

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Senninger -

Untersuchung des Adhäsions- und Migrationsverhaltens verschiedener
Tumorzelllinien in vivo in der Intravitalmikroskopie

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Domikowsky, Britta
aus Münster
2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Haier

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. A. Schwab

Tag der mündlichen Prüfung: 30. August 2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
- Direktor: Univ-Prof. Dr. med. N. Senninger -
Referent: Prof. Dr. med. J. Haier
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med A. Schwab

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchung des Adhäsions- und Migrationsverhaltens
verschiedener Tumorzelllinien in vivo in der Intravitalmikroskopie
Domikowsky, Britta

Die Haupttodesursache bei Krebserkrankungen liegt in der Bildung von Metastasen. Diese vollzieht sich in einer Reihe von hochspezifischen Schritten, wobei unter anderem die Adhäsions- und Migrationsfähigkeit der Tumorzellen eine entscheidende Rolle spielt. Dabei ist es von besonderer Bedeutung, diese Eigenschaften in vivo zu untersuchen, um das Verhalten der Zellen unter realen Bedingungen kennenzulernen. In dieser Arbeit wurden durch Intravitalmikroskopie der Rattenleber über einen Zeitraum von 30min verschiedene Aspekte, die auf Adhäsion und Migration einer Zelle wirken, analysiert. Die Tierversuche wurden am 14.06.2007 durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt (Aktenzeichen 9.93.2.10.36.07.122).

Die Bedeutung des Natrium-Protonen-Austauschers NHE-1 konnte belegt werden, da nach Blockade dieses Ionentransporters durch den Inhibitor HOE 642 die Migrationsrate der Tumorzellen in das Parenchym signifikant vermindert war.

Im Vergleich von vier verschiedenen Neuroblastomzelllinien mit unterschiedlichen metastatischen Potentialen zeigte sich dagegen interessanterweise eine deutliche Differenz zwischen den Zellen in Bezug auf die Adhäsion, nicht aber auf die Migration.

In einem weiteren Projekt wurde die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR4 in der Zellmigration untersucht: nach Stimulation des Rezeptors durch seinen Liganden, das Chemokin CXCL12 (SDF-1 α), war die Migrationsrate deutlich erhöht.

Zuletzt wurde eine experimentelle Reihe, die sich mit dem Effekt der Disintegrine Lebein-1 und Rhodocetin auf die Adhäsion und Migration von Tumorzellen beschäftigte, um die Versuche mit Intravitalmikroskopie erweitert, wobei sich ein hemmender Effekt von Rhodocetin auf die Migrationsfähigkeit der Zellen erwies.

Durch die Ergebnisse dieser vier Versuchsreihen ist das Wissen um den komplexen Vorgang der Adhäsion und Migration von Tumorzellen bei hämatogener Streuung weiter angewachsen. Je genauer man um die Mechanismen der Metastasenbildung weiß, umso besser und gezielter können therapeutische Strategien entwickelt werden. Möglicherweise lassen sich also in Zukunft Medikamente anwenden, die gezielt auf die untersuchten Strukturen wirken und so die Bildung von Metastasen reduzieren können.

Tag der mündlichen Prüfung: 30. August 2010

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Versuchsreihe A: NHE-1 Inhibition in B16-Maus-Melanomzellen	5
1.1.1. Aufbau von NHE-1	5
1.1.2. Funktion und Wirkungen von NHE-1	6
1.1.3. Der NHE-1 Inhibitor	8
1.2. Versuchsreihe B: Untersuchung von Neuroblastomzellen mit unterschiedlichen metastatischen Potentialen	9
1.2.1. Einführung	9
1.2.2. Isolierung der Zellen	10
1.2.3. Immunphänotyp und Karyotyp	11
1.2.4. Eigenschaften der Zellen	11
1.3. Versuchsreihe C: Untersuchung von HT-29 LMM Zellen und Auswirkung von SDF-1 α	13
1.3.1. Der Chemokinrezeptor CXCR4	13
1.3.2. Der CXCR4-Ligand SDF-1 α (CXCL12)	15
1.4. Versuchsreihe D: Untersuchung von HT-29 LMM Zellen unter Einfluss von Lebein-1 respektive Rhodocetin	17
1.4.1. Einführung: Integrine	17
1.4.2. Die Integrin-Inhibitoren	18
1.4.3. Eigenschaften der HT-29 LMM-Zellen	18
1.5. Ziele der Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Materialien	22
2.1.1. Zelllinien	22
2.1.1.1. B16 Maus-Melanomzellen	22
2.1.1.2. Humane Neuroblastomzelllinien SY5Y.ad und SY5Y.Lu2	22
2.1.1.3. Humane Neuroblastomzelllinien MHH.ad und MHH.Lu3	22
2.1.1.4. Humane HT-29 LMM Kolonkarzinomzellen	22
2.1.2. Enzyme/Inhibitoren	22
2.1.2.1. HOE 642 (Cariporide®)	22

2.1.2.2.	SDF-1 α (CXCL12)	22
2.1.2.3.	Isotype Control Antibody	22
2.1.2.4.	Lebein-1	22
2.1.2.5.	Rhodocetin	23
2.2.	Zellkultivierung	24
2.3.	Passagieren- Trypsinieren- Färben	24
2.4.	Spezielle Vorbereitung	25
2.4.1.	Versuchsreihe A: B16 Zellen	25
2.4.2.	Versuchsreihe B: Neuroblastomzellen	25
2.4.3.	Versuchsreihe C: HT-29 LMM Zellen	25
2.4.4.	Versuchsreihe D: Lebein-1 und Rhodocetin	25
2.5.	Intravitalmikroskopie	26
2.5.1.	Anästhesie	26
2.5.2.	Anlage arterieller Katheter	26
2.5.3.	Laparotomie	27
2.5.4.	Mikroskopie	27
2.5.5.	Observationsperiode	28
2.6.	Statistische Analyse	29
3.	Ergebnisse	30
3.1.	Versuchsreihe A: NHE-1 Inhibition in Maus-Melanomzellen	30
3.1.1.	Adhäsion	31
3.1.2.	Migration	32
3.2.	Versuchsreihe B: Untersuchung von Neuroblastomzellen mit unterschiedlichen metastatischen Potentialen	35
3.2.1.	Die SY5Y-Zellen	36
3.2.1.1.	Adhäsion	36
3.2.1.2.	Migration	37
3.2.2.	Die MHH-Zellen	38
3.2.2.1.	Adhäsion	38
3.2.2.2.	Migration	39
3.2.3.	Vergleich der Lokaltypen SY5Y.ad und MHH.ad	40
3.2.4.	Vergleich der metastatischen Zelllinien SY5Y.Lu2 und MHH.Lu3	41

3.3. Versuchsreihe C: Untersuchung von HT-29 LMM Zellen und Auswirkungen von SDF-1 α (=CXCL12)	43
3.3.1. Adhäsion	43
3.3.2. Migration	44
3.4. Versuchsreihe D: Untersuchung von HT-29 LMM Zellen unter Einfluss von Lebein-1 respektive Rhodocetin	46
3.4.1. Lebein-1	46
3.4.2. Rhodocetin	47
4. Diskussion	50
4.1. NHE-1 Inhibition reduziert Migrationsfähigkeit in B16-Zellen in vivo	50
4.2. Migrationsrate in metastatischen Neuroblastomzelllinien nicht signifikant erhöht	54
4.3. SDF-1 α verringert Adhäsion und verstärkt Migration von HT-29 LMM Zellen	58
4.4. Rhodocetin reduziert die Extravasation von kolorektalen Karzinomzellen in der Leber	61
5. Zusammenfassung und Ausblick	64
Literatur	65
Danksagung	76
Lebenslauf	77
Anhang	
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	I
Kopie der Tierversuchsgenehmigung	III

1. Einleitung

In der westlichen Welt stellen Tumorerkrankungen trotz sich ständig verbessernder Früherkennungsmöglichkeiten, Diagnostik und Therapie mit die häufigsten Todesursachen dar.

Unter Krebserkrankungen versteht man alle bösartigen Neubildungen einschließlich primär systemischer Lymphome und Leukämien. Die zurzeit häufigsten bösartigen Tumore sind Prostatakarzinome bei Männern, Mammakarzinome bei Frauen sowie Tumore der Lunge, des Kolons und Rektums und des Pankreas [Statistisches Bundesamt, Berlin].

Die Mortalitätsrate umfasst eine große Bandbreite und ist für die einzelnen Malignome sehr unterschiedlich.

Todesursache ist zumeist die (Fern-) Metastasenbildung, bei der sich Tumorzellen fern vom Primärtumor im Organismus ansiedeln. Viele Tumore zeigen dabei die Neigung in bestimmte, für sie typische Organe zu metastasieren, am häufigsten generell in Leber und Lunge [Nicolson 1988, Nicolson 1991].

Die Bildung von Metastasen vollzieht sich in einer Reihe von hochspezifischen, aufeinander aufbauenden Schritten. Eine Tumorzelle, die eine Metastase bildet, muss sich zunächst vom Primärtumor lösen und in ein Blut- oder Lymphgefäß invadieren. Dabei muss eine Zelle den Strömungskräften im Blutfluss standhalten und die Mechanismen der Immunabwehr überleben können. Im Zielorgan schließlich müssen die zirkulierenden Tumorzellen an das Kapillarendothel oder die subendotheliale extrazelluläre Matrix adhären, diese Adhäsionen stabilisieren und möglichst schnell in das Organparenchym migrieren, um toxischen Effekten des Blutes zu entgehen. Im Parenchym bilden die Zellen dann durch Proliferation eine Metastase [Fidler 2002].

Insgesamt ist nur ein Bruchteil der Tumorzellen in der Lage, alle notwendigen Schritte zu vollziehen. Daher ist der Prozess der Metastasierung generell sehr ineffektiv.

In der Frühphase der Metastasierung spielen besonders die adhäsiven und invasiven Eigenschaften der Tumorzellen eine essentielle Rolle [Schlüter et al. 2006].

Ein wichtiger und früher Schritt in der Formation von distalen Metastasen ist also das Anhaften der zirkulierenden Tumorzellen im Kapillarbett eines Organs.

Anfang des letzten Jahrhunderts wurden dabei zwei Hypothesen zu dem Arrest von Tumorzellen in tumorfernen Organen formuliert. Beide Theorien werden nach wie vor intensiv diskutiert.

Ewing vermutete, dass der mechanische Arrest der zirkulierenden Zellen im Kapillarsystem eines Organs der wichtigste Faktor in diesem Prozess sei und dass deshalb die anatomischen und hämodynamischen Bedingungen in den Organen maßgeblich das Auftreten eines Sekundärtumors bestimmten [Ewing 1928].

Im Gegensatz dazu wurde von Paget die „Seed and Soil“-Hypothese postuliert, mit der er die Meinung vertrat, dass Interaktionen zwischen den Tumorzellen („Seed“) und den Strukturen in einem Organ („Soil“) Voraussetzung für eine erfolgreiche Metastasierung seien [Paget 1889].

In jüngerer Zeit wurde nun herausgefunden, dass es sich bei diesen Interaktionen um Tumorzellen auf der einen Seite sowie Endothelzellen und Elemente der subendothelialen extrazellulären Matrix (EZM) auf der anderen Seite handelt [Nicolson 1988, Nicolson 1991]. Dabei hängt die organspezifische Metastasierung zum Einen von dem Muster der jeweiligen Komponenten auf der Tumorzelle und zum Anderen von dem Muster ihrer entsprechenden Liganden in einem Organ ab. Ein wichtiger Teil dieser Interaktionen wird dabei von Integrinen vermittelt, insbesondere die Adhäsion der Tumorzellen an Komponenten der extrazellulären Matrix [Nicolson 1989]. Interaktionen zwischen Tumorzellen und Endothelzellen dagegen werden vornehmlich über Selektine, aber auch über Mitglieder der ICAM-Gruppe, VCAM-1 sowie weitere Zelladhäsionsmoleküle reguliert [Weiss et al. 1988]. Dabei scheinen die durch Integrine modulierten Adhäsionen stärker zu sein als jene, die durch Selektine vermittelt werden. Außerdem kommt es nach erfolgter Adhäsion zu einer Integrin-vermittelten Aktivierung von intrazellulären Signalwegen, welche die Adhäsion stabilisieren und weiter die Migration der Zelle in das Organparenchym fördern können [Crissman et al. 1991].

Die zweite Voraussetzung zur Metastasenbildung ist nach der erfolgreichen Adhäsion der Tumorzelle die Auswanderung aus dem Gefäß in das Organstroma. Ohne die Fähigkeit zur Migration kann also eine Tumorzelle keine Fernmetastase bilden.

Zellmigration ist eine komplexe Abfolge von Prozessen, die in eine Bewegung der Zelle nach vorne münden [Horwitz, Parsons 1999]. Sie erfordert das Zusammenspiel sowohl der Tumorzelle als auch von Endothelzellen und extrazellulärer Matrix. Dies geschieht ebenfalls unter anderem durch Integrine und ihre Rezeptoren.

Am Anfang der Fortbewegung findet die Polarisierung der Zelle und die Bildung von Lamellipodia am führenden Zellanteil statt. Integrine fixieren nun diese zellulären Lamellipodia an der EZM, interagieren mit dem Aktinzytoskelett und triggern die Assoziation von vielen verschiedenen Signalmolekülen an den fokalen Adhäsionskontakten. Damit die Zelle ihre Translokation vervollständigen kann, müssen adhäsive Verbindungen am Ende der Zelle gelöst werden. Dies geschieht entweder durch enzymatische Spaltung der Integrine oder durch Reduktion der Integrinaffinität für die EZM an diesen Stellen. Nach der Bildung neuer Zell-EZM-Kontakte kommt es durch Aktivierung intrazellulärer Aktin-Myosin-Einheiten zu einer Kontraktion der Zelle, wodurch diese sich vorwärts bewegt [Hood et al. 2002, Lauffenburger et al. 1996].

Chemokinrezeptoren, Integrine und mit diesen interagierende zytoskelettale Proteine, welche am Vorderpol der Zelle lokalisiert sind, ermöglichen also die Bewegung nach vorne und können gleichzeitig neue adhäsive Verbindungen eingehen.

Integrine erleichtern außerdem die Zellbewegung im Gewebe durch die Aktivierung von EZM-abbauenden Enzymen, die das Gewebe teilweise destruieren und somit der Zelle Raum für Bewegung schaffen können. Maligne Zellen produzieren, aktivieren und sezernieren verschiedene Enzyme, welche spezifisch EZM-Moleküle spalten, unter anderem Hydrolasen, Proteasen, Kathepsine und Endoglykosidasen wie Heparanasen [Monsky, Chen 1993]. Die Aktivität dieser Enzyme ist essentiell für die Loslösung der Tumorzellen vom Primärtumor und für die Penetration von Lymph- oder Blutgefäßen. Zudem ist die Störung des Aufbaus oder der Integrität

der Basalmembranen in den Zielorganen durch diese Proteasen ein Schlüsselprozess bei der Tumorinvasivität und der Metastasenbildung.

Unter den proteolytischen Enzymen sind die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), eine Familie von mehr als 20 Substrat-spezifischen Endoproteasen, besonders hervorzuheben. Ihre Aktivität ist essentiell für Tumorzellinvasion, Metastasierung und Angiogenese. Sie wird auf vielerlei Weise reguliert, unter anderem durch Integrine [Brakebusch et al. 2002]. Beispielhaft sollen zwei MMPs genannt werden: MMP-2 (Gelatinase A, 72 kDa) und MMP-9 (Gelatinase B, 92 kDa). Sie besitzen die stärkste enzymatische Aktivität gegen Kollagen IV, ein Hauptbestandteil vieler Basalmembranen [Collier et al. 1988]

Der proteolytische Prozess von Zellen muss streng kontrolliert werden, um zu gewährleisten, dass die EZM ausreichend degradiert wird, aber die Zellverbindungen die Zelle noch stabilisieren können.

Damit invasive Zellen erfolgreich in ein Gewebe eindringen können, müssen sie außerdem zahlreiche Überlebensmechanismen aktivieren, um die Induktion von Apoptose zu vermeiden [Raff et al. 1992]. Auch hier spielen Integrine eine Rolle, welche in der Lage sind, einige dieser Überlebensmechanismen zu aktivieren [Hood et al. 2002].

Zelladhäsion und -migration maligner Zellen ist also ein vielschichtiger Vorgang, von dem noch längst nicht alle beteiligten Komponenten und Prozesse bekannt sind.

In dieser Arbeit wurden einige weitere Faktoren untersucht, die in zahlreichen in vitro Studien bereits in den Blick genommen worden sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen einen großen Einfluss dieser Faktoren auf die Tumorzelladhäsion und -migration vermuten. Aus diesem Grund wurden von uns in vivo Versuche mit Intravitalmikroskopie durchgeführt, mit der sich genau diese kritische Phase der Tumorzelladhäsion und Extravasation im Gefäßsystem eines Zielorgans der Metastasierung beobachten lässt. Die tierexperimentellen Untersuchungen waren notwendig, um die komplexen physiologischen Interaktionen zirkulierender Tumorzellen und biophysikalischer Faktoren besser zu berücksichtigen

Im Folgenden werden diese Studien einzeln vorgestellt.

1.1. Versuchsreihe A: NHE1-Inhibition in B16 Melanomzellen

Der Natrium-Protonen-Austauscher NHE-1 spielt in vielen physiologischen, aber auch pathologischen Prozessen im Organismus eine essentielle Rolle. In diesen Versuchen wurde der Effekt der Inhibition von NHE-1 auf die Zelladhäsions- und Migrationsfähigkeit von B16-Maus-Melanomzellen *in vivo* untersucht.

1.1.1. Aufbau von NHE-1

Bei NHE-1 handelt es sich um ein aus 815 Aminosäuren bestehendes integrales Membranprotein, welches aus zwei verschiedenen Domänen aufgebaut ist. Die N-terminale hydrophobe Domäne, bestehend aus 500 Aminosäuren ist der transmembrane Anteil, welcher sich ca. zehn- bis zwölfmal durch die Zellmembran windet und den eigentlich Ionentransporter darstellt. Das hydrophile C-terminale Ende besteht aus 315 Aminosäuren, schwimmt frei im Zytoplasma und fungiert zum einen als Protonensensor, zum anderen als Angriffsort für eine hormonelle Regulation [Wakabayashi 1997].

NHE kommt in sechs verschiedenen Isoformen vor, wobei NHE1-5 in der Plasmamembran lokalisiert sind, NHE-6 dagegen in der mitochondrialen Membran [Counillon et al. 2000, Numata et al. 1998, Ritter et al. 2001].

NHE-1 kommt ubiquitär vor;

NHE-2 v.a. im Gastrointestinaltrakt, Skelettmuskel, Hirn und Niere;

NHE-3 v.a. in Kolon und Dünndarm,

NHE-4 v.a. in Magen, Dünndarm und Kolon,

NHE-5 v.a. in nicht-epithelialen Geweben (Hirn, Milz, Hoden, Skelettmuskel),

NHE-6 ebenfalls ubiquitär.

[Stock, Schwab 2006, Klanke et al. 1995]

1.1.2. Funktionen und Wirkungen von NHE-1

Die Hauptaufgabe von NHE-1 besteht in dem Transport eines Protons aus der Zelle bei gleichzeitigem Import eines Natriumions [Orlowski et al. 2004]. Dieser Transporter arbeitet elektroneutral mithilfe des elektrochemischen Gradienten und kann deshalb auch in umgekehrter Richtung funktionieren. Die Affinität des Transporters kann z.B. durch Neurotransmitter gesteigert werden. Dadurch ergeben sich auch 3 Hauptfunktionen von NHE-1 [Grinstein et al. 1989, Mahnensmith 1985]:

1. Regulation der intrazellulären H^+ -Konzentration und damit des intrazellulären pH
2. Regulation der intrazellulären Natriumkonzentration
3. Regulation des Zellvolumens durch die Natriumkonzentration.

Im Zusammenhang mit Metastasierung kommt NHE-1 deshalb eine so wichtige Funktion zu, da auch die Zellmigration stark von NHE-1 beeinflusst wird.

Die NHE-1 Aktivität stellt die Bedingung für eine gerichtete Fortbewegung der Zelle dar. Hierbei werden die Regulation des Zellvolumens und die Fortbewegung miteinander verknüpft [Stock, Schwab 2006].

Durch die Aktivität verschiedener Transporter, u.a. NHE-1, am vorderen Lamellipodium der Zelle kommt es dort zu einem lokalisierten Einstrom von Salzen und Wasser. Dies bedingt zunächst eine Volumenzunahme des Lamellipodiums und nachfolgend ein Anschwellen des Zellkörpers, wodurch es zu einer Spannungszunahme der Plasmamembran kommt. Dadurch werden mechanosensitive Kationenkanäle aktiviert, die u.a. für Calcium durchlässig sind [Lee et al. 1999]. Somit steigt im Folgenden die intrazelluläre Calciumkonzentration, wodurch Calcium-sensitive Kaliumkanäle, die im hinteren Teil der Zelle lokalisiert sind, aktiviert werden. Durch diesen Prozess schrumpft der hintere Teil der Zelle, was durch eine Retraktion des Zytoskeletts durch Calcium-sensitive zytoskelettale Mechanismen unterstützt wird [Schneider et al. 2000]. Des Weiteren kommt es zu einer Kontraktion des Aktinomyosinnetzes und zum Verlust von Adhäsionskontakten, die durch Integrine vermittelt werden. Am Ende dieses

Zyklus kommt es dadurch zu einer Fortbewegung der Zelle nach vorne [Stock, Schwab 2006, Downey 1990, Lauffenburger 1996, Palecek 1998, Mayer et al. 2004, Clark, Brugge 1995, Huttenlocher et al. 1995, Guan, Chen 1996, Burridge et al. 1997, Felsenfeld et al. 1999].

