

Aus der

Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. M. Dieterich

**Die Mechanismen der Hirnmetastasierung:
Ein neuer experimenteller Ansatz mittels
in vivo 2-Photonen-Mikroskopie**

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

vorgelegt von
Yvonne Kienast
aus Berlin

Jahr
2010

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Walter Pfister

2. Berichterstatter Prof. Dr. Dr. h.c. Hans A. Kretzschmar

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann
Prof. Dr. Joerg-Christian Tonn

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Frank Winkler

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

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 05. 2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	6
1.1 Hirnmetastasen: Inzidenz, Prognose und Therapie.....	7
1.2 Die Pathogenese der Hirnmetastasierung.....	8
1.2.1 Die metastatische Kaskade	8
1.2.2 Faktoren der organspezifischen (Hirn)metastasierung	10
1.2.3 Mikroskopische Untersuchungen zur (Hirn)metastasierung	15
1.3 <i>In vivo</i> -2-Photonen-Mikroskopie	16
2 Zielsetzung.....	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	21
3.1.1 Mikroorganismen	21
3.1.2 Wachstumsbedingungen für <i>Escherichia coli</i>	21
3.1.3 Lagerung von <i>Escherichia coli</i>	22
3.1.4 Vollmedium zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	22
3.1.5 Geräte und Material	22
3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	23
3.2.1 Plasmide	23
3.2.2 Aufreinigung und Präparation von Nukleinsäuren	23
3.2.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren	25
3.2.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	26
3.2.5 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	26
3.2.6 Geräte und Materialien	29
3.3 Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	30
3.3.1 Zell-Linien	30
3.3.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	30
3.3.3 Mykoplasmen-Test	32
3.3.4 Stabile, nicht-virale Transfektion von RFP in eukaryotische Zellen	32
3.3.5 Retrovirale Transduktion von RFP in eukaryotische Zellen	33
3.3.6 Durchflußzytometrie (FACS).....	34
3.3.7 Proliferationsassay	35
3.4 Tierversuche	36
3.4.1 Maus-Linien	36
3.4.2 Generierung und Zucht doppelt transgener Mäuse	36
3.4.3 Genotypisierung.....	38
3.4.4 Narkose	39
3.4.5 Präparation des chronischen kraniellen Fensters.....	39
3.4.6 Intracarotidale Injektion von Tumorzellen	40
3.4.7 Injektion des Fluoreszenzmarkers zur Gefäßdarstellung	42
3.4.8 2-Photonen-Intravitalmikroskopie	42
3.4.9 Applikation von Bevacizumab	45
3.4.10 Quantifizierungen, Analyse und Auswertung.....	46
3.4.11 Geräte, Materialien und Instrumente	47

3.5	Histologie/Immunhistochemie.....	48
3.5.1	Durchführung	48
3.5.2	VEGF-Färbungen	48
3.6	Proteinchemische Arbeitsmethoden	49
3.6.1	Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen	49
3.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	49
3.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
3.6.4	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)	49
3.6.5	Lösungen und Puffer zur Protein-Analyse	50
3.6.6	Identifizierung pro- und antiangiogener Faktoren in Tumorzellen.....	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Fluoreszenzmarkierung der Tumorzell-Linien	53
4.1.1	Generierung stabiler Transfektanten durch nicht-virale Transfektion	53
4.1.2	Generierung stabiler Transfektanten durch retrovirale Transduktion.....	54
4.2	<i>In vivo</i> -2-Photonen-Analyse der Kinetik der Hirnmetastasierung	56
4.2.1	Die vier obligaten Schritte der Hirnmetastasierung	57
4.2.2	Metastatische Ineffizienz durch Mangel an Blutgefäßinteraktionen.....	62
4.2.3	Ein Ruhezustand von Tumorzellen („dormancy“) ist strikt perivaskulär und teilweise dynamisch	63
4.2.4	Obligate, ineffiziente und deletäre Schritte der Hirnmetastasierung.....	64
4.3	Auswirkung einer VEGF-Inhibition auf die Hirnmetastasierung.....	66
5	Diskussion	70
5.1	Ein neues Tiermodell für die Neuroonkologische Forschung	71
5.1.1	Vorteile und Nachteile des Tiermodells	71
5.2	Organotropie durch initialen Arrest?	72
5.3	Aktive Extravasation zu einem frühen Zeitpunkt.....	73
5.4	Hirntumorgefäße als „Boden“ der Metastasierung.....	74
5.5	Latenzzustand von Tumorzellen.....	75
5.6	Kooption, Angiogenese und anti-VEGF-Therapie	76
5.7	Die Ineffizienz der Hirnmetastasierung.....	78
5.8	Klinische Beurteilung der Ergebnisse	78
5.9	Ausblick	79
6	Zusammenfassung.....	80
7	Literaturverzeichnis	81
8	Anhang	92
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	92
8.2	Abbildungsverzeichnis	94
8.3	Tabellenverzeichnis	95
9	Danksagung.....	96
10	Bereits veröffentlichte Aspekte der Arbeit.....	97
11	Lebenslauf.....	99

In Dankbarkeit meiner Mutter gewidmet

1 Einleitung

1.1 Hirnmetastasen: Inzidenz, Prognose und Therapie

Die häufigsten malignen Hirntumore sind nicht primäre, sondern sekundäre Tumore: die Hirnmetastasen. Etwa 20–40% aller Patienten mit systemischen Malignomen entwickeln zerebrale Metastasen. Häufige Ausgangstumore sind das Lungenkarzinom (40–50%), das Mammakarzinom (15–20%), das maligne Melanom (5–20%) sowie das Nierenzellkarzinom (5–10%). Weiterhin kann eine Hirnmetastasierung bei Keimzelltumoren, gastrointestinalen Karzinomen und beim Prostatakarzinom beobachtet werden (Kirsch and Loeffler, 2005). Bei 10–20% aller Patienten ist der Primärtumor zunächst unbekannt, in 5% aller Fälle kann er nicht gefunden werden (Pavlidis and Fizazi, 2009).

Hirnmetastasen sind bei Krebserkrankungen deshalb so gefürchtet, weil nur limitierte Behandlungsoptionen zur Verfügung stehen und die Lebenserwartung und Lebensqualität der Patienten aufgrund progredienter neurologischer Ausfälle signifikant reduziert wird (Palmieri et al., 2007; Eichler and Loeffler, 2007). Die verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten beinhalten neben alleiniger antiödematöser Behandlung die Ganzhirnbestrahlung, Operation, stereotaktische Einzelzeitbestrahlung und Chemotherapie (**Abb. 1**), wobei die mittleren Überlebensraten auch durch maximale Therapie nur von 1 bis 2 Monaten auf etwa 5 bis 12 Monate verlängert werden können (Soffiatti et al., 2008).

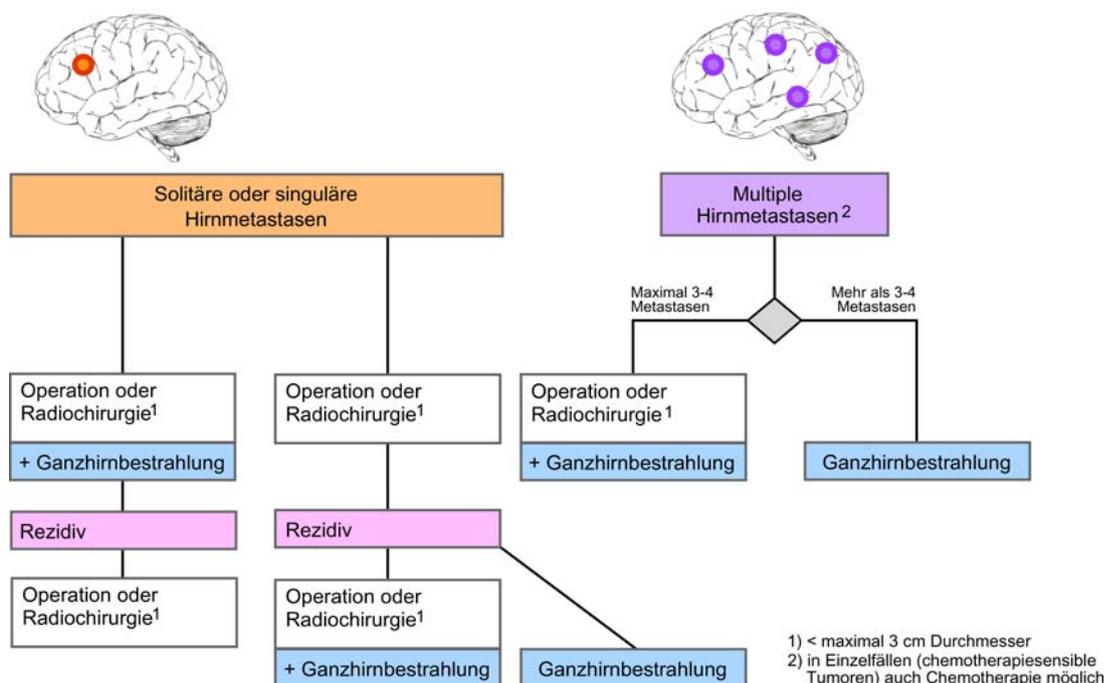


Abb. 1: Behandlungsschema zerebraler Metastasen

Bei der Therapie von Hirnmetastasen sind die Prognosefaktoren (Anzahl der zerebralen Metastasen, Ausmaß der extrazerebralen Metastasierung, Alter des Patienten, Karnofsky-Score) von ausschlaggebender Bedeutung. Sie bestimmen das therapeutische Vorgehen. Aus: Leitlinien für Diagnostik und Therapie (Diener and Putzki, 2008).

Derzeit wird die Inzidenz von Hirnmetastasen auf ca. 4–11 pro 100.000 Einwohner pro Jahr geschätzt (genaue epidemiologische Daten für Deutschland fehlen). Aufgrund einer frühzeitigen neuroradiologischen Diagnostik sowie einer verbesserten Therapie des Primärtumors ist während der letzten Jahrzehnte eine deutliche Zunahme von Patienten mit

zerebralen Metastasen zu beobachten (Ranjan and Abrey, 2009). Während die systemische Krebserkrankung immer besser therapeutisch kontrollierbar ist, sind Hirnmetastasen durch Therapeutika schwerer erreichbar, da sie vom systemischen Blutkreislauf durch eine Blut-Hirn-Schranke (Abschnitt 1.2.2.2) getrennt werden. Das Gehirn wird somit als sicheres Rückzugsgebiet, als „sanctuary site“ (Palmieri et al., 2007), für metastasierte Tumorzellen angesehen. Dieser organspezifische Faktor gilt als weitere Ursache für die steigende Inzidenz von Hirnmetastasen.

Typische klinische Zeichen für Hirnmetastasen sind neben fokalneurologischen Defiziten und epileptischen Anfällen auch Hirndruckzeichen mit Kopfschmerzen, Nausea und Erbrechen, verursacht durch tumorbedingte Flüssigkeitsansammlungen im Hirngewebe (perifokales Hirnödem). Der erhöhte intrakranielle Druck (> 30 mmHg), hervorgerufen durch Hirnödem und Raumforderung durch den Tumor, führt zu einer schlechteren Versorgung des Gehirns mit Sauerstoff und einer Druckschädigung von neuronalem Gewebe und Hirnnerven. Einblutungen in eine Metastase oder akuter Liquoraufstau können zu einer rapiden Verschlechterung mit plötzlichem Versterben führen. Metastasen der hinteren Schädelgrube (Kleinhirn und Hirnstamm) führen schon bei geringer Größenzunahme zur Einklemmung und Schädigung lebenswichtiger Areale (Atemzentrum, Herz-Kreislaufzentrum) und damit zum Tod.

Die Therapie hat mit wenigen Ausnahmen keine kurative, sondern eine palliative Zielsetzung. Daher sind wirkungsvollere Ansätze zur Prävention und verbesserten Therapie von Hirnmetastasen von großer Bedeutung.

1.2 Die Pathogenese der Hirnmetastasierung

1.2.1 Die metastatische Kaskade

Hirnmetastasen werden definiert als Absiedelungen von Tumorzellen eines soliden extrazerebralen Tumors, welche stets über den Blutweg das Gehirn erreichen (hämatogene Metastasierung, **Abb. 2**). Die lymphogene Metastasierung spielt für das Gehirn keine Rolle, da typische Lymphgefäße im Gehirn fehlen.

Die „metastatische Kaskade“ ist ein komplexer, mehrstufiger, sequenzieller Prozess und beginnt mit der Loslösung von Karzinomzellen aus dem epithelialen Verbund durch Verlust von Zelladhäsionsmolekülen [z.B. E-Cadherin; (Frixen et al., 1991; Pierceall et al., 1995)]. Die Proteolyse der extrazellulären Matrix [z.B. durch Matrix-Metalloproteinasen; (Nabeshima et al., 2002)] sowie eine gesteigerte Lokomotion der malignen Zellen führt letztlich zur Intravasation ins Blutgefäßsystem. Im Primärtumor können Blutgefäße auch neu gebildet werden (Angiogenese), über die die Tumorzellen ebenfalls den Primärtumor verlassen und in den Körperblutkreislauf eintreten können. In der Zirkulation müssen die Tumorzellen der immunologischen Abwehr entgehen und werden zusätzlich mechanischen Scherkräften ausgesetzt, so dass nur wenige Tumorzellen (weniger als ein Prozent) diese Phase überleben (Liotta and Kohn, 1990). Miteinander aggregierte Tumorzellklumpen zeigen eine deutlich erhöhte Fähigkeit, in der Blutzirkulation und deren Blutturbulenzen zu überleben (Nicolson et al., 1994). Nachdem das Gehirn erreicht wurde, beginnt eine Abfolge weiterer

Schritte [die späte „metastatische Kaskade“; (Fidler et al., 2002)]: Die metastasierenden Tumorzellen müssen das Gefäßsystem verlassen (Paku et al., 2001) oder können möglicherweise auch in selbigem anwachsen (Al-Mehdi et al., 2000), um schließlich zu klinisch relevanten, großen Metastasen zu proliferieren, wobei hierbei möglicherweise VEGF-A-vermittelte (engl.: vascular endothelial growth factor) Angiogenese-Prozesse eine Rolle spielen (Yano et al., 2000; Kusters et al., 2003). Tatsächlich bleiben viele Schritte der Metastasierung ungeklärt oder werden kontrovers diskutiert, wie der Mechanismus des Tumorzellarrests (Orr and Wang, 2001; Chambers et al., 2002; Seitz et al., 2008), die Bedeutung der Extravasation (Al-Mehdi et al., 2000) und die Bedeutung der Angiogenese (siehe auch Abschnitte 1.2.2.3 und 1.2.2.4) bei der Proliferation zur Makrometastase (Fidler et al., 2002; Leenders et al., 2004). Dies resultiert vor allem aus methodologischen Schwierigkeiten: Klassische Einzeit-Experimente durch z.B. Histologie oder bestimmte *in vivo*-Darstellungstechniken können weder die Zukunft noch die Vergangenheit eines beobachteten Phänomens klären. So ist beispielsweise auch der chronische Ruhezustand („dormancy“) einzelner metastatischer Zellen (Luzzi et al., 1998) oder perivaskulärer Mikrometastasen (Holmgren et al., 1995), der eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumorrezidiven spielen kann, in seiner Bedeutung und biologischen Charakteristik noch unzureichend verstanden (Townson and Chambers, 2006).

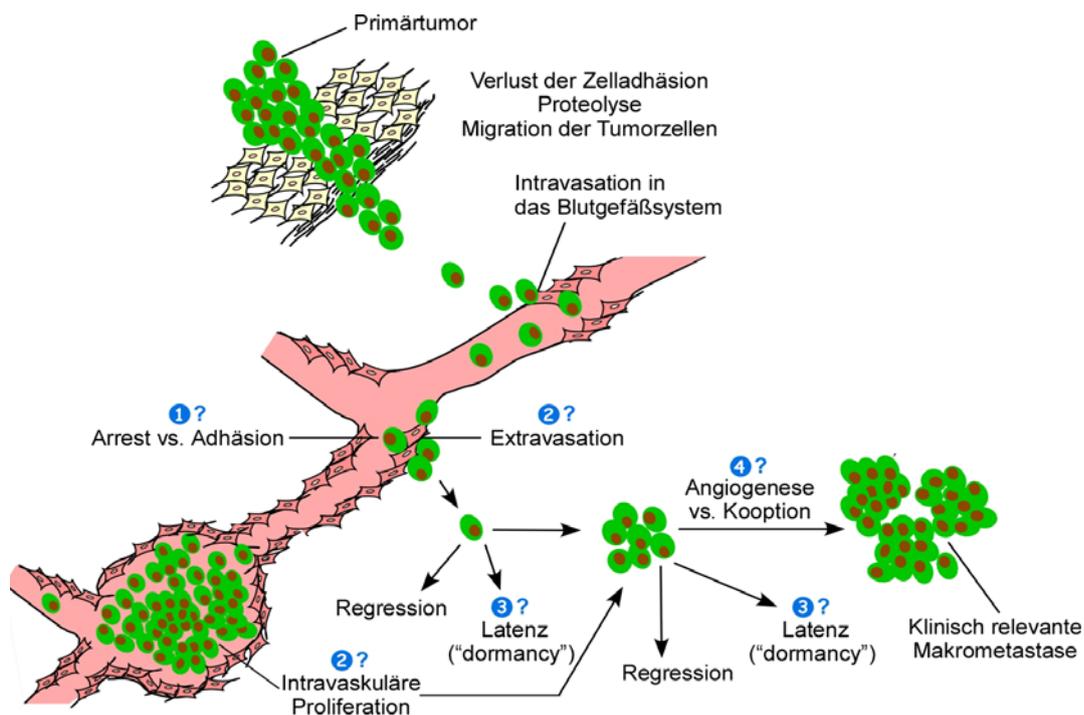


Abb. 2: Schema der Tumorzellmetastasierung

Die Disseminierung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor in das umliegende Stroma wird durch proteolytische Enzyme und den Verlust von Zell-Zell-Kontakten ermöglicht. Nach Invasivität in das Blutgefäßsystem beginnt die späte „metastatische Kaskade“ mit noch ungeklärten Fragen: (1) Ist der initiale Tumorzellarrest passiver Natur, oder können die Zellen aktiv an der Zellwand adhären? (2) Proliferieren die Tumorzellen ausschließlich nach Gefäßextravasation und Einwanderung in das Organparenchym, oder können sie möglicherweise auch intravaskulär Makrometastasen bilden? (3) Was ist die Rolle eines chronischen Latenzzustandes, der „tumor dormancy“? (4) Müssen Tumorzellen Angiogenese induzieren, oder gibt es andere Mechanismen der Tumolvaskularisierung und Makrometastasenproliferation im Gehirn? Zusammengefasst ist die metastatische Kaskade ein multifaktorieller Vorgang, der in seinen Einzelheiten noch nicht geklärt ist. Modifiziert nach (Pantel et al., 1999).

Experimentelle Analysen von Zellschicksalen konnten zeigen, dass die späteren Schritte der metastatischen Kaskade (Überleben im Blutstrom bis zum Anwachsen der metastatischen Zellpopulation im Zielorgan) ineffizienter ablaufen als die initialen Schritte (Invasion und Intravasation) und somit die insgesamt ausgeprägte Ineffizienz des metastatischen Vorganges zu bedingen scheinen (Chambers et al., 2002). Für eine wirkungsvollere Therapie wäre also theoretisch die Inhibition der späten Schritte der Metastasierungskaskade am erfolgversprechendsten, da sie zum einen zum Zeitpunkt der Diagnose möglicherweise noch nicht abgelaufen sind, zum anderen durch den vorangegangenen Zelltod weniger Zellen abgetötet oder inhibiert werden müssten (Chambers et al., 2002).

1.2.2 Faktoren der organspezifischen (Hirn)metastasierung

Die Erforschung regulierender, fördernder und hemmender Faktoren der Metastasierung hat ihren Ursprung im Jahr 1889, als der englische Chirurg Stephen Paget seine „Saat-und-Boden“-Theorie formulierte [engl.: „seed and soil“ theory; (Paget, 1889)]. Dabei stellt das Mikromilieu von unterschiedlichen Organen (der „Boden“) einen wichtigen Unterscheidungsfaktor dar, der für die selektive Bindung der metastasierenden Tumorzellen (die „Saat“) an bestimmte Organe verantwortlich ist. Rund 40 Jahre später widersprach der amerikanische Pathologe James Ewing mit seiner hämodynamischen Theorie, die besagt, dass die Entwicklung von Metastasen im jeweiligen Gewebe nach einem zufälligen Muster erfolgt, das durch anatomische Strukturen des Gefäßsystems erklärbar sei (Ewing, 1928). Schließlich führten detaillierte experimentelle und klinische Studien bezüglich der Organpräferenz von Malignomen zu der Schlussfolgerung, dass, obwohl anatomische und mechanische Gegebenheiten eine Rolle spielen, die Besiedelung entfernt liegender Organe einem organspezifischen Muster folgen muss (Fidler, 2003). Inzwischen ist bekannt, dass die Verteilung der Tumorzellen im Organismus durch Chemokine und Rezeptoren beeinflusst wird (Andre et al., 2006). Weitere Studien konnten Gene (Bos et al., 2009) und Proteine (Carbonell et al., 2009) identifizieren, welche die Hirnmetastasierung beeinflussen (siehe auch Abschnitt 1.2.2.2).

1.2.2.1 Tumorzellen als „Saatgut“

Die „Saat“ der Metastasen rekrutiert sich aus der genetisch heterogenen Krebszellpopulation des Primärtumors. Im Verlauf einer Krebserkrankung akquirieren die Tumorzellen genetische und epigenetische Veränderungen, die das weitere Schicksal dieser Zellen bestimmen. Dabei werden nach darwinistischen Prinzipien Mutationen bevorzugt, die einzelnen Krebszellen einen selektiven Vorteil bieten. Fidler und Hart haben die genetische Variabilität in Primärtumoren eingehend untersucht und konnten zeigen, dass sich bereits in der frühen Wachstumsperiode eines Tumors Zellklone mit unterschiedlichem metastatischem Potential entwickeln (Fidler and Hart, 1982). Man rätselt, ob sich diese metastasierenden Zellklone absiedeln und als Subpopulationen unabhängig vom Primärtumor entwickeln oder mit fortschreitendem Wachstum den Tumor verdrängen [klonale Dominanz; (Kerbel, 1990)]. Die Untersuchung von Genexpressionsprofilen von Mammakarzinomen hat in den letzten Jahren zumindest gezeigt, dass offenbar nicht nur kleine Zellpopulationen, sondern die

Genexpression des gesamten Primärtumors dessen Prognose und Metastasierungswahrscheinlichkeit stark beeinflussen (van't Veer et al., 2002; van de Vijver et al., 2002; Wang et al., 2002). Andererseits existieren Untersuchungen, die Gene identifizieren konnten, die in metastatischen Zellen, nicht aber im Primärtumor exprimiert werden (Mundy, 2002). Darüber hinaus wurden Metastasen-Suppressorgene entdeckt, die eine Metastasierung verhindern können, ohne dabei Einfluss auf die primäre Malignität des Tumors zu haben (Steeg, 2003). Integrative Metastasierungsmodelle unternehmen den Versuch, ein allgemeines Konzept unter Berücksichtigung der bestehenden unterschiedlichen Hypothesen zu entwickeln (**Abb. 3**). Hierbei befindet sich zwar die Gensignatur mit schlechter Prognose im gesamten Tumor, der allerdings trotzdem Subpopulationen mit gewebespezifischen Signaturen besitzen kann, um eine organspezifische Metastasierung hervorzurufen. Die Neigung zu einer Disseminierung von Tumorzellen kann gewonnen werden, während der Tumor lokal aggressiv wird, wohingegen Überwuchs distal kolonisierender Tumorzellen eine weitere Selektion genetischer Heterogenität erfordert. Das Gefäßsystem und die Matrixkomponenten der unterschiedlichen Gewebeumgebung stellen weitere wichtige Faktoren im Metastasierungsprozess dar.

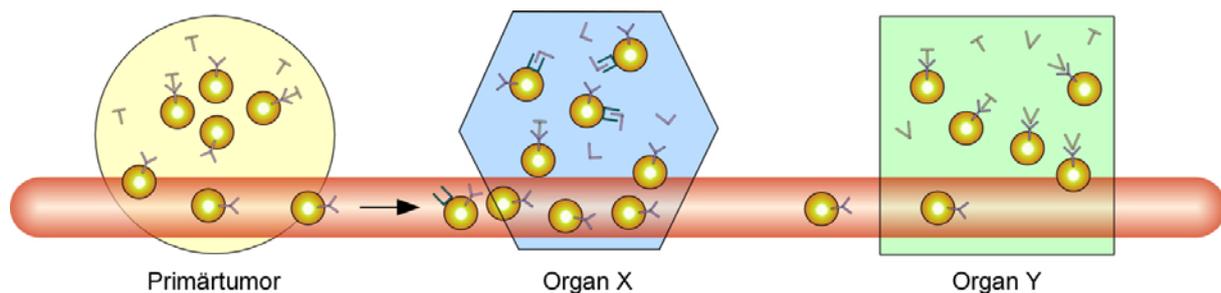


Abb. 3: Integratives Metastasierungsmodell

Verschiedene Hypothesen, wie eine Metastasierung entsteht, können zu einem Modell integriert werden. Die „Saat-und-Boden“-Theorie postuliert, dass sich Tumorzellen als „Saat“ vielfältig ausbreiten, aber nur dort aufkeimen können, wo ein fruchtbarer „Boden“ vorhanden ist (Paget, 1889). Abstrakt formuliert, liefert das Mikromilieu eines Organs X den Faktor L, der das Überleben seltener U-exprimierender Tumorzellen unterstützt. Organ Y liefert den Faktor V für das Überleben von Y-exprimierenden Zellen. Die hämodynamische Hypothese besagt, dass disseminierte Tumorzellen das erste hochvaskularisierte Organ besiedeln, welches sie auf ihrem Weg antreffen (Ewing, 1928). Organ X würde im Vergleich zu Organ Y im Falle einer Metastasierung dementsprechend bevorzugt werden. Anhand von Evolutionsmodellen lässt sich vermuten, dass die Metastasierung ein Zufallsereignis ist, welches aus der Entstehung und Selektion seltener Klone mit prometastatischer Schlüsselmutation resultiert, die einer heterogenen, instabilen Population entstammen (Fidler and Kripke, 1977). So könnten in einer genomisch instabilen Tumorzellpopulation seltene U-positive Zellklone entstehen, die im Organ X durch den Faktor L selektiert werden. Wahrscheinlichkeitsberechnungen legen den Verdacht nahe, dass Gensignaturen eines Primärtumors mit schlechter Prognose nicht nur eine Metastasierung begünstigen, sondern darüber hinaus dem Primärtumor einen Wachstumsvorteil verschaffen (Bernards and Weinberg, 2002). Y-positive Tumorzellen würden demnach eine dominierende Rolle im Primärtumor einnehmen, wenn Y einen Wachstumsvorteil, hervorgerufen durch Interaktion mit Faktor T während der Tumorigenese, darstellt. Weiterhin könnte Y eine Metastasierung in andere Organe steuern, welche den Faktor T (oder T-ähnliche Faktoren) produzieren. Das molekulare Profil des Y-Gens könnte als eine prognostisch ungünstige Gensignatur dazu dienen, den Krankheitsverlauf und das Therapieansprechen genauer vorherzusagen. Modifiziert nach (Nguyen and Massague, 2007).

Kontrovers diskutiert wird das Krebsstammzell-Modell, welches postuliert, dass Metastasen nur von extrem seltenen mobilen Krebsstammzellen gebildet werden können (Chiang and Massague, 2008; Marotta and Polyak, 2009).

1.2.2.2 Das Gehirn – „Boden“ und sicheres Rückzugsgebiet für eine Metastasierung

Das Gehirn als „Boden“ und Zielorgan einer Metastasierung unterscheidet sich von anderen Zielorganen besonders aufgrund seines Status als sicheres Rückzugsgebiet [engl.: sanctuary site; (Palmieri et al., 2007)]. Es ist geschützt durch die anatomisch und funktionell außergewöhnlich abschottende Blut-Hirnschranke, die aus Endothelzellen, Basalmembran, Perizyten und Astrozytenfortsätzen besteht und über streng regulierte „tight junctions“ (engl.: „dichte Verbindung“) verfügt (**Abb. 4**). Die „tight junctions“ bilden physikalische Barrieren zwischen den Endothelzellen und Hirnkapillaren und verhindern den Übertritt von hydrophilen Molekülen von mehr als 500 kDa in das Hirnparenchym. Darüber hinaus existieren aktive Transportmechanismen (p-Glykoproteine), die Substanzen an dem Übertritt in das Hirnparenchym hindern. Somit bildet die Blut-Hirnschranke eine hochspezialisierte Barriere zwischen dem Zentralnervensystem und dem Blutkreislauf, was in erster Linie als Schutz des Gehirns vor schädlichen Substanzen und der Aufrechterhaltung eines konstanten Mikromilieus dient. Die selektive Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke hemmt allerdings auch die Penetration der meisten Chemo- und anderer Therapeutika in das Hirnparenchym, so dass eine wirksame Therapie von Hirnmetastasen aufgrund unzureichender Zytostatika-Konzentrationen verhindert wird. Bei größeren Hirnmetastasen (1–2 mm) ist die Blut-Hirnschranke zwar nicht mehr intakt und dadurch permeabler, dennoch bleibt sie im Vergleich zu Tumorgewässwänden anderer Organe signifikant schlechter durchlässig für größere Moleküle.

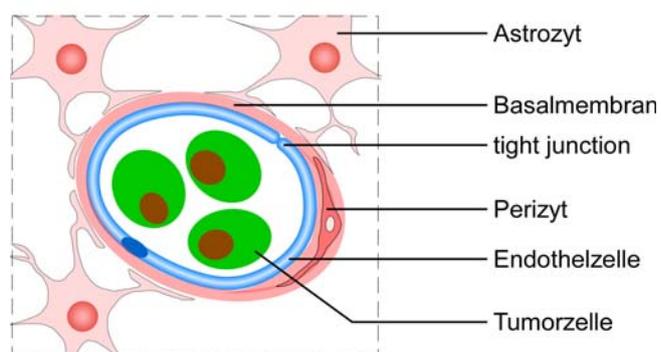


Abb. 4: Die Blut-Hirnschranke

Die Penetration von Gehirnkapillaren (Extravasation) wird aufgrund der besonderen anatomischen Struktur der Blut-Hirnschranke erschwert. Der wesentliche Bestandteil dieser Barriere sind Endothelzellen, die über „tight junctions“ eng miteinander verknüpft sind. Weitere Bestandteile sind Basalmembran, Perizyten und Astrozytenfortsätze. Die Infiltrationsschranke selektiert Tumorzellen, welche die nötigen Voraussetzungen zur Extravasation besitzen.

Bos et al. konnten zeigen, dass Mammakarzinomzellen erst dann das Gehirn besiedeln, wenn sie das Gen ST6GALNAC5 exprimieren. Es kodiert für ein Enzym (2,6-Sialyltransferase), das normalerweise nur im Gehirn aktiv ist und den Tumorzellen eine Adhäsion an die Endothelzellen und somit einen Übertritt in das Gehirn durch die Blut-Hirnschranke ermöglicht. Als weitere Voraussetzung für den Eintritt in das Gehirn müssen zwei weitere Gene aktiviert werden, die für die Cyclooxygenase Cox-2 und einen Liganden des EGFR-Rezeptors (engl.: epidermal growth factor receptor) kodieren (Bos et al., 2009). Diese beiden Gene werden, wie aus früheren Studien bekannt ist, auch für die Etablierung von Lungenmetastasen benötigt (Lassman and DeAngelis, 2003) und können daher

erklären, warum Mammakarzinomzellen sowohl Lunge als auch Gehirn besiedeln können. Mammakarzinomzellen exprimieren darüber hinaus den chemotaktischen Rezeptor CXCR₄; nach Eintritt in die Blutbahn werden die Zellen in kleinen Gefäßen verschiedener Organe (auch im Gehirn) dadurch arretiert, dass dort Endothelzellen den CXCR₄-Liganden CXCL₁₂ exprimieren (Lee et al., 2004; Muller et al., 2001).

Für die Knochenmetastasierung konnten bestimmte Faktoren identifiziert werden, welche die osteolytische Metastasenproliferation stimulieren; spezifische molekulare Mediatoren für eine Tumorzellproliferation im Gehirn sind bisher noch unzureichend bekannt (Bos et al., 2009). Aufgrund der Ansammlung besonderer Zelltypen im Gehirnparenchym lässt sich allerdings auch ein Crosstalk zwischen Stroma und Tumor vermuten. Übereinstimmend mit dieser Hypothese kann in der Klinik eine astrozytäre Gliose bei der humanen Metastasierung beobachtet werden; *in vitro*-Experimente stärken diese These (Fitzgerald et al., 2008). Obwohl viele Tumorzellen, die das Gehirn infiltrieren, aufgrund restriktiver Bedingungen des Mikromilieus sterben werden, könnte durch besondere Faktoren ein Überlebensvorteil innerhalb einer Nische geboten werden. Carbonell et al. zeigten, dass die Tumorzellen nach Extravasation an der Basalmembran mithilfe des Adhäsionsmoleküls β -1-Integrin ankern. Fehlt dieses Molekül oder ist es durch einen Antikörper blockiert, war die Metastasenbildung behindert (Carbonell et al., 2009). Wenn sich die Tumorzellen einmal im Gehirn festgesetzt haben, sind sie für das weitere Metastasenwachstum auf eine eigene Blutversorgung angewiesen, was im folgenden Abschnitt näher erläutert wird.

1.2.2.3 Die Rolle von Blutgefäßen: Angiogenese und andere Mechanismen

Metastasen sind ab einer gewissen Tumormasse abhängig von einem mitproliferierenden Kapillarnetz (Tumor-induzierte Angiogenese), das den Tumor mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt (Folkman, 1971; Carmeliet, 2003). Der Begriff Angiogenese beschreibt das Wachstum von Blutgefäßen durch Migration und Proliferation differenzierter Endothelzellen. Das Gehirn ist zwar das Organ im menschlichen Körper mit der höchsten Gefäßdichte (Blouw et al., 2003), doch auch hier brauchen rasch und verdrängend wachsende Tumoren eine adäquate Blutversorgung. Da ab einer Tumormasse von > 2 mm die Diffusionsstrecke für eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff aus bereits bestehenden Kapillaren zu lang wird, tritt in den Tumorzellen Hypoxie, Azidose und Hypoglykämie auf. Diese Faktoren veranlassen den Tumor zur Produktion proangiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF-A (engl.: vascular endothelial growth factor), Mitglieder der FGF-Familie (engl.: fibroblast growth factor), Angiogenin, TGF- α und β (engl.: transforming growth factor), PDGF (engl.: platelet-derived growth factor), TNF- α (engl.: tumor necrosis factor), EGF (engl.: epidermal growth factor) und Angiopoietine. Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren (z.B. Angiostatin, Endostatin, Trombospondin 1) zu Gunsten der Angiogeneseinitiatoren verschoben [„Angiogenic Switch“; (Bergers and Benjamin, 2003)]. Infolge des „Angiogenic Switch“ ist eine verstärkte Neubildung von Gefäßen zu beobachten. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor mit seiner VEGF-A Isoform gilt als einer der zentralen Faktoren der Tumorangiogenese. Die Bindung von VEGF-A an den Rezeptor VEGFR-2 (engl.: vascular endothelial growth factor receptor; eine Tyrosinkinase), der sich auf den Endothelzellen befindet, löst eine Kaskade verschiedener Reaktionen in der Zelle

aus, zum Beispiel die Aktivierung des MAPK-Signal-Wegs mit nachfolgender Steigerung der DNA-Synthese und des Zellwachstums oder des PI3K-Akt-Signal-Wegs, der zu einem verlängerten Überleben von Endothelzellen führt. In der Gefäßwand fördert VEGF die Produktion von Stickstoffmonoxid, dies wiederum führt zur Vasodilatation. Auch die Hyperpermeabilität von Hirntumorgefäßen, die letztlich zur Manifestation des Hirnödems beiträgt, wird durch die Produktion hoher Konzentrationen von VEGF verursacht (Machein and Plate, 2000; Batchelor et al., 2007). Weitere proangiogene Mediatoren im Tumorgewebe führen zu der Entstehung eines pathologischen, unstrukturierten, stark verzweigten Tumorgefäßsystems; ferner können Abnormalitäten der Gefäßwand bezüglich des Perizytenbesatzes und der Basalmembranstruktur auftreten (Yuan et al., 1994; Plate and Mennel, 1995; Monsky et al., 2002; Fidler et al., 2002; Winkler et al., 2004). Die Arbeitsgruppe um Brunhilde Felding-Habermann konnte zeigen, dass die Angiogenese davon abhängt, dass die Tumorzellen den Integrinrezeptor $\alpha_v\beta_3$ auf ihrer Oberfläche bilden. Erst dann kommt es zur Bildung von VEGF (Lorger et al., 2009).

Der klassische Mechanismus der Angiogenese kann durch alternative Mechanismen der Tumervaskularisierung ergänzt werden. Diskutiert werden augenblicklich die Mechanismen (1) der *splittenden Angiogenese*, bei der durch Einstülpung der Gefäßwand in das Lumen des Gefäßes zwei neue Gefäße ausgebildet werden (Yancopoulos et al., 2000), (2) der *Elongation von Blutkapillaren mit kapillärer Schleifenbildung*, was möglicherweise ein Faktor für die Entstehung der tumortyp-charakteristischen glomeruloiden Gefäßknäuel ist (Dome et al., 2003), (3) der *Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark* und einer damit einhergehenden Neovaskularisierung des Tumors (Vaskulogenese) und (4) der *Gefäß-Kooption*, bei der der Tumor bereits bestehende Gefäße umwächst und sie sich dadurch parasitär zunutze macht (Hillen and Griffioen, 2007).

1.2.2.4 Antiangiogene Therapieansätze

1971 wurde von Judah Folkman die Hypothese aufgestellt, dass durch Hemmung der Tumorangio-genese das Tumorwachstum beeinflusst werden könnte (Folkman, 1971). 33 Jahre später wurde 2004 Bevacizumab (Avastin[®]), ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, zugelassen; es folgten Sorafenib (Nexavar[®]) und Sunitinib (Sutent[®]), zwei Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren. Im Gegensatz zu klassischen Antitumorthapien ist das Ziel die Endothelzelle und nicht die Tumorzelle selbst. Das sollte in der Theorie die Entwicklung einer Therapieresistenz minimieren, die bei Chemo- und Strahlentherapie häufig auftritt und durch die hohe Mutationsrate in der heterogenen Tumorzellpopulation erklärt wird (Carmeliet and Jain, 2000; Jain, 2001). Weiterhin werden die bei Hirntumoren stark ausgeprägten Penetrationsprobleme von Therapeutika zur Tumorzelle umgangen. Antiangiogene, vor allem anti-VEGF-Therapeutika, sind durch ihre antipermeable Wirkung wirksam gegen das vasogene Hirnödem (Pope et al., 2006; Batchelor et al., 2007). In Tumoren außerhalb des Gehirns reduzieren sie den interstitiellen Flüssigkeitsdruck, was zu einer verbesserten Penetration von Makromolekülen in Tumoren führt und somit auch die Wirksamkeit von Chemotherapeutika verstärken kann (Tong et al., 2004). Winkler et al. charakterisierten ein Zeitfenster der Gefäßnormalisierung unter VEGF-Inhibition sowie eine daraus resultierende verbesserte Oxygenierung von Gliomen mit schließlich erhöhter Effektivität von additiver

Strahlentherapie (Winkler et al., 2004). Antiangiogene Therapieansätze erlangen daher in klinischen Studien eine zunehmende Bedeutung: In Kombination mit Chemotherapie konnte Bevacizumab bei vielen extrakraniellen Tumoren (vor allem Karzinomen) eine signifikante Verbesserung von progressionsfreiem Überleben und auch teilweise Gesamtüberleben erreichen (Hurwitz et al., 2004; Sandler et al., 2006; Escudier et al., 2007; Miller et al., 2007). Bei der Therapie des Glioblastoms zeigt Bevacizumab in klinischen Phase I/II-Studien eine bemerkenswerte Wirksamkeit in der Kombination mit Chemotherapie (Vredenburgh et al., 2007; Norden et al., 2008) und möglicherweise auch als Monotherapie (Kreisl et al., 2009). Für Hirnmetastasen gibt es nur kasuistische Evidenz für eine biologische Wirkung von Bevacizumab (Mathews et al., 2008). Die früher bestehende Befürchtung, dass Bevacizumab und andere VEGF-Inhibitoren die intrakranielle Blutungshäufigkeit bei Hirnmetastasen erhöhen, hat sich nicht bestätigt (Oh and Stewart, 2008); daher sind Hirnmetastasen keine Kontraindikation mehr gegen eine anti-VEGF-Therapie in anlaufenden Studien. Es ist fraglich, ob die bei der vaskulären Kooption mitbeteiligten Gefäße ebenso auf antiangiogene Medikamente ansprechen. Entscheidend hierbei ist, dass bei Zugrundelegung alternativer Mechanismen der Tumovaskularisierung das Konzept der antiangiogenen Therapie zwecklos sein könnte, da hiernach der Tumor angiogenese-unabhängig entstehen kann (Timar and Dome, 2008).

