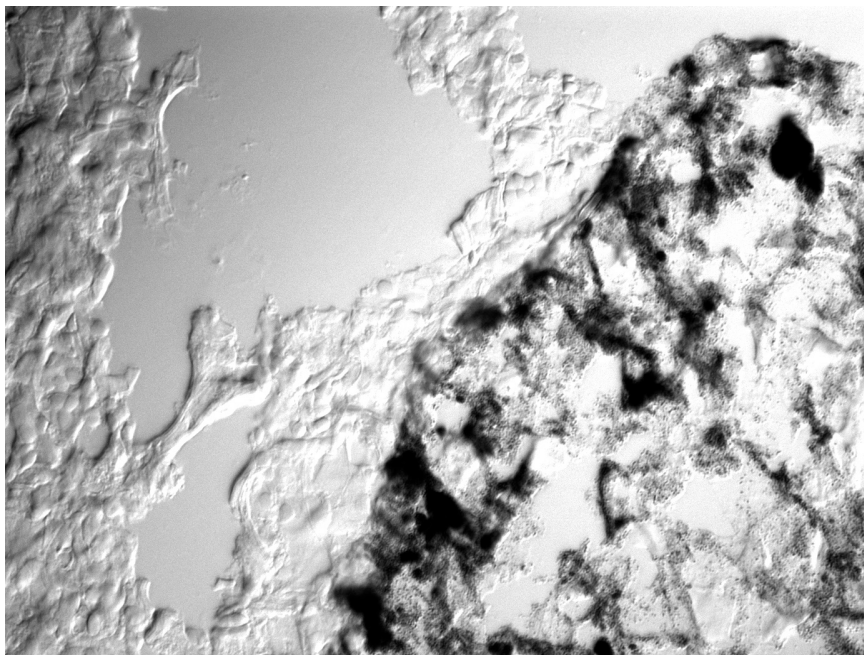


Abbildung 4.1 Melanommetastase in der murinen Lunge 10 Tage nach Tumorzellinjektion.
Vergrößerung 400fach.

4.1 Charakterisierung der Tumorzell-Ansiedlung

Die frühe Metastasierung weist in unserem Modell ein homogenes Verteilungsmuster in der Lunge auf. Die Tumorzellen gelangen von der Schwanzvene über das venöse Gefäßnetz durch den pulmonalen Kreislauf, wo sie in den kleinen Arteriolen dieses Niederdrucksystems teilweise hängenbleiben. Die ersten 24h sind dabei entscheidend für das Überleben der Tumorzellen und weisen eine hohe Ineffizienz auf^{37, 38, 41}. Die Tumorzellen finden sich im Blut in fremder Umgebung vor. Gelöst vom epitheloiden Zellverband kommt es zur Anoikis

(gr.: *Programmierter Zelltod*) und damit intravasal zum vermehrten Absterben der Zellen (Kap. 1.3.2). Wong et al. zeigten, dass die Tumorzell-Apoptose innerhalb der ersten 24 Stunden nach Tumorzellinjektion auftritt. Zelllinien von Tumorzellen, die eine hohe Metastasierungsrate aufweisen, besaßen dabei eine wesentlich geringere Apoptoserate als jene von spärlich metastasierenden Tumoren⁸². Unsere Ergebnisse zeigen anhand des tumorspezifischen Markers Pmel den Verlauf der Tumorzellansiedlung von B16-Melanomzellen in der Lunge. Lediglich 5% der injizierten Zellen waren nach 24h noch vital; 48h danach nur noch knapp 1% (Abb. 3.2). Bei den vorliegenden Zahlen muss berücksichtigt werden, dass in diesem Modell eine hohe Anzahl intravenös applizierter Tumorzellen angewandt wurde (2×10^5 Tumorzellen i.v.). Es muss davon ausgegangen werden, dass die Anzahl überlebender Tumorzellen bei Menschen viel geringer ist. Einige wenige Zellen überleben also, siedeln sich an und proliferieren. Ab Tag 4 nach Tumorzellinjektion kommt es in unserem Modell zu einem Anstieg der malignen Zellzahl.

In der Fragestellung um die Art des Hängenbleibens (Arrest) wurde die These eines adhäsiven Prozesses einem mechanischen gegenübergestellt.

4.1.1. Der Arrest: adhäsiv vs. mechanisch

Der Begriff der Adhäsion ist in Bezug auf wandernde Zellen vor allem aus der Leukozytenforschung bekannt. Leukozyten schwimmen in der Blutbahn, rollen entlang des Endothels bis zum Arrest, adhärieren über typische Adhäsionsmoleküle, durchbrechen die Endothelbarriere und transmigrieren schließlich in das Gewebe⁸³ (Abb. 4.2). Interaktionen mit Endothelzellen über Selektine reduzieren zunächst die Fließgeschwindigkeit von Leukozyten im Blut. L-Selektine werden dabei von Leukozyten, P- und E-Selektine von Endothelzellen exprimiert⁸⁴⁻⁸⁶. Sie sorgen für eine lockere Anbindung an die Gefäßwand, sind aber zu unbeständig um der Scherkraft (*shear stress*) der Blutgefäße zu widerstehen. Integrine und Rezeptoren aus der Immunglobulin-Superfamilie verstärken diese Interaktionen⁸⁷ und ermöglichen schließlich die Transmigration von Leukozyten in das Gewebe⁸⁸.

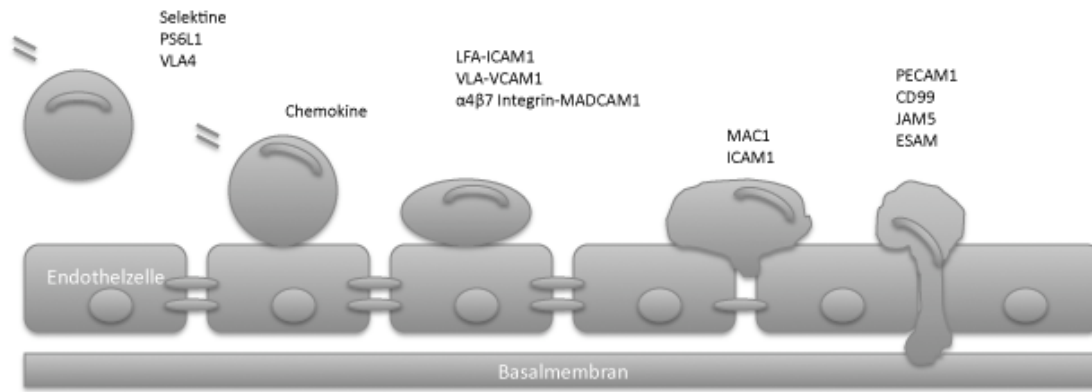


Abbildung 4.2 Leukozytenwanderung am Endothel

Dargestellt sind die beteiligten Faktoren an der Adhäsion und Transmigration von Leukozyten am Endothel. Nach K.Ley et al.; Nature Reviews Immunology 7, 678-689 (September 2007)⁸⁹

Bei den metastasierenden Tumorzellen wäre ein ähnlicher Prozess denkbar⁹⁰. Auch diese kommen als ortsfremde Zellen in die Lungenstrombahn, bleiben hängen, überschreiten die Endothelschranke und wandern in das Parenchym ab.

Die Untersuchung der Melanomzellen auf Adhäsion blieb negativ. In der Expressionsanalyse konnten keine der klassischen Endothel-Adhäsionsmoleküle gefunden werden. Als einziges Adhäsionsmolekül ließ sich das Integrin CD 29 nachweisen; Endothelzellen besitzen hierfür jedoch keinen Liganden. Eine Adhäsion über CD29 wäre also nicht direkt am Endothel, sondern über Fibrinogen/Fibronectin-Ablagerungen auf dem Endothel oder der Matrix nach einer Schädigung des Endothels möglich. Fibronectin am Endothel konnten wir immunhistochemisch in diesem Stadium der Metastasierung nicht nachweisen.

Auch funktionell ließ sich keine Adhäsion nachweisen. In vitro schwammen die Tumorzellen traubenförmig verklumpt auf dem Endothel-Layer reifer bEnd3-Zellen. Es kam zu keiner Interaktion der beiden Zelllinien und es gab zu keinem Zeitpunkt Hinweis auf einen adhäsiven Vorgang.

Tumorzellen scheinen also wenig Möglichkeit der Adhäsion an intaktes Endothel zu haben. Ein mechanischer Arrest als Ursache für die Ansiedlung in der Lunge liegt daher nahe.

Diesen visualisierten Kienast et al.⁹¹ im Mausgehirn durch In-vivo-Mikroskopie. Mittels MPLSM (*multiphoton laser scanning microscopy*) war es der Arbeitsgruppe möglich, das Verhalten von Tumorzellen im Gefäßbett zu beobachten. Tumorzellen blieben Größenbedingt im Kapillarbett – v.a. an Gefäßabzweigungen - hängen. Dort kam es zur intravasalen Proliferation und anschließenden Transmigration in das Lungenparenchym.

Betrachtet man die histologischen Verhältnisse, so besteht eine erhebliche Größendifferenz im Durchmesser von Melanomzelle (12-20 μm) und kleinster Kapillare (ca. 10 μm)^{64, 92} (Abb. 3.12).