Zum Anderen hat NHE-1 unabhängig von seiner Funktion als Ionentransporter auch eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung des Zytoskeletts inne: der Transporter fungiert als Plasmamembrananker für Aktinfilamente und ist zusammen mit Integrinen an den fokalen Adhäsionskontakten an der EZM lokalisiert [Denker et al. 2000]. Die Integrindimere sind dort an die Aktivität von NHE-1 gekoppelt: extrazelluläre Protonen stabilisieren die Kollagen-Integrin-Verbindung, so dass eine hohe NHE-1 Aktivität zu einer starken Adhäsion führt [Stock, Schwab 2006, Schwartz et al. 1990].

Außerdem beeinflusst die NHE-1 Aktivität die Expression von Genen, die zur Zellmigration beitragen. So hat es Studien gegeben die zeigten, dass der Verlust von NHE-1 zur Downregulation von Tumorsuppressorgenen führte [Putney, Barber 2004].

Tumorzellen zeigen häufig einen anaeroben glykolytischen Metabolismus, so dass es bedingt durch verminderte Vaskularisation und damit verminderte Sauerstoffversorgung zu einem Säureüberschuss in der Zelle kommt, was dann eine hohe NHE-1 Aktivität bedingt und die Zellmigration fördern kann [Stock, Schwab 2006].

Zudem gibt es immer mehr Anhaltspunkte dafür, dass nicht nur die NHE-1 Aktivität, sondern auch der saure pH im umgebenden Milieu eine wichtige Komponente für Wachstum, Invasivität, Angiogenese und maligne Progression ist [Martinez-Zaguilan et al. 1996, Xu et al. 2002, Gatenby et al. 2001].

Die NHE-1 Aktivität scheint also nicht nur intrazellulär, sondern auch extrazellulär durch Aufbau eines niedrigen extrazellulären pH Wirkungen auf die Migration und Aggressivität einer Tumorzelle zu haben:

Stock et al. demonstrierten beispielsweise, dass in humanen Melanomzellen die Integrin $\alpha 1\beta 2$ -abhängige Migration und Morphologie maßgeblich von dem durch NHE-1 induzierten extrazellulären sauren pH abhängig sind [Stock et al. 2005].

Bourguignon et al. belegten 2004, dass in Brustkrebszellen (MDA-MB 231) die NHE-1 vermittelte extrazelluläre Azidose zur Aktivierung von zwei Enzymen, Hyal-2 und Kathepsin B führte, die jeweils zur Degradation von extrazellulärer Matrix und damit zur Invasionsfähigkeit einer Tumorzelle beitragen [Bourguignon et al. 2004].

Zusammengefasst scheint also der Ionenporter NHE-1 essentiell zur Migrationsfähigkeit der Zelle beizutragen und eine wichtige Rolle in der Metastasierung zu spielen.

1.1.3. Der NHE-1 Inhibitor

Bei dem Wirkstoff HOE 642 (Cariporide®) handelt es sich um einen spezifisch den Ionenporter NHE-1 hemmenden Inhibitor aus der Familie der Benzyl-Guaninderivate [Stock, Schwab 2006].

Es gab bislang schon zahlreiche in vitro Versuche mit HOE 642, in denen sich unter anderem ein Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von Zellen zeigte. So wurde in einer Studie demonstriert, dass HOE 642 die Geschwindigkeit und Migration von humanen MV3-Zellen um bis zu 70% senken konnte [Stock et al. 2005].

Wir untersuchten nun, ob sich die Effekte der Hemmung von NHE-1 auf Adhäsion und Migration auch in vivo widerspiegeln und mittels Intravitalmikroskopie belegen lassen. Dadurch ist es möglich zu analysieren, ob sich die hemmende Wirkung von HOE 642 auch in vivo zeigt und damit einen Ansatzpunkt für die Entwicklung einer Therapie bietet, die die Bildung von Metastasen vermindern könnte.

Für B16V Zellen wurde in vitro bereits nachgewiesen, dass sie NHE-1 exprimieren und dass sich dieser Transporter in vitro durch den Inhibitor HOE 642 blockieren lässt. Zudem wurde in diesen Experimenten belegt, dass die Adhäsion und Migration dieser Zellen in vitro von der NHE-1 Aktivität abhängig sind [Stock et al., Manuskript in Vorbereitung]. Daher boten diese Zellen ideale Voraussetzungen, um diese Eigenschaften auch in vivo zu testen.

1.2. Versuchsreihe B: Untersuchung von Neuroblastomzellen mit unterschiedlichen metastatischen Potentialen

In dieser Versuchsreihe wurden von zwei verschiedenen Zelllinien eines Neuroblastoms, SY5Y und MHH, jeweils zwei Varianten mit unterschiedlichen metastatischen Potentialen auf ihre Unterschiede in der frühen Phase der Metastasierung hin untersucht. Dabei wurden in der Intravitalmikroskopie die Adhäsions- und Migrationseigenschaften der Zellen in der Rattenleber observiert.

Die Zellen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Isaac P. Witz von der Universität Tel-Aviv, Israel, zur Verfügung gestellt.

1.2.1. Einführung

Diese Zellen stammen, wie bereits erwähnt, aus einem Neuroblastom. Ein Neuroblastom ist ein solider Tumor des sympathischen Nervensystems, der sehr häufig bei jüngeren Kindern auftritt: In den USA macht das Neuroblastom 8% aller malignen Erkrankungen bei Patienten unter 15 Jahren aus [National Cancer Institute 2007]. Dieser Tumor entstammt aus der embryonalen Neuralleiste und tritt am häufigsten im Nebennierenmark auf [Vasudevan 2005]. Charakteristisch ist außerdem seine außerordentliche Heterogenität in Verhalten und Progression.

Die Prognose ist für Kinder, die älter als ein Jahr sind, eine stark fortgeschrittene Metastasierung haben oder einen sehr ausgedehnten, aggressiven Lokalbefund aufweisen mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ungefähr 30% eher ungünstig [Brodeur 2003; Brodeur, Castleberry 1997].

Wie viele andere Malignome metastasiert auch das Neuroblastom auf lymphogenem Weg in die regionalen und distalen Lymphknoten sowie auf hämatogenem Weg vor allem in Knochenmark (87%) und Knochen (66%), aber auch in Leber und Haut [Brodeur, Castleberry 1997, Brodeur 1991, Cheung 2005]. Dabei tritt, wenn überhaupt, eine Metastasierung in die Lunge erst sehr spät auf und ist ein Indiz für ein weit fortgeschrittenes und prognostisch schlechtes Krankheitsstadium [Cowie et al. 1997, Towbin 1982, Kammen 2001].

Um diese Erkrankung bestmöglich therapieren zu können, ist ein umfassendes Verständnis der Prozesse nötig, die eine Metastasierung des Primärtumors erst ermöglichen und verstärken. Dabei spielen viele unterschiedliche Faktoren, wie das Milieu des Zielorgans der Metastasierung und die Eigenschaften der Tumorzelle, eine sehr große Rolle [Fidler 2003, Witz 2008]. Ein besonderes Gewicht liegt dabei auf der genetischen Information derjenigen Tumorzellen, die in der Lage sind Metastasen zu bilden. In Kenntnis dieser Information lassen sich besonders effektiv neuere Therapiestrategien entwickeln. Es ist deshalb in diesem Forschungsbereich sehr hilfreich, Tumorzelllinien mit hohen und niedrigen metastatischen Potentialen zu analysieren, die aus demselben Primärtumor stammen. Diese Tumorzellen haben den gleichen genetischen Hintergrund und unterscheiden sich meist nur in Bezug auf die Gene, die direkt die Metastasierung betreffen.

Die Forschungsgruppe um Prof. I. Witz von der Universität Tel-Aviv hat im Rahmen eines großen Projektes mithilfe eines Tiermodells von den Neuroblastomzelllinien SY5Y und MHH jeweils zwei Varianten isoliert, eine non-metastatische Linie aus einem Nebennierentumor und eine metastatische aus Lungenmetastasen [Nevo et al. 2008]. Mit diesen Zelllinien verbessern sich die Forschungsmöglichkeiten über das Neuroblastom erheblich.

1.2.2. Isolierung der Zellen

Es handelte sich um die humanen Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y und MHH-NB-11. SH-SY5Y wurde ursprünglich aus einer Knochenmarkbiopsie gewonnen, MHH-NB-11 aus einem Nebennierenmarkstumor [Biedler et al. 1978, Pietsch et al. 1988]. Diese Zellen wurden jeweils orthotopisch in die linke Nebenniere von Nacktmäusen injiziert. Man hatte sich für eine orthotopische Injektion entschieden, da sich hierfür gezeigt hatte, dass sich so die Biologie des Primärtumors und seine Interaktion mit dem umgebenden Milieu besser reproduzieren lassen [Khanna et al. 2002].

Die Tiere wurden anschließend wöchentlich untersucht und schließlich laparotomiert, wenn sich Anzeichen des Endstadiums der Krankheit zeigten wie ein stark geschwollenes Abdomen oder Kachexie.

Aus diesem Tumor der Nebenniere wurden die „Lokalvarianten“ der Tumorzelllinien gewonnen, SY5Y.ad und MHH.ad.

Aus eventuell vorhandenen Lungenmetastasen hat man ebenfalls Zellen entnommen, kultiviert und erneut in die Nebenniere von Mäusen injiziert. Nach zwei respektive drei Zyklen dieses Verfahrens wurde schließlich aus den Lungenmetastasen eine neue, metastatische Variante der ursprünglichen Zelllinie gewonnen, SY5Y.Lu2 und MHH.Lu3 [Nevo et al. 2008].

1.2.3. Immunphänotyp und Karyotyp

Alle vier Zelllinien exprimieren hohe Level an CD 56, HLA-Klasse I sowie die für das Neuroblastom typischen Antigene TRK A, TRK B, CD44 und MRP-1 und die Chemokine und Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR3, CX3CL1, CX3CR1. Die Karyotypen sind ebenfalls nicht unterschiedlich [Nevo et al. 2008].

1.2.4. Eigenschaften der Zellen

In einem weiteren Tiermodell wurde belegt, dass in der Tat die aus Metastasen isolierten Zelllinien ein höheres Potential hatten, Metastasen zu induzieren als die Zellen aus dem Primärtumor und außerdem zu einer verkürzten Überlebenszeit führten.

Als Reaktion auf das üblicherweise in der Behandlung des Neuroblastoms eingesetzte Chemotherapeutikum Doxorubicin [Fulda et al. 1995] zeigte der metastatische Klon MHH.Lu3 in vitro eine wesentlich höhere Resistenz gegenüber diesem Therapeutikum als die Zelllinie aus dem Primärtumor, MHH.ad. Spannenderweise galt dies jedoch nicht für die metastatische Linie SY5Y.Lu2, die im Gegensatz zu ihrem Äquivalent aus dem Primärtumor, SY5Y.ad, eine eher stärkere Empfindlichkeit zeigte.

Beide metastatischen Linien reagierten dagegen wesentlich unempfindlicher auf hypoxische Bedingungen. Somit kann insgesamt von einer verstärkten Aggressivität der Linien SY5Y.Lu2 und MHH.Lu3 ausgegangen werden [Nevo et al. 2008].

Die Fähigkeit zur Migration wurde bereits über einen längeren Zeitraum durch ein in vitro Wundheilungsexperiment untersucht. Dabei zeigte sich in beiden Zelllinien, dass die metastatischen Typen schneller migrierten als ihre lokalen Äquivalente. Insbesondere die MHH.Lu3 Zellen wiesen eine Population von Zellen auf, die extrem schnell migrierten, aber auch die metastatischen SY5Y.Lu2 Zellen zeigten eine höhere Rate an Wundverschlüssen als die SY5Y.ad Zellen.

Untersuchungen über die Adhäsionsfähigkeiten der Zellen wurden in vitro bislang noch nicht durchgeführt.

In unserer Studie sind nun die entsprechenden in vivo Versuche unternommen worden und es wurde evaluiert, ob sich die metastatische und die nicht-metastatische Linie eines Zelltyps schon in der frühen Phase der Metastasierung, also innerhalb der ersten 30 Minuten, in ihrem Adhäsions- und Migrationsverhalten im Leberparenchym signifikant unterscheiden. Dazu haben wir das bekannte Modell der Intravitalmikroskopie genutzt.

1.3. Versuchsreihe C: Untersuchung von HT-29 LMM Zellen und die Auswirkungen von SDF-1 α (= CXCL12)

Diese Versuchsreihe war Teil eines Projektes, bei dem die Zusammenhänge zwischen der Stimulation des Chemokinrezeptors CXCR4 mit seinem Liganden CXCL12 und der Adhäsion und Migration von HT-29 LMM Kolonkarzinomzellen im Parenchym der Rattenleber im Fokus der Untersuchung standen.

In zahlreichen in vitro Versuchen hatte sich bereits herausgestellt, dass eine Tumorzelllinie jeweils ihr eigenes typisches Chemokinrezeptormuster aufweist, welches eine bedeutende Rolle in der Tumorzellmigration, -invasion und -proliferation spielt [Young et al. 1997, Robledo et al. 2001, Rubin et al. 2003, Chen et al. 2003]. In entsprechenden in vivo Versuchen wurde ebenfalls eine Überexpression von verschiedenen Chemokinrezeptoren, insbesondere CXCR4, bei verschiedenen Tumorzellen festgestellt, wohingegen deren Hemmung die Metastasenbildung verringerte [Müller et al. 2001, Murakami et al. 2002, Bertolini et al. 2002, Cardones et al. 2003].

1.3.1. Der Chemokinrezeptor CXCR4

Chemokinrezeptoren und ihre Liganden gehören zu einer Familie von Proteinen, die eine Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen regulieren. [Gale et al. 1999, Rossi 2000]. Diese Rezeptoren sind an heterotrimere G-Proteine gekoppelt, die aus α - und β -Untereinheiten bestehen [Zlotnik et al. 2000]. Zu dieser Familie gehört auch der Rezeptor CXCR4 [Gupta et al. 2001].

Dieser ist mit einem heterotrimeren G_i -Komplex verknüpft, der nach Stimulation durch das entsprechende Chemokin CXCL12 in seine Untereinheiten dissoziiert. Die freigewordene $G_{\alpha 1}$ -Einheit inhibiert nachfolgend die Adenylatcyclase, während das $G_{\beta\gamma}$ -Dimer zwei Signalenzyme aktiviert: die Phospholipase $C\beta$ [Chan et al. 2000; Babcock, Owens 2003] und die Phosphatidylinositol-3-Kinase [Gautam et al. 1998]. Durch diese Vorgänge werden schließlich weitere Prozesse wie die Mobilisation von Calcium, Aktinpolymerisation oder Chemotaxis in Gang gesetzt.

In früheren Untersuchungen hatte sich herausgestellt, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 eine wichtige Funktion bei der organspezifischen Metastasierung von gastrointestinalen Karzinomen hat [Gassmann et al. 2009].

Dies korreliert mit dem Ergebnis verschiedener anderer klinischer Studien: unter anderem war bei Patienten mit hepatozellulären Karzinomen beobachtet worden, dass eine Überexpression des Chemokinrezeptors CXCR4 mit einer signifikant höheren Tumorprogression, stärkerer metastatischer Streuung und einem schlechteren Outcome assoziiert war [Schimanski et al. 2006]. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie, in der die Prognose von Patienten mit Lebermetastasen aus kolorektalen Karzinomen in Zusammenhang mit der CXCR4-Expression der Tumorzellen untersucht wurde. Auch in anderen Karzinomen wie beispielsweise metastasierenden Mamma- und Prostatakarzinomen wurden erhöhte Level von CXCR4 gefunden [Holland et al. 2006]. Bei Brustkrebspatientinnen korrelierte das Muster der CXCR4-Expression sogar signifikant mit dem Grad der Lymphknotenmetastasierung [Kato et al. 2003].

In neuesten Studien ergab nun die Untersuchung von lebermetastatischen humanen kolorektalen Karzinomzellen (HT-29 LMM Zellen) ebenfalls, dass ein großer Teil der Zellen CXCR4 an der Oberfläche aufweist und außerdem in fast allen Zellen (95%) CXCR4 intrazellulär gespeichert wird. Zudem lässt sich häufig CXCR4-mRNA nachweisen. Im Gegensatz dazu wiesen Zellen mit nur geringen metastatischen Potentialen (Caco-2 und HT-29P) auch nur sehr geringe Level an CXCR4 an der Zelloberfläche auf und kaum CXCR4-mRNA [Gassmann et al. 2009].

Dieser Chemokinrezeptor ist somit in jüngster Zeit der Gegenstand intensiver Forschungen, da sich die Anzeichen häufen, dass die Interaktionen dieses Rezeptors mit seinem Liganden eine entscheidende Rolle in der Metastasierung insbesondere kolorektaler Karzinome spielen.

1.3.2. Der CXCR4-Ligand CXCL12 (=SDF-1 α)

Chemokine gehören zu einer Proteinfamilie, die unter anderem in die Migration von Zellen an ihren anatomischen Bestimmungsort involviert sind, welches eine Rolle in der Embryogenese, der Immunabwehr, aber auch der Metastasenbildung im Rahmen einer Tumorerkrankung spielt. Es gibt zwei Hauptgruppen der Chemokine, die CC- und die CXC-Gruppe [Murphy et al. 2009].

Zur letzteren gehört das Chemokin CXCL 12 (SDF-1 α = stroma cell-derived factor 1), das in multiple biologische Prozesse involviert ist, unter anderem in die kardiale und neuronale Entwicklung, Stammzellmotilität, Neovaskularisation, Angiogenese, Apoptose und Tumorgenese. Dieses Chemokin ist der spezifische Ligand des Rezeptors CXCR4 [Burns et al. 2006].

Es ist bereits bekannt, dass der CXCR4-Ligand CXCL12 in humanem Lebergewebe stark exprimiert wird [Müller et al. 2001]. Nun haben neueste immunhistochemische Analysen die genaue Lokalisation von CXCL12 ergeben: in der normalen humanen Leber befindet sich CXCL12 zwischen den Lebersinusoiden und dem Leberparenchym. Zudem waren sinusoidale Endothelzellen wie auch andere disseminierte Zellen, wahrscheinlich Kupfferzellen, ebenfalls stark positiv für CXCL12. Somit ist dieses Chemokin so lokalisiert, dass es gut zwischen dem Lebergewebe und den in den Gefäßen zirkulierenden Tumorzellen, die den entsprechenden Rezeptor CXCR4 tragen, in der frühen Phase der Metastasierung vermitteln kann [Gassmann et al. 2009].

Da HT-29 LMM Zellen wie auch die hepatozellulären Karzinomzellen HepG2 starke CXCR4-Expressionen aufweisen, wurden mit diesen Zellen Versuche mit der Intravitalmikroskopie unternommen.

Für HepG2-Zellen konnte bereits belegt werden, dass eine Inhibition von CXCR4 die Diapedese der Zellen aus dem Gefäß deutlich erschwert, wohingegen eine Stimulation mit CXCL12 diese verstärkt. Die Adhäsion war nicht beeinflusst worden [Gassmann et al. 2009].

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde nun in der Intravitalmikroskopie nach entsprechenden vorangegangenen in vitro Studien untersucht, inwieweit sich Adhäsion und Migrationsverhalten zirkulierender HT-29 LMM-Zellen in vivo durch vorherige Inkubation mit SDF-1 α verändern. Dabei ging es um die Frage, ob CXCL12 ein spezifisches „Extravasationsprogramm“ induzieren kann, wie es ja auch bei den hepatozellulären Karzinomzellen der Fall zu sein scheint.

1.4. Versuchsreihe D: Untersuchung von HT-29 LMM Zellen unter Einfluss von Lebein-1 respektive Rhodocetin

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss der aus Schlangengiften gewonnenen Integrin-Inhibitoren Lebein-1 bzw. Rhodocetin auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten von HT-29 LMM-Zellen in den Lebersinusoiden der Ratte untersucht.

1.4.1. Einführung: Integrine

Das kapillare Gefäßsystem der Leber unterscheidet sich in seinem Aufbau von vielen anderen Geweben, was gerade in der Metastasenbildung eine wichtige Rolle spielen kann. Typisch für Lebersinusoiden ist die unvollständige Auskleidung der Gefäße mit Endothel, so dass die dahinterliegende extrazelluläre Matrix teilweise direkt mit dem Blutstrom und damit mit zirkulierenden (Tumor-) Zellen in Kontakt treten kann [Haier et al. 2004, Hahn et al. 1980].

Für diese Zell-Matrix Interaktionen sind größtenteils Integrine verantwortlich [Brakebusch et al. 2002; Hood, Cheresh 2002]. Integrine sind eine Proteinfamilie von heterodimeren Rezeptoren an der Zelloberfläche, die alle aus zwei Untereinheiten aufgebaut sind, dem α - und dem β -Teil, die non-kovalent verbunden sind [Hynes 2002]. Funktion der Integrine ist es, dynamische Verbindungen zwischen extrazellulären Adhäsionsmolekülen und dem intrazellulären Zytoskelett herzustellen.

