

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz

# **Rolle des *Nerve Growth Factor* (NGF) im Modell der pulmonalen Metastasierung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanbiologie (Dr. rer. physiol.)



Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

KATRIN MICHAELA SEIDLER

geb. in Lichtenfels

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
12.12.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: PD Dr. Andreas Nockher

Korreferent: Prof. Dr. F. Czubayko

***Meiner Familie***

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
1.1	Lungenkarzinome und pulmonale Metastasierung.....	8
1.2	Verlauf der Metastasierung.....	9
1.3	Tumor und Entzündung.....	15
1.4	Neurotrophine.....	17
1.4.1	Neurotrophin-Rezeptoren.....	17
1.4.2	Neurotrophine als Modulatoren entzündlicher Prozesse.....	20
1.4.3	NGF als pro-angiogener Faktor .....	21
1.4.4	Neurotrophine bei neoplastischen Erkrankungen .....	22
1.5	Hypothese und Zielsetzung .....	25
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>27</b>
2.1	Versuchstiere.....	27
2.2	Zelllinien.....	27
2.3	Chemikalien und Reagenzien.....	27
2.4	Kits.....	29
2.5	Proteine .....	29
2.5.1	Proteinstandards .....	30
2.6	Nukleinsäuren .....	30
2.6.1	Primer zur Genotypisierung der Versuchstiere .....	30
2.6.2	Primer für mRNA-Expressionsanalysen.....	30
2.6.3	Nukleinsäurestandards.....	30
2.7	Puffer und Lösungen .....	30
2.8	Zellkulturmedien .....	31
2.9	Verbrauchsmaterial .....	31
2.10	Geräte .....	32
2.11	Software.....	33
2.12	Versuchstiere und Behandlungsprotokolle .....	34
2.12.1	Mausstämme.....	34
2.12.2	Mausmodell zur Ausbildung pulmonaler Metastasen .....	34
2.12.3	Mausmodell zur Charakterisierung der pulmonalen Extravasation von Tumorzellen .....	35
2.12.4	Applikation von NGF im Mausmodell der Lungenmetastasierung .....	35

2.12.5	Modell zur Charakterisierung der pulmonalen Extravasation von Immunzellen .....	36
2.12.6	<i>Ex vivo</i> Modell zur Untersuchung der Permeabilität pulmonaler Blutgefäße..	37
<b>2.13</b>	<b>Probengewinnung aus Versuchstieren .....</b>	<b>38</b>
2.13.1	Blut- und Serumgewinnung .....	38
2.13.2	Aufreinigung Fluoreszenz-markierter Tumorzellen aus Blut.....	38
2.13.3	Bronchoalveoläre Lavage .....	38
2.13.3.1	<i>BAL-Flüssigkeit</i> .....	39
2.13.3.2	<i>Bestimmung der Zellzahl in der BAL</i> .....	39
2.13.3.3	<i>Herstellung und Färbung von Zytospins</i> .....	39
2.13.4	Organpräparation, Einbettung, Schnitte .....	39
2.13.4.1	<i>Präparation der Lunge und weiterer Organe</i> .....	39
2.13.4.2	<i>Verdau der Lungen für die FACS-Analyse</i> .....	40
2.13.4.3	<i>Einbettung der Lungen in Agarose und Paraffin</i> .....	40
2.13.4.4	<i>Einbettung der Lungen zur Herstellung von Gefrierschnitten</i> .....	41
<b>2.14</b>	<b>Histologie und Immunhistochemie .....</b>	<b>41</b>
2.14.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	41
2.14.2	Immunhistochemische Färbungen .....	42
2.14.3	Stereologische Quantifizierung des Tumolvolumens .....	43
<b>2.15</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>44</b>
2.15.1	Murine Zelllinien .....	44
2.15.2	Subkultivierung der Zelllinien.....	44
2.15.3	Kultivierung der Zellen für proteinbiochemische und molekularbiologische Analysen.....	45
2.15.4	Bestimmung der Zellvitalität <i>in vitro</i> .....	45
2.15.5	Bestimmung der Anoikis <i>in vitro</i> .....	46
2.15.6	Bestimmung der Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen <i>in vitro</i> .....	46
2.15.7	<i>In vitro</i> -Test der endothelialen Permeabilität .....	47
2.15.8	Test zum Migrationsverhalten von Tumorzellen <i>in vitro</i> .....	47
2.15.9	Bestimmung der Proliferation <i>in vitro</i> .....	48
<b>2.16</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>48</b>
2.16.1	Messung der NGF-Konzentration in Zellkulturüberständen und BALF .....	48
2.16.2	Zytokin- und Chemokinbestimmung in BALF .....	49
2.16.3	Proteinisolation aus Zellen .....	50
2.16.4	Proteinfällung und Konzentrationsbestimmung .....	50

2.16.5	Gelelektrophorese und Immunoblotting .....	50
2.16.6	Quantifizierung Fluoreszenz-markierter Tumorzellen mittels FACS-Analyse ..	51
<b>2.17</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>52</b>
2.17.1	DNA-Isolierung und Genotypisierung der Mäuse .....	52
2.17.2	Isolation von RNA aus Zellen .....	52
2.17.3	Verdau von DNA, Bestimmung der RNA-Konzentration und cDNA-Synthese .	53
2.17.4	Qualitative Polymerase-Ketten-Reaktion.....	54
<b>2.18</b>	<b>Statistische Analysen .....</b>	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Einfluss von NGF auf die pulmonale Metastasierung im Mausmodell .....</b>	<b>55</b>
3.1.1	Lokale NGF-Expression im Modell der pulmonalen Metastasierung.....	55
3.1.2	Pulmonale Metastasierung bei lokaler NGF-Überexpression .....	58
3.1.3	Pulmonale Metastasierung bei exogener NGF-Gabe .....	61
<b>3.2</b>	<b>Einfluss von NGF auf die lokale Entzündungsreaktion bei fortgeschrittener Metastasierung.....</b>	<b>63</b>
3.2.1	Entzündung im Lungengewebe .....	63
3.2.2	Entzündungsparameter in der BAL.....	64
<b>3.3</b>	<b>Direkter Effekt von NGF auf murine Lungenkarzinom-Zellen <i>in vitro</i>.....</b>	<b>67</b>
3.3.1	Expression von NGF und Rezeptoren .....	67
3.3.2	Vitalität .....	69
3.3.3	Anoikis .....	69
3.3.4	Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen <i>in vitro</i> .....	71
3.3.5	Migration von Tumorzellen <i>in vitro</i> .....	71
3.3.6	Proliferation von Tumorzellen <i>in vitro</i> .....	72
<b>3.4</b>	<b>Einfluss der lokalen NGF-Überexpression auf die Funktion pulmonaler Blutgefäße .....</b>	<b>74</b>
3.4.1	Endotheliale Permeabilität <i>in vitro</i> .....	74
3.4.2	Permeabilitätsmessungen an der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge .....	76
3.4.3	Einfluss von NGF auf die pulmonale Extravasation von LLC-Zellen.....	77
3.4.4	Extravasation von Tumorzellen in die Lunge nach exogener NGF-Applikation .....	81
3.4.5	Extravasation von Immunzellen im Modell der akuten Atemwegsentszündung.....	83
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Verminderte pulmonale Metastasierung in NGF-Tg Mäusen .....</b>	<b>87</b>

4.2	Geringe Ausprägung einer lokalen Entzündungs-reaktion im Endstadium der pulmonalen Metastasierung.....	91
4.3	Der Einfluss von NGF auf die Funktion von LLC-Zellen <i>in vitro</i> konnte nicht nachgewiesen werden .....	97
4.4	Funktionelle Veränderungen der pulmonalen Blutgefäße und reduzierte Extravasation von Tumorzellen in NGF-Tg Tieren .....	103
4.5	Ausblick.....	108
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	110
6	SUMMARY .....	112
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	113
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	129
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	134
10	ANHANG .....	135
10.1	Körpergewicht im Verlauf pulmonalen Metastasierung .....	135
10.2	Mestasenbildung in weiteren Organen .....	136
11	VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....	137
12	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER .....	138
13	LEBENS LAUF.....	139
14	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	140
15	DANKSAGUNG .....	141

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Lungenkarzinome und pulmonale Metastasierung

Lungenkarzinome gehören in Deutschland und weltweit zu den häufigsten malignen Tumorerkrankungen. Das Erkrankungsrisiko nimmt mit dem Alter zu und steht in direktem Zusammenhang mit dem Tabakkonsum, der bei ca. 90 % der Patienten für die Tumorentstehung verantwortlich ist. Neben weiteren Umweltfaktoren, die zur Entstehung von Lungenkarzinomen beitragen können, wurde bei einigen Patienten auch eine genetische Prädisposition nachgewiesen. Krebserkrankungen der Lunge sind in über 90 % der Fälle maligne und weisen eine hohe Mortalitätsrate auf. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung liegt nur bei ca. 15 % und wird damit begründet, dass eindeutige Symptome häufig erst in einem späten Stadium der Erkrankung auftreten (Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut).

Lungenkarzinome lassen sich anhand histologischer Befunde in zwei Hauptgruppen einteilen. Dies sind die kleinzelligen Lungenkarzinome (*small cell lung cancer, SCLC*), die ca. 15-20 % der Lungenkarzinome ausmachen, sowie die nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (*non-small cell lung cancer, NSCLC*), denen 80-85 % der Lungentumore zugeordnet werden können. Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome lassen sich weiter in Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und großzellige Lungenkarzinome unterteilen. Kleinzellige Lungenkarzinome stellen die aggressivere, schnell proliferierende und bereits in einem frühen Erkrankungsstadium metastasierende Form der Lungentumore dar. Die genaue Diagnosestellung kann nur durch die mikroskopische Untersuchung des Tumorgewebes und die genaue morphologische Differenzierung der Tumorzellen erfolgen (Travis et al., 2011; Hung et al., 2013; Jhun et al., 2013). Zusätzlich kann der Nachweis genetischer Mutationen, z. B. die des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (*epidermal growth factor receptor, EGFR*) bei der Wahl eines geeigneten Therapieansatzes hilfreich sein (Dowell und Minna, 2006).

Die Therapie primärer Lungenkarzinome hängt, neben dem Stadium der Erkrankung, von der exakten Diagnosestellung ab. Bei kleinzelligen Lungenkarzinomen wird bereits in einem frühen Krankheitsstadium die Chemotherapie bevorzugt, wohingegen bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen zunächst die operative Entfernung des betroffenen Lungenareals möglich ist. Haben sich die Karzinomzellen jedoch schon auf die regionalen Lymphknoten



oder andere Organe ausgebreitet, ist eine Operation zur vollständigen Entfernung des Tumors nicht mehr möglich. Neben den klassischen Behandlungsmethoden, wie der Operation oder verschiedenen Strahlen- und Chemotherapien, gewinnen personalisierte Therapieansätze immer mehr an Bedeutung. Diese beruhen meist auf der Grundlage genetischer Mutationen (z. B. der EGF-Rezeptor-Mutation). In diesem Fall können beispielsweise spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Anwendung kommen, die die Chemotherapien auf ein Minimum reduzieren oder in manchen Fällen ganz ersetzen (Bunn, 2012).

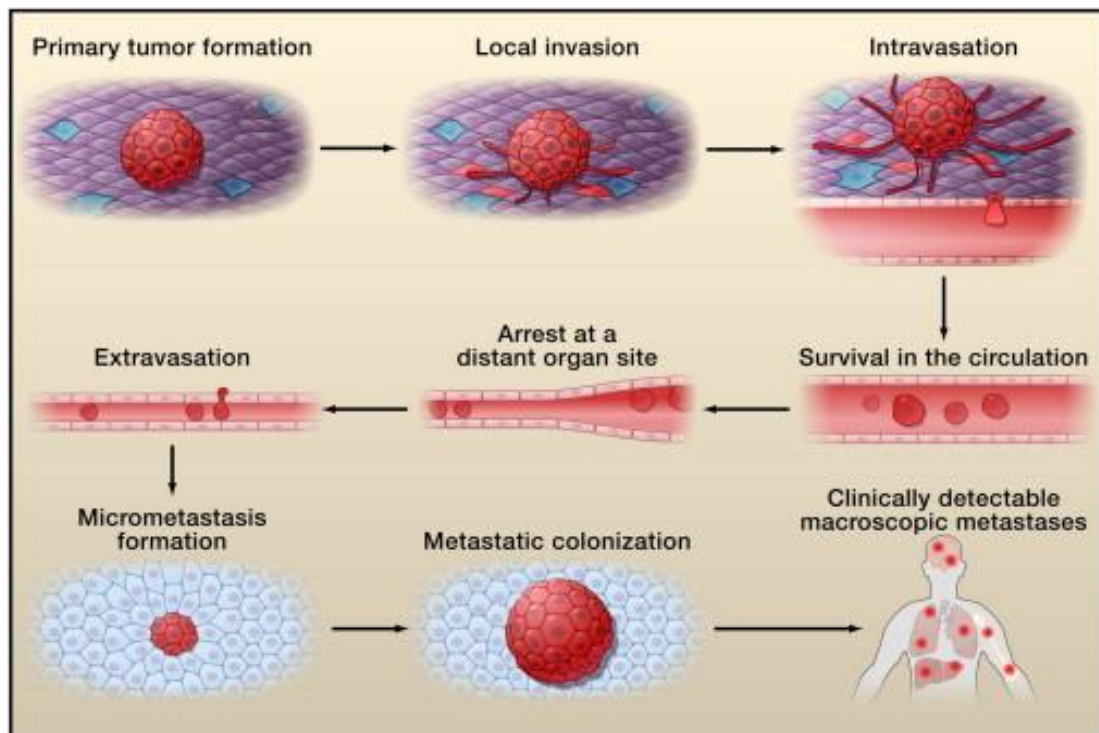
Neben der Entstehung von primären Lungenkarzinomen bilden sich in der Lunge auch häufig Metastasen aus, die bei der Dissemination von Tumorzellen aus anderen Organen entstehen. So wurden bei 30-55 % aller Krebspatienten Lungenmetastasen nachgewiesen. Primärtumore, die präferentiell in die Lunge metastasieren, sind v. a. Mammakarzinome, Melanome, Kolonkarzinome und Nierentumore. Die Ausbreitung metastasierender Tumorzellen erfolgt dabei sowohl über Blutgefäße als auch über lymphatische Gefäße. Bei der systemischen venösen Drainage wird die Lunge als eines der ersten Organe durchlaufen, wobei metastasierende Tumorzellen im Kapillarnetz der Lunge oft rein mechanisch zurückgehalten werden. Dies ist die Hauptursache für die Bildung von Lungenmetastasen. Die genauen Prozesse während der Metastasierung werden in 1.2 näher beschrieben.

Die Therapie von Lungenmetastasen hängt hauptsächlich von der Art des Primärtumors ab sowie davon, ob weitere Organe von Metastasen betroffen sind. Ist dies nicht der Fall, können Lungenmetastasen operativ entfernt werden. Ist eine komplette Entfernung sowohl des Primärtumors als auch der Metastasen nicht möglich, werden bei den meisten Patienten unterschiedliche Chemo- oder Strahlentherapien durchgeführt. Allerdings können die zurzeit verfügbaren Therapieformen zwar das Fortschreiten der Erkrankung in manchen Fällen aufhalten, eine vollständige Heilung ist jedoch nur bei sehr wenigen Patienten möglich. Deshalb ist das Auftreten von Metastasen generell mit einer schlechteren Prognose für den Patienten verbunden.

## **1.2 Verlauf der Metastasierung**

Die Malignität einer Krebserkrankung hängt von der Fähigkeit des Primärtumors ab, Metastasen auszubilden. Der Prozess der Metastasierung besteht aus einer Reihe fortlaufender, voneinander abhängiger Schritte, die bereits intensiv erforscht sind. Zunächst

migrieren die vom Primärtumor losgelösten Tumorzellen in das umliegende Gewebe und wandern anschließend in die lokalen Blutgefäße ein. Über die Zirkulation gelangen die Tumorzellen zu entfernten Organen und extravasieren dort ins Gewebsparenchym. Anschließend wird das Proliferationsprogramm der Zellen reaktiviert und somit das Wachstum der Metastasen am Sekundärorgan eingeleitet (Abb. 1).



**Abb. 1. Prozess der Metastasierung**

Metastasierende Tumorzellen lösen sich aus einem bestehenden Primärtumor. Es kommt zur lokalen Invasion des umliegenden Gewebes und anschließend zur Einwanderung der Tumorzellen in Blutgefäße (Intravasation). Nachdem metastasierende Tumorzellen im Blutkreislauf überlebt haben, adhären sie an die Kapillaren des Zielorgans und extravasieren ins Parenchym, um dort Mikrometastasen zu bilden. Nach Aktivierung der Proliferation können die Tumorzellen klinisch detektierbare Metastasen im Zielorgan ausbilden (Valastyan und Weinberg, 2011).

### Lokale Invasion

Im ersten Schritt der Metastasierung, der lokalen Invasion, lösen sich metastasierende Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors und wandern in das angrenzende Tumor-assoziierte Stroma und anschließend in das gesunde Parenchym ein. Da die meisten soliden Tumore epithelialen Ursprungs sind, müssen die Tumorzellen zunächst die den Primärtumor umgebende Basalmembran (BM) durchbrechen, um in das umliegende Stroma einwandern zu können. Dabei können sowohl in den Krebszellen selbst als auch in

benachbarten Zellen Mechanismen aktiviert werden, die die Malignität der Tumorzellen fördern. Es ist z. B. möglich, dass metastasierende Zellen Proteasen freisetzen, die zur Degradation der extrazellulären Matrix (EZM) und zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren führen. Über die Integrin-vermittelte Adhäsion der Tumorzellen an die BM können außerdem Signalwege aktiviert werden, die die Zellpolarität, die Proliferation und die invasiven Eigenschaften der Tumorzellen beeinflussen (Bissell und Hines, 2011). Daneben führt die Einwanderung der Tumorzellen in das Tumor-assoziierte Stroma meist zu dessen Aktivierung, was die Sekretion von Zytokinen (z. B. Interleukin 6 (IL-6) oder IL-4) zur Folge haben kann. Diese tragen wiederum zur Steigerung der malignen Eigenschaften der metastasierenden Zellen bei (Gocheva et al., 2010; Dirat et al., 2011).

### **Intravasation**

Der nächste Schritt nach der lokalen Invasion ist der Übertritt der Tumorzellen in angrenzende Lymph- oder Blutgefäße. Bei humanen Tumoren wird häufig die lymphatische Verbreitung der Tumorzellen beobachtet. Den Hauptmechanismus der Metastasierung stellt jedoch die hämatogene Dissemination der Tumorzellen dar (Gupta, 2006). Bei der Intravasation passieren die Tumorzellen die Wand der Mikrogefäße, die, unter physiologischen Bedingungen, von Perizyten und Endothelzellen (*endothelial cells*, EC) gebildet wird. Die Intravasation der Tumorzellen kann durch strukturelle Veränderungen Tumor-assoziiertes Blutgefäße erleichtert werden. Diese sind im Vergleich zu gesunden Blutgefäßen stark gewunden und weisen eine erhöhte Permeabilität auf. Außerdem befinden sich Tumor-assoziierte Blutgefäße im ständigen Umbau. Deshalb sind die neugebildeten Gefäße nur selten von einer Perizyten-schicht umschlossen und die EC interagieren nur schwach miteinander. Dies wiederum erleichtert die Intravasation der Tumorzellen (Carmeliet, 2011). Ein Wachstumsfaktor, der bei der Intravasation eine entscheidende Rolle spielt, ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF erhöht einerseits die Permeabilität bereits bestehender Blutgefäße und fördert andererseits auch die Angiogenese neuer Blutgefäße, die für die Versorgung und das Wachstum des Primärtumors notwendig sind (Lee et al., 2003; Monaghan-Benson et al., 2009; Claesson-Welsh et al., 2013).

### **Überleben in der Zirkulation**

Nach dem Übertritt in die Blutgefäße können sich metastasierende Tumorzellen über die Zirkulation in entfernte Organe ausbreiten. Jedoch sind die Tumorzellen in den Gefäßen vielen äußeren Einflüssen ausgesetzt, die die Ausbreitung der Tumorzellen zu einem sehr ineffektiven Prozess machen. Ähnlich der Apoptose wird in einem Großteil der zirkulierenden Tumorzellen ein Vorgang eingeleitet, der als Anoikis bezeichnet wird. Bei der Anoikis handelt es sich um den programmierten Zelltod, der durch den Kontaktverlust zu extrazellulären Matrixkomponenten oder anderen Zellen im Zellverband ausgelöst wird. Da die meisten Tumorzellen aus Epithelzellen hervorgehen, sind sie auf diese Zell-Zell bzw. Zell-Matrix-Kontakte angewiesen.

Neben der Anoikis sind zirkulierende Tumorzellen hämodynamischen Scherkräften sowie dem Angriff durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) ausgesetzt. Tumorzellen können sich vor diesen Einflüssen schützen, indem sie L- und P-Selektine exprimieren und über diese an Thrombozyten binden (Joyce et al., 2009). Von Thrombozyten umhüllte Tumorzellen sind besser vor den äußeren Einflüssen geschützt und können deshalb länger in der Zirkulation überleben. Außerdem setzen sich die Tumorzell-Thrombozyten-Aggregate auf Grund ihrer Größe leichter in den Kapillaren der Zielorgane fest.

### **Arrest in Zielorganen**

Obwohl zirkulierende Tumorzellen sich theoretisch in einer Vielzahl sekundärer Organe ansiedeln können, wird beobachtet, dass bestimmte Primärtumore nur in wenigen Zielorganen Metastasen ausbilden (Fidler, 2003). Der Arrest zirkulierender Tumorzellen in bestimmten Organen wird hauptsächlich durch die Anatomie des Gefäßsystems verursacht. Kapillaren haben einen Durchmesser von nur ca. 8  $\mu\text{m}$ , wohingegen die meisten Tumorzellen einen Durchmesser von ca. 20-30  $\mu\text{m}$  aufweisen. Deshalb können sie das Kapillarnetz des ersten Organs, das sie während der hämatogenen Dissemination erreichen, größtenteils nicht passieren. Einige metastasierende Zellen besitzen aber auch eine ungewöhnliche Plastizität, die es ihnen ermöglicht, die Engstellen der Kapillaren zu überwinden und sich in weiter entfernten Organen anzusiedeln. Eine weitere Hypothese besagt, dass zirkulierende Tumorzellen eine für den Primärtumor typische Organprädisposition besitzen. Über die Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle wandern Tumorzellen demnach nur in vorausbestimmte Organe aus. Brown et al. wiesen z. B. nach,

dass Mammakarzinomzellen Metadherin exprimieren, welches die Adhäsion an pulmonale Blutgefäße erleichtert (Brown und Ruoslahti, 2004).

### **Extravasation**

Nachdem zirkulierende Tumorzellen an die Gefäße des Sekundärorgans adhärirt haben, können sie bereits dort proliferieren und erst später die Gefäßwand durchbrechen, um so in das umgebende Gewebe einzuwandern (Al-Mehdi et al., 2000). Weitaus häufiger ist jedoch die sofortige Extravasation der Tumorzellen ins Parenchym des Zielorgans. Der Vorgang der Extravasation, bei der Tumorzellen die EC- und Perizytschicht durchqueren, ist mit der umgekehrten Intravasation vergleichbar. Da sich Blutgefäße des Primärtumors jedoch von denen des Zielorgans unterscheiden, ist es naheliegend, dass der Intra- bzw. Extravasation unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen, die bisher nicht vollständig charakterisiert werden konnten. Während die neu gebildeten Gefäße des Primärtumors, wie bereits beschrieben, meist stärker gewunden und durchlässiger sind, handelt es sich bei den Blutgefäßen der Zielorgane um unveränderte, gesunde Gefäße, die normalerweise nur eine geringe intrinsische Permeabilität besitzen. Beispiele hierfür sind die Blut-Hirn-Schranke oder auch pulmonale Kapillaren. Im Gegensatz dazu liegt in den Sini der Leber ein gefenstertes Endothel vor, das hochgradig permeabel ist und für metastasierende Tumorzellen kein großes Hindernis darstellt (Nguyen et al., 2009). Um Blutgefäße mit einer niedrigen intrinsischen Permeabilität überwinden zu können, setzen Primärtumore oft Faktoren frei, die eine Hyperpermeabilität der Gefäße auch in den Zielorganen auslösen. So sezernieren Mammakarzinome proteolytische Enzyme, wie z. B. Matrixmetalloproteasen (MMP-1 und MMP-2), die mikrovaskuläre EC-Verbindungen in der Lunge zerstören und so die Extravasation der disseminierten Mammakarzinomzellen erleichtern. (Padua et al., 2008).

### **Bildung von Mikrometastasen**

Das spezifische Mikromilieu des Zielorgans bestimmt die weitere Entwicklung der disseminierten Tumorzellen. Da sich das Milieu des Zielorgans meist stark von dem des Entstehungsorts des Primärtumors unterscheidet, ist es für die metastasierenden Tumorzellen überlebenswichtig, sich an die veränderten Bedingungen anzupassen. Meist werden am Zielort andere Zytokine und Wachstumsfaktoren exprimiert. Auch die Art der Stromazellen und der EZM-Komponenten sowie die Mikroarchitektur des Gewebes unterscheiden sich normalerweise von denen des Ursprungsorgans. Deshalb setzen einige

Primärtumore Moleküle frei, die zur Bildung einer sog. »prämetastatischen Nische« im Zielorgan beitragen. So führte z. B. in einem Mausmodell die Induktion der MMP-9-Expression in pulmonalen EC und Makrophagen durch den subkutan (s. c.) implantierten Primärtumor zu einer gesteigerten Invasion von Tumorzellen in die Lunge. Dieser Mechanismus wird über die Aktivierung des VEGF-Rezeptors 1 gesteuert (Hiratsuka et al., 2002). Generell finden die Prozesse, die zur Entstehung einer prämetastatischen Nische beitragen, bereits statt, bevor die zirkulierenden Tumorzellen den Metastasierungsort erreichen, um ein geeignetes Milieu für die zirkulierenden Tumorzellen zu etablieren (Psaila et al., 2009).

Metastasierende Zellen aktivieren außerdem autonome Mechanismen, die es ihnen ermöglichen, sich an die veränderten Bedingungen im Zielorgan anzupassen. So wurde z. B. beschrieben, dass die Aktivierung des *sarcoma* (Src)-Tyrosinkinase-Signalwegs in metastasierenden Mammakarzinomzellen deren Überleben im Knochen fördert. In Gegensatz dazu hat die Induktion der Src-Signalwege in Mammakarzinomzellen keinen Einfluss auf deren Überleben in der Lunge (Zhang et al., 2009). Diese Beobachtung zeigt zudem, dass auch am Ende des Metastasierungsprozesses noch Mechanismen existieren, die zur organspezifischen Ausbildung von Metastasen beitragen.

### **Kolonisation**

Sogar wenn die Tumorzellen die Anfangsphase im fremden Mikromilieu des Zielorgans überlebt haben, kann die Bildung makroskopisch erkennbarer Metastasen noch verhindert werden. Dies ist der Fall, wenn in den Tumorzellen die Proliferationsmechanismen nicht reaktiviert werden können. Wird die Proliferation der extravasierten Tumorzellen initiiert, kann dies sofort nach der Extravasation erfolgen, oder nach einer Latenzzeit, in der sich die Tumorzellen in einer Ruhephase (*dormancy*) befinden. Während dieser Phase behalten die Tumorzellen ihre Vitalität, proliferieren aber nicht oder nur in einem Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose. In beiden Fällen bleibt die Anzahl der Zellen konstant. Die Ruhephase kann durch verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen beendet werden. So wurden z. B. in den letzten Jahren Gene identifiziert, die die pulmonale Metastasierung von Mammakarzinomzellen erleichtern. Diese Gene kodieren z. B. für Transkriptionsregulatoren, wie den *inhibitor of DNA-binding 1* (ID1) oder extrazelluläre Proteine, wie das *secreted protein acidic and rich in cysteine* (SPARC) oder MMP-2 (Minn et al., 2005). Das unkontrollierte Wachstum maligner Tumorzellen kann letztendlich auf

verschiedene Arten in Gang gesetzt werden. Auf der einen Seite können Tumorzellen selbst Wachstumsfaktoren überexprimieren und ihre Proliferation über autokrine Stimulation anregen. Auf der anderen Seite können aber auch die Zusammensetzung der lokalen EZM oder die Expression von Wachstumsfaktoren durch lokale Strukturzellen das Mikromilieu des Zielorgans verändern und so die Proliferation der Tumorzellen fördern.

### 1.3 Tumor und Entzündung

Unter physiologischen Bedingungen existieren immunologische Prozesse, die das unkontrollierte Tumorstadium verhindern oder zumindest eindämmen sollen. So werden alle Zell- und Organsysteme ständig vom Immunsystem überwacht, welches die Mehrheit der entstehenden Tumorzellen erkennt und beseitigt. Die Tumorentstehung ist folglich ein Zeichen dafür, dass einige Tumorzellen vom Immunsystem nicht erkannt werden oder Mechanismen entwickelt haben, die sie vor den Angriffen des Immunsystems schützen. Die Bedeutung des Immunsystems bei der Tumorentstehung konnte bisher überwiegend in Modellen mit immundefizienten Mäusen nachgewiesen werden. Bei diesen Mäusen wurde eine höhere Tumorzinsidenz oder eine schnellere Progression des Tumorstadiums beobachtet. Als Effektorzellen in diesen Modellen wurden vor allem CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL), natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) beschrieben (Teng et al., 2008). Einige Tumorzellen schützen sich vor dem Angriff dieser Immunzellen, indem sie über die Sekretion des immunsuppressiv wirkenden *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) die Funktion der CTLs und NK-Zellen inhibieren. Ein weiterer Mechanismus ist die Rekrutierung immunsupprimierender Zellen, wie regulatorischer T-Zellen (Treg-Zellen) und *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) (Kopp et al., 2009; Chang et al., 2012).