Die ankommende Tumorzelle kann funktionell also ein Mikroembolus im pulmonalen Niederdrucksystem sein. Einzelne Tumorzellen, bzw. – wie Kienast et al. beschrieben – vor allem Tumorzellaggregate, würden größenbedingt das Gefäßlumen verlegen. Durch diese Obstruktion kommt es postembolisch zu einer Sauerstoff-Minderversorgung, präembolisch steigt der Druck im Lungenkreislauf an.

Wir belegten die hämodynamische Relevanz dieser Tumormikroembolie mittels ANP-Messungen. ANP (atriales natriuretisches Peptid) ist ein Peptidhormon, das in den Kardiozyten des Herzvorhofs gespeichert und durch Dehnungsreize freigesetzt wird⁹³. ANP ist folglich ein Marker erhöhter Herzvorhof-Belastung. Wir konnten in unseren Versuchen signifikant erhöhte ANP-Werte an 3 Messzeitpunkten im Zeitverlauf (Tag 0-6) nach Tumorzellinjektion feststellen. 2 Stunden nach Injektion sowie 24 Stunden danach war der pro ANP Wert im Vergleich zur Kontrolle zwar gestiegen, jedoch erst ab dem 2. Tag nach Injektion signifikant erhöht. Die Volumengabe sowie die Applikation der hohen Tumorzellzahl (2×10^5 Tumorzellen i.v.) scheinen also nicht Ursache der Vorhofbelastung zu sein. Viel mehr scheinen die intravasal applizierten Tumorzellen – am ehesten durch Aggregatbildung – im Verlauf zu einem messbaren kardialen Druckanstieg zu führen. Ursache könnte die oben beschriebene Tumorzell-Embolie sein.

Wie auch bei Embolien anderer Genese kommt es im postembolischen Gebiet zumindest vorübergehend zu einer Sauerstoff-Minderversorgung. Die Konsequenzen dieser postembolischen Hypoxie durch die Tumorzelle könnten folgende sein:

1) VEGF-A-Sekretion

Hypoxie triggert mittels HIF (*hypoxia-inducible factor 1alpha*) die Sekretion von VEGF-A durch die Endothelzellen^{94, 95}. VEGF-A induziert die Auflösung der Endothelbarriere⁵⁰, wodurch es zum Freilegen extrazellulärer Matrix kommt. Anders als an intaktes Endothel hat die Tumorzelle die Möglichkeit durch das Adhäsionsmolekül CD29 an extrazelluläre Matrix zu binden⁹⁶. Die Extravasation der Tumorzelle wird ermöglicht.

2) EPC-Mobilisierung

Durch den mechanischen Arrest der Tumorzelle im Sinne einer Mikroembolie und die entstehende Hypoxie kann ein Schaden am Endothel gesetzt werden⁹⁷. Dieser Schaden

könnte über Zytokin-Signale zum Einschwemmen von endothelialen Vorläuferzellen (EPC), welche die Gefäßintegrität wiederherstellen sollen, führen^{63,98}.

Wir konnten die Interaktion von Tumorzellen mit den EPC in vitro darstellen. Wenn man statt reifer Endothelien (bEnd3) unreife Endothelzell-Vorstufen (T17b) als Layer in einer Kultur anlegt, kommt es zu einer Interaktion der Tumorzellen mit den EPC. Die Tumorzellen schwimmen nicht mehr wie bei reifem Endothel traubenförmig verklumpt auf dem Layer, sondern können an die endothelialen Vorläuferzellen adhären und transmigrieren. Die Extravasation wird forciert.

In der Expressionsanalyse klassischer Adhäsionsmoleküle ergab sich ein Hinweis auf die Ursache dieser In-vitro-Beobachtung: Zwar findet sich bei bEnd3- und T17b-Zellen eine ähnliche Expression von Adhäsionsmolekülen (Tab. 3.2, Tab. 3.3), bei den T17b-Zellen bestand jedoch eine deutlich vermehrte Expression von F3/TF (Gerinnungs-Faktor III/ Tissue Faktor, Thromboplasmin). Hierüber wäre die oben beschriebene Adhäsion der Tumorzelle über CD 29 ermöglicht.

Die Art der Ansiedlung leiten wir demnach als primär mechanisch/anatomisch ab. Welche Faktoren ermöglichen nun das Überleben der Tumorzellen im „fremden“ Organ? Und inwieweit verändern Sekretionsprodukte der Tumorzelle das lokale Mikromilieu?

4.2. Die metastasierende Tumorzelle

4.2.1. Die Rolle von VEGF und PGF – Sekretionsprodukte der Tumorzelle

Der Großteil der metastasierenden Zellen stirbt intravasal ab. Die wenigen verbleibenden Zellen sichern sich das Überleben durch direkte Interaktion mit ihrer Umgebung. Sie tragen wesentlich zur Schaffung optimaler Bedingungen im Sinne eines pro-metastatischen Mikromilieus bei. Ein Faktor, der für das weitere Überleben von Tumorzellen entscheidend zu sein scheint, ist VEGF-A (*vascular endothelial growth factor – A*). Als Sekretionsprodukt der Tumorzellen kann er zu Permeabilitätserhöhung im Endothel führen und die Adhäsion weiterer Zellen (z.B. EPC) ermöglichen. Als weitere Funktionen werden ihm die Induktion der Endothelproliferation und der Angiogenese zugeschrieben.

Sowohl in vitro als auch in vivo wurde ein Anstieg der Sekretion von VEGF gezeigt (Kap. 3.2.1). Die Tumorzellen wurden im Medium kultiviert und über einen Zeitraum von 48 Stunden auf die Sekretion von VEGF geprüft. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg im

Zeitverlauf. Hypoxie bzw. ein zunehmender hypoxischer Stress im Medium müssen jedoch auch als Ursachen dieses Anstiegs *in vitro* in Betracht gezogen werden⁹⁹.

Bei den *In-vivo*-Versuchen war die Konzentration von VEGF-A nach I.v.-Tumorzellgabe bereits 2 Stunden nach Injektion und an den Tagen 1, 4 und 5 signifikant erhöht. Der oben beschriebene Mechanismus des mechanischen Arrests im Lungengefäßbett könnte diesen Verlauf erklären: Sobald die ersten Tumorzellen hängenbleiben (2h, Kap. 3.1), wird VEGF-A freigesetzt. Der primäre mechanische Arrest könnte also durch hypoxischen Stress die Sekretion von VEGF-A durch die Tumorzellen oder das umgebende Endothel triggern^{100, 101}. Dies hätte zur Folge, dass die Gefäßpermeabilität erhöht wird oder weitere Zellen adhären können. Wir versuchten diesen frühen Zeitpunkt durch Antikörperfärbungen gegen von Willebrand Faktor und Fibronectin zu erfassen. Dabei konnten wir die erhöhte Gefäßpermeabilität oder einen Gefäßschaden allerdings nicht fluoreszenzmikroskopisch darstellen. Ab dem Tag 2, wo nur noch 0,2% der initialen Tumorzellen in der Lunge detektierbar sind, finden sich keine signifikant erhöhten VEGF-A-Werte im Mausplasma. Erst ab dem 4. Tag nach Tumorzellinjektion, zu einem Zeitpunkt, wo die Tumorzellen in der Lunge zu proliferieren beginnen, steigt auch die Sekretion von VEGF-A wieder an.

VEGF-A entfaltet seine Wirkung im Wesentlichen über VEGF-R₁ und VEGF-R₂, wobei er seine biologische Wirkung im Wesentlichen über den Rezeptor-2 vermittelt. VEGF-R₂ wird vornehmlich von Gefäß- und Lymphendothelzellen sowie von Megakaryozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. VEGF-A reguliert über das *vascular endothelial VE-Cadherin* die Integrität zwischen endothelialen Zell-Zell-Verbindungen⁵⁶. Über eine Liganden gebundene Tyrosin-Phosphorylierung und Src-Kinase-Aktivierung am VEGF-R₂ (Flk-1)^{102, 103} induziert VEGF-A erhöhte Gefäßdurchlässigkeit über ein Endothel-Leck.

Als Zielzelle der Tumorzellsekretion von VEGF-A vermuteten wir in unserem Modell die Endothelien des Lungenkapillarnetzes. Deshalb wurde die Korrelation der VEGF-Sekretion und VEGF-R₂-Expression an den Endothelien untersucht. VEGF-A wird von der metastasierenden Tumorzelle in der Lunge progredient sezerniert. Eine entsprechende Hochregulation des VEGF-R₂ konnte im frühen Metastasierungsstadium beobachtet werden: 24h nach Injektion der Tumorzelle findet sich ein Peak der VEGF-R₂-Expression. Dieser Anstieg kann Folge einer lokalen Hochregulation (z.B. Endothel) sein oder durch das Einwandern externer Zellen (z.B. VEGF-R₂⁺ hämatopoetische Stammzellen) entstehen. Histologisch konnten wir ein Einwandern von VEGF-R₂⁺-Zellen nicht darstellen. Eine lokale

(endotheliale) Hochregulation scheint demnach wahrscheinlich. Der Peak könnte mit dem Zeitpunkt übereinstimmen, wo die meisten Tumorzellen im Kapillarbett hängenbleiben. Der Mikroembolus induziert ein akutes hypoxisches Ereignis, welches zur vermehrten Expression von VEGF-R₂ führt.