Man unterscheidet 19 α - und 8 β -Einheiten, die sich beim Menschen zu insgesamt 24 verschiedenen Integrinen zusammensetzen. Eine intakte Funktion von Integrinen ist erforderlich für eine Vielzahl von Aufgaben, unter anderem für den Gewebezusammenhalt und die Zellmigration [Humphries 2000].

Integrine können eine Verbindung mit verschiedenen Bestandteilen der Kollagenfamilie eingehen, dabei unterscheiden sich die Integrine hinsichtlich ihrer Spezifität, mit der sie sich an die unterschiedlichen Kollagene binden können [Eble 2005; Myllyharju, Kivirikko 2004]. Als Beispiel seien die Laminin-bindenden Integrine genannt: Das Integrin $\alpha3\beta1$ bindet sich an Laminin-5 und -10, die

Integrine $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ dagegen an fast alle Lamininunterformen [Nishiuchi et al. 2006, Eble et al. 1998, Colognato, Yurchenco 2000].

Andere Integrine, wie $\alpha 5\beta 1$ oder $\alpha v\beta 3$, binden sich an die Aspartat-Glycin-Arginin (RGD-) Schleife von Fibronectin, Vitronectin oder des von-Willebrand-Faktors [Ruoslathi 1996, Eble 2001]. In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass diese RGD-abhängigen Integrine eine Rolle in der Metastasierung spielen können [Eble, Haier 2006].

1.4.2. Die Integrin-Inhibitoren

Bei Lebein-1 handelt es sich um ein Disintegrin aus dem Gift der Levantenotter (*Vipera lebetina*) aus der Familie der Vipern, welches Integrininteraktionen mit Lamininen RGD-unabhängig blockiert [Eble et al. 2003].

Rhodocetin ist ein C-Typ Lectin aus dem Gift der Malaysischen Mokassin-Grubenotter (*Calloselasma rhodostoma*), ebenfalls aus der Familie der Vipern, welches spezifisch das Integrin $\alpha 2\beta 1$ inhibiert [Eble et al. 2001; Eble, Tuckwell 2003].

1.4.3. Eigenschaften der HT-29 LMM Zellen

Die in den Versuchen verwendeten humanen kolorektalen Karzinomzellen vom Typ HT-29 LMM exprimieren auf ihrer Oberfläche vor allem $\alpha 2\beta 1$ -Integrine, $\alpha 6\beta 1$ - und $\alpha 6\beta 4$ -Integrine sowie in etwas geringerer Zahl auch $\alpha 1\beta 1$ -Integrine. In kleinen Mengen wurden Fibronectin-bindende Integrine wie $\alpha 5\beta 1$ - und αv -enthaltende Integrine gefunden [Rosenow et al. 2008].

Intensive Forschungen aus dem Jahr 2008 um Lebein-1 und Rhodocetin ergaben in vitro bei den hepatozellulären Karzinomzellen HepG2 nach Behandlung durch Lebein-1 sowohl eine Adhäsionshemmung an die Kollagene I und IV, Laminin-1 und Fibronectin sowie eine Migrationshemmung auf den Kollagenen I und IV und Fibronectin. In vitro ließ sich die Reduktion der Adhäsion für Rhodocetin nicht nachweisen, wohl aber eine Hemmung der Migration, allerdings nur auf Kollagen I.

Bei entsprechenden in vivo Versuchen mit Intravitalmikroskopie konnte man für HepG2-Zellen eine signifikante Hemmung der Adhäsion und Migrationsrate durch vorherige Inkubation der Zellen sowohl mit Lebein-1 als auch mit Rhodocetin nachweisen.

In einem Versuchsaufbau mit HT-29 LMM Zellen zeigte sich hierbei in vitro auch ohne Zusatz von Inhibitoren nur eine schwache Adhäsion für Kollagene I und IV, Laminin-1 und Fibronectin. Migrationsversuche wurden in vitro nicht unternommen.

Zum Abschluss dieser Versuchsreihe haben wir eine in vivo Analyse der Adhäsion und Migration von HT-29 LMM-Zellen unter Einfluss von Lebein-1 und Rhodocetin mit Intravitalmikroskopie durchgeführt.

1.5. Ziele der Arbeit

Zur Erforschung der verschiedenen Schritte, die während der Bildung von Metastasen aufeinander folgen, sind *in vitro* Analysen sehr hilfreich, um detaillierte biochemische Informationen über die zellulären Prozesse zu gewinnen, die in den einzelnen Stufen ablaufen. Trotzdem lassen sich die komplexen Verhältnisse in einem Organismus, welche sich signifikant auf das Verhalten von Tumorzellen auswirken, nicht vollkommen naturgetreu nachbilden. Beispielsweise können zum einen Kapillarwände nicht komplett *in vitro* rekonstruiert werden, zum anderen beeinflussen biophysikalische Faktoren wie Scherkräfte im Blutstrom intrazelluläre Signalwege, die eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion und Migration spielen. *In vitro* Analysen erlauben auch keine Beurteilung darüber, ob eine Tumorzelle in der Lage ist, sämtliche Metastasierungsschritte zu vollziehen, sondern es lassen sich lediglich einzelne Schritte untersuchen [Fisch, Haier in: Cancer Handbook, Kap. 74].

Aus diesen Gründen sind *in vivo* Studien unverzichtbarer Bestandteil in der Tumorforschung, um das Verhalten von Tumorzellen unter realen Bedingungen zu beobachten. Tiermodelle sind bereits seit vielen Jahren fester Bestandteil der Tumorforschung. Oft bieten sie die einzige Möglichkeit, die komplexen Interaktionen zwischen dem Tumor und dem Organismus darzustellen, die vergleichbar mit den Bedingungen im menschlichen Körper sind. Die Wahl des Tiermodells- beispielsweise Maus, Ratte oder Kaninchen- ist dabei enorm wichtig. So finden sich beispielsweise zwischen den Spezies geringe, aber bedeutsame Unterschiede im Durchmesser der Gefäßwände, wodurch beeinflusst wird, ob eine Tumorzelle aufgrund von mechanischem Arrest oder dynamischen Interaktionen in einem Gefäß adhäriert. Daher haben wir uns in dieser Arbeit für das Modell der Ratte entschieden.

Die Intravitalmikroskopie (IVM) bietet die Möglichkeit, eine frühe Phase der Metastasenbildung, nämlich die Adhäsion der Tumorzellen an die Gefäßwände und die Auswanderung aus dem Gefäß in das Gewebe, zu beobachten. Dadurch lassen sich besonders Erkenntnisse über die in dieser Phase wichtigen Komponenten gewinnen, wie beispielsweise Integrine, Chemokine und Ionenkanäle.

In früheren Arbeiten wurde bereits die Bedeutung der Intravitalmikroskopie für die Untersuchung des Adhäsions- und Migrationsverhaltens von Tumorzellen verdeutlicht [Haier et al. 2004].

Die meisten *in vivo* Modelle erstrecken sich über einen längeren Zeitraum. Insbesondere experimentelle Metastasierungsstudien, in denen den Tieren Tumorzellen injiziert werden und anschließend die Bildung von Metastasen observiert wird, können sich über Monate hinziehen. Zudem lässt sich in den meisten Tiermodellen der Progress einzelner Zellen kaum nachvollziehen.

Wenigstens teilweise können diese Limitationen durch Intravitalmikroskopie behoben werden. So lassen sich zirkulierende Tumorzellen in bestimmten Zielorganen der Metastasierung beobachten, wie in dieser Arbeit in der Leber. Dabei können insbesondere die Zelladhäsion, Extravasation/Migration sowie Interaktionen mit anderen zirkulierenden Zellen untersucht werden.

Dadurch ist die Intravitalmikroskopie eine gute Möglichkeit, um einzelne Aspekte zu analysieren, die bereits für sich genommen *in vitro* untersucht wurden, nicht jedoch *in vivo*.

Somit werden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Zelllinien, Rezeptoren und andere Strukturen, deren Adhäsions- und Migrationseigenschaften *in vitro* bereits untersucht worden sind, auf diese Eigenschaften hin mit dieser Methode *in vivo* analysiert.

Dabei geht es in jeder der Studien um die Frage, ob sich die *in vitro* nachgewiesenen Ergebnisse auch *in vivo* reproduzieren lassen. Wenn die einzelnen Faktoren, die in der Bildung von Metastasen eine Rolle spielen *in vitro* und *in vivo* genau untersucht worden sind, lassen sich diese Erkenntnisse möglicherweise eines Tages in therapeutische Strategien umsetzen, mit denen die Bildung von Metastasen reduziert und das klinische Outcome der Patienten verbessert werden kann.

2. Material und Methoden

Ziel der Arbeit ist es, die Adhäsion und Invasion der Tumorzellen in der frühen Phase der Metastasierung in das Leberparenchym der Ratte mithilfe von Intravitalmikroskopie darzustellen. Wir haben uns dabei für die Mikroskopie der Leber entschieden, da die Leber eines der häufigsten Zielorgane in der Metastasenbildung ist, insbesondere für die verwendeten Zelltypen wie die kolorektalen Karzinomzellen.

2.1. Materialien

2.1.1. Zelllinien

- 2.1.1.1. B16 Maus-Melanomzellen
- 2.1.1.2. Humane Neuroblastomzelllinien SY5Y.ad und SY5S.Lu2
- 2.1.1.3. Humane Neuroblastomzelllinien MHH.ad und MHH.Lu3
- 2.1.1.4. Humane HT-29 LMM Kolonkarzinomzellen

2.1.2. Enzyme/Inhibitoren

- 2.1.2.1. HOE 642 (*Cariporide*®) (Firma Sanofi Aventis, Frankfurt, Deutschland)
- 2.1.2.2. SDF-1 α = CXCL 12 (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland)
- 2.1.2.3. Isotype Control Antibody (IgG 2b Mouse) (R&D Systems)
- 2.1.2.4. Lebein-1

Lebein-1 wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J.A. Eble, Institut für Biochemie, Universität Münster.

Lebein-1 wurde aus dem Gift der Schlange *V. lebetina* gewonnen. Gefriergetrocknetes Schlangengift wurde von der Berchtesgadener Schlangenfarm (Berchtesgaden, Deutschland) und Sigma erworben.

Dieses gefriergetrocknete Gift wurde in 20mM Natriumphosphat, pH 6,5, 50mM Natriumchlorid und 1mM EDTA aufgelöst und durch Gelfiltration in einer Superose 6 Column (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden) in der gleichen Pufferlösung aufgetrennt. Die $\alpha 7\beta 1$ -Integrin inhibierenden Fraktionen wurden gepoolt, 20mM MES, pH 6,0, verdünnt und anschließend auf eine Mono S Column (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden) geladen. Die $\alpha 7\beta 1$ -Integrin

inhibierende Aktivität von Lebein-1 wurde in einer Reihe von linearen Natriumchlorid-Gradienten bei 140mM eluiert. Diese eluierte Fraktion wurde einzeln gepoolt und aufgetrennt in einer C8 Reversed-Phase Column (Nucleosil, Macherey Nagel) mit einem linearen Gradienten von 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser bis 80% Acetonitril in 0,08% Trifluoressigsäure/Wasser. Lebein-1 wurde als einzelner Peak eluiert, gefriergetrocknet und in Wasser aufgelöst. Die Proteinkonzentration wurde mit einem BCA Assay bestimmt und die Reinheit in einer SDS-Page überprüft [Eble et al 2003].

2.1.2.5. Rhodocetin

Rhodocetin wurde ebenfalls von J.A. Eble zur Verfügung gestellt.

Es wurde aus dem Gift der Schlange *C. rhodostoma* gewonnen. Das gefriergetrocknete Gift dieser Schlange (Sigma), wurde zunächst in TBS, pH 7,4, welches 1mM EDTA enthielt (TBS/EDTA), bei einer Proteinkonzentration von 200mg/ml gelöst. Die Proteine wurden durch Gelfiltration in einer Superose 6 Column HR 30/30 (Amersham Pharmacia Biotech) mit TBS/EDTA bei 0,3ml/min separiert. Zwei verschiedene Fraktionen inhibierten die Bindung von löslichem $\alpha 2\beta 1$ -Integrin. Diese Fraktionen enthielten den Low Molecular Weight Calloselasma Inhibitor (LMW-CI). Sie wurden anschließend in 20mM MES/NaOH, pH 6,5 (Mono S Puffer A) verdünnt und in einer Mono S HR 5/5 Column (Amersham Pharmacia Biotech) filtriert. Die verbliebenen Proteine wurden in einem linearen Gradienten von 0-20% Mono S Puffer B (1M NaCl in Mono S Puffer A) innerhalb von 60 min eluiert. Im dritten Schritt wurde die LMW-CI enthaltende Lösung an einen pH von 8,5 durch Verdünnung mit 20mM Tris/HCl (pH 8,5, Mono Q Puffer A) angeglichen. Mit einem linearen Gradienten von 0-50% Mono Q-Puffer B (1M NaCl in Mono Q-Puffer A) wurde LMW-CI von der Mono Q Column eluiert. Die eluierten LMW-CI Fraktionen wurden mit zentrifugaler Ultrafiltration in einer Centricon 10 Tube konzentriert. Um verbliebene Proteine weiter zu reduzieren, wurde eine letzte Gelfiltration mit einer TSK G3000SWXL Column (TosoHaas, Stuttgart, Deutschland) mit 0,4ml/min vorgenommen. Die Reinheit des LMW-CI wurde durch eine SDS-Page überprüft. LMW-CI ist identisch mit Rhodocetin [Eble et al 2001].

2.2. Zellkultivierung

Um eine optimale Entwicklung der Zellen auch unter künstlichen Bedingungen zu gewährleisten, hat man versucht, das natürliche Milieu so gut wie möglich zu imitieren. Dazu erfolgte die Kultivierung der Zellen jeweils mit RPMI 1640 Medium (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) mit einem Anteil von 10% FBS (GIBCO-BRL, Karlsruhe, Deutschland) in einem speziellen Zellinkubator bei 37°C mit einem CO₂-Luftgehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 90%. Um eine Zellkontamination zu vermeiden wurde stets unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar Flow Werkbank gearbeitet. Auf den Einsatz von Antibiotika wurde verzichtet.

2.3. Passagieren- Trypsinieren- Färben

Die Zellen sind alle 2-3 Tage passagiert worden, um ein ungestörtes Wachstum und ausreichendes Nährstoffangebot zu ermöglichen. Dazu wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und dann mit 1,5 ml Trypsin voneinander gelöst. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von ca. 3 ml FKS-haltigem RPMI-Medium abgestoppt. Nach Zentrifugation, 5 min bei 1000 Umdrehungen/min, wurden die Zellen mit frischem Medium resuspendiert und anschließend auf mehrere Kulturflaschen verteilt.

Zur Vorbereitung auf einen Versuch wurden die Zellen zunächst ebenfalls mit PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Sie wurden danach erneut mit PBS gewaschen und ein zweites Mal zentrifugiert, bevor sie mit 1% BSA-Lösung in RPMI 1640 Medium resuspendiert worden sind.

Nach Zugabe des Fluoreszenz-Farbstoffes CalceinAM (Molekular Probes, Leiden, Niederlande) mit einer Konzentration von 2µl/ml folgte nun die Inkubation im Brutschrank über 45-60 min. Durch diesen Prozess wurden die Zellen fluoreszenzmarkiert.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in 5 ml PBS resuspendiert, am CASY-Zellzähler (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) gezählt und anschließend mit PBS auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml verdünnt. Sie konnten nun dem Tier injiziert werden.

2.4. Spezielle Vorbereitung

2.4.1. Versuchsreihe A: B16-Zellen

Bei Einsatz von HOE 642 wurden nach der Verdünnung der B16 Maus-Melanomzellen auf 1×10^6 Zellen/ml 2ml der Zelllösung abpipettiert und es wurden 80µl HOE 642 dazugegeben (= 40µl/ml), bei einer Stammlösung von 15mM.

2.4.2. Versuchsreihe B: Neuroblastomzellen

Diese Zellen sind nur nativ untersucht worden. Nach dem Färben der Zellen erfolgte keine weitere Behandlung.

2.4.3. Versuchsreihe C: HT-29 LMM Zellen

Bei der Vorbehandlung mit SDF-1 α erfolgte nach Verdünnung der HT-29 LMM Zellen auf 1×10^6 Zellen/ml eine erneute Inkubation im Brutschrank über 10 min mit SDF-1 α in einer Konzentration von 10µl/ml, das entspricht 500ng/ml. Alternativ wurde eine Kontrollgruppe mit Isotype Control Antibody IgG 2b vorbehandelt.

2.4.4. Versuchsreihe D:

Lebein-1:

Lebein-1 wurde zusammen mit CalceinAM zu den Zellen dazugegeben und somit ebenfalls über 45-60 min inkubiert. Die Konzentration betrug 7µg/ml.

Rhodocetin:

Rhodocetin wurde ebenfalls gemeinsam mit CalceinAM den Zellen zugesetzt und über 45-60 min im Brutschrank inkubiert. Hierbei wurden 5µg/ml dazugegeben.

2.5. Intravitalmikroskopie

Für die Intravitalmikroskopie verwendeten wir ausgewachsene, junge, männliche Ratten der Rasse Sprague-Dawley mit einem Gewicht von durchschnittlich 250-300g (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Tierversuche wurden genehmigt von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Aktenzeichen 9.93.2.10.36.07.122.

2.6. Anästhesie

Die Tiere erhielten eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Curamed, Karlsruhe, Deutschland), Sauerstoff und Lachgas. Dazu wurden die Tiere zunächst zur Einleitung der Narkose in ein Plastikgefäß gebracht, in welches die Gase mit einem Flow von ca. 6 l/min eingebracht wurden. Die Konzentration an Isofluran betrug 5 Vol%. Die Dauer der Einleitungsphase war je nach Alter und Gewicht der Tiere unterschiedlich lang, dauerte aber meist nur wenige Sekunden. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden die Tiere auf den geheizten Operationstisch umgelagert, und konnten dann im weiteren Versuchsablauf mittels Maskeninhalation anästhesiert werden. Der Flow wurde während der Operation entsprechend auf 0,6 l/min mit einem Isoflurananteil von 1,5 Vol% reduziert. Das Verhältnis von Lachgas zu Sauerstoff betrug 2:1. Die Atmung erfolgte während des gesamten Versuches spontan.

2.7. Anlage des arteriellen Katheters

Als nächstes wurde ein Katheter in die rechte A. carotis gelegt und bis ins linke Herz vorgeschoben. Dieser Katheter diente der späteren Applikation von Tumorzellen. Wir haben uns für eine intraarterielle und nicht intravenöse Gabe der Tumorzellen entschieden, da sich in vorherigen Arbeiten gezeigt hatte, dass mit dieser Applikationsart weniger hämodynamische Komplikationen und eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einhergehen [Schlüter et al. 2006].

2.8. Laparotomie

Anschließend wurde eine weite mediane Längsschnittlaparotomie vorgenommen und der Darm der Tiere der besseren Übersicht halber ausgelagert, in feuchte Tücher geschlagen und intermittierend mit angewärmter, isotoner Kochsalzlösung befeuchtet. Der linke Leberlappen wurde mittels Durchtrennung der Leberligamente vorsichtig mobilisiert, ohne dabei die Unterseite zu berühren oder die Mikrozirkulation zu beeinträchtigen.

2.9. Mikroskopie

Die Tiere wurden nun auf einer Wärmeplatte unter dem Mikroskop auf die linke Seite gelagert und fixiert. Es erfolgte die partielle Luxation und Drehung des vorher mobilisierten linken Leberlappens und dessen Auslagerung auf einem speziellen Träger. Die Leber wurde, um eine Austrocknung zu vermeiden, konstant mit angewärmter isotoner Kochsalzlösung benetzt. Ein Objektglas wurde vorsichtig auf der (nun oben liegenden) Unterseite der Leber platziert. Das Mikroskopieren erfolgte dann mit einem 20er-Objektiv unter Verwendung von 0,9% Kochsalzlösung als Immersionsmittel.

Bei dem Mikroskop handelte es sich um ein aufrechtes Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland).

2.10. Observationsperiode

Es erfolgte nun die intraarterielle Applikation von 1×10^6 Tumorzellen in 1ml PBS-Lösung über 60 sec. Diese Volumengabe hatte keine Auswirkungen auf die Herzkreislauffunktion der Tiere [Schlüter et al. 2006].

Anschließend wurde die Oberfläche der Leber über einen Zeitraum von insgesamt 30 min mikroskopiert. Es wurden in 5-Minuten-Intervallen je 28 Gesichtsfelder analysiert und jeweils die Häufigkeit des Auftretens von zirkulierenden, adhärennten sowie ins Leberparenchym migrierten Zellen bestimmt. Dabei genügte die Autofluoreszenz der Leber, um das Leberparenchym und das Gefäßsystem zu unterscheiden und die Lokalisation der mit CalceinAM markierten Tumorzellen sicher zu bestimmen.

Nach Abschluss des Versuches erfolgte die Tötung der Tiere durch intraarterielle Injektion von 2-3ml 7,45%-Kaliumchloridlösung.