1.2.3 Mikroskopische Untersuchungen zur (Hirn)metastasierung

Elektronenmikroskopische Studien in Mäusen und Ratten, die vor allem in den 70er und 80er Jahren veröffentlicht wurden, konnten einige anatomische Phänomene bei der Hirnmetastasierung intracarotidal injizierter Tumorzellen beschreiben (Ballinger, Jr. and Schimpff, 1979; Kawaguchi et al., 1982; Paku et al., 2001). Besondere Aufmerksamkeit lag auf der Untersuchung der Extravasation; über den genauen Ablauf konnten allerdings keine sicheren Aussagen getroffen werden. Fidler und Schackert konzentrierten sich in den 80er und 90er Jahren auf histologische Untersuchungen der hämatogenen Metastasierung nach intracarotidaler Injektion von Tumorzellen in der Maus, da vorherige Studien den Schluss nahe gelegt hatten, dass nach intrakardialer Injektion von Tumorzellen die extrazerebrale Tumormasse die Untersuchung zerebralen Wachstums erschwerte (Conley, 1979). Eine wesentliche Aussage der biologischen Untersuchungen war, dass unterschiedliche Zell-Linien eine Präferenz für Tumorzellwachstum in bestimmten Arealen des Gehirns aufwiesen. Die histologischen und elektronenmikroskopischen Einpunktuntersuchungen konnten allerdings methodisch bedingt nur Hypothesen über die Proliferation von Karzinomzellen im Gehirn liefern: Die Bedeutung und Wertigkeit der beobachteten Phänomene für die Bildung erfolgreicher Hirnmetastasen musste bislang spekulativ bleiben, zugrunde liegende Mechanismen blieben ungeklärt, und Fixierungsartefakte behinderten z.B. die Einschätzung des Gefäßdurchmessers im Verhältnis zum Tumorzelldurchmesser. Daher wurde in den letzten Jahren zunehmend der Versuch unternommen, die Tumorzelleextravasation in verschiedenen Geweben *in vivo* zu beobachten. Die erste intravitalmikroskopische Studie zur Metastasierung wurde bereits 1958 von Wood in Kaninchenohren durchgeführt. Hierbei wurden blau gefärbte Plattenepithelkarzinomzellen in die Ohrarterie injiziert und deren Schicksal mit einem konventionellen Durchlichtmikroskop über Tage verfolgt (Wood, 1958). Schlussfolgerungen dieser Studie, die der Thrombenbildung sowie der Leukozytenmigration

eine wichtige Rolle bei der Extravasation zusprachen, konnten später von anderen Gruppen nicht nachvollzogen werden. Dennoch legte diese Studie den Grundstein für *in vivo*-Untersuchungen der Metastasierung, auch wenn sie aufgrund ihrer limitierten Möglichkeiten zur Bildgebung nur einen ersten Ansatz darstellen konnte. Erst mit der Einführung fluoreszierender Proteine, die stabil in Tumorzellen exprimiert werden können, erhielt die *in vivo*-Metastasenforschung seit Ende der 90er Jahre einen erneuten Auftrieb (Hoffman, 2005a). Das grün fluoreszierende Protein (engl.: green fluorescent protein, GFP) wurde zwar bereits 1962 in der Qualle *Aequorea victoria* beschrieben (Shimomura et al., 1962); es dauerte allerdings noch vier Jahrzehnte, bis dieses Protein, zusammen mit zahlreichen anderen Varianten (wie dem rot fluoreszierenden Protein RFP aus der Koralle *Discosoma* sp.), der bedeutendste Fluoreszenzmarker lebender Zellen wurde. Diese Entwicklung ermöglichte die Sichtbarmachung einzelner später Prozesse nach hämatogener Streuung *in vivo*; dargestellt wurden verschiedene fluoreszierende Karzinomzell-Linien in Lunge (Al-Mehdi et al., 2000; Wong et al., 2002; Yamamoto et al., 2003; Yang et al., 2005) und Leber (Luzzi et al., 1998; Naumov et al., 1999; Ito et al., 2001; Mook et al., 2003), die mittels akuter Organpräparation für wenige Stunden mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie untersucht wurden. Dabei wurden im Wesentlichen zwei neue Erkenntnisse gewonnen: Tumorzellen scheinen nicht nur passiv in Kapillaren gefangen zu werden, sondern auch in größeren Gefäßen am Endothel stabil zu adhären und auch intravasal zu proliferieren (Mook et al., 2003; Al-Mehdi et al., 2000). Im Gehirn konnten Karzinomzellen nach intracarotidaler Injektion zu einem einzigen Zeitpunkt dargestellt werden: Lungenkarzinomzellen *ex vivo* im frisch entnommenen Gehirn (Huang et al., 2002) und stark deformierte Fibrosarkomzellen *in vivo* in meningealen Gefäßen (Yamamoto et al., 2004). Da aber im Gehirn und auch in allen Modellen außerhalb des Gehirns einzelne Zellen nur für kurze Zeitspannen verfolgt werden konnten [Minuten bis maximal 24 Stunden im Hautlappen (Yamauchi et al., 2005; Ito et al., 2001) und im Brustfettgewebe (Kedrin et al., 2008)], war ein weiterreichendes Verständnis der obligaten und ineffizienten Schritte der metastatischen Kaskade sehr schwierig. Ein solches Verständnis ist aber notwendig für die gezielte Optimierung von Therapie und möglicherweise sogar Prävention dieser gravierenden Erkrankung.

1.3 *In vivo*-2-Photonen-Mikroskopie

Eine wichtige Ergänzung zu herkömmlichen Mikroskopieverfahren bietet die 2-Photonen-Mikroskopie, welche bei der Erstellung dieser Dissertation Verwendung fand und daher im folgenden Abschnitt näher erläutert wird.

Bei der 2-Photonen-Mikroskopie wird der nicht-lineare Effekt der Fluoreszenzanregung über die Absorption zweier Photonen ausgenutzt. Obwohl das physikalische Prinzip der Multiphotonen-Anregung bereits 1931 von der deutschen Physikerin und Nobelpreisträgerin Maria Göppert-Mayer in ihrer Dissertation theoretisch vorhergesagt wurde (Göppert-Mayer, 1931), dauerte die experimentelle Realisierung bis 1961, da erst zu diesem Zeitpunkt Laser für die benötigten hohen Lichtintensitäten zur Verfügung standen (Kaiser and Garrett, 1961). Mikroskopie mit 2-Photonen-Fluoreszenzanregung gelang 1990 das erste Mal (Denk et al., 1990). Voraussetzung dafür war die Entwicklung der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie

(engl.: Laser-Scanning-Microscopy, LSM) zur hochauflösenden, dreidimensionalen Darstellung von Fluoreszenzsignalen, vorgeschlagen und 1961 patentiert von Marvin Minsky (Minsky, 1961). Die Idee der konfokalen Mikroskopie blieb jedoch mehrere Jahrzehnte unberücksichtigt, bis 1982 die Firma Carl Zeiss das erste kommerzielle Laser-Raster-Mikroskop vorstellte.

Das Prinzip der Fluoreszenz-Mikroskopie beruht auf der elektronischen Anregung von Farbstoffen, so dass die bei dem Übergang in den Grundzustand freiwerdende elektromagnetische Strahlung detektiert werden kann. Im Gegensatz zu den herkömmlichen optischen Bildgebungsverfahren erfolgt bei der 2-Photonen-Mikroskopie die elektronische Anregung eines Moleküls nicht durch die Absorption eines Photons, sondern durch simultane Absorption zweier Photonen mit halber Energie (doppelter Wellenlänge). So wird bei der Zweiphotonen-Mikroskopie ein Fluoreszenzfarbstoff, z.B. mit zwei Photonen Infrarot (IR)-Licht (700 nm, rot), anstelle mit einem Photon ultravioletten (UV)-Lichts (350 nm, blau), angeregt (**Abb. 5**). Dies ist nur möglich, wenn die zwei Photonen des energetisch ärmeren längerwelligen Lichts ihre Energie kombinieren können, weil sie räumlich und zeitlich parallel eintreffen.

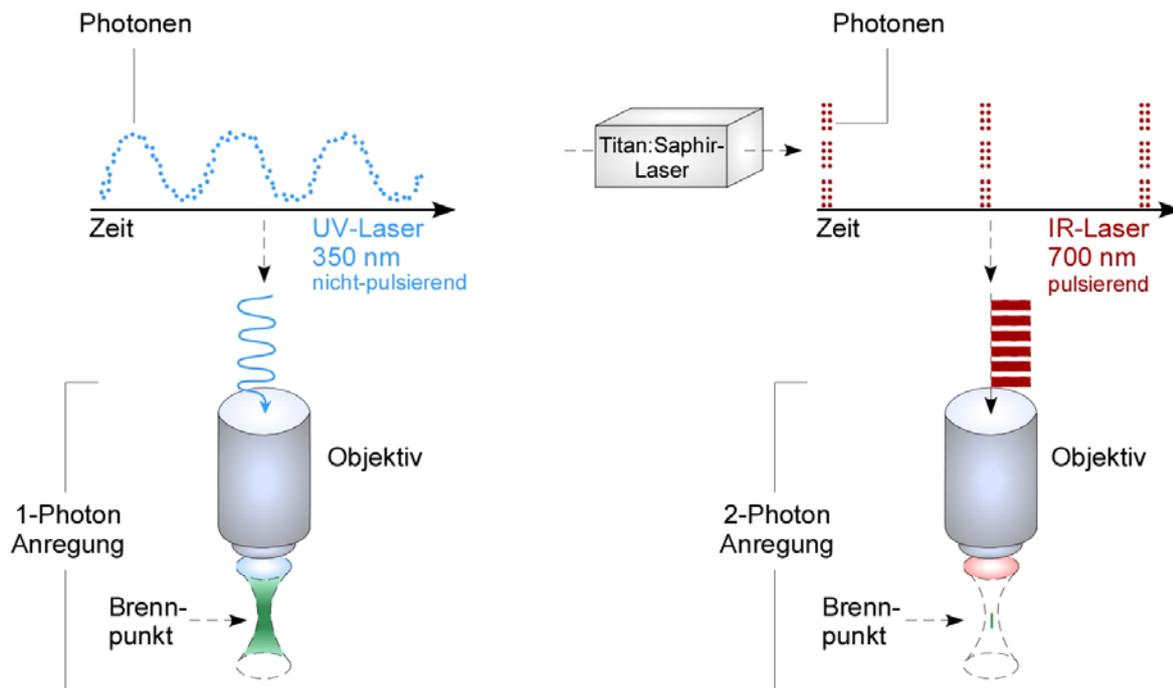


Abb. 5: Vergleich von 1- und 2-Photonen-Mikroskopie

In einer biologischen Probe soll ein Fluoreszenzfarbstoff angeregt werden, dessen Absorptionsmaximum bei 350 nm liegt. Bei der Einphotonen-Methode wird der Strahl eines Lasers auf die Probe gerichtet, es entsteht grüne Fluoreszenz im gesamten beleuchteten Bereich. Probleme können durch UV-Schäden am Gewebe und durch starke Streuung des kurzwelligen Lichtes in der Probe entstehen. Zudem entsteht Fluoreszenzlicht auch außerhalb der Brennebene des Objektivs und überlagert dadurch das Licht aus der Brennebene. Für gute räumliche Auflösung ist es notwendig, das störende Licht mit einer Lochblende (engl.: pinhole) auszublenden. Bei der 2-Photonen-Mikroskopie wird das Licht eines gepulsten Infrarotlasers durch das Objektiv fokussiert. Nur im Brennpunkt ist die Lichtintensität so hoch, dass zwei Infrarot-Photonen gleichzeitig vom Fluoreszenzfarbstoff absorbiert werden. Deshalb entsteht nur im Brennpunkt Fluoreszenz, die Regionen über und unter der angeregten Ebene werden geschont, so dass ein Ausbleichen und eine phototoxische Schädigung des Präparates minimal gehalten werden. Durch die Überflüssigkeit der Lochblende können sämtliche Photonen, die vom Fluorophor ausgesendet werden, auch zur Detektion verwendet werden; dadurch wird die Sensitivität erhöht. Modifiziert nach (Bullen, 2008).

Das Zeitfenster für das gleichzeitige Eintreffen zweier Photonen am Fluoreszenzmolekül beträgt ca. 0,5 Femto-Sekunden (Helmchen and Denk, 2005). Um dies zu erreichen, werden Ultrakurzpulslaser verwendet, die ca. alle 100 Femto-Sekunden Photonenpulse mit einer Repetitionsrate von 80 bis 100 MHz aussenden. Das Laserlicht wird zusätzlich durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur (NA) fokussiert. Das erhöht die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung zweier Photonen mit einem Fluoreszenzmolekül. Die Anregung der Fluoreszenzmoleküle ist dabei auf die Fokusebene des Objektivs limitiert (**Abb. 5**), was die punktförmige Anregungscharakteristik des 2-Photonen-Laserlichtes bedingt. Hieraus ergeben sich wesentliche Vorteile für biologische Anwendungen. (1) Da die 2-Photonen-Anregung der Fluorophoren auf den Fokus begrenzt ist, tritt ein Ausbleichen des Präparats (engl.: bleaching) in den Ebenen oberhalb und unterhalb des Fokus praktisch nicht auf. Die Phototoxizität kann dadurch minimal gehalten werden. (2) Weiterhin macht die fokussierte Anregung die Benutzung einer Lochblende (engl.: pinhole) überflüssig, so dass sämtliche Photonen, die vom Fluorophor ausgesendet werden, auch für die Detektion verwendet werden können, wodurch die Sensitivität erhöht wird. Bei der konfokalen Mikroskopie hingegen müssen emittierte Photonen, die nicht aus der Fokusebene stammen, durch das dem Detektor vorgeschaltete Pinhole ausgeblendet werden. (3) Darüber hinaus wird durch die Verwendung hoher Wellenlängen im Infrarotbereich eine große Eindringtiefe in streuende intakte Gewebe erzielt. So ist es möglich, im intakten Hirngewebe Gehirnkapillaren, Tumore und Gehirnparenchym in hohen Darstellungstiefen von 700 μm anzuregen und zu detektieren (Winkler et al., 2004; Hoffman, 2005b).

Zusammengenommen hat die 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (2PLSM) die Untersuchungen an biologischen Systemen revolutioniert, da Vorgänge tief im Gewebe visualisiert werden können, ohne dass das Gewebe durch phototoxische Effekte relevant geschädigt wird. Dadurch sind auch repetitive Untersuchungen derselben Regionen in der Hirnrinde der Maus möglich geworden (Helmchen and Denk, 2005). Für die Untersuchung der Hirnmetastasierung ist entscheidend, dass nicht nur oberflächlich meningeale Gefäße wie in der Epifluoreszenzmikroskopie, sondern tiefe Gefäße großer Teile des Kortex der Maus darstellbar sind, da viele Metastasen kortikal wachsen und meningeale Gefäße ein fenestriertes Endothel ohne „tight junctions“ aufweisen (Fidler et al., 2002). Eine Voraussetzung für *in vivo*-2-Photonen-mikroskopische Untersuchungen ist der direkte Zugang zum untersuchten Organ, entweder durch einen chirurgischen Einschnitt, Hautlappen, Rückenhautkammer oder Implantation eines chronischen Fensters. Die Kombination von 2PLSM mit Fluoreszenz-Markierungstechniken hat zu einer wachsenden Anzahl von bildgebenden Studien geführt, die diese Technik an Geweben von lebenden Tieren benutzen. Zu den untersuchten Objekten zählen lymphatische Organe (Bouso and Robey, 2004), die Niere (Molitoris and Sandoval, 2005), das Herz (Rubart, 2004), die Haut (Laiho et al., 2005), die Lunge (St Croix et al., 2006) und das Gehirn (Helmchen and Denk, 2002); darüber hinaus hat die 2PLSM zum Verständnis biologischer Prozesse, wie Angiogenese und Therapieeffekte in Tumoren, beigetragen (Jain et al., 2002). Außerhalb des Gehirns gab die 2PLSM Aufschluss über Mechanismen der Extravasation *ex vivo* (Voura et al., 2004), Invasion (Condeelis and Segall, 2003) sowie Intravasation von Tumorzellen (Wyckoff et al., 2007). Im Rahmen dieser Dissertation wurde das chronische kraniale Fenster erstmals mit der 2PLSM für die Metastasierungsforschung kombiniert.

2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, ein neues Tiermodell zu entwickeln und zu etablieren, welches zum Verständnis wichtiger Schritte der späten Hirnmetastasierung beitragen sollte. Hierbei sollten die bisher in der Metastasierungsforschung bestehenden methodologischen Schwierigkeiten klassischer Endpunktuntersuchungen umgangen werden, welche lediglich Informationen über den Zeitpunkt der Gewebeentnahme liefern, während die Evolution der beobachteten Veränderungen nicht dargestellt werden kann. Intention dieser Studie war daher, erstmalig das Schicksal individueller, hämatogener metastasierender Tumorzellen tief im lebenden Gehirn mittels *in vivo* 2PLSM über Wochen zu verfolgen und zu quantifizieren.

Ferner sollte eine Validierung des etablierten Tiermodells stattfinden, um näher zu untersuchen, ob das Tiermodell die Durchführung weiterer Studien erlaubt.

Die wichtigen Einzelziele dabei waren:

- Generierung stabil fluoreszierender, humaner Tumorzell-Linien, die in das ZNS metastasieren
- Etablierung spezifischer, bisher so noch nicht kombinierter Techniken: (1) Präparation kranialer Fenster; (2) Injektion von Tumorzellen in die Arteria carotis interna; (3) 2-Photonen-Mikroskopie (mit Fixierung der Maus während des Mikroskopievorganges)
- Quantifizierung des Schicksals individueller Tumorzellen im Zeitverlauf zur
 - Ermittlung obligater, ineffizienter und deletärer Schritte der späten metastatischen Kaskade der Hirnmetastasierung:
Arrest vs. Adhäsion; Extravasation vs. intravaskuläre Proliferation;
Angiogenese vs. Kooptation
 - Charakterisierung der Tumor „dormancy“
- Validierung des Modells durch eine Therapieanwendung: Bestimmung der Auswirkung einer VEGF-A-Inhibition mit Bevacizumab auf die einzelnen Schritte der Hirnmetastasierung

3 Material und Methoden

3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

3.1.1 Mikroorganismen

Für Klonierungsversuche (Abschnitt 2.2.5) wurden *Escherichia coli*-Bakterien DH5 α (Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ Competent Cells; Invitrogen, Karlsruhe) verwendet (Genotyp: F-*endA1*, *deoR*, (*f80dlacD(lacZ)M15*), *recA1*, *gyrA* (Nal^I), *thi-1*, *hsdR17* (r_K⁻, m_K⁺), *supE44*, *relA1*, *D(lacZYA-argF)U169*, siehe **Tab. 1**).

Für Klonierungsversuche, für die eine erhöhte Transformationseffizienz erwünscht war, wurde der Stamm *E. coli* XL10 Gold (Genotyp: Tet^R Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lac^fZ* Δ M15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]; Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet (**Tab. 1**).

Tab. 1: Überblick über genotypische Eigenschaften verwendeter Bakterien

Genotyp	Beschreibung	Benefit
<i>end A</i>	Knock-out Mutation in einer unspezifischen Endonuklease. Eliminiert unspezifische Endonuklease-Aktivität.	Verbessert Plasmid-Ausbeute und -Qualität
<i>hasdR</i>	Diese Mutation verhindert die Restriktion unmethylierter EcoRI-Stellen.	Effiziente Transformation von DNA, die mittels PCR generiert wurde
<i>mcrA</i>	Die Mutation in diesem Gen verhindert, dass methylierte DNA anderer Organismen als fremd erkannt wird.	Erlaubt die Klonierung genomischer oder methylierter DNA
<i>recA</i>	Eine Mutation im <i>recA</i> -Gen reduziert DNA Rekombination.	Verbesserte Stabilität des Plasmids
<i>lacZ</i> Δ M15	Deletion des N-terminalen α -Fragmentes des LacZ-Gens, was die β -Galaktosidase-Expression verhindert, so dass diese nun von einer anderen Quelle (z.B. von einem Plasmid) übernommen werden muss.	Wird für das blue/white screening von rekombinanten Plasmiden verwendet, die das LacZ β -Fragment tragen
<i>deoR</i>	Deletion in einem regulatorischen Gen, was zu einer konstitutiven Desoxyribose-Synthese führt.	Erhöht die Transformations-effizienz großer Plasmide
<i>hte</i>	Steht für „high transformation efficiency“	Hohe Transformationseffizienz

3.1.2 Wachstumsbedingungen für *Escherichia coli*

E. coli-Zellen wurden auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten (100 μ g/ml Ampicillin oder 50 μ g/ml Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den frisch gewachsenen Kolonien wurden Flüssigkulturen in autoklaviertem LB- (DH5 α) oder NZY⁺-

Medium (XL10 Gold) angeimpft und über Nacht bei 37 °C aerob angezogen. Kleinere Volumina wurden in Reagenzgläsern (5 ml) und größere Volumina (100–500 ml) in Erlenmeyerkolben auf einem Rundschtüttler (225 rpm) inkubiert.

3.1.3 Lagerung von *Escherichia coli*

Zur Kurzzeitlagerung wurden Bakterien-Agarplatten oder -Flüssigkulturen bei –4 °C konserviert. Als Schutz vor Austrocknung diente Parafilm. Zur Langzeitaufbewahrung wurden von frisch gewachsenen Kolonien 1–2 Impfösen in 1 ml 15 %-iger Glycerinlösung resuspendiert und die Zellen bei –80 °C gelagert.

3.1.4 Vollmedium zur Anzucht von *Escherichia coli*

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)
(für *E. coli* DH5α)

1% (v/v) Bactotrypton
1% (v/v) NaCl
0,5% (w/v) Hefeextrakt
pH 7,0 mit NaOH

S.O.C-Medium (Transformation, Abschnitt 2.2.5.4)

2% (v/v) Bacotrypton
0,5% (w/v) Hefextrakt
10 mM Glukose
10 mM NaCl
2,5 mM KCl

NZY⁺ Medium (für *E. coli* XL10 Gold)

1% (v/v) NZ Amin (Kasein Hydolysat)
0,5% (v/v) Hefeextrakt
0,5% (w/v) NaCl
80 mM MgCl₂
80 mM MgSO₄
0,2% (w/v) Glukose
pH 7,0 mit NaOH

Die Medien wurden im Autoklaven sterilisiert (30 min, 121 °C, 1,3 bar). Zur Herstellung fester Nährböden wurden dem jeweiligen Medium 1,5 % Agar hinzugegeben.

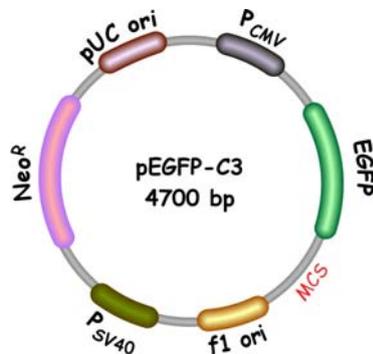
3.1.5 Geräte und Material

Tab. 2: Geräte und Material für mikrobiologische Arbeitsmethoden

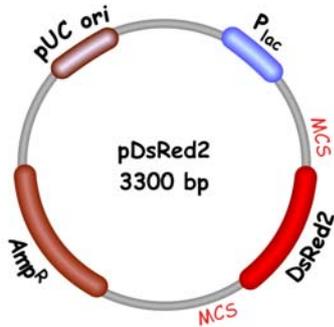
Bezeichnung	Hersteller-Nr.	Firma
Agar	30391023	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	11593-019	Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycin	11815-024	Invitrogen, Karlsruhe
Autoklav	Systec V-150	Systec-GmbH, Wettenberg
Parafilm	4AJ-9170005	Schubert & Weiß, München
Brutschrank	90100236	Kendro, Langensebold
Impfösen	E-1721	neoLab, Heidelberg
Erlenmeyerkolben, 100ml	5507004	Labmarket, Worms
Glycerin	15514029	Invitrogen, Karlsruhe

3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

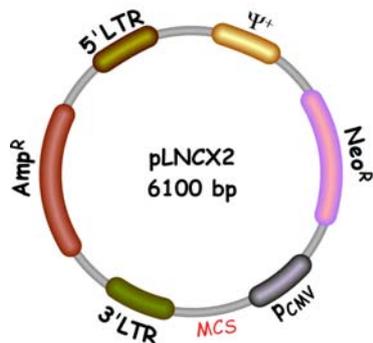
3.2.1 Plasmide



Das Plasmid pEGFP-C3 eignet sich aufgrund seiner Neomycin/Geneticin-Resistenzkassette und des starken eukaryontischen Promoters CMV (Cytomegalie-Virus) sehr gut zur Transfektion in der Zellkultur. Das EGFP-Gen kann entfernt und durch das RFP-Gen ausgetauscht werden. (BD Biosciences Clontech GmbH, Heidelberg).



Das Plasmid pDsRed2 kodiert für das Gen DsRed2, welches im Gegensatz zu seinen RFP-Vorgängern eine verbesserte Genexpression in Säugetierzellen zeigt. Es steht unter Kontrolle des lac-Promoters. P_{lac} ist ein bakterieller, schwacher Promoter, was dieses Plasmid ungeeignet für Transfektionsversuche macht. Das DsRed-Gen wird allerdings von zwei MCS flankiert und lässt sich daher einfach heraus schneiden. (BD Biosciences Clontech GmbH, Heidelberg).



Der retrovirale Vektor pLNCX2 besitzt Anteile des Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV): 5'-LTR, Ψ⁺ Verpackungssignal und 3'-LTR. Der 5'→3'-Bereich zwischen den LTRs wird bei einer retroviralen Transduktion in das Genom der Zielzellen integriert und überträgt das Neomycin/Geneticin-Resistenzgen als selektionierbaren Marker sowie eine Zielsequenz, die vorher in die MCS eingebracht wurde. Das inserierte Gen steht unter der Kontrolle des CMV-Promoters. (BD Biosciences Clontech GmbH, Heidelberg).

Abb. 6: Darstellung der verwendeten Plasmide

Die hier dargestellten Plasmide wurden mit speziellen Restriktionsenzymen geschnitten und so verschiedene neue Vektoren generiert (Abschnitt 2.2.5). Die retroviralen Verpackungsplasmide pN8 gag/pol und pN8 VSVG (Abschnitt 2.3.6, zur Verfügung gestellt von Dr. Schüller, ZNP) sind nicht dargestellt. MCS: Multiple cloning site.

3.2.2 Aufreinigung und Präparation von Nukleinsäuren

3.2.2.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Methode der DNA-Präzipitation dient dem Aufkonzentrieren von Nukleinsäuren, die durch Zugabe von Ethanol und Salz aus wässrigen Lösungen ausgefällt werden. Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 des Ausgangsvolumens eines 3 M Kaliumacetat-Puffers (pH 4,8) und entweder dem 2,5-fachen einer 100% Ethanol- oder dem 0,7-fachen einer Isopropanol-Lösung versetzt. Geringe Mengen an DNA wurden durch Zugabe von Glykogen (10mg/ml,

Roche, Penzberg) als Träger präzipitiert. 2 µl Glykogen, 1/10 Volumen LiCl und 2,5 Volumen 100% Ethanol wurden hinzugefügt. Ethanol-Präzipitationen erfolgten bei Raumtemperatur (RT) für 30–60 min oder über Nacht bei 4 °C, Präzipitationen mit Isopropanol wurden bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde für 30 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert und das getrocknete Pellet in destilliertem H₂O aufgenommen.

3.2.2.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren unter Verwendung einer Qiagen-Säule

Die Aufreinigung von doppelsträngiger DNA aus PCR-Gemischen und anderen enzymatischen Reaktionen erfolgte mit dem DNA-Aufreinigungskit der Firma Qiagen (QIAquick[®] PCR Purification Kit) nach Angaben des Herstellers. Mit diesem Kit können bis zu 10 µg DNA aufgereinigt werden. Das Prinzip beruht auf der Verwendung einer Ionenaustauschersäule, wobei die DNA-Fragmente bei einem pH-Wert ≤ 7,5 und hohen Salzkonzentrationen an eine Silikagelmembran gebunden werden, durch Wachsschritte gereinigt und mit 20–30 µl destilliertem H₂O eluiert werden.

3.2.2.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren durch Gelextraktion

Eine Aufreinigung und Trennung von Nukleinsäuren erfolgte ebenfalls unter Verwendung des QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Dabei werden die durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten, erwünschten DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Das Gel wurde bei 50 °C in einem Solubilisierungs- und Bindepuffer mit pH-Indikator aufgelöst und anschließend mit Isopropanol versetzt. Das weitere Aufreinigungsprinzip ist identisch mit dem der PCR-Aufreinigung (Abschnitt 2.2.2.2), wobei auch hier mit 20–30 µl destilliertem H₂O eluiert wurde. Eine genauere Beschreibung der Agarose-Gelelektrophorese findet sich unter Abschnitt 2.2.4.

3.2.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung der Nukleinsäuren von Proteinen wurde die DNA enthaltende Lösung mit dem gleichen Volumen an Phenol versetzt, gut geschüttelt und für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Nach Abnahme der oberen, wässrigen Phase wurde diese mit dem gleichen Volumenanteil Chloroform versetzt, gut durchmischt und für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut aufgenommen und die Nukleinsäuren mittels Präzipitation (Abschnitt 2.2.2.1) isoliert.

3.2.2.5 Isolation von Plasmid-DNA

Plasmide wurden aus *E. coli*-Kulturen (Abschnitt 2.1.1) isoliert, die aus einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C in LB-Flüssigmedium (zusammen mit dem passenden Antibiotikum) bei 250 rpm (Rundschüttler, Certomat[®] IS, B. Braun Biotech, Melsungen) geschüttelt wurden. Die Plasmid-Isolationen fanden nach Angaben des Herstellers mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) für die Gewinnung größerer Mengen an DNA (bis zu 500 µg) statt. Die Schnellpräparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (bis zu 20 µg) erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden). Bei beiden Methoden werden die Bakterien über eine alkalische Lyse aufgeschlossen, wobei genomische und Plasmid-DNA denaturiert werden. Durch die

nachfolgende Absenkung des pH-Werts werden genomische DNA und bakterielle Proteine ausgefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt und renaturiert. Die gefällten Komponenten werden abgetrennt und die DNA an eine Anionen-Austauscher-Säule gebunden, gereinigt, ausgefällt und mit destilliertem H₂O aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde spektrophotometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.3) und die isolierten Plasmide restriktionsanalytisch ausgewertet (Abschnitt 2.2.5.2).

3.2.2.6 Isolation genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA erfolgte aus Mausschwanzbiopsien von 3 Wochen alten Tieren zur Genotypisierung (Abschnitt 2.4.3). Es wurde der E.Z.N.A. Tissue Mini Kit (Peqlab, Erlangen) verwendet. Hierbei werden die Proben homogenisiert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Anschließend wird die zu isolierende DNA an eine Silikamembran-Zentrifugensäule gebunden, wobei zellulärer Debris, Proteine und sonstige Kontaminationen durch Waschen entfernt werden. Die gereinigte DNA wird mit Hilfe eines Elutionspuffers aufgenommen.

3.2.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren

3.2.3.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die ultraviolett-spektrophotometrische Analyse von Nukleinsäuren erfolgte zur Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades. Die Menge an UV-Strahlung, die von der DNA absorbiert wird, ist direkt proportional zu der Menge an DNA in der Probe (Lambert-Beersches Gesetz). Bei einer Wellenlänge von 260 nm bedeutet ein Absorptionskoeffizient von 1, dass die vorliegende DNA eine Konzentration von 50 µg/ml aufweist (Sambrook et al., 1989). Daher kann folgende Formel (1) zur DNA-Konzentrationsberechnung herangezogen werden:

$$C_{(\text{DNA})} \text{ in } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000 \quad (1)$$

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte in wässriger Lösung mit einem Photometer (Robert Riele, Berlin) unter Verwendung einer Quarzküvette (100 µl, Hellma, Müllheim) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Quotient $E_{260\text{nm}} / E_{280\text{nm}}$ wurde zur Ermittlung der Reinheit der Nukleinsäuren herangezogen: Bei einem Wert zwischen 1,8 und 2,0 beträgt die Reinheit der DNA 70–95%. Zeigt der Quotient einen erhöhten Wert, kann auf RNA-Kontamination, bei einem erniedrigten Wert auf Protein-Kontamination zurückgeschlossen werden.

3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung im Agarose-Gel

Durch Vergleich der Leuchtintensität einer DNA-Bande im Agarose-Gel mit der Referenzbande eines Markers mit definiertem DNA-Gehalt kann die DNA-Menge in einer Probe mit dem Auge abgeschätzt werden. Diese Form der Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten wurde zu Klonierungszwecken durchgeführt, indem eine adäquate Menge an DNA auf einem Agarose-Gel zusammen mit einem Quantifizierungsmarker (Hyperladder I, Bioline, Luckenwalde) als Referenzbande aufgetrennt wurde (zur Agarose-

Gelelektrophorese von Nukleinsäuren siehe Abschnitt 2.2.4). Neben der Konzentrationsbestimmung diente diese Methode auch der Überprüfung des Zustandes und Reinheitsgrades der DNA, um Verunreinigungen durch weitere Nukleinsäuren und Proteine auszuschließen.

3.2.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Die Auftrennung in einem elektrischen Feld beruht auf der Tatsache, dass die elektroforetische Beweglichkeit der DNA antiproportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare ist (Meyers et al., 1976). Nach Zugabe von Ethidiumbromid (Invitrogen, Karlsruhe) oder SYBR[®] Green (MoBiTec, Göttingen) erfolgt eine Interkalation dieser Substanzen mit der DNA, so dass anschließend DNA-Fragmente im UV-Licht aufgrund der Abgabe von Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden können. Zur Gelherstellung wurden Agarose (0,8–1% w/v, Invitrogen, Karlsruhe) und TAE-Puffer zusammen in einer Mikrowelle Moulinex Quickchef 650 (Samou, Randolfzell) aufgekocht. Nach einer kurzen Abkühlung wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid oder 0,1 µg/ml SYBR[®] Green hinzugegeben und die flüssige Agarose in den Gelschlitten mit Gelkamm eingefüllt. Nach ca. 10 min wurde das erkaltete Gel in die mit TEA-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer (Peqlab, Erlangen) gelegt. Die DNA-Reaktionsansätze wurden mit DNA 6x-Loading-Puffer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt, bevor 5–10 µl in die Geltaschen pipettiert wurden. Als Größenstandards wurden je nach zu erwartender Fragmentgröße die Marker „1 Kb DNA Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe) und „1 kb DNA-Leiter“ verwendet (Peqlab, Erlangen). An die Elektrophorese-Kammer wurde eine Spannung von 85 V angelegt. Nach erfolgter Auftrennung (ca. 2 h) wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt, die DNA-Banden wurden visualisiert und fotografiert.

3.2.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.2.5.1 Präparation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente für verschiedene Klonierungen wurden präpariert, indem sie aus einem Plasmid herausgeschnitten (2.2.5.2) wurden. Sie wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.4) und anschließende Extraktion aus dem Agarose-Gel (2.2.2.3) aufgereinigt und mit den ebenfalls geschnittenen und aufgereinigten Ziel-Plasmiden ligiert (Abschnitt 2.2.5.3). Zur Konzentrationsbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein Quantifizierungsmarker verwendet (Hyperladder I, Bionline, Luckenwalde; Abschnitt 2.2.3.2). Nach Transformation des Ligations-Mixes in *E. coli* (Abschnitt 2.2.5.4) wurden positive Klone identifiziert, Plasmide isoliert (Abschnitt 2.2.2.5) und durch Restriktionsanalysen (Abschnitt 2.2.5.2) und Sequenzierung (Abschnitt 2.2.5.5) überprüft.

3.2.5.2 Hydrolytische Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mittels Typ-2-Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers (NEB, Frankfurt am Main). Endonukleasen sind bakterielle

Enzyme, die kurze, doppelsträngige DNA-Erkennungssequenzen finden, die auf beiden Strängen in einer Richtung die gleiche Basenabfolge zeigen (palindromische Sequenzen). Durch die Spaltung der für das jeweilige Enzym spezifischen Sequenzen entstehen glatte oder einzelsträngige (kohäsive) 3' bzw. 5'-überhängende Enden. Üblicherweise wurde bis zu 1 µg DNA mit 0,5–1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym für 1–16 h bei 37 °C in 20 µl unter Verwendung des zugehörigen Puffers verdaut. Ein doppelter Restriktionsverdau wurde in einem Schritt ausgeführt, wenn beide Enzyme im selben Puffer ihre Funktion unbeeinträchtigt ausüben konnten. Bei einem Doppelverdau mit zwei Enzymen, die unterschiedliche Puffer benötigten, wurde eine Präzipitation und Aufreinigung der DNA (Abschnitt 2.2.2) zwischen beiden Restriktionsansätzen durchgeführt. Zur Überprüfung des Restriktionsverdaus wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Abschnitt 2.2.4), die gewünschten Fragmente wurden mittels Gelextraktion aus dem Gel isoliert (Abschnitt 2.2.2.3) und für Ligationsreaktionen (Abschnitt 2.2.5.3) bereitgehalten. Restriktionsanalysen wurden ebenfalls zur Untersuchung und Identifizierung neu generierter Plasmide durchgeführt.

3.2.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen verknüpfen die Enden von Nukleinsäure-Molekülen, indem sie unter Verbrauch von ATP die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem freien 5'-Phosphatrest und einer freien 3'-Hydroxylgruppe katalysieren. Auf diese Weise können zwei beliebige doppelsträngige DNA-Moleküle mit freien kompatiblen 5' und 3'-Enden kovalent zu einem neuen Molekül zusammengefügt werden, z.B. ein kurzer DNA-Abschnitt (Insert) mit einem geschnittenen Plasmid (Vektor). Der Ligationsansatz von 10–20 µl enthielt Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 (kohäsive Enden) oder 1:5 (glatte Enden), Ligasepuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt am Main). Das Endvolumen wurde mit destilliertem H₂O aufgefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend zur Transformation in *E. coli*-Bakterien eingesetzt (Abschnitt 2.2.5.4).

3.2.5.4 Transformation in *E. coli*

Kompetente Zellen sind in der Lage, Fremd-DNA aufzunehmen. Dieser zeitlich begrenzte Zustand kann bei *E. coli*-Zellen durch eine Behandlung mit CaCl₂ oder RbCl₂ induziert werden (Dagert and Ehrlich, 1979). Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* DH5α-Zellen 1:100 in vorgewärmtem LB-Medium verdünnt und bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) bis zum Erreichen einer Zelldichte von OD_{600nm} = 0,6–0,9 inkubiert. In diesem Stadium befindet sich ein Großteil der Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase, in welcher eine Induktion der Kompetenz besonders erfolgversprechend ist. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis gelagert und anschließend bei 4000 g bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge, Rotor). Das Bakterienpellet wurde in 50 ml einer 70 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert, und die Zellen wurden weitere 60 min auf Eis stehen gelassen. Nach erneuter Zentrifugation für 4 min bei 3000 g wurde das Pellet in 50 mM CaCl₂ Lösung mit 20% Glycerin resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C aufbewahrt.

Die selbst hergestellten (siehe oben) oder auch kommerziell erhältlichen kompetenten *E. coli*-Zellen (Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells, Invitrogen, Karlsruhe) wurden

zur Transformation, also der Übertragung von Plasmid-DNA in Bakterien, eingesetzt. 100 µl der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit bis zu 10 µl des Ligationsansatzes (Abschnitt 2.2.5.3) für 30 min auf Eis inkubiert. Durch den nachfolgenden Hitzeschock bei 42 °C für 45 sek wurde die Aufnahme der Plasmide induziert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Sofort danach wurde zu den Bakterien 1 ml vorgewärmtes S.O.C. Medium hinzugefügt. Die Bakterien wurden 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert, um eine Expression des neuen Antibiotikum-Resistenzgens zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz kurz zentrifugiert, das Pellet in 20 µl aufgenommen und auf antibiotikahaltigen Agarplatten verteilt. Wenn im Folgenden auf den Agarplatten positive Klone identifiziert werden konnten, wurden diese einer Plasmid-Isolation (2.2.2.5) unterworfen, um die neu generierten Plasmide durch Restriktionsanalysen (2.2.5.2) überprüfen zu können.

3.2.5.5 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten ddNTPs (Didesoxynukleosidtriphosphat) in vier sonst gleichen Ansätzen. Eine Verlängerung der DNA ist bei Einbau eines ddNTPs nicht mehr möglich. Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die zur Sequenzermittlung elektrophoretisch aufgetrennt werden. In einem Standardansatz für eine Sequenzierungsreaktion wurden 150 ng/µl aufgereinigte Plasmid-DNA, der entsprechende Primer (10 pmol, **Tab. 3**) und 2 µl „Big Dye Mix“ (DNA Sequencing Kit mit den markierten ddNTPs, Applied Biosystems, USA) mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt, gemischt und in einem Thermo-Cycler folgenden Temperaturzyklen ausgesetzt: [96 °C, 15 sec; 55 °C, 8 sec, 60 °C, 4 sec] x 30. Zur weiteren Aufarbeitung wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt und das Pellet in 20 µl TSR-Puffer (Applied Biosystems, USA) resuspendiert. Der Ansatz wurde nun 3 min bei 90 °C erhitzt, 5 min auf Eis gekühlt und im **AbiPrism[®] 310 Genetic Analyzer** (Applied Biosystems) analysiert.

Tab. 3: Sequenzierungs-Primer und Sequenzen

Name	Sequenz
pLNCX2	5'-AGCTGGTTT TAGTGAACCGTCAGATC-3'
pLNCX2-RFP	5'-GAGTTCAAGTCCATCTACATGGCCA-3'

3.2.5.6 Computer-Nukleotidsequenzanalysen

Die Planung der Konstrukte und Restriktionsanalysen wurde vorgenommen mit Clone Manager Basic 9. Die Darstellung als Vektorkarten erfolgte mit Canvas 11. Für die Auswertung der Sequenzdaten wurde die Clone Manager-Software verwendet. Homologien wurden in den Datenbanken GENBANK und EMBL gesucht, hauptsächlich mit Programmen aus dem HUSAR Paket, die auf den Suchlogarithmen FASTA (Pearson and Lipman, 1988; Pearson, 1990) und BLASTA (Altschul et al., 1997; Karlin and Altschul, 1990; Karlin and Altschul, 1993) beruhen.

3.2.6 Geräte und Materialien

Tab. 4: Geräte und Material für molekularbiologische Arbeiten

Name	Hersteller-Nr.	Firma
QIAquick PCR Purification Kit	28181	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	28706	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	12125	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Maxi Kit	12163	Qiagen, Hilden
E.Z.N.A.	12-3496-01	Peqlab, Erlangen
Ethidiumbromid	15585011	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green	S33112	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	15510-019	Invitrogen, Karlsruhe
PfuUltra™ Hotstart DNA Polymerase	600380	Stratagene, USA (Vertrieb durch Agilent Technologies, Waldbronn)
Hyperladder I	BIO-33025	Bioline, Luckenwalde
1 kb DNA Ladder	15615-016	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb DNA-Leiter	25-2030	Peqlab, Erlangen

3.3 Zellbiologische Arbeitsmethoden

3.3.1 Zell-Linien

Tab. 5: Verwendete permante (immortalisierte) humane Zellkultur-Linien

Name	Beschreibung	Hersteller
MDA-MB-435 ¹	humanes malignes Melanom	ATCC
A2058	humanes malignes Melanom	ATCC
PC14-PE6	humanes Bronchialkarzinom	Fidler Labor
HTB177	humanes Bronchialkarzinom	ATCC

3.3.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

3.3.2.1 Wachstumsbedingungen

Die Kultivierung der verwendeten Zell-Linien erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem Inkubator (HERAcell 240, Thermo Scientific, München) bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigtem Wasserdampf. Als Medium diente DMEM- oder RPMI-Komplettmedium (2.3.2.5). 80–90% konfluente, adhärenzte Monolayer-Zellschichten wurden passagiert, indem nach Abnahme des Überstandes die Zellen mit PBS (engl.: phospahte buffered saline, PAN-Biotech, Aidenbach) gewaschen und 5 min bei 37 °C mit Trypsin/EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert wurden. Das Enzym Trypsin spaltet Proteine an den Stellen der Aminosäuren Arginin und Lysin, EDTA (Ethylenddiamintetraaccetat) bindet zweiwertige Kationen wie Ca²⁺ und Mg²⁺, die zellbindende Membranproteine stabilisieren. Dadurch wird ein Ablösen der Zellen hervorgerufen, welches durch seitliches Schlagen gegen die Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden) verstärkt werden kann. Die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium mit fetalem Kälberserum (FCS, engl.: fetal calf serum; Invitrogen, Karlsruhe) gestoppt. Nach Überführung der Zellen in ein 15 ml-Röhrchen (Falcon, BD Biosciences, Heidelberg) wurden sie 3 min bei 3000 g zentrifugiert (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg) und 1/10 verdünnt erneut in Kultur genommen.