Die Arbeitsgruppe um G. Lungu et al. zeigte den Zusammenhang von Hypoxie mit VEGF-A und VEGF-R₂ an Hirntumoren in vivo. Mit Hilfe von SPAT (*spectroscopic photoacoustic tomography technology*) konnten Analysen von hypoxischen Tumoren am Rattenhirn gemacht werden. Immunhistochemie und Expressionsanalysen zeigten, dass im hypoxischen Hirntumor HIF-1 alpha, VEGF-A und VEGF-R₂ signifikant höher ($p < 0,05$) exprimiert waren als in normalen Hirnzellen. Hypoxie war in diesem Modell durch die Hochregulation von Targetgenen ein entscheidender Faktor der Tumordinvasion¹⁰⁴.

Den Grad des Einflusses der Hypoxie auf die Metastasierung untersuchten Rofstad et al. in einer experimentellen Studie. Die Arbeitsgruppe ging der Frage nach, ob hypoxische Tumoren eher metastasieren als normoxische. Mäuse mit intradermalen Melanomtumoren wurden zyklisch akuter Hypoxie ausgesetzt. Ziel war die Darstellung der Perfusionsverhältnisse sowie des Metastasierungsverhaltens des Primärtumors. Dies zeigte die Arbeitsgruppe kontrastmittelverstärkt in der Magnetresonanztomographie sowie mikroskopisch mittels Immunhistochemie. Es konnte gezeigt werden, dass akut hypoxische Tumoren höhere Konzentrationen an VEGF aufweisen und im Verlauf mit einer deutlich erhöhten Inzidenz an Lungenmetastasen einhergehen¹⁰⁵.

VEGF soll auch an der Induktion adhäsiver Eigenschaften der Tumorzellen beteiligt sein. Shen et al. untersuchten dies mittels In-vivo-Video-Mikroskopie. Die Adhäsionskapazität der Tumorzellen (Mamma-Karzinom) konnte durch Zugabe von VEGF auf das 1,9fache erhöht werden. VEGF, VEGF-R₂ und Tumorzell-Integrine seien dabei wesentlich an dem adhäsiven Prozess beteiligt. Durch Antikörper-Blockade von VEGF oder dessen Rezeptor KDR/Flk-1 (=VEGF-R₂) wurde eine signifikante Reduktion der Adhäsion in vivo fluoreszenzmikroskopisch beobachtet¹⁰⁶. Shen et al. schließen daraus, dass VEGF die Adhäsion der Tumorzelle an das intakte Endothel steigern kann.

Unsere Untersuchungen zeigen keine Adhäsion der Tumorzelle an intaktes Endothel (Kap. 4.1.1). Viel mehr weisen unsere Daten darauf hin, dass durch das VEGF-A induzierte Auseinanderweichen der Endothelzellen Matrix freiliegt, an welche die Tumorzellen – in unserem Modell am wahrscheinlichsten mittels CD29 – binden können. Wir gehen also davon aus, dass VEGF-A nicht die adhäsive Kapazität der Tumorzelle an intaktes Endothel

verändert, sondern durch Induktion einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit Möglichkeiten der Adhäsion an Matrix schafft.

Die Bedeutung des VEGF-A-Signalpfades für die frühen Metastasierungsmechanismen wird verdeutlicht, wenn man seine Funktion oder Teile dessen inhibiert. VEGF-A scheint einzigartig in der Familie der VEGF, da es über den VEGF-R₂ die endotheliale Barriere brechen kann und damit einen wichtigen Einfluss auf die Tumorzell-Migration hat.

Src- und Yes- sind beides Signalwege des VEGF-R₂ ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Weis et al. inhibierten sie pharmakologisch (Src inhibitor SKI-606) bei Mäusen an den ersten 3 Tagen nach Tumorzellinjektion. Im Vergleich zu Kontrolltieren kam es zu einer signifikanten Reduktion der Lungenmetastasen. Auch eine direkte Inhibition von Flk (VEGF-R₂) über den Flk Inhibitor SU1498 führte zu einer Metastasenreduktion von ca. 50% ⁵⁰.

Im Unterschied dazu blockierten wir mittels siRNA das von den Tumorzellen freigesetzte VEGF und konnten somit direkt Rückschlüsse auf den Einfluss der VEGF-Sekretion durch die Tumorzelle ziehen. Wir konnten zeigen, dass die Inhibition von VEGF-A mittels siRNA bei Melanomzellen eine eindruckliche Reduktion der Metastasen auf 50% erzielt. Die Inhibition von PGF, eines weiteren Mitglieds der VEGF-Superfamilie, zeigte ebenso eine deutliche Metastasenreduktion. Vor allem die kombinierte Hemmung von PGF und VEGF konnte eine statistisch signifikante Reduktion der Metastasenanzahl erzielen. Die pmel Konzentration – als Marker für Melanom-Metastasen – sank dabei auf 31% der Kontroll-Lunge. Der Versuch verdeutlicht klar die Bedeutung der beiden Mediatoren PGF und VEGF bei der Metastasierung.

Durch die Blockade des VEGF-A-Signalwegs kann folglich eine signifikante Reduktion der Metastasierung erreicht werden. Die Blockade wurde experimentell an unterschiedlichen Stellen angesetzt, in unserem Modell kann jedoch der alleinige Einfluss der VEGF-A Tumorzellsekretion gezeigt werden.

Abbildung 4.3 verdeutlicht die oben aufgezeigten Möglichkeiten.

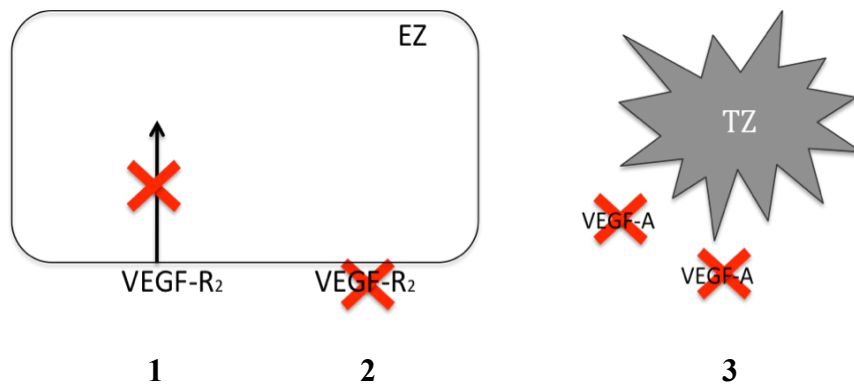


Abbildung 4.3 Blockade des VEGF – VEGF-R₂-Wirkungspfad

- 1 Signaltransduktions-Stopp durch Hemmung der Tyrosinkinase Src und Yes⁵⁰
- 2 Rezeptorblockade durch direkte Inhibition von Flk1 (=VEGF-R₂)
- 3 Liganden-Inhibition durch siRNA vermittelte Hemmung von VEGF-A

EZ = Endothelzelle, TZ = Tumorzelle

Die VEGF-A-Sekretion der Tumorzelle scheint also ein wichtiger Aspekt der prometastatischen Nischenbildung zu sein. Die endotheliale Barriere kann unterbrochen werden, Matrix wird freigelegt und die Adhäsion weiterer Tumorzellen – aber auch von Thrombozyten – wird ermöglicht. Thrombozyten scheinen mit an der Nischenbildung beteiligt zu sein. Es wird die Möglichkeit der Anhängen der Tumorzelle an das Endothel durch Thrombozyten diskutiert, aber auch die Ummantelung der Tumorzelle zum Schutz vor dem Immunsystem (Kap. 4.2.2).

4.2.2. Thrombozytenadhäsion – eine Schutzmaßnahme

Auf die Bedeutung der Interaktion von Thrombozyten mit metastasierenden Zellen wird in der Literatur zunehmend hingewiesen. Insbesondere die Plättchenaggregation um die Tumorzelle als Schutz vor dem Immunsystem wurde mehrfach untersucht¹¹⁰⁻¹¹². Dieses Konglomerat aus Plättchen und maligner Zelle birgt folgende Vorteile: Die Maskierung vor dem Immunsystem (insbesondere den natürlichen Killerzellen), eine Induktion der Adhäsion von Tumorzelle mit Thrombozyten (z.B. über P-Selektine) und der Zellproliferation sowie die Möglichkeit zur Angiogenese^{113,114}.

Besonders hinsichtlich der Ansiedlung der Tumorzelle im neuen Organ wird die Thrombozytenfunktion in der Literatur kontrovers diskutiert. Binden die Thrombozyten direkt und schon intravasal an die Tumorzelle^{113,115,116} oder findet eine Aggregation von Plättchen

an Matrix in Gefäßlecks, bzw. Gefäßschäden statt und es kommt sekundär zur Tumorzelladhäsion⁵⁰?

Eine Expressionsanalyse der Melanomzellen unserer Arbeitsgruppe ergab, dass die Tumorzelle F3/*tissue factor* -positiv ist (Kap. 3.1.3.1). Sie hat demnach die Möglichkeit primär die Gerinnung zu aktivieren und sich durch Plättchenaggregation vor Ort abzuschirmen¹¹⁷. Das Konglomerat aus Tumorzelle und Plättchen kann embolisch ein kleines Gefäßlumen verschließen und mithilfe der Freisetzung von VEGF eine Extravasation und Metastasierung ermöglichen¹¹³. Bazou et al. zeigten die intravasale Adhäsion in annähernd physiologischen Flussbedingungen mittels Ultraschall (USWT, *ultrasound standing wave trap*). Die Untersuchungen zeigten eine Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten an den Tumorzellen (Adenokarzinom- und Fibrosarkomzellen)¹¹⁸. Integrine und Glykoproteine sollen diese Tumorzell-Thrombozyten-Interaktionen als Adhäsionsmoleküle vermitteln. P-Selektine sollen dabei wesentlich zur Adhäsion beitragen¹¹⁹.