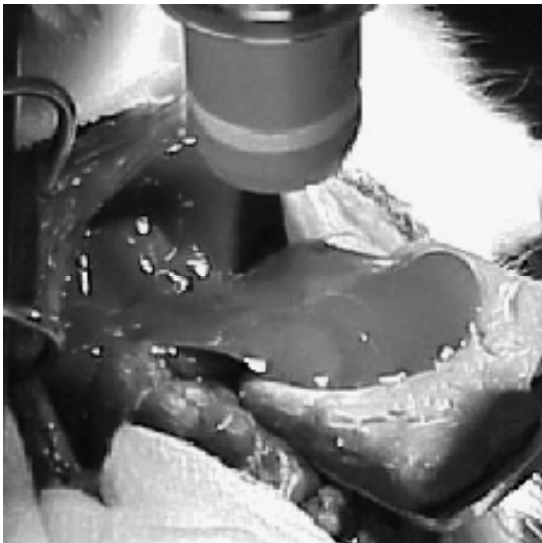


Abb. 1: Aufbau Intravitalmikroskopie. Mobilisierung, Luxation und Auslagerung der linken Leberlappens und Positionierung unter dem Mikroskop [Gassmann et al. 2009].

2.11. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem Microsoft Office Excel 2007 Programm durchgeführt sowie mit dem SPSS-Programm (PASW Statistics 18, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Es sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der adhären und migrierten Zellen bestimmt worden, sowie die relative Migrationsrate als prozentualer Anteil der migrierten Zellen an allen arretierten Zellen. Diese Werte wurden jeweils auf 28 beobachtete Gesichtsfelder pro 5-Minuten-Intervall berechnet.

Die Gruppen sind mit dem t-Test oder mit dem Scheffé-Test (ANOVA posthoc test) miteinander verglichen worden. Die Signifikanz wurde festgelegt als $P < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1. Versuchsreihe A: NHE-1 Inhibition in B16 Maus-Melanomzellen

In dieser Versuchsreihe wurde die Bedeutung des NHE-1 Inhibitors HOE 642 für Adhäsion und Migration von B16-Maus-Melanomzellen hin überprüft. In jeder Gruppe sind 8 Tiere untersucht worden.

Den Tieren wurden 1×10^6 B16 Maus-Melanomzellen in 1 ml PBS-Lösung intraarteriell über 60 sec injiziert, teilweise nach vorheriger Behandlung mit HOE 642. Die Zellen beider Gruppen waren fluoreszenzmarkiert mit CalceinAM.

Schon wenige Sekunden nach der Injektion zeigten sich in den Lebersinusoiden erste Tumorzellen, die mit dem Blutstrom durch die Kapillaren zirkulierten. Bereits innerhalb der ersten 5 min kam es dann auch zu Adhäsionen der Zellen an die Gefäßwände. Dabei ließen sich diese Adhäsionen nicht durch mechanischen Einschluss der Zellen in den Gefäßen erklären, da der Durchmesser des Lumens der Lebergefäße in der Regel größer war als der der Zellen. Zudem wurde neben den Zellen ein persistierender Blutstrom beobachtet, der einen Verschluss des Lumens durch die Tumorzelle ebenfalls ausschloss. Einige dieser adhärierten Zellen lösten sich nach einiger Zeit wieder, andere dagegen verließen die Blutbahn und begannen, in das Lebergewebe auszuwandern. Dieses Phänomen ließ sich ebenfalls bereits innerhalb der ersten Minuten beobachten.

Dabei war zwischen den beiden Gruppen, der unbehandelten Kontrollgruppe und der mit HOE vorbehandelten Zellen, ein deutlicher Unterschied in Bezug auf die Migration der Zellen zu erkennen, nicht jedoch in der Adhäsion.

3.1.1. Adhäsion

Die unbehandelten B16-Zellen zeigten eine hohe Adhäsionskraft und es adhärten schon innerhalb der ersten 5 min $29,7 \pm 10,0$ Zellen/28 mikroskopierte Felder an den Lebersinusoiden und erreichten durchschnittlich ihr Maximum nach 15 min, in denen $47,8 \pm 19,4$ Zellen adhärten. In der letzten Phase des Versuches, also zwischen Minute 25-30 ließen sich dann $38,9 \pm 16,6$ Zellen bestimmen.

Kein deutlicher Unterschied zeigte sich in der Adhäsionsrate der mit HOE 642 vorbehandelten Zellen. Die Zahl der adhärten Zellen unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von der der Kontrollgruppe.

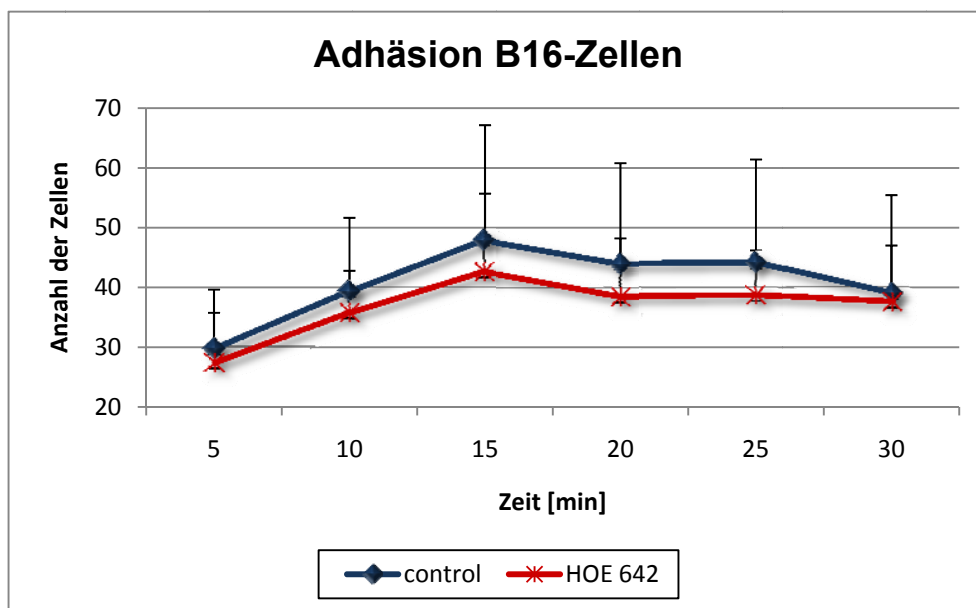


Abb.2.1: Adhäsion der B16-Zellen im Vergleich

3.1.2. Migration

Anders verhielt es sich in der Analyse der Migrationsdaten. Hier zeigte sich schon in dem ersten 5 Minuten-Intervall ein deutlicher Unterschied: während die unbehandelten B16-Zellen eine starke Tendenz zur Extravasation und Migration ins Gewebe erkennen ließen, war dieser Trend bei den mit HOE 642 vorbehandelten Zellen deutlich niedriger: migrierten bei den unbehandelten Zellen in den ersten Minuten durchschnittlich $11,7 \pm 6,3\%$ der Zellen ins Gewebe, betrug dieser Wert bei den mit HOE 642 behandelten Zellen nur $7,3 \pm 3,6\%$. Noch deutlicher zeigte sich dieser Effekt im Laufe des Versuchsablaufes: im Intervall Minute 15-20 lag die Extravasationsrate der unbehandelten Zellen bei $18,2 \pm 5,0\%$, jedoch nur bei $11,5 \pm 3,4\%$ in der HOE-Gruppe ($P < 0,05$). Nach 30 Minuten waren in der Kontrollgruppe $20,1\%$ der arretierten Zellen in das Gewebe migriert, wohingegen dieser Anteil in der HOE-Gruppe lediglich bei $11,5\%$ lag ($P < 0,05$).

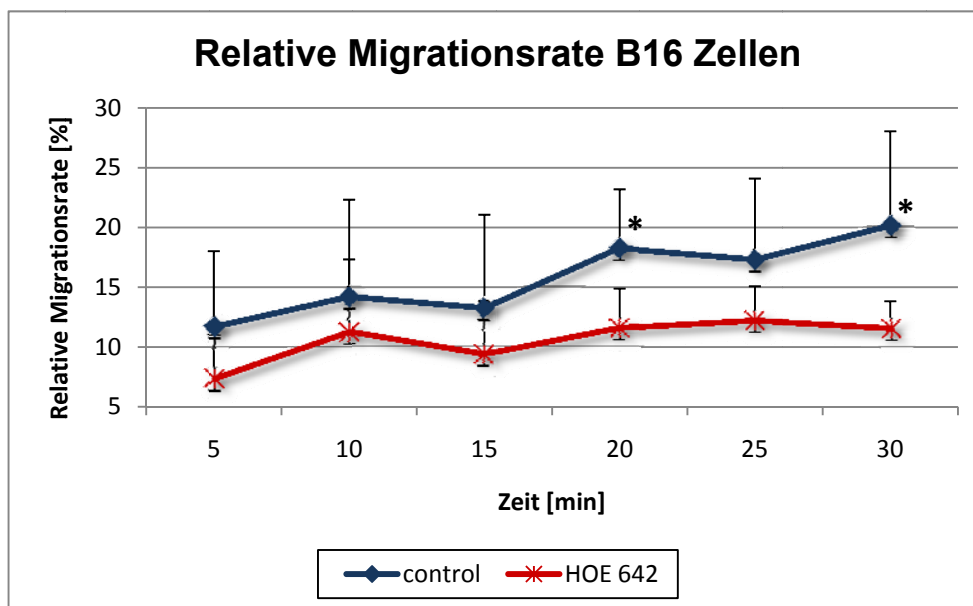


Abb.2.2: Migration der B16-Zellen im Vergleich (* = $P < 0,05$)

Die genauen Daten zu Adhäsion und Migration im Vergleich der beiden Gruppen sind in Tabelle 1 ersichtlich.

B16-Zellen	<i>In vivo</i>	Zeit nach der Injektion (min)					
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30
Kontrollgruppe (n=8)	<i>Adhäsion</i> $\pm SD$	29,7 10,0	39,2 12,4	47,8 19,4	43,9 16,9	44,1 17,3	38,9 16,6
	<i>Relative Migrationsrate[%]</i> $\pm SD$	11,7 6,3	14,2 8,1	13,2 7,8	18,2 5,0	17,3 6,8	20,1 8,0
HOE 642 (n=8)	<i>Adhäsion</i> $\pm SD$	27,3 8,4	35,7 7,1	42,5 13,1	38,4 9,8	38,6 7,6	37,5 9,6
	<i>Relative Migrationsrate[%]</i> $\pm SD$	7,3 3,6	11,2 6,1	9,3 4,5	11,5 3,4	12,2 2,9	11,5 2,3

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichung der B16-Zellen im Vergleich

In den Abbildungen 2.3 und 2.4 auf S. 33 sind Bilder der Intravitalmikroskopie dargestellt. Sie zeigen beispielhaft adhärierte und migrierte Zellen aus der Kontrollgruppe sowie aus der HOE-Gruppe.



Abb.2.3.: IVM-Bild, Minute 19. Kontrollgruppe. Es sind zwei B16-Zellen erkennbar, die in das Leberparenchym migriert sind (1,2). Die Lebersinusoide weiß umrandet. Keine adhärenierten Zellen sichtbar. (— = 50µm)



Abb.2.4.: IVM-Bild nach Gabe von HOE 642, Minute 9. Adhäsion einer einzelnen B16-Zelle. Es sind keine migrierten Zellen sichtbar. Konturen des Parenchyms weiß markiert. (— = 50µm)

3.2. Versuchsreihe B: Untersuchung von Neuroblastomzellen mit unterschiedlichen metastatischen Potentialen

Wie bereits beschrieben, handelte es sich hier um die Analyse zweier Neuroblastom-Zelllinien, SY5Y und MHH, von denen jeweils zwei Subtypen analysiert worden sind: eine Zelllinie, die aus einem Primärtumor der Nebenniere gewonnen worden war („ad“) und eine Zelllinie, die aus Lungenmetastasen kultiviert worden war („Lu“). Von jeder Untergruppe sind 7 respektive 8 Tiere untersucht worden.

Bereits in der Zellkultur zeigten alle vier Zelllinien erste Unterschiede.

Die SY5Y-Zellen vermehrten sich schnell und verdoppelten ihre Anzahl innerhalb weniger Tage. Mikroskopisch waren die Zellen eher kleiner und lagen in Clustern zusammen. Dagegen teilten sich die MHH-Zellen eher langsam und es dauerte länger, bis genügend Zellen für einen Versuch vorhanden waren. Diese Zellen waren etwas größer und verteilten sich regelmäßig am Boden der Kulturflasche.

Innerhalb der Zelllinien zeigten die lokalen Typen einen eher kleineren, rundlicheren Zellkörper mit kurzen neuritischen Fortläufern und ähnelten damit eher den Ursprungszelllinien SH-SY5S und MHH-NB-11, wohingegen die metastatischen Subtypen SY5Y.Lu2 und MHH.Lu3 als morphologisch eher abgeflacht mit relativ langen dendritischen Fortsätzen imponierten.

3.2.1. Die SY5Y-Zellen

3.2.1.1. Adhäsion

In der Adhäsion zeigte sich in dieser Zelllinie ein sehr starker Unterschied über die gesamte Observationsperiode. Die SY5Y.Lu2-Zellen wiesen mit Werten zwischen 44,9 und 56,5 Zellen pro 5-Minuten-Intervall/28 Gesichtsfelder deutlich stärkere Adhäsionszahlen auf als die SY5Y.ad-Zellen mit Zahlen zwischen 22,8 und 30,0 Zellen/Intervall ($P < 0,05$ ab Minute 5 über den gesamten Zeitraum). Damit adhärierte die metastatische Variante dieser Zelllinie signifikant stärker als der nicht-metastatische Typ.

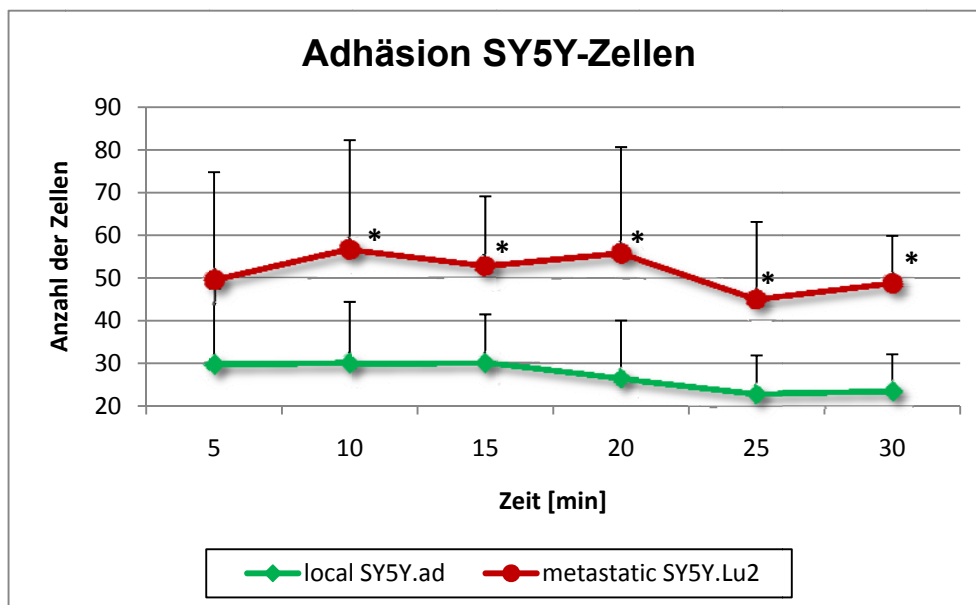


Abb. 2.5.: Graphische Darstellung der Adhäsion der SY5Y-Zellen im Vergleich des lokalen (SY5Y.ad) und metastatischen (SY5Y.Lu2) Subtyps. (* = $P < 0,05$)

3.2.1.2. Migration

In der Analyse der Migrationsrate dagegen zeigte sich in diesem Versuchsaufbau, wie in Abbildung 2.6. ersichtlich, kein relevanter Unterschied. Die SY5Y.ad-Zellen, also die Lokalvariante, wiesen im Gegenteil eine eher höhere Migrationsrate auf als die metastatischen SY5Y.Lu2-Zellen, jedoch war dieser Unterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant und beruhte daher vermutlich auf zufälligen Schwankungen.

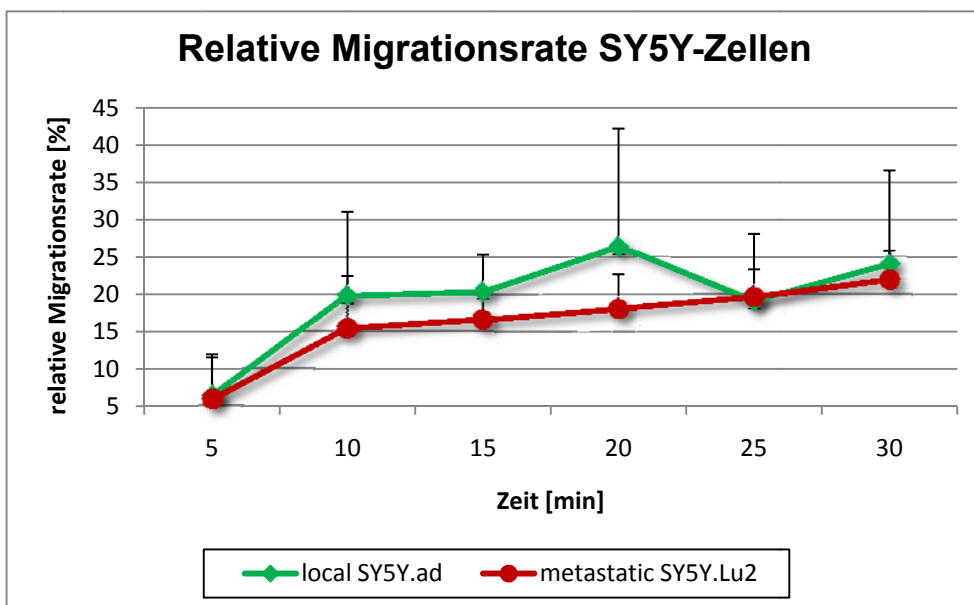


Abb.2.6. :Darstellung der relativen Migrationsrate der SY5Y-Zellen im Vergleich des lokalen (SY5Y.ad) und metastatischen (SY5Y.Lu2) Subtyps.

3.2.2. Die MHH-Zellen

3.2.2.1. Adhäsion

Kaum eine Differenz war ersichtlich in der Adhäsionsrate der beiden Subtypen der MHH-Zelllinie. Im Verlauf der Beobachtungsperiode nahmen dann auch beide Kurven etwas ab, der metastatische Typ MHH.Lu3 noch etwas stärker als die MHH.ad-Zellen, die somit in späteren Intervallen eine etwas stärkere Adhäsion aufwiesen, die jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant war.

Der leichte Abfall beider Kurven ist ein häufig beobachtetes Phänomen in der Intravitalmikroskopie bezüglich der Adhäsion und lässt sich vermutlich auf ein Ablösen und Rezirkulieren der vormals adhärenierten Zellen zurückführen.

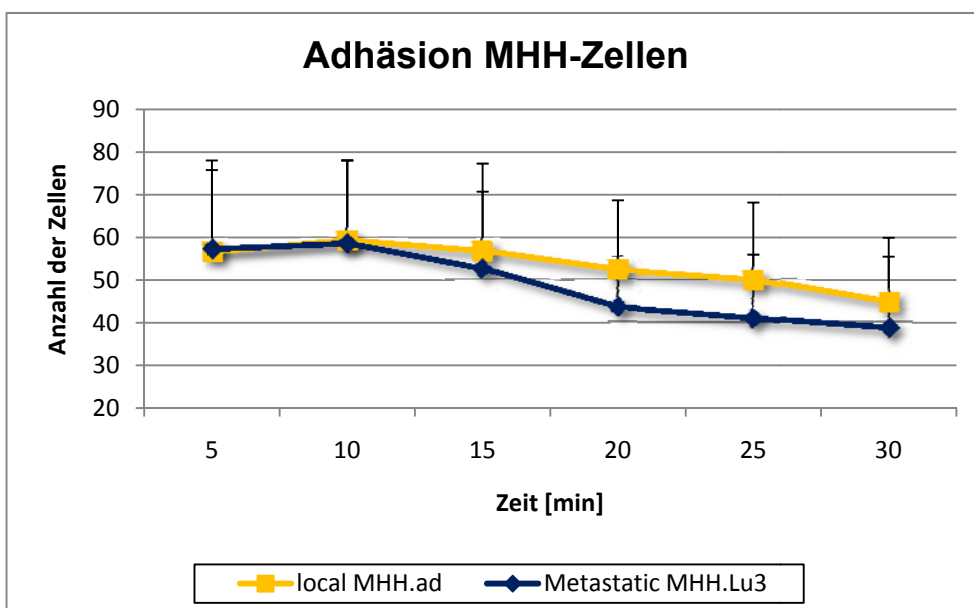


Abb. 2.7.: Graphische Darstellung der Adhäsion der MHH-Zellen im Vergleich des lokalen (MHH.ad) und metastatischen (MHH.Lu3) Subtyps.

3.2.2.2. Migration

Ebenfalls nur geringfügige Unterschiede ließen sich in der Migration der MHH-Zellen ausmachen. Hier war ebenfalls ein nahezu gleicher Verlauf ersichtlich, jedoch zeigte der metastatische Typ MHH.Lu3 einen etwas stärkeren Anstieg der Migrationsrate. Auch hier waren diese Unterschiede jedoch nicht signifikant.