3.3.2.2 Präparation der Zellen für die intracarotidale Injektion

24 h prae injectionem wurden jeweils 4 x 10⁵ vitale, sich mindestens eine Woche in Kultur befindliche Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Um die Zellen für die Injektion in die Arteria carotis interna vorzubereiten, wurden diese mit PBS gewaschen, trypsiniert, zentrifugiert, in HBSS (Hank's balanced salt solution, Invitrogen,

¹ Es existieren zurzeit widersprüchliche Ergebnisse, ob die Zell-Linie MDA-MB-435 einem malignen Melanom oder Mammakarzinom entstammt (Rae et al., 2007; Chambers, 2009). Die Experten sind sich allerdings einig, dass die Zell-Linie einen melanozytischen Phänotyp zeigt und in dieser Dissertationsstudie daher mit einer anderen Melanom-Zell-Linie verglichen werden kann (Ross et al., 2000; Sellappan et al., 2004; Ellison et al., 2002).

Karlsruhe) gelöst, mehrfach gefiltert (BD Falcon, Heidelberg, Nr. 352235) und anschließend Zellzahl und Zellvitalität (2.3.2.4) bestimmt. Nun wurden 10^5 rot fluoreszierende Tumorzellen in einem Volumen von 0,2 µl HBSS gelöst und über einen Zeitraum von 2 min vorsichtig in die A. carotis interna der Versuchstiere injiziert (Abschnitt 2.4.6).

3.3.2.3 Einfrieren, Lagerung und Auftauen

Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsinisiert (Abschnitt 2.3.2.1), zentrifugiert und mit dem entsprechenden Zellkulturmedium plus 5% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert und in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Die kryoprotektive Substanz DMSO diffundiert in die Zellen und verhindert eine Kristallbildung beim Einfrieren, welche eine Zerstörung der Zellmembran zur Folge hätte. Das Einfrieren geschah langsam und schonend in einer Einfrierbox (Mr. Frosty; Nalgene, Hereford, UK) mit Isopropanol bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zur langfristigen Lagerung (> 1 Jahr) wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) überführt (Stickstoffbehälter: Espace 330, AIR LIQUIDE Kryotechnik, Düsseldorf). Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen zügig im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad (GFL, Burgwedel) aufgetaut, abzentrifugiert (3 min, 3000 g), in Medium aufgenommen und in entsprechende Zellkulturflaschen ausgesät.

3.3.2.4 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Zelldichte einer Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt (0,1 mm Tiefe, Brandt, Wertheim). Dabei entspricht die Zellzahl, die in 16 Zählquadraten bestimmt wird, der Anzahl der Zellen in 0,1 µl und wurde daher noch mit dem Faktor 10 multipliziert, um die Zellzahl pro ml Suspension zu erhalten.

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde die Zellsuspension vor dem Auszählen 1:5 mit einer Trypanblau-Lösung (0,02%, Serva, Heidelberg) verdünnt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Die Substanz dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol und färbt diese Zellen blau. Vitale Zellen bleiben ungefärbt und können so gut von toten Zellen unterschieden werden.

3.3.2.5 Medien und Mediensupplemente

Tab. 6: Medien und Mediensupplemente

Medium	Zusatz (Komplettmedium)
RPMI 1640 (PAN-Biotech, Aidenbach) Zell-Linie: HTB177	10% FCS (PAN-Biotech, Aidenbach) 6 ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) 6 ml L-Glutamin (2mM, Invitrogen, Karlsruhe) 6 ml HEPES (10 mM, Invitrogen, Karlsruhe) 6ml Natriumpyruvat (1 mM, Invitrogen, Karlsruhe)
DMEM (PAN-Biotech, Aidenbach) Zell-Linien: MDA-MB-435, PC14-PE6, A2058, MDA-MB-231, MDA-MB-231-BR, MDA-MB-361	10% FCS (PAN-Biotech, Aidenbach) 6 ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) 6 ml L-Glutamin (2mM, Invitrogen, Karlsruhe)

FCS wurde bei 4 °C aufgetaut und anschließend für ca. 30 min bei ca. 56 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Es wurden 60 ml Aliquots hergestellt und bei -20 °C gelagert.

3.3.3 Mykoplasmen-Test

Um eine Kontamination der verwendeten Zell-Linien mit Mykoplasmen (zellwandlose, parasitäre Bakterien) auszuschließen, wurden in regelmäßigen Abständen Kontrollen durchgeführt. Die Kontamination einer Zellkultur mit Mykoplasmen ist lichtmikroskopisch nicht erkennbar, ändert allerdings die Stoffwechselfparameter der Zellen nachhaltig (Langdon, 2004). Die zu untersuchenden Zellkulturen wurden in das entsprechende Kulturmedium ohne Antibiotikum überführt und für drei Tage kultiviert. Der Mykoplasmen-nachweis erfolgt mit einem Mykoplasmen PCR Detektions-Kit (AppliChem, Darmstadt, Nr. A3744,0020). Als Probenmaterial diente 1 ml des Zellkulturüberstandes. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 20.000 g für 10 min wurde das Pellet in einer Pufferlösung resuspendiert und für 3 min bei 95 °C gekocht. Vom Überstand wurden 2 µl für den PCR-Test eingesetzt. Anschließend wurden Probenmaterial und positive und negative Kontrolle durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Auswertung und Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert (**Abb. 7**). Alle Versuche wurden mit mykoplasmenfreien Zell-Linien durchgeführt.

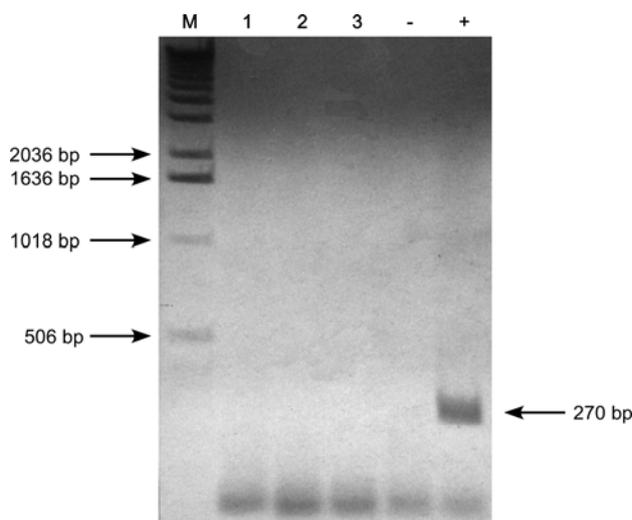


Abb. 7: Mykoplasmen-Test

(A) Zur Testung auf Mykoplasmen wurden Zellkulturüberstände einer Detektion mittels PCR unterzogen. Mykoplasmen-positive Zellkulturen weisen nach einer PCR-Amplifikation eine 270 kb große Bande auf (entspricht einer Region des rRNA Operons von Mykoplasmen). In einem repräsentativen Gel-Bild eines Mykoplasmen-Tests zeigt 1-3 die Zell-Linien PC14-PE6, MDA-MB-435 und A2058 ohne Mykoplasmen-Kontamination. Als Kontrollen dienten H₂O (-) und Mykoplasmen-DNA (+). M: Marker, 1 KB Ladder, Invitrogen; bp: Basenpaare.

3.3.4 Stabile, nicht-virale Transfektion von RFP in eukaryotische Zellen

Eine stabile Fluoreszenzmarkierung der Tumorzellen ist für intravitalmikroskopische Verlaufsuntersuchungen (Abschnitt 2.4.8) unabdingbar, da dies eine Beobachtung individueller Zellen über Wochen *in vivo* erst ermöglicht. Das dauerhafte Einbringen von DNA in das Genom eukaryotischer Zellen wird als stabile Transfektion bezeichnet. Dies wurde durch eine Lipofektion unter Verwendung des Reagens Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers erreicht. Dabei wird DNA in Lipidpartikel eingeschlossen und von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Eine stabile Transfektion wird durch eine Selektion mit dem Neomycin-Derivat Geneticin (G418, 50 mg/ml, Roth, Karlsruhe) gewährleistet. Für eine Transfektion wurde am Vortag eine 6-

Loch-Zellkulturplatte mit 4×10^5 Tumorzellen pro Loch ausgesät. Für die Transfektion wurden pro Loch 1 μg DNA im Verhältnis 1:3 mit LipofectamineTM 2000 versetzt und in 1 ml Optimem gelöst. 24 h später erfolgte ein Mediumswechsel. Nach 48 Stunden wurde 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 zur Selektion stabil RFP-exprimierender Zellen hinzugegeben. Die Transfektionseffizienz wurde zwei bis drei Tage nach der Transfektion mit einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

3.3.5 Retrovirale Transduktion von RFP in eukaryotische Zellen

Humane Tumorzellen, welche durch eine nicht-virale Transfektion (2.3.4) nicht die für intravitalmikroskopische Untersuchungen notwendige Fluoreszenzintensität aufwiesen, wurden in einem neuen Experiment viral transduziert (**Abb. 8**). Das retrovirale Gentransfersystem umfasste die Helferzell-Linie 293T, den retroviralen Vektor pLNCX2-RFP und zwei Verpackungsplasmide (pN8 VSVG und pN8 gag/pol, Vektorkarte nicht dargestellt). Der Vektor ist dahingehend modifiziert, dass die retroviralen Strukturgene gag, pol und VSVG deletiert sind; dadurch ist er replikationsdefizient. Er verfügt über das Verpackungssignal ψ^+ und die retroviralen 5'- und 3'-LTRs, die eine Insertionsstelle für das zu übertragende Gen (RFP) sowie den Selektionsmarker Neomycin^R flankieren. Durch die Verpackungsplasmide werden die für die Entstehung viraler Partikel notwendigen Gene gag, pol und VSVG beigesteuert. Sämtliche Arbeitsgänge wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt.

In einem ersten Arbeitsschritt wurde eine Triple-Transfektion der Helferzell-Linie 293T durchgeführt. 1×10^6 Geneticin-resistente 293T-Zellen wurden in 10 cm Petrischalen in DMEM mit G418 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgesät, so dass die Zellen 24 h später eine Konfluenz von 80% aufwiesen. In ein Reaktionsgefäß wurden 2 ml Optimem gegeben und 90 μl Fugene 6[®] vorsichtig hinzupipettiert und durch leichtes Klopfen gegen die Gefäßwand gemischt. Fugene 6[®] sollte nicht unverdünnt an die Wände von Plastikgefäßen kommen. Dann wurden jeweils 10 μg der drei Plasmide (pN8 gag-pol, pN8 VSVG, pLNCX2-RFP) hinzugegeben und wiederum durch leichtes Klopfen gegen die Gefäßwand (nicht vortexen) gemischt. Der Transfektionsmix wurde 45 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde das Medium von den 293T-Zellen abgesaugt und durch Medium ohne G418 ersetzt; der Transfektionsmix wurde mit einer Pipette in Tropfen vorsichtig auf der Platte verteilt. Nach einer 4-stündigen Inkubation im Brutschrank wurden 4 ml Medium zu den Zellen hinzugefügt und diese über Nacht im CO₂-Brutschrank inkubiert. Am Morgen wurde das Medium entfernt und durch 10 ml frisches Medium ausgetauscht. Am Folgetag wurden morgens die ersten zellfreien Virusüberstände geerntet. Dazu wurde das virusenthaltende Medium mit einer sterilen Spritze aufgenommen und in einem Filtrationsschritt mit einem 0,45 μm -Filter (Biochrom, Berlin) von Zellen und Zellresten getrennt. Es wurden 4 ml frisches Medium zu den 293T-Zellen hinzugegeben und so spät wie möglich am selben Tag erneut geerntet. Anschließend wurden 6 ml für die Inkubation über Nacht hinzupipettiert. Insgesamt wurden so über drei Tage verteilt pro Petrischale 30 ml Virusüberstand geerntet. Die zellfreien Virusüberstände wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt oder kurze Zeit bei 4°C gelagert und sofort für die Infektion der Zielzellen verwendet. 24 h vor Beginn der Transduktion (der Infektion der Zielzellen mit dem Virusüberstand) wurden 4×10^5 Zielzellen (humane Tumorzellen) in einer

6-Lochplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das konditionierte Medium abgenommen, und die Zellen wurden mit 2 ml zellfreiem Virusüberstand überschichtet und für 8 Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Virusüberstand abgenommen und nach Vorschrift entsorgt. Die Zellen wurden in 2 ml frischem Medium über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde zur Selektion RFP-transduzierter Zellen das Medium mit G418 (800 µg/ml) versetzt. Die Transduktionseffizienz wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop zwei bis drei Tage später überprüft, sechs Wochen nach der Transfektion wurden besonders stark rot fluoreszierende Zellen per FACS (2.3.7) selektioniert und weiterkultiviert.

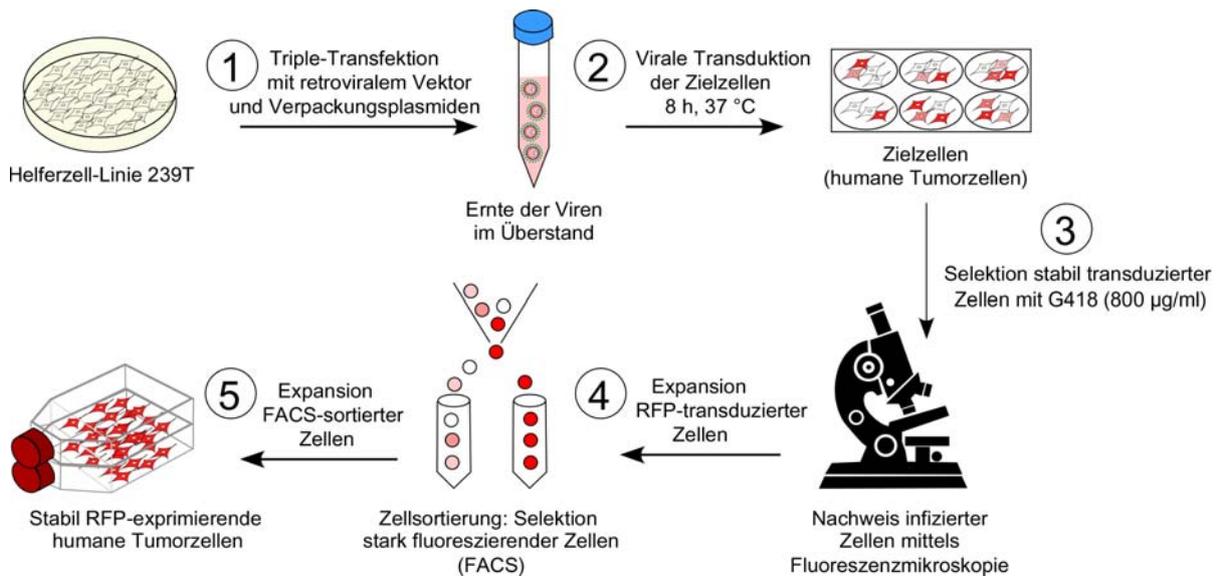


Abb. 8: Schematische Darstellung zur Vorgehensweise bei retroviraler Transduktion

In einer Triple-Transfektion (1) wurde die Helferzell-Linie 239T mit dem retroviralen Plasmid pLNCX2-RFP sowie den Verpackungsplasmiden pN8 gag/pol und pN8 VSVG unter Verwendung von Fugene 6[®] in einer 10 cm Petrischale transfiziert. Es folgte eine mehrtägige Ernte der Viren im Zellkulturüberstand. Diese Viren wurden in einem nachfolgenden Schritt zur Transduktion der humanen Tumorzellen in einer 6-Loch-Platte verwendet (2). Stabil transduzierte und dadurch Geneticin-resistente Tumorzellen wurden durch Selektion mit G418 (800 µg/ml) von nicht infizierten und damit nicht resistenten Zellen getrennt (3). Ein Nachweis rot fluoreszierender Zellen erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie. Aufgrund einer heterogenen RFP-Expression, hervorgerufen durch Unterschiede in der Zahl der RFP-Genkopien im Genom der transduzierten Zellpopulation, wurden stark rot fluoreszierende Zellen durch eine FACS-Zellsortierung (2.3.7) von den übrigen Zellen getrennt (4) und konnten dann für die Verwendung in weiteren Experimenten expandiert werden (5).

3.3.6 Durchflußzytometrie (FACS)

Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS; engl.: fluorescence activated cell sorting) erfolgte an dem System FACSVantage[®] (Becton Dickinson, Heidelberg). Dieses Zellsortiergerät ist ein Durchflußzytometer, das neben dem Zählen und Phänotypisieren einzelner Zellpopulationen eine gleichzeitige serielle Trennung der Zellen ermöglicht. Beim Sortieren werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung innerhalb eines Flüssigkeitsstrahles stark beschleunigt und müssen am Analysepunkt einen Laser passieren, wobei der Flüssigkeitsstrahl in Einzeltropfen zerfällt und die Einzelzellen in Tropfen verpackt werden. Die Tropfen erhalten entsprechend der vorher festgelegten Sortierkriterien unterschiedliche Ladungen und können so in verschiedene Richtungen abgelenkt und

sortiert werden. Hierzu wurden mit Hilfe der Software Cell Quest v3.3 und CloneCytPlus v3.1 Fenster (sogenannte „Gates“) für die zu trennende Zellpopulation festgelegt und so ca. 1% der am stärksten rot fluoreszierenden Zellen aussortiert (**Abb. 9**). Die Geschwindigkeit der Sortierung wurde auf 2000 Zellen/sec festgelegt.

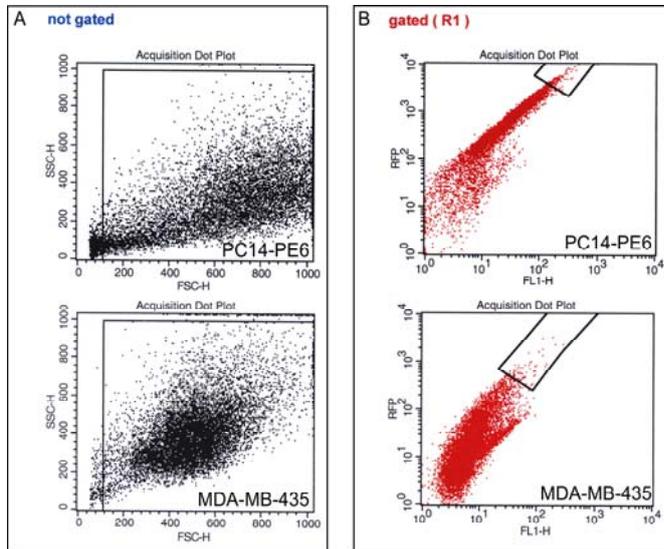


Abb. 9: Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

(A) Die Zellpopulationen ließen sich aufgrund ihrer Größe und Granulation unterscheiden. Von den Streueigenschaften der Zelle wurde das Vorwärtsstreulicht (engl.: forward scatter, FCS), das ein Maß für die Größe der Zellen darstellt, und das 90°-Streulicht (engl.: side scatter, SSC), ein Maß für die Granularität, gemessen. (B) Die Fluoreszenzemissionen werden in einem Punktdiagramm (engl.: DotPlot) dargestellt. Ein Fenster (engl.: Gate, schwarzer Kasten) wurde festgelegt und so ca. 1% der am stärksten rot

3.3.7 Proliferationsassay

Der CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Mannheim) beruht auf einer kolorimetrischen Methode zur Bestimmung lebender Zellen. Er besitzt die Tetrazolium-Komponente MTS, die durch vitale Zellen zu einem farbigen, löslichen Formazan-Produkt reduziert wird. Die Formazan-Konzentration ist direkt proportional der Zahl lebender, metabolisch aktiver Zellen. Die Zellen wurden auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Loch ausgesät. Nach 6 h wurde das Medium durch serum-freies Medium ersetzt, und nach weiteren 12–16 h erfolgte die Stimulation mit 10–500 µg/ml Bevacizumab oder Kontroll-IgG. Nach 48 h wurden in jedes Loch 20 µl CellTiter 96[®] AQueous One Solution pipettiert. Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde die Zellproliferationsrate ermittelt, indem die Platten bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader (Dynex Opsys MR, iLF bioserve, Langenau) gemessen wurden.

3.4 Tierversuche

3.4.1 Maus-Linien

Als Versuchstiere wurden athymische Nacktmäuse verwendet (Stamm: NMRI nu/nu, Charles River, Sulzfeld). Diese Mäuse zeichnen sich durch Haarlosigkeit und Thymusaplasie aus. Weiterhin wurden von Jackson Laboratory TIE2-GFP-Mäuse bezogen (Stamm: B6.Cg-Tg(TIE2GFP)287Sato/1J; Nummer 004659). Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte in den Tierlaboratorien des Zentrums für Neuropathologie. Homozygote NMRI nu/nu Männchen wurden mit heterozygot nackten (nu/WT) Weibchen verpaart, da homozygote Nacktmausweibchen ihre Nachkommen nicht versorgen konnten.

3.4.2 Generierung und Zucht doppelt transgener Mäuse

Der von Jax Lab bezogene TIE2-GFP-Mausstamm B6.Cg-Tg(TIE2GFP)287Sato/1J exprimiert grün fluoreszierendes Protein (engl.: green fluorescent protein, GFP) aus der Alge *Aequorea victoria* selektiv in Endothelzellen unter der Kontrolle des Endothelzell-spezifischen Tie2-Promoters. Der Stamm wurde generiert, indem GFP cDNA mit dem Tie2 Promoter/Enhancer-Element fusioniert wurde und das Konstrukt durch Mikroinjektion in die Tiere eingebracht wurde (Motoike et al., 2000). Das Tie2-Gen codiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die durch Bindung von Angiopoietinen (Ang1–4) verantwortlich für vaskuläre Veränderungen ist. **Abb. 10** zeigt diejenige Region des Konstruktes, die für die Endothelzell-spezifische Expression verantwortlich ist.

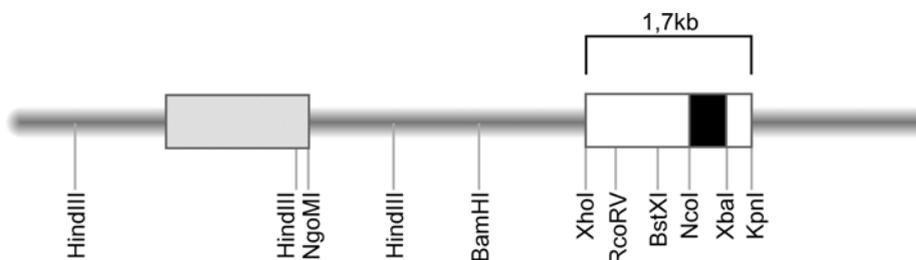


Abb. 10: Struktur der Tie2-Promoter-Region

Dargestellt ist der zur spezifischen Endothelzellexpression erforderliche Sequenzabschnitt. Das Exon (grau) wird flankiert von Upstream- und Intron-Sequenzen (weiß *XhoI-KpnI*-Fragment, schwarz *NcoI-XbaI*-Fragment). Das 1,7kb große *XhoI-KpnI*-Fragment spielt eine Schlüsselrolle bei der Endothelzell-spezifischen Expression (Schlaeger et al., 1997). Wird nun das GFP-Gen unter die Kontrolle des hier dargestellten Tie2-Promoters gebracht, kann eine selektive Expression des GFP-Gens in Endothelzellen erreicht werden.

Durch Kreuzung weiblicher homozygoter Tie2-GFP-Mäuse (FVB/N-Hintergrund, **Abb. 11A**) mit homozygoten männlichen Nacktmäusen (NMRI nu/nu) sollten doppeltransgene athymische Tie2-GFP-Nacktmäuse entstehen, in denen zerebrale Endothelzellen grün (im Verhältnis zu roten humanen Tumorzellen) dargestellt werden können (**Abb. 11B**). Nach der 1. Mendelschen Regel (Uniformitätsregel) sind die Nachkommen der F_1 -Generation heterozygot für beide betreffenden Merkmale (hier GFP-Expression und athymisch aufgrund einer Deletion im FOXP1-Gen). Durch Verpaarung der Nachkommen der F_1 -Generation entstehen dann in der F_2 -Generation neue, reinerbige Kombinationen, wobei für die in diesem Promotionsvorhaben antizipierten Versuche nur homozygote Nacktmäuse mit ausreichender GFP-Endothelzell-Expression Verwendung fanden (**Abb. 11B**).

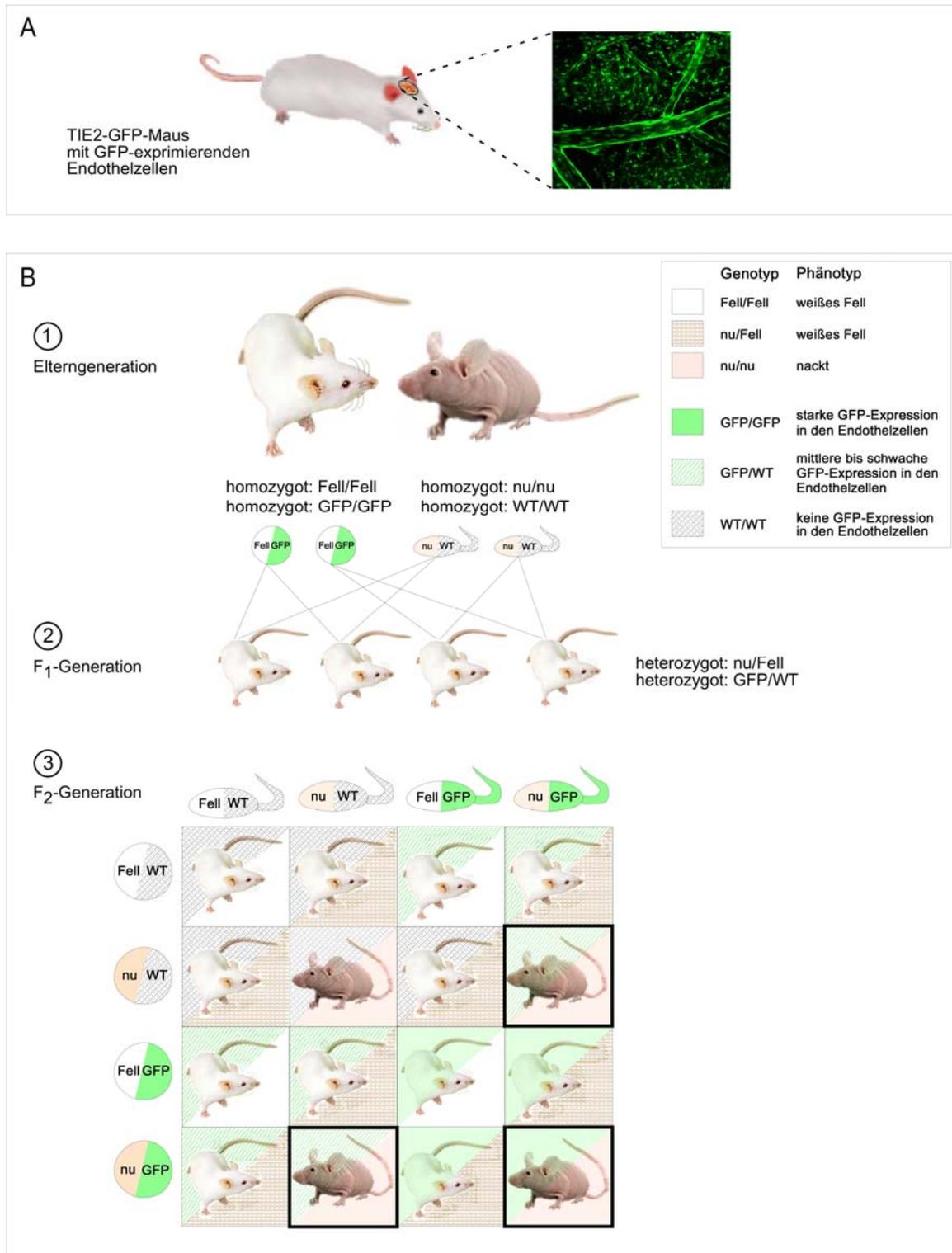


Abb. 11: Generierung und Zucht doppelt transgener Mäuse

(A) Grün fluoreszierende zerebrale Endothelzellen sind intravitalmikroskopisch durch ein chronisches kraniales Fenster in einer Tie2-GFP^{+/+} Maus darstellbar. (B) Weibliche Tie2-GFP^{+/+} werden mit homozygoten Nacktmäusen verpaart (1). In der F₁-Generation sind alle Nachkommen für die betreffenden Merkmale heterozygot (2). Wird die F₁-Generation nun miteinander verpaart, entstehen bei der F₂-Generation („Enkel“), neue, reinerbige Kombinationen (3). Durch Genotypisierung werden die F₂-Nachkommen charakterisiert. Bei einer Verpaarung der F₂-Nachkommen werden 2–3 heterozygot athymische Tie2-GFP^{+/+} Weibchen mit einem homozygot athymischen Tie2-GFP^{+/+} Männchen zusammen gesetzt. Homozygot athymische Tie2-GFP Nacktmäuse mit ausreichender GFP-Expression (schwarzer Kasten) fanden Verwendung in intravitalmikroskopischen Untersuchungen zur Lagebeziehung von zerebralen Endothelzellen und Tumorzellen.

3.4.3 Genotypisierung

Um die in Abschnitt 2.4.2 beschriebene Verpaarung durch Genotypisierung zu überprüfen, wurden von 3 Wochen alten Nachkommen der F₂-Generation Schwanzbiopsien genommen und die genomische DNA isoliert (Abschnitt 2.2.2.6). Die Genotypisierung erfolgte durch PCR (engl.: Polymerase chain reaction) unter Verwendung Gen- und Transgen-spezifischer Primer (**Tab. 7**).

Tab. 7: Genotypisierungs-Primer und Sequenzen

Name	Sequenz
F-WT-Tie2	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
R-WT-Tie2	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
F-TG-Tie2	ATTCTCGTGGAACTGGATGG
R-TG-Tie2	GGACAGGTAATGGTTGTCTGG
F-nude	GGCCCAGCAGGCAGCCCAAG
R-nude	AGGGATCTCCTCAAAGGCTTC

Phänotypisch behaarte Weibchen wurden darauf geprüft, ob sie heterozygot athymisch waren (**Abb. 12; Tab. 8**).

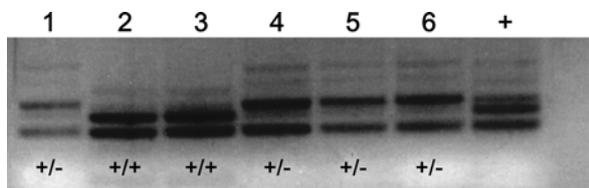


Abb. 12: Agarosegel zur Genotypisierung von heterozygoten Nacktmäusen

Die Banden der Größen x und x entsprechen dem PCR-Produkt für heterozygot athymische Tiere (+/-; Banden 1, sowie 4-6). Phänotypisch sind diese Tiere behaart, genotypisch tragen sie allerdings eine heterozygote Mutation im FOYN1-Gen. Als Positiv-Kontrolle (+) wurde DNA eines homozygot behaarten Tieres (+/+) eingesetzt.

Tab. 8: PCR-Mix für Nacktmaus-Genotypisierung und PCR-Programm

Volumen (µl)	Produkt	Konzentration
10	HotMasterMix (x 2,5)	
1,2	F-nude	10µM
1,2	R-nude	10µM
1	Template DNA	
11,6	H ₂ O	

Schritt	Temp (°C)	Zeit	Repeat
1	94	1,5 min	x 1
2	94	30 sek	x 35
3	55	1 min	
4	72	1 min	
5	72	10 min	x 1
6	4	unlimited	

Heterozygot athymische Weibchen (**Abb. 12**, siehe oben) und alle weiteren Nacktmäuse der Generation F₂ (homozygot athymisch) wurden zur Bestimmung der Tie2/GFP-Expression in Endothelzellen genotypisiert (**Abb. 13; Tab. 9**). Heterozygot athymische Weibchen mit Tie2/GFP-Expression wurden mit homozygot athymischen Tie2/GFP^{+/+} Nacktmausmännchen verpaart. Homozygot athymische Nacktmäuse (nu/nu) mit GFP-Endothelzellen (Tie2/GFP^{+/+}) dienten als Versuchstiere in intravitalmikroskopischen Untersuchungen.

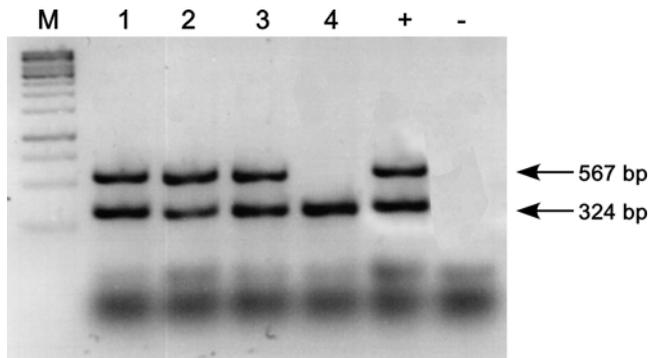


Abb. 13: Agarosegel zur Genotypisierung von Tie2/GFP

Die Bande der Größe 567 bp ist das PCR-Produkt des Tie2/GFP-Transgens. Die Banden 1-3 sind somit positiv für das Transgen, Bande 4 zeigt keine Tie2/GFP-Expression. Als Kontroll-PCRs dienten ein Tie2/GFP^{+/+}-Tier (+) und H₂O (-). M: Marker, 100 bp Leiter, Peqlab; bp: Basenpaare.

Tab. 9: PCR-Mix für Tie2/GFP-Genotypisierung und PCR-Programm

Volumen (µl)	Produkt	Konzentration
10	HotMasterMix (x 2,5)	
1,2	F-WT-Tie2	10µM
1,2	R-WT-Tie2	10µM
1,2	F-TG-Tie2	10µM
1,2	R-TG-Tie2	10µM
1	Template DNA	
6,8	H ₂ O	

Schritt	Temp (°C)	Zeit	Repeat
1	94	1.5 min	x 1
2	94	30 sec	x 35
3	55	1 min	
4	72	1 min	
5	72	10 min	x 1
6	4	unlimited	

3.4.4 Narkose

Für Experimente, die eine tiefe und lange Narkose notwendig machten (Abschnitte 2.4.5 und 2.4.6), erfolgte die Anästhesie durch intramuskuläre Injektion einer Lösung, bestehend aus Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg). Für intravitalmikroskopische Untersuchungen (2.4.8) wurde eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Isofluran/Sauerstoff 7:3, Einleitung 5%, Erhaltung 1%) angewendet.

3.4.5 Präparation des chronischen kraniellen Fensters

Die repetitive mikroskopische Verlaufsuntersuchung des Metastasierungsvorgangs im Gehirn erforderte die Präparation eines chronischen kraniellen Fensters. Die im Folgenden beschriebenen Präparationsschritte wurden unter einem Operationsmikroskop (Stemi 2000C, Zeiss, Jena) mit 0,65–5-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Tiere wurden zunächst anästhesiert (2.4.4). Zum Schutz vor Austrocknung wurde Bepanthensalbe auf die Augen gegeben. Nach Fixierung der Maus auf einem stereotaktischen Tisch (Eigenbau) mittels einem Paar Ohrstifte und einer Schneidezahnhalterung (**Abb. 14A**) wurde die Kopfhaut mit jodhaltiger Lösung desinfiziert und über dem Schädel mit Schere und Pinzette entfernt. Nach erneuter Desinfektion wurde die Knochenhaut mit einem Skalpell abgeschabt und so der Schädelknochen frei präpariert (**Abb. 14B**). Mit Hilfe eines feinen Drillbohrers wurde ein rundes Loch mit einem Durchmesser von 6 mm im Bereich des Bregmas in die Kalotte gefräst (**Abb. 14C–E**), dabei wurde intermittierend mit steriler NaCl-Lösung zur Kühlung sowie zur Entfernung von Bohrspänen gespült (**Abb. 14E**). Unter Verwendung einer Feinpinzette konnte die Schädelkalotte nach ausreichender Bohrung trepaniert werden (**Abb. 14F**). Die frei präparierte Gehirnoberfläche wurde mit steriler NaCl-Lösung vor Austrocknung bewahrt (**Abb. 14G–I**). Zur Entfernung der Dura mater wurde diese vorsichtig unter Schonung der Duragefäße lateral vom Sinus sagittalis superior abgezogen (**Abb. 14J–M**). Der Kortex wurde mit einem runden 6 mm großen Deckglas geschlossen (**Abb. 14N–P**), die Ränder wurden mit chirurgischem Kleber verklebt (**Abb. 14Q–R**). Während der

Aufwachphase wurde das Tier auf einer bei 37 °C angewärmten Wärmeplatte gehalten. Alle verwendeten Geräte und Instrumente wurden vor Beginn der Operation autoklaviert, während der Operation erfolgte eine Sterilisation der Instrumente in einem Tischsterilisator.

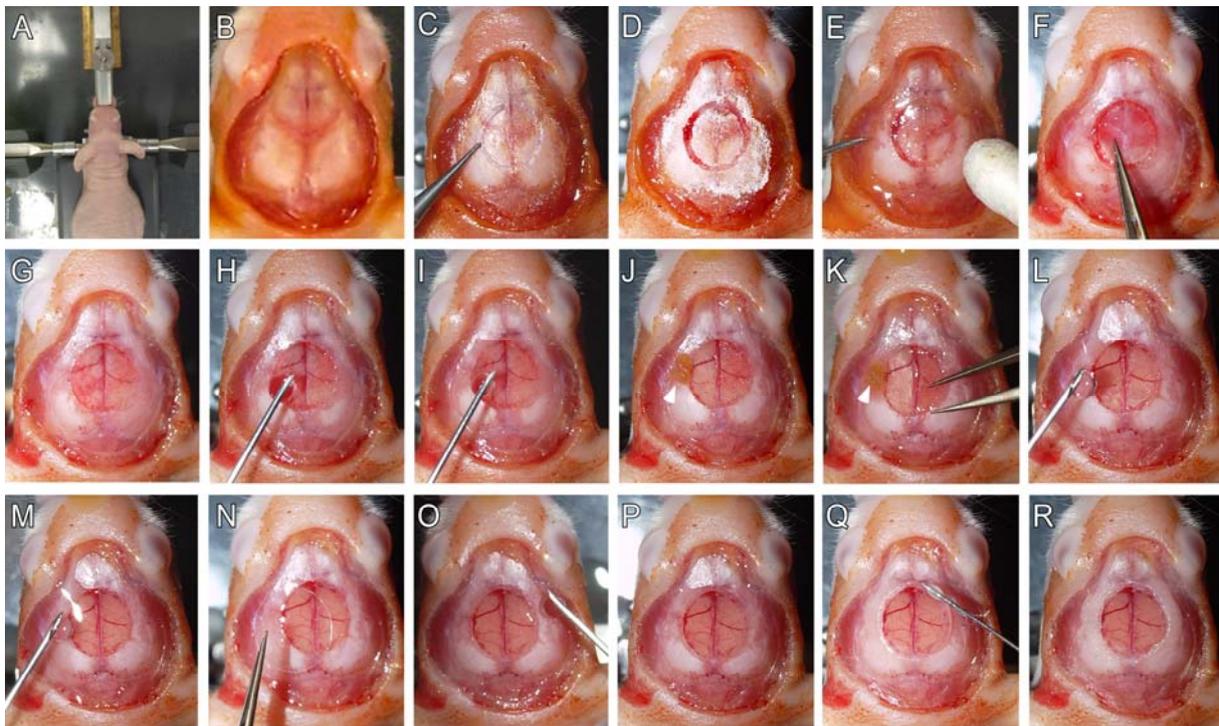


Abb. 14: Präparationsschritte zum Einbau eines chronischen kraniellen Fensters

Kurz zusammen gefasst wird zur Präparation eines chronischen kraniellen Fensters die Haut vom Schädelknochen entfernt, der Schädelknochen wird in einem kreisförmigen Durchmesser von etwa 6 mm mit einem Drillbohrer entfernt sowie Dura mater mit Feinpinzetten und -scheren, das Fenster wird mit einem runden Deckglas geschlossen, und die Ränder werden mit dem Schädelknochen durch chirurgischen Kleber verklebt.

Detailbeschreibung: (A) Fixierung der narkotisierten Maus mit einem Paar Ohrstifte und einer Schneidezahnhalterung. Die Schnauze wird über eine Schraubklemme zusätzlich stabilisiert. Die Maus ist während der gesamten Präparation auf dem Mikroskoptisch fixiert. (B) Zur Desinfektion wird der Schädel der Maus vor und nach Entfernung der Kopfhaut mit jodhaltiger Lösung desinfiziert. (C) Mit einem Drillbohrer (links im Bild) wird über dem Bregma ein 6 mm großes Loch gefräst, ohne jedoch den Knochen komplett zu durchbohren. (D) Um Bohrspäne zu beseitigen wird intermittierend mit steriler NaCl-Lösung gespült (E), die Spüllösung wird mit einem sterilen Wattepad (rechts im Bild) aufgenommen. (F) Kraniotomie: operative Öffnung des Schädels nach erfolgreicher Bohrung mit Hilfe einer Feinpinzette. (G) Kortex und Dura mater sind freigelegt. (H-I) Um eine Austrocknung zu vermeiden, wird die Gehirnoberfläche regelmäßig mit steriler NaCl-Lösung gespült. (J) Entfernung der Dura mater des linken Kortex, rechts ist sie noch vorhanden. Es muss darauf geachtet werden, dass beim Entfernen der Dura mater Brückenvenen nicht abreißen. Eventuell auftretende Blutungen werden mit einem blutstillenden Kollagen-Schwamm (Pfeilkopf) gestoppt. (K) Die Dura mater wird nun auch rechts mit einer Feinpinzette angehoben und vorsichtig lateral vom Sinus sagittalis superior abgezogen. (L-M) Erneute Spülung des Kortex mit NaCl. Die Dura mater ist nun komplett entfernt. (N) Ein rundes Deckglas (Durchmesser 6 mm) wird über den Kortex auf den Schädelknochen gelegt. (O-P) Luftblasen werden mit steriler NaCl-Lösung aufgefüllt. (Q-R) Mit chirurgischem Kleber werden Deckglas und Schädelknochen miteinander verklebt.