Im Unterschied dazu beschreiben Weis et al. keine intravasale Plättchenaggregation. Die Arbeitsgruppe geht primär von einem VEGF-A-induzierten Gefäßleck aus: Die Tumorzelle sezerniert lokal VEGF-A und durch das Auflösen der endothelialen Barriere werden der von Willebrand Faktor sowie Matrix freigelegt. Thrombozyten exprimieren vWF. Es kann sich folglich eine Thrombozytenadhäsion an extrazelluläre Matrix bilden. Die Tumorzelle nistet sich in diese Plättchen-Nische ein, welche sie schützt und ihre Extravasation fördert⁵⁰.

Diese beiden Untersuchungen zeigen verschiedene Ansatzpunkte in der Charakterisierung der Tumorzelleinnistung. Ist es die Tumorzelle selber, die sich optimale Bedingungen schafft, oder sind es lokale Begebenheiten die Metastasierung ermöglichen? Das lokale Mikromilieu, die metastatische Nische wurden deshalb hier genauer erforscht.

4.3. Das pulmonale Mikromilieu

4.3.1. Der Einfluss der Umgebung auf die Tumorzelle

Metastasierende Tumorzellen finden sich fernab von ihrem Primärtumor in fremder, meist unwirtlicher Umgebung vor. Die Tatsache, dass gewisse Zellen überleben und sogar zu proliferieren beginnen, lässt vermuten, dass diese sich der Umgebung anpassen konnten, bzw. die Umgebung an sich anpassen konnten. Dieses Ausmaß des Einflusses des Mikromilieus auf die Tumorzelle¹²⁰ wurde in folgenden Versuchen eindrücklich dargestellt:

Seftor et al. erreichten bei gesunden Melanozyten allein durch Zugabe von modifiziertem Kollagen Invasivität. Andererseits führte ein Medium, welches mit gesunden humanen embryonalen Stammzellen präkonditioniert war, zu einem weniger aggressiven Melanomphänotyp und in diesem Sinne zu einer Tumorzell-Reprogrammierung durch spezifisches Mikromilieu ¹²¹.

Ähnliches stellte sich auch in der Untersuchung von Fibroblasten heraus: Fibroblasten stellen den Hauptanteil an Stromazellen der meisten menschlichen Karzinome dar ¹²². Die Fibroblasten, im Kontext der malignen Proliferation, werden auch als CAFs (Carcinoma associated fibroblasts ¹²³) bezeichnet. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass CAFs die Tumorgenese bei blanden epithelialen Prostatazellen induzieren ¹²⁴ sowie das maligne Wachstum von Brustkrebszellen im Gegensatz zu normalen Fibroblasten fördern können ¹²⁵.

Diese Studien belegen den erheblichen Einfluss, den die Umgebung auf die Tumorzelle ausübt. Es wurde gezeigt, dass Kollagen und Fibroblasten bzw. deren Produkte die Entwicklung von Metastasen beeinflussen können. Im vorliegenden Modell wurde deshalb die Rolle des Fibronektins, als ubiquitär vorkommendes Molekül, genauer untersucht.

4.3.2. Die Rolle von Fibronektin bei der Metastasierung

Laut Kaplan et al. ⁷³ prägt der Primärtumor den Ort zukünftiger Metastasen im Sinne einer prämetastatischen Nische. Der Primarius exprimiert demnach Faktoren, welche über die Blutbahn Fibroblasten in der Lunge zur Produktion z.B. von Fibronektin anregen. Aus dem Knochenmark werden hämatopoetische Vorläuferzellen mobilisiert. Diese im Blutstrom zirkulierenden VEGF-R₁⁺ - hämatopoetischen Vorläuferzellen binden über den VLA4-Rezeptor an das Fibronektin (Abb. 4.4). Es entsteht so eine Nische aus Zellen, welche die ankommende Tumorzelle aufnehmen und ihre Proliferation ermöglichen.

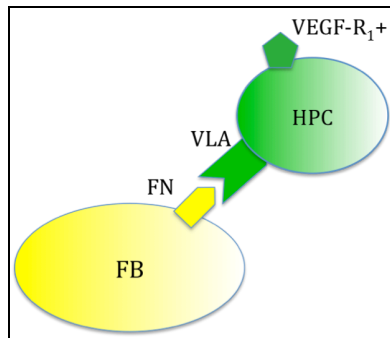


Abbildung 4.4 Bildung der Nische nach Kaplan et al.⁷³

Die mobilisierten VEGF-R₁⁺ Knochenmarkvorläuferzellen (HPC) binden über den VLA -ezeptor an lokales Fibronectin (FN). Dieses wird z.B. von ortsständigen Fibroblasten (FB) exprimiert. (FB Fibroblast; FN Fibronectin; HPC Hämatopoetische Vorläuferzellen)

In unserem Modell, wo wir unter Ausschaltung des Einflusses eines Primärtumors Melanomzellen i.v. verabreicht haben, zeigte sich keine vermehrte Fibronectinansammlung um die Nische. In den ersten Tagen nach Tumorzellinjektion wiesen fluoreszierende Fibronectin-AK in den Lungenpräparaten ein homogenes Verteilungsmuster von Fibronectin in der Lunge auf.

Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass der Primarius selber – wie von Kaplan et al. beschrieben – die frühe Fibronectin-Ansammlung zur Vorbereitung einer Nische induziert. In unserem i.v. Modell wurde der Einfluss des Primärtumors ausgeschaltet. Des Weiteren liegt Fibronectin sowohl zellulär gebunden, als auch in löslich- plasmatischer Form vor. Letztere könnte durch die Manipulation beim Anlegen von Gefrierschnitten beeinträchtigt worden sein. Insbesondere durch die Lungenperfusion mit NaCl, bzw. durch die Konservierung der Lungenflügel in PAH, könnte das plasmatische Fibronectin reduziert worden sein. Auch Kaplan et al. wiesen kein plasmatisches Fibronectin nach, sondern zeigten immunhistochemisch bronchus-nahe, zelluläre Fibronectinexpressionen im Zeitverlauf. Die ersten Aufnahmen mit einer sichtbaren Fibronectin-Mehranreicherung stammen dabei von Tag 3 und werden bis Tag 14 vermehrt beobachtet.

Angemerkt sei auch, dass die Lunge, bzw. ihre Alveolarepten physiologischerweise viel Fibronectin enthalten. Eine frühe lokale Mehranreicherung könnte somit in der Auswertung unerfasst bleiben.

Damit kann in der vorliegenden Arbeit keine frühe lokale Fibronectinproduktion durch Fibroblastenstimulation durch den Primärtumor nachgewiesen werden, aber auch nicht definitiv ausgeschlossen werden.

Zu einem späteren Zeitpunkt aber (Tag 10-12 post injectionem), als schon makroskopisch Lungenmetastasen sichtbar waren, kam es zu deutlichen Mehranreicherungen von Fibronectin um die Melanom-Metastase. Eine regelrechte Abkapselung der Metastase durch Fibronectin war erkennbar (Abb. 3.19, 3.20). Diese könnte im Zusammenhang mit einer ungehinderten Proliferation der malignen Zellen innerhalb des Fibronectin-Saums stehen.

Eine prämetastatische Nischenbildung durch Fibronectin konnte in unserem Modell nicht gezeigt werden. In den vorliegenden Versuchen zeigt sich Fibronectin zwar ubiquitär in der Lunge, eine Mehranreicherung in Metastasen-Nähe wurde jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt beobachtet. Fibronectin scheint in diesem Modell also initial eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Neben Fibronectin untersuchten Kaplan et al. die Nische auch auf das Vorhandensein VEGF-R₁-positiver Knochenmarkvorläuferzellen. Welche Rolle spielen sie bei der Metastasierung? Findet man sie auch unter Ausschluss eines Primärtumors in Metastasen-Nähe?

4.3.3. Die Rolle der VEGF-R₁ positiven Zellen

VEGF-R₁-positive hämatopoetische Vorläuferzellen initiieren die prämetastatische Nische – so postulieren Kaplan et al. die frühen Metastasierungsmechanismen⁷³.

Die oben beschriebene Präkonditionierung des Ortes zukünftiger Metastasen durch Fibronectin bildet demnach eine Andockstelle für aus dem Knochenmark mobilisierte unreife VEGF-R₁⁺-Zellen^{62, 73}. Diese Tumor-assoziierten Nischen-Zellen bereiten laut neueren Untersuchungen vom Primärtumor ausgehend in der Lunge ein prämetastatisches Mikromilieu vor^{126, 127}, in welches die metastasierende Tumorzelle aufgenommen wird und proliferieren kann.

Hiratsuka et al. ergänzten diese Modelle durch Untersuchungen des Signalpfades in der Lunge. Sie postulieren ein Modell, in welchem der Primärtumor über Sekretion der proinflammatorischen Chemokine 100A8 (MRP8/ calgranulin A) und S100A9 (MRP14/ calgranulin B) in der Lunge die Expression von Serum Amyloid A 3 (SAA3) steigert. Dies wiederum führt über die Toll-like Rezeptoren 4 (TLR4) zu einer Anziehung von Macrophagen-Antigen-1-positiven Knochenmarkvorläuferzellen (Mac1⁺- BMPC)¹²⁸. Dieser „entzündungsähnliche Zustand“ könnte wandernde Tumorzellen anziehen und Metastasierung in der Lunge ermöglichen (Abb. 4.5).