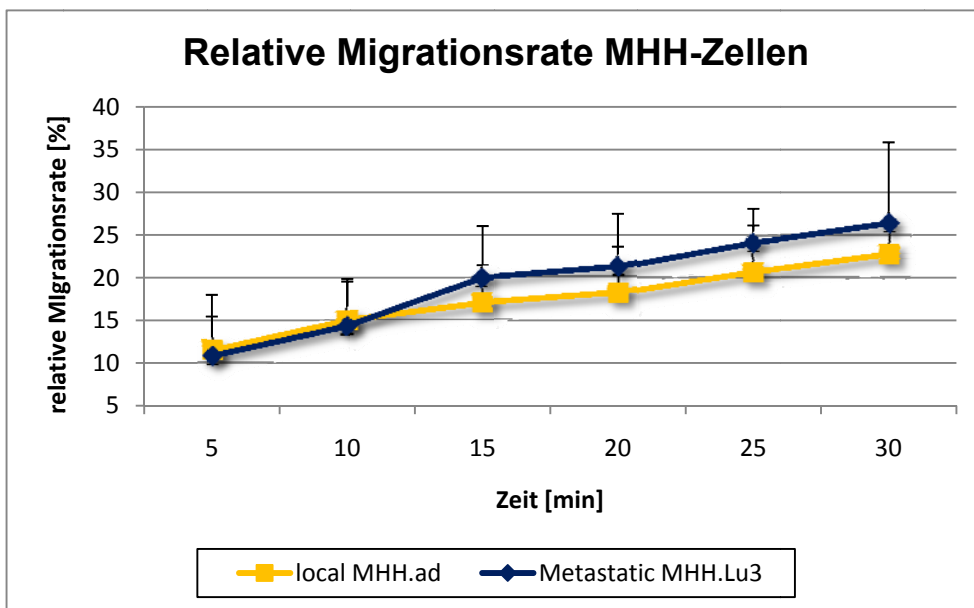


Abb.2.8.: Darstellung der relativen Migrationsrate der MHH-Zellen im Vergleich des lokalen (MHH.ad) und metastatischen (MHH.Lu3) Subtyps

3.2.3. Vergleich der Lokaltypen SY5Y.ad und MHH.ad

Im Vergleich beider Subtypen, die aus dem Primärtumor stammen, zeigte sich in der Adhäsion ein starker Unterschied, wobei auch hier eine sehr schwache Adhäsionsrate der SY5Y.ad-Zellen auffiel. Dieser Unterschied war über den gesamten Zeitraum der Observation signifikant.

Die Migrationsrate dagegen war bei beiden Varianten sehr ähnlich. Hier ließ sich nur zeitweise eine geringfügig, nicht signifikant höhere Migrationsrate der MHH.ad Zellen ausmachen, die sich jedoch zu späteren Versuchszeitpunkten wieder anglich.

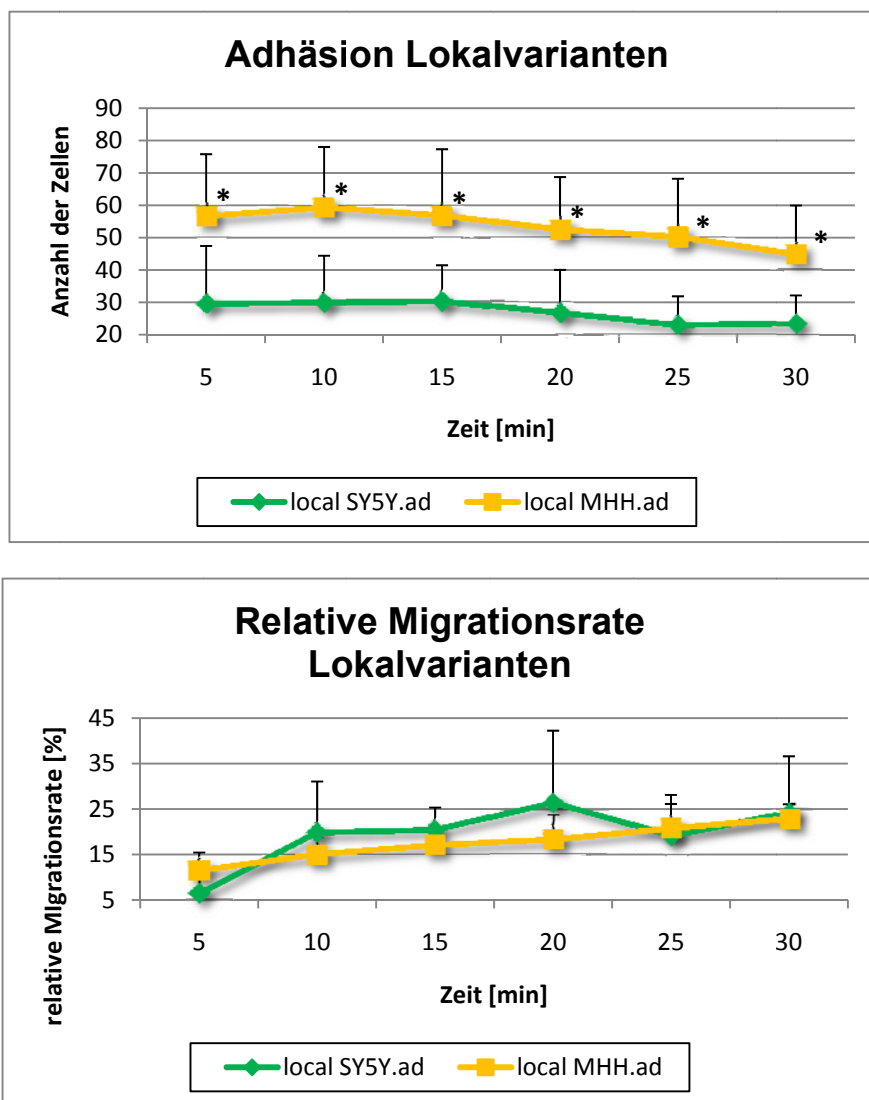


Abb. 2.9.: Vergleich der Lokalsubtypen SY5Y.ad und MHH.ad in Bezug auf Adhäsion und relative Migrationsrate (* = $P < 0,05$)

3.2.4. Vergleich der metastatischen Zelllinien SY5Y.Lu2 und MHH.Lu3

Wiederum war auch im Vergleich der metastatischen Subtypen in Bezug auf die Adhäsion kaum ein Unterschied feststellbar. Die Zahlen ähneln sich sehr stark und sind zu keinem Zeitpunkt signifikant verschieden.

Auch die relative Migrationsrate schien zunächst sehr ähnlich zu verlaufen, jedoch waren die Migrationsraten der MHH.Lu3-Zellen ab dem dritten Intervall konstant höher als der SY5Y.Lu2-Typ und im Intervall Minute 20-25 sogar knapp signifikant höher ($P=0,048$). Die Migrationsrate der MHH.Lu3-Zellen lag in dieser Phase bei $24,1\pm 4,0\%$ im Gegensatz zu einer Rate von $19,6\pm 3,8\%$ bei den SY5Y.Lu2-Zellen.

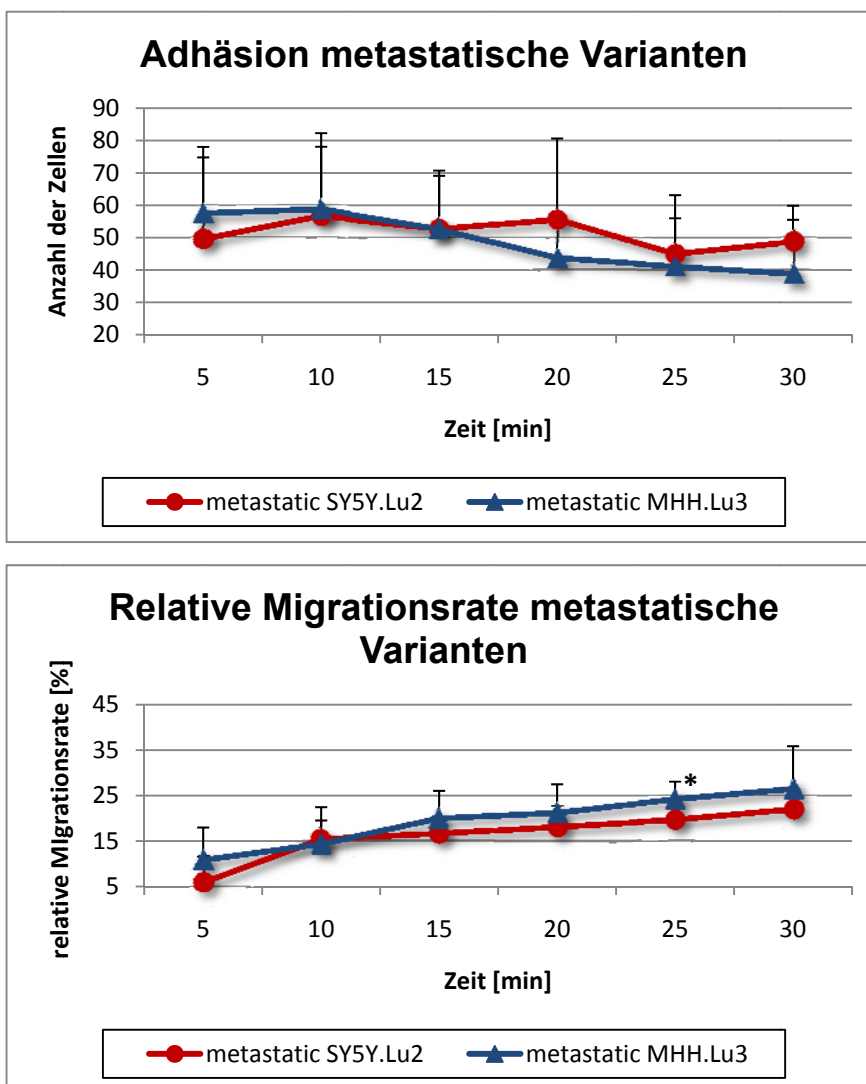


Abb.2.10.: Vergleich der metastatischen Zelllinien SY5Y.Lu2 und MHH.Lu3 in Bezug auf Adhäsion und relative Migrationsrate (* = $P < 0,05$)

Die genauen Werte für Adhäsion und relative Migrationsrate aller 4 Zelllinien sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Zelllinie	<i>In vivo</i>	Zeit nach Injektion (min)					
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30
SY5Y.ad (n=8)	<i>Adhäsion</i>	29,4	29,8	30,0	26,3	22,8	23,3
	\pm SD	18,0	14,6	11,4	13,7	9,1	8,8
	<i>Relative Migrationsrate [%]</i>	6,4	19,8	20,3	26,4	19,0	24,0
	\pm SD	5,6	11,3	5,0	15,8	9,1	12,6
SY5Y.Lu2 (n=8)	<i>Adhäsion</i>	49,4	56,5	52,6	55,6	44,9	48,6
	\pm SD	25,4	25,8	16,5	25,1	18,2	11,2
	<i>Relative Migrationsrate [%]</i>	5,9	15,4	16,5	18,0	19,6	21,9
	\pm SD	5,7	7,1	3,9	4,7	3,8	4,0
MHH.ad (n=8)	<i>Adhäsion</i>	57,2	58,5	52,5	43,5	40,9	38,6
	\pm SD	19,2	18,8	20,6	16,4	18,2	15,3
	<i>Relative Migrationsrate [%]</i>	11,4	14,9	17,0	18,1	20,6	22,7
	\pm SD	4,0	4,9	4,5	5,5	5,5	3,3
MHH.Lu3 (n=7)	<i>Adhäsion</i>	57,2	58,5	52,5	43,5	40,9	38,6
	\pm SD	20,8	19,6	18,2	11,9	15,1	16,9
	<i>Relative Migrationsrate [%]</i>	10,8	14,3	19,9	21,2	24,1	26,4
	\pm SD	7,2	5,3	6,1	6,3	4,0	9,5

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichung von Adhäsion und relativer Migrationsrate für die lokale und metastatische Variante der SY5Y- und der MHH- Zelllinie

3.3. Versuchsreihe C: Untersuchung von HT-29 LMM Zellen und die Auswirkungen von SDF-1 α (CXCL 12)

Hier wurde analysiert, welche Auswirkungen die Inkubation mit SDF-1 α vor Durchführung der Intravitalmikroskopie auf das Verhalten der kolorektalen Karzinomzellen HT-29 LMM in Bezug auf Adhäsion und Migration hatte. In der Kontrollgruppe wurden 8, in der SDF-Gruppe 5 Tiere untersucht.

Für die humanen kolorektalen Karzinomzellen HT-29 LMM ist es typisch, dass sie im Organismus sowohl lymphogen als auch hämatogen metastasieren. Bevorzugtes Metastasierungsorgan ist dabei die Leber, was sich nicht allein aus ihrer Position als erstes nachgeschaltetes Organ im Pfortaderkreislauf erklären lässt. Für diese Versuche wurden HT-29 LMM Zellen ausgewählt, da sie in vitro die stärksten Expressionen von CXCR4, also des Rezeptors von SDF-1 α , zeigten [Gassmann et al. 2009].

3.3.1. Adhäsion

In der Adhäsion zeigte sich interessanterweise nach Stimulation der HT-29 LMM Zellen durch SDF-1 α eine durchweg geringere Adhäsion als in der Kontrollgruppe. Besonders groß war dieser Unterschied zwischen Minute 15-20 sowie 25-30. Hier lag die Zahl der adhärenierten Zellen in der Kontrollgruppe durchschnittlich bei $52,9 \pm 16,2$ sowie $54,0 \pm 11,8$ Zellen, in der mit SDF-1 α vorbehandelten Gruppe dagegen nur bei $34,2 \pm 8,1$ und $35,2 \pm 15,7$ (jeweils $P < 0,05$).

SDF-1 α scheint also die Adhäsionskraft der Zellen trotz seiner stimulierenden Wirkung auf den CXCR4 Rezeptor zu vermindern.

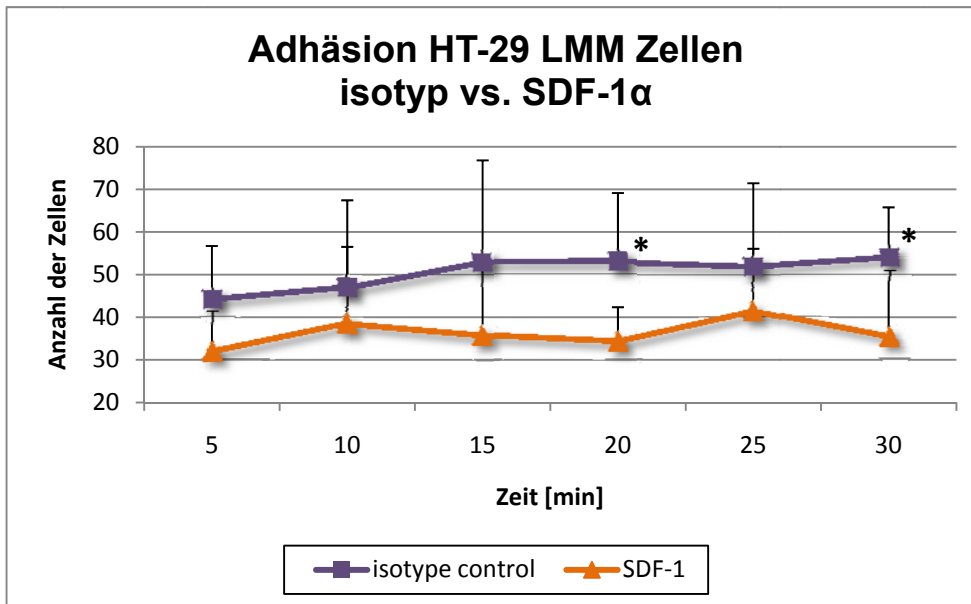


Abb. 2.11.: Darstellung der Adhäsion der HT-29 LMM Zellen: Kontrollgruppe vs. nach Inkubation mit SDF-1 α (* = $P < 0,05$)

3.3.2. Migration

Zwar scheint die Adhäsion der HT-29 LMM Zellen nach Stimulation von CXCR4 mit SDF-1 α eher geringer zu sein, in der Migration konnte jedoch eine deutlich gesteigerte Migration von SDF-1 α -stimulierten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Migrationsrate der SDF-1 α -Gruppe lag während der gesamten Observationsperiode deutlich höher als in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war signifikant im Intervall 15-20 ($P < 0,05$) mit einer Migrationsrate von 16,8% in der SDF-1 α -Gruppe im Gegensatz zu 10,1% in der Kontrollgruppe.

Zwar hoch, jedoch nicht signifikant unterschiedlich waren die Migrationsraten auch in den Intervallen von Minute 5-10, 10-15 und 25-30 mit einer Migrationsrate von jeweils 21,5%, 21,1% und 22,9% in der SDF-Gruppe im Vergleich zu Migrationsraten in der Kontrollgruppe von 9,4%, 9,8% und 8,7%.

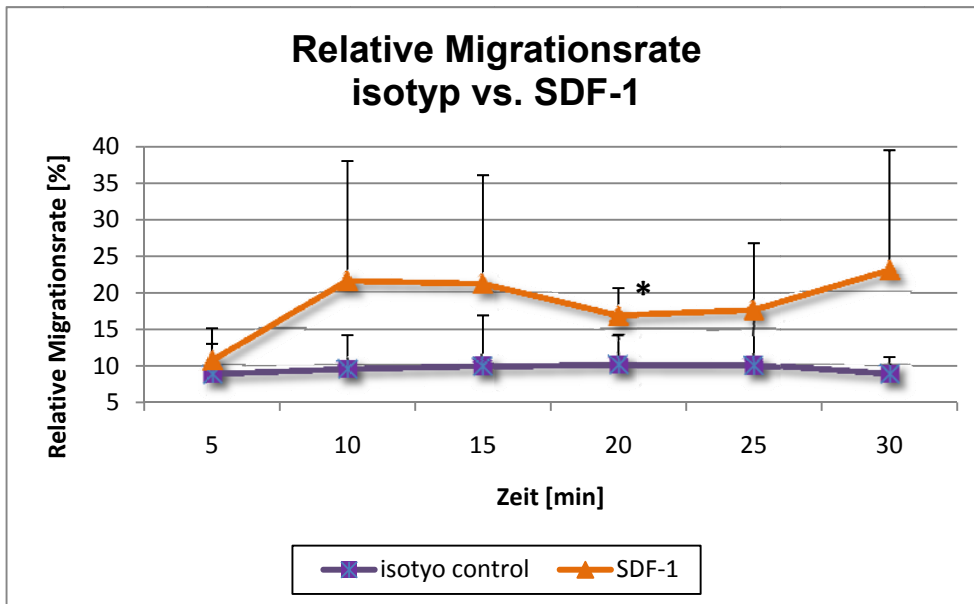


Abb. 2.12.: Darstellung der relativen Migrationsrate der Kontrollgruppe HT-29 LMM IgG 2b und der SDF-1-Gruppe im Vergleich. (* = $P < 0,05$)

HT-29 LMM	<i>In vivo</i>	Zeit nach der Injektion (min)					
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30
IgG 2b isotype Control (n=8)	<i>Adhäsion</i>	44,0	46,9	52,8	52,9	51,8	54,0
	$\pm SD$	12,6	20,5	24,0	16,2	19,6	11,8
	<i>Relative Migrationsrate[%]</i>	8,7	9,4	9,8	10,1	10,0	8,7
	$\pm SD$	4,3	4,8	7,1	4,0	6,4	2,5
SDF-1 (n=5)	<i>Adhäsion</i>	31,9	38,4	35,7	34,2	41,3	35,2
	$\pm SD$	9,4	18,1	15,2	8,1	14,7	15,7
	<i>Relative Migrationsrate[%]</i>	10,6	21,5	21,1	16,8	17,5	22,9
	$\pm SD$	4,5	16,5	15,0	3,8	9,2	16,6

Tabelle. 3: Daten der absoluten Adhäsionszahlen und der relativen Migrationsraten der HT-29 LMM IgG 2b Gruppe und der SDF-Gruppe

3.4. Versuchsreihe D: Untersuchung von HT-29 LMM Zellen unter Einfluss von Lebein-1 respektive Rhodocetin

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss von Lebein-1 und Rhodocetin auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten von HT-29 LMM Zellen in der Intravitalmikroskopie untersucht. Es sind in der Kontrollgruppe 8 Tiere, in der Lebein-Gruppe 5 und in der Rhodocetin-Gruppe 4 Tiere untersucht worden.

In diesem Modell zeigten sich schon kurze Zeit post injectionem erste Zellen in der Blutbahn der Leber, die bereits innerhalb der ersten 2 min an der Wand der Lebersinusoide adhärten und wenig später ins Gewebe wanderten. Dabei hatte die vorherige Inkubation mit Lebein-1 oder Rhodocetin teilweise Auswirkungen auf die Adhäsions- und Migrationskraft der Zellen.

3.4.1. Lebein-1

Unter Einfluss von Lebein-1 zeigte sich über alle Zeitpunkte kaum ein Unterschied in der Adhäsion im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Lediglich zu Beginn und am Schluss der Beobachtungsperiode zeigte sich ein leichter Unterschied in der Adhärenz der Zellen an die Lebersinusoide, diese Differenzen waren aber nicht signifikant.