Neben den anti-tumorigenen Mechanismen des Immunsystems kann die Tumorentstehung aber auch durch entzündliche Prozesse begünstigt werden. So postulierte Rudolf Virchow bereits vor genau 150 Jahren die Präsenz inflammatorischer Zellen im Tumorgewebe sowie die Entstehung von Tumoren in chronisch entzündeten Geweben. Diese Hypothese bestätigte sich bis heute bei mehreren Tumorerkrankungen denen chronische Entzündungen vorausgegangen sind. Es konnten u. a. Magenkarzinome mit *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) Infektionen, Pankreaskarzinome mit chronischer oder hereditärer Pankreatitis sowie hepatozelluläre Karzinome mit Hepatitis B und C Virusinfektionen (HBV,

HCV) in Verbindung gebracht werden. Neben der durch Infektionen, z. B. *H. pylori* oder HCV, verursachten Tumorentstehung wirken auch intrinsische Mediatoren wie pro-inflammatorische Zytokine, Eicosanoide, Wachstumsfaktoren und reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) über verschiedene Mechanismen Tumor-fördernd. Über diese Mechanismen werden u. a. das Überleben, die Proliferation und die Motilität der Zellen gefördert oder die Apoptose gehemmt (Sjöblom et al., 2006; Stephens et al., 2009). Neuere Untersuchungen in humanem Tumorgewebe mittels genomweiter Analyse belegen außerdem das Auftreten genetischer und epigenetischer Veränderungen, die die Krebsentstehung begünstigen. So fördern z. B. Mutationen in Onkogenen wie *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog* (MYC) oder *rat sarcoma* (RAS) oder Tumorsuppressorgenen wie p53 die Tumorgenese (Schuster et al., 2011; Solomon et al., 2012). Die Verbindung zum Immunsystem besteht darin, dass diese Onkogene und Tumorsuppressoren inflammatorischen Signalwegen, wie z. B. der Aktivierung von *nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) oder *signal transducer and activator of transcription* (STAT), vorgeschaltet sind (Starczynowski et al., 2011).

In den letzten 15 Jahren gelang außerdem der Nachweis, dass Tumor-assoziierte, inflammatorische Prozesse die Tumorgenese und die Tumorprogression vorantreiben können. Viele aktuelle Studien in der Tumorforschung konzentrierten sich deshalb darauf, die funktionellen Aspekte der Tumor-assoziierten Entzündung zu entschlüsseln. Dabei konnten vor allem Zellen des angeborenen Immunsystems identifiziert werden, die die Tumorprogression forcieren (Colotta et al., 2009; DeNardo et al., 2010; Qian et al., 2010; Grivennikov et al., 2010). So können inflammatorische Zellen beispielsweise das Mikromilieu beeinflussen, indem sie Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie EGF oder den *colony stimulating factor 1* (CSF-1), sezernieren. Diese wiederum fördern die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen oder hemmen die Apoptose dieser Zellen. Proteolytische Enzyme, die von Immunzellen sezerniert werden, wie z. B. MMP-9, können außerdem zur Modifizierung der EZM beitragen und so die Angiogenese, die Invasion und die Metastasierung begünstigen (Lin et al., 2001; Ren et al., 2003; Palma et al., 2005).

Diese Daten belegen die Bedeutung inflammatorischer Prozesse während der Tumorgenese und –progression. Die Identifizierung und Charakterisierung der gegenläufigen Immunantworten bei Tumoren kann einerseits zur frühen Diagnose des Krankheitsverlaufs beitragen, andererseits können ggf. neue Therapien entwickelt werden, die die anti-tumorigene Immunantwort verstärken.



## 1.4 Neurotrophine

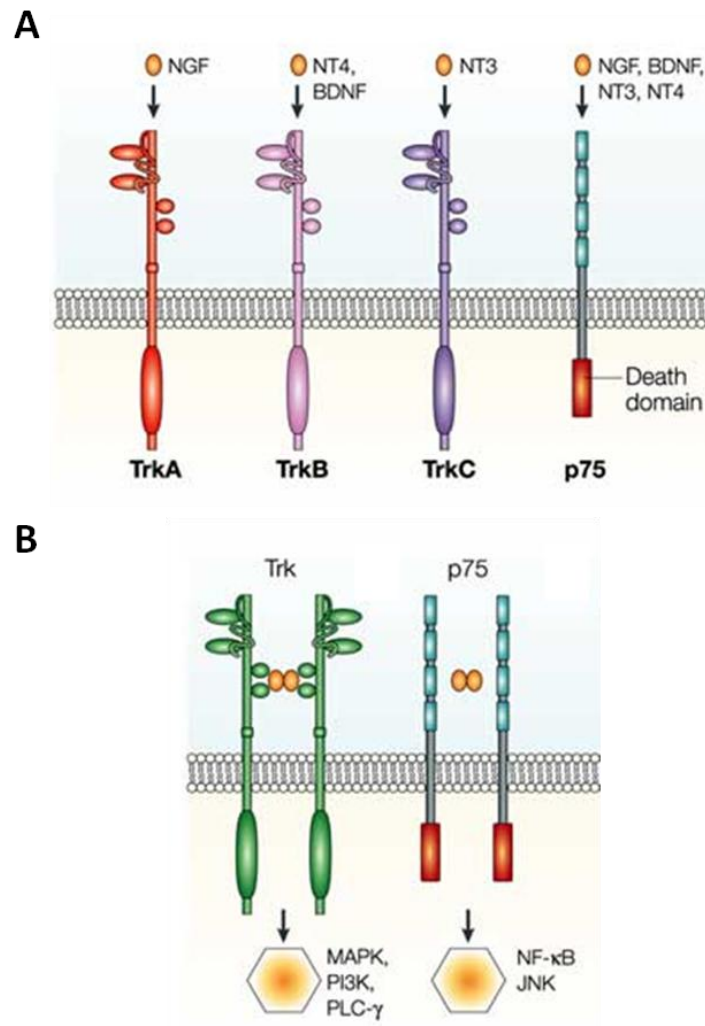
Die Neurotrophine (NT) stellen eine Familie von Wachstumsfaktoren dar, deren Bedeutung bei neoplastischen Erkrankungen kontrovers diskutiert wird. Die Expression der NT wurde zunächst im Nervensystem beschrieben, wo deren Funktion bis heute sehr gut erforscht ist (Levi-Montalcini, 1998). So regulieren NT sowohl das Überleben als auch die Apoptose neuronaler Zellen sowie deren Differenzierung. Sie sind nicht nur während der embryonalen und postnatalen Entwicklung, sondern auch zur Erhaltung neuronaler Zellen essentiell (Lewin und Barde, 1996).

Die Familie der NT besteht bei Mammaliern aus 4 Polypeptiden die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten aufweisen. Zu den NT zählen der *nerve growth factor* (NGF), der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und die Neurotrophine NT3 und NT4. NT werden zunächst als etwa 27 kDa große Vorläuferproteine synthetisiert. Prä-pro-NT können intrazellulär durch Furin oder Pro-Konvertasen an einer hochkonservierten dibasischen Spaltstelle gespalten werden. Nach der weiteren Prozessierung der Vorläuferproteine kommt es zur Freisetzung maturaer carboxy-terminaler Proteine. Die abgespaltene aminoterminaler Proproteindomäne scheint an der intrazellulären Faltung der reifen Proteine beteiligt zu sein. NT können auch als Proproteine sezerniert werden, die extrazellulär beispielsweise durch Plasmin und Matrixmetalloproteinasen (MMP) in kleinere Peptide gespalten werden. Die maturaen Proteine (ca. 12 kDa) bilden formstabile, nicht kovalent gebundene Dimere. (Chao et al., 2006).

### 1.4.1 Neurotrophin-Rezeptoren

NT vermitteln ihre Effekte über die Bindung an zwei unterschiedliche Oberflächenrezeptortypen. Zum einen sind dies die Tropomyosin-ähnlichen Tyrosinkinase-Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC, zum andern der, zur Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF) Rezeptorfamilie gehörende, p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor. Bei den Trk-Rezeptoren handelt es sich um transmembrane Rezeptoren (ca. 140 kDa), die reife NT mit unterschiedlicher Spezifität binden. So bindet NGF präferenziell an TrkA, BDNF und NT4 an TrkB sowie NT3 an TrkC (Teng and Hempstead, 2004). Diese, im Allgemeinen als hochaffine Bindungen beschriebenen Interaktionen sind in Bezug auf NGF-TrkA und BDNF-TrkB nur von niedriger Affinität, können aber durch Rezeptordimerisierung, strukturelle Modifikationen oder die Assoziation mit p75<sup>NTR</sup> als Korezeptor erhöht werden (Bibel, 1999). Der p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor

(ca. 75 kDa) ist ein Glykoprotein, das über eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert ist. Dieser Rezeptor besitzt keine Ligandenspezifität und bindet alle NT, sowohl die aktiven Proteine als auch die Pro-Neurotrophine, mit der gleichen Affinität (Sutter et al., 1979; Johnson et al., 1986; Radeke et al., 1987; Martin-Zanca et al., 1989) (Abb. 2A).



**Abb. 2. Neurotrophin-Rezeptoren und Signalkaskaden**

(A) Die Neurotrophine NGF, BDNF, NT3 und NT4 vermitteln ihre Effekte über zwei verschiedene Rezeptortypen. Durch die Ligandenspezifität der *tropomyosin-related kinase* (Trk) Rezeptoren bindet NGF präferentiell an TrkA, BDNF und NT4 an TrkB und NT3 an TrkC. Der p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor bindet alle Neurotrophine mit der gleichen Affinität. (B) Durch die Bindung der Neurotrophine werden drei Hauptwege aktiviert, die ihre Signale über MAPK, PI3K bzw. PLC-γ vermitteln. Die Aktivierung dieser Signalkaskaden induziert die Differenzierung oder Proliferation der Zellen. Die Bindung der Neurotrophine an den p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor vermittelt über die Aktivierung von JNK die Apoptose oder über NFκB das Überleben der Zellen. (modifiziert nach Chao, 2003)

Die Trk-Rezeptoren werden sowohl in voller Länge als auch in einer verkürzten Form exprimiert (Reichardt, 2006). Für die direkte Aktivierung der Signaltransduktion wird der Volle-Länge-Rezeptor benötigt. Die genaue Funktion der verkürzten Trk-Rezeptoren ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Über die Bindung der Liganden an die entsprechenden Trk-Rezeptoren oder den p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor werden verschiedene Signalwege aktiviert, die für das Schicksal der Zellen entscheidend sind (Kaplan and Miller, 2000; Patapoutian and Reichardt, 2001; Roux, 2002; Hempstead, 2002). So induzieren die Trk-Rezeptoren vor allem die Zellaktivierung, die Differenzierung und das Überleben der Zellen, während die Aktivierung des p75<sup>NTR</sup>-Rezeptors meist die Apoptose der Zellen vermittelt. Werden von Zellen jedoch beide Rezeptortypen koexprimiert, können die übermittelten Signale einander entgegenwirken. Es können aber auch hochaffine Bindungsstellen entstehen, die die NGF-vermittelten Effekte verstärken (Chao, 2003).

Die Bindung der NT an ihre entsprechenden Trk-Rezeptoren führt zunächst zur Dimerisierung der Rezeptoren und zur Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste. Dadurch kommt es zur Aktivierung von drei unterschiedlichen Signalwegen. Die Rekrutierung des Adapterproteins *Src homology 2 domain containing protein* (Shc) aktiviert die *phosphatidyl-inositol 3-Kinase* (PI3K) und die Proteinkinase B (Akt). Akt induziert daraufhin entweder die Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) oder einer *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Kaskade, zur Transkription von Genen, die das Überleben und die Differenzierung der Zellen fördern. Über das Adapterprotein Shc werden aber auch, über die *rat sarcoma* (Ras)/*rat fibrosarcoma*- (Raf) und *extracellular- regulated kinase*- (ERK 1/2) Signalwege, Transkriptionsfaktoren induziert, die ebenfalls zur Differenzierung und zum Überleben der Zellen beitragen. Ein weiterer Signalweg führt über die Bindung der Phospholipase C $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) an aktivierte Trk-Rezeptoren zur Induktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>). Dieses wird anschließend in Inositol-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) gespalten. Über IP<sub>3</sub> erfolgt die intrazelluläre Freisetzung des gespeicherten Kalziums, das zusammen mit DAG die Aktivierung der PKC bewirkt.

Der p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor vermittelt dagegen je nach Zelltyp und Rezeptordichte sowohl pro- als auch anti-apoptotische Signale in der Zielzelle. Dabei kommt es zur Rekrutierung von Adapterproteinen und deren anschließender Phosphorylierung. So führt einerseits die Aktivierung von *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6) und *IL-1 receptor-associated*

*kinase* (IRAK) zur Induktion des *nuclear factor kappa B* (NFκB). Dies hat die Transkription anti-apoptotischer Gene (z. B. *B-cell lymphoma 2*, Bcl-2) zur Folge. Andererseits wird über die Aktivierung des p75<sup>NTR</sup>-Rezeptors durch NT-Bindung die GTPase *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) induziert. Dies wiederum führt über *c-Jun N-terminale kinase* (JNK) vermittelte Signale zur Transkription pro-apoptotischer Proteine wie p53 und dessen Kofaktor *Bcl-2-associated X protein* (Bax) (Abb. 2B)

Auch außerhalb des zentralen und peripheren Nervensystems konnte in den letzten Jahren die Expression und Funktion der NT in verschiedenen Zellen, Organen und Organsystemen nachgewiesen werden. In der Lunge werden die NT und deren Rezeptoren von verschiedenen Zelltypen, wie neuronalen Zellen, dem Bronchialepithel, glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, und Immunzellen exprimiert (Ricci et al., 2004; Prakash et al., 2010). Diese heterogene Expression der NT kann sich auf eine Vielzahl struktureller und funktioneller Prozesse in der Lunge auswirken. So wurde bereits beschrieben, dass NT an einer Vielzahl inflammatorischer Prozesse, struktureller Umbauprozesse und der Entstehung und Progression neoplastischer Erkrankungen beteiligt sind. Auf diese Punkte soll im Folgenden näher eingegangen werden.

#### **1.4.2 Neurotrophine als Modulatoren entzündlicher Prozesse**

Die erhöhte Expression der NT wurde in verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie atopischer Dermatitis, Psoriasis, systemischem Lupus erythematoses, Osteoarthritis und Asthma bronchiale, nachgewiesen (Aalto et al., 2002; Raap et al., 2005; Nockher und Renz, 2006; Raychaudhuri und Raychaudhuri, 2009; Cardenas et al., 2010; Mapp und Walsh, 2012).

Beim allergischen Asthma bronchiale ist die Expression der NT gut charakterisiert. So wurden in der bronchoalveolären Lavage von Asthmatikern (Virchow et al., 1998) und im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung erhöhte NGF- und BDNF-Konzentrationen nachgewiesen (Braun et al., 1998). Die nähere Charakterisierung der Immunzellen zeigte, dass sowohl NT als auch NT-Rezeptoren von vielen dieser Zellen exprimiert werden. Zum Teil ist dafür die vorherige Aktivierung der Immunzellen nötig. So konnte z. B. nachgewiesen werden, dass Alveolarmakrophagen NT-3 konstitutiv exprimieren, aber erst nach Allergenprovokation auch NGF und BDNF sezernieren (Hikawa, 2002). Humane dendritische Zellen (DC) exprimieren NGF und BDNF auf mRNA- und

Proteinebene und zeigen eine erhöhte BDNF-Sekretion nach exogenem Lipopolysaccharid (LPS) Stimulus (Noga et al., 2007; Noga et al., 2008). Auch bei CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten konnte die Produktion von NGF und BDNF nachgewiesen werden. Ebenso produzieren B-Lymphozyten NGF, BDNF und NT3, vor allem nach Allergenprovokation (Santambrogio et al., 1994; Kerschensteiner et al., 1999).

NT können außerdem den Verlauf der Entzündungsreaktion modulieren, indem sie die Expression verschiedener Zytokine beeinflussen. Eosinophile Granulozyten produzieren z. B. vermehrt IL-4 nach NGF-Stimulus (Noga et al., 2002). Humane DCs, die die NT-Rezeptoren TrkA und TrkB exprimieren und durch NGF und BDNF über unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden, produzieren bei Allergikern vermehrt das pro-inflammatorische IL-6, wohingegen bei gesunden Probanden die Produktion des anti-inflammatorischen IL-10 überwiegt (Noga et al., 2008).

Diese vielfältigen Daten belegen die Funktion der NT und der NT-Rezeptoren als Mediatoren und Modulatoren inflammatorischer Prozesse sowohl über autokrine als auch über parakrine Mechanismen. Die Bedeutung der NT bei Tumor-assoziierten Entzündungsprozessen wurde bis heute jedoch nicht beschrieben.

### 1.4.3 NGF als pro-angiogener Faktor

Die Angiogenese ist der Prozess der Gefäßneubildung aus bereits bestehenden Blutgefäßen. Sie ist während der Entwicklung von zentraler Bedeutung und findet auch im Erwachsenenalter, meist unter pathologischen Bedingungen, noch statt. So trägt die Angiogenese, z. B. während chronischer Entzündungsprozesse oder dem Tumorwachstum, zur Progression der Erkrankung bei (Folkman, 1995). Während des fortschreitenden Tumorwachstums sind Tumore auf die Bildung neuer Blutgefäße angewiesen, da sie ohne eigene Blutversorgung nur bis zu einer Größe von ca. 2 mm<sup>3</sup> wachsen können. Über die neu gebildeten Blutgefäße werden Tumore mit Sauerstoff, Nährstoffen und Wachstumsfaktoren sowie proteolytischen Enzymen versorgt. Diese Proteasen tragen zur Degradation der EZM bei und erleichtern so die Metastasierung.

Für die Regulation der Angiogenese sind vor allem Faktoren wie VEGF, Angiopoietine (Ang), der *platelet-derived growth factor* (PDGF) und Angiostatin beschrieben (Ribatti et al., 2000). In den letzten Jahren wurden darüber hinaus weitere endogene Regulatoren der

Angiogenese identifiziert. Dies sind u. a. Erythropoietin (EPO) und Adrenomedullin (AM) (Hermansen et al., 2011; Xue et al., 2012).

Auch NGF besitzt pro-angiogene Eigenschaften. EC exprimieren die NGF-Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup>, und die Stimulation der EC mit NGF fördert deren Proliferation (Raychaudhuri et al., 2001; Cantarella, 2002; Steinle und Granger, 2003). Ferner führt die Stimulation aus der Aorta von Mäusen und Schweinen isolierter EC mit NGF zur schnellen Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors sowie der Migration der EC entlang eines NGF-Gradienten (Tanaka et al., 2004; Rahbek et al., 2005). Außerdem steigert NGF die Angiogenese *in vivo*. Dies konnte in Angiogenesetests sowohl in Hühnerembryonen als auch in der Kornea von Ratten gezeigt werden (Seo et al., 2001; Lazarovici et al., 2006). Dabei kann NGF direkt wirken oder die Expression anderer pro-angiogener Faktoren, wie z. B. VEGF induzieren (Santos et al., 1991; Calza et al., 2001; Julio-Pieper et al., 2006; Hansen-Algenstaedt et al., 2006).

NGF besitzt auch pro-angiogene Eigenschaften während der Tumorprogression. Es konnte z. B. nachgewiesen werden, dass von Mammakarzinomzellen sezerniertes NGF das invasive Wachstum von EC in ein Gel aus EZM-Komponenten fördert. Dabei wurden über die Aktivierung des TrkA-Rezeptors PI3K- und ERK-Signalwege induziert (Romon et al., 2010).

#### **1.4.4 Neurotrophine bei neoplastischen Erkrankungen**

Die Wirkung der NT bei der Metastasierung und der Entwicklung bzw. Progression maligner Erkrankungen wird kontrovers diskutiert. Dabei scheinen v. a. das Expressionsmuster der unterschiedlichen NT-Rezeptortypen (Trk und p75<sup>NTR</sup>) sowie deren Funktionsfähigkeit und der Aktivierungsgrad von entscheidender Bedeutung zu sein.

Da die NT zuerst im ZNS entdeckt und beschrieben wurden, ist auch die Funktion der NT bei Tumoren des ZNS, wie Neuroblastomen und Gliomen, gut erforscht.

Das Neuroblastom ist einer der häufigsten Tumore bei Kindern (Hoehner et al., 1998). NT tragen zur Entstehung und Progression dieser Tumore bei. Studien von Nakagawara und Yamashiro belegen, dass die Expression der NT-Rezeptoren TrkA und TrkC mit einer guten Prognose einhergeht, wohingegen die Expression des TrkB-Rezeptors mit einem schwereren, aggressiveren Krankheitsverlauf assoziiert ist (Nakagawara et al., 1993; Yamashiro et al., 1996). In Neuroblastomen wurden auch neue *Splice*-Varianten des TrkA-Rezeptors identifiziert. Eine Variante des TrkA-Rezeptors, die als TrkAIII-Rezeptor bezeichnet wird, ist durch die Deletion der Exone 6, 7 und 9 charakterisiert. Diese Exone liegen

innerhalb der extrazellulären Sequenz, an die NGF normalerweise bindet. Dennoch handelt es sich bei der TrkAIII-Variante des TrkA-Rezeptors um einen konstitutiv aktiven Rezeptor, über den Liganden-unabhängig Signalkaskaden aktiviert werden (Tacconelli et al., 2004).

Auch bei Gliomen, den häufigsten Tumoren des ZNS im Erwachsenenalter, sind NT während des Krankheitsverlaufs von Bedeutung. So konnten Wang et al. die Expression der Trk-Rezeptoren v. a. bei einer Unterart der Glioblastome, den Astrozytomen nachweisen (Wang et al., 1998). In Glioblastomzellen wurde NGF als Stimulator pro-migratorischer und pro-proliferativer Prozesse identifiziert. Diese Prozesse werden über die direkte Interaktion von NGF mit dem Integrin  $\alpha 9\beta 1$  über die Aktivierung des MAPK/ERK 1/2 Signalwegs vermittelt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl die NGF- als auch die  $\alpha 9\beta 1$ -Expression mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Brown et al., 2008).

Auch außerhalb des ZNS sind NT an der Entstehung und Progression bestimmter Tumore beteiligt. Bei Prostatakarzinomen wurde nachgewiesen, dass maligne epitheliale Karzinomzellen sowohl NGF und BDNF als auch die Trk-Rezeptoren koexprimieren. Somit wird von autokrinen Wirkmechanismen ausgegangen, die die Tumorprogression fördern. Gleichzeitig wurde eine verringerte Expression des  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptors, der in der Regel pro-apoptotische Signale vermittelt, beobachtet (Dalal und Djakiew, 1997; Montano und Djamgoz, 2004).

In Mammakarzinomzellen wurde, im Gegensatz zu differenzierten Zellen der Brustdrüsen, eine hohe NGF-Expression nachgewiesen (Dollé et al., 2004). Überraschenderweise korrelierte die Expression des TrkA-Rezeptors jedoch mit einer besseren Prognose. Es wird vermutet, dass in diesem Fall Signalwege aktiviert werden, bei denen nicht die Proliferation, sondern die Differenzierung der Zellen gefördert wird. Des Weiteren könnten alternative Varianten des TrkA-Rezeptors exprimiert werden, die in die Aktivierung alternativer Signalwege münden. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen stehen jedoch *in vitro* Experimente mit NGF-stimulierten Mammakarzinomzellen. Diese Zellen zeigten eine erhöhte Proliferation nach NGF-Stimulation, die durch Zugabe neutralisierender Anti-NGF-Antikörper gehemmt werden konnte (Dollé et al., 2003).

In Melanomen, die zu den aggressivsten Tumoren beim Menschen zählen, konnte in den meisten Fällen zunächst die Expression des  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptors nachgewiesen werden (Iwamoto et al., 2001). Marchetti et al. zeigten, dass die NGF-vermittelte Aktivierung des  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptors meist zur Übertragung von Signalen führt, die das Überleben der

Melanomzellen fördern (Marchetti et al., 2003). Einige Jahre später wurde die Expression aller NT und der Trk-Rezeptoren durch Melanomzellen nachgewiesen. Die Signaltransduktion über Trk-Rezeptoren trug hier zur gesteigerten Migration der Melanomzellen *in vitro* bei (Truzzi et al., 2008).

NT und ihre Rezeptoren werden auch von Lungentumoren produziert bzw. sezerniert (Ricci et al., 2001; Ricci et al., 2005; Perez-Pinera et al., 2007; García-Suárez et al., 2009). So wird NGF v. a. von Bronchialkarzinomzellen exprimiert, wohingegen BDNF hauptsächlich bei kleinzelligen Lungenkarzinomen (*small cell lung cancer, SCLC*) nachgewiesen werden konnte. Häufig werden bei Lungenkrebskrankungen sowohl der Ligand als auch der Rezeptor gleichzeitig exprimiert, was darauf schließen lässt, dass NT über parakrine und autokrine Mechanismen den Krankheitsverlauf beeinflussen. So wird die gleichzeitige Expression von TrkB und BDNF bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (*non small cell lung cancer, NSCLC*) mit einem schweren Krankheitsverlauf und einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert (Okamura et al., 2012)

Über die genaue Funktion der NT während der Entstehung und der Progression von Lungentumoren ist jedoch noch wenig bekannt. Daten von Missale et al. belegen die inhibierende Funktion von NGF auf isolierte Lungenkarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* (Missale et al., 1998). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Simulation humaner Lungenkarzinomzellen mit NGF und BDNF deren Überleben fördert und die Inhibition des Trk-Signalweges die Apoptose dieser Zellen induziert (Perez-Pinera et al., 2007).

Diese Daten belegen, dass viele Tumore bzw. Tumorzellen selbst NT produzieren. Da außerdem die Expression der NT-Rezeptoren nachgewiesen wurde, können Tumorzellen auch auf NT reagieren, die z. B. von umliegenden Stromazellen gebildet werden. Die genaue Funktion der NT scheint dabei von der Lokalisation des Tumors sowie des Expressionsmusters der NT-Rezeptoren und deren Funktionalität abzuhängen.



## 1.5 Hypothese und Zielsetzung

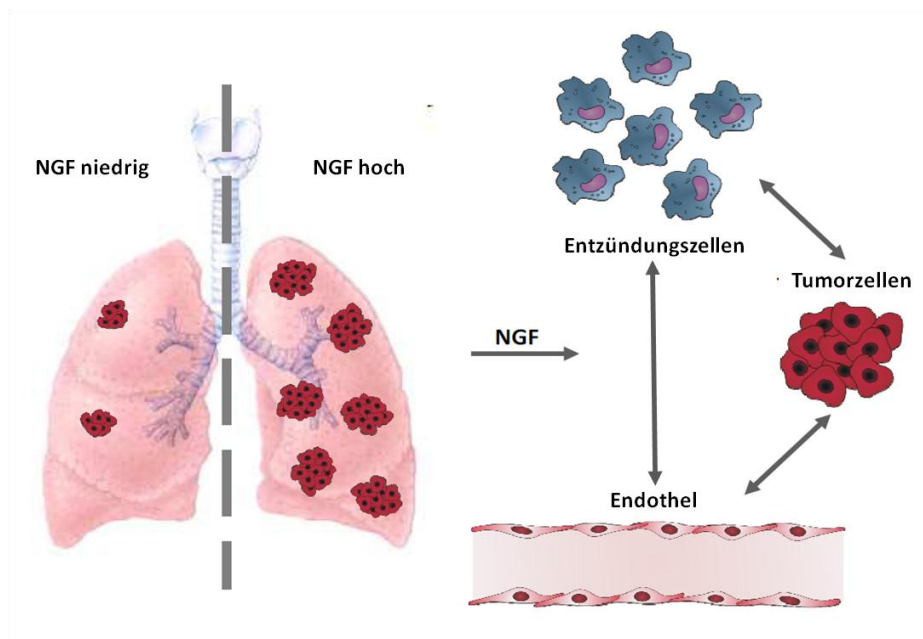
Laut WHO (*World Health Organisation*) steigt die Zahl der durch Krebserkrankungen verursachten Todesfälle kontinuierlich an. Es wird vermutet, dass bis zu 90 % dieser Todesfälle auf die Metastasierung sekundärer Organe zurückzuführen sind. Da die Lunge eines der dichtesten Kapillarsysteme des Körpers aufweist und bei der systemischen venösen Drainage als eines der ersten Organe durchlaufen wird, bilden sich dort häufig Metastasen aus.

Der Erfolg der Metastasierung und des Tumorwachstums ist zum einen abhängig vom Überleben und der Proliferation der Tumorzellen. Aber auch die Interaktionen der Tumorzellen mit dem umgebenden Stroma geraten immer mehr in den Fokus der derzeitigen Forschung. Dies sind v. a. Tumor-assoziierte Entzündungsreaktionen, die das Fortschreiten der Erkrankung vorantreiben, sowie die Eigenschaften der Blutgefäße, die sich im Verlauf der Tumorerkrankung verändern. So wird während der Metastasierung häufig die Hyperpermeabilität der Blutgefäße induziert, wohingegen beim fortschreitenden Tumorwachstum die Angiogenese für die Versorgung des Tumors essentiell ist.

Die meisten bislang verfügbaren Krebstherapien greifen erst in die Progression bereits etablierter Tumore ein und besitzen somit nur eine begrenzte Wirksamkeit. Für die Entwicklung neuer und v. a. wirksamer Therapieansätze, die auf die frühen Prozesse der Metastasierung abzielen, ist es deshalb entscheidend, die der Metastasierung zu Grunde liegenden Mechanismen zu entschlüsseln und neue Faktoren zu identifizieren, die am Prozess der Metastasierung beteiligt sind.