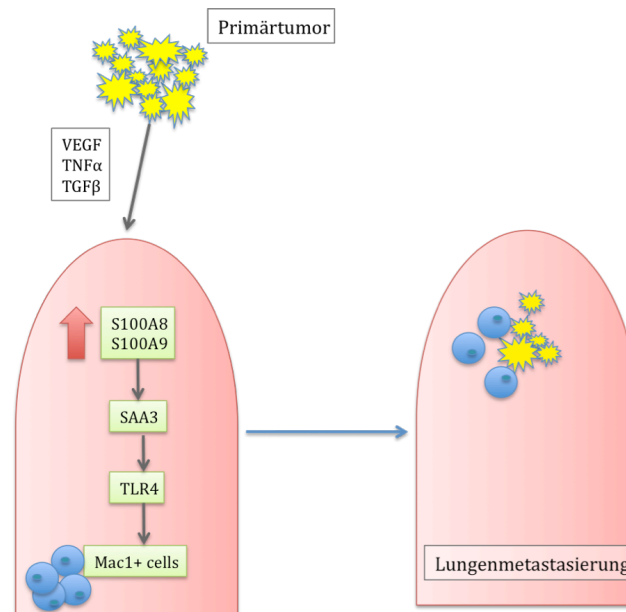


Abbildung 4.5 Das zelluläre Zusammenspiel in der Vorbereitung der prämetastatischen Nische nach Hiratsuka et al. ¹²⁸

Ist es aber nun primär der entfernte Tumor, der die oben genannten Begebenheiten schafft, oder handelt es sich bei der Nischenbildung doch um ein lokales Geschehen?

Wir bedienen uns eines Modells, wo Tumorzellen i.v. verabreicht wurden. Der Einfluss des Primärtumors war somit ausgeschaltet. Nach Injektion der B16/D5-Melanomzellen untersuchten wir zum einen das Vorhandensein von VEGF-R₁⁺-Zellen in der Lunge, zum anderen führten wir eine Expressionsanalyse von c-kit – als Marker unreifer Zellen – durch. Die VEGF-R₁-Untersuchungen ergaben mit Hilfe der PCR einen Peak 24h nach Tumorzellinjektion, dem Zeitraum, an dem nur mehr etwa 5% der Tumorzellen noch im Lungengefäßnetz zu finden sind. An den folgenden Tagen (Tag 2-6) nahm zwar die Tumorzellmasse zu, die Expression von VEGF-R₁ sank jedoch wieder und blieb hochnormal erhalten. Die Immunhistochemie konnte diesen frühen Anstieg nicht nachweisen.

Zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 10 post injectionem) konnten immunhistochemisch VEGF-Rezeptoren-1 in unmittelbarer Nähe der Tumorzellen dargestellt werden (Abb. 3.23). Andere Zellen, insbesondere mobilisierte Knochenmarkvorläuferzellen wurden nicht gesehen. In der 1000fachen Vergrößerung zeigte sich dann, dass VEGF-R₁ direkt an der Zellmembran der B16/D5 exprimiert war. Es stellte sich demnach die Frage, ob die Tumorzellen selber VEGF-R₁ exprimieren oder aber lösliche, plasmatische VEGF-R₁ ¹²⁹ an die Tumorzelle binden.

Das Gene-Array der Melanomzellen zeigte eine – wenngleich geringe – Expression an VEGF-R₁ durch die Tumorzellen. In In-vitro-Analysen wurde mittels Antikörperfärbungen gezeigt, dass VEGF-R₁ an der Zellmembran von D5/B16-Melanomzellen exprimiert wird.

Unsere Beobachtungen werden von einer klinischen Studie ergänzt, die eine Korrelation von Melanomerkkrankungen mit dem Serumwert für VEGF-R₁ (sVEGF-R₁) nachgewiesen hat¹³⁰. Tumorpatienten wiesen signifikant erhöhte sVEGF-R₁⁺-Werte im Vergleich zu Kontrollpatienten auf. Zudem zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Tumorstaging und VEGF-R₁-Serumwert. Ein fortgeschrittenes Melanomstadium geht demnach mit einer Erhöhung von VEGF-R₁ einher.

Wir schließen folglich, dass sich VEGF-Rezeptoren 1 – zumindest zu einem fortgeschrittenerem Zeitpunkt – auch an der Tumorzellmembran befinden. Der Anstieg von VEGF-R₁ kann demnach nicht ausschließlich mit dem von Knochenmarkvorläuferzellen korreliert werden.

Als Indikator für das Vorkommen von BMPCs untersuchten wir c-kit. C-kit ist ein Marker hämatopoetischer Vorläuferzellen¹³¹ und wird außerdem auch noch von Mastzellen und Melanomzellen bzw. Melanozyten¹³² exprimiert.

Auch diese Untersuchung geschah unter Ausschluss eventueller Einflussfaktoren durch den Primärtumor durch i.v. Injektion von Tumorzellen. C-kit erreicht in der Expressionsanalyse zusammen mit VEGF-R₁⁺-Zellen einen Peak 24h nach Tumorzellinjektion und stieg danach – im Gegensatz zu VEGF-R₁ – stetig an. Das heißt, innerhalb des ersten Tages nach Injektion, kommt es in der Lunge zur Ansammlung von VEGF-R₁⁺-Zellen und von c-kit exprimierenden Zellen. Wir gehen davon aus, dass es sich bei den c-kit⁺-Zellen um hämatopoetische Vorläuferzellen handelt. Eine Expression durch die Melanomzellen würde zwar den frühen Anstieg der Werte erklären, müsste dann jedoch in Korrelation mit dem pmel Wert wieder abfallen (vgl. pmel Verlauf Abb. 3.2-4).

Kaplan et al. sahen in dem simultanen Anstieg c-kit positiver Zellen und VEGF-R₁⁺-Zellen den Beweis für das Einschwemmen VEGF-R₁-positiver BMPCs durch den Primärtumor. Diese Vorläuferzellen bilden sodann die prämetastatische Nische.

Hier wurde aber gezeigt, dass hämatopoetische Vorläuferzellen sich ohne den Einfluss eines Primärtumors in der Lunge einfinden. VEGF-R₁ wird von der Tumorzelle membrangebunden exprimiert und kann also nicht direkt mit dem Vorkommen von BMPCs korreliert werden.

Aus dem Ablauf der Metastasierung in unserem Modell ergibt sich folglich das Modell einer sekundären Nischenbildung:

Durch mechanischen Arrest der Tumorzelle im Gefäßbett entsteht ein hypoxischer Schaden. Dieser kann zur stressbedingten Freisetzung von VEGF durch das Endothel, bzw. durch die Tumorzelle führen, wodurch ein Gefäßleck induziert wird. Zur Wiederherstellung des beschädigten Gefäßabschnittes werden Knochenmark-Vorläuferzellen teils durch einen Hypoxiegradienten, teils durch VEGF und SDF1 zur hypoxischen Läsion geführt¹³³. Als Schlüsselfaktor gilt hierbei HIF-1 (*Hypoxia inducible factor*)^{94, 134}. Vor Ort dienen die Knochenmarkvorläuferzellen dann der Schadensbegrenzung und weniger als Vorboten einer ankommenden Tumorzelle.

Auch der von Hiratsuka et al. beschriebene *entzündungsähnliche Zustand*, vermittelt durch die Chemokine S100A8 und S100A9, wäre durch dieses Modell erklärbar (Abb. 4.6).

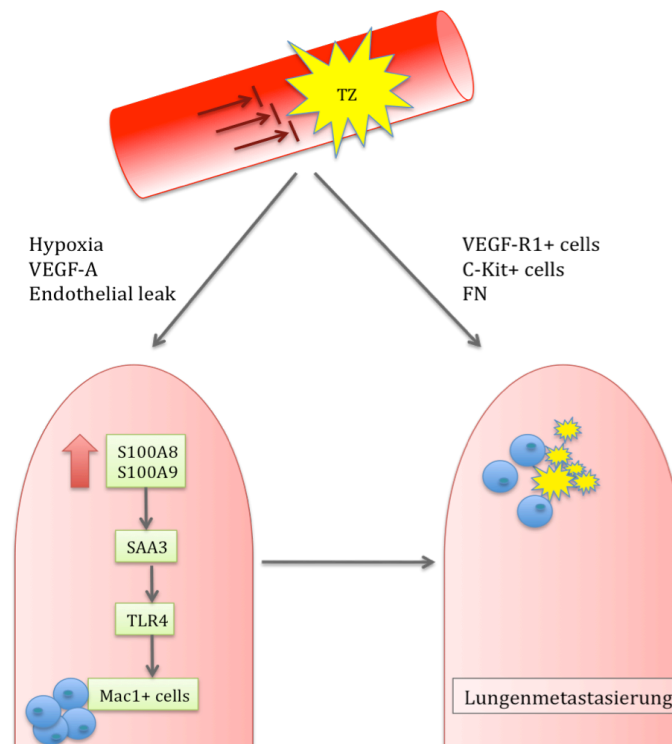


Abbildung 4.6 Modell der frühen Metastasierung

Die Tumorzelle setzt einen Schaden – Hypoxie, Endothelschaden und VEGFA-getriggerte Gefäßdurchlässigkeit induzieren einen entzündungsähnlichen Zustand (Mac1⁺- BMPC) – Fibronectin, VEGF-R1+ Zellen, C-Kit⁺-BMPC unterstützen die Nischenbildung in der Lunge.