In der Analyse der Extravasation dagegen zeigte sich eine geringfügige Zunahme der Extravasation unter Einfluss von Lebein-1. Besonders ausgeprägt waren diese Unterschiede innerhalb der ersten 5 Minuten, hier lag die relative Migrationsrate in der Lebein-Gruppe bei $23,1 \pm 11,3\%$, in der Kontrollgruppe dagegen nur bei $6 \pm 7\%$ ($P < 0,05$). Nach diesem Zeitraum nahm der Einfluss ab.

3.4.2. Rhodocetin

Wie in Abb. 2.13 ersichtlich, wurde die Adhäsion der HT-29 LMM Zellen nach Gabe von Rhodocetin kaum beeinflusst. Hier lag die Zahl der adhärenierten Zellen ab dem zweiten Intervall bei durchschnittlich 36-41 Zellen/Intervall und 28 Felder und nahm gegen Ende der Observationsperiode wieder etwas ab. Dieser Effekt lässt sich vermutlich, wie es auch bei anderen Zelllinien beobachtet worden ist damit erklären, dass sich vormals adhärenente Zellen wieder lösten und im Blut rezirkulierten. Bei der Kontrollgruppe lagen die Werte für die Adhäsion ab dem zweiten Intervall durchgängig etwas niedriger mit 25-32 Zellen.

Somit scheint Rhodocetin die Adhäsion leicht zu verstärken, allerdings sind diese Unterschiede zu keinem Zeitpunkt signifikant gewesen.

Die Extravasation, also die Invasion der Zellen in das Leberstroma hingegen wurde durch vorherige Inkubation der Zellen mit Rhodocetin deutlich reduziert. Lag die relative Migrationsrate in der Rhodocetin-Gruppe zwar im ersten Intervall noch höher als in der Kontrollgruppe, fiel sie danach ab und war im folgenden Versuchsablauf konstant niedriger. Dieser Unterschied war im Intervall Minute 15-20 signifikant niedriger mit einer Migrationsrate der Rhodocetin-Gruppe von $10,7 \pm 4,9\%$ gegenüber der Kontrollgruppe mit $23,0 \pm 10,0\%$ ($P < 0,05$).

Rhodocetin hatte also nur wenig Einfluss auf die Adhäsion, minderte aber teilweise signifikant die Migration der Zellen ins Gewebe.

Zur besseren Übersicht sind die Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu Lebein-1 und Rhodocetin in den Abbildungen 2.13. und 2.1 graphisch dargestellt.

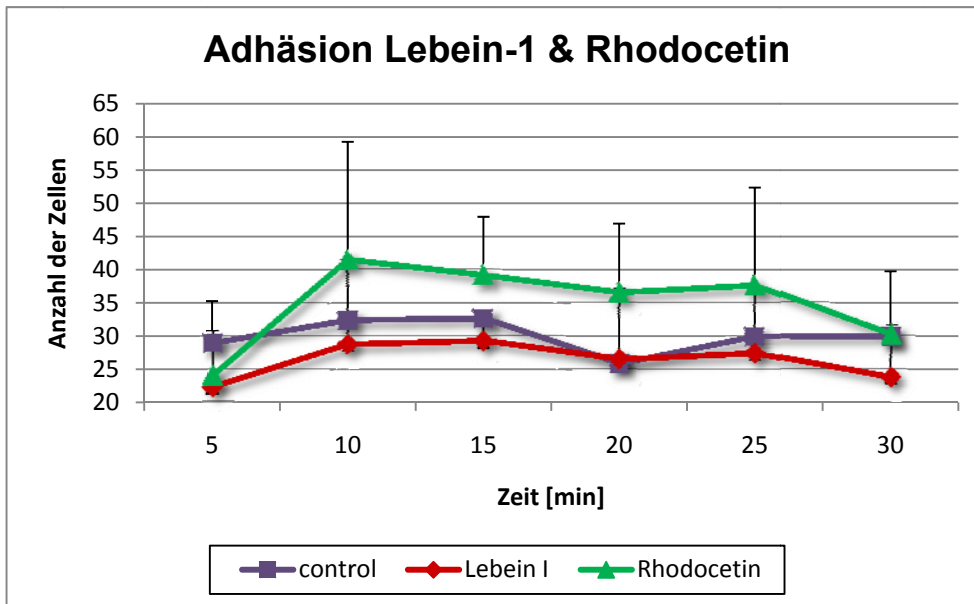


Abb.2.13.: Adhäsion der HT-29 LMM Zellen der Kontrollgruppe sowie unter Einfluss von Lebein-1 und Rhodocetin

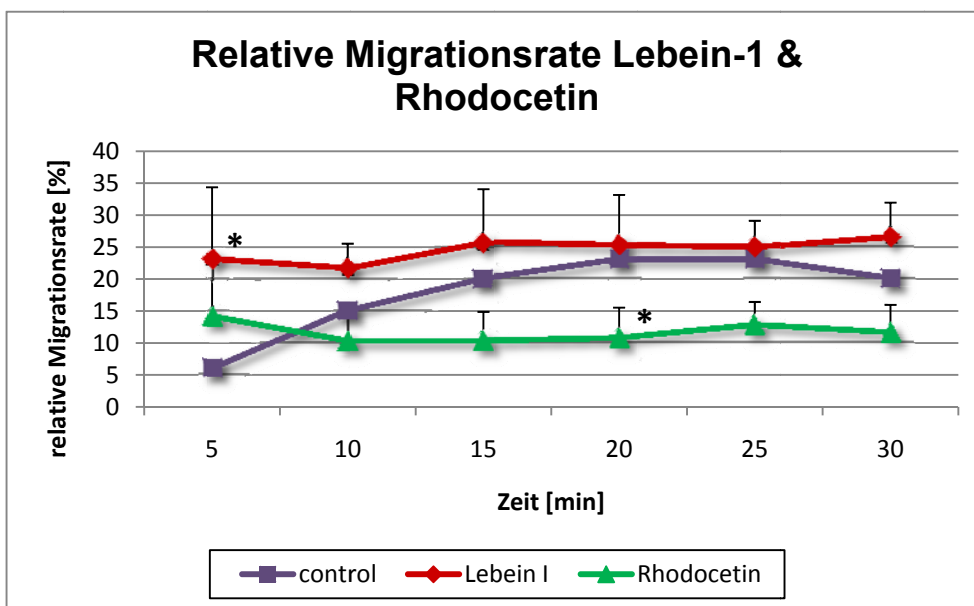


Abb.2.14.: Darstellung der relativen Migrationsrate der HT-29 LMM Zellen im Vergleich nach Inkubation mit Lebein-1 und Rhodocetin (* = P<0,05)

Tabelle 4 zeigt die genauen Werte für Lebein-1, Rhodocetin und die Kontrollgruppe an.

HT-29 LMM . <i>In vivo</i>		Zeit nach Injektion (min)					
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30
Kontrollgruppe (n=8)	<i>Adhäsion</i>	28,9	32,3	32,5	25,8	29,8	29,8
	\pm SD	4,8	11,9	10,8	8,1	9,0	9,7
	<i>Relative</i>						
	<i>Migrationsrate [%]</i>	6	15	20	23	23	20
	\pm SD	7	10	10	10	9	9
Lebein-1 (n=5)	<i>Adhäsion</i>	22,2	28,7	29,2	26,4	27,3	23,7
	\pm SD	13,0	12,8	4,3	10,7	10,0	7,8
	<i>Relative</i>						
	<i>Migrationsrate [%]</i>	23,1	21,7	25,7	25,2	24,9	26,5
	\pm SD	11,3	3,9	8,4	8,0	4,3	5,5
Rhodocetin (n=4)	<i>Adhäsion</i>	24,0	41,4	39,1	36,5	37,6	30,1
	\pm SD	6,8	17,9	8,9	10,5	14,8	9,6
	<i>Relative</i>						
	<i>Migrationsrate [%]</i>	14,1	10,2	10,2	10,7	12,7	11,5
	\pm SD	9,3	4,2	4,6	4,9	3,7	4,5

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichung der HT-29 LMM Zellen

4. Diskussion

4.1. NHE-1 Inhibition reduziert Migrationsfähigkeit von B16-Zellen *in vivo*

In unserer Studie versuchten wir die bereits *in vitro* für B16-Zellen erhobenen Ergebnisse, nämlich die Auswirkungen der NHE-1 Blockade auf Adhäsion und Migration auf das *in vivo* Modell zu übertragen.

Bereits *in vitro* hatte sich in Untersuchungen mit den B16-Zellen gezeigt, dass deren Adhäsion an Kollagen vom extrazellulären pH und von der NHE-1 Aktivität abhängt. Dabei reduzierte die Blockade von NHE-1 durch HOE 642 die Adhäsion signifikant in einem sauren Milieu bei einem pH 6,8-7,0. Je alkalischer der extrazelluläre pH wurde, umso geringer wurde die Adhäsion und umso geringer wurde auch der Einfluss von HOE, der bei einem pH von 7,5 sogar ganz aufgehoben war [Stock et al., Manuskript in Vorbereitung]. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den *in vivo* erhobenen Befunden. Unter der Annahme, dass der pH in der Rattenleber im physiologischen Bereich von ca. 7,4 liegt, ist die Adhäsion an die Lebersinusoide unabhängig von der Aktivität von NHE-1. Dies entspricht den *in vivo* gemessenen Werten, in denen kein deutlicher Unterschied zwischen den Adhäsionsraten der Kontrollgruppe und der HOE-Gruppe festgestellt werden konnte.

Zudem demonstrierten Stüwe et al., dass NHE-1 defiziente humane Melanomzellen zwar unfähig waren auf einer Kollagenmatrix zu migrieren, jedoch eine feste Adhäsion aufwiesen. Auch diese Ergebnisse bestätigen, dass die NHE-1 Aktivität zwar unter bestimmten Bedingungen auf die Adhäsion der Zellen wirkt, aber weder für das Überleben der Zellen noch für die Adhäsion eine absolute Voraussetzung ist [Stüwe et al. 2005].

Zusammengefasst scheint NHE-1 also eine Rolle in der Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen zu spielen, jedoch nur in einem sauren extrazellulären Milieu, nicht aber bei einem physiologischen pH von ca. 7,4.

Umso wichtiger scheint der Einfluss der NHE-1 Aktivität auf die Migrationsfähigkeit der B16-Zellen zu sein. Stock et al. konnten zeigen, dass sich die Migrationsgeschwindigkeit und Translokation der B16-Zellen in vitro durch Blockade von NHE-1 durch HOE 642 signifikant senken lassen und die Invasion in eine Kollagenmatrix sogar ganz verhindert werden kann [Stock et al. 2009, Manuskript in Vorbereitung]. Diese Ergebnisse decken sich ebenfalls mit den in vivo erhobenen Befunden: in unseren Experimenten konnten wir eindeutig zeigen, dass nach Inhibition des NHE-1 Transporters durch HOE 642 die Invasionsrate der Tumorzellen signifikant vermindert war.

Damit bestätigen sich zahlreiche in vitro Studien, dass der Ionentransporter NHE-1 auch in vivo eine essentielle Rolle in der Zellmigration von Melanomzellen spielt und so erheblich zu deren Aggressivität und Metastasierungsfähigkeit beiträgt. Es wurde auch bereits in früheren Studien demonstriert, dass ein stimulierter NHE-1 Transporter und eine hohe NHE-1 Expression mit erhöhter Aggressivität von Tumorzellen einhergehen, unter anderem von Mammakarzinomzellen und Zervixkarzinomzellen [Cardone et al. 2007, Chiang et al. 2008].

Zurzeit werden drei Mechanismen diskutiert, über die NHE-1 in die Zellmigration eingreift:

1. über seine Aktivität im Lamellipodium der Zelle, die zur gerichteten Fortbewegung der Zelle führt [Denker et al. 2000, Grinstein et al. 1993, Srivastava et al. 2007],
2. über die Senkung des extrazellulären pH, wodurch extrazellulär mehr Protonen zur Verfügung stehen, die an fokalen Adhäsionsstellen Kollagen-Integrin-Verbindungen stabilisieren können [Stock et al. 2005, Eble, Tuckwell 2003],
3. über die Sekretion von Matrixmetalloproteinasen wie MMP-9 oder Kathepsin-B, die eine Invasivität der Zelle begünstigen können [Putney, Barber 2004, Bourguignon et al. 2004].

In migrierenden Tumorzellen wird vermutlich die NHE-1 Aktivität über verschiedene intrazelluläre Signalwege stimuliert, die durch eine durch Fibronectin- oder Integrin-vermittelte Adhäsion an die extrazelluläre Matrix ausgelöst werden [Cardone et al. 2005, Schwartz et al. 1991]. Bei diesen Signalwegen handelt es sich um die RhoA-ROCK-Kaskade. Die Downregulation von RhoA durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung resultiert in einer Inhibition der Rho-assoziierten Kinase (ROCK) p160ROCK und der p38-MAP-Kinase. Diese inhibiert normalerweise NHE-1, so dass ihre Downregulation zu einer Stimulation der NHE-1 Aktivität und einer stärkeren Invasivität führt [Cardone et al. 2005].

Zusammengefasst spielt also der Ionentransporter NHE-1 eine wichtige Rolle für die Zellmigration in einigen Tumorzellen.

Somit könnte die Blockade des NHE-1 Transporters in Zukunft eine Möglichkeit darstellen, bei bestimmten Tumorarten, die mit einer hohen NHE-1 Aktivität einhergehen, die Metastasenbildung zu vermindern.

Allerdings muss dabei beachtet werden, dass NHE-1, der ja wie schon beschrieben, ubiquitär im Organismus vorkommt, auch eine Reihe von physiologischen Aufgaben erfüllt, so dass die Blockade auch Auswirkungen in anderen Prozessen haben kann wie zum Beispiel der Wundheilung.

Die Inhibition des NHE-1 Transporters wurde auch in der Kardiologie schon intensiv erforscht. Hier hatte sich in vielen präklinischen Studien eine bei Myokardinfarkten und Herzinsuffizienz kardioprotektive Wirkung der NHE-1 Inhibition, z.B. durch Cariporide® erwiesen, so dass sich erste klinische Studien anschlossen [Rupprecht et al. 2000, Chaitman et al. 2000, Zeymer et al. 2001, Boyce et al. 2003, Fleisher et al. 2005, Bolli et al. 2003]. Dabei wurde zum einen gezeigt, dass eine systemische Behandlung mit Cariporide® von den Patienten im Allgemeinen gut vertragen wurde [Avkiran et al. 2002], sich in einer anderen Studie allerdings auch zerebrovaskuläre Ereignisse häuften [Bolli et al. 2003].

Daher muss vor einer klinischen Anwendung der NHE-1-Inhibitoren sicher noch eine intensive präklinische Forschung, unter anderem bezüglich möglicher unerwünschter Wirkungen stattfinden.

Doch obwohl die Forschung um die NHE-1 vermittelten Mechanismen in Zellmigration und Metastasierung noch in den Anfängen steckt, zeichnet sich hier ein vielversprechendes Forschungsfeld ab, das in Zukunft eine große Rolle in der Tumorforschung spielen könnte. Möglicherweise stellt die Inhibition des NHE-1 Transporters eines Tages eine medikamentöse Behandlungsoption zur Verminderung der Metastasenbildung bei Tumoren dar.

4.2. Migrationsrate in metastatischen Neuroblastomzelllinien nicht signifikant erhöht

In diesem Projekt wurden zwei Subtypen aus den Neuroblastomzelllinien SY5Y und MHH untersucht, jeweils eine aus einem Nebennierentumor gewonnene Zelllinie und eine aus Lungenmetastasen kultivierte. Dabei waren bei der Untersuchung der Eigenschaften der Zellen schon verschiedenste Versuche bezüglich der Migrationsfähigkeit durchgeführt worden, die sich aber alle auf einen längeren Zeitraum von mindestens 24 Stunden bezogen. Hier wurde nun analysiert, wie sich das Verhalten der Tumorzellen in einer frühen Phase, also innerhalb von 30 Minuten nach Erreichen der Blutbahn darstellte.

Die SY5Y-Zellen sind ursprünglich aus einer Knochenmarkbiopsie kultiviert worden und damit per se eine Zelllinie mit metastatischem Potential. Dieses galt jedoch nicht für die MHH-Zellen, die aus einem Nebennierentumor gewonnen worden und damit kaum metastatisch waren. Hier konnte man erst durch die Kultivierung von Zellen über mehrere Zyklen die metastatische Variante MHH.Lu3 schaffen.

In den Voruntersuchungen stellten sich die metastatischen Zelltypen insgesamt aggressiver dar als die Lokalvarianten [Nevo et al. 2008].

Ein typisches Merkmal maligner Zellen ist unter anderem die Sekretion von Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Diese unterstützen die Invasion von Zellen durch die Basalmembran [Overall, Kleinfeld 2006], antagonisieren Apoptose, können Angiogenese initiieren und so Metastasenbildung begünstigen. Bei den SY5Y.Lu2 Zellen wurde wie zu erwarten eine deutlich höhere Aktivität und Sekretion von MMP-2 und MMP-9 gefunden als in der Lokalvariante.

Dies korreliert ebenfalls mit der Tatsache, dass in den Tumoren von Patienten mit fortgeschrittenem Neuroblastom ein überdurchschnittlicher Anteil von Zellen gefunden wurde, die diese MMPs exprimieren [Ribatti et al. 2001, Sugiura et al. 1998].

Nicht so dagegen bei den MHH-Zellen: hier exprimieren die ad- und die Lu3-Zellen gleiche Level und weisen keinen Unterschied auf. Allerdings wurden nur die MMPs -2 und -9 getestet. Es wäre natürlich möglich, dass andere MMPs oder

degradierende Enzyme in der Lu-Variante verstärkt freigesetzt werden. Dies ist noch nicht untersucht worden.

Alle bisherigen Studien zu den vier Neuroblastomzelllinien weisen eindeutig darauf hin, dass die metastatischen Typen deutlich aggressiver sind und auch eine höhere Migrationsbereitschaft zeigen. Diese Befunde spiegeln sich jedoch nicht in unseren Ergebnissen wider.

Hier wurde sowohl bei der SY5Y- als auch bei der MHH-Zelllinie kein signifikanter Unterschied der Migrationsraten zwischen dem Lokaltyp und der metastatischen Variante gefunden. Dies lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass sich die Unterschiede in der Fähigkeit zur Migration und Metastasenbildung bei diesen Zelllinien noch nicht zu einem solch frühen Zeitpunkt zeigen, sondern erst während eines längeren Zeitraumes, wie es die Ergebnisse der Forschungsgruppe um Nevo nahelegen [Nevo et al. 2008]. Das sind zum einen die Ergebnisse der Versuches zur Wundheilung, zum anderen ein Langzeitversuch, in dem die SY5Y.Lu2 Zellen in 60% der Fälle in der Lage waren, Lungenmetastasen zu induzieren, die MHH.Lu3 Zellen noch in 45%, jedoch keine der Lokalvarianten. Damit lässt sich schließen, dass die Zelltypen SY5Y.Lu2 und MHH.Lu3 im längeren Verlauf ein größeres metastatisches Potential aufweisen. Dieses Phänomen kam allerdings im Kurzzeitversuch (30 min) nicht zum Ausdruck.

Im Vergleich der Migrationsraten zwischen den beiden Lokalvarianten zeigte sich hier ebenfalls kein deutlicher Unterschied, wohl aber im Vergleich der beiden Lu-Zelllinien: hier migrierte die MHH-Zelllinie etwas stärker als die SY5Y.Lu2 Zellen, in einer Phase auch signifikant. Dies korreliert mit den in vitro erhobenen Befunden zur Wundheilung, in denen eine Subpopulation der MHH-Zellen extrem schnell migrierte [Nevo et al. 2008].

Bezüglich der Migration konnte also insgesamt in dieser frühen Phase der Migration noch kein Unterschied im Verhalten der Zellen erfasst werden.

Dagegen zeigten die Zelllinien im Verhalten der Adhäsion deutliche Unterschiede: bei den SY5Y-Zellen wiesen die metastatischen Lu-Zellen über fast den gesamten Zeitraum signifikant höhere Adhäsionszahlen auf als die ad-Zellen.

In den bisherigen Voruntersuchungen, in denen die Rezeptoren der Zelloberfläche der Neuroblastomzellen untersucht worden sind, konnten keine Unterschiede zwischen den Zelltypen festgestellt werden. Untersucht wurden bislang die Rezeptoren CXCR4, CXCR3 und CX3CR1. Nach unseren Ergebnissen ist jedoch zu vermuten, dass durchaus Unterschiede in Bezug auf die für die Adhäsion wichtigen Rezeptoren vorhanden sind, die man bislang noch nicht entdeckt hatte.

Der fehlende Unterschied in der Rezeptorexpression lässt sich auch unter Einbeziehung der Ergebnisse von Holland et al. erklären [Holland et al. 2006]. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass die reine Expression von Chemokinrezeptoren nicht unbedingt mit deren Funktionalität gekoppelt ist. Dies bestätigen auch frühere Untersuchungen von Haier et al. [2002], in denen für Kolonkarzinomzellen nachgewiesen wurde, dass Zellen mit unterschiedlichen metastatischen Potentialen trotz Expression gleicher Integrinmuster auf der Zelloberfläche unterschiedliche Adhäsionsfähigkeiten aufweisen [Haier, Nicolson 2000].