3.4.6 Intracarotidale Injektion von Tumorzellen

Versuchstieren mit einem mindestens eine Woche alten chronischen kraniellen Fenster (2.4.5) wurden in einem weiteren Schritt rot fluoreszierende Lungenkarzinom- und Melanomzellen in die Arteria carotis interna injiziert, um individuelle Zellen im Folgenden dann intravitalmikroskopisch darstellen zu können (2.4.8). Dazu wurde die anästhesierte

Maus (2.4.4) in Rückenlage unter einem Operationsmikroskop positioniert und in eine überstreckte Kopfposition gebracht. Nach Desinfektion der Halsregion wurde die Haut mit einem ca. 2 cm langen medianen Schnitt zwischen Unterkiefer und Manubrium sterni eröffnet. Durch Klammern wurden die Hautlappen am Tisch fixiert. Das Unterhautfettgewebe wurde mobilisiert, und die linke Arteria carotis communis und ihre Äste Arteria carotis externa und interna wurden aus dem aus den Muskeln M. digastricus, M. sternomastoideus und M. sternohyoideus gebildeten Dreieck stumpf freipräpariert und ihrem Verlauf entlang der Trachea dargestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Truncus vagosympathicus nicht verletzt wurde. Die Arteria carotis externa (ACE) wurde mit Seide (0,5 metric) ligiert. Ebenso verfahren wurde mit der Arteria carotis communis (ACC) distal der Bifurkation (**Abb. 15A**). Die ACC wurde darüber hinaus noch mit zwei weiteren Fäden proximal der Ligatur (nach intrakraniell) angeschlungen. Es erfolgte eine temporäre Okklusion der Arteria carotis interna (ACI) mit einem mikrovaskulärem Gefäßclip (Yasargil, Aesculap, Tuttlingen). Die ACC wurde mit einer Mikroschere eröffnet und ein Katheter (PE10 Tubing, Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm, Smith Medical, Grasbrunn) in die ACC eingeführt. Der Gefäßclip wurde gelöst und der Katheter weiter in die ACI nach intrakraniell verschoben und mit einem Faden fixiert. 10^5 rot fluoreszierende Tumorzellen, in $0,2 \mu\text{l}$ HBSS (Invitrogen, Karlsruhe) gelöst (Abschnitt 2.3.2.2), wurden über einen Zeitraum von zwei Minuten vorsichtig durch den Katheter injiziert (**Abb. 15B**).

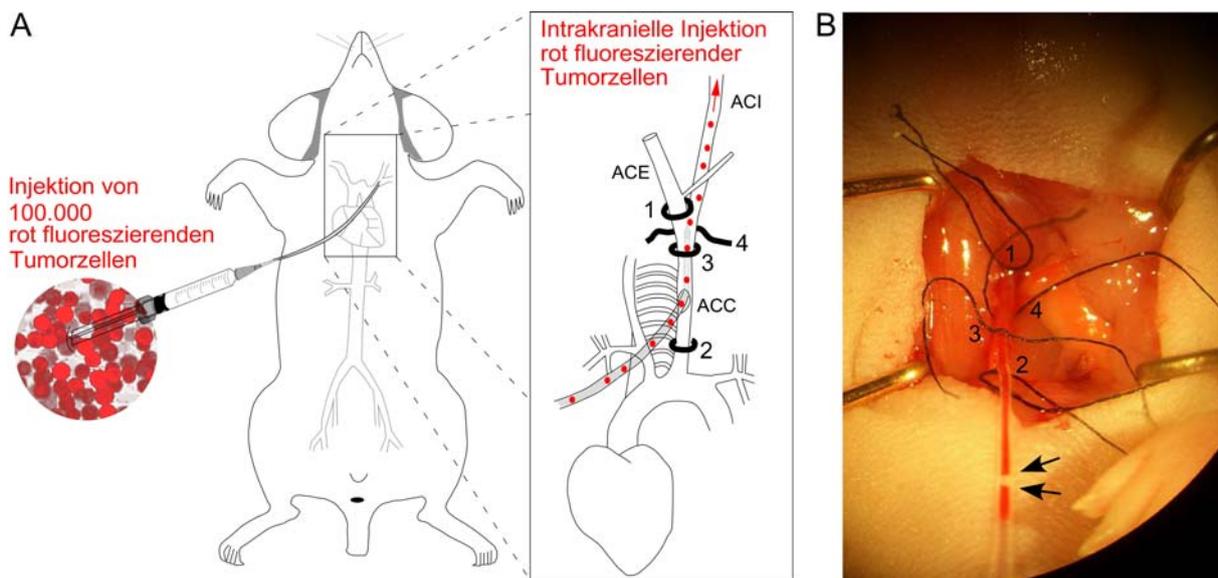


Abb. 15: Anatomische Darstellung der A. carotis interna-Injektion in der Maus

(A) Unter Schonung der umliegenden Muskeln wird die A. carotis communis (ACC), die A. carotis externa (ACE) und die A. carotis interna (ACI) stumpf freipräpariert und dargestellt. Es erfolgt eine Ligation der ACE (1) und der ACC distal der Bifurkation (2), die ACC wird darüber hinaus mit zwei weiteren Fäden angeschlungen (3 und 4). Nachdem die ACC mit einer Mikroschere eröffnet wurde, wird die ACI selektiv kanüliert. Der Katheter wird mit dem Faden 3 befestigt. Anschließend werden 10^5 rot fluoreszierende Tumorzellen über einen Zeitraum von zwei Minuten vorsichtig injiziert. (B) Fotografie des chirurgischen Eingriffes der A. carotis interna Injektion. Zu sehen sind die Ligaturen der ACE (1) und der ACC (2) sowie die Befestigung des Katheters (3). Durch Lösen des Gefäßclips erfolgt eine Perfusion des Katheters (Rückfluss des Blutes, Pfeile). Darüber hinaus ist die ACC angeschlungen mit Faden 4, der eine Ligatur der ACC distal der Injektionsstelle ermöglicht, nachdem die Injektion der Tumorzellen erfolgt ist.

Eine Zellinjektion von 10^5 Zellen ist üblich für Hirnmetastasenmodelle (Schackert et al., 1989) und auch notwendig, um eine relevante Anzahl dieser Zellen unter dem kraniellen Fenster

verfolgen zu können. Anschließend wurde das Gefäß distal von der Injektionsstelle ebenfalls ligiert und der Katheter entfernt. Trotz Okklusion dieses Hauptgefäßzuflusses des Circulus arteriosus Willisii kann das Gehirn der Maus über das anastomosierende Gefäßnetzwerk noch adäquat mit Blut versorgt werden. Um die Wunde zu verschließen, wurden die Wundränder mit einer Pinzette adaptiert und anschließend ein Klammergerät ohne Druck auf die Haut gesetzt, bevor der Klammergriff langsam zusammengedrückt wurde. Die Klammern (FST, Heidelberg) wurden fest und sicher in der Haut verankert, so dass das Tier sie nach dem Aufwachen nicht selbst entfernen konnte. Das Tier wurde postoperativ bis zum Aufwachen auf einer 37 °C Wärmeplatte gelagert und mit 1 ml Glukose/Tutofusin (1:1) s.c. versorgt. Die auf diese Weise injizierten Tiere wurden nun zu verschiedenen Zeitpunkten post operationem intravitalmikroskopisch beobachtet (2.4.8) und das Verhältnis von Tumorzellen zu perfundierten Gefäßen und zerebralen Endothelzellen analysiert (2.4.9).

3.4.7 Injektion des Fluoreszenzmarkers zur Gefäßdarstellung

Der Farbstoff Fluorescein emittiert bei Anregung durch Licht von 476 nm Licht in einer Wellenlänge von 518 nm. Er wurde als Fluoresceinisothiocyanat (FITC) an hochmolekulares Dextran (2M MW, Sigma-Aldrich, Deisendorf) gebunden, in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht (KG), verwendet. Zu Beginn jeder Intravitalmikroskopie erfolgte zur Darstellung des Gefäßsystems (Angiogramm) eine intravenöse Injektion von 0,1 ml FITC-Dextran in eine der lateralen Schwanzvenen mittels einer 30G-Nadel unter Isofluran-Anästhesie. Das hochmolekulare Dextran verteilt sich gleichmäßig im Blutplasma und gelangt nur langsam nach extravasal. Dadurch werden Blutgefäße grün gefärbt und gut erkennbar gemacht, Arterien (klein, hohe Blutflussgeschwindigkeit) lassen sich unterscheiden von Venen (groß, niedrige Blutflussgeschwindigkeit). FITC-Dextran wird durch die Niere ausgeschieden, ein Teil des Fluorescein wandert allerdings in den Extravasalraum und wird nur langsam ausgewaschen. FITC-Dextran-Ablagerungen können daher bei einer wiederholten Mikroskopie desselben Areals zum Teil beobachtet werden, allerdings ohne negative Beeinflussung des Mikroskopieergebnisses. Bei der Darstellung von grün fluoreszierenden Endothelzellen (2.4.2) wurden keine FITC-Angiogramme angefertigt.

3.4.8 2-Photonen-Intravitalmikroskopie

Das für die 2-Photonen-Intravitalmikroskopie verwendete Setup (**Abb. 16A**) bestand aus dem 2-Photon-Laser „Mai Tai Titanium:Saphir“ (Newport Spectra Physics, Darmstadt). Diesem Laser vorgeschaltet wurde das Modul „Mai Tai DeepSee“ zur Abschwächung von Dispersionseffekten (**Abb. 16B**). Die 2-Photonen-Mikroskopie erfolgte *in vivo* mittels Fixierung des Kopfes der Maus in einem stereotaktischen Rahmen (**Abb. 16C;D**), bestehend aus einer Schneidezahnhalterung (1), einer Inhalations-Narkosemaske (2) und Ohrstiften (3). Der Laser wurde über eine Spiegelstrecke in das Mikroskop „Axioskop 2 FS mot“ der Firma Zeiss eingekoppelt (**Abb. 16E**). Das Mikroskop war mit dem Scan-Kopf „LSM 5 MP“ ausgerüstet. Außerdem befanden sich zwei Auflicht- und zwei Durchlicht-„Non-Descanned-Detectors“ (NDDs) am Mikroskop-Stativ, wobei aufgrund der höheren Sensitivität mit den Auflicht-NDDs gearbeitet wurde.

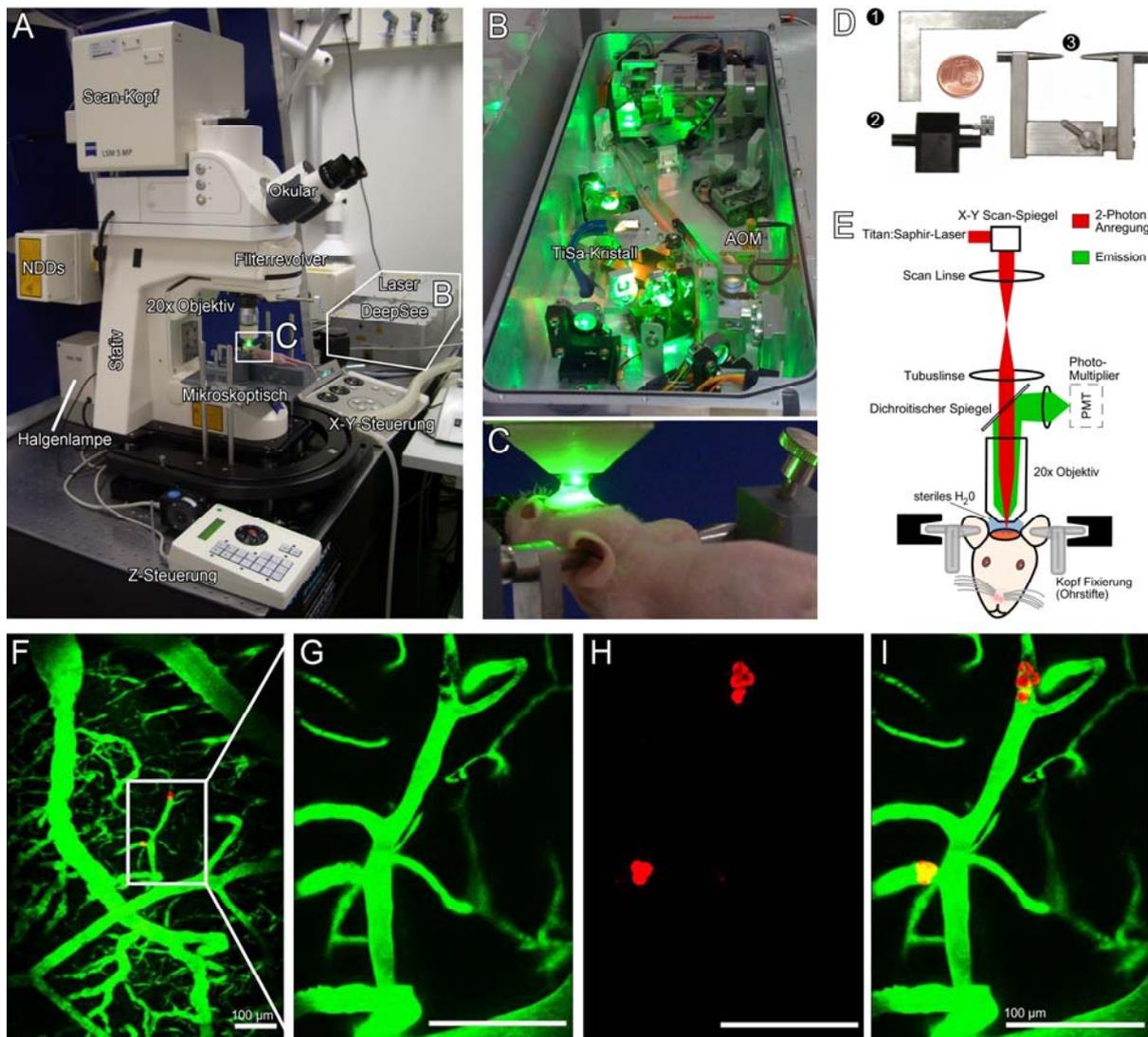


Abb. 16: 2-Photonen-Intravitalmikroskopie

(A) Setup für 2-Photonen-Intravitalmikroskopie (Zeiss LSM 5MP). (B) Zur 2-Photonen-Anregung werden Femtosekundenlaser eingesetzt: Bei geöffnetem Deckel ist grünes, sichtbares Licht im Strahlengang erkennbar, da der Titan:Saphir-Laser (kurz TiSa) von einem zweiten grünen Dauerstrichlaser optisch gepumpt wird. Zur optimalen Raumausnutzung des vorhandenen Lasergehäuses wird die 1,80 m lange Laserstrecke durch Anordnung verschiedener Spiegel komprimiert. Mit Hilfe des Akusto-optischen Modulators (AOM) lässt sich das Licht präzise schalten und regeln. Durch die optische Eigenschaft des TiSa-Kristalls sendet dieser selbständig Lichtpulse mit einer Dauer von 100 fs im Infrarotbereich. (C) Die Maus ist während des gesamten Mikroskopievorgangs auf dem Mikroskoptisch fixiert und narkotisiert durch eine Inhalationsanästhesie (Isofluran/Sauerstoff 7:3, Einleitung 5%, Erhaltung 1%). (D) Kopfhalterung der Maus zur Vermeidung von Bewegungsartefakten. Die oberen Zähne der Maus werden in eine Schneidezahnhalterung (1) gehängt, auf welche eine Inhalations-Narkosemaske (2) geschoben wird, die sowohl zur Anästhesie als auch zur Fixierung der Schnauze dient. Ohrstifte (3) tragen zur weiteren Stabilisierung bei. (E) Durch im Strahlengang befindliche bewegliche Spiegel (X-Y Scan-Spiegel) wird der Laserstrahl in seiner Lage so verändert, dass sich der Fokuspunkt durch das Präparat bewegt, dieses also abrastert. Die dadurch entstehende Fluoreszenz wird vom Objektiv aufgefangen, über dichroitische Spiegel spektral aufgetrennt und schließlich von Detektoren (PMT: Photomultiplier) aufgefangen. (F) Durch 2-Photonenanregung und Detektion der Fluoreszenz werden Gehirnregionen von Interesse in der Übersicht (10-fach-Vergrößerung) aufgenommen. Der Kasten zeigt die in G–I mit 40-facher Vergrößerung aufgenommene Teilregion von zwei Karzinomzellclustern, wobei Gefäße (G) und Zellen (H) getrennt oder als Überlagerungsbild (I) dargestellt werden können. Der Balken entspricht 100 µm.

Eine Steuerung der Hardware wurde durch die LSM Release 3.2 Software (Zeiss, Jena) gewährleistet. Im Exzitations-Strahlengang wurde der Hauptstrahlteiler HFT/KP660 verwendet, der den 2-Photonen-Laser mit infraroter Wellenlänge von 710–920 nm auf die Probe spiegelt und kurzwelligeres Licht als 660 nm, das von der Probe emittiert wird, zu den NDDs durchlässt. Im Emissions-Strahlengang wurde das Filterset FT560 ausgewählt, das für die Detektion von RFP und FITC besonders geeignet war. Dieses Filterset beinhaltete die Bandpass-Filter BP500–550 (lässt Licht der Wellenlänge 500–550 nm passieren; zur Darstellung grüner Fluoreszenz) sowie BP 575–640 (lässt Licht der Wellenlänge 575–640 nm passieren; zur Darstellung roter Fluoreszenz). Um rot fluoreszierende Zellen (RFP) und grün fluoreszierende Gefäße (FITC-Dextran) anzuregen (**Abb. XF-I**), wurde die Wellenlänge des 2-Photonen-Lasers auf 750 nm eingestellt. Grün fluoreszierende zerebrale Endothelzellen (Nacktmäuse mit Tie2-GFP-Expression, Abschnitt 2.4.2) wurden im Verhältnis zu roten Tumorzellen bei einer Wellenlänge von 830 nm dargestellt. Es wurden die Wasserimmersionsobjektive Achroplan 20x/1.0 (numerische Apertur von 1.0), Achroplan 40x/0,80 (numerische Apertur von 0.8) und Achroplan 10x/0,45 (numerische Apertur von 0.45) von Zeiss verwendet. Für die Detektion der Fluoreszenzsignale war eine absolute Verdunklung des Laborraumes notwendig, da der Photomultiplier (PMT) eine außerordentlich hohe Empfindlichkeit besitzt und dadurch jede weitere Lichtquelle Störeffekte verursacht.

Für Kurzzeituntersuchungen wurde eine Videosequenz einer Bildebene alle 0.5 Sekunden über 5 Minuten 50 µm tief im Hirnparenchym akquiriert. Weiterhin erfolgten 30-sekündliche Aufnahmen eines z-Stapels mit einer Ausdehnung von 50 µm für eine Stunde. Die Regionen wurden zufällig ausgewählt. Für Langzeituntersuchungen wurden an den Tagen 1, 3, 6, 9, 14 und dann wöchentlich post injectionem individuelle Tumorzellen (rot) in ihrer Lagebeziehung zu perfundierten Gefäßen (grün, FITC-Dextran) oder zerebralen Endothelzellen (grün, TIE2-GFP) dargestellt. An Tag 1 post injectionem wurden sechs Kortexregionen, in denen Tumorzellen detektiert werden konnten, ausgewählt und an den oben beschriebenen Tagen im Zeitverlauf verfolgt. Waren keine Zellen mehr in einer Beobachtungsregion zu finden, wurde diese ein letztes Mal aufgenommen, und ein neues Kortexareal wurde ausgewählt. Um dieselbe Gefäßregion im Zeitverlauf verlässlich wiederzufinden, wurde mit einem wasserfesten Marker ein schwarzer Punkt auf das Deckglasfenster des Versuchstieres gesetzt (**Abb. 17**) und dieser als Nullpunkt definiert. Der Mikroskopiertisch war über einen computergesteuerten Schrittmotor (380 FM Verschiebetisch, Luigs & Neumann, Ratingen) in zweidimensionaler Richtung (x-Achse, y-Achse) beweglich. Ausgehend vom Nullpunkt konnte nun die genaue Position der eingangs definierten Beobachtungsfelder in Form von x- und y-Koordinaten immer wieder aufgerufen und untersucht werden. Zusätzlich dienten markante Gefäßstrukturen als Orientierungshilfe (**Abb. 17**). Somit war es möglich, alle Ausgangspositionen exakt wiederzufinden und die verschiedenen Beobachtungsfelder innerhalb derselben Fensterpräparation präzise zu reproduzieren. Es wurden z-Stapel in hoher Auflösung mit einer z-Ausdehnung von 0 bis –600 µm und einem z-Abstand von 2 µm in einem Areal von 420 x 420 µm aufgenommen. Dabei wurde durch manuelle Justierung der Laserpower dafür gesorgt, dass die Fluoreszenz-Intensität über den gesamten z-Stapel gleich blieb. Außerdem wurde gewährleistet, dass die Fluoreszenz-Intensität derselben Beobachtungsfelder zu verschiedenen Zeitpunkten nicht variierte.

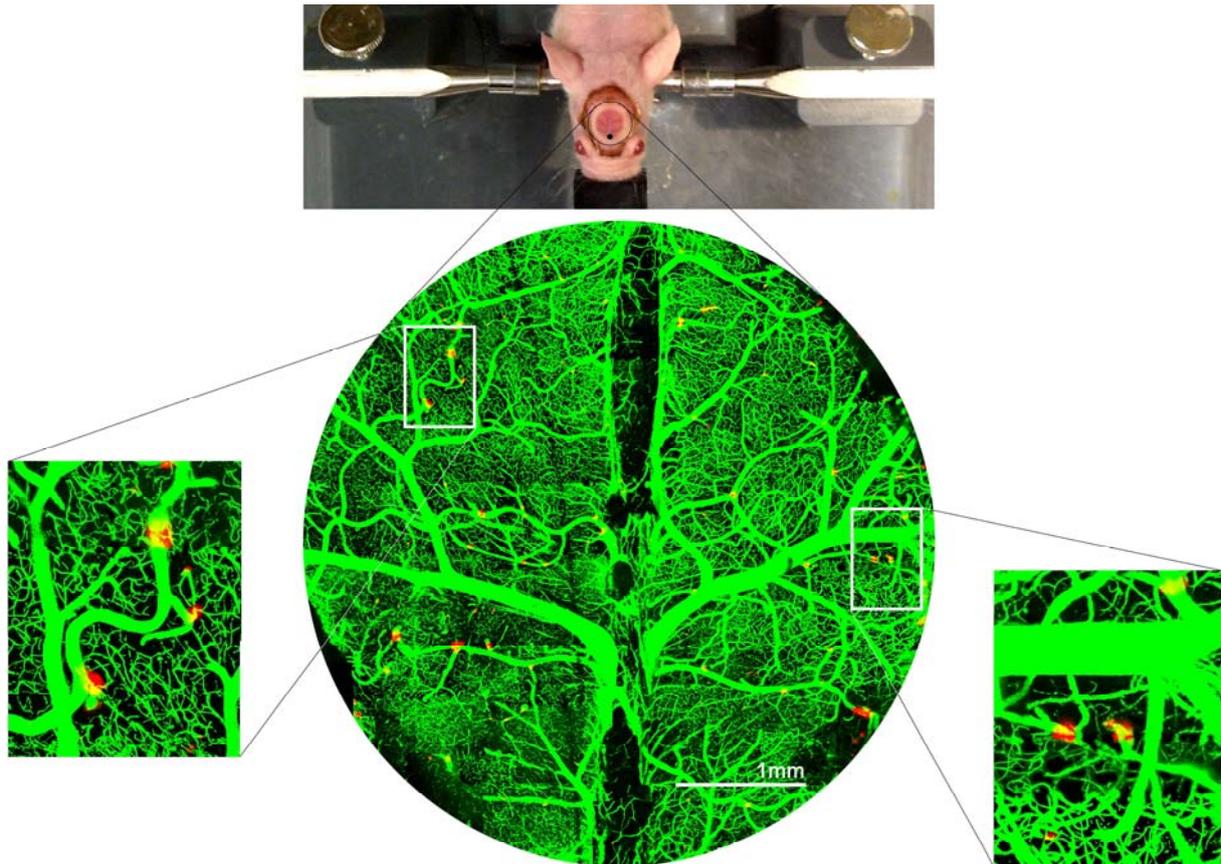


Abb. 17: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines vollständigen kraniellen Fensters

Dargestellt ist eine Übersicht eines gesamten kraniellen Fensters mit allen darin enthaltenen und intravitalmikroskopisch sichtbaren Gefäßstrukturen (grün, FITC-Dextran) im Kortex der Maus. Erkennbar sind der median liegende Sinus sagittalis superior, lateral Anteile der linken und rechten Hemisphäre und Tumorzellen (rot, in Überlagerung mit Gefäßen gelb). Die Abbildung wurde aus 10-fach vergrößerten Einzelabbildungen zusammengesetzt, welche direkt nach Injektion der Tumorzellen in die ACI akquiriert wurden. Eine Markierung auf dem Deckglas des kraniellen Fensters (schwarzer Punkt) wird als Nullpunkt definiert und ermöglicht ein Wiederfinden definierter Beobachtungsareale (hier zwei exemplarisch dargestellt) über lange Zeiträume. Tiefe: 0–100 μm .

3.4.9 Applikation von Bevacizumab

Um die Effekte einer Angiogenese-Inhibition zu untersuchen, wurde den Versuchstieren Bevacizumab (Avastin®) intraperitoneal verabreicht. Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der ausschließlich humanes (nicht aber murines) VEGF-A inhibiert (Yu et al., 2008). Als Kontrolle diente ein IgG Antikörper. Die „prophylaktische“ Therapie begann einen Tag nach der Injektion von PC14-PE6 Lungenkarzinom- oder MDA-MB435 Melanomzellen (15 mg/kg KG alle 2 Tage). Bestehende Gehirnetastasen wurden ab einer Größe von 1 mm therapiert (15 mg/kg KG alle 2 Tage).

3.4.10 Quantifizierungen, Analyse und Auswertung

Insgesamt konnten 128 individuelle metastasierende Zellen der Melanomzell-Linie MDA-MB-435 (n = 4 Mäuse), 107 Zellen der Melanomzell-Linie A2058 (n = 5 Mäuse), 124 Zellen der Lungenkarzinomzell-Linie PC14-PE6 (n = 6 Mäuse) und 102 Zellen der Lungenkarzinomzell-Linie HTB177 (n = 5 Mäuse) über Wochen beobachtet und quantifiziert werden. Zusätzlich wurden Zellen über einen Zeitraum von 30 bis 60 Minuten direkt nach intraarterieller Injektion beobachtet (PC14-PE6: 61 Zellen, n = 4 Mäuse; MDA-MB-435: 39 Zellen, n = 3 Mäuse). Um die Auswirkungen einer VEGF-Inhibition zu untersuchen, wurden 241 PC14-PE6 Zellen in 4 Mäusen unter Bevacizumab-Therapie und 163 PC14-PE6 Zellen in 6 IgG-behandelten Kontrollmäusen im Zeitverlauf beobachtet und analysiert. Die folgenden Parameter wurden in denselben Kortexregionen im Zeitverlauf für jede Tumoreinzelle bzw. jeden metastatischen Knoten bestimmt: 1) direkt nach Injektion der Zellen in die ACI: Relation zwischen Tumorzelldurchmesser und Gefäßdurchmesser (μm), Geschwindigkeit intravaskulärer Tumorzellen ($\mu\text{m}/\text{sec}$), Anzahl der Tumorzellen, welche sich in vaskulären Verzweigungsstellen befinden; 2) ab Tag 0 post injectionem wurde für jede individuelle Tumorzelle im Zeitverlauf bestimmt: a) die Anzahl an Tumorzellen, welche sich I) intravaskulär, II) innerhalb der Gefäßwand, III) extravasieren, IV) perivaskulär, V) ohne direkten physischen Kontakt zu Gefäßen befanden; b) Tumorzellmigrationsgeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{h}$, intra- vs. perivaskulär vs. parenchymal); c) Veränderungen der Tumorzellanzahl und des Metastasendurchmessers (μm), in Relation zu der anatomischen Lokalisation (intra-, perivaskulär, parenchymal); d) Gefäßdichte (mm/mm^3); e) Auftreten vaskulärer Umbauvorgänge („remodeling“; Dilatation und erhöhte Gewundenheit; kapilläre Schleifenbildung) oder die Entstehung neuer Blutgefäße (Angiogenese); f) Zellmorphologie (longitudinal vs. kugelförmig) und g) Zellen, die sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes über Wochen im Ruhezustand ohne Proliferation zeigten, und ihre Lagebeziehung zu den Gehirngefäßen. Nur Zellen mit direktem physikalischem Kontakt zur abluminalen Oberfläche der Blutgefäßwand, welche bei maximaler Vergrößerung keine Lücke zwischen Tumorzellsignal und Gefäßsignal zeigten, wurden als „perivaskulär“ charakterisiert. Der chronische Latenzzustand („dormancy“) wurde definiert als Fehlen oder Arrest der Tumorzellproliferation ohne jegliches Zeichen einer Regression während der gesamten Dauer des Experimentes (bestimmt durch das Überleben des Versuchstieres: Minimum 21, Maximum 51 Tage). Eine konstante Zellzahl (kein Zeichen von Proliferation oder Regression) musste für ein Minimum von 21 Tagen detektiert werden, damit die Zelle als ‚ruhend‘ bezeichnet werden konnte. Gefäß-Kooption wurde definiert als Invasion und Proliferation entlang präexistenter zerebraler Blutgefäße, was in einer perivaskulären Infiltration des Hirnparenchyms resultierte. Mikrometastasen wurden definiert als multizelluläre Tumorzellcluster, bestehend aus 4–50 Zellen (was einem mittleren Metastasendurchmesser von $<50 \mu\text{m}$ entspricht); Makrometastasen bestanden laut unserer Definition aus >50 Zellen ($>50 \mu\text{m}$ Durchmesser). Diese Größe entspricht auf den Menschen übertragen der Ausdehnung einer MRT-detektierbaren Gehirnmetastase (5 mm) in einem menschlichen Gehirn. Die Gefäßdichte wurde in Kortexregionen von $150 \times 150 \times 30 \mu\text{m}$ bestimmt, in welchen sich proliferierende bzw. sich rückläufig entwickelnde Mikrometastasen befanden. Die Bildanalyse wurde unter Verwendung der AxioVision Rel. 4.6 Software

durchgeführt, wobei entweder Einzelbilder oder 3-dimensionale Rekonstruktionen ausgewertet wurden.

3.4.11 Geräte, Materialien und Instrumente

Tab. 10: Geräte und Material für tierexperimentelle Arbeiten

Name	Hersteller-Nr.	Firma
Bead Sterilizer FST 250	18000-45	FST, Heidelberg
Bepanthen Augen- und Nasensalbe, 5g	423303	Bayer AG, Leverkusen
Cyano Veneer Fast	152261	Henry Schein Dental Depot, München
Cyano Veneer Pulver A2	152254	Henry Schein Dental Depot, München
Deckglas, rund, 6mm	MENZCB00060RA120	VWR, Ismaning
Drillbohrer	18000-17	FST, Heidelberg
Faden zur Ligation (Seide)	14699	Vömel, Kronberg
FITC-Dextran, 1g	FD2000S-1G	Sigma-Aldrich, Deisendorf
Glukose	4999.99.99	DeltaSelect, Pfullingen
Isofluran, 6x250 ml	2594.00.00	Abbott, Wiesbaden
Isofluran-Narkosegerät	-	Eigenbau
Isotone Natriumchlorislösung 0,9%, 50 ml	6726174.00.00	Braun/Melsungen AG, Melsungen
Kanülen 30G	612-0138	VWR, Ismaning
Kanüle 24G	46557675	Braun/Melsungen AG, Melsungen
Ketamin Inresa 50mg/ml, 10x10ml	401924	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg
Kollagen-resorb 1,8x3,6cm, 12st	RK-1836	Resorba Clinicare, Nürnberg
Lectin-FITC	L0401	Sigma-Aldrich, Deisendorf
Leukoplast	260257	BSN medical, Hamburg
Operationsmikroskop	Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
PE10 Tubing, 30m	800/100/100	Portex (Smith Medical), Grasbrunn
Pinzette Dumont #5	11251-20	FST, Heidelberg
Pinzette Dumont #5-45	11251-35	FST, Heidelberg
Schere (Spitze 0,1 mm)	15007-08	FST, Heidelberg
Spritzen	6120106	VWR, Ismaning
Stereotaktischer Tisch	-	Eigenbau
Sterile Wattestäbchen	8147501	Schubert und Weiß, München
Tachosil	3101150	Nycomed, Konstanz
Tutofusin	2038998	Baxter, Unterschleißheim
Wärmeplatte	21061-90	FST, Heidelberg
Xylazin	6293841.00.00	Bayer AG, Leverkusen
Yasargil Clip Mini Temporaer. 5mm	FE691K	Aesculap, Tuttlingen
Yasargil Miniclips Anlegezange	FE570K	Aesculap, Tuttlingen

3.5 Histologie/Immunhistochemie

3.5.1 Durchführung

Für histologische Untersuchungen wurden die Tiere zunächst mit Ketamin/Xylazin narkotisiert, und FITC wurde intravenös appliziert (2.4.4). Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation euthanisiert. Danach wurden Gehirn, Lungen, Milz und Leber entnommen, bei 4 °C für jeweils 24 h in PFA (Paraformaldehyd) und Sucrose gelagert und bei –80 °C weggefroren. Das Gehirn wurde in Eindeckmedium (TissueTek, Sakura Finetek, Heppenheim) eingebettet, mit einem Kryotom (HM 560, Microm, Wolldorf) wurden bei –20 °C alle 50 µm zwei 10 µm dicke Schnitte in koronarer Schnittrichtung unter Einschluss der gesamten Hemisphären angefertigt (**Abb. 18**). Die Schnitte wurden auf vorbeschriftete, zimmertemperierte Glasobjektträger aufgezogen und bis zur weiteren Untersuchung bei –80 °C eingefroren. Lunge, Milz und Leber wurden ebenfalls geschnitten und auf Befehl durch Metastasen untersucht.

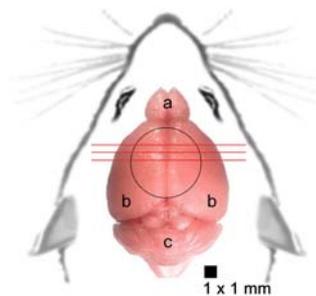


Abb. 18: Dorsale Ansicht auf das Mausgehirn

Erkennbar sind (a) der Bulbus olfactorius, (b) die zwei Hemisphären und (c) das Cerebellum. Der schwarze Kreis zeigt die anatomische Lage des chronischen kraniellen Fensters. Mit Hilfe eines Kryotoms wurden koronare Gehirnschnitte (10 µm Schnittdicke, angedeutet mit roten Strichen) angefertigt.

3.5.2 VEGF-Färbungen

Der endotheliale Wachstumsfaktor (engl.: vascular endothelial growth factor, VEGF) wird v.a. von Tumorzellen produziert und ist maßgeblich an der Steuerung der Angiogenese beteiligt (Plate et al., 1992). Die Kryo-Schnitte (2.5.1) wurden auf Raumtemperatur gebracht und für 10 min getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte bei –20 °C 10 min in kaltem Aceton fixiert. Es folgte eine Umrandung des Präparates mit einem Dako Pen, um ein Auslaufen der Flüssigkeiten zu vermeiden. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte eine Stunde mit Eselserum (Konzentration 1:100, Sigma-Aldrich, Deisendorf) zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Für die immunhistochemische Färbung von VEGF wurde der polyklonale Primärantikörper VEGF (A-20): sc-152 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) über Nacht bei 4 °C bzw. 1 h bei RT mit den Schnitten inkubiert (Verdünnung 1:100 in PBS-Eselserum). Hierbei handelt es sich um einen gereinigten Kaninchen-anti-VEGF-Antikörper, der an die Aminosäure 1–20 am Aminoende des humanen VEGF bindet. Nach der Inkubationszeit erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS, um überschüssige und unspezifisch bindende Primärantikörper zu entfernen. Nun folgte eine einstündige Inkubation der Schnitte mit dem Esel-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper DyLight™649 (Jackson Immuno, Suffolk, UK; Verdünnung 1:200 in PBS-Eselserum). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit einem Deckgläschen und Einbettmedium haltbar gemacht und bei 4 °C gelagert, bevor sie konfokalmikroskopisch untersucht wurden.

3.6 Proteinchemische Arbeitsmethoden

3.6.1 Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen

Zur Proteingewinnung wurden adhärenente Zellen einer 25 cm²-Zellkulturflasche mit kaltem PBS gewaschen und mit einem sterilen Zellkulturschaber (Sarstedt, Nümbrecht) abgelöst. Zur Lyse wurde das Zellpellet auf Eis je nach Größe in 100 µl bis 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte unter ständiger Rotation 30 min bei 4 °C. Nach Zentrifugation (10.000 g für 15 min bei 4 °C) wurden anschließend die Zelltrümmer verworfen, das Zellysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei –80 °C gelagert.

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Bradford-Test beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Bio-Rad, München) von 465 nm zu 595 nm, wenn dieser in saurer Lösung an Proteine bindet (Bradford, 1976). Als Standardkurve wurde eine BSA-Verdünnungsreihe (bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich, Deisendorf) verwendet. Die Proben unbekannter Proteinkonzentration wurden in zwei verschiedenen Verdünnungen als Doppelwerte gemessen. Zur Proteinkonzentrations-Bestimmung wurde das Bradford-Reagenz mit ddH₂O 1:5 verdünnt. Je 1 ml des verdünnten Reagenz wurde in Standardküvetten überführt und 5 µl BSA-Standard oder Proben zugegeben und gründlich durchmischt. Die Extinktion wurde im Photometer bei 595 nm gemessen.

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gele benutzt (Laemmli, 1970). Verwendung fand eine Gelelektrophorese-Apparatur für 10x10 cm² große Gele Typ Owl P8DS (VWR, Ismaning), wobei $\frac{1}{4}$ der Gel-Länge aus dem Sammelgel und $\frac{3}{4}$ aus dem Trenngel bestand. Es wurden 10%ige Trenngele mit Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Bio-Rad, München) erstellt. Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Trenngellösung mit Isopropanol überschichtet und 30 min zur Polymerisation bei RT stehengelassen. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und der Kamm positioniert. Zur Denaturierung wurden die Proteinproben mit 5x Proteinpuffer (mit Natriumdodecylsulfat, SDS) versetzt und 10 min bei 99 °C aufgekocht. Nach Abkühlung wurden sie zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (Prestained SDS-PAGE standard, Bio-Rad-München) auf das Gel aufgetragen. Der Einlauf der Proben durch das Sammelgel in das Trenngel wurde durch Anlegen einer Spannung von 80 V für 40 min erreicht, die Spannung für die größenabhängige Auftrennung der Proteine im Trenngel betrug 140 V.

3.6.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Um Proteine immunochemisch nachzuweisen, wurden diese nach der elektrophoretischen Auftrennung durch SDS-PAGE aus dem Gel auf eine geeignete Matrix (immobilisierende

Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran, Immobilon-P, Millipore, Eschborn) überführt. Der Transfer erfolgte auf elektrophoretischem Weg in die proteinbindende Membran. Beim hier angewandten Semi-dry Blot (Towbin et al., 1979; Kyhse-Andersen, 1984) wurden Gel und Membran, sandwichartig eingerahmt von Filterpapieren (IGB 004 Gel-Blotting-Papiere, VWR, Ismaning), zwischen die Elektroden gelegt. Methanol im Puffer diente dazu, das SDS zu entfernen und die Bindungsaffinität der Proteine zu erhöhen. Der Proteintransfer erfolgte mit der Semiphor Transphor Blot-Apparatur (Amersham Biosciences, Freiburg) für 1,5 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Gelfläche. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation der Membran mit Block-Puffer unter Schütteln für 1 h bei RT abgesättigt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht unter gleichmäßigem Schwenken in 5% (w/v) Magermilchpulver in PBST. Die Antiseren wurden in einer Verdünnung von 1:200 (Kaninchen-anti-VEGF, (A-20):sc-152, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) und 1:5000 (Kaninchen-anti-β-Aktin; Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) eingesetzt. Nach zwei Waschvorgängen (30 min in PBST) wurde die Membran für 1 h in einer Lösung des in PBST-verdünnten Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Kaninchen, alkalische Phosphatase-Konjugat, Verdünnung 1:2000) geschwenkt, erneut gewaschen (2x 30 min in PBST) und abschließend für 5 min in Chemilumineszenz-(CLZ)-Puffer inkubiert. Als Substrat für die alkalische Phosphatase diente eine organische Phosphatverbindung (C₁₈H₁₉Cl₂O₇PNa₂, CDP-Star; Roche, Penzberg). Die Membran wurde mit Klarsichtfolie umhüllt, in einer Entwicklungskassette mit verschiedenen Expositionszeiten auf einen Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgelegt und in einer Entwicklungsmaschine (Optimax Typ TR; MS Laborgeräte, Wiesloch) entwickelt.