4.4. Das Modell der (prä)metastatischen Nische

In der Diskussion um die Ansiedlung der malignen Zellen in einem vom Primärtumor entfernten Organ werden verschiedene Thesen postuliert. Neben dem „*seed and soil*“-Prinzip von Sir S. Paget (1889), überarbeitet von Fidler et al. 2003¹⁵ und dem Zufallsprinzip des nächstgelegenen Kapillarbettts nach J. Ewing, wird in neuerer Zeit wieder zunehmend der Begriff der metastatischen Nische betont. Durch ein perfektes Zusammenspiel von Tumorzelle und metastatischer Umgebung soll ein Mikromilieu geschaffen werden, welches die Proliferation der malignen Zelle ermöglicht.

Doch kann tatsächlich von einer prämetastatischen und durch den Primärtumor initiierten Nische gesprochen werden?

Die oben genannten Experimente fanden ohne den Einfluss eines Primärtumors statt. Sie führten zur These einer sekundären Nischenbildung in der murinen Lunge. Demnach wird – anders als von Kaplan und Mitarbeitern beschrieben – von einem lokalen Geschehen ausgegangen. Die Tumorzelle kommt über den Blutweg in der Lunge an und bleibt dort mechanisch hängen. Eine spezifische Adhäsion der Tumorzelle an intaktes Endothel konnte ausgeschlossen werden. Viel mehr scheint eine Aggregatbildung der Tumorzellen oder auch von Thrombozyten mit den Tumorzellen den Arrest zu begünstigen. Durch den mechanischen Arrest kommt es zum Anstieg des pulmonalen Druckes, welcher mittels ANP-Messungen erfasst wurde. Das lokale Zusammenspiel zwischen Tumorzelle und künftigem Metastasenboden ermöglicht danach das Wachstum der malignen Zelle. Die Tumorzelle sezerniert lokal Faktoren, die die Metastasierung begünstigen. In erster Linie stellte sich VEGF als bedeutend dar. VEGF erhöht die vaskuläre Permeabilität und ermöglicht ein Andocken von Thrombozyten und Tumorzellen. Eine therapeutische Inhibition von VEGF reduzierte also folgerichtig die Zahl der Metastasen.

Die vorliegenden Versuche haben das Bild der Nische erweitert und die präklinische Charakterisierung molekularer Metastasierungsmechanismen von Tumorzellen in der Lunge weiter beleuchtet. Schafft man es Teile dieser Kette zu unterbrechen oder dem Entstehen eines Mikromilieus, das die Tumorzelle schützt, zuvorzukommen, so könnte dies bedeutende Auswirkungen auf die Prävention von Metastasen haben.

4.5. Therapeutischer Ausblick

Verschiedene Schlüsselstellen der Metastasierung bieten Angriffsflächen für therapeutische Interventionen. In Bezug auf die Ansiedlung der Metastase, den frühen Prozess der Metastasierung, könnten sowohl die Veränderungen im Mikromilieu als auch das Expressionsmuster der Tumorzelle pharmakologisch beeinflusst werden.

Wie unsere Ergebnisse gezeigt haben, finden sich in den ersten Tagen nach Tumorzellinjektion Knochenvorläuferzellen in der Lunge ein. Arafat et al. sehen in den BMPCs einen idealen Vektor zur frühen Metastastherapie¹³⁵. Ein durch CD34⁺ endotheliale Vorläuferzellen vermittelter zytotoxischer Angriff erreichte einen deutlichen Rückgang der Metastasen. Ähnliches beobachteten Komarova et al., die MPCs (*Mesenchymal Progenitor Cells*) mit einem onkolytischen Virus impften und so ebenfalls eine Reduktion der Tumorzellmasse erreichten¹³⁶. Das pulmonale Mikromilieu kann also als Target der Tumorthherapie angesehen werden und könnte in Zukunft in Kombination mit anderen Chemotherapeutika an Bedeutung gewinnen.

Die Tumorzelle selbst beeinflusst durch Sekretion prometastasierender Faktoren wesentlich ihr Überleben in der neuen Umgebung. Insbesondere VEGF-A und PGF scheinen dabei einflussreiche Sekretionsprodukte zu sein und sind zunehmend in das Augenmerk der Tumorthherapie gerückt. Seit Februar 2004 befinden sich humane monoklonale Antikörper (mAb) gegen VEGF-A (z.B. Bevacizumab¹³⁷) erfolgreich im klinischen Anwendungsbereich. Als ihre Hauptangriffspunkte gelten dabei die Angiogenese sowie die Proliferation durch den Tumor¹³⁸⁻¹⁴¹ und die Reduktion von Micrometastasen¹⁴².

In unseren Versuchen ergab die direkte Inhibition von VEGF-A eine Metastasenreduktion von ca. 50%. Statistisch signifikant wurde die Reduktion der Metastasenanzahl jedoch erst durch Hemmung von VEGF und PGF. Inhibiert man nur PGF mittels siRNA so wurde auch hier eine signifikante Reduktion der Metastasen erzielt ($p < 0,05$).

Diese Ergebnisse geben Hinweise auf die Ursache der klinisch beobachteten eingeschränkten Erfolge der anti-VEGF Therapie. Die zusätzliche Blockade von PGF könnte die Wirksamkeit der Anti-Tumorthherapie – wie in unseren Ergebnissen gezeigt – deutlich verbessern.

Fischer et al. untersuchten die pharmakologischen Möglichkeiten eines PGF-Antikörpers. Dabei zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Eine Monotherapie mit einem PGF-Antikörper konnte das Tumorwachstum in mehr als 12 Tumormodellen reduzieren. Außerdem erhöhte der PGF-Antikörper die Ansprechrate auf Chemotherapeutika und konnte VEGF-Therapie-resistente Tumoren signifikant reduzieren. Die Hemmung von PGF wird demnach in der

therapeutischen Strategie an Bedeutung gewinnen¹⁴³; als Monotherapie oder insbesondere in Kombination mit der VEGF-Blockade.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Reduktion der Metastasenanzahl mittels siRNA-vermittelter Hemmung von VEGF, PGF oder von beiden Faktoren erreicht. Davis et al. prüften die Gen-Ausschaltung mittels siRNA kürzlich auf ihre Anwendbarkeit methodisch am Menschen. Was im Experiment in der Zellkultur gezielt angewandt wurde, galt es spezifisch an Tumorzellen in vivo zu reproduzieren. Mittels Nanopartikeln wurde eine spezifische mRNA/Protein-Inhibition erreicht und damit in einer klinischen Phase I-Studie eine Methode zur humanen Applikation von siRNA erforscht¹⁴⁴. Zukünftig könnte die Inhibition von VEGF, PGF oder beider Faktoren mittels siRNA eine bedeutende Rolle in der Tumorthherapie darstellen.

Die Verhinderung der Metastasierung stellt einen wichtigen Aspekt in der klinischen Onkologie dar. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der komplexen frühen Metastasierungsmechanismen liefern. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Mechanismen viele Angriffspunkte für eine pharmakologische Tumorzellinhibition bieten. Sie zeigen jedoch auch, dass aufgrund der Komplexität des Metastasierungsablaufs eine Monotherapie wenig aussichtsreich erscheint. Auch in unseren Versuchen konnte zwar durch eine kombinierte Hemmung von VEGF und PGF eine signifikante Metastasenreduktion erzielt werden, einzelne Tumorzellen haben allerdings überlebt und zu makroskopisch sichtbaren Läsionen geführt.

Es bedarf also weiterer Untersuchungen, um die Metastasierung in ihren wichtigsten Schritten zu verstehen und therapeutisch zu beeinflussen.

5. Zusammenfassung

„Jedes Naturgesetz, das sich dem Beobachter offenbart, läßt auf ein höheres, noch unerkanntes schließen.“ (*Alexander Freiherr von Humboldt*)

Die Metastasierung – Inbegriff für die Wanderung und Absiedlung maligner Zellen – gilt in der klinischen Onkologie als stark prognoselimitierender Faktor. Ein Primarius streut neoplastische Zellen und aus einem lokalen Krankheitsgeschehen wird eine Multiorgan-Pathologie mit zumeist letalem Ausgang. Es ist also von essentieller Bedeutung, den Prozess der Metastasierung im Detail zu erforschen um gezielte Therapien etablieren zu können.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den frühen Metastasierungsmechanismen in der Lunge. Insbesondere wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- a. Ablauf der hämatogenen Metastasierung in der Lunge
- b. Art der Tumorzellansiedlung: Adhäsion oder mechanischer Arrest?
- c. Interaktion der Tumorzelle mit dem Lungengewebe: Die Rolle von VEGF und PGF
- d. Erforschung des pulmonalen Mikromilieus und Charakterisierung der Nische
- e. Möglichkeiten therapeutischer Beeinflussung der frühen Metastasierungsmechanismen

Wir bedienten uns eines Mausmodells, bei dem B16D5-Melanomzellen i.v. verabreicht wurden. Unter Ausschaltung sämtlicher Einflussfaktoren eines Primärtumors wurden lokale, tumorzell-induzierte Veränderungen in der Lunge zu definierten Zeitintervallen immunhistochemisch sowie molekularbiologisch erfasst.

Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Arbeit waren:

1. Die pulmonale Metastasierung weist eine hohe Ineffizienz auf. 48 Stunden nach Injektion fanden sich lediglich 0,7% der initialen Tumorzellen im Lungenpräparat. Erst am 4. Tag post injectionem kommt es zum Anstieg der Tumorzellmasse in der Lunge – vermutlich durch die beginnende Proliferation einzelner erfolgreicher Metastasen.
2. Der Tumorzell-Arrest in der Lunge ist mechanisch. In-vitro-Versuche zeigten keine Adhäsion der Melanomzellen an reifes Endothel. Auch konnten keine klassischen Adhäsionsmoleküle in der Expressionsanalyse erhoben werden.

Der größenbedingte, mechanische Arrest hingegen konnte histologisch dargestellt werden. Ansteigende ANP-Werte – als Zeichen erhöhter Rechtsherzbelastung – belegten die hämodynamische Relevanz dieser Tumorzell- Microemboli.

3. VEGF-A und PGF erwiesen sich als essentielle, prometastatische Sekretionsprodukte der Tumorzelle. Sie werden vor allem in der frühen Phase der Tumorzellansiedlung sezerniert und tragen durch Induktion einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit wesentlich zur erfolgreichen Metastasierung bei.

Ein therapeutischer Versuchsansatz, wobei gezielt VEGF und PGF in den injizierten Melanomzellen unterdrückt wurden, zeigte eine signifikante Reduktion der Metastasen im Einzeltherapie-Schema und eine beeindruckende Reduktion der Metastasen auf 31% im Kombinationsversuch.

4. Das pulmonale Mikromilieu besteht in der frühen Metastasierungsphase aus VEGF-R₁⁺ und VEGF-R₂⁺ Zellen. Fibronektin wurde mit zunehmender Größe der Metastase als umhüllender Saum beobachtet.
5. Die in der Literatur beschriebene prämetastatische Nischenvorbereitung durch VEGF-R₁⁺-hämatopoetische Vorläuferzellen wurde immunhistochemisch dargestellt. In unserem Modell kam es trotz Ausschaltung eines Primarius zur Koinzidenz von Melanomzellen und VEGF-R₁⁺-Zellen. Dabei fiel auf, dass die Tumorzelle selbst VEGF-R₁ positiv ist oder durch lösliche Rezeptoren maskiert wurde. In vitro bestätigte sich der Verdacht. Die Annahme einer Nischenvorbereitung durch den Primärtumor mittels VEGF-R₁⁺-hämatopoetischen Vorläuferzellen sollte demnach zur Diskussion gestellt werden.

Wir stellen ein Modell vor, in dem die zirkulierende Tumorzelle mechanisch im Lungengefäßnetz hängenbleibt, einen hypoxischen Schaden setzt und es so zur Induktion eines prometastatischen Mikromilieus kommt. Dieses Mikromilieu besteht u.a. aus VEGF-A und PGF seitens der Tumorzelle und aus unreifen Knochenmark-Vorläuferzellen sowie aktivierten Endothelien seitens der Umgebung. Durch Hemmung der VEGF-A- sowie der PGF-Sekretion durch die Tumorzelle konnten wir die Metastasierung der Tumorzellen blockieren.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der frühen metastatischen Vorgänge. Der Prozess der Metastasierung beruht auf einer Kette an Ereignissen, welche weiterhin detailliert erforscht werden sollten. Schafft man es Teile der Kette zu durchbrechen, so könnte dies bedeutende Auswirkungen auf die Vermeidung von Metastasen und damit auf die Prognose der Tumorpatienten haben.

6. Abkürzungsverzeichnis

a.m.	<i>anti mouse</i>
a.r.	<i>anti rabbit</i>
AK	Antikörper
AKT/PKB	Akt 1-3 (Gene) der Proteinkinase B
BMPC	<i>Bone marrow precursor cells</i> (Knochenmark-Vorläuferzellen)
CA	Karzinom
d.h.	das heißt
EMT	<i>Epthelial-mesenchymal transition</i>
ER	Östrogen-Rezeptor
ff	<i>forward</i> (vorwärts)
FN	Fibronektin
gr.	griechisch
Hö	Hoechst (Kernfärbung)
HWZ	Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
lat.	Latein
Min	Minute/n
mM	Milli-Molar
MR	Magnetresonanz
MW	Mittelwert
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäure
NSCLC	<i>Non small-cell lung carcinoma</i>
p.i.	post injectionem
PGF	<i>Placenta growth factor</i>
r	rückwärts
RLU	<i>Relative light unit</i>
RT	Raumtemperatur
SCLC	<i>Small-cell lung carcinoma</i>
Sek.	Sekunden
SiRNA	<i>small interfering RNA (ribonucleic acid)</i>
Temp.	Temperatur

TZ	Tumorzelle
ü.N.	über Nacht
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

7. Literaturverzeichnis

1. Graham TA, Weaver C, Mao F, Kimelman D, Xu W. Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell* 2000;103:885-96.
2. Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem* 2006;108:327-34.
3. Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 2007;369:1742-57.
4. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27:6199-206.
5. Harpole DH, Jr., Johnson CM, Wolfe WG, George SL, Seigler HF. Analysis of 945 cases of pulmonary metastatic melanoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;103:743-8; discussion 8-50.
6. Fife KM, Colman MH, Stevens GN, et al. Determinants of outcome in melanoma patients with cerebral metastases. *J Clin Oncol* 2004;22:1293-300.
7. Eggermont AM, Gore M. Randomized adjuvant therapy trials in melanoma: surgical and systemic. *Semin Oncol* 2007;34:509-15.
8. Eggermont AM, Voit C. Management of melanoma: a European perspective. *Surg Oncol Clin N Am* 2008;17:635-48, x.
9. Graziani G, Tentori L, Navarra P. Ipilimumab: A novel immunostimulatory monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Pharmacol Res* 2011.
10. Lipson EJ, Drake CG. Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:6958-62.
11. Luke JJ, Hodi FS. Vemurafenib and BRAF Inhibition: A New Class of Treatment for Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* 2012;18:9-14.
12. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364:2507-16.
13. Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 1990;50:6130-8.
14. Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978;38:2651-60.

15. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003;3:453-8.
16. Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res* 1978;28:149-250.
17. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005;233:706-20.
18. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006;172:973-81.
19. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-54.
20. Friedl P, Brocker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:41-64.
21. Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J Cell Sci* 2005;118:2143-53.
22. Hildenbrand R, Dilger I, Horlin A, Stutte HJ. Urokinase and macrophages in tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 1995;72:818-23.
23. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:548-58.
24. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76-83.
25. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991;113:173-85.
26. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:118-32.
27. Kumar S, Tomooka Y, Noda M. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;185:1155-61.
28. McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 2005;5:505-15.

29. Kim M, Gans JD, Nogueira C, et al. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* 2006;125:1269-81.
30. Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS, Segall JE. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* 2000;60:2504-11.
31. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, et al. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* 2007;67:2649-56.
32. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 2006;12:895-904.
33. Liotta LA, Kohn E. Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature* 2004;430:973-4.
34. Nguyen DX, Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 2007;8:341-52.
35. Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, et al. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 2004;428:332-7.
36. Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell* 2006;10:355-62.
37. Sugarbaker PH. Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastases from colorectal cancer. *J Surg Oncol Suppl* 1993;3:158-60.
38. Weiss L. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res* 1990;54:159-211.
39. Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 2005;26:513-23.
40. Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2000;60:2541-6.
41. Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, Nadkarni KV, MacDonald IC, Groom AC. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am* 2001;10:243-55, vii.
42. Varghese HJ, Davidson MT, MacDonald IC, et al. Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases. *Cancer Res* 2002;62:887-91.
43. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970;45:773-82.

44. Fidler IJ, Nicolson GL. Fate of recirculating B16 melanoma metastatic variant cells in parabiotic syngeneic recipients. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:1867-72.
45. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998;153:865-73.
46. Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Peeper DS. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 2004;430:1034-9.
47. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989;8:98-101.
48. Tarin D, Price JE, Kettlewell MG, Souter RG, Vass AC, Crossley B. Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res* 1984;44:3584-92.
49. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:227-41.
50. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol* 2004;167:223-9.
51. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 2005;437:497-504.
52. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.
53. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
54. van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, et al. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest* 1999;104:1613-20.
55. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 1998;140:947-59.
56. Weis S, Shintani S, Weber A, et al. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest* 2004;113:885-94.

57. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999;286:950-2.
58. Tuschl T. Functional genomics: RNA sets the standard. *Nature* 2003;421:220-1.
59. Martin SE, Caplen NJ. Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8:81-108.
60. Schackert G, Fidler IJ. Development of in vivo models for studies of brain metastasis. *Int J Cancer* 1988;41:589-94.
61. Radinsky R, Fidler IJ, Price JE, et al. Terminal differentiation and apoptosis in experimental lung metastases of human osteogenic sarcoma cells by wild type p53. *Oncogene* 1994;9:1877-83.
62. Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* 2006;8:1369-75.
63. Hristov M, Weber C. Progenitor cell trafficking in the vascular wall. *J Thromb Haemost* 2009;7 Suppl 1:31-4.
64. Weibel ER, Gomez DM. Architecture of the human lung. Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. *Science* 1962;137:577-85.
65. Gloor F. [The ultrastructure of pancreatic capillaries; electron microscopic research on the exocrine pancreas of the white mouse.]. *Acta Anat (Basel)* 1958;35:63-84.
66. Kuchler AM, Gjini E, Peterson-Maduro J, Cancilla B, Wolburg H, Schulte-Merker S. Development of the zebrafish lymphatic system requires VEGFC signaling. *Curr Biol* 2006;16:1244-8.
67. Hogan BM, Herpers R, Witte M, et al. Vegfc/Flt4 signalling is suppressed by Dll4 in developing zebrafish intersegmental arteries. *Development* 2009;136:4001-9.
68. Li X, Lee C, Tang Z, et al. VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell Adh Migr* 2009;3:322-7.
69. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7:575-83.
70. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9267-71.

71. Iyer S, Leonidas DD, Swaminathan GJ, et al. The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* 2001;276:12153-61.
72. Kopfstein L, Christofori G. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:449-68.
73. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005;438:820-7.
74. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 1995;55:5687-92.
75. McGrath RT, McRae E, Smith OP, O'Donnell JS. Platelet von Willebrand factor--structure, function and biological importance. *Br J Haematol* 2010;148:834-43.
76. Furlan M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann Hematol* 1996;72:341-8.
77. Dutly AE, Kugathasan L, Trogadis JE, Keshavjee SH, Stewart DJ, Courtman DW. Fluorescent microangiography (FMA): an improved tool to visualize the pulmonary microvasculature. *Lab Invest* 2006;86:409-16.
78. van Schooten CJ, Shahbazi S, Groot E, et al. Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood* 2008;112:1704-12.
79. Kaspar M, Zardi L, Neri D. Fibronectin as target for tumor therapy. *Int J Cancer* 2006;118:1331-9.
80. Fidler IJ, Gersten DM, Budmen MB. Characterization in vivo and in vitro of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 1976;36:3160-5.
81. Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol* 2001;Chapter 20:Unit 20 1.
82. Wong CW, Lee A, Shientag L, et al. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2001;61:333-8.
83. Chavakis E, Choi EY, Chavakis T. Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. *Thromb Haemost* 2009;102:191-7.
84. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-87.

85. Witz IP. The selectin-selectin ligand axis in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:19-30.
86. Chen M, Geng JG. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2006;54:75-84.
87. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991;65:859-73.
88. Dejana E, Breviario F, Caveda L. Leukocyte-endothelial cell adhesive receptors. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12 Suppl 10:S25-8.
89. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7:678-89.
90. Madsen CD, Sahai E. Cancer dissemination--lessons from leukocytes. *Dev Cell* 2010;19:13-26.
91. Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 2010;16:116-22.
92. MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF. Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays* 2002;24:885-93.
93. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol* 2011;57:131-40.
94. Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1367-74.
95. Koshikawa N, Iyozumi A, Gassmann M, Takenaga K. Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor overexpression upon hypoxic exposure. *Oncogene* 2003;22:6717-24.
96. Etoh T, Byers HR, Mihm MC, Jr. Integrin expression in malignant melanoma and their role in cell attachment and migration on extracellular matrix proteins. *J Dermatol* 1992;19:841-6.
97. Paternotte E, Gaucher C, Labrude P, Stoltz JF, Menu P. Review: behaviour of endothelial cells faced with hypoxia. *Biomed Mater Eng* 2008;18:295-9.
98. Simons D, Grieb G, Hristov M, et al. Hypoxia-induced endothelial secretion of macrophage migration inhibitory factor and role in endothelial progenitor cell recruitment. *J Cell Mol Med* 2010.

99. Cheng Y, Luo Y, Zhou YS, Wu HY, Xie ZB. [Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in malignant melanoma]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2009;25:134-6.
100. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1994;71:374-9.
101. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16:4604-13.
102. Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, Zaret KS. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 2001;294:559-63.
103. Suarez S, Ballmer-Hofer K. VEGF transiently disrupts gap junctional communication in endothelial cells. *J Cell Sci* 2001;114:1229-35.
104. Lungu GF, Li ML, Xie X, Wang LV, Stoica G. In vivo imaging and characterization of hypoxia-induced neovascularization and tumor invasion. *Int J Oncol* 2007;30:45-54.
105. Rofstad EK, Gaustad JV, Egeland TA, Mathiesen B, Galappathi K. Tumors exposed to acute cyclic hypoxic stress show enhanced angiogenesis, perfusion and metastatic dissemination. *Int J Cancer* 2010;127:1535-46.
106. Shen S, Fan J, Cai B, et al. Vascular endothelial growth factor enhances cancer cell adhesion to microvascular endothelium in vivo. *Exp Physiol* 2010;95:369-79.
107. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001;2001:re21.
108. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 1999;4:915-24.
109. Werdich XQ, Penn JS. Src, Fyn and Yes play differential roles in VEGF-mediated endothelial cell events. *Angiogenesis* 2005;8:315-26.
110. Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, et al. Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454. *Thromb Haemost* 2003;90:549-54.
111. Im JH, Fu W, Wang H, et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004;64:8613-9.
112. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *Lancet Oncol* 2002;3:425-30.

113. Borsig L. The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:1247-55.
114. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 1999;59:1295-300.
115. Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW. Platelet--cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 2004;143:819-26.
116. Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. Inhibition of metastasis in a murine 4T1 breast cancer model by liposomes preventing tumor cell-platelet interactions. *Clin Exp Metastasis* 2010;27:25-34.
117. Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, Ruf W. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:11832-6.
118. Bazou D, Martinez MJ, Medina C, Radomski MW. Elucidation of flow-mediated tumour cell-induced platelet aggregation using an ultrasound standing wave trap. *Br J Pharmacol* 2010.
119. Laubli H, Borsig L. Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 2010;20:169-77.
120. Cretu A, Brooks PC. Impact of the non-cellular tumor microenvironment on metastasis: potential therapeutic and imaging opportunities. *J Cell Physiol* 2007;213:391-402.
121. Seftor EA, Brown KM, Chin L, et al. Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment. *Cancer Res* 2005;65:10164-9.
122. Sappino AP, Skalli O, Jackson B, Schurch W, Gabbiani G. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int J Cancer* 1988;41:707-12.
123. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999;59:5002-11.
124. Hayward SW, Wang Y, Cao M, et al. Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. *Cancer Res* 2001;61:8135-42.
125. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121:335-48.

126. Wels J, Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev* 2008;22:559-74.
127. Kang SY, Halvorsen OJ, Gravdal K, et al. Prosaposin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12115-20.
128. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, et al. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol* 2008;10:1349-55.
129. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
130. Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Circulating serum levels of angiogenic factors and vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in melanoma patients. *Melanoma Res* 2006;16:405-11.
131. Edling CE, Hallberg B. c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:1995-8.
132. Pilloni L, Bianco P, Difelice E, et al. The usefulness of c-Kit in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions. *Eur J Histochem* 2011;55:e20.
133. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175-89.
134. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004;10:858-64.
135. Arafat WO, Casado E, Wang M, et al. Genetically modified CD34+ cells exert a cytotoxic bystander effect on human endothelial and cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:4442-8.
136. Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, Curiel DT, Pereboeva L. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther* 2006;5:755-66.
137. Loupakis F, Bocci G, Pasqualetti G, et al. Targeting vascular endothelial growth factor pathway in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: state-of-the-art and future perspectives in clinical and molecular selection of patients. *Curr Cancer Drug Targets* 2010;10:37-45.
138. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995;95:1789-97.

139. Borgstrom P, Gold DP, Hillan KJ, Ferrara N. Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin. *Anticancer Res* 1999;19:4203-14.
140. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-27.
141. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005;65:671-80.
142. Yang H, Jager MJ, Grossniklaus HE. Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:2835-42.
143. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 2007;131:463-75.
144. Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 2010;464:1067-70.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Enders, meinem Doktorvater, der mir durch diese Arbeit einen spannenden Einstieg in die Grundlagenforschung ermöglicht hat. Die Arbeit mit Versuchstieren, die Handhabung von Gefrierschnitten, die Untersuchungen mit Fluoreszenzmikroskopie, das Forschen mittels PCR Analysen bereicherten mein wissenschaftliches Interesse. Die Versuche führten zu aufschlussreichen Ergebnissen und eröffneten spannende neuen Fragestellungen. Für die außerordentlich gute und geduldige Betreuung möchte ich mich hiermit bedanken.

Danken möchte ich auch den medizinisch-technischen Assistentinnen Claudia Fahney und Bärbel Lorenz, die mir bei den Versuchen mit Rat und Tat zur Seite standen und Höhen und Tiefen des Laboralltags zu puffern wussten.

Mein Dank gilt auch dem FöFoLe (Förderprogramm für Forschung und Lehre), dabei insbesondere Prof. Dr. Dr. J. Heesemann und Prof. Dr. M. Reincke. Das FöFoLe hat sich zum Ziel gesetzt junge Forscher zu unterstützen und in die wissenschaftliche Tätigkeit der LMU einzugliedern. Dabei regte das Förderprogramm unser Interesse an der molekularen und systembiologischen Forschung auf breiter Basis an.

Zuletzt ein herzlicher Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich die ganzen Jahre unterstützt und gefördert haben. Nur so konnte ich viele meiner Ziele erreichen.

Vielen Dank.