Einer dieser Faktoren ist der zur Familie der Neurotrophine gehörende *nerve growth factor* (NGF). Die Expression von NGF sowie der NGF-Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup> wurde bereits bei verschiedenen neoplastischen Erkrankungen, wie u. a. Neuroblastomen, Melanomen und Lungenkarzinomen nachgewiesen. Die Funktion von NGF bei diesen Erkrankungen wird jedoch kontrovers diskutiert. So kann die Expression von NGF und/oder den NGF-Rezeptoren die Tumorprogression sowohl fördern als auch hemmen. Da NGF auch pro-angiogene sowie immun-modulierende Eigenschaften besitzt, wird folgende Hypothese aufgestellt (Abb. 3):

NGF begünstigt die pulmonale Metastasierung und das anschließende Tumorwachstum in der Lunge, indem es die Proliferation der Tumorzellen, die Angiogenese neuer Tumorgefäße und eine pro-tumorogene Entzündungsreaktion fördert.



**Abb. 3. Hypothese zur NGF-Wirkung bei der pulmonalen Metastasierung**

Eine hohe NGF-Konzentration begünstigt die pulmonale Metastasierung, indem sie die Proliferation der Tumorzellen, die Angiogenese der Tumorgefäße und eine pro-tumorigene Entzündungsreaktion fördert.

Um die Hypothese zu bestätigen, sollen im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Mausmodells der pulmonalen Metastasierung sowie in zell- und molekularbiologischen Experimenten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- (1) Führt NGF zu einer gesteigerten pulmonalen Metastasierung im Mausmodell?
- (2) Fördert NGF lokale Entzündungsprozesse während der pulmonalen Metastasierung?
- (3) Beeinflusst NGF direkt die Funktion muriner Lungenkarzinomzellen?
- (4) Trägt NGF zu funktionellen oder strukturellen Veränderungen der pulmonalen Blutgefäße bei?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Versuchstiere

C57BL/6	Charles River
CCSP-NGF-TG	Hauseigene Zucht

### 2.2 Zelllinien

C166	ATCC
LLC	ATCC
B16 F10	ATCC

### 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Acros Organics
Acrylamid	Sigma-Aldrich
Agarose	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Atipamezol	Hausapotheke
BM Blue POD Substrate	Roche
Borsäure	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA Albumin V Fraction	Serva
CASY <sup>®</sup> Ton	Schärfe Systems
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen
Complete Protease Inhibitor	Roche
Diaminophenylindol (DAPI)	Invitrogen
Diff Quik <sup>®</sup> Färbe-Lösungen	Medion Diagnostics
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dulbecco's Modified essential Medium (4,5 g/l Glukose)	PAA Laboratories
Eosin G	Merck
Ethanol p.a.	Sigma-Aldrich
Ethidumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS Gold)	PAA Laboratories
Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran)	Sigma-Aldrich
Glycerin	Roth

---

Glycerol	Sigma-Aldrich
Hämatoxin II nach Gill	Merck
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Ketamin	Hausapotheke
L-Glutamin	PAA-Laboratories
Lipopolysaccharid (LPS)	Invitrogen
Luminol	Santa Cruz
Metedomidin	Hausapotheke
Methanol	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Roth
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Natrium-Chlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumzitat	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
Percoll	Sigma-Aldrich
Phospho-Stop® Tablette	Roche
Polyhydroxyethylmethacrylat (polyHEMA)	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor Tablette	Roche
Qtracker® 585	Invitrogen
R.T.U. Horseradish Peroxidase Streptavidin	Vector Laboratories
RotiAgarose	Roth
Roticlear®	Roth
RotiMount	Roth
Salzsäure (HCL)	Merck
Schwefelsäure (2 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich
TissueTek® O.C.T.™ Compound	Sakura
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCL	Roth
TritonX-100	Roth
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories
Tween®20	Roth
Vecta Mount	Vector Laboratories
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

## 2.4 Kits

BCA (Bichinonic-Assay)	Pierce/ThermoScientific
CBA Flex Kits	BD Biosciences
Cell Proliferation ELISA, BrdU chemiluminescent	Roche
CellTiter 96 <sup>®</sup> A <sub>queous</sub> One Cell Solution	Promega
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen
DAB Peroxidase Substrate Kit,	Vector Laboratories
NGF E <sub>max</sub> <sup>™</sup> ImmunoAssay System	Promega
Omniscript	Qiagen
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit	Peqlab
RedTaq Ready-Mix Kit	Qiagen
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen

## 2.5 Proteine

### Rekombinante Proteine

rekombinantes humanes NGF	PeproTech
rekombinantes murines VEGF	PeproTech

### Primäre Antikörper

Antikörper (Spezies)	Klon	Verdünnung/ Konzentration	Firma
Anti-β-Aktin (Maus, monoklonal IgG1)	AC-15	1:40000	Sigma-Aldrich
Anti-TrkA (Kaninchen, polyklonal IgG)	763	1:1000	Santa Cruz
Anti-CD45 (Rat, monoklonal IgG2b)	30-F11	1:100	Santa Cruz
Anti-VCAM (Ziege, polyklonal IgG)	C-19	5 µg/ml	Santa Cruz
Anti-NGF (Maus, monoklonal IgG2b)	-	1 µg/ml	PeproTech

### Sekundäre Antikörper

Anti-Maus IgG (Peroxidase-gekoppelt)	Sigma-Aldrich
Anti-Kaninchen IgG (Peroxidase-gekoppelt)	Sigma-Aldrich
Anti-Ratte (biotinyliert)	Vector Laboratories

### Enzyme

Dispase	BD Biosciences
DNaseI (Gewebeverdau)	Serva
DNaseI (DNA-Verdau)	life technologies
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories

### 2.5.1 Proteinstandards

Magic Mark XP

Invitrogen

## 2.6 Nukleinsäuren

Oligonukleotid-Primer für den Einsatz in der PCR wurden von der Firma Metabion bezogen.

### 2.6.1 Primer zur Genotypisierung der Versuchstiere

Gen	Primersequenz	T <sub>m</sub>	Produkt
NGF-Tg	for: 5'-CATACCCACACATACCCACA-3'	54°C	WT: -
	rev: 5'-ACATTACGCTATGCACCTGG-3'		NGF-Tg: 311 bp

### 2.6.2 Primer für mRNA-Expressionsanalysen

Gen	Primersequenz	T <sub>m</sub>	Produkt
NGF	for: 5'-CCAAGCTCACCTCAGTGTC-3'	58°C	150-200 bp
	rev: 5'-TACGGTTCTGCCTGTACG-3'		
TrkA	for: 5'-TTGGCATGAGCAGAGACATC-3'	60°C	100-150 bp
	rev: 5'-AAAGCTCCACACATCGCTCT-3'		
p75 <sup>NTR</sup>	for: 5'-TTCTAGGGGTGCCTTTGGA-3'	58°C	174 bp
	rev: 5'-TCACCACGTCAGAGAACGTA-3'		

### 2.6.3 Nukleinsäurestandards

PeqGOLD DNA-Sizer XII (50-1000 bp)

Peqlab

GeneRuler (200-10000 bp)

Fermentas

## 2.7 Puffer und Lösungen

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)

PAA Laboratories

Natriumcitrat

Sigma-Aldrich

PBS Pulver

Roth

### Probenpuffer für BAL

BAL-Probenpuffer

1 Tablette Complete® Protease Inhibitor in 50 ml PBS

**Puffer für ELISA**

Natriumkarbonat-Puffer	0,05 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,7
TBST-Waschpuffer (1x)	20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween® 20

**Puffer für FACS-Analysen**

FACS-Puffer	PBS, 1 % FCS
-------------	--------------

**Puffer für Protein-Isolation und Western Blot**

Lyse-Puffer	50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % Nonidet 40, Protease-Inhibitor, Phosphatase-Inhibitor
Lämmli-Puffer (10x)	100 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 % SDS/ 1 % Saccharose, 1 %
Probenpuffer (2x)	150 mM Tris (pH 6,8), 1,2 % SDS, 3,3 % Glycerin, 1,8 % Bromphenolblau
Sammelgel-Puffer	1 M TrisHCl (pH 6,8), 0,4 % SDS
Trenngel-Puffer	1,5 M TrisHCl (pH 8,8), 0,4 % SDS
Laufpuffer für Proteingel	30 g Tris-Base, 10 g SDS, 250 g Glycin ad 1 l dH <sub>2</sub> O
Transfer-Puffer	300 mg Tris, 144 mg Glycin, 100 ml Ethanol ad 1 l dH <sub>2</sub> O

**Puffer für DNA-Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Probenpuffer (6x)	10 % Glycerol, 40 % Saccharose, 0,25 % Bromphenolblau
TBE-Puffer (10x)	108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l dH <sub>2</sub> O

**2.8 Zellkulturmedien**

DMEM	500 ml DMEM (4,5 g/l Glukose), 50 ml FCS (hitzeinaktiviert), 5 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml Penicillin (10000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml)
------	--

**2.9 Verbrauchsmaterial**

Braunüle (20 G)	BD Biosciences
Deckgläser	Menzel
Insulinspritze (1 ml)	Braun
Kanüle (27G)	BD Microlance
Kryo-Röhrchen (1,7 ml)	Nunc
MaxiSorp™ Surface, 96 well Platten (ELISA)	Nunc
Mikrotiterplatte (schwarz, 96-well)	Corning Incorporated
Objektträger	Menzel

Probenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarsted
PVDF- Membran	Millipore
Quarzküvette	Hellma
Reaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL)	GE Healthcare
Skalpell	Feather
Stabpipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Sarstedt
Super-Frost Objektträger	Menzel
<i>Transwell</i> -Filter (0,4 µm und 8 µm Porengröße)	BD Falcon
Zellkulturflaschen T25 und T75	Sarstedt
Zellkulturplatten (6-, 12- und 96-well)	Nunc
Zellschaber	Sarstedt
Zellsieb (70 µm)	BD Falcon

## 2.10 Geräte

BD FACSAArray bioanalyzer	BD Biosciences
Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra
CASY <sup>®</sup> Modell TT (Cell-Counter, Analyser System)	Roche
FACS Canto II	BD
Geldokumentationsstation (Fusion FX7)	peqlab
Gelkammer Omni Page mini	Cleaver Scientific
Gelkammer Perdect Blue Gelsystem	peqlab
Infinite F200PRO	Tecan
Inkubator	Thermo Scientific
Kryotom Leica CM1850	Leica
Megafuge 1.0R	Heraeus
Mikroskop BX51	Olympus
Mikrotiterplattenreader Genion	Tecan Sunrise
MJ Mini Thermocycler	Biorad
Rotationsmikrotom Microm 355S	Microm
Semi-Dry Elektrobplotter	peqlab
Thermocell Cooling & Heating Block	Bioer
Ultraspec 3100pro UV/Visibel Spectrophotometer	Biochrom
Zentrifuge BIOFUGE fresco	Heraeus
Zentrifuge BIOFUGE pico	Heraeus
Zytozentrifuge Cytospin III	Shandon/Thermo Scientific



## 2.11 Software

Cell<sup>^</sup>F imaging software

Geldokumentations-Software Fusion 1

*newCAST*<sup>™</sup>-Software

GraphPad Prism 4

Photometersoftware Magellan 2

FACS

FACS Array

Soft Imaging System

peqlab

Visiopharm

GraphPad Software

Tecan Sunrise

BD Biosciences

BD Biosciences

## 2.12 Versuchstiere und Behandlungsprotokolle

Für die Tierexperimente wurden weibliche Mäuse im Alter von 10-12 Wochen eingesetzt, die unter Standardbedingungen in einem belüfteten Käfigsystem gehalten wurden. In den Räumen der Versuchstierhaltung herrschte ein künstlich erzeugter 12 h-hell-dunkel-Zyklus und die Raumtemperatur (RT) lag konstant bei 20°C. Wasser und Nahrung (in Form von Pellets) standen *ad libitum* zur Verfügung. Die beschriebenen *in vivo* Versuche wurden mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen unter der Tierversuchsnummer V 54-19c 20-15 MR 88-2011 »Einfluss des *Nerve Growth Factor* (NGF) auf Metastasierung und Tumorwachstum in der Lunge« durchgeführt.

### 2.12.1 Mausstämme

Für die Tierversuche wurden Mäuse eingesetzt, die unter der Kontrolle des spezifischen Promotors des *Clara cell secretory protein* (CCSP-NGF-Tg) konstitutiv humanes NGF in Atemwegsepithelzellen überexprimieren (Hoyle et al., 1998). Diese wurden auf den C57BL/6-Hintergrund gekreuzt und werden im Folgenden als NGF-transgene Tiere (NGF-Tg) bezeichnet. Als Referenztiere bzw. Wildtypiere (WT) dienten Mäuse des C57BL/6-Stamms aus der hauseigenen Zucht.

### 2.12.2 Mausmodell zur Ausbildung pulmonaler Metastasen

Um den Einfluss von NGF auf die pulmonale Metastasierung zu untersuchen, wurden in diesem Versuchsteil WT und NGF-Tg Mäuse eingesetzt. Den 10-12 Wochen alten Tieren wurden  $1 \times 10^6$  in Zellkultur kultivierte subkonfluente Tumorzellen (*Lewis Lung Carcinoma*, (LLC) bzw. eine Melanomzelllinie (B16/F10)(2.15.1) intravenös (i. v.) injiziert. Dazu wurden die Schwänze der Mäuse zunächst kurz mit einer Rotlichtlampe erwärmt, um eine bessere Durchblutung der Schwanzvenen zu erzielen. Anschließend erfolgte die Injektion von 200  $\mu$ l der Zellsuspension mit einer 27 Gauge (G) Kanüle in die laterale Schwanzvene. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Tiere bezüglich offensichtlicher Leiden wie Veränderungen des Aussehens, des Fressverhaltens, der Mobilität sowie Atemnot und anderer funktioneller Störungen beobachtet. Des Weiteren wurden die Mäuse zweimal pro Woche gewogen, um eine mögliche Gewichtsabnahme feststellen zu können, die häufig mit Tumorerkrankungen einher geht (Tumorkachexie). Im Modell der pulmonalen Metastasierung konnte der Gewichtsverlust als Parameter für den Gesundheitszustand der

Tiere genutzt werden, da hier keine großen, soliden Tumore ausgebildet werden, die eine Gewichtsabnahme überdecken würde. Nach 14 Tagen wurde der Versuch beendet und die Metastasierung der Lunge zwischen WT- und NGF-Tg Mäusen makroskopisch sowie histologisch verglichen.

### **2.12.3 Mausmodell zur Charakterisierung der pulmonalen Extravasation von Tumorzellen**

Einer der ersten Schritte im Verlauf der Tumormetastasierung ist die Extravasation der Tumorzellen in das umliegende Gewebe. In diesem Versuch sollte die Extravasation von Fluoreszenz-markierten und anschließend in die Schwanzvene injizierten LLC-Zellen in die Lunge untersucht werden. Die Analyse der in die Lunge ausgewanderten Tumorzellen erfolgte bei WT- bzw. NGF-Tg Mäusen 8 h und 24 h nach der Injektion.

Um die Tumorzellen im Lungengewebe und im peripheren Blut detektieren zu können, wurden LLC-Zellen mit fluoreszierenden Nanopartikeln (Qtracker® 585, Invitrogen) nach Herstellerangaben für 1 h bei 37°C markiert. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 200 µl DMEM-Medium ohne Zusätze i. v. in die Schwanzvene von WT- bzw. NGF-Tg Mäusen injiziert. Die Präparation der Versuchstiere erfolgte 8 h und 24 h nach Injektion der Tumorzellen. Die nachfolgenden Analysen beinhalteten die Quantifizierung Fluoreszenz-markierter Tumorzellen in der Lunge sowie im peripheren Blut mittels *fluorescence-activated cell sort sorting* (FACS) Analyse (2.16.6) und den histologischen Nachweis der in die Lunge ausgewanderten Tumorzellen (2.13.4.4).

In diesem Versuch mitgeführte WT- und NGF-Tg Tiere, denen keine Tumorzellen injiziert wurden, dienten als Negativkontrollen für die folgenden Analysen.

### **2.12.4 Applikation von NGF im Mausmodell der Lungenmetastasierung**

Um die direkte und lokale Wirkung von NGF auf die experimentelle pulmonale Metastasierung zu bestätigen, wurde WT-Tieren rekombinantes humanes NGF (rhNGF) intratracheal (i. t.) verabreicht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze gewählt.

In Versuchsteil (a) wurden den Mäusen zunächst  $1 \times 10^6$  LLC-Zellen in einem Volumen von 200 µl DMEM-Medium i. v. injiziert. Die i. t. Behandlung der Tiere mit rhNGF erfolgte an den

Tagen 0, 3, 7 und 10 nach Tumorzellinjektion. Die Versuchstiere wurden an Tag 14 nach Injektion der Tumorzellen präpariert. Dabei wurden die Lungen entnommen und anschließend die Metastasen an der Lungenoberfläche makroskopisch sowie das Metastasenvolumen in der Lunge mikroskopisch (2.14.3) analysiert.

In Versuchsteil (b) erfolgte die rhNGF-Applikation vor Injektion der Tumorzellen, um den direkten und lokalen Effekt von NGF auf die Extravasation der Zellen in die Lunge nachzuweisen. Den Versuchstieren wurden dazu an den Tagen -11, -8, -4 und -1, vor i. v. Injektion von  $1 \times 10^6$  Fluoreszenz-markierten LLC-Zellen rhNGF i. t. appliziert. Der Nachweis fluoreszierender Tumorzellen mittels FACS (2.16.6) erfolgte 8 h nach Injektion der Tumorzellen.

Als Kontrollgruppen wurden in beiden Versuchsteilen WT-Tiere und NGF-Tg Tiere mitgeführt, denen i. t. physiologischer Salzlösung (PBS) Stelle von rhNGF verabreicht wurde.

Für die i. t. Behandlung wurden die Mäuse narkotisiert, da sie die NGF-Lösung ohne sonst wieder aushusten würden. Als Narkose wurden Domitor (Medetomidin; 0,5 mg/kg) und Ketamin (100 mg/kg) intraperitoneal (i. p.) verabreicht. Als Antagonist diente Atipamezol (1 mg/kg). Pro i. t. Behandlung wurden den Versuchstieren je 10 µg rhNGF in 50 µl PBS verabreicht (Quarcoo et al., 2004). Damit sollte eine ausreichend hohe NGF-Konzentration in der Lunge erreicht werden, um den NGF-Effekt in der NGF-Tg Maus widerspiegeln zu können. Da es sich bei NGF um ein kleines Protein (ca. 27 kDa als Homodimer) handelt, das innerhalb weniger Tage abgebaut wird, erfolgte die Applikation 2x wöchentlich, um eine relativ konstante Bioverfügbarkeit zu gewährleisten.

### **2.12.5 Modell zur Charakterisierung der pulmonalen Extravasation von Immunzellen**

Die Extravasation von Immunzellen in die Lunge wurde im Modell einer akuten lokalen Entzündung untersucht. Zur Induktion der akuten Atemwegsentzündung wurde Lipopolysaccharid (LPS), der Hauptbestandteil der Membran gramnegativer Bakterien, verwendet. Als Versuchsgruppen dienten WT- und NGF-Tg Mäuse, denen eine LPS-Lösung intranasal (i. n.) appliziert wurde. Als Negativkontrolle wurden Mäuse mitgeführt, denen i. n. PBS verabreicht wurde. Die Versuchstiere wurden zunächst i. p. narkotisiert (2.12.4). Anschließend erfolgte die i. n. Applikation von 50 µg LPS in 50 µl PBS (Konzentration: 1 mg/ml) bzw. PBS i. n., jeweils in WT- und NGF-Tg Tiere. Nach 8 h bzw. 24 h wurden die

Mäuse präpariert, eine BAL (2.13.3) zur Differenzierung der inflammatorischen Zellen in den Atemwegen (2.13.3.3) durchgeführt und die Lungen für die histologische Analyse des entzündlichen Infiltrats im Lungengewebe aufgearbeitet (2.13.4.1, 2.13.4.3 und 2.14.1).

### **2.12.6 Ex vivo Modell zur Untersuchung der Permeabilität pulmonaler Blutgefäße**

Die Versuche an isolierten, perfundierten und ventilerten Lungen wurden von der AG Weißmann in Gießen durchgeführt. Für die Experimente wurden WT- und NGF-Tg Mäuse mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Zur Gerinnungshemmung wurde Heparin (500 IU/kg Körpergewicht) injiziert. Die Tiere wurden intubiert und mit Raumluft mit einem Atemzugvolumen von 300  $\mu$ l, 90 Atemzügen/min und einem positiven Endexpiratorischem Druck (*positive end-expiratory pressure*, PEEP) von 3 cmH<sub>2</sub>O beatmet. Während die Lungen über Kanülen in der Pulmonalarterie und dem linken Atrium mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert wurden, erfolgte die Präparation der Lungen aus dem Thorax. Anschließend wurde der Perfusionskreislauf geschlossen und der linksarterielle Druck auf 2 mmHg eingestellt, was dem physiologischen Druck im Hilum entspricht. Gleichzeitig wurde die Ventilation von Raumluft gegen eine Beatmung mit einem Gasgemisch bestehend aus 5,3 % Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>), 21 % Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und 73,7 % Stickstoff (N<sub>2</sub>) umgestellt.

Die Messungen wurden in einer geschlossenen Anordnung durchgeführt, die auf ca. 38 C aufgeheizt wurde. Die Druckmessung erfolgte über Druckfühler in der Pulmonalarterie und dem linken Atrium. Zur Analyse der Permeabilität der Lungengefäße wurden der kapilläre Filtrationskoeffizient ( $K_{fc}$ ) und das Lungengewicht gemessen. Die Bestimmung des  $K_{fc}$  erfolgte gravimetrisch, über die Veränderung des Lungengewichts, welche durch hydrostatische Provokationen induziert wurde. Dazu wurde der venöse Druck für 8 min auf 7,5 mmHg erhöht und das Lungengewicht jeweils direkt vor und 5 min nach der hydrostatischen Provokation gemessen und als Differenz (Gewicht vor der Messung *minus* Gewicht nach der Messung) berechnet.

Es wurden nur Lungen ausgewertet, die homogen weiß erschienen und keine Anzeichen von Homöostase, Ödembildung oder kollabierten Lungenabschnitten (Atelektase) aufwiesen. Des Weiteren mussten der mittlere pulmonalarterielle Druck und der Ventilationsdruck im definierten Normbereich liegen und die Lungen während der initialen *steady state* Phase stabil bleiben.

## 2.13 Probengewinnung aus Versuchstieren

### 2.13.1 Blut- und Serumgewinnung

Zum systemischen Nachweis Fluoreszenz-markierter Tumorzellen wurde den Versuchstieren am Analysetag Vollblut über die Schwanzvene entnommen.

Zur Gerinnungshemmung wurden 1,6 mg/ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in die Entnahmeröhrchen vorgelegt. Anschließend wurde eine Dichtegradientenzentrifugation zur Aufreinigung mononukleärer Zellen durchgeführt (2.13.2).

In Serumproben sollten Zytokine und Chemokine nachgewiesen werden. Nach Gerinnung des Blutes für 1 h bei RT wurde das Serum über einen Zentrifugationsschritt von 20 min bei 4000 Umdrehungen (*rounds per minute*, rpm) vom Koagulat getrennt. Das Serum wurde in ein neues 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.13.2 Aufreinigung Fluoreszenz-markierter Tumorzellen aus Blut

Um Fluoreszenz-markierte Tumorzellen aus Versuchsteil 2.12.3 aus Vollblut anzureichern, wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Dazu wurden die Blutproben auf ein Volumen von 5 ml mit PBS aufgefüllt. Ein Kieselgel-Gradient (Percoll, 5 ml) wurde vorsichtig mit dem verdünnten Vollblut überschichtet und anschließend bei 1200 g bei RT für 20 min zentrifugiert. Die Interphase, in der sich sowohl Immunzellen als auch die markierten Tumorzellen angereichert haben, wurde vorsichtig abgenommen. Zellen mit einer höheren Dichte als das Separationsmedium, wie z.B. Erythrozyten und Granulozyten wurden durch das Medium hindurch zentrifugiert und bildeten ein Pellet. Die Zellen der Interphase wurden 2-mal mit FACS-Puffer gewaschen und danach für die FACS-Analyse der fluoreszierenden Tumorzellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und auf Eis gelagert.

### 2.13.3 Bronchoalveoläre Lavage

Mit Hilfe der Bronchoalveolären Lavage (BAL) wurde Probenmaterial aus den proximalen und distalen Atemwegen gewonnen. Nach der Öffnung des Thorax und Freipräparieren der oberen Atemwege wurde eine Braunüle (20G) in die Trachea eingeführt. Eine mit 1 ml PBS/Complete® Protease Inhibitor gefüllte Spritze wurde auf die Braunüle gesteckt und die Lunge vorsichtig gespült. Die gewonnene Probe wurde auf Eis gelagert.

### **2.13.3.1 BAL-Flüssigkeit**

Die BAL wurde 10 min bei 1300 rpm zentrifugiert, der zellfreie Überstand abgenommen, aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

### **2.13.3.2 Bestimmung der Zellzahl in der BAL**

Das nach Abnahme des Überstands verbleibende Zellpellet wurde in 1 ml PBS mit Zusatz von 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) resuspendiert und die Zellzahl mit einem *Casy*<sup>®</sup>-*Cell-Counter* in einer Verdünnung von 1:200 bestimmt.

### **2.13.3.3 Herstellung und Färbung von Zytospins**

Die Zytospins wurden mit Hilfe einer Zytozentrifuge hergestellt. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension aus 2.13.3.2 mit 150 µl PBS/1 % BSA verdünnt und anschließend bei 700 rpm für 5 min auf Objektträger zentrifugiert. Nach einer 30 minütigen Lufttrocknung erfolgte die Differenzialfärbung zur Bestimmung der Zelltypen mit Hilfe der DiffQuick<sup>®</sup> Färbemethode. Die Objektträger wurden zunächst 1 min in eine Fixierlösung getaucht, danach 1 min mit Eosin-Lösung gefärbt und abschließend 30 Sekunden zur Kernfärbung in Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Nach einem Waschschriff in Leitungswasser wurden die Objektträger erneut luftgetrocknet und die Zellen lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung analysiert. Die Differenzierung der verschiedenen Zelltypen erfolgte auf Grund ihrer Färbung und Morphologie.

## **2.13.4 Organpräparation, Einbettung, Schnitte**

### **2.13.4.1 Präparation der Lunge und weiterer Organe**

Für die histologischen Analysen der pulmonalen Metastasierung (Versuchsteile 2.12.2, 2.12.4 und 2.12.5) wurden die kompletten Lungen verwendet. Über eine in die Trachea eingeführte Braunüle wurde eine 6%ige Paraformaldehyd-Lösung (PFA) in die Lunge appliziert, bis sich diese vollständig entfaltet hatte. Nach der 24-stündigen Fixierung in PFA-Lösung wurden die Trachea und das Herz entfernt und makroskopisch die Anzahl der Oberflächenmetastasen bestimmt. Anschließend wurden die Lungen bis zur Einbettung in Agarose (2.13.4.3) erneut in PFA gelagert.

Neben der Lunge wurden auch die Nieren, die Leber und das Gehirn entnommen. Diese Organe wurden ebenfalls in 6%iger PFA-Lösung fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend histologisch auf Metastasen untersucht.

Für die Versuchsteile 2.12.3 und 2.12.5 wurde nach der Lavage der Atemwege die *Aorta descendens* durchtrennt und die Lunge zunächst über den rechten Ventrikel mit ca. 10 ml PBS mit einem Druck von 30 cm H<sub>2</sub>O (Zentimeter Wassersäule) perfundiert, um das in den pulmonalen Blutgefäßen vorhandene Blut zu entfernen. Da in diesen Experimenten die Extravasation der Tumorzellen bzw. Immunzellen in die Lunge analysiert wurde, käme es durch die Detektion nicht extravasierter Zellen in den Blutgefäßen zu falsch positiven Ergebnissen. Nach der Perfusion wurde der rechte Teil der Lunge an der Bifurkation der Trachea abgebunden.

Im Versuchsteile 2.12.3 wurde die linke Lungenhälfte zur Herstellung von Gefrierschnitten zum histologischen Nachweis fluoreszierender Tumorzellen im Lungengewebe verwendet (2.13.4.4). Die rechte Lungenhälfte, in der die extravasierten Fluoreszenz-markierten LLC-Zellen mittels FACS-Analyse quantifiziert werden sollten, wurde bis zur weiteren Verwendung in PBS auf Eis gelagert.

#### **2.13.4.2 Verdau der Lungen für die FACS-Analyse**

Die rechten Lungenhälften aus dem Versuchsteil 2.12.3 wurden zunächst mit zwei Skalpellens in ca. 1-2 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten. Diese wurden dann in ein 15 ml Probengefäß mit einer Enzymlösung, bestehend aus 5 ml HBSS-Puffer, 500 µl Dispase (5000 U/100 ml) und 125 µl DNaseI (Endkonzentration: 250 µg/ml), überführt. Der Verdau des Lungengewebes erfolgte für 1 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator. Um letzte größere Gewebestücke zu zerkleinern, wurde die Suspension nach der Inkubation mit einer 10 ml Stabpipette mehrfach auf- und abpipettiert. Die Zugabe von 5 ml HBSS-Puffer mit Zusatz von 20 % FCS stoppte die Enzymaktivität ab. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm gefiltert, um unverdaute Gewebereste zu entfernen. Danach wurden die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen, in 5 ml FACS-Puffer resuspendiert und bis zur FACS-Analyse der Fluoreszenz-markieren LLC-Zellen auf Eis gelagert.