3.6.5 Lösungen und Puffer zur Protein-Analyse

Tab. 11: Lösungen und Puffer zur Protein-Analyse

Name	Zusammensetzung
Lysispuffer	5 mM Tris-HCl. pH 7,4, 2 mM EDTA, 10 µl Protease-Inhibitor Cocktail, 10 mg/ml Benzamidin, 5 mg/ml Leupetin, 5 mg/ml Trypsin-Inhibitor
Trenngel	10% Acrylamid, 0,375 M Tris/HCl ph 8,8, 0,1% SDS, 0,05% Ammoniumperoxodisulfat (APS), 0,035% TEMED
Sammelgel	5% Acrylamid, 0,125 M Tris/HCl ph 8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,07% TEMED
Laufpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% SDS
5x Probenpuffer	15% (w/v) SDS, 40% (w/v) Saccharose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 6,8, 20% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau
Blotting-Puffer	0,025 M Tris, 0,192 Glycin, 0,1 % SDS, 20% Methanol
Block-Puffer	3% Magermilchpulver, 0,1% Tween in PBS
PBST	PBS mit 0,1%v Tween
CLZ-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 9,8, 1 mM Magnesiumchlorid
5% Magermilchpulver	2,5 g Milchpulver in 50 ml PBST

3.6.6 Identifizierung pro- und antiangiogener Faktoren in Tumorzellen

Zur Charakterisierung des Expressionsprofils pro- und antiangiogener Faktoren in Tumorzellen wurde ein humanspezifischer Angiogenese-Array verwendet (Human Angiogenesis Antibody Array C Series 1000, RayBiotech Inc., Atlanta, USA). Diese Membran ermöglicht die Identifizierung von 43 pro- und antiangiogenen Faktoren. Hierzu wurden die Zellen lysiert und die Gesamtproteinmenge extrahiert (2.6.1). Eine Angiogenese-Membran wurde mit 200 µg Protein nach Angaben des Herstellers inkubiert (**Abb. 19**). Nach erfolgter Hybridisierung wurden gebundene Faktoren durch Zugabe eines biotinylierten Antikörpermixes markiert. Die Detektion der Antikörper erfolgte durch Zugabe von Streptavidin, konjugiert mit Meerrettich-Peroxydase (engl.: horseradish, HRP), mittels Chemilumineszenz (**Abb. 19**). Zur densitometrischen Analyse wurden die optischen Dichtewerte der Signale mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Die optischen Dichtewerte der einzelnen Punkte wurden als Prozentsatz der durchschnittlichen optischen Dichte der Positivkontrollen angegeben (arbitrary units, A.U.).

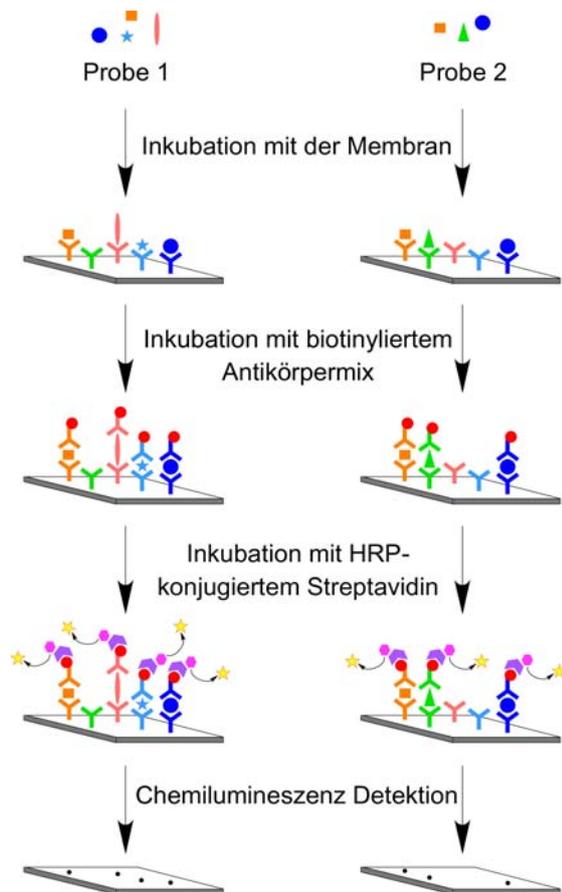


Abb. 19: Angiogenese-Array

Mit Hilfe von Angiogenese-Arrays (RayBiotech Inc., Atlanta, USA) ist es möglich, in relativ kurzer Zeit einen Überblick über die Sekretionsspiegel spezifischer humaner pro- und antiangiogener Faktoren von Tumorzellen zu erhalten. Durch vergleichende Untersuchungen ist es zusätzlich möglich, Konzentrationsunterschiede zu bestimmen.

Durchführung: Die Membranen wurden mit den Proteinproben über Nacht bei 4 °C hybridisiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C mit einem Biotin-konjugierten Antikörpermix. Es folgten mehrmalige Waschschrte, bis HRP-konjugiertes Streptavidin auf die Membran gegeben wurde. Das Streptavidin bindet an Biotin nicht-kovalent. Nach 60 min Inkubation bei RT erfolgte eine Detektion der Signale mittels Chemilumineszenz, wobei die Meerrettichperoxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) die Oxidation von zyklischen Diacylhydraziden katalysiert (Lichtaussendung).

4 Ergebnisse

4.1 Fluoreszenzmarkierung der Tumorzell-Linien

4.1.1 Generierung stabiler Transfektanten durch nicht-virale Transfektion

In der vorliegenden Arbeit sollten zwei humane Lungenkarzinomzell-Linien (PC14-PE6 und HTB177) sowie zwei humane Melanomzell-Linien (MDA-MB-435 und A2058) für die Etablierung und Anwendung eines neuen Tiermodells zur Hirnmetastasierung eingesetzt und daher stabil RFP markiert werden. Die Fluoreszenzmarkierung der Tumorzell-Linien war demnach der erste entscheidende Schritt des Promotionsvorhabens, da erst derart fluoreszenzmarkierte Zellen nach intracarotidaler Injektion *in vivo* mittels 2-Photonen-Mikroskopie detektierbar sind.

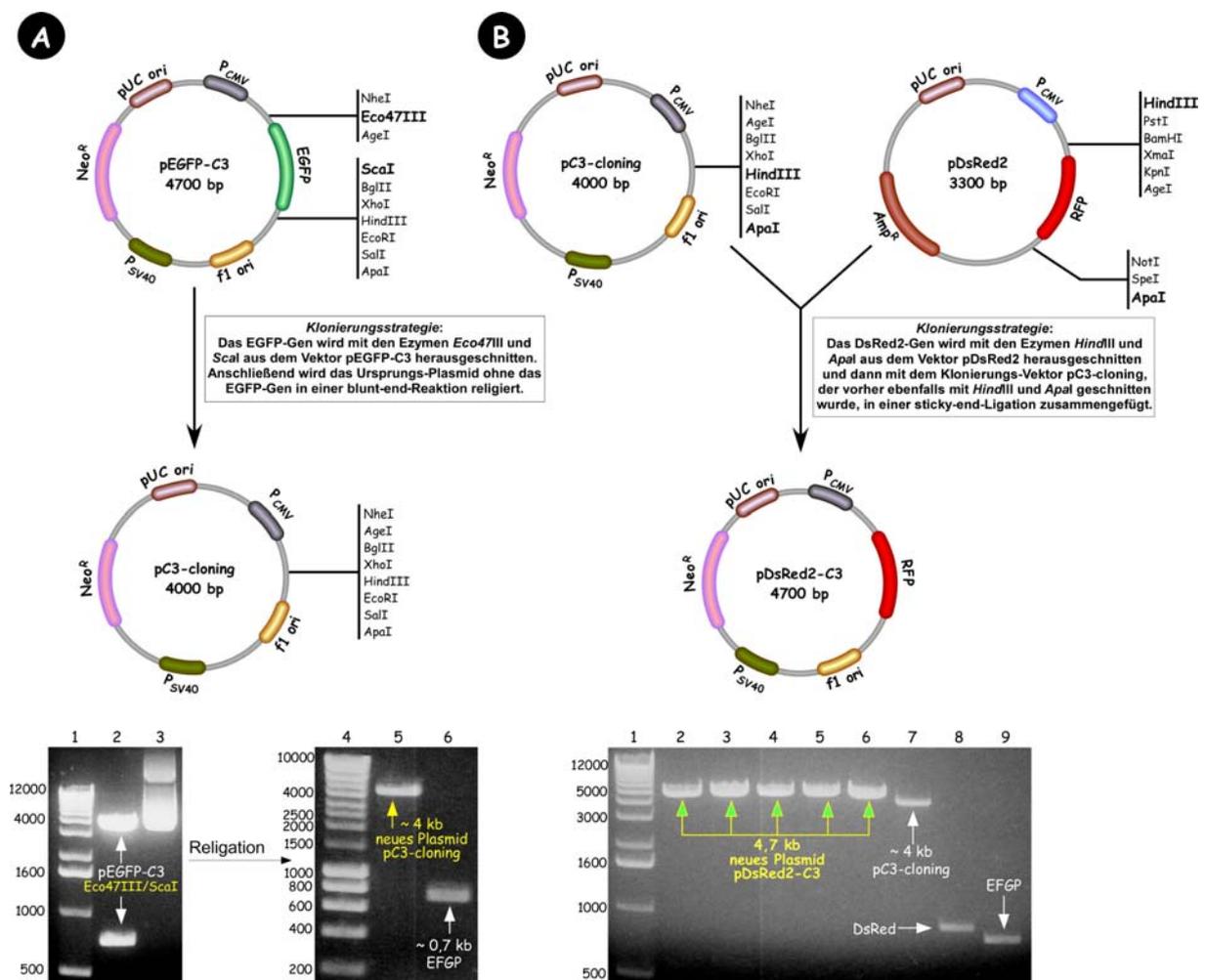


Abb. 20: Klonierungsstrategie zur Herstellung von pDsRed2-C3

(A) Zur Herstellung des neuen Vektors pDsRed-C3 wurde zunächst das EGFP-Gen des Ausgangsvektors pEGFP-C3 entfernt und dieser zum neuen Vektor pC3-cloning religiert. Banden: 1 = Marker 1 Kb DNA Ladder, 2 = pEGFP-C3 geschnitten mit *Eco47III* und *ScaI*, 3 = pEGFP-C3 ungeschnitten, 4 = Marker Hyperladder I, 5 = neues Plasmid pC3-cloning geschnitten mit *HindIII*, 6 = isoliertes EGFP-Gen. (B) Der neue Vektor pC3-cloning konnte anschließend einem *HindIII/NotI*-Restriktionsverdau unterzogen werden, so dass das ebenfalls mit den Enzymen *HindIII* und *NotI* herausgeschnittene Gen DsRed in den Vektor zur Produktion von pDsRed2-C3 eingefügt werden konnte. Banden: 1 = Marker 1 Kb DNA Ladder, 2–6 = Screening verschiedener Klone durch *BglII*-Restriktionsverdau (Charakterisierung des neuen Plasmids pDsRed2-C3), 7 = pC3-cloning geschnitten mit *HindIII*, 8 = DsRed2-Gen isoliert, 9 = EGFP-Gen isoliert.

Die Generierung stabiler Transfektanten durch einen nicht-viralen Gentransfer erforderte die Klonierung eines selektierbaren Vektors, der gleichzeitig das Gen RFP übertragen sollte (**Abb. 20A;B**). Das Plasmid pDsRed2 kodiert für das Gen DsRed2, welches im Gegensatz zu seinen RFP-Vorgängern eine verbesserte Expression in eukaryotischen Zellen zeigt. Der bakterielle, schwache lac-Promoter dieses Plasmids machte es allerdings unbrauchbar für Transfektionsexperimente. Deswegen wurde in einem ersten Schritt das Gen für das grün fluoreszierende Protein EGFP aus dem Vektor pEGFP-C3 herausgeschnitten (**Abb. 20A**), der anschließend einem *HindIII/NotI*-Restriktionsverdau unterzogen wurde und mit dem DsRed2-Gen ligiert wurde (**Abb. 20B**). Das neue Plasmid pDsRed2-C3 besitzt nun das DsRed2-Gen, das unter der Kontrolle des hoch aktiven viralen CMV (Cytomegalo-Virus) Promoters steht, was ein besseres Expressionsniveau erlaubt. Der Vektor trägt außerdem ein Neomycin-Resistenzgen. Die nicht-virale Fluoreszenzmarkierung der Karzinomzellen erfolgte mittels Lipofectamine™ 2000 unter Verwendung des neu generierten Plasmid-Vektors pDsRed2-C3. Resistente Kolonien wurden in 800 µg/ml G418 selektiert. Die chromosomale Integration nicht-viraler Vektoren ist allerdings ein seltenes Ereignis ($< 10^3$) und wird bei der Verwendung von Karzinomzellen besonders erschwert. Die durch nicht-viralen Gentransfer akquirierte Fluoreszenzintensität der Tumorzellen war daher entweder zu schwach, um sie für *in vivo*-Untersuchungen zu verwenden, andere Tumorzell-Linien (MDA-MB-435 und HTB177) konnte nicht-viral gar nicht transfiziert werden.

4.1.2 Generierung stabiler Transfektanten durch retrovirale Transduktion

Durch nicht-virale Transfektionen wiesen nicht alle Tumorzell-Linien eine stabile RFP-Expression auf, lediglich die Zell-Linie PC14-PE6 konnte nach nicht-viraler Transfektion und FACS Sorting eine für *in vivo*-Experimente angemessene Fluoreszenzintensität aufweisen. Daher wurde für die Generierung eines effizient chromosomal integrierenden retroviralen Vektors das Plasmid pDsRed2 einem *HindIII/NotI*-Restriktionsverdau unterzogen und so die gesamte erhaltene DsRed-cDNA in die *HindIII/NotI*-Schnittstelle des retroviralen Vektors pLNCX2 eingefügt, um pLNCX2-DsRed2 herzustellen (**Abb. 21**). Der neu entstandene, retrovirale, selektierbare Vektor pLNCX2-DsRed2 integrierte neben der gewünschten rot fluoreszierenden DsRed2-Sequenz unter der Kontrolle des CMV-Promotors zusätzlich das Neomycin-Resistenzgen als selektierbaren Marker in das Genom der transduzierten Zellen, so dass nach einer G418-vermittelten Selektion die Zellen verblieben, die beide Gene ko-integrierten. Infektiöse, aber nicht replikationsfähige retrovirale Partikel wurden durch Triple-Transfektion der Helferzell-Linie 239T mit dem neu generierten Vektor pLNCX2-DsRed2 sowie den viralen Verpackungsplasmiden pN8 gag-pol und pN8 VSVG hergestellt. Mit diesen wurden die Karzinomzell-Linien infiziert und stabil exprimierende Klone in 800 µg/ml G418 selektioniert und mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht. Die Herstellung größerer Mengen an DNA für die Transfektionsexperimente erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) aus 500 ml Bakterienkultur des *E. coli* Sicherheitsstammes Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells.

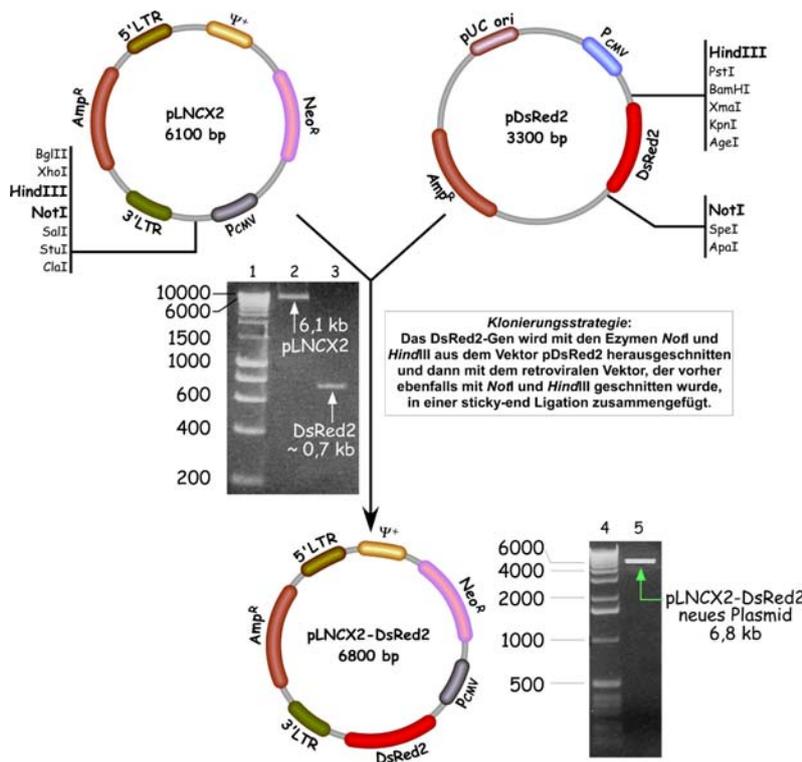


Abb. 21: Klonierungsstrategie zur Herstellung von pLNCX2-DsRed

Zur Herstellung des neuen Vektors pLNCX2-DsRed2 wurden die Ausgangsvektoren pDsRed2 und pLNCX2 mit den Enzymen NotI und HindIII geschnitten, aufgereinigt und anschließend die separierte DsRed2-cDNA mit dem Vektor pLNCX2 über Nacht in einer sticky-end-Reaktion ligiert. Der neue rot fluoreszierende Vektor pLNCX2-DsRed2 enthält die gewünschte Zielsequenz DsRed2 und kann mit Neomycin selektioniert werden. Banden: 1 = Marker Hyperladder I, 2 = pLNCX2 geschnitten mit HindIII, 3 = DsRed2-Gen isoliert, 4 = Marker Hyperladder I, 5 = neues Plasmid pLNCX2-DsRed2 geschnitten mit HindIII

Mit Hilfe des retroviralen Gentransfers konnten von allen Zell-Linien Transfektanten generiert werden, die eine stabile und intensive RFP-Expression aufwiesen und ein Wachstumsverhalten zeigten, welches der Proliferation von nicht-transfizierten Zellen entsprach. Die einzelnen Klone wurden hinsichtlich ihrer Zellmorphologie, ihrer Leuchtintensität und ihres geschätzten prozentualen Anteils an RFP-exprimierenden Zellen (Positivität) ausgewählt, gepoolt und mehreren Runden FACS Sorting unterzogen, bevor sie für *in vivo*-Metastasierungsexperimente zum Einsatz kamen. Die RFP-Expression blieb *in vitro* über viele Passagen stabil ohne eine nachweisbare Abschwächung; *in vivo* nahm die Fluoreszenzintensität sogar im Zeitverlauf zu (bei MDA-MB-435 Melanomzellen um den Faktor 8 im Verlauf von 51 Tagen, **Abb. 22**). Der Grund für diese Zunahme der Fluoreszenzintensität ist unbekannt. Eine Ursache könnten unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeiten und Mikromilieubedingungen *in vivo* vs. *in vitro* darstellen.

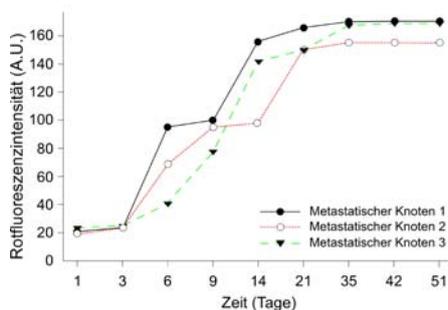


Abb. 22: Fluoreszenzintensität im Zeitverlauf *in vivo*

Zunahme der Fluoreszenzintensität in drei erfolgreich proliferierenden MDA-MB-435 Melanomzellen, welche von Tag 1 bis Tag 51 post injectionem beobachtet wurde. Die mittlere Fluoreszenzintensität (rot) wurde in Kortexregionen von 12x12 µm an den Tagen 1, 3, 6, 9, 14, 21, 28, 42, und 51 bestimmt.

Darüber hinaus zeigten (1) alle großen Makrometastasen eine starke RFP Expression *in vivo* (vgl. **Abb. 29**), konnte (2) im Fall einer Regression oftmals eine Zunahme der Fluoreszenzintensität kurz vor dem Absterben beobachtet werden und konnte (3) kein indirektes (z.B. vaskuläres) Zeichen eines Metastasenwachstums *in vivo* beobachtet werden. Wir folgerten daraus, dass eine repetitive mikroskopische Untersuchung der Tumorzellen im Zeitverlauf *in vivo* aufgrund ihrer kontinuierlichen Expression von RFP durchführbar war.

4.2 *In vivo*-2-Photonen-Analyse der Kinetik der Hirnmetastasierung

Um das in dieser Dissertation skizzierte Ziel zu erreichen, die Mechanismen der Hirnmetastasierung genauer zu charakterisieren, entschieden wir uns für einen neuen Ansatz, indem das chronische kranielle Fenster mit der 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (2PLSM) kombiniert wurde. Dadurch sollte es erstmals ermöglicht werden, das Schicksal derselben metastasierenden Karzinomzelle(n) im Zeitverlauf zu verfolgen. Die hierfür erforderliche komplexe Methodik (die Technik des chronischen kraniellen Fensters, die Injektion der Tumorzellen in die A. carotis interna (ACI) und die *in vivo*-Mikroskopie sowie -Fixierung der Maus) wurde im Rahmen dieser Dissertation erfolgreich etabliert und weiterentwickelt. Dies ermöglichte die repetitive *in vivo* 2-Photonen-Mikroskopie der Gehirnrinde derselben Maus über Sekunden bis hin zu Monaten (an den Tagen 1, 3, 6, 9, 14 und dann wöchentlich). Die stabil RFP-exprimierenden Tumorzellen (rot) wurden dabei in ihrer Lagebeziehung zu perfundierten Gefäßen (FITC Dextran Angiogramme, grün) dargestellt. Dabei konnten Tumorzellen und Gefäße bis zu einer Tiefe von 500 µm detektiert werden (mittlerer Kortex der Maus), und nicht nur oberflächliche Strukturen der Hirnhäute (piale Gefäße). Weiterhin wurden transgene Tiere, die GFP unter dem Promoter des Endothelzellmarkers Tie2 exprimierten, nach Kreuzung mit Nacktmäusen und Genotypisierung für diese Studie eingesetzt. Intravitalmikroskopisch untersucht wurden zwei Lungenkarzinomzell-Linien (PC14-PE6 und HTB177) und zwei Melanomzell-Linien (MDA-MB-435 und A2058). Eine Quantifizierung des Schicksals individueller Tumorzellen erfolgte unter Berücksichtigung folgender Parameter: Position der Zellen im Gefäßsystem, Zellzahl zum jeweiligen Zeitpunkt, Auftreten morphologischer Veränderungen der Gefäße, Migrationsgeschwindigkeit, Gefäßdichte, Zellmorphologie und Wachstumsstillstand.

In den ersten Tagen und Wochen nach intracarotidaler Injektion war eine starke Regression der blutverschleppten Tumorzellen zu beobachten, durch welche die Ineffizienz des Metastasierungsprozesses belegt werden konnte (**Abb. 23**).

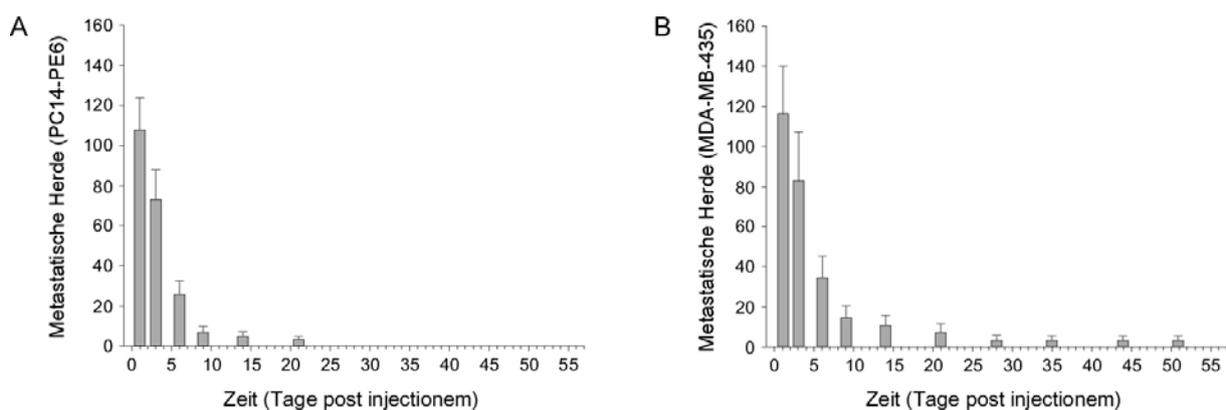


Abb. 23: Metastatische Ineffizienz

107 ± 62,51 PC14-PE6 Lungenkarzinomzellen (A) und 117 ± 63,57 MDA-MB-435 Melanomzellen (B) konnten durch das kranielle Fenster an Tag 1 post injectionem detektiert werden. Die Anzahl der Tumorzellen reduzierte sich im Zeitverlauf auf 1,2 ± 1,46 (PC14-PE6, Tag 21, n = 6 Mäuse) und 3,3 ± 5,63 (MDA-MB-435, Tag 51, n = 4 Mäuse) metastatische Knoten. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Das divergierende Versuchsende resultiert aus der heterogenen Überlebensrate: Mäuse, denen Lungenkarzinomzellen injiziert wurden, überlebten im Schnitt 25 Tage, Mäuse mit Melanomzellen hingegen 50 Tage.

Für eine erfolgreiche Metastasierung (Wachstum einer Einzelzelle zu einer klinisch manifesten Makrometastase) waren vier obligate Schritte notwendig, die durch unser neues Tiermodell erstmalig aufgedeckt werden konnten und im Folgenden erläutert werden.

4.2.1 Die vier obligaten Schritte der Hirnmetastasierung

4.2.1.1 Der erste obligate Schritt der Hirnmetastasierung: Passiver Tumorzellarrest in Gefäßgabeln

Während der ersten Minuten nach intracarotidaler Injektion bewegten sich die Tumorzellen passiv mit dem Blutfluss durch die Mikrogefäße des Gehirns. Die Zellen wechselten häufig die Geschwindigkeit, wobei nur eine geringe Anzahl der Zellen permanent statisch blieb (**Abb. 24A;B**). Die Bewegung der Zellen verlangsamte sich in kleinen Mikrogefäßen (vor allem Kapillaren), die denselben Durchmesser besaßen wie auch die Tumorzellen. Bevorzugt fand die Reduktion der Geschwindigkeit an vaskulären Verzweigungsstellen (Bifurkationen) statt, die als natürliche Hindernisse wirkten (**Abb. 24C;D**).

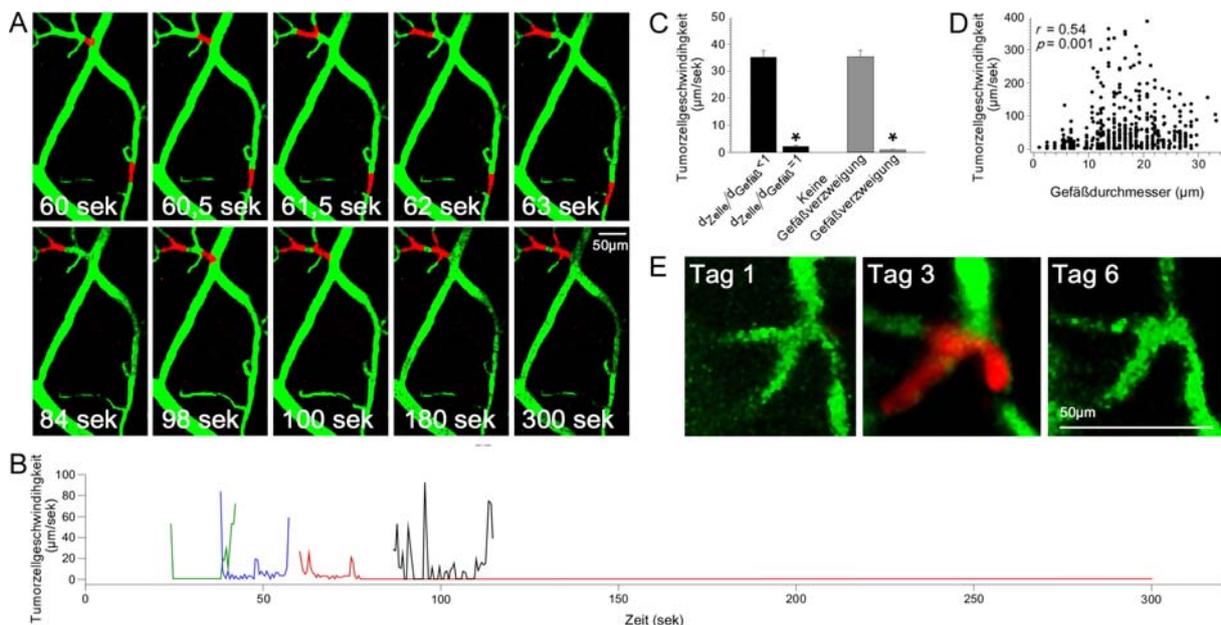


Abb. 24: Der erste obligate Schritt der Hirnmetastasierung: Passiver Tumorzellarrest

Karzinomzellen mit stabiler RFP-Expression (rot) in Lagebeziehung zu perfundierten Gefäßen (grün). (A) Direkt nach Injektion von PC14-PE6-Lungenkarzinomzellen in die A. carotis interna der Nacktmaus bewegen sich die Zellen passiv mit dem Blutstrom und werden gefangen in Verzweigungsstellen kleiner Gefäße. Eine Videosequenz wurde alle 0,5 Sekunden über fünf Minuten akquiriert, 50 µm tief im Hirnparenchym. Die Bilder repräsentieren ausgewählte Zeitpunkte daraus. (B) Repräsentative Geschwindigkeitsprofile von 5 intravaskulären Lungenkarzinomzellen in einem Hirnareal über 5 Minuten. Man beachte die häufigen Stops und Remobilisierungen. Permanenter Arrest ist rar (roten Graph). (C) Geschwindigkeit von PC14-PE6 Zellen in Abhängigkeit von dem Verhältnis von Tumorzell- und Gefäßdurchmesser sowie vom Vorhandensein vaskulärer Verzweigungsstellen (3173 Zeitpunkte analysiert, $n = 4$ Mäuse, $P = 0,001$, Mann-Whitney Rank Sum Test, Standardfehler). Die Melanomzellen MDA-MB-435 wurden ebenfalls analysiert, werden hier aber nicht gezeigt (1435 Zeitpunkte analysiert, $n = 3$ Mäuse, $P = 0,001$, Mann-Whitney Rank Sum Test). $d =$ Durchmesser. (D) Korrelation zwischen dem Gefäßdurchmesser und der Geschwindigkeit intravaskulärer PC14-PE6 Lungenkarzinomzellen ($r = 0,54$, $P = 0,001$, Spearman Rank Order Correlation). Die Melanomzellen MDA-MB-435 wurden ebenfalls analysiert, werden hier aber nicht gezeigt ($r = 0,56$, $P = 0,001$, Spearman Rank Order Correlation). (E) Ein transientser Arrest einer Lungenkarzinomzelle ist noch 3 Tage nach Injektion detektierbar (Tiefe: 120–160 µm).

Ein anhaltender Tumorzellarrest (für ein Minimum von 60 Sekunden) wurde nur für 9,8% von 61 PC14-PE6 Lungenkarzinomzellen ($n = 4$ Tiere) und 7,7% von 39 MDA-MB-435 Melanomzellen ($n = 3$ Tiere) detektiert, wobei alle diese Zellen in Gefäßgabeln von Mikrogefäßen steckten, die dieselbe Größe aufwiesen wie auch die Tumorzellen. Eine dauerhafte Adhäsion von Einzelzellen oder Zellclustern an der Wand von Gefäßen, die einen größeren Durchmesser als die Zelle(n) hatten, konnte nicht beobachtet werden. Zusammengenommen konnte die initiale Arretierung von Tumorzellen in unserem Modell als passives Verfangen in präformierten vaskulären Strukturen identifiziert werden. Dieses blieb über Tage dynamisch (**Abb. 24E**).

4.2.1.2 Der zweite obligate Schritt der Hirnmetastasierung: Frühe Extravasation

Das Wachstum von Metastasen wurde in allen 4 untersuchten Zell-Linien ($n > 100$ Zellen in jeder Zell-Linie) nur dann beobachtet, wenn die Tumorzellen es schafften, mittels aktiver Transmigration durch die Löcher in der Gefäßwand das Gefäß zu verlassen (**Abb. 24 A;C** und hier nicht gezeigte Videos). Die Extravasation trat zwischen Tag 1 und Tag 9 auf, allerdings nicht mehr zu einem späteren Zeitpunkt (**Abb. 25B**).

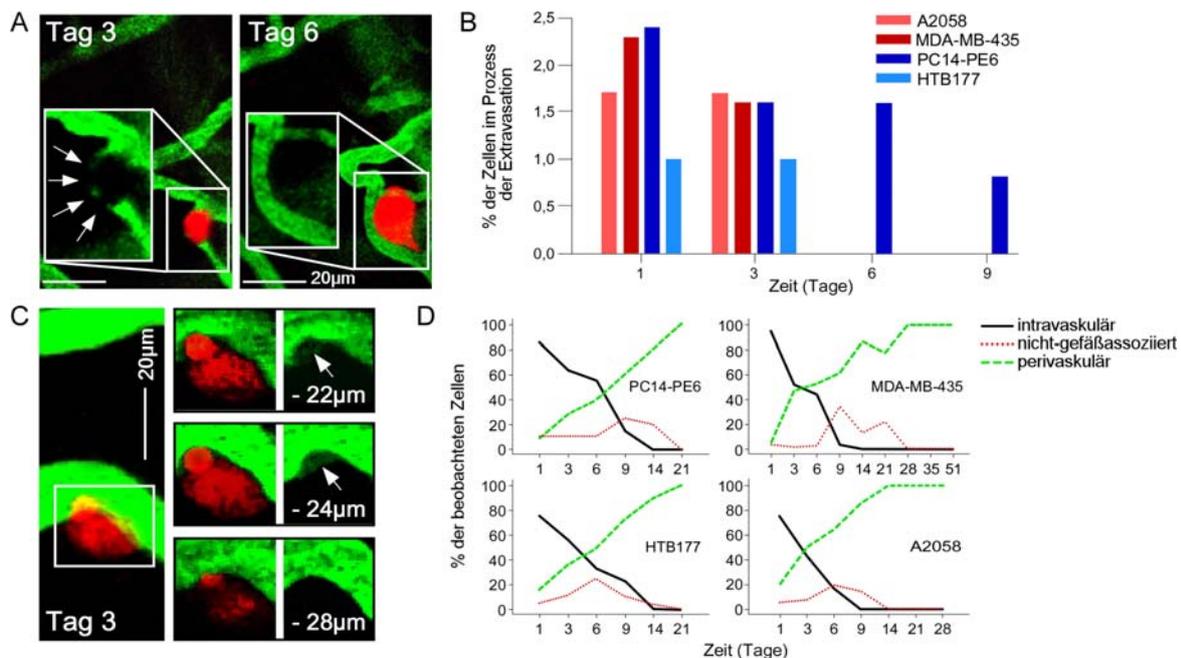


Abb. 25: Der zweite obligate Schritt der Hirnmetastasierung: Frühe Extravasation

(A) Extravasation: Eine MDA-MB-435-Melanomzelle, die an Tag 3 intravaskulär liegt (Pfeile; Vergrößerung zeigt nur das Angiogramm) hat an Tag 6 das Gefäßsystem verlassen und befindet sich extravaskulär (Tiefe 20–70 μm). (B) Anteil der Lungenkarzinomzellen (PC14-PP6 und HTB177) und Melanomzellen (MDA-MB-435 und A2058), die während des Prozesses der Extravasation im Zeitverlauf dargestellt werden konnten. (C) Prozess der Extravasation: Die Melanomzelle befindet sich schon größtenteils in einer extravaskulären Position; ein kleiner Teil (Pfeile) verbleibt intravaskulär. Man beachte die Abschnürung der Zelle im Bereich der Gefäßwand, wo die Zelle durch ein kleines Loch migrieren muss. Die Pfeile zeigen das durch die Zelle induzierte Loch in der Angiographie (Tiefe 20–30 μm). (D) Die Position von Tumorzellen im Verhältnis zu Blutgefäßen über die Zeit ($n = 124$ PC14-PE6, $n = 128$ MDA-MB-435, $n = 102$ HTB177, $n = 107$ A2048). Nach Tag 9 können keine Tumorzellen mehr intravaskulär detektiert werden. Auch alle extravasierten Zellen ohne direkten physikalischen Kontakt zu zerebralen Mikrogefäßen sterben.

Die Zellen, von denen während des Extravasationsprozesses 2-Photonen-Aufnahmen angefertigt wurden, zeigten einen intra- und einen extravaskulären Zellanteil mit einer charakteristischen Einschnürung an der Gefäßwand (**Abb. 25C**). Eine Zeitrafferaufnahme von diesen Zellen (A2058 Melanom) zeigte extravaskuläre Fortsätze, welche sich dynamisch vor- und zurück schoben (nicht gezeigtes Video). Tumorzellen, die eine intravaskuläre Position beibehielten, wurden entweder weiter mit dem Blutstrom verschleppt oder starben (**Abb. 25D**); eine Proliferation dieser Zellen zu einer größeren Metastase wurde niemals beobachtet. An Tag 14 waren alle überlebenden Melanomzellen (MDA-MB-435 und A2058) sowie alle Lungenkarzinomzellen (PC14-PE6 und HTB177) in das umgebende Gewebe extravasiert (**Abb. 25D**). Bemerkenswerterweise hatten alle Tumorzellen, die später erfolgreich zu Makrometastasen proliferieren sollten, bereits sehr früh (bis zu Tag 3) das Gefäß verlassen.

4.2.1.3 Der dritte obligate Schritt der Hirnmetastasierung: Beibehaltung einer strikt perivaskulären Position

Tumorzellen, die nach dem Verlassen des Gefäßes keinen engen Kontakt zur abluminalen Oberfläche der Blutgefäßwand ausbildeten, gingen über die Zeit zugrunde (**Abb. 25A**). Alle 4 untersuchten Tumorzell-Linien proliferierten nur dann erfolgreich zu einer Mikro- und Makrometastase, wenn ein direkter Kontakt zur Gefäßwand bzw. Endothelzelle der Gehirnkapillare in einer perizytenähnlichen Lokalisation aufrechterhalten wurde (**Abb. 26B–E**).

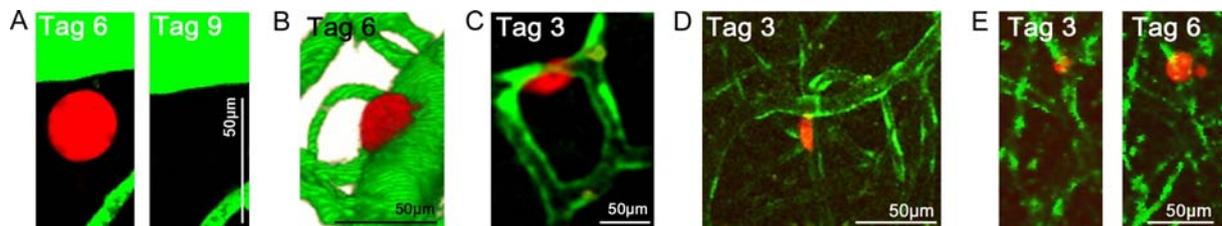


Abb. 26: Der dritte obligate Schritt der Hirnmetastasierung: Strikt perivaskuläre Position

(A) Regression einer extravasierten PC14-PE6-Lungenkarzinomzelle ohne engen Kontakt zu einem Mikrogefäß (Tiefe: 10–30 μm). (B) Eine extravasierte PC14-PE6 Lungenkarzinomzelle in einer typischen, perizytenartigen perivaskulären Position (3D-Rekonstruktion, Tiefe: 80–120 μm). (C) Eine A2058 Melanomzelle zeigt enge physikalische Interaktionen mit der abluminalen Seite von Endothelzellen (Tie2-GFP, grün; Tiefe: 80–150 μm). (D,E) HTB177 Lungenkarzinomzellen zeigen engen Kontakt zu der abluminalen Oberfläche der Endothelzellen nach der Extravasation an den Tagen 3 und 6 (Tiefe: 0–150 μm).

Allerdings nutzten nur die beiden Melanomzell-Linien zerebrale Mikrogefäße als Leitstrukturen für Invasion und Proliferation, wobei sie ihre typische rundliche Form in eine perivaskulär-längliche veränderten (**Abb. 27A–D**). Entlang ihrem Weg induzierten sie eine charakteristische Formveränderung der Gefäße, die schließlich zu kapillärer Schleifenbildung am Ort des Tumorzell-Gefäßkontaktes führte (**Abb. 27E;F**). Für invadierende Gliomzellen konnte eine morphologisch identische kapilläre Schleifenbildung gefunden werden (Winkler et al., 2009). Dieser Befund unterstützt einen generellen, neuen Mechanismus für die Bildung von vaskulären Glomeruloidkörpern im Gehirn, welche typisch für die Angiogenese von Hirnmetastasen sind (Dome et al., 2003).

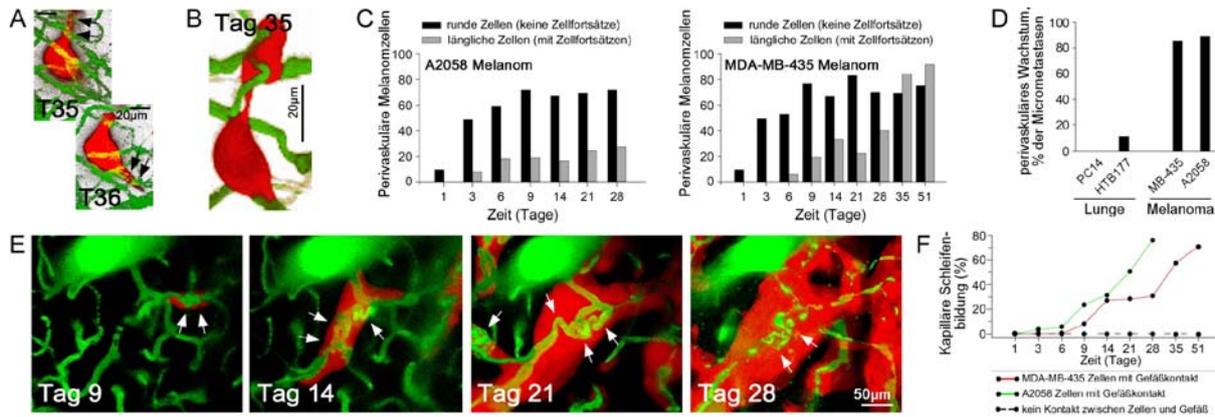


Abb. 27: Reziproke Interaktionen von metastasierenden Melanomzellen mit den Blutgefäßen des Gehirns

(A) Lamellipodium-ähnliche zelluläre Protusionen (Pfeile) werden von perivaskulär invadierenden MDA-MB-435 Melanomzellen entwickelt und verändern sich mit der Zeit (Tiefe: 80–150 µm). (B) MDA-MB-435-Melanomzellen invadieren und proliferieren entlang vorbestehender Mikrogefäße des Gehirns; einzelne Zellen zeigen eine Deformation mit longitudinaler Streckung entlang der Blutgefäße, wobei stets ein strenger Kontakt mit selbigen aufrecht erhalten wird (3D-Rekonstruktion, Tiefe 120–450 µm). (C) Häufigkeit perivaskulärer MDA-MB-435 und A2058-Melanomzellen mit sphärischer/rundlicher vs. longitudinaler/länglicher Formation über die Zeit. (D) Invasion und Proliferation entlang von zerebralen Gefäßen (Kooptation) tritt häufig bei Melanomzellen auf (MDA-MB-435, 12 von 14 Knoten in 4 Mäusen; A2058, 7 von 8 Knoten in 5 Mäusen), ist allerdings sehr selten bei Lungenkarzinomzellen (PC14-PE6, 0 von 15 Knoten in 6 Mäusen; HTB177, 1 von 11 Knoten in 5 Mäusen). (E) Vasculäre Veränderungen mit Bildung kapillärer Schleifen treten nur dort auf, wo Melanomzellen (hier: A2058) direkten Kontakt zu Hirngefäßen haben (Tiefe: 200–210 µm). (F) Quantifikation der kapillären Schleifenbildung im Zeitverlauf von zerebralen Mikrogefäßen mit Kontakt zu den Melanomzellen MDA-MB-435 (n = 128) und A2058 (n = 107) und ohne diesen Kontakt.