Die Differenz in der Adhäsion zeigte sich auch im Vergleich zwischen den beiden Lokalvarianten. Auch hier adhärten die SY5Y.ad-Zellen signifikant weniger als die MHH.ad-Zellen. Der Grund könnte darin liegen, dass die MHH-Zellen aus einem Nebennierentumor kultiviert worden und somit zunächst nicht-metastatisch waren. Sie weisen möglicherweise noch eine stärkere Fähigkeit zu Bindung an Nachbarzellen auf.

Zwischen den beiden Varianten innerhalb der MHH-Zelllinie zeigte sich dagegen kein Unterschied in den Adhäsionszahlen.

Zusammengefasst lässt sich also aus den Ergebnissen in der Intravitalmikroskopie ableiten, dass sich der Unterschied im Metastasierungsverhalten zwischen den metastatischen und den nicht-metastatischen Zelllinien erst zu einem späteren Zeitpunkt manifestiert und noch nicht in dieser frühen Phase der Metastasierung stattfindet. Dies könnte beispielsweise die Sekretion von weiteren proteolytischen Enzymen umfassen, die nötig sind um die Basalmembran zu überwinden.

Ein weiterer Faktor, der erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Metastasierungskaskade auftritt ist beispielsweise auch die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α . Dieser aktiviert unter hypoxischen Bedingungen die Transkription von Genen, die wichtig für Metastasenwachstum, Progression und Invasion sind [Subarsky, Hill 2003]. Sowohl bei den SY5Y- als auch bei den MHH-Zellen wurde eine wesentlich höhere Expression von HIF-1 α in den Lu-Zellen entdeckt als in den lokalen ad-Zellen. Damit weisen diese Zellen bessere Voraussetzungen auf mit schlechteren Bedingungen umzugehen, was einen Teil ihrer stärkeren Aggressivität erklärt.

Es sind also noch viele weitere Forschungen notwendig, um im Einzelnen zu klären worin genau sich die metastatischen und nicht-metastatischen Zellen eines Neuroblastoms unterscheiden. Jedoch wurde mit diesen Zelllinien eine starke Verbesserung der Möglichkeit für diese Untersuchungen geschaffen. Langfristig kann man dadurch die einzelnen Schritte der Metastasierung dieses Tumors besser verstehen und die Therapiemöglichkeiten des Neuroblastoms optimieren.

4.3. SDF-1 α verringert Adhäsion und verstärkt Migration von HT-29 LMM-Zellen

Kolorektale Karzinome sind inzwischen eine der häufigsten Krebsarten in westlichen Ländern. Dabei ist der klinische Verlauf häufig von dem Auftreten von Lebermetastasen dominiert [Poston 2004]. Wie in früheren Studien bereits demonstriert werden konnte, spielt der Chemokinrezeptor CXCR4 eine wichtige Rolle in der Dissemination von kolorektalen Karzinomzellen in der Leber [Kim et al. 2006].

In dieser Studie wurde nun der Zusammenhang der Stimulation von den lebermetastatischen kolorektalen Karzinomzellen HT-29 LMM mit dem Chemokin SDF-1 α (=CXCL12) und der Adhäsion und Migration dieser Zellen in der Leber untersucht. SDF-1 α ist der Ligand des Chemokinrezeptors CXCR4 und befindet sich in der Leber, wie bereits nachgewiesen wurde, zwischen den Lebersinusoiden und dem Parenchym und kann damit eine Vermittlerrolle zwischen den CXCR4 exprimierenden Tumorzellen und dem Gewebe einnehmen [Gassmann et al. 2009].

Die Stimulation der Zellen mit SDF-1 α hatte in der Tat einen teilweise signifikanten Effekt auf die Adhäsionsfähigkeit der Zellen, sie wurde jedoch interessanterweise nicht verstärkt, sondern verringert.

Diese Ergebnisse sind deshalb so erstaunlich, da für andere Tumorentitäten, wie beispielsweise dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, dem Multiplen Myelom und malignem Melanom von einer verstärkten Tumorzelladhäsion an Endothelzellen nach SDF-1 α Behandlung berichtet wurde [Burger et al. 2003, Parmo-Carbanas et al. 2004, Cardones et al. 2003].

Dies könnte damit zusammenhängen, dass HT-29 LMM Zellen die Integrin α 4-Untereinheit nicht auf ihrer Oberfläche aufweisen und ebenfalls nur eine sehr schwache Expression der α 5-Untereinheit. Gerade diese beiden Untereinheiten sind aber wichtig für eine durch CXCR4 regulierte und Integrin-vermittelte Adhäsion. Die Adhäsion von HT-29 LMM Zellen dagegen scheint vorwiegend über CXCR4-unabhängige Signalwege vermittelt zu werden, wie beispielsweise über sialysierte Glykoproteine, Thomson-Friedenreich-Glykoantigene und Galektin-3. [Enns et al. 2004, Witz 2006, Glinskii et al. 2005]. Bei entsprechenden in vitro

Versuchen mit SDF-1 α stimulierten HT-29 LMM Zellen zeigte sich auch kein Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit.

SDF-1 α scheint also in diesen Zellen Signalwege zu stimulieren, die einer Adhäsion entgegenwirken oder in einer anderen Form die adhäsionsvermittelnden Moleküle beeinflussen. Dies könnte einen Ansatz für weitere Forschungen der genaueren SDF-1 α vermittelten Wirkungen darstellen.

In Kontrast dazu wurde die Rate der in das Leberparenchym migrierten Zellen durch vorherige Stimulation mit SDF-1 α signifikant erhöht. Dabei war die Migrationsrate der stimulierten Zellen über den gesamten Versuchsablauf deutlich höher, jedoch nur in einem Intervall (Minute 15-20) signifikant erhöht. Dieses Phänomen lässt sich durch die relativ kleine Stichprobenanzahl der SDF-Gruppe (n=5) im Gegensatz zu einer höheren Anzahl getesteter Tiere in der Kontrollgruppe (n=8) erklären.

Durch Stimulation mit SDF-1 α kommt es in HT-29 LMM Zellen zu einer Aktivierung von GTPasen aus der Rho-Familie [Gassmann et al. 2009].

Es gab in vorherigen Studien viele Anhaltspunkte, dass gerade diese Signalwege stark in die Zellmigration und Extravasation und damit in entscheidende Schritte der Metastasierung involviert zu sein scheinen. RhoA und RhoC beispielsweise verstärken die Formation und Kontraktilität von Aktinfasern. Zudem verstärkt SDF-1 α die Aktivität der Rho-GTPase cdc42. Cdc42 wiederum ist an der Bildung von Mikrospikes beteiligt, welches möglicherweise die Reaktion der Zelle auf einen Chemokingradienten in den Lebersinusoiden erleichtert und damit synergistisch mit anderen Rho-Signalwegen zur Extravasation der Tumorzellen beiträgt [Miyoshi et al. 2004]. Somit werden also mehrere Vorgänge in der Zelle, die zur Zellmigration beitragen, durch SDF-1 α getriggert.

Zusammengefasst wurde in dieser Studie bestätigt, dass der SDF-1 α /CXCR4-Signalweg auch in vivo an der Migration von lebermetastatischen Tumorzellen aus den Sinusoiden in das Parenchym beteiligt ist und diesen Vorgang mit reguliert, wohingegen keine Stimulation der Adhäsion stattfindet.

Es ist von großem Interesse, diese Mechanismen noch genauer zu verstehen, um die Behandlung von Tumorpatienten in der Zukunft weiter zu verbessern. Dazu gehört vor allem eine verbesserte Behandlung oder gar Prophylaxe bezüglich einer Bildung von Metastasen, die in den meisten Fällen die Todesursache darstellen. Wie hier bestätigt werden konnte, spielt die Interaktion des Chemokins SDF-1 α mit seinem Rezeptor CXCR4 dabei eine wichtige Rolle, so dass eine intensive Erforschung dieser Vorgänge sehr vielversprechend ist.

4.4. Rhodocetin reduziert die Extravasation von kolorektalen Karzinomzellen in der Leber

In dieser Studie wurden die Auswirkungen der aus Schlangengiften gewonnenen Disintegrine Lebein-1 und Rhodocetin auf die Adhäsions- und Migrationsfähigkeit humaner kolorektaler Karzinomzellen in der Leber *in vivo* untersucht.

Dabei zeigte die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren keine unerwünschten Nebenwirkungen in den Tieren bei der anschließenden intravasalen Injektion.

Lebein-1 ist ein Disintegrin, das RGD-Sequenzen enthält. Die Blockade der Bindung von Integrinen an Laminin durch Lebein-1 erfolgt dagegen RGD-unabhängig [Eble et al. 2003].

Rhodocetin inhibiert die Bindung von Integrinen an Laminine und Kollagene ebenfalls RGD-unabhängig [Eble et al. 2001, Eble et al. 2003]. Beide wirken antagonistisch.

Durch unsere Studienergebnisse wurde nun bestätigt, dass nicht nur RGD-abhängige Integrine wie $\alpha\beta 3$ -Integrine eine wichtige Rolle in der Metastasenbildung spielen können [Kikkawa et al. 2002], sondern auch die Kollagen- und Laminin-bindenden Integrine.

Den ersten Schritt in der Metastasenbildung stellt die Adhäsion einer Tumorzelle an die Lebersinusoide dar. Dieser Schritt wurde in früheren Studien durch Lebein-1 *in vitro* effektiv gehemmt: die Adhäsion an Laminin-1, Fibronectin und in höheren Konzentrationen auch Kollagen I und IV war signifikant reduziert [Rosenow et al. 2008]. Diese Ergebnisse ließen sich *in vivo* allerdings nicht reproduzieren, wobei möglicherweise Effekte wie beispielsweise Scherkräfte des Blutstromes eine Rolle spielen könnten.

Die Existenz von Lamininen im Dissé-Raum wurde lange in Frage gestellt [Martinez-Hernandez 1995]. Letztlich sind nur die Lamininketten $\alpha 1$ und $\alpha 4$ entdeckt worden, jedoch keine Laminine $\beta 1$ und $\gamma 1$ [Kikkawa et al. 2002]. Zwar enthält der Dissé-Raum auch Fibronectin, welches ebenfalls als Adhäsionssubstrat für Tumorzellen dienen kann und durch Lebein-1 blockiert wird, jedoch könnten die Ausprägungen dieser Substrate insgesamt zu schwach sein, um eine starke Adhäsion hervorzurufen, so dass eine Blockade durch Lebein-1 keine deutlichen Effekte aufweist.

Gleiches gilt für die Migration: schon in vitro migrierten HT-29 LMM Zellen nicht auf Laminin-1, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Lamininrezeptoren keine große Rolle bei der Infiltration des Leberstromas spielen. Dies wurde durch die in vivo Daten bestätigt. Die Migrationsraten der mit Lebein-1 vorbehandelten Zellen lag nicht niedriger, sondern eher höher als diejenigen der Kontrollgruppe. Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

Rhodocetin blockiert spezifisch das Integrin $\alpha 2\beta 1$. Dieses Integrin- wie auch das Integrin $\alpha 1\beta 1$ - geht in der EZM Verbindungen mit Kollagen IV ein.

In unseren Versuchen fand keine Reduktion des Tumorzellarrestes unter Einfluss von Rhodocetin statt. Damit kann ausgeschlossen werden, dass das Integrin $\alpha 2\beta 1$ einen starken Beitrag zur Adhäsion von Tumorzellen an die Kollagen IV-reiche subendotheliale Schicht liefert. Dieser Vorgang scheint also vor allem durch andere Integrine vermittelt zu werden.

Dagegen war die Migrationsrate der Tumorzellen nach Inkubation mit Rhodocetin deutlich verringert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Integrin $\alpha 2\beta 1$ und sein Ligand Kollagen IV eine essentielle Rolle bei der Bildung von Lebermetastasen spielen. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Ura et al., die nachwiesen, dass Lebermetastasen das Integrin $\alpha 2\beta 1$ in signifikant höherem Maße exprimieren als Tumorzellen aus dem entsprechenden Primärtumor [Ura et al. 1998].

Während also die vorwiegend $\alpha 1\beta 1$ -Integrin vermittelte Adhäsion von Tumorzellen an Kollagen IV der subendothelialen EZM nicht durch Rhodocetin beeinflusst wird, inhibiert es die $\alpha 2\beta 1$ -vermittelte Migration aus den Gefäßen in das Lebergewebe entlang der losen Kollagenfasern in den Dissé-Raum deutlich. Dies steht allerdings in Kontrast zu einer Studie von Yang et al. [2003], nach der den Kollagenbindenden Integrinen $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ ähnliche Funktionen zukämen. Unsere Ergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass dies nicht der Fall ist, sondern dass das Integrin $\alpha 1\beta 1$ eher adhäsionsvermittelnd, das Integrin $\alpha 2\beta 1$ dagegen eher migrationsfördernd ist.

Zusammengefasst wurde in dieser Studie demonstriert, dass zusätzlich zu den Kontakten zwischen Tumorzellen und Endothelzellen auch direkte Interaktionen zwischen den Zellen und der subendothelialen extrazellulären Matrix des Dissé-Raumes eine Schlüsselrolle bei der Formation von Lebermetastasen spielen. Diese Verbindungen werden vor allem durch Integrine vermittelt, wobei wir zeigen konnten, dass es sich dabei auch um RGD-unabhängige Integrine handelt.

Die effektive Blockade der Tumorzellinvasion durch den $\alpha 2\beta 1$ -Integrin spezifischen Inhibitor Rhodocetin unterstreicht die Bedeutung dieses Integrins und seiner Kollagenliganden für die Bildung von Lebermetastasen. Möglicherweise ist die besondere Anordnung der Kollagenfasern im Dissé-Raum der Grund für die hohe Metastasenrate in der Leber. Diese Beobachtung könnte zu neuen Therapieverfahren führen, mit denen sich eine Metastasierung in die Leber reduzieren lässt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In vivo Studien stellen einen unverzichtbaren Teil der Erforschung von Zusammenhängen der Zellmigration dar, da nur so die gleichen Bedingungen geschaffen werden können, wie sie auch in der Realität auftreten.

Die Intravitalmikroskopie erlaubt uns dabei die frühesten Schritte einer Formation von Lebermetastasen zu observieren. Dadurch ist es möglich, den genauen Einfluss einzelner Faktoren zu beobachten und gegebenenfalls durch gezielte Intervention weiter zu verifizieren.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Extravasation und Infiltration in das Lebergewebe von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst wird, die jeder für sich eine wichtige Rolle spielen. So ist für eine erfolgreiche Invasion in das Gewebe die Migrationsfähigkeit der Zelle entscheidend, da sie sonst das Lebergefäß nicht verlassen könnte. Dabei hat unter anderem der Ionentransporter NHE-1 eine Schlüsselposition inne, da wir zeigen konnten, dass die Migration in das Parenchym durch Inhibition dieses Transporters signifikant vermindert wird.

Zum anderen sind auch Chemokine und ihre Rezeptoren an dem Prozess der Migration beteiligt. Wie wir demonstrieren konnten, wird durch die Stimulation des Chemokinrezeptors CXCR4 durch seinen Liganden SDF-1 α die Extravasation und Invasion in das Leberparenchym deutlich erleichtert, so dass auch dieser Vorgang eine wichtige Rolle in der Bildung von Lebermetastasen zu spielen scheint.

Dies gilt auch für die Integrin-vermittelte Migration der Zellen. In dieser Studie wurde eindeutig gezeigt, dass die Hemmung von Integrinen einen negativen Effekt auf die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen in das Stroma hat, weswegen man von einem Beitrag der direkten Interaktion von Integrinen und subendothelialer Matrix ausgehen kann.

Zusammengefasst zeigen diese Erkenntnisse einmal mehr die Vielfältigkeit und Komplexität des Vorganges der Metastasierung und erweitern das Wissen um diesen Prozess. Sie bieten dadurch auch zahlreiche Ansatzmöglichkeiten, um Therapiestrategien neu zu entwickeln oder zu verbessern, so dass in der Zukunft die Therapie und Prophylaxe von Lebermetastasen deutlich optimiert werden kann.

Literatur

A

Al-Mehdi et al (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat. Am.* 6, No 1, 100-104

Avkiran et al (2002) Na/H Exchange Inhibitors for Cardioprotective Therapy: Progress, Problems and Prospects, *J Am Coll Cardiol.* 39, No. 5, 747–53

B

Babcock A, Owens T. (2003). Chemokines in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 520, 120–32.

Bertolini F, Dell'Agnola C, Mancuso P, Rabascio C, Alessandra B, Monestiroli S, Gobbi A, Pruneri G, and Martinelli G (2002). CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 62, 3106–3112

Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, and Freedman LS (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38, 3751–3757.

Bolli R (2003). The role of sodium-hydrogen ion exchange in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Card Surg* 18(Suppl. 1):21-26.

Bourguignon et al (2004). CD44 interaction with Na/H exchanger (NHE1) creates acidic microenvironment leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 279, 26991-27007

Boyce SW, Bartels C, Bolli R, Chaitman B, Chen JC, Chi E, Jessel A, Kereiakes D, Knight J, Thulin L (2003). Impact of sodiumhydrogen exchange inhibition by cariporide on death ormyocardial infarction in high-risk CABG surgery patients: results of the CABG surgery cohort of the GUARDIAN study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126, 420-427.

Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, and Fässler R (2002). Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* 109, 999–1006.

Brodeur GM (1991). Neuroblastoma and other peripheral neuroectodermal tumors. In: Fernbach DJ and Vietti TJ (Hrsg.). *Clinical Pediatric Oncology*. Mosby Year Book, St. Louis, MO, Kap. 24 437–464.

Brodeur GM and Castleberry RP (1997). Neuroblastoma. In: Pizzo PA and Poplack DG (Hrsg). *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers, Kap. 29, 761–783.

Brodeur GM (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3, 203–216.

Burger M, Glodek A, Hartmann T, Schmitt-Gräf A, Silberstein LE, Fuji N, Kipps TJ, and Burger JA (2003). Functional expression of CXCR 4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene* 22, 8093–8101.

Burns et al. (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203, 2201-2213

C

Cardone, R.A., Bagorda, A., Bellizzi, A., Busco, G., Guerra, L., Paradiso, A., Casavola, V., Zaccolo, M. & Reshkin, S.J. (2005a). Protein kinase A gating of pseudopodial-located RhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cells lines. *Mol Biol Cell* 16, 3117–3127

Cardones AR, Murakami T, and Hwang ST (2003). CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via $\alpha 1$ integrin. *Cancer Res* 63, 6751–6757.

Chaitman BR, Danchin N, Erhardt LRW, Meinertz T, Schroeder JS, Tognoni G, White HD, Willerson JT, Jessel A (2000). Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with . cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations: main results of the GUARDIAN trial. *Circulation* 102, 3032-3038.

Chan JS, Lee JW, Ho MK, Wong YH (2000). Preactivation permits subsequent stimulation of phospholipase C by G(i)-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 57, 700–8.

Chen Y, Stamatoyannopoulo G, and Song CZ (2003). Down regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. *Cancer Res* 63, 4801–4804

Cheung NV and Cohn SL (2005). Neuroblastoma. Heidelberg, Germany: Springer.

Clark, E.A. & Brugge, J.S. (1995). Integrin and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233–238.

Collier, I. E. *et al.* (1988). H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* 263, 6579–6587

Counillon L, Pouyssegur J. (2000). The expanding family of eucaryotic Na(+)/H(+) exchangers. *J Biol Chem.* 275:1-4.

Colognato H and Yurchenco PD (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218, 213–234.

Cowie F, Corbett R, and Pinkerton CR (1997). Lung involvement in neuroblastoma: incidence and characteristics. *Med Pediatr Oncol* 28, 429–432.

Crissman JD, Cerra RF, Sarka F (1991). The morphology of cancer cell arrest and extravasation, in *Microcirculation and Cancer Metastasis*, Boca Raton, CRC Press, 205-215

D

Demaurex N, Grinstein S. (1994). Na⁺/H⁺ antiport: modulation by ATP and role in cell volume regulation. *J Exp Biol*.196, 389-404.

Denker et al (2000). Direct binding of the Na/H Exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H⁺ translocation. *Mol Cell* 6, 1425-1436

Downey, G.P., Chan, C.K., Trudel, S. & Grinstein, S. (1990). Actin assembly in electropermeabilized neutrophils: role of intracellular calcium. *J Cell Biol* 110, 1975–1982

E

Eble JA, Wucherpfennig KW, Gauthier L, Dersch P, Krukonis E, Isberg RR, and Hemler ME (1998). Recombinant soluble human $\alpha 3 \beta 1$ integrin: purification, regulation, and specific binding to laminin-5 and invasin in a mutually exclusive manner. *Biochemistry* 37, 10945–10955

Eble JA (2001). The molecular basis of integrin–extracellular matrix interactions. *Osteoarthr Cartil* 9, 131–140

Eble JA, Beermann B, Hinz H-J, and Schmidt-Hederich A (2001). $\alpha 2 \beta 1$ integrin is not recognized by rhodocetin but is the specific high affinity target of rhodocetin, an RGD-independent disintegrin and potent inhibitor of cell adhesion to collagen. *J Biol Chem* 276, 12274–12284

Eble JA and Tuckwell DS (2003). The $\alpha 2 \beta 1$ integrin inhibitor rhodocetin binds to the A-domain of the integrin $\alpha 2$ subunit proximal to the collagen binding site. *Biochem J* 376, 77–85

Eble JA, Bruckner P, Mayer U (2003). *Vipera lebetina* Venom Contains Two Disintegrins Inhibiting Laminin-binding $\beta 1$ Integrins, *J Biol Chem*. 278, No. 29, 26488–26496

Eble JA (2005). Collagen-binding integrins as pharmaceutical targets. *Curr Pharm Des* 11, 867–880

Eble JA and Haier J (2006). Integrins in cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets* 6, 89–105

Enns A, Gassmann P, Schlueter K, Korb T, Spiegel HU, Senninger N, and Haier J (2004). Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within liver sinusoides. *J Gastrointest Surg* 8, 1049–1059

Ewing J: A (1928). *Treatise on Tumors, Neoplastic Diseases*, ed 3. Philadelphia, Saunders

F

Felsenfeld, D.P., Schwartzberg, P.L., Venegas, A., Tse, R. & Sheetz, M.P. (1999). Selective regulation of integrin-cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat Cell Biol* 1, 200–206

Fidler (2002). The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 70, 498-505

Fidler IJ (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453–458.