#### **2.13.4.3 Einbettung der Lungen in Agarose und Paraffin**

Die Lungen wurden nach dem Prinzip des *systematic uniform randomized sampling* (SURS) (2.14.3) weiterverarbeitet, um die Voraussetzungen für quantitative Auswertung z. B. des Tumorumfangs zu schaffen. Dazu wurden die Lungen in eine 2%ige Agarose-Lösung eingebettet und nach dem Erkalten in 3 mm starke Blöcke in der Transversalebene geschnitten. Anschließend wurden die einzelnen Gewebestücke in gleicher Orientierung in eine Einbettform gelegt und erneut in Agarose gegossen. Nach erneutem Erkalten der



Agarose wurden die Blöcke in Einbettkassetten überführt und in 6%iger PFA-Lösung bis zur Paraffineinbettung gelagert.

Die Einbettung des Gewebes in Paraffin erfolgte in der Pathologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg.

Aus den in Paraffin eingebetteten Organen wurden an einem Mikrotom 3 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Superfrost-Objektträger aufgezogen wurden. Zur histologischen Analyse des Gewebes wurden Färbungen mit Hämatoxylin/Eosin (2.14.1) oder spezielle immunhistochemische Färbungen durchgeführt (2.14.2).

#### **2.13.4.4 Einbettung der Lungen zur Herstellung von Gefrierschnitten**

Für die Analyse der Extravasation Fluoreszenz-markierter Tumorzellen in die Lunge wurden von der linken Lungenhälfte Gefrierschnitte angefertigt. Als Einbettmedium diente eine TissueTek® O.C.T.<sup>TM</sup> Compound-Lösung, die aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen besteht. Die Lungenhälften aus Versuchsteil 2.12.3 wurden zunächst mit einer 10%igen TissueTek®-Lösung über die Trachea gefüllt, anschließend in TissueTek® eingebettet, sofort auf Trockeneis gefroren und bis zur Herstellung der Gefrierschnitte bei -80°C gelagert. Die Gefrierschnitte wurden mit einem Kryotom (Fa. Leica) mit einer Schnittdicke von 6 µm hergestellt und bis zur Färbung erneut bei -80°C gelagert.

## **2.14 Histologie und Immunhistochemie**

### **2.14.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) handelt es sich um eine Übersichtsfärbung zur Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen und pathologischer Veränderungen im Gewebe. Die Färbung wurde durchgeführt, um den Grad der pulmonalen Metastasierung und eventuelle Entzündungsprozesse in der Lunge analysieren zu können.

Dazu wurden die Paraffinschnitte zunächst 2x 10 min in einem Xylolersatzmittel (Roticlear®) entparaffiniert und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe (2x 5 min in 100 %, 5 min 96 % und 5 min 70 % Ethanol) rehydriert. Nach dem Abspülen der Schnitte in Wasser, folgte eine 3-minütige Inkubation in Hämatoxylin-Lösung. Danach wurden die Schnitte für 5 min in fließendem Leitungswasser »gebläut« um die charakteristische Blaufärbung der Zellkerne zu erzielen. Dem folgte eine 5-minütige Zytoplasmafärbung in Eosin-Lösung. Die

Dehydrierung der Gewebeschnitte erfolgt in einer aufsteigenden Alkoholreihe (10 Sekunden in 70 %, 1 min in 96 %, 2x 5 min in 100 % Ethanol) mit anschließender Inkubation (2x 10 min) in Xylolersatz. Als Eindeckmedium wurde *Vecta Mount* verwendet.

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mit einem Olympus BX51 Mikroskop und den Softwareprogrammen Cell<sup>^</sup>F sowie newCAST<sup>™</sup> zur stereologischen Auswertung des Tumolvolumens in der Lunge (2.14.3).

### 2.14.2 Immunhistochemische Färbungen

Die in Paraffin eingebetteten Lungenschnitte wurden zunächst in Xylolersatz (Roticlear<sup>®</sup>) 10 min entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 min in 100 %, 90 %, 80 %, 70 % Ethanol) rehydriert und als Nächstes 5 min in PBS inkubiert. Die Schnitte wurden danach mit 10 mM Citratpuffer für 20 min im Wasserbad bei 95°C zur Antigen- (Ag) Demaskierung inkubiert, 30 min bei RT abgekühlt und 5 min in PBS gewaschen. Unspezifische Antikörper- (AK) Bindungsstellen wurden durch die Inkubation mit 1 % Milchpulver in PBS für 1 h bei RT blockiert. Die Inkubation mit dem entsprechenden Primär-AK erfolgte über Nacht (ü. N.) bei 4°C. Um ungebundene AK zu entfernen, erfolgten zunächst drei 5-minütige Waschschritten in PBS. Anschließend wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch eine Inkubation mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 30 min blockiert. Nach erneutem Waschen der Schnitte wurde der biotinylierte Sekundär-AK für 1 h zugegeben. Auf drei weitere Waschschriffe mit PBS folgte die Bindung eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes an den Sekundär-AK für 30 min bei RT. Die Substratreaktion wurde mit Diaminobenzidin (DAB) durchgeführt, das eine spezifische Braunfärbung der Zielstrukturen bewirkte. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in PBS gewaschen, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und für 2x 10 min in Xylolersatz überführt. Als Eindeckmedium diente *VectaMount*.

Die lichtmikroskopischen Analysen und Auswertungen wurden mit einem Olympus BX51 Mikroskop und der Software Cell<sup>^</sup>F durchgeführt.

### 2.14.3 Stereologische Quantifizierung des Tumolvolumens

Neben der quantitativen Bestimmung der Oberflächenmetastasen auf der Lunge sollte auch das Metastasenvolumen bezogen auf das Lungenvolumen bestimmt werden. Dazu wurden stereologische Methoden angewendet, mit deren Hilfe aus zweidimensionalen Gewebeschnitten auf Grund statistischer und mathematischer Prinzipien die Auswertung dreidimensionaler Strukturen möglich ist (Hsia et al., 2010). Um eine statistisch korrekte repräsentative Aussage treffen zu können, ist eine einheitliche, zufällige und systematische Probenaufarbeitung nötig (SURS).

Dazu wurden die fixierten, in Agarose eingebetteten (2.13.4.3) Lungen zunächst in der Transversalebene in parallele Blöcke (Intervalle) mit der Dicke  $t = 3 \text{ mm}$  geschnitten. Diese wurden in gleicher Orientierung erneut in Agarose gegossen und anschließend in Paraffin eingebettet. Am Mikrotom wurden  $3 \mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte für die histologische Auswertung angefertigt. Diese erfolgte an einem BX51 Mikroskop (Olympus) mit Hilfe der *newCAST™* Software (*computer assisted stereological toolbox*, Visopharm). Mittels dieser Software wurde der Faktor aus dem Volumen der metastasierten Areale zum Volumen der gesamten Lunge ins Verhältnis gesetzt. Dadurch konnten eventuelle Unterschiede im Gesamtvolumen der Lunge ausgeglichen werden. Der Metastasierungsfaktor wurde nach folgender Formel berechnet (Nielsen et al., 2001):

$$\frac{VMet}{VLunge} = \frac{t \times (a/p) \times \Sigma P}{t \times (a/p) \times \Sigma P}$$

Wobei  $a/p$  der *area/point* ( $9587,46 \mu\text{m}^2$ ) entspricht. Dies ist die Fläche um einen Punkt eines Messgitters, welches mittels *newCAST™* Software optisch über den Schnitt gelegt wurde. P steht in diesem Fall für einen Punkt des Messgitters, der Tumorgewebe markiert.

## 2.15 Zellbiologische Methoden

### 2.15.1 Murine Zelllinien

#### Lewis Lung Carcinoma Zellen

Bei *Lewis Lung Carcinoma* Zellen (LLC) handelt es sich um eine Zelllinie epithelialen Ursprungs, die 1951 von Margaret R. Lewis von einem spontan aufgetretenen Lungenkarzinom einer C57BL/6-Maus isoliert und etabliert wurde. Die Zelllinie wird häufig in syngenem Tiermodellen zur Charakterisierung der pulmonalen Metastasierung genutzt. LLC-Zellen werden als hochgradig tumorigen aber wenig metastasierend eingestuft.

#### B16/F10 Melanomzellen

B16/F10-Zellen wurden aus spontan aufgetretenen Melanomen in C57BL/6-Mäusen isoliert. Es handelt sich um eine etablierte Melanomzelllinie neuroektodermaler Herkunft, die in Mausmodellen zur Untersuchung des Tumorwachstums und der Metastasierung, auch im Modell der pulmonalen Metastasierung, eingesetzt wird. Im Gegensatz zu LLC-Zellen werden B16/F10-Melanomzellen als hochgradig metastasierend eingestuft.

#### C166-Endothelzellen

Die EC-Zelllinie C166 wurde ursprünglich aus dem murinen Dottersack von zwölf Tage alten Mausembryos gewonnen. Diese Zelllinie stellt eine undifferenzierte EC-Zelllinie dar, die keine organspezifischen EC-Charakteristika aufweist. Sie eignet sich für zellbiologische Experimente zur Charakterisierung des Einflusses bestimmter Faktoren auf die Differenzierung und Funktion der EC.

### 2.15.2 Subkultivierung der Zelllinien

Das Medium einer 75 cm<sup>2</sup> Flasche mit konfluent gewachsenen Zellen (LLC, B16/F10 bzw. C166) wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 3 ml 1x Trypsin/EDTA lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche ab. Die Zellen wurden in 7 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS-Zusatz aufgenommen, für 5 min bei 350 g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die in 10 ml frischem Vollmedium resuspendierten Zellen wurden im Verhältnis 1:10 geteilt, in eine neue Zellkulturflasche überführt und erneut bis zur Konfluenz kultiviert. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 3 bis 10 eingesetzt.

### 2.15.3 Kultivierung der Zellen für proteinbiochemische und molekularbiologische Analysen

Für Protein-Expressionsanalysen wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in die Kavitäten einer 6-well Platte ausgesät. Die Proteinisolation erfolgte nach 24 h wie in 2.16.3 beschrieben.

Für mRNA-Expressionsanalysen wurden die Zellen ebenfalls mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in die Kavitäten einer 6-well Platte ausgesät. Nach 8 h wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert (2.17.1).

### 2.15.4 Bestimmung der Zellvitalität *in vitro*

Die Zellvitalität wurde mittels *CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* der Fa. Promega bestimmt, der sich sowohl für Zytotoxizitätsmessungen als auch für Proliferationsmessungen eignet. Der Test basiert auf der Bildung des Farbstoffs Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen aus einem nicht-farbigem Substrat, 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoliumsalz (MTS). Da nur in lebenden Zellen die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen gegeben ist, ist die Menge des gebildeten löslichen Formazanprodukts direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur.

Für die Bestimmung der Zellvitalität wurden 100  $\mu$ l LLC-Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in die Kavitäten einer 96-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 3 h unter Serum-armen Bedingungen (DMEM-Medium mit 1 % FCS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml rhNGF für 24 h stimuliert. In einem weiteren Ansatz wurde das von LLC-Zellen sezernierte NGF durch Zugabe eines Anti-NGF-AK (1  $\mu$ g/ml) neutralisiert. Als Positivkontrolle diente die Inkubation der Zellen mit 10 (v/v) DMSO. Außerdem wurden unstimulierte Zellen mitgeführt, die in DMEM-Medium inkubiert wurden. Nach 24 h wurde das Substrat zugegeben und nach weiteren 4 h die Zellvitalität kolorimetrisch bei 490 nm mittels eines Mikrotiterplattenreaders gemessen.

### 2.15.5 Bestimmung der Anoikis *in vitro*

Der programmierte Zelltod, der auf Kontaktverlust der Zellen zueinander oder zur Basalmembran zurückzuführen ist, wird als Anoikis bezeichnet. Um den Vorgang der Anoikis *in vitro* abzubilden wurden 6-*well* Platten mit 500 µl in 95 % Ethanol gelöstem Polyhydroxymethacrylat (polyHEMA) beschichtet, welches die Adhäsion der Zellen an den Boden der Zellkulturschalen verhindert. Anschließend wurden 2 ml LLC-Zellen mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in die Platten ausgesät und mit rhNGF (10 ng/ml und 100 ng/ml) stimuliert. Anti-NGF-AK (1 µg/ml) wurden in einem weiteren Ansatz zugegeben, um endogen gebildetes und sezerniertes NGF zu neutralisieren. Als Negativkontrolle bzw. Positivkontrolle wurden die Zellen in DMEM-Medium bzw. DMEM-Medium mit 10 % (v/v) DMSO inkubiert. In unbeschichteten Platten inkubierte Zellen dienten als weiterer Kontrollansatz. Die Stimulation der Zellen wurde nach 24 h beendet, die Zellen geerntet, abzentrifugiert und in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Diaminphenylindol (DAPI), ein Farbstoff, der sehr schnell in die DNA von Zellen mit nicht intakter Zellenmembran interkaliert, und somit zur Färbung apoptotischer Zellen geeignet ist, wurde für 15 min zur Zellsuspension gegeben. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der DAPI-positiven Zellen bei 470 nm mittels FACS-Analyse.

### 2.15.6 Bestimmung der Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen *in vitro*

Der Einfluss von NGF auf die Adhäsion von Tumorzellen (LLC) an Endothelzellen (C166) *in vitro* wurde mittels eines Adhäsionstests analysiert.

Die Adhäsion Fluoreszenz-markierter LLC-Zellen an EC wurde in 12-*well* Platten untersucht. Dazu wurden C166-EC ausgesät und für 72 h bis zur Konfluenz bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach folgte die Stimulation der C166-Zellen für 2 h mit rhNGF (10 ng/ml und 100 ng/ml), Anti-NGF-AK (1 µg/ml) und AK gegen das Adhäsionsmolekül *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) in einer Konzentration von 5 µg/ml als Positivkontrolle. LLC-Zellen wurden in der Zwischenzeit für 15 min mit Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester (CFSE) (Konz: 5 µM) angefärbt und zweimal mit PBS waschen. Anschließend wurden je  $1 \times 10^5$  Fluoreszenz-markierte LLC-Zellen in ein 12-*well* mit konfluenten C166-EC pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit PBS, die dazu dienten, nicht adhärenzte Tumorzellen zu entfernen, wurden die Zellen lysiert und die Fluoreszenzintensität

des Zelllysats bei 517 nm gemessen. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl der an die EC gebundenen Tumorzellen. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität der Mediumkontrolle auf 100 % gesetzt und die Werte der anderen Ansätze dazu in Relation gebracht.

### **2.15.7 *In vitro*-Test der endothelialen Permeabilität**

Zum Test des Einflusses von NGF auf die Permeabilität des Endothels wurden C166-Zellen in einem 12-well System auf *Transwell*-Filter mit einer Porengröße von 0,4 µm in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und bis zur Konfluenz bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Filter in eine neue 12-well Platte, in die 1 ml frisches DMEM-Medium vorgelegt wurde, überführt. Danach erfolgte eine 15-minütige Stimulation der C166-Zellen im oberen Kompartiment mit 10 ng/ml bzw 100 ng/ml rhNGF sowie 1 µg/ml Anti-NGF-AK. Mit 100 ng/ml VEGF stimulierte Zellen dienten als Positivkontrolle für die endotheliale Permeabilität. Nach 15 min wurde den verschiedenen Stimulationsansätzen 500 µl in DMEM-Medium verdünntes FITC-Dextran in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben. Nach Inkubationszeiten von 15 min bis 2 h wurden je 100 µl Medium aus dem unteren Kompartiment entnommen und die Fluoreszenzintensität bei 517 nm mit einem Mikrotiterplattenreader (Tecan) bestimmt. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zur Konzentration an FITC-Dextran im unteren Kompartiment und somit ein Maß für die Permeabilität der EC-Schicht.

### **2.15.8 Test zum Migrationsverhalten von Tumorzellen *in vitro***

Das Migrationsverhalten der Tumorzellen auf NGF-Stimulus *in vitro* wurde in einem *Transwell*-Migrationstest untersucht. LLC-Zellen wurden dazu in einem 12-well System auf *Transwell*-Filter mit 8 µm Porengröße in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Die Zugabe der verschiedenen Stimulationsansätze (10 ng/ml rhNGF bzw. 100 ng/ml rhNGF) erfolgte in das untere Kompartiment des *Transwell*-Systems. Nach der 5-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die *Transwell*-Filter aus den Zellkulturplatten entnommen und eine HE-Färbung durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen mit einem Skalpell vorsichtig aus dem Filter geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und an einem Olympus BX51 Mikroskop ausgewertet. Dazu wurde die Anzahl der auf NGF-Stimulus hin durch die Membran gewanderten Zellen im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle bestimmt.

### 2.15.9 Bestimmung der Proliferation *in vitro*

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde mittels *Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)* der Fa. Roche untersucht. Der Test beruht auf dem Einbau des Pyrimidin-Analogons 5-Bromo-2'-Desoxyuridine (BrdU) in die DNA proliferierender Zellen.

Für den BrdU-Proliferationsassay wurden 100 µl LLC-Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in die Kavitäten einer schwarzen 96-well Platte mit durchsichtigem Boden ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte wie in den vorausgegangenen Versuchsteilen mit folgenden Ansätzen: 10 ng/ml rhNGF, 100 ng/ml rhNGF und 1 µg/ml Anti-NGF-AK. Nach 6-stündiger Stimulation wurde den Ansätzen für 18 h BrdU mit einer Endkonzentration von 10 µM zugegeben. Danach erfolgte die Fixierung und Lyse der Zellen. Das in proliferierte Zellen eingebaute BrdU wurde über einen Peroxidase gekoppelten Anti-BrdU-AK und anschließender Zugabe des Luminolsubstrats bestimmt. Die Detektion der freiwerdenden Lichtmenge erfolgte mittels eines Luminometers. Die Ergebnisse wurden in Relativen Lichteinheiten (*relative light units, rlu*) angegeben und korrelierten direkt mit der Menge an neusynthetisierter DNA und dadurch mit der Anzahl proliferierender Zellen. Um die Änderungen in der Proliferationsfähigkeit der behandelten Zellen miteinander vergleichen zu können, wurde die Mediumkontrolle gleich 100 % gesetzt und die Ergebnisse der behandelten Ansätze dazu in Relation gebracht.

## 2.16 Proteinbiochemische Methoden

### 2.16.1 Messung der NGF-Konzentration in Zellkulturüberständen und BALF

Die Bestimmung der NGF-Konzentration in Zellkulturüberständen und in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) erfolgte mit einem Kit der Fa. Promega nach Herstellerangaben. Bei dem Test handelt es sich um einen indirekten Sandwich-ELISA. Zunächst wurde ein gegen NGF gerichteter Primär-AK an die Platte gebunden und freie Proteinbindungsstellen durch Zugabe des mitgelieferten Blockierungs- und Probenpuffers blockiert. Nachdem die Standards (7,8 pg/ml bis 250 pg/ml) und die Proben, welche das zu detektierende Antigen (NGF) enthielten, aufgetragen und für 6 h inkubiert wurden, folgte zunächst die Zugabe des biotinylierten Sekundär-AK. An diesen band der danach zugegebene Streptavidin-Peroxidase-Komplex der anschließend das Substrat umgesetzten



konnte. Die Farbreaktion wurde bei 450 nm gemessen und die NGF-Konzentration in den Proben über die mitgeführte Standardreihe berechnet. Das Detektionslimit des ELISA-Kits für NGF lag bei 7,8 pg/ml.

### 2.16.2 Zytokin- und Chemokinbestimmung in BALF

Der BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA) ist eine durchflusszytometrische Multiplex-Anwendung, die die simultane Messung mehrerer unterschiedlicher Proteine (Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren) aus einer Probe ermöglicht. Das Prinzip beruht auf der Kopplung spezifischer AK mit Polystyrol-*beads*, die jeweils eine bestimmte Fluoreszenzintensität besitzen. Somit ist die Konzentration eines bestimmten Proteins spezifisch für die Fluoreszenzintensität, des spezifisch gegen dieses Protein gerichteten AK-*bead*-Komplexes und kann so quantifiziert werden.

Die Durchführung und Messung der Chemokin- und einen Zytokin-Arrays erfolgte nach Herstellerangaben mittels BD *FACSArray™ bioanalyzer* (BD Biosciences). In je 25 µl Probe pro Array wurden zum einen die Chemokine *chemokine (C-C motif) ligand 2* (CCL2, auch *monocyte chemotactic protein-1*, MCP-1), CCL3 (auch *macrophage inflammatory protein-1α*, MIP-1α), CCL4 (auch MIP-1β), CCL5 (auch *regulated and normal T cell expressed and secreted*, RANTES), CCL7 (auch MCP-3) und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) gemessen. Zum anderen wurden die Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF-α), IL-1β, IL-4, IL-10, IL-13 sowie Interferon-γ (IFN-γ) bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der spezifischen Gerätesoftware.

Detektionslimits der einzelnen Zytokine und Chemokine:

Zytokine	Detektionslimit	Chemokine	Detektionslimit
TNF-α	6,3 pg/ml	CCL2	4,2 pg/ml
IL-1β	1,9 pg/ml	CCL3	1,8 pg/ml
IL-4	5,0 pg/ml	CCL4	14,9 pg/ml
IL-10	9,2 pg/ml	CCL5	6,1 pg/ml
IL-13	2,7 pg/ml	CCL7	1,4 pg/ml
IFN-γ	2,5 pg/ml	GM-CSF	12,2 pg/ml

### 2.16.3 Proteinisolation aus Zellen

Die Zellen wurden nach der Stimulation 2x mit kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml PBS wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst, durch eine Zentrifugation bei 350 g und 4°C für 5 min wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 500 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis und einer Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm bei 4°C wurde der Überstand, der die Proteinfraction ohne Membranbestandteile enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur anschließenden Proteinfällung (2.16.4) auf Eis gelagert.

### 2.16.4 Proteinfällung und Konzentrationsbestimmung

Dem in 2.16.3 gewonnenen Zelllysate wurden 4 Volumenanteile (v/v) Aceton zugegeben und 2 h bei -20°C gefällt. Das durch 10-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C gewonnene Pellet wurde nach Entfernen des Überstands luftgetrocknet und in 50 µl 1x Lämmli-Puffer resuspendiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte kolorimetrisch mittels BCA-Assay (Bichinonic-Assay) nach Herstellerangaben.

### 2.16.5 Gelelektrophorese und Immunoblotting

Die Auftrennung der Proteine nach Molekülgröße erfolgte mittels SDS-PAGE. Dazu wurde ein 10%iges SDS-Gel nach folgendem Ansatz hergestellt:

	Sammelgel	Trenngel (10 %)
Acrylamid	720 µl	4 ml
Puffer	1,4 ml	3 ml
Wasser	2,8 ml	5 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	20 µl	60µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	5 µl	6 µl

Nach Aushärten des Gels wurden 20 µg Gesamtprotein pro Tasche aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgte bei 80 V für 2 h. Anschließend wurden die Proteine nach der *Semi-Dry*-Methode bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gel für 1,5 h auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF) Membran übertragen, die zuvor für 1 min in Methanol aktiviert wurde.

Um unspezifische AK-Bindestellen zu blockieren, wurde die Membran zunächst für 1 h bei RT mit einer 3%igen Milchpulverlösung in PBS und anschließend mit dem in der Milchpulverlösung verdünnten Primär-AK bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach 3 Waschschritten in TBST-Puffer für jeweils 10 min bei RT erfolgte eine 2-stündige Inkubation bei RT mit dem in 3%iger Milchpulverlösung verdünnten Peroxidase-gekoppelten Sekundär-AK. Die Membran wurde erneut zweimal gewaschen und die Substrat-Lösung (Luminol) für ca. 4 min aufgetragen. Danach wurden die Lichtsignale auf einen Röntgenfilm übertragen und dieser anschließend zur Detektion der reaktiven Banden entwickelt.

### **2.16.6 Quantifizierung Fluoreszenz-markierter Tumorzellen mittels FACS-Analyse**

Die Quantifizierung Fluoreszenz-markierter Tumorzellen im Lungengewebe und im peripheren Blut erfolgte durchflusszytometrisch mittels FACS. Bei der Durchflusszytometrie wird eine Einzelzellsuspension, die in einem Hüllstrom durch eine Kapillare gesaugt wird, durch verschiedene Laser angeregt. Die Zellen emittieren in Abhängigkeit vom Zelltyp und der vorher erfolgten Fluoreszenzmarkierung charakteristische Lichtsignale, die von Detektoren erfasst werden.

Die in 2.13.4.2 aus der Lunge und in 2.13.2 aus peripherem Blut der Versuchstiere aufgereinigten Zellen wurden vor der Injektion mit fluoreszierenden Nanokristallen markiert (2.12.3). Diese werden von *in vitro* kultivierten Zellen aufgenommen und reichern sich im Zytoplasma an. Qtracker®-Nanokristalle ermöglichen durch eine intensive und stabile Fluoreszenzmarkierung die Nachverfolgung der markierten Zellen über mehrere Generationen *in vivo*. Qtracker®585-Nanokristalle werden bei einer Extinktion von 405-545 nm angeregt und emittieren Licht der Wellenlänge 585 nm. Auf Grund dieser Eigenschaften können sie bei der FACS-Analyse im R-Phycoerythrin-(PE) Kanal detektiert werden. Aus den Lungenproben wurden  $5 \times 10^5$  Gesamtzellen und aus den Blutproben  $1 \times 10^5$  Gesamtzellen analysiert.

## 2.17 Molekularbiologische Methoden

### 2.17.1 DNA-Isolierung und Genotypisierung der Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde die DNA aus Schwanzspitzen mittels peqGOLD Tissue DNA Mini Kit der Fa. peqlab isoliert. Dazu wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte DNA bei 4°C gelagert.

Für die Genotypisierungs-PCR der NGF-Tg Mäuse wurde folgender Ansatz pipettiert:

2x RedTaq Ready Mix	10 µl
Primer Mix (forward und reverse)	1 µl
Wasser	4 µl
DNA-Template	5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>

Anschließend wurde eine PCR mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Aktivierung	94°C	5 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 s	
Annealing	60°C	45 s	
Extension	72°C	30 s	
Finale Extension	72°C	5 min	

Der Nachweis des PCR Produkts erfolgte anschließend mittels Gelelektrophorese. Dazu wurde ein 1,5%iges Agarosegel (1,5 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer) hergestellt. Dem Gel wurden 5 µl Ethidiumbromid zugegeben, welches in die doppelsträngige DNA interkalierte. Anschließend wurden 10 µl des PCR Produkts auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 1 h. Visualisiert wurde das Ergebnis mit Hilfe der Gel-Dokumentationsstation. Tiere, die das Transgen für NGF trugen, zeigten im Gel ein PCR-Produkt mit einer Größe von 311 bp (Basenpaaren).

### 2.17.2 Isolation von RNA aus Zellen

Zur Aufreinigung der RNA aus Zellen oder Gewebe wurde das RNeasy® Mini Kit der Fa. Qiagen benutzt. Die RNA-Isolierung erfolgte schrittweise über ein Säulensystem. Das

Aufreinigungsprinzip beruht auf dem Einsatz von Puffern mit hohem Salzgehalt, die die selektive Bindung von bis zu 100 µg RNA (>200 Basen) an die RNeasy Silica-Membran der Säule ermöglichen. Die Aufreinigung wurde gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 µl RNase-freiem Wasser.

### 2.17.3 Verdau von DNA, Bestimmung der RNA-Konzentration und cDNA-Synthese

Da die Proben nach der Aufreinigung noch kontaminierende DNA enthalten kann, wurde, um diese zu entfernen, ein DNA-Verdau durchgeführt. Zu 30 µl RNA wurden 2,5 µl 10x DNaseI Reaktionspuffer und 1 µl DNaseI pipettiert und der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl EDTA (25 nM) wurde die Probe für weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration der Probe erfolgte photometrisch. Dazu wurde eine 1:50 Verdünnung des Ansatzes in RNase-freiem Wasser hergestellt. Die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm mittels Photometer ergab die RNA-Konzentration der Probe. Gleichzeitig wurde die Absorption der Probe bei 280 nm ermittelt, die die Proteinkonzentration in der Probe detektiert. Der Quotient der Adsorptionen 260 nm/280 nm ist ein Maß für die Reinheit der RNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Als Matrize für die complementaryDNA-Synthese (cDNA) dienten 500 ng der zuvor aufgereinigten RNA. Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte mittels Omniscript-Kit und Oligomer-Primern aus 18 Thymidinen (Oligo-dT). Diese binden an die Poly-A-Schwänze der mRNA und markieren so den Startpunkt für die Polymerase. Dadurch kann die Umschreibung der intakten mRNA-Sequenz in cDNA gewährleistet werden.

Der folgende Ansatz wurde für 1 h bei 37°C und anschließend 5 min bei 93°C inkubiert.

500 ng RNA	x µl
Reaktionspuffer (10x)	2 µl
dNTPs (5 nM)	2 µl
Oligo-dT Primer	1 µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 µl
RNase-freies Wasser	y µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert und für qualitative Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) eingesetzt.

### 2.17.4 Qualitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Zum qualitativen Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen wurde eine PCR unter Verwendung des RedTaq Ready Mix Kit von Sigma-Aldrich durchgeführt

Dazu wurde folgender PCR-Ansatz pipettiert:

2x RedTaq Ready Mix	10 $\mu$ l
Primer Mix (forward und reverse, 10 pM)	1 $\mu$ l
Wasser	7 $\mu$ l
DNA-Template	2 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler für 40 Zyklen nach folgendem Temperaturprofil:

Aktivierung der Taq-Polymerase	94°C	5 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 s	
Annealing	56-60°C	45 s	
Extension	72°C	30 s	
Finale Extension	72°C	5 min	

Die Annealing-Temperatur, die sich nach dem GC-Gehalt der Primer richtet, ist der Primerliste in 2.5 zu entnehmen.

Der Nachweis des PCR Produkts erfolgte anschließend mittels Gelelektrophorese, bei der die Proben über ein Ethidiumbromid-haltiges 1,5%iges Agarosegel bei 100 V für 1 h aufgetrennt und die Banden anschließend durch UV-Belichtung sichtbar gemacht wurden (2.17.1).