Die Verfolgung derselben metastasierenden Zellen über 28 Tage bestätigte, dass ein striktes Wachstum von Melanomzellen entlang vorbestehender Blutgefäße (Kooptation) über lange Zeiträume erfolgte (**Abb. 28; Abb. 27 D**). Kapilläre Schleifenbildung und Wachstum entlang von Gehirngefäßen konnten nicht bei Lungenkarzinomzellen (PC14-PE6, HTB177) beobachtet werden (**Abb. 27 D**). Die Ergebnisse legen nahe, dass extravasierte Tumorzellen physisch unmittelbar mit der Gefäßwand interagieren müssen, um im Hirnparenchym zu überleben.

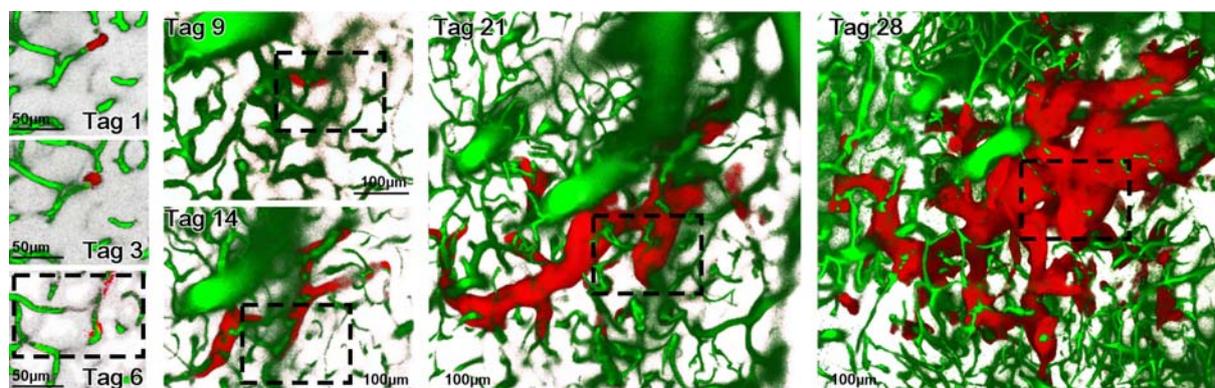


Abb. 28: Strikt perivaskuläre Proliferation einer A2058-Melanomzelle über 28 Tage

Die Melanomzelle verlässt an Tag 3 das Gefäß. Man beachte das ausschließliche Wachstum entlang von vorbestehenden Mikrogefäßen des Gehirns (kooptives Wachstum). Der schraffierte Kasten zeigt denselben Ausschnitt über die Zeit (3D-Rekonstruktionen, Tiefe 200–280 µm).

4.2.1.4 Der vierte obligate Schritt der Hirnmetastasierung: Wachstum zu einer Makrometastase durch Besatz bestehender Gefäße oder Angiogenese

Die Verfolgung individueller Tumorzellen *in vivo* ermöglichte es, die Strategien für die erfolgreiche Bildung wachsender Makrometastasen zu bestimmen (Abb. 29).

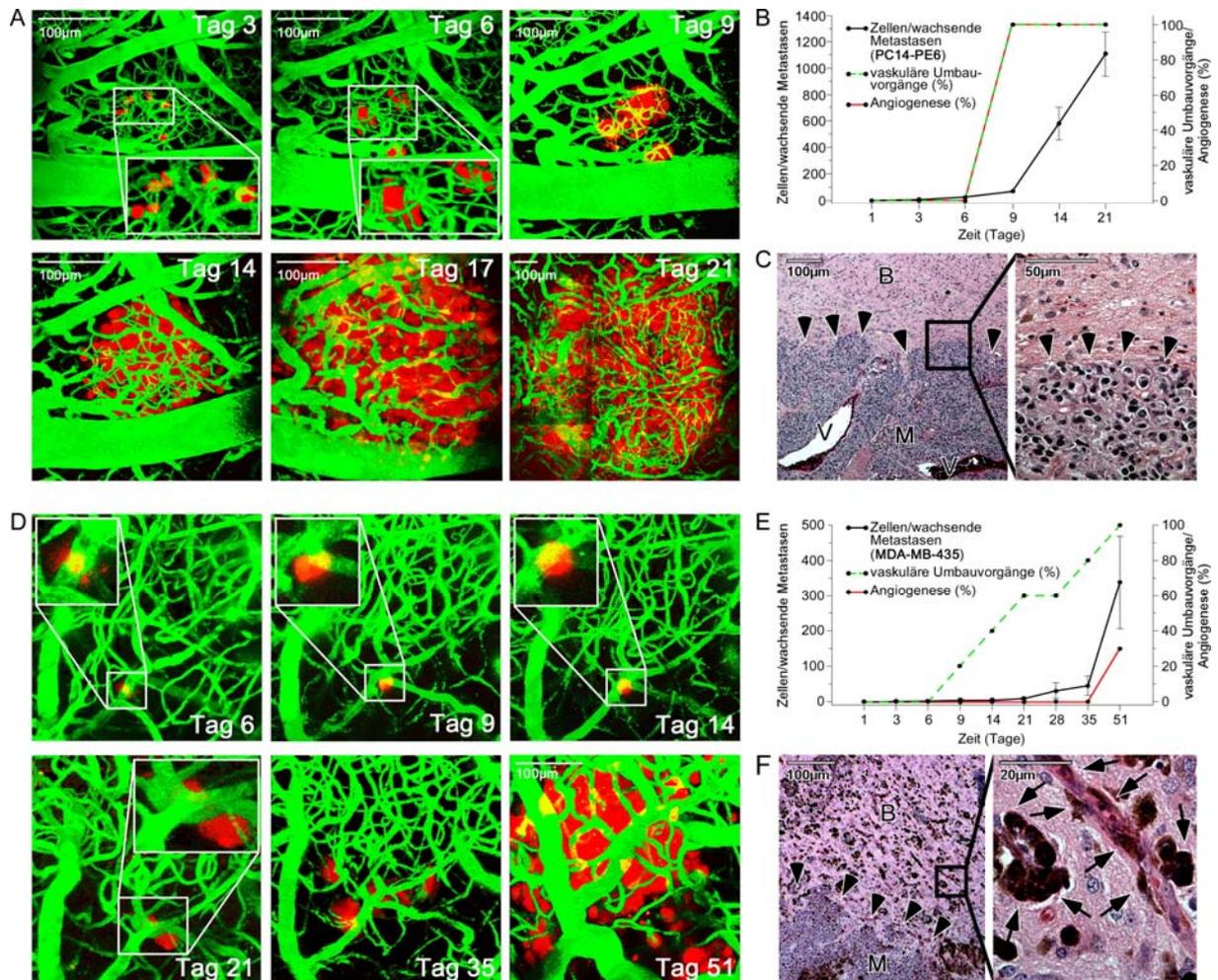


Abb. 29: Charakteristika erfolgreicher Makrometastasenbildung

(A) 5 Foci eng benachbarter extravasierter PC14-PE6 Lungenkarzinomzellen vereinen sich über die Zeit zu einer wachsenden Makrometastase im Gehirn. Man beachte die ausgeprägte Angiogenese von Tag 14 an und die parallel dazu auftretende rasche Größenzunahme der Metastase, die vom umgebenden Hirnparenchym klar demarkiert ist. Tiefe: 40–450 μm . (B) Proliferationskinetik erfolgreich metastasierender PC14-PE6 Lungenkarzinomzellen im Verhältnis zu Veränderungen des Gefäßsystems. Vaskuläre Umbauvorgänge („remodeling“; Dilatation, erhöhte Gewundenheit, allerdings ohne kapilläre Schleifenbildung) und Angiogenese (Bildung neuer Blutgefäße) treten frühzeitig zwischen Tag 6 und 9 auf und werden gefolgt von ungehindertem, raschem Metastasenwachstum. (C) Gehirnmetastase eines Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom. Man beachte die relativ scharfe Trennung zwischen Gehirnparenchym (B) und Makrometastase (M, Pfeilspitzen) und die starke Erweiterung einiger Tumorgefäße (V). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. (D) Eine einzelne MDA-MB-435-Melanomzelle bleibt vorübergehend ruhend ohne Zellteilung, in einer perivaskulären Position bis Tag 14 post injectionem. Sie nutzt vorbestehende Gefäße als Leitstruktur für die Proliferation (Kooption) zu einer Makrometastase. Eine Erweiterung vorbestehender Gefäße kann erst zu einem späten Zeitpunkt (Tag 51) beobachtet werden. Tiefe: 50–350 μm . (E) MDA-MB-435 Melanomzellen induzieren frühzeitig vaskuläre Umbauvorgänge inklusive kapillärer Schleifenbildung. Angiogenese wird selten beobachtet, und dann spät. Melanommetastasen wachsen insgesamt langsamer. (F) Gehirnmetastasen eines Melanom-Patienten. Die Metastase (Pfeilspitzen) ist sehr viel schlechter vom Hirnparenchym abgegrenzt, da Verbände von Tumorzellen (Pfeile, braun durch Melaninexpression) in perivaskulärer Position im angrenzenden Gehirn zu finden sind.

Die Verfolgung von individuellen Tumorzellen mittels *in vivo*-Echtzeitbildgebung ermöglichte es schließlich, die Strategien für die erfolgreiche Bildung wachsender Makrometastasen zu bestimmen. Lungenkarzinomzellen bildeten Makrometastasen durch die Proliferation separater Zellhaufen in enger Nähe zueinander (**Abb. 29A**). Das simultane Wachstum und die sich anschließende Fusion der einzelnen Foci ermöglichte es dem metastatischen Zellhaufen, einen kritischen Durchmesser (147 μm in PC14-PE6, 195 μm in HTB177) zu überschreiten, was stets zu deutlichen Gefäßveränderungen (Dilatation, Gewundenheit) führte, kurz danach gefolgt von Angiogenese, die in eine Phase sehr raschen und ungehinderten Wachstums mündete (**Abb. 29B**). Die histologische Analyse von Hirnmetastasen von Lungenkarzinom-Patienten bestätigte, dass eine ausgeprägte Angiogenese und geringe Infiltration des Normalhirns auch in menschlichem Gehirngewebe gefunden werden kann (**Abb. 29C**). Im Gegensatz dazu resultierte das Wachstum von Melanomzellen zu Makrometastasen aus starken, wechselseitigen Interaktionen mit vorbestehenden Hirngefäßen. Typischerweise proliferierten einzelne Zellen entlang von Mikrogefäßen, oft nach einer transienten Ruheperiode von bis zu 21 Tagen nach der Injektion; die resultierenden Melanometastasen waren also klonal (**Abb. 29D**). Angiogenese trat nur gelegentlich auf, und nur dann, wenn sich Makrometastasen bereits gebildet hatten (durchschnittlicher Gefäßdurchmesser: MDA-MB-435 382 μm ; A2058 548 μm ; **Abb. 29D;E**). Der typische Gefäßbesatz von Tumorzellen kann ebenfalls in menschlichen Melanometastasen im Gehirn gefunden werden (**Abb. 29F**).

4.2.2 Metastatische Ineffizienz durch Mangel an Blutgefäßinteraktionen

Auch wenn extravasierte Lungenkarzinomzellen es schafften, initial zu proliferieren (bis Tag 9 in **Abb. 30A**), gingen sie dennoch überall dort zugrunde, wo Angiogenese nicht initiiert wurde (**Abb. 30A**).

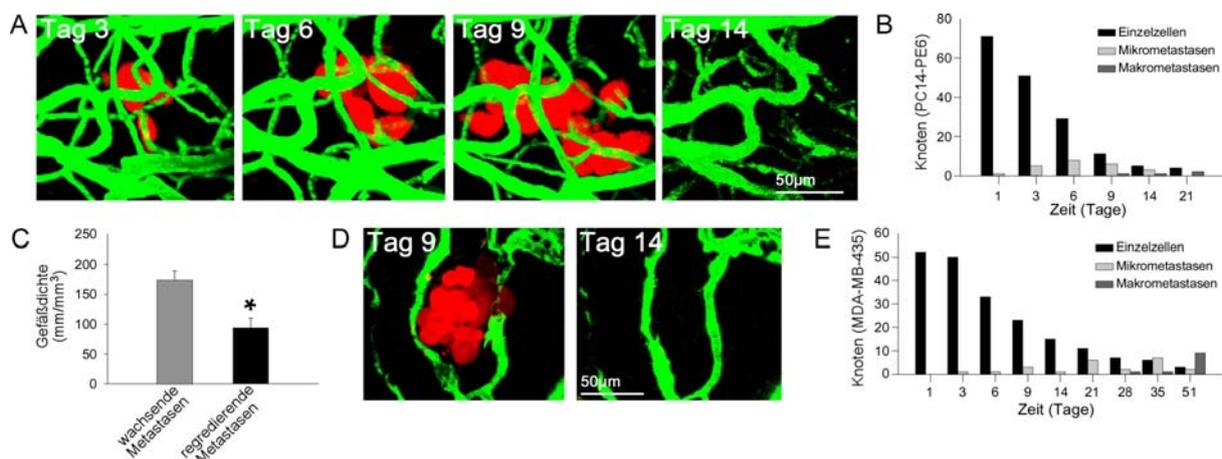


Abb. 30: Charakteristika erfolgloser Makrometastasenbildung

(A) Extravasierte PC14-PE6 Lungenkarzinomzellen proliferieren und bilden bis Tag 9 eine Mikrometastase, die an Tag 14 verschwunden ist. Man beachte das Fehlen von Gefäßveränderungen während der Proliferation (Tiefe: 0–100 μm). (B) Zeitverlauf der Entwicklung von Mikrometastasen (4–50 Zellen) und Makrometastasen (<50 Zellen) von einzelnen extravasierten PC14-PE6 Lungenkarzinomzellen. (C) Wachstum oder endgültiger Untergang von Melanom-Mikrometastasen werden bestimmt von der Gefäßdichte (mm/mm^3) der Hirnregion ($n = 8$ Metastasen pro Gruppe; $P = 0,003$). (D) Beispiel der Regression einer MDA-MB-435-Mikrometastase in einer Region schlechter Vaskularisierung (Tiefe 0–100 μm). (E) Zeitverlauf der Entwicklung von Mikrometastasen und Makrometastasen von MDA-MB-435-Melanomzellen.

Die Quantifizierung von Zellzahlen über die Zeit zeigte, dass keine PC14-PE6 Lungenkarzinom-Mikrometastasen (4–50 Zellen) nach Tag 14 mehr detektiert werden konnten, während die Zahl von Makrometastasen (< 50 Zellen) nach Tag 9 anstieg (**Abb. 30B**). Bei metastasierenden MDA-MB-435-Melanomzellen waren solche Zellen, die initial wuchsen, aber später zugrunde gingen, in Regionen besonders geringer Gefäßdichte lokalisiert (**Abb. 30C;D**). A2058-Melanomzellen zeigten einen ähnlichen Trend (nicht gezeigt). Dies legt nahe, dass die Abwesenheit einer kritischen Anzahl vorbestehender Blutgefäße, die als Leitstrukturen für Migration und Proliferation dienen können, hinderlich für das Wachstum zu einer Melanommakrometastase ist. Das Wachstum zu einer Makrometastase durch perivaskuläre Proliferation dauerte ohnehin vergleichsweise lange, bis Tag 51 post injectionem (**Abb. 30E**).

4.2.3 Ein Ruhezustand von Tumorzellen („dormancy“) ist strikt perivaskulär und teilweise dynamisch

Die Möglichkeit, individuelle metastasierende Tumorzellen über viele Wochen zu verfolgen, erlaubte die Identifikation einer kleinen Fraktion von vitalen Zellen, die während des Experimentes nicht proliferierten. Von $n > 100$ Zellen in jeder der 4 Zell-Linien blieben 4,0% (PC14-PE6; 6 Zellen in 4 Mäusen), 3,1% (MDA-MB-435; 4 Zellen in 3 Mäusen) und 0% (HTB177, A2058) in einem chronischen Ruhezustand von bis zu 51 Tagen. Alle diese Zellen waren Einzelzellen oder kleine Gruppen von bis zu drei Zellen in einer strikt perivaskulären Position. Bemerkenswerterweise zeigten MDA-MB-435-Melanomzellen während dieses Latenzzustandes eine hohe Motilität im Gehirn und invadierten entlang präexistierender Blutgefäße (**Abb. 31A**). PC14-PE6-Lungenkarzinomzellen behielten ebenfalls eine enge Verbindung zu Hirngefäßen während des chronischen Ruhezustandes, Bewegung konnte allerdings nicht beobachtet werden (**Abb. 31B**).

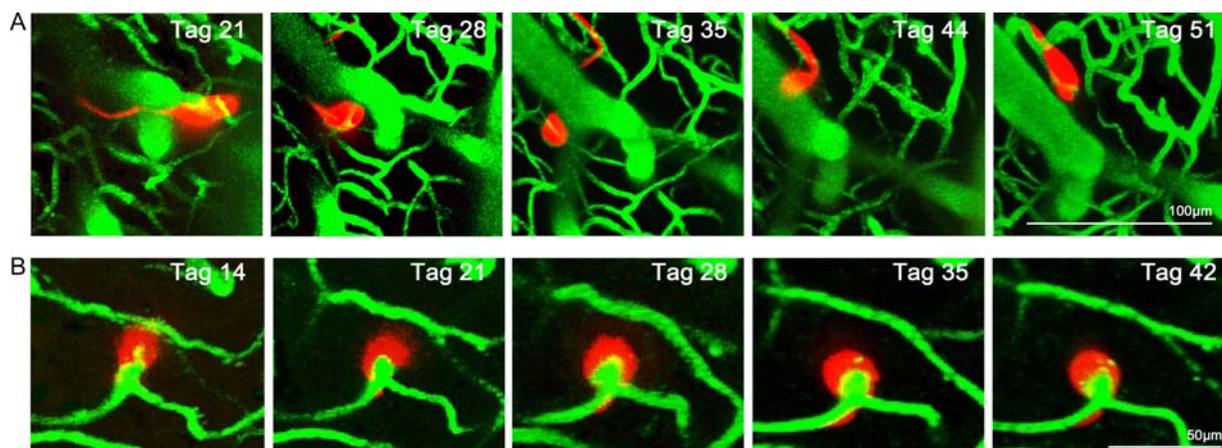


Abb. 31: Chronischer Latenzzustand von Einzelzellen ohne Proliferation („Dormancy“)

Durch *in vivo* 2PLSM konnte in dieser Studie erstmal ein Zustand langfristiger Persistenz ohne Proliferation der Tumorzellen („Dormancy“) über viele Wochen verfolgt werden. „Dormancy“ von Tumorzellen wurde nur perivaskulär beobachtet, und mit einem Maximum von 3 Zellen. (A) 2–3 MDA-MB-435-Zellen bewegen sich entlang von zerebralen Blutgefäßen in 3 Dimensionen über eine Distanz von 150 μm , proliferieren aber nicht. Dargestellt ist ein Zeitraum von 30 Tagen. Der Bildausschnitt verändert sich über die Zeit etwas, um die migrierende Zelle darzustellen. Tiefe: 80–230 μm . (B) Eine PC14-PE6 Lungenkarzinomzelle im chronischen Latenzzustand ohne Proliferation mit engem Kontakt zu Mikrogefäßen bleibt statisch. Tiefe: 160–210 μm .

Größere Mikro- oder Makrometastasen verblieben niemals in einem Ruhezustand, sondern zeigten stets entweder Proliferation oder Regression im Zeitverlauf.

4.2.4 Obligate, ineffiziente und deletäre Schritte der Hirnmetastasierung

Durch die Verfolgung des Schicksals von zwei metastasierenden Melanomzell- und zwei Lungenkarzinomzell-Linien über viele Wochen bis Monate war es möglich, die obligaten und ineffizienten Schritte der späten metastatischen Kaskade für unser Modell zu bestimmen (**Abb. 32**). Für jede Zelle oder jeden proliferierenden metastasierenden Zellhaufen konnte die Wahrscheinlichkeit einer weiteren Proliferation und die des Erreichens eines nächsten Schrittes der Kaskade bestimmt werden, abhängig von anatomischer Position und biologischem Verhalten der Zelle. Die ineffizienten Schritte waren hinsichtlich der Tumortypen unterschiedlich: Während Lungenkarzinomzellen am ineffizientesten von Mikro- zu Makrometastasen wuchsen (**Abb. 32**), proliferierten Melanomzellen am ineffizientesten von perivaskulären Zellen zu Mikrometastasen durch Gefäßbesatz (**Abb. 30**).

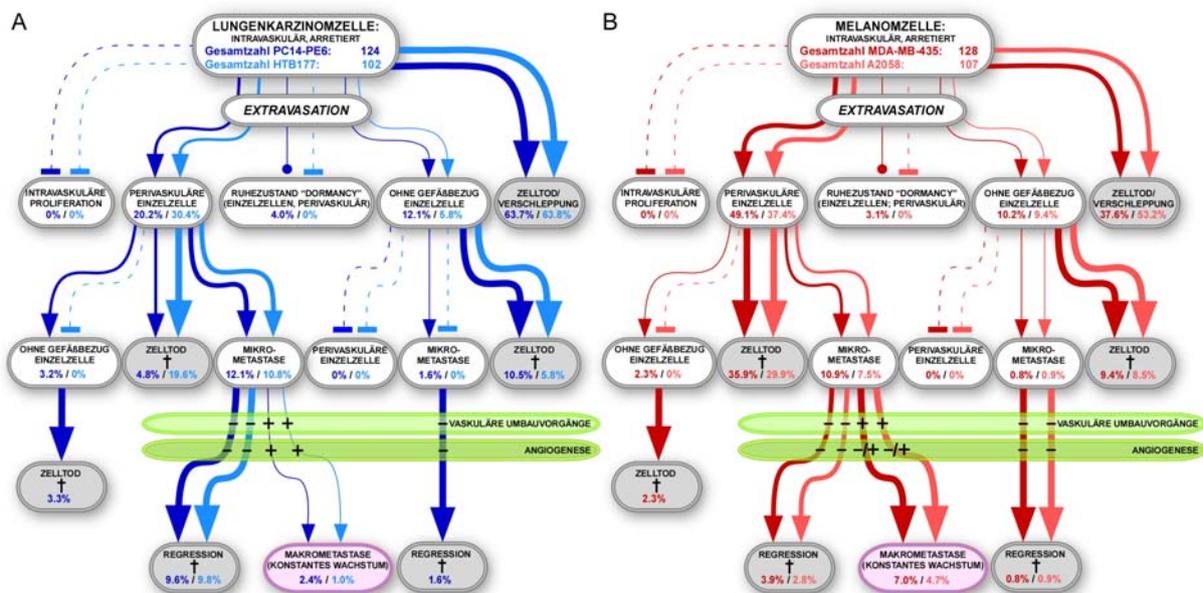


Abb. 32: Die obligaten und ineffizienten Schritte der Hirnmetastasierung, die Sackgassen und der „Weg zum Erfolg“

Das Schicksal einzelner PC14-PE6 und HTB177-Lungenkarzinomzellen (A) und MDA-MB-435 und A2058-Melanomzellen (B) nach Injektion in die Arteria carotis interna wurde über viele Wochen im Maushirn mittels *in vivo* 2PLSM verfolgt. Durch die Quantifizierung der Häufigkeit aller aufeinanderfolgenden Schritte ist es möglich, die obligaten, erfolglosen und ineffizienten Schritte der Hirnmetastasierung zu identifizieren. Nur eine kleine Fraktion metastasierender Zellen kann alle Schritte der späten metastatischen Kaskade erfolgreich absolvieren und eine Makrometastase bilden. Nur solche Zellen wurden als ruhend, also in einem langfristig persistierenden Latenzzustand ohne Proliferation („Dormancy“) bezeichnet, die bis zum Ende des Experiments nicht proliferierten; alle diese Zellen lagen strikt perivaskulär, Krebszellen ohne Gefäßkontakt („ohne Gefäßbezug“) wiesen eine messbare Distanz zum nächsten Blutgefäß in allen 3 Dimensionen auf. Mikrometastasen: 4–50 Zellen; Makrometastasen: >50 Zellen. Signifikante statistische Unterschiede zwischen den Wahrscheinlichkeiten des Erreichens eines nächsten Schrittes dieser Kaskaden bestehen nicht für beide Zell-Linien desselben Tumortyps, wohl aber für die beiden Tumortypen für alle obligaten Schritte (intravaskuläre – perivaskuläre Zelle, $P < 0,001$, Chi Quadrat; perivaskuläre Zelle – Mikrometastase, $p = 0,003$, Chi Quadrat; Mikrometastase – Makrometastase, $P < 0,001$, Fisher Exakt Test).

Die vier obligaten Schritte erfolgreicher Hirnmetastasierung wurden oben aufgeführt und waren identisch für alle vier Zell-Linien (**Abb. 33**). Sackgassen waren: (1) Beibehaltung einer intravaskulären Position; (2) Fehlen einer engen Lagebeziehung zu Mikrogefäßen des Gehirns, entweder direkt nach Extravasation oder im Verlauf; und (3) Ausbleiben vaskulärer Veränderungen während der Metastasierung.

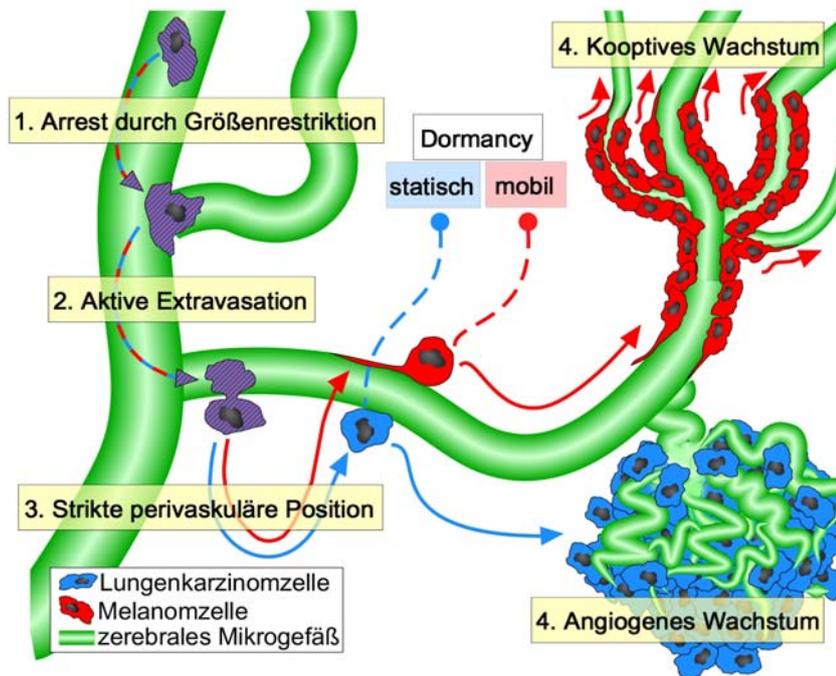


Abb. 33: Die obligaten Schritte der Hirnmetastasierung

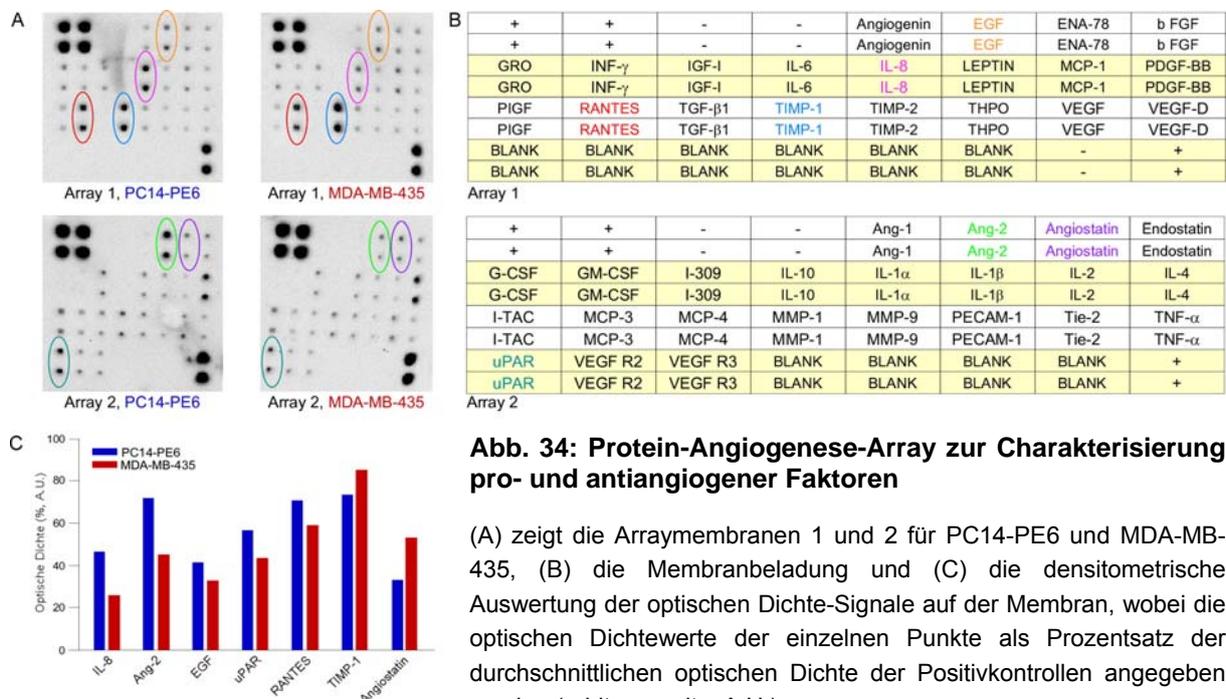
Schematische Zusammenfassung der obligaten Schritte der Hirnmetastasierung von Lungenkarzinom- und Melanomzellen

Zusammenfassend ergeben sich daraus folgende Schlussfolgerungen:

- Es ist nun erstmals in einem Tiermodell der Metastasenbildung möglich, einzelne Tumorzellen über lange Zeiträume zu verfolgen und damit die obligaten, effizienten und erfolglosen Schritte der Hirnmetastasierung zu identifizieren.
- Es wurden vier obligate Schritte der Hirnmetastasierung identifiziert, die für alle untersuchten Zell-Linien gleich waren, deren Effizienz sich aber zwischen den Tumortypen unterschied. Diese Information erleichtert die Selektion bestimmter Schritte für Studien zur Prophylaxe und Therapie der Hirnmetastasierung.

4.3 Auswirkung einer VEGF-Inhibition auf die Hirnmetastasierung

In einem nächsten Schritt wollten wir die molekularen Unterschiede zwischen zwei Zell-Linien, PC14-PE6 (Lungenkarzinom) und MDA-MB-435 (Melanom) bezüglich der Bildung angiogener Faktoren genauer charakterisieren. Als Initialversuche wurden zunächst Protein-Angiogenese-Arrays durchgeführt (**Abb. 34A**), durch welche ein Überblick über die Sekretionsspiegel spezifischer angiogener und antiangiogener Faktoren ermittelt werden kann (**Abb. 34B**). Durch vergleichende Untersuchungen war es möglich, Konzentrationsunterschiede semiquantitativ zu bestimmen (**Abb. 34C**). Es wurden mehr pro-angiogene Faktoren beim Lungenkarzinom (PC14-PE6; Ang-2, EGF, RANTES, uPAR und IL-8) und mehr anti-angiogene Faktoren beim Melanom (MDA-MB-435; TIMP-1 und Angiostatin) differentiell exprimiert. (**Abb. 34C**). Dies kann als Erklärung für die vorherigen *in vivo*-Befunde dienen, die eine stärker ausgeprägte Angiogenese beim Lungenkarzinom zeigten. Bei der Interpretation dieser Proteindaten muss allerdings folgendes berücksichtigt werden: (1.) Die Helligkeit der Signale sagt nichts aus über die absolute Proteinmenge, da die Bindungsaffinitäten der verschiedenen Antikörper stark variieren, es können also nur (2.) zwei Gruppen (hier: zwei Zell-Linien) verglichen und relative Unterschiede festgestellt werden. (3.) Auch die absolute Proteinmenge sagt noch nichts über eine biologische Bedeutung aus: Es gibt Proteine, die in sehr niedriger Konzentration enorme Effekte in der Zelle auslösen können (z.B. die verschiedenen Rezeptoren und VEGF – letzteres im Array unter der Detektionsgrenze), und andere, die das nicht tun. (4.) Die Validierung der Ergebnisse durch quantitative PCR und Western Blot steht daher noch aus.



Für das weitere Vorgehen entschieden wir uns daher zunächst für die Untersuchung eines zentralen angiogenen Faktors, VEGF-A, um die Relevanz der Blutgefäß-Interaktionen für die Hirnmetastasierung von malignen Zellen zu bestätigen und die beteiligten molekularen Mechanismen besser zu verstehen. Wir inhibierten VEGF-A mittels Bevacizumab.

Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der ausschließlich humanes (nicht aber murines) VEGF-A inhibiert (Yu et al., 2008); wir konnten damit spezifisch die Bedeutung von Tumorzell-gebildetem VEGF-A für die Prozesse der Hirnmetastasierung untersuchen. Bevacizumab ist, wie in der Einleitung ausgeführt, mittlerweile für die Behandlung des Lungen-, Brust- und Kolonkarzinoms zugelassen und befindet sich in intensiver Erprobung für das Glioblastom. Auch in präklinischen Tumorexograft-Modellen wird die Substanz zunehmend für die Inhibition von humanem VEGF-A eingesetzt (Dickson et al., 2007; Xue et al., 2008; Eikesdal et al., 2008). Lungenkarzinomzellen PC14-PE6, nicht aber MDA-MB-435-Melanomzellen, exprimierten konstitutiv (also auch bei Normoxie) das VEGF-A-Protein (**Abb. 35A**) und steigerten die Expression *in vivo* während der Proliferation zu einer Makrometastase (**Abb. 35B**). Die Proliferation beider Zell-Linien wurde *in vitro* von Bevacizumab nicht beeinflusst (**Abb. 35C**).

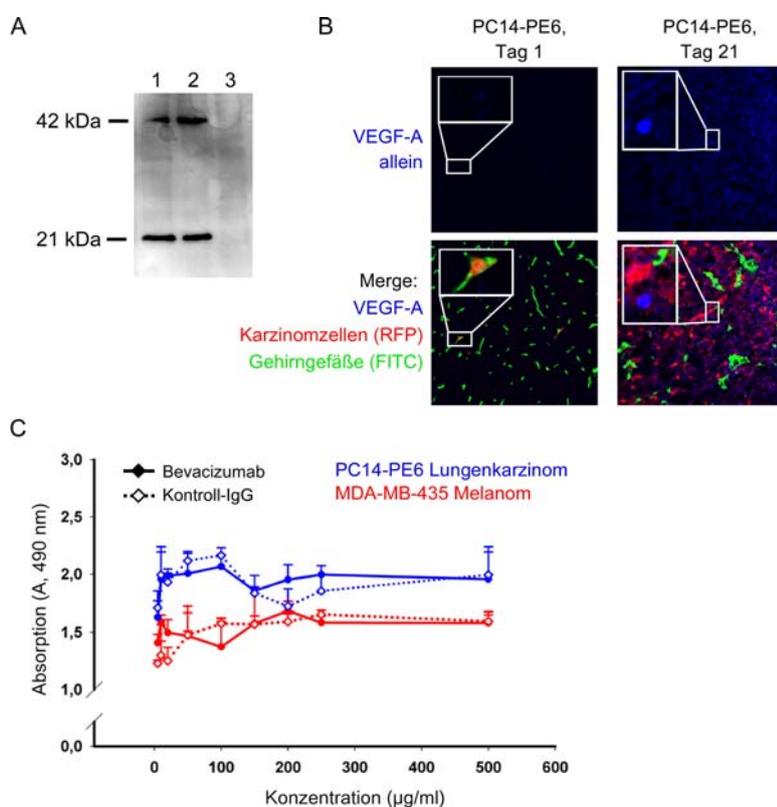


Abb. 35: VEGF-Expression von Krebszellen *in vitro* und *in vivo* und *in vitro*-Effekte v. Bevacizumab

(A) Western Blot-Analyse der VEGF-A Expression unter Normoxie (1: humane U87 Gliomzellen, Positivkontrolle; 2: PC14-PE6 Lungenkarzinomzellen; 3: MDA-MB-435 Melanomzellen). (B) Immunofluoreszenzbilder von Hirnschnitten mit metastasierenden PC14-PE6 Zellen (RFP, rot), Blutgefäßen (FITC lectin, grün) und VEGF-A Protein (blau). (C) Bevacizumab hat keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen *in vitro*.

Die Bevacizumab-Therapie verminderte die Zahl der Blutgefäße in großen, etablierten PC14-PE6-Hirnmetastasen, was von einer Tumorzellregression begleitet wurde (**Abb. 36**). Dies spricht für eine therapeutische Wirksamkeit der antiangiogenen Substanz in solchen Makrometastasen, die relevante Mengen von VEGF-A bilden.

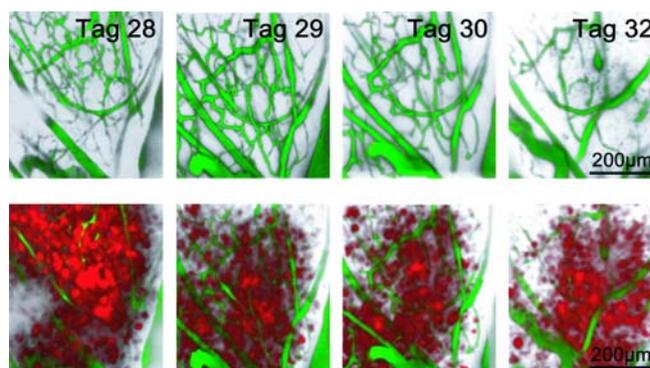


Abb. 36: Bevacizumab-Therapie von Makrometastasen

In vivo 2PLSM derselben Tumorregion: Gefäßangiogramme (grün, FITC-Dextran, oben) und eine 1 mm große Makrometastase aus PC14-PE6 Lungenkarzinomzellen (rot, unten in Überlagerung mit Angiogramm). Die Bevacizumab-Therapie wurde an Tag 28 begonnen mit 15 mg/kg KG alle 2 Tage.

Wir nutzen nun die Möglichkeiten unseres neu entwickelten Tiermodells, um die Auswirkung einer Bevacizumab-Therapie, die einen Tag nach Tumorzellinjektion „prophylaktisch“ verabreicht wurde, auf die einzelnen Schritte der Hirnmetastasierung zu untersuchen. Bevacizumab inhibierte die Bildung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese) während der Evolution von Lungenkarzinom-Hirnmetastasen, was Mikrometastasen an der weiteren Proliferation hinderte (**Abb. 37A**).

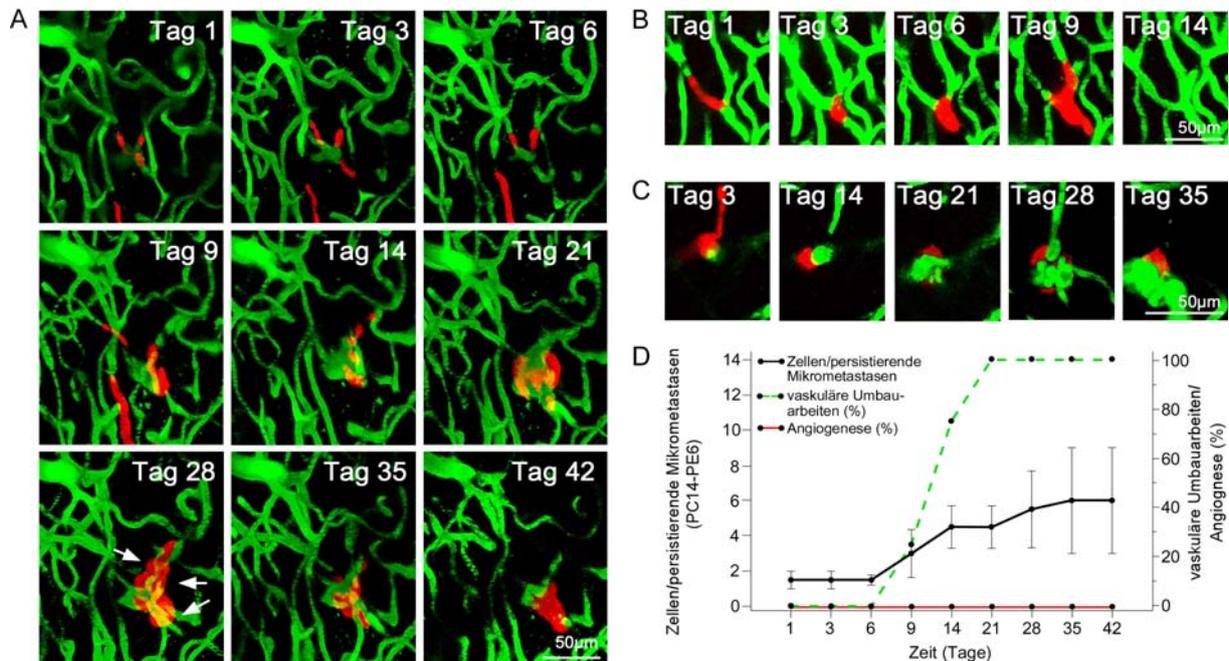


Abb. 37: Effekte einer VEGF-A-Inhibition durch Bevacizumab

Einen Tag nach der Injektion von PC14-PE6-Lungenkarzinomzellen wurde mit einer Bevacizumab-Therapie (15 mg/kg KG alle 2 Tage) begonnen. Bevacizumab inhibiert humanes, also hier ausschließlich Tumorzellgebildetes VEGF-A. (A) Die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) wird durch Bevacizumab vollständig unterdrückt. Stattdessen persistieren die Tumorzellen in einem chronischen Ruhezustand („Dormancy“) als Mikrometastasen von wenigen perivaskulären Zellen über lange Zeiträume. Tiefe 100–170 μm . (B) Unter Bevacizumab-Therapie wurde erstmals intravaskuläre Proliferation von malignen Zellen beobachtet; diese führte jedoch niemals zu erfolgreich wachsenden Metastasen, sondern stets zu Zerstörung oder Verschleppung der Zellen im Zeitverlauf (Tiefe: 60–100 μm). (C) Kapilläre Schleifenbildung tritt beim Lungenkarzinom erstmalig unter Bevacizumab-Therapie am Ort des Kontaktes von Lungenkarzinomzellen mit Mikrogefäßen des Gehirns auf (Tiefe: 240–300 μm). (D) Proliferationskinetik von metastasierenden PC14-PE6 Lungenkarzinomzellen während der Bevacizumab-Behandlung. Man beachte den Arrest der Proliferation, das Fehlen von Angiogenese und das ungehinderte Auftreten von vaskulären Umgestaltungen („remodeling“), zum ersten Mal kann auch kapilläre Schleifenbildung beobachtet werden. Unbehandelte Zellen weisen eine vollkommen andere Kinetik auf; sie wachsen sehr rasch zu großen Makrometastasen bei frühzeitiger Angiogenese, wie in Abbildung 27 A und B gezeigt.