Fisch and Haier (2007). Tumour Cell Adhesion and Invasion. In: Alison M (Hrsg) *The Cancer Handbook*. Wiley&Sons, 2nd Edition, Kap. 74, 1-13

Fulda S, Honer M, Menke-Moellers I, and Berthold F (1995). Antiproliferative potential of cytostatic drugs on neuroblastoma cells in vitro. *Eur J Cancer* 31A, 616–621.

Fleisher LA, Newman MF, St Aubin LB, Cropp AB, Billing CB, Bonney S, Mackey WC, Poldermans D, Corbalan R, Pereira AH (2005). Efficacy of zonisipride, an Na/H exchange ion inhibitor, for reducing perioperative cardiovascular events in vascular surgery patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 19, 570-576.

G

Gale LM, McColl SR. (1999). Chemokines: extracellular messengers for all occasions? *Bioessays* 21, 17–28.

Gaßmann et al (2004). Role of Tumor Cell Adhesion and Migration in Organ-Specific Metastasis Formation. *Onkologie* 27- Review

Gaßmann et al (2009). CXCR4 regulates the early extravasation of Metastatic Tumor Cells in vivo. *Neoplasia* 11, No 7, 651-661

Gatenby, R. A., and Gawlinski, E. T. (2001). Mathematical models of tumour invasion mediated by transformation-induced alteration of microenvironmental pH. *Novartis Found. Symp.* 240, 85–96.

Gautam N, Downes GB, Yan K, Kisselev O. (1998). The G-protein hg complex. *Cell Signal* 10, 447–55.

Glinskii OV, Huxley VH, Glinsky GV, Pienta KJ, Raz A, and Glinsky VV (2005). Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs. *Neoplasia* 7, 522–527

Grinstein S, Rotin D, Mason MJ. (1989). Na⁺/H⁺ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 988, 73-97.,

Grinstein S, Woodside M, Waddell TK, Downey GP, Orłowski J, Pouyssegur J (1993). . Focal localization of the NHE-1 isoform of the Na⁺/H⁺ antiport: assessment of effects on intracellular pH. *Embo J* 12(13), 5209-18.

Guan, J.-L. & Chen, H.-C. (1996). Signal transduction in cellmatrix interactions. *Int Rev Cytol* 168, 81–121

Gupta et al (2001). Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1_α: implications for development of selective CXCR4 antagonists. *Immunol Lett* 78, 29–34

H

Hahn E, Wick G, Pancev D, and Timpl R (1980). Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. *Gut* 21, 63–71

Haier and Nicolson (2000). Tumor cell adhesion of human colon carcinoma cells with different metastatic properties to extracellular matrix under dynamic conditions of laminar flow. *J Cancer Res Clin Oncol* 126, 699-706

Haier et al (2001). The Role of Tumor Cell Adhesion as an Important Factor in Formation of Distant Colorectal Metastasis. *Dis Colon Rectum* 44, 876-884

Haier et al (2003). An Intravital Model to Monitor Steps of Metastatic Tumor Cell Adhesion Within the Hepatic Microcirculation. *J of GI Surgery* 7, 507-515

Holland et al (2006). Differential Functional Activation of Chemokine Receptor CXCR4 Is Mediated by G Proteins in Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 66, 4117-4124

Hood JD and Cheresh DA (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2, 91–100

Horwitz, A. R. & Parsons, J. T. (1999) Cell migration — movin' on. *Science* 286, 1102–1103

Humphries MJ (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28, 311-339

Huttenlocher, A., Sandborg, R.R. & Horwitz, A.F. (1995). Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 7, 697–706.

Hynes RO (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687.

K

Kammen BF, Matthay KK, Pacharn P, Gerbing R, Brasch RC, and Gooding CA (2001). Pulmonary metastases at diagnosis of neuroblastoma in pediatric patients: CT findings and prognosis. *AJR Am J Roentgenol* 176, 755–759

Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. (1999). The myocardial Na(+)-H(+) exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circul Res* 85, 777-86.]

Kato M, Kitayama J, Kazama S (2003). Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res* 5, 144–50

Khanna C, Jaboin JJ, Drakos E, Tsokos M, and Thiele CJ (2002). Biologically relevant orthotopic neuroblastoma xenograft models: primary adrenal tumor growth and spontaneous distant metastasis. *In Vivo* 16, 77–85

Kikkawa H, Kaihou M, Horaguchi N, Uchida T, Imafuku H, Takiguchi A, Yamazaki Y, Koike C, Kuruto R, Kakiuchi T, et al. (2002). Role of Integrin $\alpha\beta 3$ in the early phase of liver metastasis: PET and IVM analyses. *Clin Exp Metastasis* 19, 717–725

Kim J, Mori T, Chen SL, Amersi FF, Martinez SR, Kuo C, Turner RR, Ye X, Bilchik AJ, Morton DL, et al. (2006). Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome. *Ann Surg* 244, 113–120

Klanke CA, Su YR, Callen DF, Wang Z, Meneton P, Baird N, Kandasamy RA, Orłowski J, Otterud BE, Leppert M. (1995). Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics*. 25, 615-22

L

Lauffenburger, D.A. & Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physical integrated molecular process. *Cell* 84, 359–369.

Lee, J., Ishihara, A., Oxford, G., Johnson, B. & Jacobson, K. (1999). Regulation of cell movement is mediated by stretchactivated calcium channels. *Nature* 400, 382–386.

M

Mahnensmith RL, Aronson PS. (1985). The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circul Res*. 56, 773-88.]

Martinez-Hernandez A and Amenta PS (1995). The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* 9, 1401–1410.

Martinez-Zaguilan, R., Seftor, E. A., Seftor, R.E.B., Chu, Y., Gillies, R. J., and Hendrix, M.J.C. (1996). Acidic pH enhances the invasive behaviour of human melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 14, 176–186

Mayer, C., Maaser, K., Daryab, N., Zanker, K.S., Brocker, E.B. & Friedl, P. (2004). Release of cell fragments by invading melanoma cells. *Eur J Cell Biol* 83, 709–715

Miyoshi K, Wakioka T, Nishinakamura H, Kamio M, Yang L, Inoue M, Hasegawa M, Yonemitsu Y, Komiya S, and Yoshimura A (2004). The Sprouty-related protein Spred, inhibits cell motility, metastasis and Rho-mediated actin reorganisation. *Oncogene* 23, 5567–5576

Monsky, W. I. and Chen, W. T. (1993). Proteases of cell adhesion proteins in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 4, 251–258.

Moolenaar WH, Tsien RY, van der Saag PT, de Laat SW. (1983). Na⁺/H⁺ exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature* 304, 645–648.

Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner S, et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastases. *Nature* 410, 50–56

Myllyharju J and Kivirikko K (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20, 33–437

Murphy JW, Hua Yuan, Yong Kong, Yong Xiong, Lolis E. (2009) Heterologous quaternary structure of CXCL12 and its relationship to the CC chemokine family. *Proteins* 78, 1331–1337

N

National Cancer Institute, Surveillance, (2007). Epidemiology, and End Results Database. Available at: <http://seer.cancer.gov>.

Nevo et al (2008). Generation and Characterization of Novel Local and Metastatic Human Neuroblastoma Variants. *Neoplasia* 10, 817–827

Nicolson GL (1988) Cancer metastasis: tumor cell and host properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim Biophys Acta* 948, 175–224

Nicolson GL (1989). Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane, and tissue. *Curr Opin Cell Biol* 1, 1009–1019

Nicolson GL (1991) Tumor and host molecules important in the organ preference of metastasis. *Semin Cancer Biol* 2, 143–154

Nishiuchi R, Takagi J, Hayashi M, Ido H, Yagi Y, Sanzen N, Tsuji T, Yamada M, and Sekiguchi K (2006). Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin–integrin interactions using recombinant $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins. *Matrix Biol* 25, 189–197.

Numata M, Petrecca K, Lake N, Orłowski J. (1998). Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem.* 273, 6951-9.

O

Orłowski J, Kandasamy RA, Shull GE.(1992). Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins.; *J Biol Chem* 267, 9331

Orłowski, J. & Grinstein, S. (2004). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Eur J Physiol* 447, 549–565.

Overall CM and Kleifeld O (2006). Tumour microenvironment—opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6, 227–239

P

Paget. S (1889). The Distribution of secondary Growths of cancer of the breast, *The Lancet*, 571-73

Palecek, S.P., Huttenlocher, A., Horwitz, A.F. & Lauffenburger, D.A. (1998). Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *J Cell Sci* 111, 929–940.

Parmo-Carbanas M, Bartolome RA, Wright N, Hidalgo A, Drager AM, and Teixido J (2004). Integrin $\alpha 4\beta 1$ involvement in stromal cell–derived factor-1 α – promoted myeloma cell transendothelial migration and adhesion: role of cAMP and the actin cytoskeleton in adhesion. *Exp Cell Res* 294, 571–580.

Pietsch T, Gottert E, Meese E, Blin N, Feickert HJ, Riehm H, and Kovacs G (1988). Characterization of a continuous cell line (MHH NB-11) derived from advanced neuroblastoma. *Anticancer Res* 8, 1329–1333

Poston GJ (2004). Surgical strategies for colorectal liver metastases. *Surg Oncol* 13, 125–136.

Putney and Barber (2004). Expression profile of genes regulated by activity of the Na-H exchanger NHE1, *BMC Genomics.* 16; 46.

R

Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397–400

Ribatti D, Surico G, Vacca A, De Leonardis F, Lastilla G, Montaldo PG, Rigillo N, and Ponzoni M (2001). Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase- 2 and -9 correlate with progression in human neuroblastoma. *Life Sci* 68, 1161–1168.

Ritter M, Fuerst J, Wöll E, Chwatal S, Gschwentner M, Lang F, Deetjen P, Paulmichl M. (2001). Na⁺/H⁺ exchangers: linking osmotic dysequilibrium to modified cell funktion. *Cell Physiol Biochem*. 11:1-18.

Robledo MM, Bartolome RA, Longo N, Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Longo I, van Muijen GNP, Sanchez-Meteos P, and Teixido J (2001). Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J Biol Chem* 276, 45098–45105.

Rosenow F, Ossig R, Thormeyer D, Gassmann P, Schlüter K, Brunner G, Haier J, Eble J (2008). Integrins as antimetastatic Targets of RGD-Independent snake venom components in liver metastasis, *Neoplasia* 10, 168-176

Rossi D, Zlotnik A.(2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217–42.

Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD, and Segal RA (2003). A small molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13513–13518.

Ruoslahti E (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 697–715.

Rupprecht H-J, vom Dahl J, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheiss H-P, Buerke M, Sheehan FH, Drexler H (2000). Cardioprotective effects of the Na⁺/H⁺ exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation* 101, 2902-2908.

S

Schimanski CC, Bahre R, Gockel I, Müller A, Frerichs K, Hörner V, Teufel A, Simiantonaki N, Biesterfeld S, Wehler T, et al. (2006). Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4. *Br J Cancer* 95, 210–217

Schlüter et al (2006). Organspecific Metastatic Tumor Cell Adhesion and Extravasation of Colon Carcinoma Cells with different metastatic potential, *Am J Path* 169, 1064-1073

Schneider, S.W., Pagel, P., Rotsch, C., Danker, T., Oberleithner H., Radmacher, M. & Schwab, A. (2000). Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy. *Eur J Physiol* 439, 297–303

Schwartz, M.A., Lechene, C. & Ingber, D.E. (1991). Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin alpha 5 beta 1, independent of cellshape. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7849–7853

Schwartz, M.A., Cragoe, E.J., Jr & Lechene, C.P. (1990). pH regulation in spread cells and round cells. *J Biol Chem* 265, 1327–1332.

Springer, T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.

Srivastava J, Barber DL, Jacobson MP (2007). Intracellular pH sensors: design principles and functional significance. *Physiology (Bethesda)* 22, 30-9.

Statistisches Bundesamt, Berlin

Stock et al (2005). Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na⁺/H⁺ exchange. *J Physiol* 567, 225-238

Stock C, Schwab A. (2006). Role of the Na⁺/H⁺ Exchanger NHE-1 in cell migration. *Review, Acta Physiol* 187, 149-157

Stüwe, L., Meyer, J., Mally, S., Schwab, A. & Stock, C. (2005). NHE deficiency lowers the significance of extracellular pH for tumor cell migration. *Eur J Physiol* 449(Suppl. 1), 124

Subarsky P and Hill RP (2003). The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression. *Clin Exp Metastasis* 20, 237–250.

Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC, Laug WE, and DeClerck YA (1998). Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res* 58, 2209–2216.

T

Thurin M, SA-Lea and Tumor metastasis (2002). The old prediction and recent findings, *Hybrid Hybrodomics* 21, 111-6

Towbin R and Gruppo RA (1982). Pulmonary metastases in neuroblastoma. *Am J Roentgenol* 138, 75–78

U

Ura H, Denno R, Hirata K, Yamaguchi K, and Yasoshima T (1998). Separate functions of $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins in the metastatic process of human gastric carcinoma. *Surg Today* 28, 1001–1006

V

Vasudevan SA and Nuchtern JG (2005). Gene profiling of high risk neuroblastoma. *World J Surg* 29, 317–324.

Von Sengbusch et al (2005). Focal Adhesion Kinase regulates metastatic adhesion of carcinoma cells within Liver sinusoids, *Am J Pathol* 166, 585-596

W

Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. (1997). Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiological Reviews*. 77:51-74.]

Weiss L (1992). Biomechanical interactions of cancer cells with the microvasculature during hematogenous matastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 11: 227-235

Weiss L, Orr FW, Honn KV (1988). Interactions of Cancer Cells with the the microvasculature during metastasis. *FASEB J* 2, 12-21

Witz IP (2006). Tumor-microenvironment interactions: the selectin-selectin ligand axis in tumor-endothelium cross talk. *Cancer Treat Res* 130, 125–140.

Witz IP (2008). Yin-yang activities and vicious cycles in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 68, 9–13

X

Xu, L., Fukumura, D., and Jain, R. K. (2002). Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *J. Biol. Chem.* 277, 11368–11374.

Y

Yang C, Zeisberg M, Lively JC, Nyberg P, Afdhal N, and Kalluri R (2003). Integrin $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ are the key regulators of hepatocarcinoma cell invasion across the fibrotic matrix microenvironment. *Cancer Res* 63, 8312–8317.

Youngs SJ, Ali SA, Taub DD, and Rees RC (1997). Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 71, 257–266.

Z

Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, Linsen G, Tebbe U, Schröder R, Tiemann R (2001). The Na⁺/H⁺ exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction: results of the Evaluation of the Safety and Cardioprotective Effects of Eniporide in Acute Myocardial Infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol* 38:1644-1650

Zlotnik A, Yoshie O.(2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121–127

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Haier für die gute Betreuung und Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken.

Außerdem danke ich Katja Hagen und Frauke Spiecker für ihre Geduld und die vielen Hilfen im Labor.

Ein weiterer sehr herzlicher Dank geht an Anna-Lena Skawran und Ulrike Hanning für die kritische Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die mich während des Studiums immer unterstützt hat und mir den Raum für diese Arbeit gegeben hat.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung		Seite	Quelle
1	Aufbau Intravitalmikroskopie	28	Dr. P. Gaßmann(UKM)
2.1.	Adhäsion der B16-Zellen im Vergleich	31	B.Domikowsky
2.2.	Migration der B16-Zellen im Vergleich	32	B.Domikowsky
2.3.	IVM-Bild, Kontrollgruppe	34	B.Domikowsky
2.4.	IVM-Bild, HOE-Gruppe	34	B.Domikowsky
2.5.	Graphische Darstellung der Adhäsion der SY5Y-Zellen im Vergleich des lokalen (SY5Y.ad) und metastatischen (SY5Y.Lu2) Subtyps	36	B.Domikowsky
2.6.	Darstellung der relativen Migrationsrate der SY5Y-Zellen im Vergleich des lokalen (SY5Y.ad) und metastatischen (SY5Y.Lu2) Subtyps.	37	B.Domikowsky
2.7.	Graphische Darstellung der Adhäsion der MHH-Zellen im Vergleich des lokalen (MHH.ad) und metastatischen (MHH.Lu3) Subtyps.	38	B.Domikowsky
2.8.	Darstellung der relativen Migrationsrate der MHH-Zellen im Vergleich des lokalen (MHH.ad) und metastatischen (MHH.Lu3) Subtyps	39	B.Domikowsky
2.9.	Vergleich der Lokalsubtypen SY5Y.ad und MHH.ad in Bezug auf Adhäsion und relative Migrationsrate	40	B.Domikowsky
2.10.	Vergleich der metastatischen Zelllinien SY5Y.Lu2 und MHH.Lu3 in Bezug auf Adhäsion und relative Migrationsrate	41	B.Domikowsky
2.11.	Darstellung der Adhäsion der HT-29 LMM Zellen: Kontrollgruppe vs. nach Inkubation mit SDF-1	44	B.Domikowsky
2.12.	Darstellung der relativen Migrationsrate der Kontrollgruppe HT-29 LMM IgG 2b und der SDF-1-Gruppe im Vergleich	45	B.Domikowsky
2.13.	Adhäsion der HT-29 LMM Zellen der Kontrollgruppe sowie unter Einfluss von Lebein-1 und Rhodocetin	48	B.Domikowsky
2.14.	Darstellung der relativen Migrationsrate der HT-29 LMM Zellen im Vergleich nach Inkubation mit Lebein I und Rhodocetin	48	B.Domikowsky

Tabelle		Seite	Quelle
1	Mittelwerte und Standardabweichung der B16-Zellen im Vergleich	33	B. Domikowsky
2	Mittelwerte und Standardabweichung von Adhäsion und relativer Migrationsrate für die lokale und metastatische Variante der SY5Y- und der MHH- Zelllinie	42	B. Domikowsky
3	Daten der absoluten Adhäsionszahlen und der relativen Migrationsrate der HT-29 LMM IgG 2b Gruppe und der SDF-Gruppe	45	B. Domikowsky
4	Mittelwerte und Standardabweichung der HT-29 LMM Zellen im	49	B. Domikowsky

Kopie Tierversuchsgenehmigung



Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen

LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn
Dr. med. Peter Gaßmann
Klinik u. Poliklinik für Allg. Chirurgie
Molekularbiologisches Labor
Waldeyerstraße 1
48149 Münster

Tierschutz
Durchführung von Tierversuchen; Genehmigung gem. § 8 Tierschutzgesetz
Ihr Antrag vom 05.04.2007

Sehr geehrter Herr Dr. Gaßmann,

auf Grund des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Bekanntmachung der Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206) erteile ich Ihnen unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Tierversuches

„Bedeutung der Fucosyl-Transferase und fucosylierter Glykoproteine für die E-Selektin vermittelte Tumorzelladhäsion und die organo-selektive Metastasierung humaner Malignome“

Ihrem Genehmigungsantrag entsprechend obliegt die Verantwortung für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens folgenden Personen:

Verantwortlicher Leiter: Herr Dr. med. Peter Gaßmann
Stellvertretender Leiter: Herr PD Dr. med. Jörg Haier

Diese Genehmigung ist für die Dauer von 36 Monaten ab dem 14.06.2007 befristet bis zum

30.06.2010.

Die Genehmigung wird unter den folgenden Bedingungen erteilt und mit folgenden Auflagen verbunden:

Auskunft erteilt:
Herr Skoff
Direktwahl 02361/305-478
Fax 02361/305-786
poststelle@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen
9.93.2.10.36.07.122
bei Antwort bitte angeben
Ihre Nachricht vom:
Ihr Aktenzeichen:

Datum: 14.06.2007

Hauptsitz:
Leibnizstraße 10
45659 Recklinghausen
Telefon 02361 305-0
Fax 02361 305-786
poststelle@lanuv.nrw.de
www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:
Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:
Ab Hbf Recklinghausen mit Bus
236 bis Haltestelle
"Siemensstraße" oder mit Bus
SB20 bis Haltestelle
"Blitzkuhlenstraße" und 15 Min.
Fußweg

Bankverbindung:
Landeskasse Düsseldorf
Konto-Nr.: 41 000 12
West LB AG
(BLZ 300 500 00)
BIC-Code: WELADED3
IBAN-Code: DE 41 3005
0000 0004 1000 12