## 2.18 Statistische Analysen

Alle in Balken- und Punktdiagrammen dargestellten Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) angegeben. Für die graphische und statistische Auswertung sowie die Berechnung der Signifikanz wurde das Softwareprogramm GraphPad Prism<sup>®</sup>4 verwendet. Der Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit einem ungepaarten t-Test. Sollten mehr als zwei unterschiedliche Versuchsgruppen miteinander verglichen werden, wurde die Analyse der Varianz (ANOVA) berechnet, gefolgt von einem Post-Test nach Tukey zum Vergleich der einzelnen Gruppen innerhalb des Experiments. Ergebnisse mit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angegeben (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Einfluss von NGF auf die pulmonale Metastasierung im Mausmodell**

Metastasierende Tumorzellen verbreiten sich in der Regel über die Blutgefäße. Treffen die Tumorzellen auf das Kapillarnetz eines Organs, werden sie dort meist rein mechanisch zurückgehalten. Bei der systemischen venösen Drainage stellt die Lunge eines der ersten Organe mit einem sehr dichten Kapillarnetz dar, in dem Tumorzellen aus den Blutgefäßen extravasieren und im Lungenparenchym proliferieren können. Da es sich bei der Metastasierung um eine Abfolge komplexer Vorgänge handelt (1.2), sollen im Mausmodell der experimentellen pulmonalen Metastasierung die Prozesse ab dem »Überleben in der Zirkulation« bis zur »Kolonisation der Lunge« untersucht werden. Die Funktion des Wachstumsfaktors NGF bei der pulmonalen Metastasierung wird mit Hilfe der NGF-Tg Maus, die NGF im Atemwegsepithel überexprimiert, charakterisiert.

##### **3.1.1 Lokale NGF-Expression im Modell der pulmonalen Metastasierung**

Zunächst wurde das beschriebene Mausmodell der pulmonalen Metastasierung (Kim et al., 2008; Parlakian et al., 2010) in der Arbeitsgruppe etabliert und hinsichtlich der lungenspezifischen Metastasenausbildung charakterisiert. Dazu wurden WT-Tieren an Tag 0 des Experiments  $1 \times 10^6$  LLC-Zellen i. v. in die laterale Schwanzvene injiziert. An Tag 14 erfolgten die Analysen (Abb. 4A). Der Analysezeitpunkt wurde so gewählt, dass die Versuchstiere deutliche pulmonale Metastasen ausgebildet haben aber nicht auf Grund des fortgeschrittenen Metastasenwachstums leiden mussten. Während des gesamten Versuchszeitraums wurden die Tiere zweimal wöchentlich gewogen, um einen möglichen Gewichtsverlust festzustellen. Dieser geht häufig mit Tumorerkrankungen einher (Tumorkachexie) und dient als Parameter für den Gesundheitszustand der Tiere.

Es zeigte sich, dass WT- und NGF-Tg Mäuse, denen keine Tumorzellen injiziert wurden eine Gewichtszunahme von 20,8 % (WT) bzw. 6,7 % (NGF-Tg) aufweisen. Wurden den Tieren Tumorzellen injiziert, zeigten NGF-Tg Tiere im Verlauf von 14 Tagen keine auffällige Gewichtsänderung (Zunahme um 1,8 %), wohingegen WT-Tiere, 8,2 % ihres Körpergewichts verloren. Der deutliche Gewichtsverlust der WT-Tiere lässt darauf schließen, dass diese sich

in einem schlechteren allgemeinen Gesundheitszustand befinden als die NGF-Tg Tiere (Daten s. Anhang 10.1).

Da im Modell der experimentellen Metastasierung die Lunge das erste Kapillarnetz darstellt, das bei der venösen Drainage nach Injektion der Tumorzellen in die Schwanzvene durchlaufen wird, bilden sich Metastasen bevorzugt dort aus. Deshalb wurden die Lungen der Versuchstiere am Analysetag entnommen, histologisch aufgearbeitet und mikroskopisch analysiert.

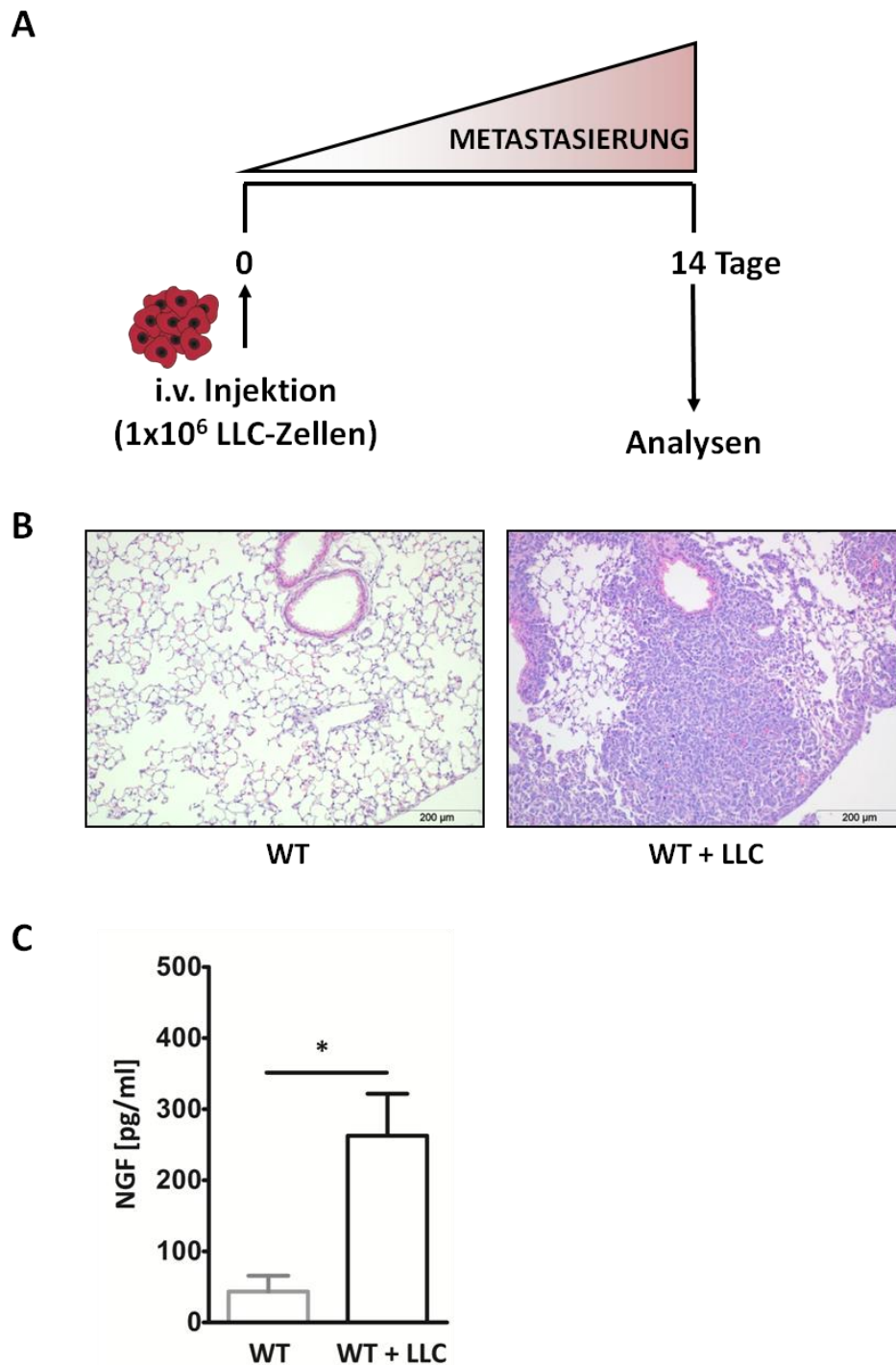
Dazu wurde der Thorax der Mäuse geöffnet und die Lunge entnommen (2.13.4.1). Nach Fixierung in 6%iger PFA-Lösung für 24 h wurden die Lungen zunächst in Agarose und anschließend in Paraffin eingebettet (2.13.4.3). Danach wurden 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und eine HE-Färbung durchgeführt (2.14.1). Die mikroskopische Auswertung der Lungenpräparate zeigte bei WT-Kontrolltieren in einer 100-fachen Übersichtsvergrößerung homogenes Lungengewebe, in dem neben den Alveolarräumen größere Atemwege und Blutgefäße erkennbar waren. Die Lungen von WT-Tieren, denen LLC-Zellen injiziert worden waren, zeigten große Areale mit dichterem Gewebe, welches deutlich stärker angefärbt war. Diese Metastasen-Areale gehen mit dem Verlust des physiologischen strukturellen und funktionellen Aufbaus der Lunge einher (Abb. 4B).

Da Tumorzellen das Kapillarnetz der Lunge aber auch passieren und sich weiter über die Zirkulation ausbreiten könnten, wurden auch andere Organe, wie Nieren, Leber und Gehirn, die häufig von Metastasierung betroffenen sind, histologisch ausgewertet. Die Analyse ergab jedoch keine Ausbildung von Metastasen in den genannten Organen, so dass davon ausgegangen wurde, dass im durchgeführten Modell der experimentellen Metastasierung nur pulmonale Metastasen entstehen (Daten s. Anhang 10.2).

Um die Rolle von NGF bei der pulmonalen Metastasierung näher zu charakterisieren, wurden die lokalen NGF-Konzentrationen bei gesunden WT-Tieren in der BAL gemessen, und mit den Werten von WT-Tieren verglichen, die Metastasen in der Lunge ausgebildet hatten.

Dazu wurde bei Versuchstieren 14 Tage nach Injektion von  $1 \times 10^6$  LLC-Zellen eine BAL durchgeführt (2.13.3). Im zellfreien Überstand der BAL (2.13.3.1) wurden anschließend die NGF-Konzentrationen mittels ELISA (2.16.1) gemessen.





**Abb. 4. Erhöhte NGF-Konzentration in der BALF im Modell der pulmonalen Metastasierung**

(A) Modell zur pulmonalen Metastasierung durch i. v. Injektion von  $1 \times 10^6$  LLC-Zellen. Die pulmonale Metastasierung wurde nach 14 Tagen analysiert. (B) Repräsentative Histologie der Lungen von unbehandelten WT-Tieren (WT) bzw. nach Injektion von LLC-Zellen (WT + LLC) gefärbt mit HE (Vergrößerung 100x). (C) Messung der NGF-Konzentrationen in der zellfreien bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) mittels ELISA von unbehandelten Kontrolltieren (WT) und WT-Mäusen, die pulmonale Metastasen ausgebildet hatten (WT + LLC). Die Werte von  $n = 4-5$  sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \* $p < 0,05$ .

In der BAL-Flüssigkeit von WT-Tieren, denen keine Tumorzellen injiziert worden waren, waren nur geringe NGF-Spiegel von  $44,17 \pm 21,84$  pg/ml nachweisbar. WT-Tiere, die während des Versuchszeitraums pulmonale Metastasen ausgebildet hatten, zeigten eine signifikante Erhöhung der NGF-Konzentrationen auf  $704,2 \pm 97,55$  pg/ml (Abb. 4C).

Diese ersten Ergebnisse zeigten, dass die Versuchstiere zum Analysezeitpunkt pulmonale Metastasen ausgebildet hatten. Die pulmonale Metastasierung wurde von erhöhten NGF-Spiegeln in der BALF begleitet.

### 3.1.2 Pulmonale Metastasierung bei lokaler NGF-Überexpression

Im Modell der experimentellen pulmonalen Metastasierung wurde bei WT-Mäusen eine erhöhte NGF-Konzentration in der BALF gemessen. NGF könnte hier sowohl von den proliferierenden LLC-Zellen als auch von Struktur- oder Immunzellen im Lungengewebe gebildet werden. Um den Einfluss erhöhter NGF-Konzentrationen bei der pulmonalen Metastasierung näher zu charakterisieren, wurde ein transgener Mausstamm (NGF-Tg) eingesetzt, der NGF im Atemwegsepithel überexprimiert. WT- und NGF-Tg Mäusen wurden  $1 \times 10^6$  LLC-Zellen Tumorzellen in die Schwanzvene injiziert.

Die Analyse der pulmonalen Metastasen erfolgte 14 Tage nach der Injektion der Tumorzellen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch. Dazu wurde zunächst der Thorax der Mäuse geöffnet und die Lunge entnommen (2.13.4.1). Nach Fixierung in 6%iger PFA-Lösung für 24 h wurden die auf der Lungenoberfläche sichtbaren Metastasen gezählt. Für die histologische Auswertung wurden Paraffinschnitte der zuvor in Agarose eingebetteten Lungen angefertigt (2.13.4.3) und eine HE-Färbung durchgeführt (2.14.1).

Bereits bei der makroskopischen Auswertung der pulmonalen Metastasen zeigte sich, dass sich bei WT-Tieren deutlich mehr Oberflächenmetastasen ausgebildet hatten als bei NGF-Tg Mäusen (Abb. 5A). Die quantitative Analyse ergab bei den WT-Tieren  $85,46 \pm 6,2$  Oberflächenmetastasen pro Lunge, wohingegen bei NGF-Tg Tieren nur  $32,58 \pm 8,55$  Metastasen an der Lungenoberfläche gezählt wurden (Abb. 5B). Bei der histologischen Auswertung der Gewebeschnitte bestätigte sich das makroskopische Ergebnis (Abb. 5C). Die stereologische Auswertung des Metastasenvolumens ( $V_{Met}$ ) bezogen auf das gesamte Volumen der Lunge ( $V_{Lunge}$ ) mittels *newCAST™*-Software (2.14.3) zeigte bei WT-Mäusen ein Verhältnis von  $0,17 \pm 0,02$ . Somit waren bei WT-Tieren ca. 17 % des Lungengewebes von Metastasierung betroffen. Bei NGF-Tg Mäusen betrug das Verhältnis  $V_{Met}/V_{Lunge}$   $0,06 \pm 0,02$ .

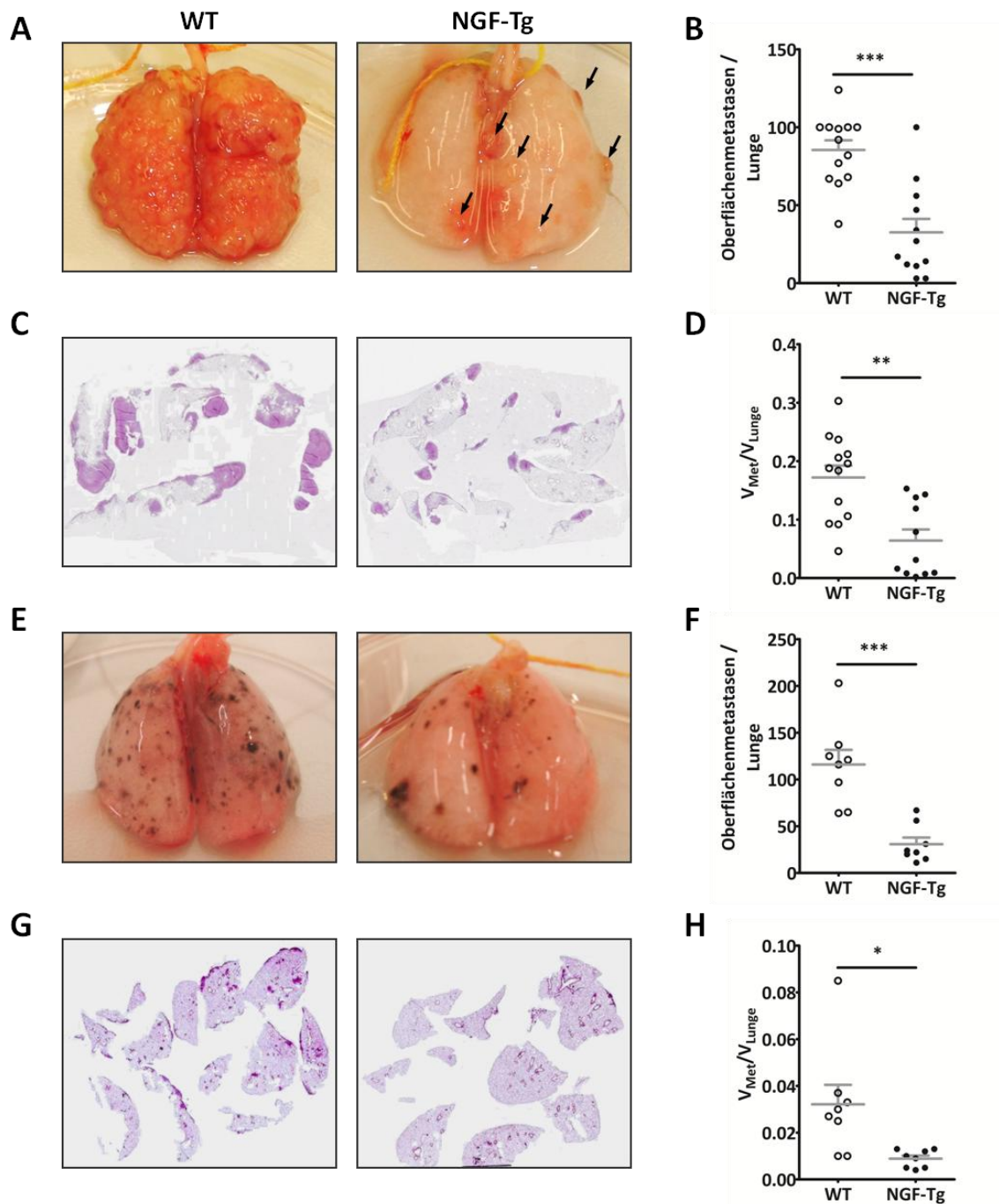
Bei NGF-Tg Mäusen machten die Metastasen also nur ca. 6 % des Lungengewebes aus (Abb. 5D).

Die geringere Ausbildung pulmonaler Metastasen in NGF-Tg Mäusen im LLC-Modell kann mehrere Ursachen haben. Um zu analysieren, ob die lokale NGF-Überexpression in der Lunge spezifisch die Metastasierung von LLC-Zellen hemmt, wurde das Modell mit einer weiteren Tumorzelllinie, den B16/F10-Melanomzellen, durchgeführt. Auf Grund des verwendeten Tiermodells kommt es auch bei der ursprünglich aus der Haut isolierten Tumorzelllinie zur Ausbildung pulmonaler Metastasen. B16/F10-Zellen gelten als hochgradig metastasierend, im Gegensatz zu LLC-Zellen, die als wenig metastasierend eingestuft sind.

Analog zum LLC-Modell wurden WT- und NGF-Tg Tieren an Tag 0  $1 \times 10^6$  B16/F10-Melanomzellen i. v. injiziert. Die Analyse der makroskopisch ausgebildeten Metastasen sowie die histologische Auswertung erfolgten, wie für das LLC-Modell beschrieben, an Tag 14 (Abb. 4A).

Die makroskopische Auswertung der auf Grund der Melaninproduktion schwarzgefärbten Metastasen an der Lungenoberfläche zeigte, dass WT-Tiere signifikant mehr Metastasen ausgebildet hatten als NGF-Tg Tiere (Abb. 5E). Die Anzahl der Oberflächenmetastasen auf der Lunge betrug  $116 \pm 15,69$  Metastasen bei WT-Mäusen. Die Gruppe der NGF-Tg Tiere bildete mit  $30,75 \pm 7,11$  signifikant weniger Metastasen an der Lungenoberfläche aus (Abb. 5F). Auch histologisch, in HE-gefärbten Lungenschnitten, zeigten sich in WT-Mäusen mehr stark angefärbte (auf Grund des dichteren Gewebes) metastatische Areale als in NGF-Tg Tieren (Abb. 5G). Die histologische Analyse des Metastasenvolumens der Lunge mittels *newCAST™*-Software ergab bei WT-Tieren ein Verhältnis von  $0,032 \pm 0,008$  bezogen auf das Volumen der gesamten Lunge. Das Verhältnis des Metastasenvolumens zum gesamten Lungenvolumen betrug bei NGF-Tg Mäusen  $0,009 \pm 0,001$  (Abb. 5H). In der WT-Gruppe machte das Tumorgewebe demzufolge ca. 3,2 % des Lungengewebes aus. In der NGF-Tg Gruppe war der Anteil mit ca. 0,9 % deutlich geringer.

Diese Ergebnisse zeigten auch, dass WT- und NGF-Tg Tiere nach i. v. Injektion von LLC-Zellen bzw. B16/F10-Melanomzellen eine vergleichbare Anzahl pulmonaler Metastasen ausbildeten. Da das Metastasenvolumen im B16/F10-Modell sowohl bei WT- als auch bei NGF-Tg Mäusen jedoch deutlich geringer war als im LLC-Modell, kann daraus geschlossen werden, dass sich im B16/F10-Modell deutlich kleinere Metastasen ausgebildet haben. Dieses Ergebnis war bereits makroskopisch sichtbar.



**Abb. 5. Effekt der lokalen NGF-Überexpression auf die pulmonale Metastasierung**

Pulmonale Metastasierung 14 Tage nach Injektion von  $1 \times 10^6$  (A-D) LLC-Zellen und (E-H) B16/F10-Melanomzellen. (A+E) Repräsentative Fotografie von Metastasen an der Lungenoberfläche von WT- bzw. NGF-Tg Mäusen. (B+F) Makroskopische Quantifizierung der Oberflächenmetastasen der Lungen von WT- bzw. NGF-Tg Tieren. (C+G) Repräsentative Histologie des von Metastasen durchsetzten Lungengewebes von WT- und NGF-Tg Mäusen (Vergrößerung 12,5x). (D+H) Stereologische Quantifizierung des Metastasenvolumens bezogen auf das Volumen Lungenvolumen ( $V_{Met}/V_{Lunge}$ ) bei WT- und NGF-Tg Tieren. Die Werte von  $n = 11-13$  im LLC-Modell und  $n = 8$  im B16/F10-Modell sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Sowohl im LLC-Modell als auch im B16/F10-Modell konnte bei NGF-Tg Mäusen eine verringerte pulmonale Metastasierung nachgewiesen werden. Diese reduzierte pulmonale Metastasierung in NGF-Tg Mäusen steht im kompletten Gegensatz zum erwarteten Ergebnis. Die Fragestellungen nach den der Metastasierung zu Grunde liegenden Mechanismen, die sich aus der Hypothese dieser Arbeit ergeben haben, ändern sich durch dieses unerwartete Resultat jedoch nicht.

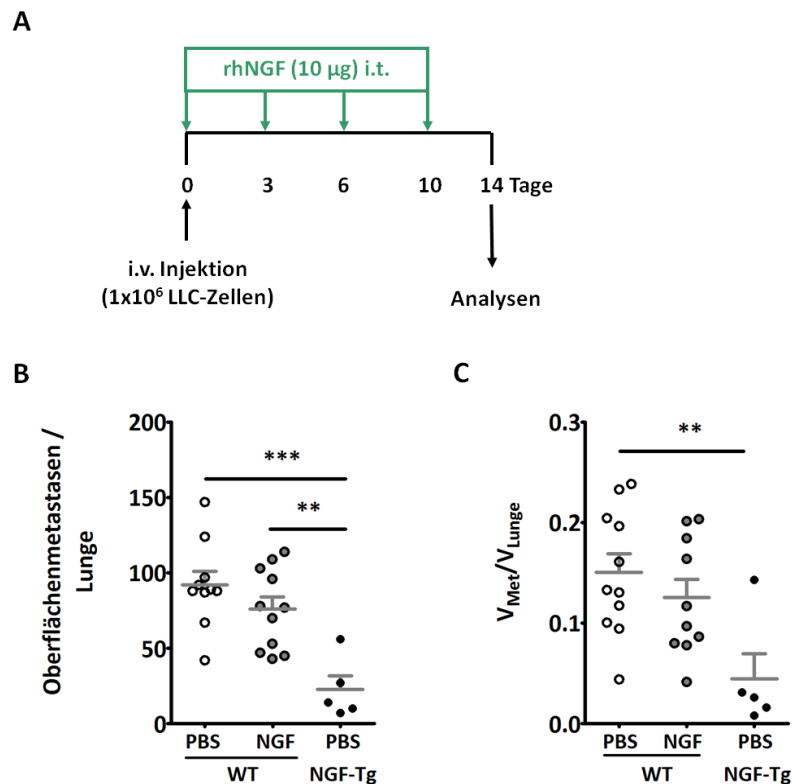
### **3.1.3 Pulmonale Metastasierung bei exogener NGF-Gabe**

NGF-Tg Mäuse, die im Atemwegsepithel NGF überexprimieren, zeigten eine verringerte pulmonale Metastasierung. Um zu bestätigen, dass dieser Effekt auf der Überexpression von NGF beruht, wurde WT-Mäusen exogenes rekombinantes humanes NGF (rhNGF) intratracheal (i. t.) verabreicht. Nach exogener NGF-Applikation waren in WT-Mäusen vergleichbare Befunde wie bei der NGF-Tg Maus zu erwarten. Bei der NGF-Tg Maus kommt es jedoch bereits vor der Geburt über die Aktivierung des CCSP-Promotors zur NGF-Überexpression. Deshalb können indirekte NGF-Effekte auf die Metastasierung nicht ausgeschlossen werden. Die kurzzeitige i. t. NGF-Gabe (über einen Zeitraum von 2 Wochen ab Injektion der Tumorzellen) dient somit zum einen dazu, den direkten Effekt von NGF auf die pulmonale Metastasierung nachzuweisen. Außerdem kann aber auch der Zeitraum der NGF-Wirkung eingegrenzt werden; nämlich von der Injektion der Tumorzellen bis zur Analyse der makroskopisch nachweisbaren Metastasen in der Lunge.

Um die lokale NGF-Überexpression in der Lunge von NGF-Tg Tieren nachzuahmen, wurde WT-Tieren rhNGF i. t. verabreicht. Da es sich bei NGF um ein kleines Protein handelt, welches schnell abgebaut wird, erfolgte die Applikation an den Tagen 0, 3, 7 und 10 nach i. v. Injektion der LLC-Zellen (2.12.4). Die mehrfache NGF-Gabe sollte die ständige Bioverfügbarkeit von NGF in der Lunge gewährleisten. Die makroskopische sowie mikroskopische (2.14.3) Analyse der pulmonalen Metastasen erfolgte an Tag 14 nach Injektion der Tumorzellen (Abb. 6A). Als Kontrollgruppen dienten WT-Tiere und NGF-Tg Tiere, denen anstatt NGF PBS i. t. verabreicht wurde.

Die makroskopische Auswertung der an der Lungenoberfläche sichtbaren Metastasen ergab bei WT-Tieren, die zur Kontrolle mit PBS behandelt wurden eine Anzahl  $92,10 \pm 8,99$  Metastasen. Bei mit rhNGF behandelten WT-Mäusen bildeten sich  $75,91 \pm 8,05$  Metastasen an der Lungenoberfläche aus. Die Kontrollgruppe der PBS-behandelten NGF-Tg Tiere zeigte

22,80 ± 8,97 Oberflächenmetastasen (Abb. 6B). Diese signifikante Reduktion pulmonaler Metastasen bei NGF-Tg Tieren konnte durch exogene Applikation von rhNGF jedoch nicht erzielt werden. Bei der histologischen Analyse des Metastasenvolumens in HE-gefärbten Lungenpräparaten bestätigte sich das makroskopische Resultat. Bei WT-Tieren, denen PBS appliziert wurde, war die Lunge zu ca. 15 % von Metastasen befallen. Dies ergab sich aus dem Metastasenvolumen bezogen auf das gesamte Lungenvolumen ( $V_{Met}/V_{Lunge} = 0,150 \pm 0,0187$ ). Bei mit rhNGF behandelten WT-Mäusen betrug das Metastasenvolumen der Lunge bezogen auf das gesamte Lungenvolumen  $0,125 \pm 0,0184$ , was ca. 12 % entspricht. Bei NGF-Tg Tieren, die mit PBS behandelt wurden, ergab sich ein Quotient  $V_{Met}/V_{Lunge}$  von  $0,045 \pm 0,025$  (Abb. 6C). Das Metastasenvolumen lag demnach bei ca. 4,5 % und war somit im Vergleich zu WT-Tieren signifikant vermindert, wohingegen die NGF-Behandlung von WT-Tieren nicht zur erwarteten signifikanten Reduktion des pulmonalen Metastasenvolumens bei WT-Mäusen führte.



**Abb. 6. Die lokale NGF-Applikation bei WT-Mäusen reduziert die pulmonale Metastasierung nicht.**

(A) Protokoll der NGF-Applikation im Modell der pulmonalen Metastasierung. WT-Tieren wurde nach i. v. Injektion der LLC-Zellen 4x rhNGF i. t. verabreicht. Kontrolltieren (WT- bzw. NGF-Tg Tiere) wurde PBS i. t. appliziert. (B) Anzahl der Oberflächenmetastasen. (C) Stereolog. Quantifizierung Metastasenvolumen/Lungenvolumen ( $V_{Met}/V_{Lunge}$ ). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM n = 10-11 in den WT-Gruppen und n = 5 in der NGF-Tg Gruppe. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

## 3.2 Einfluss von NGF auf die lokale Entzündungsreaktion bei fortgeschrittener Metastasierung

Während der Metastasierung können sowohl pro- als auch anti-metastatisch wirkende entzündliche Prozesse initiiert werden (1.3). Im Mausmodell der experimentellen pulmonalen Metastasierung (2.12.2) zeigten NGF-Tg Mäuse eine geringere Metastasierung der Lunge als WT-Tiere. Deshalb sollte untersucht werden, ob dies mit einer veränderten lokalen Immunantwort assoziiert ist. Dazu wurde die lokale Entzündungsreaktion bei bereits ausgebildeten Lungenmetastasen im Lungengewebe und in der BAL näher charakterisiert.