Kleine Mikrometastasen wurden dadurch während der Therapiedauer in einem chronischen Ruhezustand („dormancy“) gehalten. Weiterhin begannen Lungenkarzinomzellen intravaskulär zu proliferieren (**Abb. 37B**), was in unbehandelten oder IgG-behandelten Kontrollen niemals beobachtet wurde. Schließlich gab es eine komplette Veränderung der Gefäßinteraktionen der Lungenkarzinomzellen unter VEGF-A-Inhibition: Erstmals wurde eine ausgedehnte kapilläre Schleifenbildung beobachtet (**Abb. 37C**), die bisher nur von den (kaum VEGF-exprimierenden) Melanomzellen bekannt war (vgl. **Abb. 27E**). Das Wachstumsmuster von MDA-MB-435-Melanomzellen und dessen Gefäßinteraktionen

(inklusive perivaskulärem Wachstum und kapillärer Schleifenbildung) wurden durch VEGF-A-Inhibition nicht beeinflusst. Schließlich wurde das Schicksal von mehr als 150 metastasierenden PC14-PE6 Karzinomzellen in IgG- vs. Bevacizumab-behandelten Tieren verglichen. Diese Quantifizierung bestätigte, dass die prophylaktische Wirkung von Bevacizumab tatsächlich primär auf die Induktion eines Ruhezustandes von Mikrometastasen durch Verhinderung der Angiogenese beschränkt war, so dass Makrometastasen nicht entstehen konnten (**Abb. 37D; Abb. 38**).

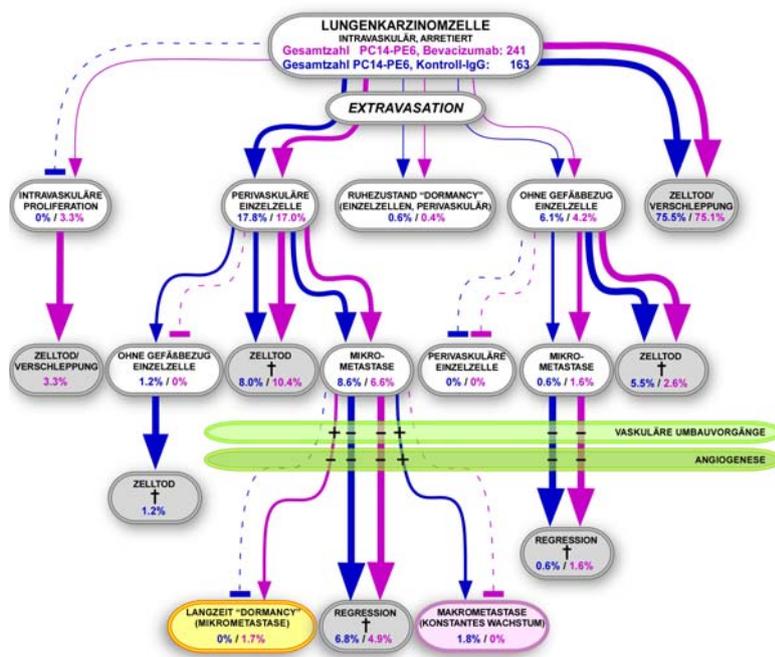


Abb. 38: Bevacizumab- vs. Kontroll-IgG-Therapie (Lungenkarzinom; Quantifizierung)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen treten nur bei den letzten Schritten auf (Makrometastasenbildung vs. chronischer Ruhezustand von Mikrometastasen „Langzeit Dormancy“; $P = 0,029$, Fisher Exact Test). Auch wenn erstmals intravaskuläre Proliferation unter Bevacizumab-Therapie auftritt, ist dies nicht als Hinweis auf eine signifikante Inhibition der Extravasation zu werten: Die Extravasationsraten sind identisch in beiden Gruppen.

Zusammenfassend ergeben sich daraus folgende Schlussfolgerungen:

- Die frühe Angiogenese in der Kaskade der Hirnmetastasierung von Lungenkarzinomzellen ist VEGF-A-abhängig und obligat für deren sehr rasches Wachstum zu Makrometastasen.
- Die Bildung von kapillären Schleifen und später Glomeruloidkörpern ist VEGF-A unabhängig.
- Bevacizumab verhindert die Bildung von Makrometastasen durch die spezifische Induktion eines langfristigen Ruhezustandes von Mikrometastasen; dies spricht für ein prophylaktisches Potential der Substanz, könnte aber problematisch sein hinsichtlich einer Beendigung der Therapie.
- Das neu entwickelte Tiermodell erlaubt die separate Untersuchung der Wirksamkeit auf jeden relevanten Prozess der Hirnmetastasierung. Dies erweitert die Möglichkeiten präklinischer pharmakologischer Untersuchungen.

5 Diskussion

5.1 Ein neues Tiermodell für die Neuroonkologische Forschung

Die Metastasierung ist eine der Haupttodesursachen von Tumorpatienten. Daher ist die Aufklärung der hierbei zugrunde liegenden Mechanismen von sehr großer Bedeutung für das Verständnis von Tumorleiden und die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, die eine Metastasierung verhindern oder stoppen können. Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, zum Verständnis wichtiger Mechanismen der Hirnmetastasierung beizutragen. Das selbständig entwickelte Tiermodell ermöglichte es uns, vormals nicht sichtbare Mechanismen der Hirnmetastasierung aufzudecken und neue Einsichten zu gewinnen. Durch mikroskopische Verfolgung derselben Tumorzelle(n) über viele Wochen in ihrer räumlichen Beziehung zu perfundierten Gefäßen und Endothelzellen konnten die obligaten, ineffizienten und erfolglosen zellulären Prozesse der Hirnmetastasierung studiert und quantifiziert werden. Dies gelang bisher in keinem Modell auf mikroskopischer Ebene und stellte daher seit langem eine Herausforderung in der Metastasenforschung dar (Palmieri et al., 2007; Townson and Chambers, 2006). Es konnten vier obligate Prozesse der Hirnmetastasierung identifiziert werden, wobei die ersten drei (Arrest durch Größenrestriktion in Gefäßgabeln; aktive und frühe Extravasation; Beibehaltung einer strikt perivaskulären Lage) für alle Zell-Linien identisch waren und der vierte für Lungenkarzinomzellen (frühe Angiogenese) und Melanomzellen (prolongiertes Wachstum entlang bestehender Hirngefäße durch Kooption) unterschiedlich war. Deletär für die Zellen war eine Beibehaltung einer intravaskulären Position für einen Zeitraum von mehr als 9 Tagen, ein Verlust des direkten Gefäßkontaktes zu irgendeinem Zeitpunkt und eine Unfähigkeit zur Angiogenese oder zum Wachstum entlang bestehender Gefäße. Die effizienten und ineffizienten Einzelschritte der Hirnmetastasierung waren vergleichbar für die Zell-Linien einer Tumorentität, unterschieden sich allerdings von Tumortyp zu Tumortyp und traten auf jeder Stufe der Hirnmetastasierung auf. Weiterhin konnte die Rolle der klinisch sehr relevanten „dormancy“ von metastasierenden Zellen oder Zellhaufen neu beleuchtet werden. Im Sinne eines „proof or principle“ konnte, unter Validierung des neuen Tiermodells, die Wirkung einer chronischen Bevacizumab-Therapie auf die einzelnen Schritte der Hirnmetastasierung untersucht werden.

5.1.1 Vorteile und Nachteile des Tiermodells

Das neue Tiermodell, das im Rahmen dieser Dissertation etabliert wurde, weist folgende Vorteile auf:

- Es ist minimal invasiv und sensitiv für Einzelzellen.
- Es kann die metastatische Verteilung im zerebralen Kortex während aller Stadien bestimmen.
- Es kann zwischen ruhenden, regredierenden und proliferierenden Zellen unterscheiden.
- Es zeigt zu allen Zeitpunkten die Lagebeziehung von Tumorzellen und Wirtsgefäßen.
- Es ermöglicht, das Wachstum individueller Einzelzellen bis zu einem großen Tumor über Wochen zu verfolgen und zu quantifizieren.

Die intracarotidale Injektion umgeht zwar die initialen Schritte der Metastasierung (Separation vom Primärtumor, Invasion, Eintritt in den Blutstrom) im Prozess der Hirnmetastasierung, aber alle nachfolgenden Schritte, wie Arrest, Extravasation, Wachstum und Angiogenese konnten im Tiermodell beobachtet werden. Durch das Fehlen eines Primärtumors konnten wir keine Aussage treffen über die Bedeutung einer kontinuierlichen Invasion von Tumorzellen in den Blutkreislauf und Dissemination in das Gehirn. Ein derartiges spontanes Hirnmetastasenmodell wäre allerdings aufgrund einer zu geringen Anzahl von Tumorzellen im mikroskopierbaren Bereich des kraniellen Fensters für unsere Zwecke unbrauchbar. Nachteile des Modells ergeben sich aufgrund des anspruchsvollen experimentellen Aufbaus der Versuche, da dadurch bedingt nur ein Teil aller injizierten Tiere im Zeitverlauf verfolgt werden kann (im Durchschnitt 30%). Aufgrund der Verwendung humaner Tumorzellen entschieden wir uns für ein Nacktmausmodell, welches einen idealen Wirt für homologe und xenogene Transplantationen darstellt. Ein syngenes Tiermodell bietet zwar ein intaktes Immunsystem des Tumorzellwirtes, besitzt allerdings Einschränkungen aufgrund schlechter optischer Eigenschaften des kraniellen Fensters, hervorgerufen durch Entzündungsvorgänge. Darüber hinaus konnten bisher Blutgefäße (grün, FITC-Dextran) und Endothelzellen (grün, GEP Tie2) in ihrer Interaktion mit Tumorzellen untersucht werden, nicht jedoch die vielschichtige Biologie des Nervengewebes und Hirnparenchyms. Durch die Verwendung weiterer transgener Tiere mit fluoreszierenden Gehirnstrukturen (Perizyten, Mikroglia, Neuronen) kann allerdings zukünftig unter Anwendung unseres neuen Tiermodells weiteren Fragen diesbezüglich nachgegangen werden.

5.2 Organotropie durch initialen Arrest?

Mittels *in vivo* 2-Photonen-Mikroskopie konnten Carotis-injizierte Tumorzellen durch ein chronisches kraniales Fenster direkt post injectionem beobachtet werden. Hierbei zeigte sich, dass der initiale Arrest blutverschleppter Tumorzellen im Gehirn rein mechanisch aufgrund von Größenrestriktion stattfand, präferentiell in Gefäßbifurkationen und kleinen Kapillaren. Ein passives Steckenbleiben von Tumorzellen wurde bereits in Lunge und Leber beschrieben (Chambers et al., 2002). Kapillaren (Durchmesser 3–8 μm) ermöglichen die Passage kleiner, stark deformierbarer Erythrozyten (Durchmesser 7 μm), wohingegen viele Tumorzellen relativ groß sind (Durchmesser 20 μm oder größer) und daher aufgrund ihrer Größe passiv im Kapillarnetz gefangen werden. Unsere Befunde legen nahe, dass der Anteil an zirkulierenden Zellen, welche aufgrund von Größenrestriktion in einem Organ arretieren, durch physikalische Faktoren, wie die relative Größe von Zellen und Kapillaren, den Blutdruck und die Deformierbarkeit der Zellen bestimmt wird. Im Gegensatz dazu adhären beispielsweise Leukozyten an den Wänden von Gefäßen, deren Durchmesser die Größe der Zellen übersteigt. Diese Art der adhäsiven Interaktion, hervorgerufen durch Selektine und Integrine, ist gut dokumentiert (Panes and Granger, 1998), konnte bei Tumorzellen in dieser Form allerdings bisher nicht beobachtet werden (Chambers et al., 2000; Luzzi et al., 1998; Skubitz, 2002). Lediglich im Kaninchenohr (Wood, 1958) und in der Leber wurde eine Adhäsion von Tumorzellen in großen Gefäßen beschrieben, im letzteren Fall allerdings nur, wenn die Endothelzellen durch das Zytokin Interleukin IL-1 α aktiviert worden waren (Scherbarth and Orr, 1997). Hierbei jedoch zeigte sich, dass die Behandlung der

Endothelzellen nicht den Gesamtanteil aller arretierten Zellen in der Leber erhöhte, sondern lediglich mehr Zellen dazu brachte, kleinere Kapillaren zu erreichen (Orr and Wang, 2001).

Bei einer hämatogenen Zelldissemination liegt der erste Zielort für Metastasen in der Regel stromabwärts, also für Tumoren der Körperwand und Extremitäten in der Lunge und erst danach im Gehirn, für Tumoren des Darmes in der Leber. Fast nie von Metastasen betroffen sind Herz, Milz und Nieren; dies ist umso verwunderlicher, da diese Organe einen hohen Blutfluss haben. Eine Bevorzugung bestimmter Organe ist also erkennbar, ohne dass die rein mechanische Verteilung durch den Blutstrom diese verschiedenartige Lokalisierung ausreichend erklärt. So kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass, obwohl für den initialen Arrest mechanische Faktoren wie kleine Kapillaren und Gefäßbifurkationen eine entscheidende Rolle spielen, eine pathobiologische Interaktion mit den Blutgefäßen und dem Organparenchym im Sinne einer Organotropie nach der „Saat-und-Boden“-Theorie für spätere Schritte der metastatischen Kaskade und ein Überleben der Tumorzellen wichtig ist (Chambers et al., 2002). Eine Erklärung, wie es zu einer Organspezifität während des Metastasierungsprozesses kommt, beruht auf den Mechanismen der Chemotaxis. Demnach exprimieren Lungen- und Mammakarzinomzellen sowie Zellen des malignen Melanoms den chemotaktischen Rezeptor CXCR₄ auf ihrer Oberfläche (Andrea et al., 2009), der nach Eintritt in die Blutbahn dazu führt, dass die Zellen nach mechanischem Arrest in kleinen Gefäßen dann Adhäsionen bilden, wenn die Endothelzellen, wie es im Gehirn der Fall ist, den CXCR₄-Liganden CXCL₁₂ exprimieren. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass ein Antikörper gegen CXCR₄ das Auftreten von Lungenmetastasen verhindert (Muller et al., 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß trotz des initialen intravasalen Tumorzellarrests (aufgrund mechanischer Faktoren) die Tumorzellen über viele Tage im Gefäßsystem weiterwandern und erneut arretieren können. Dies unterstützt das Vorhandensein eines molekularen Adhäsionsprozesses, der zusätzlich notwendig ist, um eine dauerhafte Adhäsion und dann Extravasation der Tumorzelle zu gewährleisten.

5.3 Aktive Extravasation zu einem frühen Zeitpunkt

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass nach stabiler Arretierung im Kapillarbett des Gehirns einige wenige Tumorzellen in der Lage waren, innerhalb von 24 Stunden bis Tag 9 post injectionem die Gefäße zu verlassen. Nach Tag 14 post injectionem konnten keine Zellen mehr intravaskulär detektiert werden, die Extravasation konnte in unserem Modell als obligater Schritt für den Prozess der Hirnmetastasierung bestimmt werden. Videoanalysen extravadierender A2058-Melanomzellen zeigten eine aktive Transmigration durch die Löcher in der Gefäßwand, wobei sich extravaskuläre Fortsätze dynamisch vor- und zurück schoben, analog zu früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Gehirn (Kawaguchi et al., 1982). Interessanterweise hatten jene Tumorzellen, die später erfolgreich zu Makrometastasen proliferieren sollten, bereits sehr früh das Gefäß verlassen (bis zu Tag 3). Das Endothel bildet eine selektive Barriere zwischen dem umliegenden Gewebe und den im Blut zirkulierenden Tumorzellen. Endotheliale Zell-Zell-Kontakte bestimmen die Permeabilität der Blutgefäßwand, im Gehirn bilden „tight junctions“ zwischen den Zellen des Epithels eine hochwirksame Barriere (Fidler et al., 2002). Eine Adhäsion an die Endothelzellen, vermittelt durch CXCR₄ oder die 2,6-Sialyltransferase im Mammakarzinom, scheint eine Voraus-

setzung für den Eintritt in das Gehirn darzustellen (Bos et al., 2009). Sialyltransferasen sind eine Familie von Enzymen, welche am Schluss des Glykosylierungsvorganges das Glykoprotein mit Sialinsäure verkoppeln (Harduin-Lepers et al., 2001); es konnte gezeigt werden, dass ein Sialylieren der Zelloberflächen eine Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen spielt (Dall'Olio and Chiricolo, 2001). Die Ergebnisse von Bos et al. lenken nun die Aufmerksamkeit auf eine Rolle der Übertragung von Sialinsäuren auf Glykoproteine beim Vorgang der Extravasation von Mammakarzinomzellen in das Gehirn. Diese Entdeckung schafft einen Anreiz für die Entwicklung neuer Medikamente. Inhibitoren der 2,6-Sialyltransferase könnten möglicherweise die Metastasierung des Mammakarzinoms verhindern (Bos et al., 2009). Beim Mammakarzinom müssen für den Vorgang der Extravasation noch zwei weitere Gene aktiviert werden. Sie kodieren einmal die Cyclooxygenase Cox-2 und zum anderen einen Liganden für den Rezeptor EGFR (Bos et al., 2009). Auch für Cox-2-Inhibitoren wird seit längerem eine krebspräventive Wirkung diskutiert (Sahin et al., 2009). Bereits zugelassen für die Krebstherapie (wenn auch in Deutschland noch nicht beim Mammakarzinom) sind EGFR-Blocker wie Gefitinib oder Erlotinib sowie die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab, die ebenfalls am EGFR angreifen (Sattler et al., 2008). Unter Verwendung weiterer Tumorzellen, die normalerweise nicht in das Gehirn metastasieren, kann zukünftig mit unserem Modell die Hypothese überprüft werden, dass die Fähigkeit zur raschen Extravasation ein entscheidender Faktor ist, der ins ZNS metastasierende Zellen von solchen unterscheidet, die dazu nicht in der Lage sind.

5.4 Hirntumorgefäße als „Boden“ der Metastasierung

Arteriell injizierte Karzinom- und Melanomzellen zeigten in unseren Experimenten eine strikt perivaskuläre Lage als Voraussetzung erfolgreicher Hirnmetastasierung. Dies spricht für einen Überlebensvorteil in dieser perivaskulären Metastasierungsnische, am ehesten durch einen optimalen Zugang zu Sauerstoff und Nährstoffen, möglicherweise aber auch durch andere Faktoren des Mikromilieus (Carbonell et al., 2009). Es ist anzunehmen, dass die strikt perivaskulären Zellen besser erreichbar sind durch solche Therapeutika, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, deren Konzentration dann aber mit der Entfernung vom Gefäß rasch abfällt (Tong et al., 2004). Britische Forscher konnten zeigen, dass die Tumorzellen nach Extravasation an der Basalmembran mithilfe des Adhäsionsmoleküls β 1-Integrin ankern. Ein Fehlen dieses Moleküls verursachte eine Behinderung der Metastasierung (Carbonell et al., 2009). Eine perivaskuläre Nische wurde auch als charakteristisch für Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften in Hirntumoren beschrieben (Calabrese et al., 2007). Es wäre daher denkbar, dass die geringe Anzahl erfolgreich metastasierender Karzinomzellen einem Subtyp von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften entspricht. Das Konzept von Tumorstammzellen geht davon aus, dass es nur eine, möglicherweise kleine, Subfraktion von Tumorzellen gibt, die für ungehemmtes Wachstum, Klonogenität und Metastasenbildung verantwortlich ist. Da die Krebs-Stammzell-Hypothese allerdings nach wie vor umstritten ist (Rosen and Jordan, 2009), fehlen noch weitere wissenschaftliche Belege für eine fundierte Aussage. Die in unserer Arbeitsgruppe antizipierten *in vivo*-mikroskopischen Untersuchungen zum Metastasierungsverhalten von Tumorzellpopulationen mit angereicherten Stammzeleigenschaften [CD133 positiv und/oder Side-Population mit Selbsterneuerungskapazität (Dell'Albani, 2008)] könnten hier zur Klärung

wichtiger Fragen beitragen. Unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe (von Dr. Louisa von Baumgarten) sprechen auch für eine bevorzugt perivaskuläre Lage von hämatopoetischen Stammzellen in Gliomen. Einerseits wäre es denkbar, dass die hämatopoetischen Vorläuferzellen spezifische Schritte der Hirnmetastasierung fördern (Kaplan et al., 2005), andererseits könnten sie aber auch um die perivaskuläre Nische mit den Tumorzellen konkurrieren. Fragen nach weiteren Mikromilieu-Bedingungen im Kortex, welche unter Umständen ein Wachstum epithelialer Tumorzellen begünstigen könnten, bleiben ebenfalls bisher unbeantwortet.

5.5 Latenzzustand von Tumorzellen

Bereits 1934 beschrieb der britische Onkologe Rupert Willis ein Phänomen, das er als „tumor dormancy“ bezeichnete: Nach der scheinbar kurativen Resektion eines Primärtumors kommt es nach langer Latenzzeit zum Auftreten von Metastasen (Willis, 1934). Die Erklärung für diesen „Schlafzustand“ besagte, dass die Tumorzellen in der G₀-Phase verharren, um später reaktiviert zu werden, was später im Tierexperiment vorerst widerlegt werden konnte (Murray, 1995). Der Ruhezustand der Tumorzellen wurde später als Gleichgewicht zwischen hoher Proliferationsrate und hoher Apoptoserate betrachtet (Holmgren et al., 1995). Tatsächlich trifft letztere Annahme allenfalls auf Mikrometastasen zu (Townson and Chambers, 2006) und muss sehr kritisch hinterfragt werden, da eine jahrelang ganz stabile, letztlich perfekte Balance zwischen Proliferation und Apoptose in einem biologischen System kaum vorstellbar scheint (Prof. D. Hölzel, persönliche Kommunikation). Inzwischen gilt auch für Einzelzellen wieder die Annahme, dass diese in einem Proliferationsstillstand verharren (Aguirre-Ghiso, 2007). Die Untersuchungen dieser Arbeit weisen erstmals eindeutig für ein Organ (Gehirn) nach, daß wirkliche „Dormancy“ ausschließlich auf Einzelzellebene erfolgt, und zwar tatsächlich durch einen Proliferationsarrest – aber niemals auf Mikrometastasen-ebene.

Das Phänomen der „tumor dormancy“ ist von hoher klinischer Bedeutung, da Spätrezidive, die lange nach der erfolgreichen Primärtumorbehandlung auftreten, auf metastasierte Tumorzellen oder kleine Tumore zurückzuführen sind, die häufig einen teils jahrelangen Tumorschlaf durchleben (Naumov et al., 2001). Auch Stammzellen können ruhend oder vorübergehend proliferationsinaktiv werden, was ein attraktives Modell zum Verständnis von Spätrezidiven und der „tumor dormancy“ sein könnte. Bisher konnten durch mikroskopische Einzeitanalysen ruhende Tumorzellen mit Wachstumsstillstand nicht eindeutig identifiziert werden (Townson and Chambers, 2006). In der hier vorgestellten Studie konnten ruhende Tumorzellen im lebenden Gehirn erstmals eindeutig identifiziert, im Zeitverlauf verfolgt und quantifiziert werden. Alle ruhenden Tumorzellen wiesen eine strikt perivaskuläre Lage auf. Ein transients Wachstumsstillstand von einigen Wochen konnte klar abgegrenzt werden von einem chronischen Latenzzustand über den gesamten Untersuchungszeitraum (bis 50 Tage). Eine aktive Beweglichkeit von ruhenden Tumorzellen konnte bei Melanomzellen beobachtet werden, während sich ruhende Lungenkarzinomzellen ausschließlich statisch verhielten. Wir interpretieren diese Befunde beim Melanom als Hinweis auf eine Dichotomie zwischen Migration und Proliferation, welche bereits für das invasive Gliom gezeigt werden konnte (Giese et al., 2003). Beim Migrationsvorgang vollziehen migrierende Zellen eine

durch parakrine und autokrine Faktoren stimulierte pseudopodiale Vorwärtsbewegung (Price et al., 1997), die wir auch in unserem Modell beobachten konnten. Der erste Schritt im Prozess der Migration führt durch eine Auswölbung (Protrusion) der Plasmamembran zur Bildung von Lamellipodien oder Filopodien. Nachdem sich die Membranauswölbungen an ein Substrat angeheftet haben, kann der Zellkörper durch kontraktile Kräfte, die durch Interaktionen von Myosin mit Aktinfilamenten entstehen, wandern. Gleichzeitig muss sich die Zelle am „Zellende“ durch Zerreißen der Zell-Substrat-Verbindungen ablösen (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Eine durch einen Wachstumsfaktor induzierte chemotaktische Anziehung hat eine gerichtete Wanderung zur Folge und führt beispielsweise zu einer gerichteten Migration von Leukozyten an den Ort einer Entzündung. Bisher wurden als Mitglieder der Superfamilie der „Chemokine“ bereits über 40 humane Zytokine identifiziert, wie beispielsweise „Interleukin 1 α “ (IL1 α) und „Tumor Necrosis Factor“ [TNF, (Taub, 2000)]. Es lässt sich vermuten, dass die migrierenden Melanomzellen ihre Mobilität nutzen, um zu speziellen Stellen des Gehirns zu wandern, in welchen ein Tumorstadium begünstigt werden kann. Die Degradierung der extrazellulären Matrix (engl.: extracellular matrix, ECM) durch Proteasen und Glykosidasen ist ein weiterer wesentlicher Mechanismus für die Invasion von Tumorzellen in das Parenchym von Organen. Die extrazelluläre Matrix stellt eine Barriere zwischen den epithelialen Zellen und dem Stroma dar (Nakajima et al., 1988). Die extrazelluläre Matrix des ZNS besitzt im Vergleich zu anderen Gewebetypen meist eine eher lockere Struktur, mit Ausnahme der Hirnhäute. Sie nimmt ein verhältnismäßig großes Volumen von bis zu 20% des adulten Gehirns ein (Nicholson and Sykova, 1998). Obwohl viele ECM-Moleküle des ZNS auch in nicht-neuronalen Geweben zu finden sind, wie z.B. Tenascine, Fibronectin und Laminin, gibt es auch ZNS-spezifische Komponenten wie die Chondroitinsulfat-Proteoglykane Phosphacan und Neurocan. Für Proteoglykane wird vermutet, dass die Moleküle ein Reservoir für Wachstumsfaktoren wie beispielsweise „Transforming Growth Factor, β 1“ (TGF β 1) darstellen könnten. Wird die ECM durch Enzyme degradiert, kann TGF β 1 in einer aktiven Form freigesetzt werden (Chakrabarty et al., 1990). Deshalb könnten die Proteoglykane indirekt eine wichtige Rolle in der Wachstumsregulierung und Differenzierung von Tumorzellen spielen.

5.6 Kooption, Angiogenese und anti-VEGF-Therapie

In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass einzelne Melanomzellen zur Bildung von Kapillarkonvoluten und vaskulären Glomeruloidkörpern befähigt sind, und zwar spezifisch am Ort des Zell-Gefäß-Kontaktes. Dies ist ein neuer Mechanismus der Tumorangio-genese über physikalische Tumorzell-Wirtsgefäß-Interaktionen (Winkler et al., 2009). Die Melanomzellen konnten in unserem Modell auch ohne Gefäßneubildung wachsen, indem sie bestehende Gefäße des Parenchyms besetzten (Koooption) und an ihnen entlang proliferieren. Vor allem im gefäßreichen Gehirn wurde dieser Mechanismus schon früher als wichtig angesehen, zumindest im frühen Stadium des Tumorstadiums (Holash et al., 1999). Für die Bildung von Lungenkarzinom-Makrometastasen war im Gegensatz dazu in unserem Modell eine frühe Angiogenese notwendig. Der US-amerikanische Zellbiologe und Mediziner Judah Folkman entwickelte 1971 eine zentrale Hypothese zur Tumorangio-genese, nach welcher der angiogene Phänotyp eines Tumors aus der Bilanz angiogener und anti-angiogener Faktoren resultiert. Der Wechsel vom avaskulären zum vaskulären Stadium

wurde als „switch to angiogenesis“ bezeichnet (Folkman, 1971). Ein „Angiogenic Switch“ konnte für Lungenkarzinometastasen auch in unserem Modell beobachtet werden; wir folgerten daraus, dass unterhalb eines kritischen Metastasendurchmessers (147 μm in PC14-PE6, 195 μm in HTB177) die Mikrometastasen noch zu klein sind, um extensive Angiogenese zu initiieren. Während die relevanten molekularen Faktoren der Angiogenese (VEGF, Angiopoietine, PDGF, PIGF, bFGF, IL8) heute recht gut verstanden sind (Jain et al., 2007), sind die der Kooption nicht hinreichend untersucht.

In der hier vorgestellten Arbeit konnte erstmals demonstriert werden, dass dauerhafte anti-VEGF-Therapie mit dem humanisierten monoklonalen anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab ein prophylaktisches Potential für die Verhinderung klinisch relevanter Hirnmetastasierung des Lungenkarzinoms besitzen kann. Durch die Inhibition früher Angiogenesevorgänge wurden metastasierende Lungenkarzinomzellen in einen chronischen Ruhezustand gezwungen, der ihnen nicht erlaubte, über eine Mikrometastase von maximal 9 Zellen hinauszuwachsen. Die Inhibition der Tumor-Angiogenese führte also zu einer Tumor-Minimierung, jedoch zu keiner vollständigen Eradikation der Tumorherde. Vielmehr entwickelten Lungenkarzinomzellen unter Bevacizumab-Therapie einen Phänotyp, der dem Gefäßbesatz von Melanomzellen ähnelte und erstmalig zu kapillärer Schleifenbildung führte. Dieses abortive Krankheitsbild führte weder zur vollständigen Regression der Zellen noch zu der Entwicklung klinisch manifester Makrometastasen. Die Induktion des Ruhezustandes („Dormancy“) war bereits für die antiangiogene Substanz TNP-470 vermutet worden (Holmgren et al., 1995). Eine neue Studie beschreibt dagegen eine Zunahme der Metastasierung nach einer nur kurz dauernden Inhibition des VEGF-Signalweges (Ebos et al., 2009). Als Erklärung hierfür könnte die systemische Hochregulation von VEGF-A während der Inhibition des VEGF-A/VEGFR2-Signalweges herangezogen werden (Rini et al., 2008). Zusammen genommen sprechen diese Daten für eine chronische Inhibition des VEGF-A-Signalweges, möglicherweise mit geringeren Dosen von VEGF-Inhibitoren als in der Akuttherapie, wenn eine anhaltende suppressive Wirkung auf das Metastasenwachstum erreicht werden soll. Ob dies tatsächlich notwendig ist, werden wir in Folgestudien untersuchen.

Diagnostische Konsequenzen einer antiangiogenen Therapie sollten ebenfalls berücksichtigt werden. Mikrometastasen, welche unter antiangiogener Therapie in einem Latenzzustand persistieren, werden in kernspintomographischer Bildgebung (MRT; Magnetresonanztomographie) nicht zur Darstellung kommen. Neue Kontrastmittel, basierend auf kleinen Eisenoxidpartikeln, könnten möglicherweise eine sensitivere Darstellung erzielen (Leenders et al., 2003). Eine Wirkung der anti-VEGF-A-Therapie auf die Melanom-Metastasierung im Gehirn konnte in unserem Modell nicht beobachtet werden. Diese Befunde können darauf hindeuten, dass VEGF auf ein kooptives Wachstum durch Besatz bestehender Gefäße keinen Einfluss hat und eine antiangiogene Therapie daher bei diesem alternativen Mechanismus der Tumovaskularisierung keine Wirkung erzielt. Unser Modell unterstreicht daher die Heterogenität von Hirnmetastasen, welcher zukünftig wahrscheinlich nur durch maßgeschneiderte Therapieansätze zu begegnen ist.

5.7 Die Ineffizienz der Hirnmetastasierung

Bisher war es aus methodologischen Gründen schwierig, die effizienten von den ineffizienten Schritten der Hirnmetastasierung zu unterscheiden. Extravasation wurde nicht als limitierender Faktor angesehen (Luzzi et al., 1998; Koop et al., 1995; Chambers et al., 2000). In unserem Modell zeigte sich Extravasation als ineffizienter und daher limitierender Schritt bei der Bildung von Lungenkarzinommetastasen. Unsere Befunde zeigen, dass die Gründe für die hohe Ineffizienz der späten metastatischen Kaskade für die Tumortypen Lunge und Melanom unterschiedlich sind und auf jeder Stufe der Metastasierung auftreten können, innerhalb einer Tumorentität allerdings vergleichbar sind. Ein weiterer ineffizienter Schritt beim Lungenkarzinom war das Wachstum von einer Mikro- zur Makrometastase, was insbesondere auf das Zusammenspiel verschiedener Faktoren für die Induktion der Angiogenese zurückzuführen sein könnte. Alle Lungenkarzinomzellen, die erfolgreich zu Makrometastasen wuchsen, waren aus Zellclustern extravasierter Einzelzellen entstanden, welche erst im Zellverbund den kritischen Metastasendurchmesser für den „Angiogenic Switch“ überwinden konnten. Dies steht im Kontrast zu früheren Erkenntnissen, die einen klonalen Ursprung von Metastasen postulieren (Fidler and Talmadge, 1986). Melanomzellen hingegen zeigten ausnahmslos ein solches klonales Wachstum, wobei die Ineffizienz der Melanom-Metastasierung beim Wachstum zu einer Mikrometastase aus perivaskulären Einzelzellen durch Besatz bestehender Gefäße zu finden war. Zwar waren Melanomzellen bei ihrem Wachstum weniger auf einen wachsenden Zellverband angewiesen, da schon einzelne Melanomzellen offensichtlich selbständig mit den kortikalen Gefäßen interagieren und proliferieren konnten, ohne dabei angiogene Veränderungen bewirken zu müssen. Entscheidend für das erfolgreiche Metastasenwachstum war jedoch, dass diese Gefäße den Tumorzellen zur Verfügung standen. Eine unzureichende Gefäßdichte behinderte ein kooptives Wachstum und führte als limitierender Faktor zu einer Ineffizienz der Metastasierung.

5.8 Klinische Beurteilung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie können mehrere Erfahrungen aus der Klinik erklären. (1) Melanomzellen neigen dazu, multiple Läsionen zu bilden (>70% in Patienten), was auch in unserem Modell beobachtet werden konnte und auf das klonale Wachstum von Einzelzellen zurückgeführt werden kann (Fidler and Talmadge, 1986). (2) Das maligne Melanom hat die höchste Prävalenz für eine zerebrale Metastasierung (McWilliams et al., 2008). Auch in unserem Modell waren die Zellen des malignen Melanoms besonders effizient darin, alle obligaten Schritte der Hirnmetastasierung zu meistern. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sowohl die Melanozyten der Haut, die zu einem malignen Melanom entarten können, als auch das Nervensystem dem Ektoderm entstammen und somit möglicherweise Ähnlichkeiten aufgrund der embryogenetischen Herkunft aufweisen. (3) Hirnmetastasen des Lungenkarzinoms entwickeln sich innerhalb von Monaten nach der Diagnose des Primärtumors (im Durchschnitt nach 6–9 Monaten), wohingegen klinisch relevante Hirnmetastasen des malignen Melanoms oft erst nach einer Latenzphase von 2–3 Jahren manifest werden (Nathoo et al., 2005). In unserem Modell konnten wir zeigen, dass

das von Tumorzellen produzierte VEGF zu einem frühen Zeitpunkt zu Angiogenese und schnellem, expansivem Wachstum von Lungenkarzinommetastasen führt.

5.9 Ausblick

Zusammenfassend ermöglicht das etablierte Tiermodell die sensitive Detektion und Verfolgung individueller, metastasierender Tumorzellen auf Einzellebene über viele Wochen *in vivo* sowie eine genaue Quantifizierung unterschiedlichster Parameter. Durch die Anwendung der *in vivo* 2PLSM wird die Voraussetzung geschaffen, die Evolution von natürlichen Vorgängen und Therapieeffekten in ein und derselben Maus über längere Zeiträume zu verfolgen. Aus diesem Grund eignet sich das Modell zur Entwicklung und Überprüfung neuer Therapieansätze. Durch die Möglichkeit, den Einfluss verschiedener molekularer Faktoren und Therapeutika auf die einzelnen Schritte der Hirnmetastasierung zu untersuchen, eröffnen sich neue Möglichkeiten in der Metastasenforschung. Wir erwarten durch die wachsenden Erkenntnisse aus diesem Tiermodell auch einen Einfluss auf die Optimierung von Therapiestrategien gegen die Hirnmetastasierung: Die obligaten Schritte sollten die primären Angriffspunkte sein; die erfolglosen Schritte der Hirnmetastasierung können vernachlässigt werden; und die ineffizienten Schritte sind möglicherweise am leichtesten zu inhibieren (Chambers et al., 2000). Letztere Hypothese wurde für die Angiogenese-abhängige Bildung von Lungenkarzinom-Metastasen in dieser Arbeit bereits verifiziert.

6 Zusammenfassung

Metastasen sind die häufigsten bösartigen Hirntumore und gehen mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Die steigende Inzidenz von Hirnmetastasen sowie die limitierten Therapieoptionen unterstreichen die Notwendigkeit der Entwicklung neuer, wirkungsvollerer Ansätze zur Prävention und Therapie dieser gravierenden Erkrankung. Da momentan im Wesentlichen lediglich Endpunktuntersuchungen vorliegen, sind viele Schritte des Metastasierungsprozesses noch wenig verstanden.

In der vorliegenden Dissertation wurde daher ein neuartiges Tiermodell etabliert, welches erstmalig das qualitative und quantitative Studium der einzelnen Prozesse der Hirnmetastasierung erlaubte, vom Arrest der Tumorzellen in Blutkapillaren bis hin zum Wachstum einer großen Metastase. Dabei wurden individuelle, fluoreszierende Tumorzellen in Gehirnen lebender Mäuse über einen Zeitraum von Minuten bis Monaten mittels 2-Photonen-Mikroskopie *in vivo* verfolgt und quantifiziert. Es konnten obligate, ineffiziente und erfolglose Schritte der Hirnmetastasierung bestimmt sowie die Rolle der bestehenden Hirngefäße, Endothelzellen und der Angiogenese ermittelt werden.

Die in die Arteria carotis interna injizierten Lungenkarzinom- und Melanomzellen mussten folgende Schritte absolvieren, um über Wochen erfolgreich zu einer Makrometastase zu proliferieren (was nur wenigen Prozent gelang): 1.) vaskulärer Arrest durch Größenrestriktion in Gefäßgabeln, 2.) aktive und frühe Extravasation, 3.) Beibehaltung einer strikt perivaskulären Position über Wochen, 4.) Wachstum entlang bestehender Gefäße (Melanom) oder sehr frühe Angiogenese (Lungenkarzinom). Die Persistenz nicht-proliferierender Tumorzellen über viele Wochen (Ruhezustand, „dormancy“) geschah nur im Einzelzellstadium und nur unter Beibehaltung eines strikten Gefäßkontaktes. „Dormancy“ war bei Melanomzellen mit hoher Mobilität im Gehirn verbunden, wohingegen Lungenkarzinomzellen statisch blieben. Effiziente und ineffiziente Schritte waren vergleichbar für die Zell-Linien einer Tumorentität, unterschieden sich aber deutlich zwischen den Tumortypen und waren über die gesamte späte metastatische Kaskade verteilt.

Chronische VEGF-A-Inhibition durch Bevacizumab induzierte einen Ruhezustand von Lungenkarzinom-Mikrometastasen durch Verhinderung ihres Angiogenese-abhängigen Wachstums zu Makrometastasen. Diese Ergebnisse sprechen für ein Potential antiangiogener Therapien für die Prophylaxe und Therapie der Hirnmetastasierung des Lungenkarzinoms.

Das neue Tiermodell erlaubt es somit erstmals, die Wirkung von Therapien und molekularen Faktoren auf jeden einzelnen Schritt der späten metastatischen Kaskade zu bestimmen.

7 Literaturverzeichnis

Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer.* 7, 834-846.

Al-Mehdi, A.B., Tozawa, K., Fisher, A.B., Shientag, L., Lee, A., and Muschel, R.J. (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat. Med.* 6, 100-102.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

Andre, F., Cabioglu, N., Assi, H., Sabourin, J.C., Delaloge, S., Sahin, A., Broglio, K., Spano, J.P., Combadiere, C., Bucana, C., Soria, J.C., and Cristofanilli, M. (2006). Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann Oncol.* 17, 945-951.

Andrea, S., Emanuela, M., Chiara, C., Paola, G., Alessandra, C., Ida, M., Antonio, S., Francesco, D.M., Antonino, C., and Bianca, P. (2009). CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression in brain metastases. *Cancer Biol. Ther.* 8.