### 3.2.1 Entzündung im Lungengewebe

Die lokale Entzündungsreaktion im Lungengewebe wurde über eine immunhistochemische Oberflächenfärbung des CD45-Ag (2.14.2) untersucht, das von allen hämatopoetischen Zellen außer Erythrozyten und Plasmazellen exprimiert wird. Die gegen CD45 gefärbten Lungenschnitte wurden mikroskopisch ausgewertet und die Anzahl der braungefärbten Zellen bestimmt, die CD45 an ihrer Oberfläche exprimieren (CD45<sup>+</sup>). Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin. Als Färbekontrollen dienten Lungenschnitte, die ohne Zugabe des Primär-AK inkubiert wurden (Abb. 7A, neg. Kontr./Asthma) und, als positive Färbekontrolle, Lungenschnitte von Mäusen, die eine Ovalbumin-induzierte allergische Entzündung in der Lunge ausgebildet haben (Abb. 7A, pos. Kontr./Asthma). Bei der mikroskopischen Analyse der CD45<sup>+</sup> Zellen in der Lunge von Versuchstieren, die Metastasen entwickelt hatten, war weder bei WT- noch NGF-Tg Tieren ein entzündliches Infiltrat im Lungengewebe nachweisbar (Abb. 7A, WT/LLC und NGF-Tg/LLC). Die Quantifizierung der CD45<sup>+</sup> Zellen in der Lunge gesunder Tiere ergab bei WT-Mäusen  $1,73 \pm 0,10$  CD45<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>3</sup> und  $2,11 \pm 0,21$  CD45<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>3</sup> bei NGF-Tg Tieren. Bei WT-Mäusen, denen Tumorzellen injiziert wurden, waren nur  $0,08 \pm 0,03$  CD45<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>3</sup> im unveränderten Lungengewebe nachweisbar, und bei der NGF-Tg Vergleichsgruppe wurden  $0,18 \pm 0,03$  CD45<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>3</sup> im Lungengewebe gezählt. In den pulmonalen Metastasen der WT-Gruppe betrug die Zahl der CD45<sup>+</sup> Zellen im Tumorgewebe  $1,55 \pm 0,59$  CD45<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>3</sup>. Im Vergleich dazu wurde bei NGF-Tg Tieren ein leichter (nicht signifikanter) Anstieg auf  $2,70 \pm 0,41$  CD45<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>3</sup> beobachtet (Abb. 7B).

Somit war die Anzahl der CD45<sup>+</sup> Zellen bei gesunden WT- und NGF-Tg Mäusen im Tumorgewebe beider Versuchsgruppen nahezu gleich. Im unveränderten Lungengewebe

der Tiere, die Metastasen ausgebildet hatten, wurde jedoch eine deutlich verringerte Anzahl CD45<sup>+</sup> Immunzellen nachgewiesen.

### 3.2.2 Entzündungsparameter in der BAL

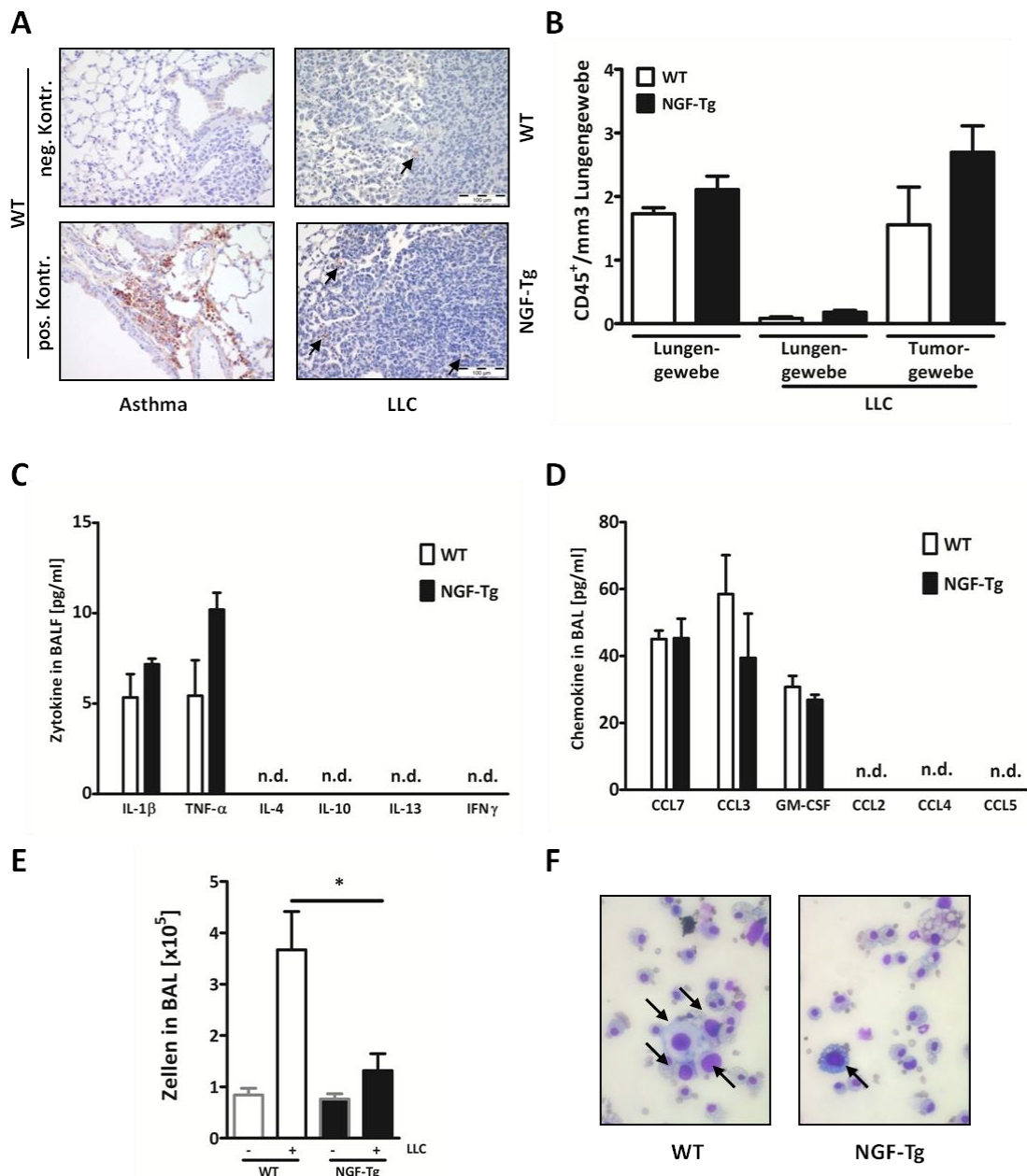
Da trotz der ähnlichen Anzahl inflammatorischer Zellen in WT- und NGF-Tg Tieren differenziell regulierte Entzündungsreaktionen vorliegen können, erfolgte die Analyse verschiedener Zytokine und Chemokine, die für eine pro- bzw. anti-tumorigene Entzündung charakteristisch sind.

Die Messung der Zytokine in der BALF 14 Tage nach Injektion der LLC-Zellen mittels CBA (2.16.2) ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und NGF-Tg Mäusen (Abb. 7C). Für IL-1 $\beta$  wurde bei WT-Tieren eine Konzentration von  $5,3 \pm 1,3$  pg/ml gemessen. Bei NGF-Tg Mäusen lag die IL-1 $\beta$ -Konzentration in der BALF bei  $7,2 \pm 0,3$  pg/ml. Die TNF- $\alpha$ -Spiegel betragen bei WT-Mäusen  $5,4 \pm 1,9$  pg/ml und  $10,2 \pm 0,9$  pg/ml bei NGF-Tg Tieren. Die Konzentrationen für IL-4, IL-10, IL-13 und IFN- $\gamma$  in der BALF lagen unter dem jeweiligen Detektionslimit (nicht detektierbar, n.d.).

Bei der Bestimmung der Chemokin-Konzentrationen in der BALF konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und NGF-Tg Tieren detektiert werden (Abb. 7D). Die Konzentrationen für CCL7 betragen bei WT-Mäusen  $45,1 \pm 2,5$  pg/ml und  $45,3 \pm 5,8$  pg/ml bei NGF-Tg Tieren. Für CCL3 lagen die Konzentrationen in der BALF von WT-Tieren bei  $58,5 \pm 11,6$  pg/ml im Vergleich zu  $39,4 \pm 13,2$  pg/ml in der NGF-Tg Gruppe. GM-CSF wurde bei WT-Tieren in einer Konzentration von  $30,7 \pm 3,3$  pg/ml bzw.  $26,9 \pm 1,5$  pg/ml bei NGF-Tg Tieren nachgewiesen. Die Chemokine CCL2, CCL4 und CCL5 waren weder in der WT- noch in der NGF-Tg Gruppe in der BALF detektierbar.

Als weiterer Entzündungsparameter im Modell der pulmonalen Metastasierung wurde die Gesamtzellzahl in der BAL gemessen (2.13.3.2) und zur Differenzierung der darin enthaltenen Zellpopulationen Zytopspins angefertigt, die nach einer DiffQuick® Färbung (2.13.3.3) analysiert wurden.





**Abb. 7. Lokale Entzündungsreaktion im Modell der pulmonalen Metastasierung**

(A) Repräsentative IHC gegen CD45 gefärbter Lungenschnitte von WT- und NGF-Tg Tieren. Positivkontrolle: Lungenschnitte von WT-Tieren mit akuter allergischer Atemwegsentzündung, Negativkontrolle ohne Inkubation mit Primär-AK (Vergrößerung: 200x). (B) Quantifizierung CD45<sup>+</sup> Zellen im Lungengewebe von gesunden Kontrolltieren und WT- und NGF-Tg Tieren nach Ausbildung pulmonaler Metastasen. (C) Messung der Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-13 und IFN $\gamma$  in der BAL mittels CBA zum o. g. Analysezeitpunkt. (D) Messung der Chemokine CCL7, CCL3, GM-CSF, CCL2, CCL4 und CCL5 in der BAL zum Analysezeitpunkt mittels CBA. (E) Bestimmung der Gesamtzellzahl in der BAL von WT- und NGF-Tg Mäusen 14 Tage nach i. v. Injektion von  $1 \times 10^6$  LLC-Zellen wurde die Gesamtzellzahl bestimmt. Als Kontrolltiere dienten WT- und NGF-Tg Mäuse, denen keine Tumorzellen injiziert wurden. (F) Repräsentative Zytospins zur morphologischen Charakterisierung der Zellpopulationen in der BAL; Tumorzellen (Pfeile) (Vergrößerung: 400x). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4$  für die Quantifizierung CD45<sup>+</sup> Zellen im Lungengewebe und die Zytokin- bzw Chemokin-Bestimmung und  $n = 6-8$  für die BAL-Gesamtzahl. n.d.: nicht detektierbar. \* $p < 0,05$ .

Dabei ergab sich bei gesunden Kontrolltieren (WT) eine Gesamtzellzahl von  $0,84 \pm 0,13 \times 10^5$  Zellen/ml in der BAL. Im Vergleich dazu war bei WT-Mäusen, die Lungenmetastasen ausgebildet hatten (WT + LLC) ein signifikanter Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL auf  $3,67 \pm 0,75 \times 10^5$  Zellen/ml zu beobachten. Bei unbehandelten NGF-Tg Mäusen (NGF-Tg) lagen die Gesamtzellzahlen bei  $0,76 \pm 0,11 \times 10^5$  Zellen/ml bzw. bei  $1,32 \pm 0,33 \times 10^5$  Zellen/ml in NGF-Tg Tieren, die zuvor LLC-Zellen injiziert bekommen hatten (NGF-Tg + LLC) und waren somit nicht signifikant verändert (Abb. 7E). Bei der mikroskopischen Auswertung der Zytospins zeigte sich, dass die erhöhten Zellzahlen in der WT-Gruppe, der LLC-Zellen injiziert worden waren, auf dem Einstrom von Tumorzellen in die BAL beruhen (Abb. 7F).

Als weiterer Entzündungsparameter im Modell der pulmonalen Metastasierung wurde die Gesamtzellzahl in der BAL gemessen (2.13.3.2) und zur Differenzierung der darin enthaltenen Zellpopulationen Zytospins angefertigt, die nach einer DiffQuick® Färbung (2.13.3.3) analysiert wurden. Dabei ergab sich bei gesunden Kontrolltieren (WT) eine Gesamtzellzahl von  $0,84 \pm 0,13 \times 10^5$  Zellen/ml in der BAL. Im Vergleich dazu war bei WT-Mäusen, die Lungenmetastasen ausgebildet hatten (WT + LLC) ein signifikanter Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL auf  $3,67 \pm 0,75 \times 10^5$  Zellen/ml zu beobachten. Bei unbehandelten NGF-Tg Mäusen (NGF-Tg) lagen die Gesamtzellzahlen bei  $0,76 \pm 0,11 \times 10^5$  Zellen/ml bzw. bei  $1,32 \pm 0,33 \times 10^5$  Zellen/ml in NGF-Tg Tieren, die zuvor LLC-Zellen injiziert bekommen hatten (NGF-Tg + LLC) und waren somit nicht signifikant verändert (Abb. 7E). Bei der mikroskopischen Auswertung der Zytospins zeigte sich, dass die erhöhten Zellzahlen in der WT-Gruppe, der LLC-Zellen injiziert worden waren, auf dem Einstrom von Tumorzellen in die BAL beruhen (Abb. 7F).

Die Analysen verschiedener Entzündungsparameter im Lungengewebe und in den Atemwegen zeigten folglich im Mausmodell der pulmonalen Metastasierung bis auf eine erhöhte Gesamtzellzahl in der BAL bei WT-Tieren, die auf den Einstrom von Tumorzellen zurückzuführen ist, keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und NGF-Tg Tieren.

### 3.3 Direkter Effekt von NGF auf murine Lungenkarzinom-Zellen *in vitro*

Die reduzierte pulmonale Metastasierung in NGF-Tg Tieren könnte auch auf die direkte Wirkung von NGF auf die Tumorzellen zurückzuführen sein. Ob dies zutrifft, sollte in verschiedenen funktionellen *in vitro* Experimenten untersucht werden. Neben dem Nachweis von NGF und den NGF-Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup> auf Tumorzellen auf mRNA- bzw. Proteinebene wurden *in vitro* Experimente durchgeführt, die dazu beitragen sollten, den Effekt von NGF auf einzelne Schritte der Metastasierungskaskade einzugrenzen.

#### 3.3.1 Expression von NGF und Rezeptoren

Um sicherzustellen, dass die Tumorzellen auf den exogenen NGF-Stimulus reagieren können, wurde zunächst die Expression der Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup> auf mRNA- und auf Proteinebene untersucht. Weiterhin wurde getestet, ob Tumorzellen selbst NGF produzieren und sezernieren.

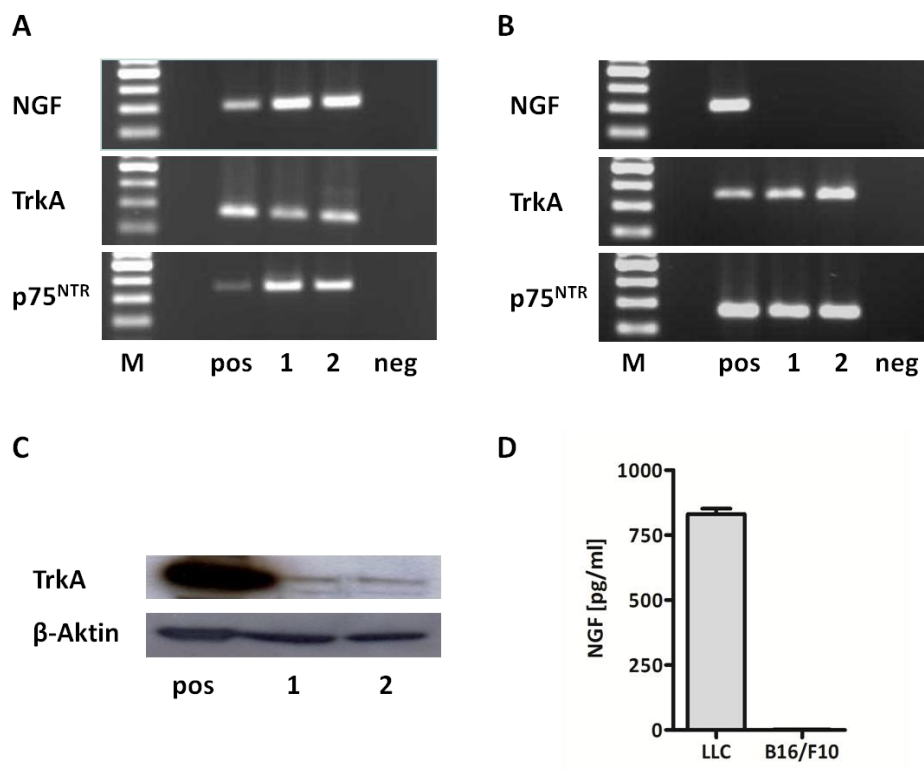
Für die Analyse der mRNA-Expression wurde aus kultivierten LLC-Zellen und B16/F10-Melanomzellen, wie in 2.17.2 beschrieben, die RNA über ein Silica-Säulensystem aufgereinigt. Nach reverser Transkription (2.17.3) wurde die mRNA-Expression mittels qualitativer PCR nachgewiesen (2.17.4).

Auf mRNA-Ebene konnte in 2 Isolaten (1 und 2) sowohl die Expression von NGF als auch der Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup> durch LLC-Zellen gezeigt werden (Abb. 8A). B16/F10-Melanomzellen exprimieren auf mRNA-Ebene zwar die NGF-Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup>, aber im Gegensatz zu LLC-Zellen kein NGF (Abb. 8B). Als Positivkontrolle (pos) wurde aus dem Gehirn isolierte cDNA mitgeführt. In den Ansatz der Negativkontrolle (neg) wurde Wasser anstelle von cDNA zugegeben.

Die Expression des NGF-Rezeptors TrkA in LLC-Zellen wurde zusätzlich auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurde aus LLC-Zellen, wie unter 2.16.3 beschrieben, das Gesamtprotein isoliert und aufgereinigt (2.16.4) Mittels Western Blot konnte in zwei Proteinproben (1 und 2) die Expression des NGF-Rezeptors TrkA auf LLC-Zellen bestätigt werden (2.16.5). Als Positivkontrolle (pos) diente aus dem Gehirn aufgereinigtes Gesamtprotein (Abb. 8C).

In den Zellkulturüberständen kultivierter LCC- und B16/F10-Zellen wurde außerdem die Konzentration des sezernierten NGF gemessen (2.16.1). Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 6-well

Zellkulturplatten ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h inkubiert. Die Messung der NGF-Konzentration in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Die Auswertung der Daten ergab in den Überständen von LLC-Zellen eine NGF-Konzentration von  $830,6 \pm 20,5$  pg/ml. In den Zellkulturüberständen von für 24 h kultivierten B16/F10-Melanomzellen lagen die gemessenen NGF-Konzentrationen unter dem Detektionslimit von 7,8 pg/ml. Somit konnte bei B16/F10-Zellen keine NGF-Sekretion nachgewiesen werden (Abb. 8D).



**Abb. 8. Expression von NGF und NGF-Rezeptoren durch Tumorzellen**

mRNA-Expression von NGF und den NGF-Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup> in (A) LLC-Zellen und (B) B16/F10-Melanomzellen in jeweils 2 Isolaten (1 und 2). Als Positivkontrolle diente aus dem Gehirn isolierte cDNA (pos). (C) Nachweis der Proteinexpression von TrkA in 2 Proteinisolaten (1 und 2) aus LLC-Zellen und Gehirn (pos) mittels Western Blot. (D) Nachweis der NGF-Sekretion durch LLC- bzw. B16/F10-Zellen nach 24 h mittels ELISA. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM für n = 6 dargestellt.

In diesen initialen *in vitro* Experimenten war sowohl die Expression von NGF und den NGF-Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup> sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisbar. LLC-Zellen und B16-Melanomzellen sind demnach in der Lage, auf einen exogenen NGF-Stimulus die Signaltransduktion über die beiden NGF-Rezeptoren zu initiieren. Durch die Sekretion von NGF können LLC-Zellen ggf. auch autokrine bzw. parakrine Wirkung besitzen.

Sowohl LLC- als auch B16/F10-Zellen exprimieren beide NGF-Rezeptoren. LLC-Zellen synthetisieren und sezernieren im Gegensatz zu B16/F10-Melanomzellen außerdem auch selbst NGF. Deshalb wurden in den folgenden *in vitro* Experimenten LLC-Zellen eingesetzt, da diese nicht nur in der Lage sind, auf einen exogenen NGF-Stimulus zu reagieren sondern die untersuchten Prozesse auch selbst zu regulieren.

### 3.3.2 Vitalität

Zunächst sollte getestet werden, ob NGF die Vitalität *in vitro* kultivierter Tumorzellen beeinflusst. Dazu wurden LLC-Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml rhNGF für 24 h stimuliert. In einem weiteren Ansatz wurde von den Zellen sezerniertes NGF durch die Zugabe von Anti-NGF-AK (1 µg/ml) neutralisiert (2.15.4). Die Konzentration des Anti-NGF-AK wurde in Vorversuchen getestet und war ausreichend, das von LLC-Zellen sezernierte NGF über einen Zeitraum von mindestens 24 h zu neutralisieren. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 10 % (v/v) DMSO inkubiert. Nach 24 h wurde die Zellvitalität durch Substratzugabe mittels *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* der Fa. Promega bestimmt (2.15.4). Dabei bildeten vitale Zellen den Farbstoff Formazan, der 4 h nach Substratzugabe kolorimetrisch bei 490 nm gemessen wurde. Die Absorptionswerte der Negativkontrolle wurden auf 100 % gesetzt und die Werte der unterschiedlichen Stimulationsansätze dazu in Relation gebracht.

Hierbei zeigte sich, dass im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle weder die Stimulation mit NGF (10 ng/ml und 100 ng/ml) noch die Inhibition des von den LLC-Zellen sezernierten NGF durch neutralisierende AK die Zellvitalität beeinflusste. Im Gegensatz hierzu war durch die Zugabe von 10 % (v/v) DMSO eine signifikante Abnahme der Zellvitalität auf etwa 20 % im Vergleich zur Mediumkontrolle zu beobachten. Somit konnte gezeigt werden, dass NGF *in vitro* keinen Einfluss auf die Vitalität der LLC-Zellen ausübt (Abb. 9A).

### 3.3.3 Anoikis

Während der Metastasierung müssen Tumorzellen zunächst die Passage durch die Blutgefäße überleben. Zirkulierende Tumorzellen liegen dabei meist als Einzelzellen vor. Die ist auch bei der i. v. Injektion von LLC-Zellen im Modell der pulmonalen Metastasierung der

Fall. Somit haben die Zellen keine Zell-Zell-Kontakte zu anderen Zellen und unterlaufen den Prozess der Anoikis. Dieser programmierte Zelltod, der durch Verlust von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakten ausgelöst wird, sollte hier *in vitro* getestet werden.

Dazu wurden  $2 \times 10^5$  LLC-Zellen in 6-well Platten ausgesät, die zuvor mit 6 mg/ml polyHEMA beschichtet wurden, um die Adhäsion der Zellen an den Boden der Zellkulturplatten zu verhindern. Die Zellen wurden anschließend für 24 h mit rhNGF (10 ng/ml und 100 ng/ml) stimuliert. In einem weiteren Ansatz wurde endogen gebildetes NGF durch Zugabe eines Anti-NGF-AK (1 µg/ml) neutralisiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit Medium dem 10 % FCS zugesetzt wurden. Als Positivkontrolle wurden Zellen in DMEM-Medium in unbeschichteten Zellkulturplatten mitgeführt. Außerdem wurden als weitere Kontrollansätze Zellen zur Induktion der Apoptose mit 10 % (v/v) DMSO inkubiert. Dies geschah sowohl in polyHEMA-beschichteten als auch in unbeschichteten Zellkulturplatten. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 15 min mit DAPI gefärbt (2.15.5). Zellen, die sich im Prozess der Apoptose bzw. Anoikis befinden, können mittels einer starken DAPI-Fluoreszenz nachgewiesen werden, da apoptotische Zellen eine höhere Zellmembranpermeabilität aufweisen als intakte lebende Zellen. Die Quantifizierung der DAPI-positiven Zellen erfolgte bei einer Wellenlänge von 470 nm mittels FACS-Analyse. Es wurden jeweils 50000 Ereignisse pro Ansatz aufgenommen.

Die Analyse der DAPI-positiven Zellen ergab in der unstimulierten Mediumkontrolle einen Anteil von  $31 \pm 2$  % an apoptotischen Zellen. Die mit rhNGF stimulierten Ansätze und der Ansatz mit Anti-NGF-AK zeigten dazu keine signifikanten Veränderungen. Die in unbeschichteten Platten inkubierte Mediumkontrolle ergab einen signifikant reduzierten Anteil von  $22 \pm 2$  % apoptotischer Zellen im Vergleich zu der in Suspension kultivierten Mediumkontrolle (Abb. 9B).

Die als weitere Kontrollen mit 10 % (v/v) DMSO behandelten Zellen zeigten in unbeschichteten Zellkulturplatten einen Anteil von  $51 \pm 2$  % apoptotischer Zellen und in polyHEMA beschichteten Platten  $59 \pm 3$  % apoptotische Zellen (Daten nicht gezeigt).

Im *in vitro* Anoikis-Test konnte somit kein Einfluss von NGF auf die durch Kontaktverlust induzierte Apoptose der LLC-Zellen nachgewiesen werden. Bei adhärent wachsenden Tumorzellen war, im Vergleich zu den in Suspension kultivierten Zellen, jedoch eine leicht verringerte, wenn auch nicht signifikante Anoikisrate zu beobachten.

### 3.3.4 Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen *in vitro*

Haben metastasierende Tumorzellen *in vivo* ihr Zielorgan erreicht, adhären sie an die EC der Blutgefäße. Um diese Situation nachzustellen, wurde ein *in vitro* Adhäsionstest durchgeführt.

Dazu wurden C166-EC in 12-well Platten ausgesät. Nachdem sie die Konfluenz erreicht hatten, wurden sie für 2 h mit rhNGF (10 ng/ml und 100 ng/ml), Anti-NGF-AK (1 µg/ml) und Anti-VCAM-1-AK (5 µg/ml) als Positivkontrolle stimuliert. Anschließend wurden  $1 \times 10^5$  mit CFSE Fluoreszenz-markierte LLC-Zellen zu den stimulierten C166-EC pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert (2.15.6). Während dieser Zeit adhärten die LLC-Zellen an die EC. Ungebundene Tumorzellen wurden in zwei Waschschritten mit PBS entfernt und die in der Zellkulturplatte adhärten Zellen lysiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität des Zelllysats bei 517 nm gemessen. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der an die EC gebundenen Tumorzellen. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität der Mediumkontrolle auf 100 % gesetzt und die Werte der anderen Ansätze dazu in Relation gebracht.

Die Analyse der nach 30 min an die EC adhärten LLC-Zellen ergab bei den mit rhNGF stimulierten Ansätzen keine Unterschiede zur Mediumkontrolle. Die Inhibition des durch die Tumorzellen sezernierten NGF durch neutralisierende Anti-NGF-AK ergab ebenfalls keine veränderte Adhäsion der Tumorzellen an die C166-EC. Die als Positivkontrolle eingesetzte Blockade des Adhäsionsmoleküls VCAM durch Anti-VCAM-AK führte hingegen zu einer signifikant reduzierten Adhäsion der LLC-Zellen an die kultivierten EC auf  $87,7 \pm 2,1$  % im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle (Abb. 9C).

### 3.3.5 Migration von Tumorzellen *in vitro*

Als Modell für die Transmigration der Tumorzellen durch die endotheliale Barriere wurde ein *in vitro* Transmigrationstest genutzt.

Dazu wurden LCC-Zellen im 12-well-System auf *Transwell*-Filter mit einer Porengröße von 8 µm in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und für 24 h inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen für 5 h mit Zusatz von 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml rhNGF in das untere Kompartiment der Zellkulturplatten. Anschließend wurden die durch die Membran gewanderten Zellen mit einer HE-Färbung angefärbt, die Membranen auf Objektträger überführt und die Anzahl der migrierten Zellen mikroskopisch ausgewertet

(2.15.8). Die Anzahl der in den mit 1 % FCS-Medium inkubierten Ansätzen durch den *Transwell*-Filter gewanderten Zellen wurde als 100 % angegeben und die Werte der anderen Ansätze dazu in Relation gesetzt.

Die Stimulation mit rhNGF hatte keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der LLC-Zellen. Wurden die Zellen jedoch mit 10 % FCS-Medium mit inkubiert, wanderten signifikant mehr Zellen durch die Filter in das untere Kompartiment als in der Mediumkontrolle, die 1 % FCS enthielt (Abb. 9D).

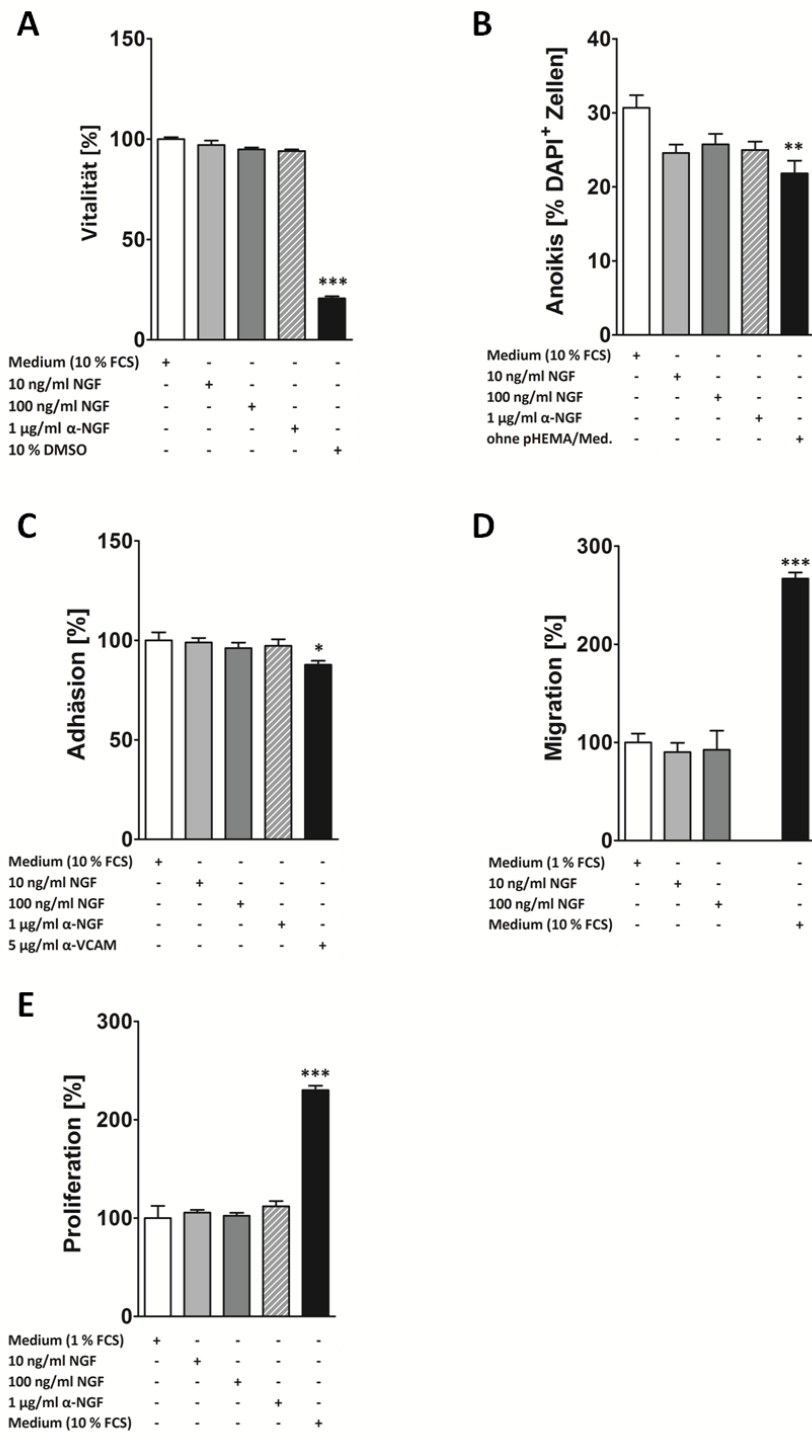
### 3.3.6 Proliferation von Tumorzellen *in vitro*

Beim Prozess der Metastasierung kommt es nach der Extravasation der Tumorzellen ins umliegende Gewebe zur Proliferation der Tumorzellen. Die geringere Metastasierung der Lunge bei NGF-Tg Mäusen könnte somit auf eine reduzierte Proliferation der Tumorzellen in der Lunge zurückzuführen sein.

Um den direkten Effekt von NGF auf die Proliferation von LLC-Zellen *in vitro* zu testen, wurde ein Chemilumineszenz-basierter Proliferationstest durchgeführt, der auf dem Einbau des Pyrimidin-Analogons BrdU in die proliferierenden Zellen während der DNA Synthese beruht. Dazu wurden 100 µl LCC-Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in eine 96-*well* Platte ausgesät und anschließend mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml rhNGF für 24 h stimuliert. Zur Inhibition des von den Tumorzellen sezernierten NGF wurde ein weiterer Ansatz mitgeführt, dem Anti-NGF-AK (1 µg/ml) zugesetzt wurden. Nach 6-stündiger Inkubation wurde BrdU zugegeben. Die Analyse erfolgte nach weiteren 16 h luminometrisch wie in 2.15.9 beschrieben. Die Anzahl der proliferierenden Zellen wurde über die Menge der neu synthetisierten DNA bestimmt, die direkt proportional zum in Lichteinheiten (*relative light units*, rlu) gemessenen BrdU-Einbau ist. Bei der Analyse der Daten wurden die Werte der unstimulierten, in Medium inkubierten Zellen gleich 100 % gesetzt und die Ergebnisse der stimulierten Zellen mit der Kontrolle in Relation gebracht.

Die Auswertung der Daten zeigte, dass die Behandlung der LLC-Zellen mit rhNGF bzw. neutralisierenden Anti-NGF-AK keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen im Vergleich zur mit 1 % FCS-Medium inkubierten Kontrolle hatte. Die Inkubation der Zellen mit Medium mit 10 % FCS-Zusatz führte jedoch zu einer signifikant gesteigerten Proliferation der LLC-Zellen (Abb. 9E).





**Abb. 9. Effekt von NGF auf Tumorzellen (LLC-Zellen) *in vitro*.**

(A) Die Vitalität und (B) die Anoikis von LLC-Zellen wurden 24 h nach Stimulation mit rhNGF bzw. nach Inhibition von sezerniertem NGF untersucht. (C) Die Adhäsion von Fluoreszenz-markierten LLC-Zellen an, für 2 h stimulierte C166-EC wurde nach 30 min analysiert. (D) Auf NGF-Stimulus durch Membranfilter migrierte LLC-Zellen wurden nach 5-stündiger Inkubation quantifiziert. (E) 24 h nach NGF-Stimulation wurde die Proliferation von LLC-Zellen mittels BrdU-ELISA gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von n = 3-4. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; Signifikanz zur Mediumkontrolle (weißer Balken)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *in vitro* kein Effekt von NGF auf Tumorzellen (LLC) nachgewiesen werden konnte. Obwohl LLC-Zellen NGF und die Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup> exprimieren, beeinflusste die Stimulation mit rhNGF weder die Vitalität noch die Anoikis oder die Proliferation der Zellen. Darüber hinaus konnte auch keine chemotaktische Wirkung von NGF auf LLC-Zellen beobachtet werden und die Adhäsion der Tumorzellen an C166-EC blieb unverändert.

### **3.4 Einfluss der lokalen NGF-Überexpression auf die Funktion pulmonaler Blutgefäße**

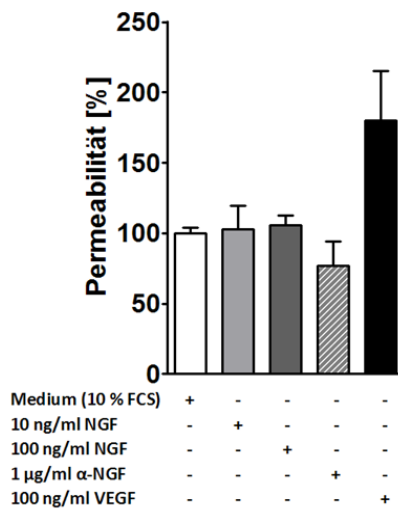
Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die pulmonale Metastasierung in NGF-Tg Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren reduziert ist. Dies ist, wie in den vorausgegangenen Experimenten nachgewiesen werden konnte, nicht auf veränderte lokale Entzündungsprozesse in der Lunge im Endstadium der Metastasierung oder auf direkte NGF-vermittelte Effekte, die die Funktion der Tumorzellen beeinflussen, zurückzuführen. Da die endotheliale Barriere bei der Extravasation der Tumorzellen ins Lungengewebe ein komplexes Hindernis darstellt, sollten nun funktionelle Veränderungen der pulmonalen Blutgefäße näher charakterisiert werden. Dazu wurde zunächst der Einfluss von NGF auf EC *in vitro* getestet und anschließend die Permeabilität pulmonaler Blutgefäße im *ex vivo* Modell sowie die Extravasation von Tumorzellen ins Lungengewebe untersucht.

#### **3.4.1 Endotheliale Permeabilität *in vitro***

Um den Einfluss von NGF auf die Permeabilität von EC *in vitro* zu testen, wurden C166-EC in 12-*well*-Zellkulturplatten auf *Transwell*-Filter mit einer Porengröße von 0,4 µm in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät (2.15.7). Nachdem die EC eine konfluente Zellschicht gebildet hatten, erfolgte die Stimulation der EC für 15 min mit 10 ng/ml und 100 ng/ml rhNGF sowie mit 100 ng/ml VEGF, welches als Positivkontrolle diente, da es die Permeabilität des Endothels fördert. Anschließend wurde in das obere Kompartiment in DMEM-Medium verdünntes FITC-Dextran (Endkonzentration: 1 mg/ml) zugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten (15 min, 30 min, 1 h und 2 h) wurden 100 µl Medium aus dem unteren Kompartiment entnommen und die Fluoreszenzintensität bei 517 nm bestimmt. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zur Konzentration an FITC-Dextran im unteren Kompartiment und somit ein Maß für die Permeabilität der EC-Schicht. Die

Fluoreszenzintensitätswerte der Mediumkontrolle wurden auf 100 % gesetzt und die der unterschiedlichen Stimulationsansätze dazu in Relation gebracht.

Nach Inkubation der EC mit FITC-Dextran für 15 min konnten nur sehr geringe Fluoreszenzintensitäten in den Proben gemessen werden. Die EC-Schicht war somit noch weitgehend intakt und zeigte kaum Permeabilität für FITC-Dextran. Bei den folgenden Analysezeitpunkten (30 min, 1 h und 2 h) wurden steigende FITC-Dextran-Konzentrationen über die Detektion steigender Fluoreszenzintensitäten nachgewiesen. Die Ergebnisse zu den verschiedenen Analysezeitpunkten waren zwischen den Gruppen vergleichbar. So zeigte sich bei rhNGF-stimulierten Ansätzen keine Veränderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle. Auch die Neutralisierung von NGF mittels spezifischer AK hatte keinen Einfluss auf die Permeabilität der EC-Schicht. Nach Stimulation mit 100 ng/ml VEGF war ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Anstieg der FITC-Dextran-Konzentration und somit eine erhöhte Permeabilität nachweisbar. In Abb. 10 sind exemplarisch die Werte für 1 h dargestellt.



**Abb. 10. Effekt von NGF auf die Permeabilität von C166-EC *in vitro*.**

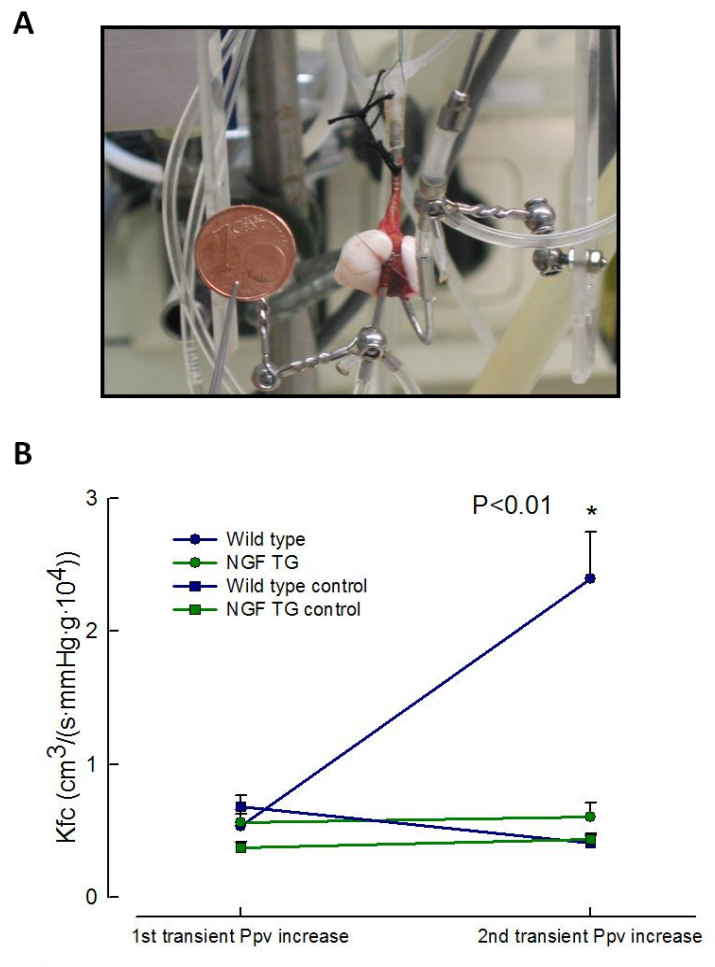
Die Permeabilität von C166-Zellen für FITC-Dextran wurde 1 h nach NGF-Stimulation gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von n = 3.

### 3.4.2 Permeabilitätsmessungen an der isolierten, perfundierten und ventilerten Lunge

Um die Funktionalität der pulmonalen Blutgefäße näher zu charakterisieren, wurde die Permeabilität der Gefäße im *ex vivo* Modell an isolierten, perfundierten und ventilerten Mauslungen untersucht. Die Messungen wurden von der AG Weißmann in Gießen durchgeführt.

Die Lungen von WT- und NGF-Tg Mäusen wurden ohne Unterbrechung der Perfusion und Ventilation aus dem Thorax präpariert und anschließend in ein geschlossenes Zirkulationssystem überführt (Abb. 11A). Bei einer Durchflussrate von 2 ml/min und normoxischer Beatmung wurde der linksarterielle Druck auf 2 mmHg eingestellt und das System zunächst equilibriert. Nachdem ein stabiler Zustand erreicht war, wurden hydrostatische Provokationen (*transient Ppv increase*) durchgeführt, indem der venöse Druck für 8 min auf 7,5 mmHg erhöht wurde. Die Druckmessung erfolgte über Druckfühler in der Pulmonalarterie und dem linken Atrium. Außerdem wurde das Lungengewicht gemessen. Daraus konnte der kapillare Filtrationskoeffizient (*capillary filtration coefficient*,  $K_{fc}$ ) errechnet werden, der als Maß für die Permeabilität der Lungengefäße dient (2.12.6). In dem Versuch wurden die Lungen von WT- und NGF-Tg Mäuse *ex vivo* analysiert. Als Kontrollen dienten die Lungen von WT- und NGF-Tg Tiere, die keinen hydrostatischen Provokationen unterzogen wurden.

Es zeigte sich, dass WT-Tiere bei der 2. hydrostatischen Provokation einen signifikanten Anstieg des  $K_{fc}$  aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigten NGF-Tg Tiere nach hydrostatischer Provokation, genauso wie die nicht provozierten Kontrollgruppen, keinen  $K_{fc}$ -Anstieg. Somit war in den Lungen der WT-Mäuse eine erhöhte vaskuläre Permeabilität nachweisbar, während diese bei Lungen aus NGF-Tg Tieren nicht induziert werden konnte (Abb. 11B).



**Abb. 11. Permeabilität pulmonaler Blutgefäße im *ex vivo* Modell**

(A) Versuchsaufbau des *ex vivo* Modells isolierter, ventilierter und perfundierter Mauslungen. (B) Messung des kapillären Filtrationskoeffizienten ( $K_{fc}$ ) nach hydrostatischer Provokation in Lungen von WT- und NGF-Tg Mäusen.  $n = 6-7$ ,  $*p < 0,05$ .

### 3.4.3 Einfluss von NGF auf die pulmonale Extravasation von LLC-Zellen

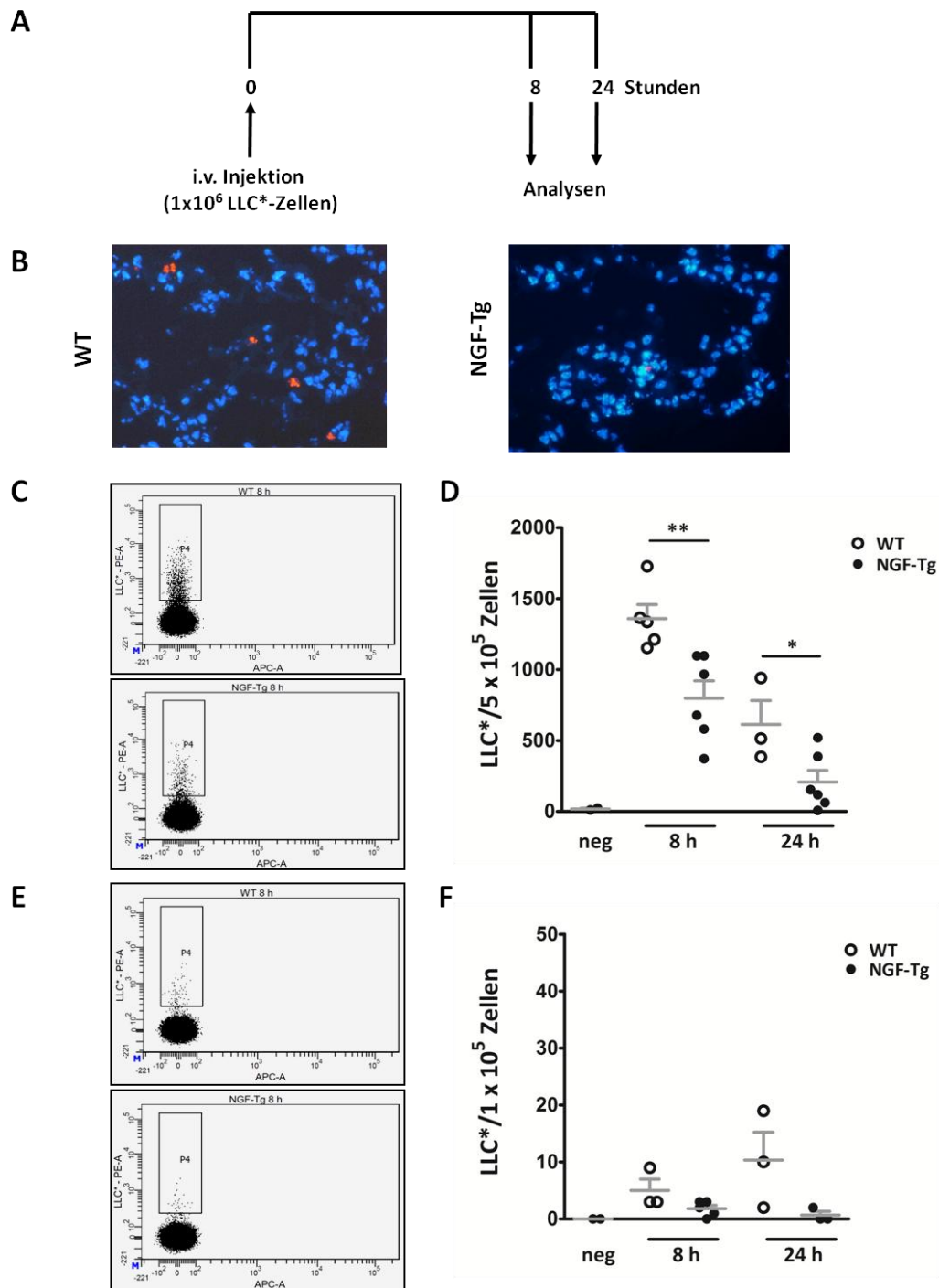
Bei den bisher durchgeführten *in vivo* Experimenten zur pulmonalen Metastasierung handelt es sich um Endpunkt-Analysen. Mit diesen Experimenten konnte jedoch nicht geklärt werden, welcher Abschnitt des Metastasierungsprozesses durch die lokale NGF-Überexpression in NGF-Tg Tieren beeinflusst wird. Es wurde jedoch gezeigt, dass bei NGF-Tg Mäusen die Permeabilität pulmonaler Blutgefäße reduziert ist. Dadurch könnte auch die Extravasation der Tumorzellen aus den Blutgefäßen ins Lungengewebe inhibiert werden.

Um dies zu untersuchen, wurden WT- und NGF-Tg Tieren, wie in den vorausgegangenen Experimenten, LLC-Zellen i. v. injiziert. Die Tumorzellen wurden zuvor mit fluoreszierenden Nanopartikeln (2.12.3) markiert, um sie später mittels FACS-Analyse (2.16.6) sowie histologisch nachweisen zu können. Die Analysen erfolgten 8 h bzw. 24 h nach Injektion der LLC-Zellen (Abb. 12A). Dieser Zeitraum reicht aus, dass die Tumorzellen über das Gefäßsystem in die Lunge wandern, dort adhären und in das Lungengewebe auswandern. Zu den Analysezeitpunkten wurden die Versuchstiere getötet und die Lungen mit PBS-Puffer mit einem Druck von 30 cmH<sub>2</sub>O perfundiert, um das noch vorhandene Blut zu entfernen. Die linke Lungenhälfte wurde aus dem Thorax präpariert und für die Herstellung von Gefrierschnitten weiterverarbeitet (2.13.4.4). Diese wurden vor der mikroskopischen Analyse zur Markierung der Zellkerne für 5 min mit einer DAPI-Lösung gefärbt.

Bei der Fluoreszenz-mikroskopischen Analyse des Lungengewebes konnten Fluoreszenz-markierte LLC-Zellen (LLC\*-Zellen) als orange-rot gefärbte Zellen detektiert werden (Abb. 12B). Die mit DAPI-Lösung gefärbten Zellkerne erscheinen blau. Bei der weiteren Analyse der Gewebeschnitte konnten bei WT-Mäusen deutlich mehr fluoreszierende Tumorzellen nachgewiesen werden als bei NGF-Tg Tieren.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, sollten in die Lunge ausgewanderte LLC-Zellen mittels FACS-Analyse nachgewiesen und quantifiziert werden. Dazu wurde die rechte Lungenhälfte zunächst für 1 h in einer Enzymlösung aus Dispase und DNase I bei 37°C verdaut (2.13.4.2), um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Der Nachweis der LLC\*-Zellen mittels FACS Canto II erfolgte auf Grund der Eigenschaften der Qtracker<sup>®</sup>585-Nanokristalle (Ex/Em 405-545 nm/585 nm) im PE-Kanal (2.16.6). Neben den WT- und NGF-Tg Gruppen, denen LLC\*-Zellen injiziert worden waren, dienten als Negativkontrolle WT-Tiere, denen unmarkierte Tumorzellen injiziert worden waren. Bei der FACS-Analyse wurden aus den Lungenproben  $5 \times 10^5$  Gesamtzellen gemessen.

Zur Auswertung der LLC\*-Zellen wurden die gemessenen Ereignisse als Punktdiagramme (*dot plots*) dargestellt. In Abb. 12C sind exemplarisch *dot plots* für WT-Tiere (oben) und NGF-Tg Tiere (unten) 8 h nach Injektion Fluoreszenz-markierter Tumorzellen gezeigt. LLC\*-Zellen, die im PE-Kanal nachgewiesen wurden, sind im Bereich »P4« abgebildet.



**Abb. 12. Die Extravasation von LLC-Zellen in die Lunge**

(A) Modell zur Extravasation von Tumorzellen in die Lunge. (B) Repräsentative Histologie Fluoreszenz-markierter LLC-Zellen (rot-orange) in DAPI-gefärbten Lungenschnitten (200x). (C) Repräsentative *dot plots* der FACS-Analyse des Lungenhomogenisats von WT- und NGF-Tg Tieren 8 h nach i. v. Injektion von LLC\*-Zellen. (D) Quantitative Auswertung der in die Lunge extravasierten Tumorzellen in den Versuchsgruppen 8 h und 24 h nach i. v. Injektion. (E) Repräsentative *dot plots* der FACS-Analyse des peripheren Bluts von WT- und NGF-Tg Tieren 8 h nach i. v. Injektion von LLC\*-Zellen. (F) Quantitative Auswertung der LLC\*-Zellen im peripheren Blut. Die Werte von n = 3-6 in den Versuchsgruppen und n = 2 in der Kontrollgruppe sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Bei der Analyse des homogenisierten Lungengewebes von WT-Mäusen denen als Negativkontrolle (neg) unmarkierte Zellen injiziert wurden, konnten  $17 \pm 6$  Zellen/ $5 \times 10^5$  Gesamtzellen als Hintergrund gemessen werden. In der Lunge von WT-Tieren konnten 8 h nach Injektion der LLC\*-Zellen  $1359 \pm 100$  fluoreszierende Zellen in  $5 \times 10^5$  ausgezählten Zellen des Lungenhomogenisats nachgewiesen werden. Bei NGF-Tg Mäusen wurden im Vergleich dazu nur  $798 \pm 122$  LLC\*-Zellen in der Zellsuspension detektiert. Dies entspricht, bezogen auf die komplette Lunge, ca. 0,5 - 1 % der injizierten Tumorzellen. Die signifikante Reduktion extravasierter Tumorzellen in der Lunge NGF-Tg Tiere konnte auch noch 24 h nach Tumorzellinjektion beobachtet werden. Zu diesem Analysezeitpunkt waren in der WT-Gruppe  $613 \pm 168$  LLC\*-Zellen in  $5 \times 10^5$  Gesamtzellen nachweisbar, wohingegen in NGF-Tg Tieren nur  $208 \pm 82$  fluoreszierende Tumorzellen in der Gesamtzellsuspension der Lunge detektiert wurden (Abb. 12D).

Um die Frage zu klären, ob bei NGF-Tg Tieren mehr Tumorzellen in der Zirkulation nachweisbar sind, da die Extravasation der Zellen ins Lungengewebe reduziert ist, wurden LLC\*-Zellen im Vollblut nachgewiesen. Dazu wurde den Versuchstieren zu den Analysezeitpunkten Blut aus der *Arteria brachialis* (2.13.1) entnommen und eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Den Blutproben wurde zur Gerinnungshemmung EDTA zugesetzt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung über einen Kieselgelgradienten (Percoll) (2.13.2), um die LLC\*-Zellen anzureichern. Die aufgereinigten Zellen wurden nach 2 Waschschritten in  $500 \mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen und die Fluoreszenz-markierten Tumorzellen analog zu den Lungenproben mittels FACS-Analyse detektiert (2.16.6). Dazu wurden  $1 \times 10^5$  Gesamtzellen ausgewertet.

Repräsentative *dot plots* zeigen Fluoreszenz-markierte LLC-Zellen (»P4«) im aufgereinigten peripheren Blut von WT-Mäusen (oben) und NGF-Tg Tieren (unten) 8 h nach Injektion (Abb. 12E). Bei Kontrolltieren (neg) waren nach Injektion unmarkierter LLC-Zellen, wie erwartet, keine LLC\*-Zellen detektierbar. Die FACS-Analyse der im Blut nachweisbaren LLC\*-Zellen ergab bei WT-Tieren  $5 \pm 2$  markierte Zellen in  $1 \times 10^5$  analysierten Gesamtzellen. Bei NGF-Tg Tieren wurden  $1,8 \pm 0,6$  LLC\*-Zellen detektiert. Bei der Analyse der 24 h nach Injektion gewonnenen Blutproben waren bei WT-Tieren  $10,3 \pm 4,9$  Fluoreszenz-markierte Tumorzellen in  $1 \times 10^5$  Gesamtzellen nachweisbar, bei NGF-Tg Mäusen  $0,7 \pm 0,7$ . (Abb. 12F). Diese Ergebnisse zeigten, dass zu beiden Analysezeitpunkten nur wenige LLC\*-Zellen im Blut nachweisbar waren. Zwischen WT- und NGF-Tg Mäusen wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen.



Somit ergab die Auswertung dieses Experiments eine signifikante Reduktion der pulmonalen Extravasation von LLC-Zellen in NGF-Tg Tieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Anzahl metastasierender Tumorzellen in der Zirkulation sehr gering ist und sich nicht zwischen WT- und NGF-Tg Mäusen unterscheidet.

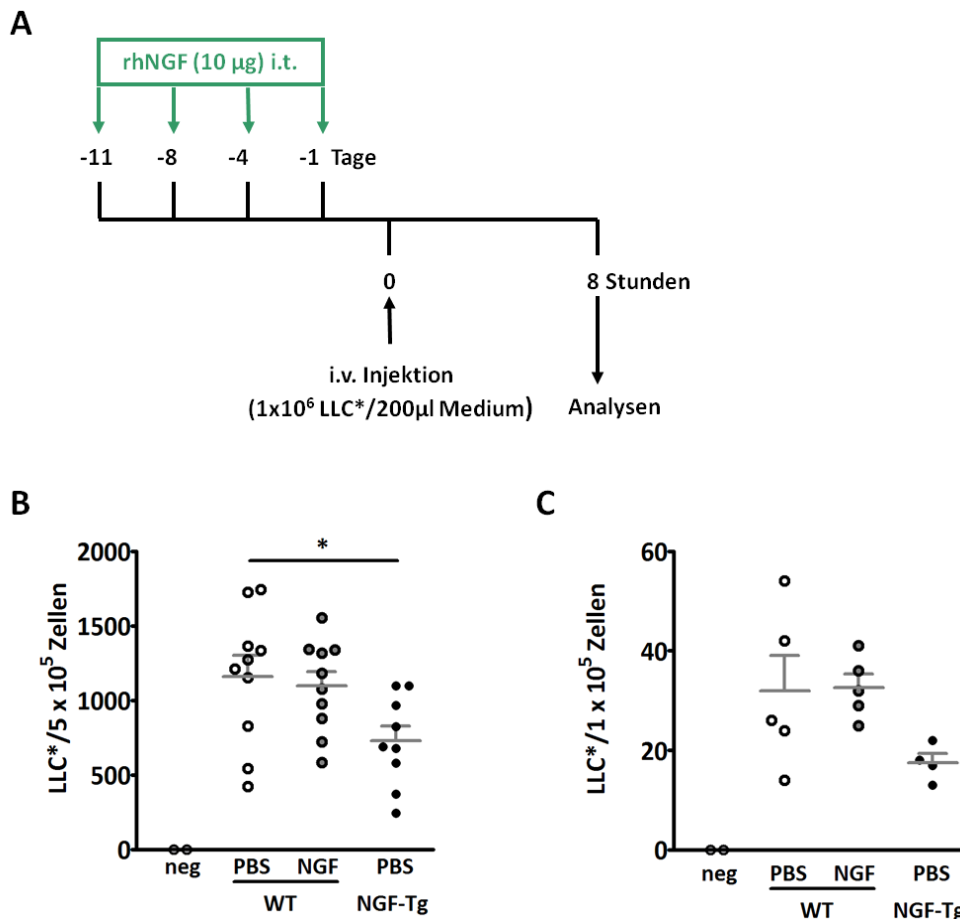
#### **3.4.4 Extravasation von Tumorzellen in die Lunge nach exogener NGF-Applikation**

Im vorangegangenen Versuch konnte die reduzierte Extravasation von Tumorzellen ins Lungengewebe bei NGF-Tg Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren gezeigt werden. Diese verminderte Extravasation kann sowohl durch funktionelle als auch strukturelle Veränderungen der Blutgefäße in NGF-Tg Tieren verursacht werden. Funktionelle Veränderungen sind durch die Einwirkung bestimmter Faktoren innerhalb von Minuten möglich, z. B. durch VEGF, welches die Permeabilität der Blutgefäße erhöht. Strukturelle Veränderungen der Blutgefäße entstehen über einen längeren Zeitraum und gehen häufig mit einem Umbau der EZM einher. In diesem Versuchsteil soll nun geklärt werden, ob die kurzzeitige lokale NGF-Applikation zu funktionellen Veränderungen der pulmonalen Blutgefäße und somit zu einer reduzierten Extravasation von Tumorzellen in die Lunge führt.