Ballinger, W.E., Jr. and Schimpff, R.D. (1979). An experimental model for cerebral metastasis: preliminary light and ultrastructural studies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 38, 19-34.

Batchelor, T.T., Sorensen, A.G., di, T.E., Zhang, W.T., Duda, D.G., Cohen, K.S., Kozak, K.R., Cahill, D.P., Chen, P.J., Zhu, M., Ancukiewicz, M., Mrugala, M.M., Plotkin, S., Drappatz, J., Louis, D.N., Ivy, P., Scadden, D.T., Benner, T., Loeffler, J.S., Wen, P.Y., and Jain, R.K. (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell.* 11, 83-95.

Bergers, G. and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 401-410.

Bernards, R. and Weinberg, R.A. (2002). A progression puzzle. *Nature.* 418, 823.

Blouw, B., Song, H., Tihan, T., Bosze, J., Ferrara, N., Gerber, H.P., Johnson, R.S., and Bergers, G. (2003). The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* 4, 133-146.

Bos, P.D., Zhang, X.H., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R.R., Nguyen, D.X., Minn, A.J., van de Vijver, M.J., Gerald, W.L., Foekens, J.A., and Massague, J. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.* 459, 1005-1009.

Bouso, P. and Robey, E.A. (2004). Dynamic behavior of T cells and thymocytes in lymphoid organs as revealed by two-photon microscopy. *Immunity.* 21, 349-355.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54., 248-254.

Bullen, A. (2008). Microscopic imaging techniques for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 54-67.

- Calabrese,C., Poppleton,H., Kocak,M., Hogg,T.L., Fuller,C., Hamner,B., Oh,E.Y., Gaber,M.W., Finklestein,D., Allen,M., Frank,A., Bayazitov,I.T., Zakharenko,S.S., Gajjar,A., Davidoff,A., and Gilbertson,R.J. (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*. 11, 69-82.
- Carbonell,W.S., Ansorge,O., Sibson,N., and Muschel,R. (2009). The vascular basement membrane as "soil" in brain metastasis. *PLoS. ONE*. 4, e5857.
- Carmeliet,P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653-660.
- Carmeliet,P. and Jain,R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Chakrabarty,S., Fan,D., and Varani,J. (1990). Modulation of differentiation and proliferation in human colon carcinoma cells by transforming growth factor beta 1 and beta 2. *Int. J. Cancer*. 46, 493-499.
- Chambers,A.F. (2009). MDA-MB-435 and M14 cell lines: identical but not M14 melanoma? *Cancer Res*. 69, 5292-5293.
- Chambers,A.F., Groom,A.C., and MacDonald,I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer*. 2, 563-572.
- Chambers,A.F., MacDonald,I.C., Schmidt,E.E., Morris,V.L., and Groom,A.C. (2000). Clinical targets for anti-metastasis therapy. *Adv. Cancer Res*. 79:91-121., 91-121.
- Chiang,A.C. and Massague,J. (2008). Molecular basis of metastasis. *N. Engl. J. Med.* 359, 2814-2823.
- Condeelis,J. and Segall,J.E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat. Rev. Cancer*. 3, 921-930.
- Conley,F.K. (1979). Development of a metastatic brain tumor model in mice. *Cancer Res*. 39, 1001-1007.
- Dagert,M. and Ehrlich,S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*. 6, 23-28.
- Dall'Olio,F. and Chiricolo,M. (2001). Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj. J.* 18, 841-850.
- Dell'Albani,P. (2008). Stem cell markers in gliomas. *Neurochem. Res*. 33, 2407-2415.
- Denk,W., Strickler,J.H., and Webb,W.W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76.
- Dickson,P.V., Hamner,J.B., Sims,T.L., Fraga,C.H., Ng,C.Y., Rajasekeran,S., Hagedorn,N.L., McCarville,M.B., Stewart,C.F., and Davidoff,A.M. (2007). Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. *Clin. Cancer Res*. 13, 3942-3950.
- Diener,H. and Putzki,N. (2008). Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag), p. 654 ff.
- Dome,B., Timar,J., and Paku,S. (2003). A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 655-661.

- Ebos, J.M., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., and Kerbel, R.S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 15, 232-239.
- Eichler, A.F. and Loeffler, J.S. (2007). Multidisciplinary management of brain metastases. *Oncologist*. 12, 884-898.
- Eikesdal, H.P., Sugimoto, H., Birrane, G., Maeshima, Y., Cooke, V.G., Kieran, M., and Kalluri, R. (2008). Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15040-15045.
- Ellison, G., Klinowska, T., Westwood, R.F., Docter, E., French, T., and Fox, J.C. (2002). Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol. Pathol.* 55, 294-299.
- Escudier, B., Pluzanska, A., Koralewski, P., Ravaud, A., Bracarda, S., Szczylik, C., Chevreau, C., Filipek, M., Melichar, B., Bajetta, E., Gorbunova, V., Bay, J.O., Bodrogi, I., Jagiello-Gruszfeld, A., and Moore, N. (2007). Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 370, 2103-2111.
- Ewing, J. (1928). *Neoplastic Diseases: A Textbook on Tumors*.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer*. 3, 453-458.
- Fidler, I.J. and Hart, I.R. (1982). Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*. 217, 998-1003.
- Fidler, I.J. and Kripke, M.L. (1977). Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*. 197, 893-895.
- Fidler, I.J. and Talmadge, J.E. (1986). Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell. *Cancer Res*. 46, 5167-5171.
- Fidler, I.J., Yano, S., Zhang, R.D., Fujimaki, T., and Bucana, C.D. (2002). The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *Lancet Oncol*. 3, 53-57.
- Fitzgerald, D.P., Palmieri, D., Hua, E., Hargrave, E., Herring, J.M., Qian, Y., Vega-Valle, E., Weil, R.J., Stark, A.M., Vortmeyer, A.O., and Steeg, P.S. (2008). Reactive glia are recruited by highly proliferative brain metastases of breast cancer and promote tumor cell colonization. *Clin. Exp. Metastasis*. 25, 799-810.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J Med*. 285, 1182-1186.
- Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D., and Birchmeier, W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol*. 113, 173-185.
- Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M.E., and Westphal, M. (2003). Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J. Clin. Oncol*. 21, 1624-1636.
- Göppert-Mayer, M. Elementary processes with two-quantum transitions. *Ann Phys* 9, 273-295. 1931.
- Ref Type: Thesis/Dissertation

- Harduin-Lepers,A., Vallejo-Ruiz,V., Krzewinski-Recchi,M.A., Samyn-Petit,B., Julien,S., and Delannoy,P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*. *83*, 727-737.
- Helmchen,F. and Denk,W. (2002). New developments in multiphoton microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol.* *12*, 593-601.
- Helmchen,F. and Denk,W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods*. *2*, 932-940.
- Hillen,F. and Griffioen,A.W. (2007). Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* *26*, 489-502.
- Hoffman,R.M. (2005a). Advantages of multi-color fluorescent proteins for whole-body and in vivo cellular imaging. *J. Biomed. Opt.* *10*, 41202.
- Hoffman,R.M. (2005b). The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. *Nat. Rev. Cancer*. *5*, 796-806.
- Holash,J., Maisonpierre,P.C., Compton,D., Boland,P., Alexander,C.R., Zagzag,D., Yancopoulos,G.D., and Wiegand,S.J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* *284*, 1994-1998.
- Holmgren,L., O'Reilly,M.S., and Folkman,J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med.* *1*, 149-153.
- Huang,M.S., Wang,T.J., Liang,C.L., Huang,H.M., Yang,I.C., Yi-Jan,H., and Hsiao,M. (2002). Establishment of fluorescent lung carcinoma metastasis model and its real-time microscopic detection in SCID mice. *Clin. Exp. Metastasis*. *19*, 359-368.
- Hurwitz,H., Fehrenbacher,L., Novotny,W., Cartwright,T., Hainsworth,J., Heim,W., Berlin,J., Baron,A., Griffing,S., Holmgren,E., Ferrara,N., Fyfe,G., Rogers,B., Ross,R., and Kabbinavar,F. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2335-2342.
- Ito,S., Nakanishi,H., Ikehara,Y., Kato,T., Kasai,Y., Ito,K., Akiyama,S., Nakao,A., and Tatematsu,M. (2001). Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line. *Int. J. Cancer*. *93*, 212-217.
- Jain,R.K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat. Med.* *7*, 987-989.
- Jain,R.K., di,T.E., Duda,D.G., Loeffler,J.S., Sorensen,A.G., and Batchelor,T.T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 610-622.
- Jain,R.K., Munn,L.L., and Fukumura,D. (2002). Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 266-276.
- Kaiser,W. and Garrett,C.G.B. (1961). Two-Photon excitation in $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$. *Phys. Rev. Lett.* *7*, 229-231.
- Kaplan,R.N., Riba,R.D., Zacharoulis,S., Bramley,A.H., Vincent,L., Costa,C., MacDonald,D.D., Jin,D.K., Shido,K., Kerns,S.A., Zhu,Z., Hicklin,D., Wu,Y., Port,J.L., Altorki,N., Port,E.R., Ruggiero,D., Shmelkov,S.V., Jensen,K.K., Rafii,S., and Lyden,D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. *438*, 820-827.

- Karlin, S. and Altschul, S.F. (1990). Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 2264-2268.
- Karlin, S. and Altschul, S.F. (1993). Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 5873-5877.
- Kawaguchi, T., Tobai, S., and Nakamura, K. (1982). Extravascular migration of tumor cells in the brain: an electron microscopic study. *Invasion Metastasis.* *2*, 40-50.
- Kedrin, D., Gligorijevic, B., Wyckoff, J., Verkhusha, V.V., Condeelis, J., Segall, J.E., and van, R.J. (2008). Intravital imaging of metastatic behavior through a mammary imaging window. *Nat. Methods.* *5*, 1019-1021.
- Kerbel, R.S. (1990). Growth dominance of the metastatic cancer cell: cellular and molecular aspects. *Adv. Cancer Res.* *55*:87-132., 87-132.
- Kirsch, D.G. and Loeffler, J.S. (2005). Brain metastases in patients with breast cancer: new horizons. *Clin. Breast Cancer.* *6*, 115-124.
- Koop, S., MacDonald, I.C., Luzzi, K., Schmidt, E.E., Morris, V.L., Grattan, M., Khokha, R., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1995). Fate of melanoma cells entering the microcirculation: over 80% survive and extravasate. *Cancer Res.* *55*, 2520-2523.
- Kreisl, T.N., Kim, L., Moore, K., Duic, P., Royce, C., Stroud, I., Garren, N., Mackey, M., Butman, J.A., Camphausen, K., Park, J., Albert, P.S., and Fine, H.A. (2009). Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* *27*, 740-745.
- Kusters, B., de Waal, R.M., Wesseling, P., Verrijp, K., Maass, C., Heerschap, A., Barentsz, J.O., Sweep, F., Ruiter, D.J., and Leenders, W.P. (2003). Differential effects of vascular endothelial growth factor A isoforms in a mouse brain metastasis model of human melanoma. *Cancer Res.* *63*, 5408-5413.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* *10*, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* *227*, 680-685.
- Laiho, L.H., Pelet, S., Hancewicz, T.M., Kaplan, P.D., and So, P.T. (2005). Two-photon 3-D mapping of ex vivo human skin endogenous fluorescence species based on fluorescence emission spectra. *J. Biomed. Opt.* *10*, 024016.
- Langdon, S.P. (2004). Cell culture contamination: an overview. *Methods Mol. Med.* *88*:309-17., 309-317.
- Lassman, A.B. and DeAngelis, L.M. (2003). Brain metastases. *Neurol. Clin.* *21*, 1-23, vii.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* *84*, 359-369.
- Lee, B.C., Lee, T.H., Avraham, S., and Avraham, H.K. (2004). Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Mol. Cancer Res.* *2*, 327-338.

- Leenders,W., Kusters,B., Pikkemaat,J., Wesseling,P., Ruiten,D., Heerschap,A., Barentsz,J., and de Waal,R.M. (2003). Vascular endothelial growth factor-A determines detectability of experimental melanoma brain metastasis in GD-DTPA-enhanced MRI. *Int. J. Cancer.* *105*, 437-443.
- Leenders,W.P., Kusters,B., Verrijp,K., Maass,C., Wesseling,P., Heerschap,A., Ruiten,D., Ryan,A., and de,W.R. (2004). Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option. *Clin. Cancer Res.* *10*, 6222-6230.
- Liotta,L.A. and Kohn,E. (1990). Cancer invasion and metastases. *JAMA.* *263*, 1123-1126.
- Lorger,M., Krueger,J.S., O'Neal,M., Staflin,K., and Felding-Habermann,B. (2009). Activation of tumor cell integrin alphavbeta3 controls angiogenesis and metastatic growth in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 10666-10671.
- Luzzi,K.J., MacDonald,I.C., Schmidt,E.E., Kerkvliet,N., Morris,V.L., Chambers,A.F., and Groom,A.C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* *153*, 865-873.
- Machein,M.R. and Plate,K.H. (2000). VEGF in brain tumors. *J Neurooncol.* *50*, 109-120.
- Marotta,L.L. and Polyak,K. (2009). Cancer stem cells: a model in the making. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *19*, 44-50.
- Mathews,M.S., Linskey,M.E., Hasso,A.N., and Fruehauf,J.P. (2008). The effect of bevacizumab (Avastin) on neuroimaging of brain metastases. *Surg. Neurol.* *70*, 649-652.
- McWilliams,R.R., Rao,R.D., Buckner,J.C., Link,M.J., Markovic,S., and Brown,P.D. (2008). Melanoma-induced brain metastases. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* *8*, 743-755.
- Meyers,J.A., Sanchez,D., Elwell,L.P., and Falkow,S. (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* *127*, 1529-1537.
- Miller,K., Wang,M., Gralow,J., Dickler,M., Cobleigh,M., Perez,E.A., Shenkier,T., Cella,D., and Davidson,N.E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *357*, 2666-2676.
- Minsky, M. [US 3,013,467]. 1961.
Ref Type: Patent
- Molitoris,B.A. and Sandoval,R.M. (2005). Intravital multiphoton microscopy of dynamic renal processes. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* *288*, F1084-F1089.
- Monsky,W.L., Carreira,C.M., Tsuzuki,Y., Gohongi,T., Fukumura,D., and Jain,R.K. (2002). Role of Host Microenvironment in Angiogenesis and Microvascular Functions in Human Breast Cancer Xenografts: Mammary Fat Pad versus Cranial Tumors. *Clin. Cancer Res.* *8*, 1008-1013.
- Mook,O.R., Van,M.J., Vreeling-Sindelarova,H., Jonges,R., Frederiks,W.M., and Van Noorden,C.J. (2003). Visualization of early events in tumor formation of eGFP-transfected rat colon cancer cells in liver. *Hepatology.* *38*, 295-304.

- Motoike,T., Loughna,S., Perens,E., Roman,B.L., Liao,W., Chau,T.C., Richardson,C.D., Kawate,T., Kuno,J., Weinstein,B.M., Stainier,D.Y., and Sato,T.N. (2000). Universal GFP reporter for the study of vascular development. *Genesis*. 28, 75-81.
- Muller,A., Homey,B., Soto,H., Ge,N., Catron,D., Buchanan,M.E., McClanahan,T., Murphy,E., Yuan,W., Wagner,S.N., Barrera,J.L., Mohar,A., Verastegui,E., and Zlotnik,A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 410, 50-56.
- Mundy,G.R. (2002). Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer*. 2, 584-593.
- Murray,C. (1995). Tumour dormancy: not so sleepy after all. *Nat. Med*. 1, 117-118.
- Nabeshima,K., Inoue,T., Shimao,Y., and Sameshima,T. (2002). Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol. Int*. 52, 255-264.
- Nakajima,M., Irimura,T., and Nicolson,G.L. (1988). Heparanases and tumor metastasis. *J. Cell Biochem*. 36, 157-167.
- Nathoo,N., Chahlavi,A., Barnett,G.H., and Toms,S.A. (2005). Pathobiology of brain metastases. *J. Clin. Pathol*. 58, 237-242.
- Naumov,G.N., MacDonald,I.C., Chambers,A.F., and Groom,A.C. (2001). Solitary cancer cells as a possible source of tumour dormancy? *Semin. Cancer Biol*. 11, 271-276.
- Naumov,G.N., Wilson,S.M., MacDonald,I.C., Schmidt,E.E., Morris,V.L., Groom,A.C., Hoffman,R.M., and Chambers,A.F. (1999). Cellular expression of green fluorescent protein, coupled with high-resolution in vivo videomicroscopy, to monitor steps in tumor metastasis. *J. Cell Sci*. 112, 1835-1842.
- Nguyen,D.X. and Massague,J. (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat. Rev. Genet*. 8, 341-352.
- Nicholson,C. and Sykova,E. (1998). Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci*. 21, 207-215.
- Nicolson,G.L., Menter,D.G., Herrmann,J., Cavanaugh,P., Jia,L., Hamada,J., Yun,Z., Nakajima,M., and Marchetti,D. (1994). Tumor metastasis to brain: role of endothelial cells, neurotrophins, and paracrine growth factors. *Crit Rev. Oncog*. 5, 451-471.
- Norden,A.D., Young,G.S., Setayesh,K., Muzikansky,A., Klufas,R., Ross,G.L., Ciampa,A.S., Ebbeling,L.G., Levy,B., Drappatz,J., Kesari,S., and Wen,P.Y. (2008). Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology*. 70, 779-787.
- Oh,Y. and Stewart,D.J. (2008). Systemic therapy for lung cancer brain metastases: a rationale for clinical trials. *Oncology (Williston. Park)*. 22, 168-178.
- Orr,F.W. and Wang,H.H. (2001). Tumor cell interactions with the microvasculature: a rate-limiting step in metastasis. *Surg. Oncol. Clin. N. Am*. 10, 357-35x.
- Paget,S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 8, 98-101.
- Paku,S., Dome,B., Toth,R., and Timar,J. (2001). Organ-specificity of the extravasation process: an ultrastructural study. *Clin. Exp. Metastasis*. 18, 481-492.

- Palmieri,D., Chambers,A.F., Felding-Habermann,B., Huang,S., and Steeg,P.S. (2007). The biology of metastasis to a sanctuary site. *Clin. Cancer Res.* *13*, 1656-1662.
- Panes,J. and Granger,D.N. (1998). Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology.* *114*, 1066-1090.
- Pantel,K., Cote,R.J., and Fodstad,O. (1999). Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J. Natl. Cancer Inst.* *91*, 1113-1124.
- Pavlidis,N. and Fizazi,K. (2009). Carcinoma of unknown primary (CUP). *Crit Rev. Oncol. Hematol.* *69*, 271-278.
- Pearson,W.R. (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* *183:63-98.*, 63-98.
- Pearson,W.R. and Lipman,D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 2444-2448.
- Pierceland,W.E., Woodard,A.S., Morrow,J.S., Rimm,D., and Fearon,E.R. (1995). Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines. *Oncogene.* *11*, 1319-1326.
- Plate,K.H., Breier,G., Weich,H.A., and Risau,W. (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature.* *359*, 845-848.
- Plate,K.H. and Mennel,H.D. (1995). Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. *Exp. Toxicol. Pathol.* *47*, 89-94.
- Pope,W.B., Lai,A., Nghiemphu,P., Mischel,P., and Cloughesy,T.F. (2006). MRI in patients with high-grade gliomas treated with bevacizumab and chemotherapy. *Neurology.* *66*, 1258-1260.
- Price,J.T., Bonovich,M.T., and Kohn,E.C. (1997). The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* *32*, 175-253.
- Rae,J.M., Creighton,C.J., Meck,J.M., Haddad,B.R., and Johnson,M.D. (2007). MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Res. Treat.* *104*, 13-19.
- Ranjan,T. and Abrey,L.E. (2009). Current management of metastatic brain disease. *Neurotherapeutics.* *6*, 598-603.
- Rini,B.I., Michaelson,M.D., Rosenberg,J.E., Bukowski,R.M., Sosman,J.A., Stadler,W.M., Hutson,T.E., Margolin,K., Harmon,C.S., DePrimo,S.E., Kim,S.T., Chen,I., and George,D.J. (2008). Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab-refractory metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *26*, 3743-3748.
- Rosen,J.M. and Jordan,C.T. (2009). The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science.* *324*, 1670-1673.
- Ross,D.T., Scherf,U., Eisen,M.B., Perou,C.M., Rees,C., Spellman,P., Iyer,V., Jeffrey,S.S., Van de,R.M., Waltham,M., Pergamenschikov,A., Lee,J.C., Lashkari,D., Shalon,D., Myers,T.G., Weinstein,J.N., Botstein,D., and Brown,P.O. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat. Genet.* *24*, 227-235.
- Rubart,M. (2004). Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ. Res.* *95*, 1154-1166.

- Sahin,M., Sahin,E., and Gumuslu,S. (2009). Cyclooxygenase-2 in cancer and angiogenesis. *Angiology*. 60, 242-253.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sandler,A., Gray,R., Perry,M.C., Brahmer,J., Schiller,J.H., Dowlati,A., Lilenbaum,R., and Johnson,D.H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 355, 2542-2550.
- Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-5467.
- Sattler,M., Abidoye,O., and Salgia,R. (2008). EGFR-targeted therapeutics: focus on SCCHN and NSCLC. *ScientificWorldJournal*. 8:909-19., 909-919.
- Schackert,G., Price,J.E., Bucana,C.D., and Fidler,I.J. (1989). Unique patterns of brain metastasis produced by different human carcinomas in athymic nude mice. *Int. J. Cancer*. 44, 892-897.
- Scherbarth,S. and Orr,F.W. (1997). Intravital videomicroscopic evidence for regulation of metastasis by the hepatic microvasculature: effects of interleukin-1alpha on metastasis and the location of B16F1 melanoma cell arrest. *Cancer Res*. 57, 4105-4110.
- Schlaeger,T.M., Bartunkova,S., Lawitts,J.A., Teichmann,G., Risau,W., Deutsch,U., and Sato,T.N. (1997). Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3058-3063.
- Seitz,G., Warmann,S.W., Fuchs,J., Heitmann,H., Mahrt,J., Busse,A.C., Ruck,P., Hoffman,R.M., and Wessels,J.T. (2008). Imaging of cell trafficking and metastases of paediatric rhabdomyosarcoma. *Cell Prolif.* 41, 365-374.
- Sellappan,S., Grijalva,R., Zhou,X., Yang,W., Eli,M.B., Mills,G.B., and Yu,D. (2004). Lineage infidelity of MDA-MB-435 cells: expression of melanocyte proteins in a breast cancer cell line. *Cancer Res*. 64, 3479-3485.
- Shimomura,O., Johnson,F.H., and Saiga,Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp Physiol.* 59:223-39., 223-239.
- Skubitz,A.P. (2002). Adhesion molecules. *Cancer Treat. Res.* 107:305-29., 305-329.
- Soffietti,R., Ruda,R., and Trevisan,E. (2008). Brain metastases: current management and new developments. *Curr. Opin. Oncol.* 20, 676-684.
- St Croix,C.M., Leelavanichkul,K., and Watkins,S.C. (2006). Intravital fluorescence microscopy in pulmonary research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 834-840.
- Steeg,P.S. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer*. 3, 55-63.
- Taub,D.D. (2000). Modified microchemotaxis assays. *Methods Mol. Biol.* 138:105-12., 105-112.
- Timar,J. and Dome,B. (2008). Antiangiogenic drugs and tyrosine kinases. *Anticancer Agents Med. Chem.* 8, 462-469.

- Tong,R.T., Boucher,Y., Kozin,S.V., Winkler,F., Hicklin,D.J., and Jain,R.K. (2004). Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res.* **64**, 3731-3736.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350-4354.
- Townson,J.L. and Chambers,A.F. (2006). Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle.* **5**, 1744-1750.
- van de Vijver,M.J., He,Y.D., van't Veer,L.J., Dai,H., Hart,A.A., Voskuil,D.W., Schreiber,G.J., Peterse,J.L., Roberts,C., Marton,M.J., Parrish,M., Atsma,D., Witteveen,A., Glas,A., Delahaye,L., van der Velde,T., Bartelink,H., Rodenhuis,S., Rutgers,E.T., Friend,S.H., and Bernards,R. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1999-2009.
- van't Veer,L.J., Dai,H., van de Vijver,M.J., He,Y.D., Hart,A.A., Mao,M., Peterse,H.L., van der,K.K., Marton,M.J., Witteveen,A.T., Schreiber,G.J., Kerkhoven,R.M., Roberts,C., Linsley,P.S., Bernards,R., and Friend,S.H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* **415**, 530-536.
- Voura,E.B., Jaiswal,J.K., Mattoussi,H., and Simon,S.M. (2004). Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat. Med.* **10**, 993-998.
- Vredenburgh,J.J., Desjardins,A., Herndon,J.E., Marcello,J., Reardon,D.A., Quinn,J.A., Rich,J.N., Sathornsumetee,S., Gururangan,S., Sampson,J., Wagner,M., Bailey,L., Bigner,D.D., Friedman,A.H., and Friedman,H.S. (2007). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4722-4729.
- Wang,W., Wyckoff,J.B., Frohlich,V.C., Oleynikov,Y., Huttelmaier,S., Zavadil,J., Cermak,L., Bottinger,E.P., Singer,R.H., White,J.G., Segall,J.E., and Condeelis,J.S. (2002). Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res.* **62**, 6278-6288.
- Willis,R.A. (1934). *The Spread of Tumors in the Human Body*. London, Butterworth & Co.
- Winkler,F., Kienast,Y., Fuhrmann,M., von Baumgarten,L., Burgold,S., Mitteregger,G., Kretzschmar,H., and Herms,J. (2009). Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia.* **57**, 1306-1315.
- Winkler,F., Kozin,S.V., Tong,R.T., Chae,S.S., Booth,M.F., Garkavtsev,I., Xu,L., Hicklin,D.J., Fukumura,D., di Tomaso,E., Munn,L.L., and Jain,R.K. (2004). Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* **6**, 553-563.
- Wong,C.W., Song,C., Grimes,M.M., Fu,W., Dewhirst,M.W., Muschel,R.J., and Al-Mehdi,A.B. (2002). Intravascular location of breast cancer cells after spontaneous metastasis to the lung. *Am. J. Pathol.* **161**, 749-753.
- Wood,S. (1958). Pathogenesis of Metastasis Formation Observed in Vivo in the Rabbit Ear Chamber. *AMA Arch Pathol* **66**, 550-568.

Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J.F., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W., and Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* *67*, 2649-2656.

Xue, Y., Religa, P., Cao, R., Hansen, A.J., Lucchini, F., Jones, B., Wu, Y., Zhu, Z., Pytowski, B., Liang, Y., Zhong, W., Vezzone, P., Rozell, B., and Cao, Y. (2008). Anti-VEGF agents confer survival advantages to tumor-bearing mice by improving cancer-associated systemic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 18513-18518.

Yamamoto, N., Jiang, P., Yang, M., Xu, M., Yamauchi, K., Tsuchiya, H., Tomita, K., Wahl, G.M., Moossa, A.R., and Hoffman, R.M. (2004). Cellular dynamics visualized in live cells in vitro and in vivo by differential dual-color nuclear-cytoplasmic fluorescent-protein expression. *Cancer Res.* *64*, 4251-4256.

Yamamoto, N., Yang, M., Jiang, P., Xu, M., Tsuchiya, H., Tomita, K., Moossa, A.R., and Hoffman, R.M. (2003). Real-time imaging of individual fluorescent-protein color-coded metastatic colonies in vivo. *Clin. Exp. Metastasis.* *20*, 633-638.

Yamauchi, K., Yang, M., Jiang, P., Yamamoto, N., Xu, M., Amoh, Y., Tsuji, K., Bouvet, M., Tsuchiya, H., Tomita, K., Moossa, A.R., and Hoffman, R.M. (2005). Real-time in vivo dual-color imaging of intracapillary cancer cell and nucleus deformation and migration. *Cancer Res.* *65*, 4246-4252.

Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., and Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* *407*, 242-248.

Yang, M., Jiang, P., Yamamoto, N., Li, L., Geller, J., Moossa, A.R., and Hoffman, R.M. (2005). Real-time whole-body imaging of an orthotopic metastatic prostate cancer model expressing red fluorescent protein. *Prostate.* *62*, 374-379.

Yano, S., Shinohara, H., Herbst, R.S., Kuniyasu, H., Bucana, C.D., Ellis, L.M., Davis, D.W., McConkey, D.J., and Fidler, I.J. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor is necessary but not sufficient for production and growth of brain metastasis. *Cancer Res.* *60*, 4959-4967.

Yu, L., Wu, X., Cheng, Z., Lee, C.V., LeCouter, J., Campa, C., Fuh, G., Lowman, H., and Ferrara, N. (2008). Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *49*, 522-527.

Yuan, F., Salehi, H.A., Boucher, Y., Vasthare, U.S., Tuma, R.F., and Jain, R.K. (1994). Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer Res.* *54*, 4564-4568.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
2PLSM	2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie
Abb.	Abbildung
ACI	Arteria carotis interna
ACE	Arteria carotis externa
ACC	Arteria carotis communis
Akt	Proteinkinase B
Ang	Angiopietin
AOM	Akusto-optischer Modulator
a.u.	engl.: arbitrary units
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlendioxid
Cox-2	Cyclooxygenase-2
CUP	engl.: cancer of unknown primary
DMEM	engl.: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DsRed	rot fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma sp.</i> (Synonym: RFP)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	engl.: epidermal growth factor
EGFR	engl.: epidermal growth factor receptor
EGFP	engl.: enhanced green fluorescent protein
engl.	Englisch
ELISA	engl.: enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
FACS	engl.: fluorescent activated cell sorting
FCS	engl.: fetal calf serum
FGF	engl.: fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Beschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
G418	Geneticin
GFP	engl.: green fluorescent protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HBSS	engl.: Hank's balanced salt solution
HRP	engl.: horseradish peroxidase
Hz	Hertz
IL-8	Interleukin-8
i.p.	intraperitoneal
IR	Infrarot
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LB	Luria-Bertani
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie
LTR	engl.: long terminal repeats
M	molar
mA	Milliampere
MAPK	engl.: mitogen activated protein kinase
MCS	engl.: multiple cloning site
min	Minute
MMLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
MRT	Magnetresonanztomographie
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolim
MW	Molekulargewicht
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
µM	mikromolar
mM	millimolar
NA	Numerische Apertur
nA	Nanoampere
NaCl	Natriumchlorid
NDD	Engl.: non descanned detector
ng	Nanogram
nM	nanomolar
nm	Nanometer
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PBST	engl.: phosphate buffered saline Tween-20
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PDGF	engl.: platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMT	Photomultiplier
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANTES	engl.: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RFP	engl.: red fluorescent protein
rpm	engl.: rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.c.	Subkutan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	engl.: standard error of the mean
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	engl.: transforming growth factor
TIMP	engl.: tissue inhibitor of metalloproteinase
TiSa	Titan:Saphir-Laser
TNF	tumor necrosis factor
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
uPAR	urokinaseartiger Plasminogen Aktivator Rezeptor
V	Volt
VEGF	engl.: vascular endothelial growth factor
VEGFR	engl.: vascular endothelial growth factor receptor
vs.	versus
vsvg	engl.: vesicular stomatitis virus G-protein
v/v	engl.: volume per volume
WT	Wildtyp
w/v	engl.: weight per volume
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Behandlungsschema zerebraler Metastasen	7
Abb. 2: Schema der Tumorzellmetastasierung	9
Abb. 3: Integratives Metastasierungsmodell	11
Abb. 4: Die Blut-Hirnschranke	12
Abb. 5: Vergleich von 1- und 2-Photonen-Mikroskopie	17
Abb. 6: Darstellung der verwendeten Plasmide	23
Abb. 7: Mykoplasmen-Test.....	32
Abb. 8: Schematische Darstellung zur Vorgehensweise bei retroviraler Transduktion	34
Abb. 9: Fluoreszenzaktivierte Zell-sortierung (FACS).....	35
Abb. 10: Struktur der Tie2-Promoter-Region.....	36
Abb. 11: Generierung und Zucht doppelt transgener Mäuse	37
Abb. 12: Agarosegel zur Genotypisierung von heterozygoten Nacktmäusen.....	38
Abb. 13: Agarosegel zur Genotypisierung von Tie2/GFP	39
Abb. 14: Präparationsschritte zum Einbau eines chronischen kraniellen Fensters	40
Abb. 15: Anatomische Darstellung der A. carotis interna-Injektion in der Maus	41
Abb. 16: 2-Photonen-Intravitalmikroskopie	43
Abb. 17: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines vollständigen kraniellen Fensters.....	45
Abb. 18: Dorsale Ansicht auf das Mausgehirn	48
Abb. 19: Angiogenese-Array	51
Abb. 20: Klonierungsstrategie zur Herstellung von pDsRed2-C3	53
Abb. 21: Klonierungsstrategie zur Herstellung von pLNCX2-DsRed	55
Abb. 22: Fluoreszenzintensität im Zeitverlauf <i>in vivo</i>	55
Abb. 23: Metastatische Ineffizienz.....	56

Abb. 24: Der erste obligate Schritt der Hirnmetastasierung: Passiver Tumorzellarrest.....	57
Abb. 25: Der zweite obligate Schritt der Hirnmetastasierung: Frühe Extravasation	58
Abb. 26: Der dritte obligate Schritt der Hirnmetastasierung: Strikt perivaskuläre Position	59
Abb. 27: Reziproke Interaktionen von metastasierenden Melanomzellen mit den Blutgefäßen des Gehirns	60
Abb. 28: Strikt perivaskuläre Proliferation einer A2058-Melanomzelle über 28 Tage.....	60
Abb. 29: Charakteristika erfolgreicher Makrometastasenbildung.....	61
Abb. 30: Charakteristika erfolgloser Makrometastasenbildung.....	62
Abb. 31: Chronischer Latenzzustand von Einzelzellen ohne Proliferation („Dormancy“)	63
Abb. 32: Die obligaten und ineffizienten Schritte der Hirnmetastasierung, die Sackgassen und der „Weg zum Erfolg“	64
Abb. 33: Die obligaten Schritte der Hirnmetastasierung	65
Abb. 34: Protein-Angiogenese-Array zur Charakterisierung pro- und antiangiogener Faktoren	66
Abb. 35: VEGF-Expression von Krebszellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> -Effekte v. Bevacizumab	67
Abb. 36: Bevacizumab-Therapie von Makrometastasen	67
Abb. 37: Effekte einer VEGF-A-Inhibition durch Bevacizumab	68
Abb. 38: Bevacizumab- vs. Kontroll-IgG-Therapie (Lungenkarzinom; Quantifizierung)	69

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Überblick über genotypische Eigenschaften verwendeter Bakterien.....	21
Tab. 2: Geräte und Material für mikrobiologische Arbeitsmethoden	22
Tab. 3: Sequenzierungs-Primer und Sequenzen	28
Tab. 4: Geräte und Material für molekularbiologische Arbeiten	29
Tab. 5: Verwendete permanente (immortalisierte) humane Zellkultur-Linien	30
Tab. 6: Medien und Mediensupplemente	31
Tab. 7: Genotypisierungs-Primer und Sequenzen	38
Tab. 8: PCR-Mix für Nacktmaus-Genotypisierung und PCR-Programm	38
Tab. 9: PCR-Mix für Tie2/GFP-Genotypisierung und PCR-Programm.....	39
Tab. 10: Geräte und Material für tierexperimentelle Arbeiten	47
Tab. 11: Lösungen und Puffer zur Protein-Analyse	50

9 Danksagung

Meinem Doktorvater,
Herrn Prof. Dr. Hans-Walter Pfister,
Neurologische Poliklinik Großhadern, danke ich sehr herzlich für sein Interesse an meiner Arbeit und die entgegengebrachte Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem Leiter der Neuroonkologischen Arbeitsgruppe,
Dr. Frank Winkler,
der mich in meiner Doktorarbeit nicht nur durch sein überaus kompetentes Fachwissen, sondern auch durch viel praktische Hilfe, Humor und Optimismus unterstützt und betreut hat. Als Doktorandin kann man sich keinen engagierteren Arbeitsgruppenleiter wünschen.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jochen Herms, Zentrum für Neuropathologie,
in dessen Labor ich den überwiegenden Teil meiner praktischen Arbeit durchgeführt habe. Vielen Dank für die zu jeder Zeit offene Bereitschaft zur Diskussion und die unproblematische Bereitstellung eines Laborplatzes.

Nicht weniger danken möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen aus der neurologischen Klinik und dem Zentrum für Neuropathologie, vor allem Louisa von Baumgarten und Carola Eggert, die Freude und Leid des Laboralltages mit mir teilten, sowie Dr. Uwe Koedel für hilfreiche Diskussionen.

Meinem Vater Klaus Kienast möchte ich für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit herzlich danken.

Andreas Boese möchte ich für seine liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen danken und vor allem dafür, dass er das beste Ergebnis dieser Doktorarbeit ist.

Meiner Familie, besonders meiner Mutter, möchte ich von ganzem Herzen für den Glauben an mich danken, der mir diesen Weg ermöglichte.

10 Bereits veröffentlichte Aspekte der Arbeit

Publikation:

Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation.

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WEF, Goldbrunner R, Herms J and Winkler F

Nature Medicine (Januar 2010)

Vorträge:

International Brain Tumor Reserach Conference 2010, Seeheim/Frankfurt am Main, 24.–26.03.2010

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Ullrich A, Goldbrunner R, Kretschmar H, Herms J and Winkler F

Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation.

PhD Symposium <interact 2009> am 2.4.2009, München*

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Ullrich A, Goldbrunner R, Kretschmar H, Herms J and Winkler F

Real-time imaging reveals mechanisms of brain metastasis formation: Mandatory and inefficient steps, and the role of blood vessels

3rd European Conference on Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Therapy, Padua, Italien, 6.–11.11.2008*

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Ullrich A, Goldbrunner R, Kretschmar H, Herms J and Winkler F

Real-time imaging reveals the mechanisms of brain metastasis formation: The role of pre-existing blood vessels and angiogenesis

80. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie

Winkler F, Kienast Y, von Baumgarten L, Herms J

Mechanismen der Hirnmetastasierung: ein neuer Untersuchungsansatz mittels *in vivo*-Zweiphotonenmikroskopie

Poster:

PhD Symposium <interact 2009> am 2.4.2009, München*

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Ullrich A, Goldbrunner R, Kretschmar H, Herms J and Winkler F

Real-time imaging reveals mechanisms of brain metastasis formation: Mandatory and inefficient steps, and the role of blood vessels

3rd European Conference on Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Therapy, Padua, Italien, 6.–11.11.2008*

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Ullrich A, Goldbrunner R, Kretschmar H, Herms J and Winkler F

Real-time imaging reveals the mechanisms of brain metastasis formation: The role of pre-existing blood vessels and angiogenesis

3rd Mildred Scheel Cancer Conference, Königswinter, 18.–20.06.2008

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Ullrich A, Goldbrunner R, Kretschmar H, Herms J and Winkler F

Mechanisms of brain metastasis: *In vivo* investigations using Two-Photon microscopy

Meeting der American Association for Cancer Research, LA, Kalifornien, 14.–18.04.2007

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Ullrich A, Goldbrunner R, Kretschmar H, Herms J and Winkler F

Mechanisms of brain metastasis: *In vivo* investigations using Two-Photon microscopy

11 Lebenslauf

Name Yvonne Kienast
Geburtsdatum 20.12.1980
Geburtsort Berlin
Familienstand ledig

Schulbildung

08.1987 – 06.1993 Grundschule Unter den Kastanien, Berlin
08.1993 – 06.2000 Goethe-Gymnasium, Berlin (Abschluss: Abitur)

Studium

04.2001 – 03.2005 Biotechnologie, Technische Fachhochschule Berlin
03.2003 – 08.2003 Imperial College London (Praxissemester)
10.2004 – 03.2005 Imperial College London (Diplomarbeit)

Promotion

09.2005 – 09.2009 Neurologische Klinik und Poliklinik und Zentrum für Neuropathologie
und Prionforschung
Ludwig-Maximilians-Universität München;
Betreuer: Prof. Dr. H.-W- Pfister, Dr. Winkler

Auszeichnungen und Preise

Vortragspreis (International Brain Tumor Reserach Conference 2010, Seeheim/Frankfurt am
Main, 24.– 26.03.2010)

Posterpreis für das beste Poster im Bereich „Most interesting method“ (PhD Symposium
<interact> 2009 am 2.4.2009)

Posterpreis (3rd European Conference on Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Therapy,
Padua, Italien, 6. –11.11.2008)

Posterpreis für junge Nachwuchswissenschaftler (3rd Mildred Scheel Cancer Conference,
Bonn/Königswinter, 18. –20.06.2008)

Reisestipendium der GlaxoSmithKline Stiftung München zum Meeting der American
Association for Cancer Research 2007, Los Angeles, Kalifornien

Stipendien

Promotionsstipendium der TFH Berlin zur Förderung des wissenschaftlichen weiblichen Nachwuchses (von Juni 06 bis Dezember 06)

DFG-Stipendium für die Anfertigung der Diplomarbeit am Imperial College London (von Oktober 04 bis März 05)

Publikationsliste

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WEF, Goldbrunner R, Herms J and Winkler F

Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation.

Nature Medicine 2010 Jan;16(1):116-22

Kienast Y and Winkler F

Therapy and prophylaxis of brain metastases.

Expert Review of Anticancer Therapy (Publikation im November 2010)

Kienast Y

Neue Einsichten – Metastasen beim Wachsen zusehen.

GIT-Laborfachzeitschrift (2010)

von Baumgarten L, **Kienast Y**, Herms J, Winkler F

In vivo effect of bevacizumab, an anti-VEGF antibody, on glioblastoma tumor cells and vessels

Manuscript in preparation

Winkler F, **Kienast Y**, Fuhrmann M, von Baumgarten L, Burgold S, Mitteregger G, Herms J

Imaging cancer cells invasion *in vivo* reveals mechanisms of tumor dissemination and peritumoral angiogenesis.

Glia 2009 Sep;57(12):1306-15.

Tolmachov O, Ma Y, Themis M, Patel P, Spohr H, Macleod KT, Ullrich ND, **Kienast Y**, Coutelle C, Peters S

Overexpression of connexin 43 improves electrical coupling of skeletal myoblasts with cardiac myocytes *in vitro*.

BMC Cardiovascu. Disord. 2006 Jun 6;6:25.

Harbottle RP, Vaysse L, Rahim A, **Kienast Y**, Passa O, Tolachov O, Coutelle C

Nuclear localization mediated by the adenoviral-core peptide mu enhances phage ϕ C31-integrase activity in mammalian cells.

Molecular Therapy 2005 (11):82.