Um den direkten und kurzzeitigen Effekt von NGF auf die Extravasation von Tumorzellen in die Lunge zu untersuchen, wurde WT-Tieren i. t. rhNGF verabreicht. Die Applikation von 10 µg rhNGF/Tier erfolgte unter Narkose (2.12.4) an den Tagen -11, -8, -4 und -1, vor i. v. Injektion von  $1 \times 10^6$  LLC\*-Zellen. Fluoreszierende Tumorzellen wurden mittels FACS-Analyse (2.16.6) 8 h nach Injektion der Tumorzellen sowohl im Lungenhomogenisat als auch im peripheren Blut nachgewiesen (Abb. 13A). Als Kontrollgruppen wurden WT-Tiere mitgeführt, denen anstelle von rhNGF PBS i. t. appliziert wurde.

Bei der FACS-Analyse der in die Lunge extravasierten Tumorzellen wurden in den Kontrolltieren (neg), denen unmarkierte LLC-Zellen injiziert wurden keine fluoreszierenden Tumorzellen detektiert. Wurden den Versuchstieren LLC\*-Zellen injiziert, konnten in der Lunge von mit PBS behandelten WT-Tieren  $1160 \pm 140$  fluoreszierende Zellen in  $5 \times 10^5$  Gesamtzellen nachgewiesen werden. In der Lunge von WT-Tieren, denen i.t. rhNGF verabreicht wurde, waren  $1097 \pm 97$  LLC\*-Zellen/ $5 \times 10^5$  Gesamtzellen nachweisbar. Bei NGF-Tg-Mäusen wurden  $728 \pm 100$  LLC\*-Zellen in  $5 \times 10^5$  ausgezählten Zellen der Lungenzellsuspension detektiert. Somit war, wie bereits im vorangegangenen Versuch, eine signifikant erniedrigte Extravasation von Tumorzellen in NGF-Tg-Tieren im Vergleich zu WT-

Mäusen zu beobachten. Die i. t. Behandlung von WT-Mäusen mit rhNGF hatte im Vergleich zu WT-Mäusen, denen zur Kontrolle PBS appliziert wurde jedoch keine reduzierte Extravasation von Tumorzellen in die Lunge zur Folge (Abb. 13B).



**Abb. 13. Extravasation von Tumorzellen in die Lunge nach exogener NGF-Applikation**

(A) Protokoll zur Applikation von NGF im Modell der Extravasation von i. v. injizierten Tumorzellen in die Lunge. (B) Quantitative Auswertung der LLC\*-Zellen im Lungenhomogenisat der Versuchsgruppen 8 h i. v. Injektion mittels FACS-Analyse. (C) Quantitative Analyse von LLC\*-Zellen im peripheren Blut mittels FACS-Analyse 8 h nach i. v. Injektion. Die Werte von n = 9-10 im Lungenhomogenisat, n = 4-5 im peripheren Blut und n = 2 in der Kontrollgruppe sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*p < 0,05.

Auch im peripheren Blut unterschied sich die Anzahl der nachgewiesenen LLC\*-Zellen zwischen diesen beiden Versuchsgruppen nicht. So konnten bei mit PBS behandelten WT-Tieren  $32 \pm 7$  fluoreszierende Zellen in  $1 \times 10^5$  analysierten Gesamtzellen detektiert werden. Bei WT-Mäusen, die i. t. mit rhNGF behandelt wurden, waren  $33 \pm 3$  LLC\*-Zellen/ $1 \times 10^5$  Gesamtzellen nachweisbar. Die Gruppe der NGF-Tg-Tiere zeigte bei der Analyse Werte von  $18 \pm 2$  LLC\*-Zellen in  $1 \times 10^5$  Gesamtzellen. Bei negativen Kontrolltieren (neg) waren keine fluoreszierenden Tumorzellen nachweisbar (Abb. 13C).

Wie schon im vorausgegangenen Experiment zeigten auch die in diesem Experiment gewonnenen Daten eine signifikant verringerte Anzahl an Tumorzellen in den Lungen NGF-Tg Tiere im Vergleich zu WT-Tieren. Die kurzzeitige exogene lokale NGF-Applikation führte jedoch nicht zu einer reduzierten Tumorzellzahl in der Lunge von WT-Tieren. Die Anzahl metastasierender Tumorzellen in der Zirkulation war wiederum sehr gering und zeigte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

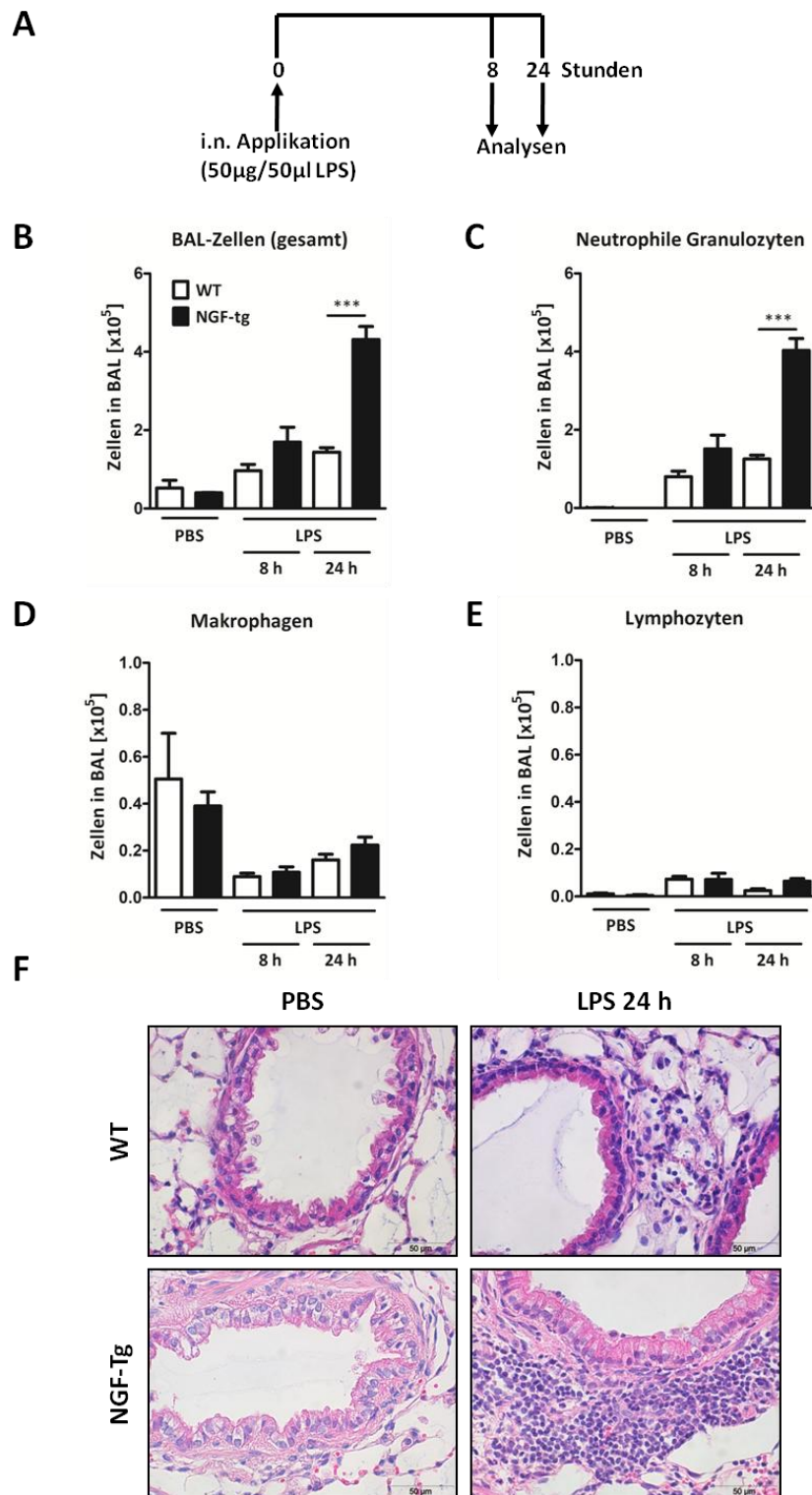
### **3.4.5 Extravasation von Immunzellen im Modell der akuten Atemwegsentzündung**

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass zum einen die Permeabilität pulmonaler Gefäße in NGF-Tg-Mäusen und zum anderen die Extravasation von LLC-Zellen in die Lunge NGF-Tg Tiere im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant verringert ist. Auch bei Entzündungsprozessen müssen Immunzellen, die über die Blutgefäße in das Gewebe rekrutiert werden, die endotheliale Barriere überwinden. Mit Hilfe des folgenden *in vivo* Experiments sollte geklärt werden, ob die verringerte Permeabilität pulmonaler Blutgefäße in NGF-Tg Mäusen generell die Extravasation verschiedener Zelltypen inhibiert, oder dieser Effekt auf Tumorzellen beschränkt ist. In diesem Kontext wurde die Extravasation von Immunzellen in die Lunge untersucht.

Dazu wurden WT- und NGF-Tg Tiere einem LPS-induzierten Modell der akuten Atemwegsentzündung unterzogen, bei dem WT- und NGF-Tg Versuchstieren eine LPS-Lösung (1 mg/ml) i. n. verabreicht wurde (2.12.5). Zur Kontrolle wurde WT- und NGF-Tg Mäusen PBS i. n. appliziert. Nach 8 h bzw. 24 h wurden die Mäuse präpariert und die Analysen durchgeführt (Abb. 14A). Zunächst wurde eine BAL (2.13.3) für die differenzielle Zellanalyse (2.13.3.2, 2.13.3.3) gewonnen. Für die histologischen Analysen wurde die Lunge über die Trachea mit 6%iger PFA-Lösung gefüllt (2.13.4.1), 24 h fixiert, in Agarose und anschließend in Paraffin eingebettet (2.13.4.3) und die Gewebeschnitte nach der HE-Methode angefärbt, um die Beurteilung des entzündlichen Infiltrats im Lungengewebe zu ermöglichen (2.14.1).

Die Analyse der Gesamtzellzahl in der BAL ergab 8 h nach Induktion der akuten Atemwegsentzündung durch LPS-Applikation noch keinen deutlichen Influx von Immunzellen. So konnten bei WT-Kontrolltieren, denen PBS i. n. appliziert wurde,  $0,520 \pm 0,200 \times 10^5$  Leukozyten/ml in der BAL nachgewiesen werden und bei PBS-behandelten NGF-Tg Mäuse  $0,400 \pm 0,010 \times 10^5$  Leukozyten/ml. In WT-Mäusen wurden 8 h

nach der LPS-Applikation  $0,963 \pm 0,162 \times 10^5$  Zellen/ml gemessen. Bei NGF-Tg Tieren lag die Gesamtzellzahl in der BAL nach LPS Gabe bei  $1,692 \pm 0,383 \times 10^5$  Leukozyten/ml. Zum zweiten Analysezeitpunkt, 24 h nach Induktion der Atemwegsentzündung, zeigten WT-Tiere einen signifikanten Einstrom von Entzündungszellen auf  $1,438 \pm 0,112 \times 10^5$  Zellen/ml. Die Zahl der Immunzellen in der BAL von NGF-Tg Tieren stieg 24 h nach LPS-Gabe auf  $4,317 \pm 0,330 \times 10^5$  Zellen/ml an und war somit im Vergleich zu WT-Tieren zum gleichen Analysezeitpunkt signifikant erhöht (Abb. 14B). Die Bestimmung der einzelnen Immunzellpopulation in der BAL zeigte, dass dieser Anstieg durch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten verursacht wurde, deren Anzahl 24 h nach Induktion einer akuten Atemwegsentzündung bei NGF-Tg Mäusen mit  $4,028 \pm 0,308 \times 10^5$  Zellen/ml im Vergleich zu WT-Tieren mit  $1,254 \pm 0,098 \times 10^5$  Zellen/ml signifikant erhöht war. Während bei unbehandelten WT- und NGF-Tg Kontrolltieren keine neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnten, waren 8 h nach LPS-Applikation in WT-Tieren  $0,801 \pm 0,142 \times 10^5$  Zellen/ml und bei NGF-Tg Tieren  $1,511 \pm 0,351 \times 10^5$  Zellen/ml in der BAL detektierbar (Abb. 14C). Die Anzahl der Makrophagen (Abb. 14D) und Lymphozyten (Abb. 14E) in der BAL waren erwartungsgemäß sehr gering. Jedoch war bei der quantitativen Analyse der Makrophagen eine signifikante Reduktion 8 h und 24 h nach LPS-Behandlung bei WT-Tieren im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren und bei NGF-Tg Tieren 8 h nach Induktion der Atemwegsentzündung nachweisbar. Die Anzahl der Makrophagen betrug bei unbehandelten WT-Tieren  $0,505 \pm 0,195 \times 10^5$  Zellen/ml und  $0,390 \pm 0,060 \times 10^5$  Zellen/ml bei PBS behandelten NGF-Tg Kontrolltieren. In der BAL wurden 8 h nach LPS-Gabe  $0,090 \pm 0,014 \times 10^5$  Makrophagen/ml bei WT-Tieren und  $0,108 \pm 0,023 \times 10^5$  Makrophagen/ml bei NGF-Tg Mäusen nachgewiesen. 24 h nach Induktion der akuten Atemwegsentzündung wurden bei WT-Tieren  $0,160 \pm 0,024 \times 10^5$  Makrophagen/ml in der BAL detektiert. Bei NGF-Tg Tieren lag die Anzahl der Makrophagen bei  $0,224 \pm 0,034 \times 10^5$  Zellen/ml. Die statistische Analyse der Lymphozytenzahlen in der BAL ergab keine signifikanten Unterschiede. So wurden in den unbehandelten Kontrollgruppen bei WT-Mäusen  $0,010 \pm 0,004 \times 10^5$  Lymphozyten/ml und bei NGF-Tg Mäusen  $0,004 \pm 0,004 \times 10^5$  Lymphozyten/ml nachgewiesen. Die Lymphozytenzahl betrug 8 h nach LPS-Applikation bei WT-Mäusen  $0,073 \pm 0,011 \times 10^5$  Zellen/ml und bei NGF-Tg Mäusen  $0,071 \pm 0,026 \times 10^5$  Zellen/ml. Auch 24 h nach Induktion der akuten Atemwegsentzündung mittels LPS waren die Lymphozytenzahlen mit  $0,024 \pm 0,008 \times 10^5$  Zellen/ml bei WT-Tieren und  $0,065 \pm 0,011 \times 10^5$  Zellen/ml bei NGF-Tg Tieren nahezu unverändert.



**Abb. 14. Extravasation von Immunzellen im Modell der akuten Atemwegsentzündung**

(A) Protokoll zur Induktion der akuten Atemwegsentzündung. Bestimmung der (B) Gesamtzellzahl in der BAL von WT- und NGF-Tg Mäusen sowie (C) neutrophiler Granulozyten, (D) Makrophagen und (E) Lymphozyten. (B-E: weiße Balken WT, schwarze Balken NGF-Tg (F) Repräsentative HE-Färbungen von Lungenschnitten von WT- und NGF-Tg Tieren (400x). Die Werte von  $n = 5$  sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*\* $p < 0,001$ .

Neben der Analyse der BAL wurde auch das Lungengewebe 24 h nach LPS-Gabe histologisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl WT- als auch NGF-Tg Mäuse im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren ein perivaskuläres und peribronchiales Infiltrat aufwiesen (Abb. 14F). Die Infiltration mit Entzündungszellen war bei NGF-Tg Tieren jedoch deutlich stärker ausgeprägt als bei WT-Tieren.

Insgesamt konnte im Modell der akuten, LPS-induzierten Atemwegsentzündung bei NGF-Tg Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren, ein signifikant erhöhter Einstrom neutrophiler Granulozyten ins Lungengewebe und die Atemwege nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen, dass im Gegensatz zur verringerten Extravasation von Tumorzellen die Infiltration der Lunge durch inflammatorische Zellen in NGF-Tg Tieren erhöht war.

## 4 DISKUSSION

Die pulmonale Metastasierung stellt bei neoplastischen Erkrankungen eine häufige Komplikation dar. So können bei ca. 50 % der an Krebserkrankungen gestorbenen Patienten bei einer Obduktion Metastasen in der Lunge nachgewiesen werden. Da die pulmonale Metastasierung mit einer schlechten Prognose für den Patienten einher geht, tritt die Entschlüsselung der komplexen Mechanismen, die der Metastasierung zu Grunde liegen immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. In diesem Zusammenhang sollte die Rolle des Neurotrophins NGF bei der Ausbildung pulmonaler Metastasen untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, entgegen der initialen Hypothese, NGF-Tg Mäuse im Modell weniger pulmonale Metastasen ausbilden als WT-Tiere (4.1). In NGF-Tg Tieren war dabei eine tendenziell erhöhte Infiltration des Tumorgewebes mit Immunzellen zu beobachten, wobei weitere Entzündungsparameter unverändert blieben. Eine gesteigerte Entzündungsneigung NGF-Tg Tiere wurde außerdem in einem Modell der akuten Atemwegsentzündung bestätigt (4.2). Als Ursache für die reduzierte pulmonale Metastasierung in NGF-Tg Mäusen konnte die direkte Wirkung von NGF auf Tumorzellen durch funktionelle *in vitro* Experimente weitgehend ausgeschlossen werden (4.3). Weitere Daten lassen darauf schließen, dass Veränderungen der pulmonalen Blutgefäße in NGF-Tg Mäusen zur verringerten Metastasierung beitragen. So konnte die reduzierte Permeabilität der Blutgefäße sowie die verringerte Extravasation von Tumorzellen in die Lunge nachgewiesen (4.4).

### 4.1 Verminderte pulmonale Metastasierung in NGF-Tg Mäusen

Die Bildung von Metastasen ist durch die Abfolge voneinander abhängiger Prozesse charakterisiert. Zunächst wandern Zellen des Primärtumors in das umliegende Gewebe ein, penetrieren die Blutgefäße (Intravasation) und werden anschließend über den Blutkreislauf in entfernte Organe transportiert. Dort adhären die metastasierenden Zellen an die Kapillarwände und migrieren ins Parenchym des Zielorgans (Extravasation). Anschließend wird die Proliferation der Tumorzellen initiiert, was zur Entstehung metastatischer Kolonien führt.

Während der Kolonisation interagieren die metastasierenden Zellen mit verschiedenen Komponenten des lokalen Gewebes. Diese Kontakte sind für das weitere Schicksal der ins Parenchym des Zielorgans eingewanderten Tumorzellen mitverantwortlich. So können die Zellen im Allgemeinen in drei Richtungen beeinflusst werden. Dies sind die Apoptose der Tumorzellen, eine vorübergehende Ruhephase oder die sofortige Initiierung der Proliferation der Zellen. Für das Überleben und die Proliferation der metastasierenden Zellen sind u. a. Interaktionen zwischen den Zellen und Komponenten der EZM verantwortlich. Die Bindung von Integrinen auf Tumorzellen an Liganden der EZM führt beispielsweise zur Aktivierung von Signalkaskaden, die die Proliferation der Zellen fördern. Dabei können durch die Integrin-Bindung direkt Signalproteine wie die *focal adhesion kinase* (FAK) aktiviert werden (Shibue and Weinberg, 2009). Integrine können auch die Signaltransduktion über Wachstumsfaktor-Rezeptoren beeinflussen, indem sie die Liganden-abhängige Signalweiterleitung verstärken. Dies kann z. B. über TGF- $\beta$  oder VEGF erfolgen, die von verschiedenen Zellen und EZM-Komponenten produziert werden. Auch die Sekretion von Proteasen, z. B. MMP, durch die Tumorzellen führt zur teilweisen Prozessierung der EZM und zur Abspaltung Membran-gebundener Wachstumsfaktoren, die wiederum das Überleben und die Proliferation der extravasierten Tumorzellen fördern (Lee et al., 2005; Alcantara und Dass, 2013).

Wie in 1.4.4 beschrieben, wird die Rolle von NGF sowie die Expression der Rezeptoren TrkA oder p75<sup>NTR</sup> bei verschiedenen neoplastischen Erkrankungen kontrovers diskutiert. Einige Arbeiten lassen jedoch darauf schließen, dass NGF, als Wachstumsfaktor, die Bildung und Progression von Lungenmetastasen begünstigt. Die z. T. gleichzeitige Expression der NT sowie ihrer Rezeptoren bei verschiedenen Lungentumoren legen nahe, dass NT ihre Effekte sowohl über autokrine als auch über parakrine Mechanismen vermitteln (Ricci et al., 2005; García-Suárez et al., 2009). So fördert die Stimulation humaner Lungenkarzinomzellen mit NGF und BDNF deren Überleben. Gleichzeitig induziert die Inhibition des Trk-Signalweges die Apoptose dieser Zellen (Perez-Pinera et al., 2007).

Allerdings sezernieren nicht nur die Tumore selbst NGF, sondern auch Strukturzellen der Lunge, Atemwegsepithelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten und EC (Lambiase et al., 2000; Micera et al., 2001; Olgart Hoglund et al., 2002; Freund et al., 2002). Es ist also auch denkbar, dass das von Strukturzellen der Lunge sezernierte NGF die Progression der pulmonalen Metastasierung zusätzlich vorantreiben kann.



In einem initialen Experiment der pulmonalen Metastasierung wurde eine erhöhte NGF-Konzentration in der BALF von WT-Mäusen gemessen, die nach LLC-Injektion Metastasen in der Lunge ausgebildet hatten (Abb. 4C). Die Annahme, dass die erhöhte NGF-Konzentration die Metastasierung und das Tumorstadium vorantreibt, sollte unter Einsatz der NGF-Tg Maus, die NGF im Atemwegsepithel überexprimiert, bestätigt werden. Wenn die lokale NGF-Überexpression in der NGF-Tg Maus die Metastasierung zusätzlich fördert, wären in NGF-Tg Tieren mehr, bzw. größere pulmonale Metastasen zu erwarten gewesen als in WT-Tieren.

Das Modell der pulmonalen Metastasierung wurde außer mit LLC-Zellen noch mit einer zweiten Tumorzelllinie, den B16/F10-Melanomzellen durchgeführt, um auszuschließen, dass die im LLC-Modell beobachteten Ergebnisse auf Tumorzell-spezifische Mechanismen zurückzuführen sind. Neben LLC-Zellen werden auch B16/F10-Melanomzellen im Modell der pulmonalen Metastasierung eingesetzt (Parlakian et al., 2010). Dies basiert auf dem Hintergrund, dass Melanome als hochgradig metastasierend eingestuft werden und häufig Leber, Lunge und Gehirn befallen. Im Gegensatz zu LLC-Zellen, die ursprünglich einem spontan aufgetretenen Lungentumor in C57BL/6 Mäusen entstammen, wurden B16/F10-Zellen aus einem Melanom des gleichen Mausstammes isoliert. Melanome entwickeln sich aus Melanozyten, bei denen die Expression aller NT und NT-Rezeptoren außer TrkC nachgewiesen wurde (Marconi et al., 2003; Marconi et al., 2006). Auch humane Melanomzelllinien exprimieren NT und NT-Rezeptoren. Bei diesen Zellen führte die Inhibition der Trk-Rezeptoren zu einer reduzierten Proliferation *in vitro*, wohingegen die Stimulation der Melanomzellen mit NGF, BDNF, NT-3 bzw. NT-4 deren Migrationsfähigkeit steigerte (Truzzi et al., 2008). Demzufolge war in NGF-Tg Tieren auch im B16/F10-Modell eine gesteigerte pulmonale Metastasierung zu erwarten gewesen.

In dieser Arbeit konnte jedoch sowohl im LLC-Modell als auch im B16/F10-Modell gezeigt werden, dass die experimentelle pulmonale Metastasierung in NGF-Tg Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren signifikant reduziert war. So konnten bei NGF-Tg Tieren in beiden Modellen makroskopisch weniger Metastasen an der Lungenoberfläche sowie ein verringertes Metastasenwachstum im Lungengewebe mikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 5).

Da die Experimente sowohl mit LLC-Zellen als auch mit B16/F10-Zellen das gleiche Ergebnis zeigten, wird davon ausgegangen, dass es sich bei der verminderten Metastasierung der Lunge in NGF-Tg Mäusen um einen Mechanismus handelt, der unabhängig von der primären Herkunft der Tumorzellen ist. Die folgenden Experimente wurden deshalb nur mit einer

Tumorzelllinie, den LLC- Zellen, durchgeführt, da diese ursprünglich aus der Lunge isoliert wurden.

Da NGF-Tg Tiere bereits vor der Geburt NGF im Atemwegsepithel unter dem CCSP-Promotor überexprimieren, können indirekte NGF-Effekte auf die pulmonale Metastasierung nicht ausgeschlossen werden. Durch die lokale exogene NGF-Applikation in die Lunge sollte deshalb die direkte und kurzfristige Wirkung von NGF auf die Metastasierung in WT-Tieren untersucht werden. In dem hier eingesetzten Mausmodell der pulmonalen Metastasierung bei dem den Versuchstieren die Tumorzellen i. v. injiziert wurden, konnten die einzelnen Schritte der Metastasierung (1.2) ab der Zirkulation der Tumorzellen in den Blutgefäßen experimentell abgebildet werden. Dabei sind das Überleben der Tumorzellen in der Zirkulation, der Arrest in den Zielorganen und die Extravasation der metastasierenden Zellen ins Lungengewebe Prozesse, die innerhalb weniger Stunden ablaufen (Weis et al., 2004; Hu, 2006; und eigene Experimente). Jedoch sind auch i. t. applizierte Proteine (abhängig von Molekulargewicht und hydrophoben Eigenschaften) innerhalb weniger Stunden systemisch nachweisbar (Patton et al., 2004). In dieser Arbeit wurde rhNGF 3 h vor Injektion der Tumorzellen appliziert. Auf Grund der Eigenschaften von NGF ist anzunehmen, dass es bis zur Injektion der Tumorzellen bereits in die Blutgefäße diffundiert ist und somit einen Einfluss auf die frühen Prozesse der Metastasierung ausüben kann.

Die Versuchstiere (WT) wurden viermal über einen Zeitraum von zwei Wochen i. t. mit rhNGF behandelt. Anhand der Analyse der Oberflächenmetastasen sowie des Metastasenvolumens konnte jedoch keine signifikant verminderte Metastasierung der Lunge im Vergleich zu mit PBS behandelten WT-Tieren nachgewiesen werden (Abb. 6). Es wird davon ausgegangen, dass das über den gesamten Versuchszeitraum applizierte rhNGF ausgereicht hat, um eine ähnlich hohe Konzentration wie in der NGF-Tg Maus zu gewährleisten. Deshalb kann aus dem Ergebnis geschlossen werden, dass NGF während der letzten Schritte der Metastasierung, nämlich der Entstehung von Mikrometastasen und der anschließenden Ausbildung makroskopisch detektierbarer Metastasen, nur eine untergeordnete Rolle zukommt. Somit sind NGF-induzierte Mechanismen, die das Überleben der Tumorzellen im Lungengewebe sowie deren Proliferation oder Apoptose steuern, weitgehend auszuschließen. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Vitalitäts- bzw. Proliferationstests gestützt (3.3.2, 3.3.6).

Mit diesen bisher durchgeführten Experimenten wurde die initiale Hypothese, dass NGF die pulmonale Metastasierung fördert, komplett widerlegt. Sowohl NGF als auch die NGF-Rezeptoren werden jedoch nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von vielen Struktur- und Entzündungszellen exprimiert, welche am Prozess der Metastasierung beteiligt sind. Die Zielzellen, auf die NGF während der pulmonalen Metastasierung wirken kann, sind u. a. die Tumorzellen selbst, Immunzellen und EC. Da NGF je nach Zelltyp und/oder Rezeptorexpression auch gegensätzliche Effekte vermitteln kann, ist es denkbar, dass NGF, welches bekanntermaßen immun-modulatorische Eigenschaften besitzt eine tumorhemmende Entzündungsreaktion begünstigt (Nockher und Renz, 2006). Des Weiteren sollte der direkte Einfluss von NGF auf verschiedene Funktionen der Tumorzellen *in vitro* getestet und die Wirkung von NGF auf die pulmonalen Blutgefäße untersucht werden.

## **4.2 Geringe Ausprägung einer lokalen Entzündungsreaktion im Endstadium der pulmonalen Metastasierung**

Krebserkrankungen werden häufig von Entzündungsreaktionen begleitet, die entweder zur Tumorprogression oder zur Tumorregression beitragen können. In Tumoren und in deren Umgebung wurden sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen, MDSC, DC und NK-Zellen) als auch Zellen des adaptiven Immunsystems (T- und B-Lymphozyten) nachgewiesen. Außerdem tragen auch die Zellen des Stromas (u. a. Fibroblasten, EC, Perizyten und mesenchymale Zellen) sowie die Tumorzellen selbst zum Entzündungsgeschehen bei. So kann jeder Schritt während der Tumorentstehung und der -progression durch die Interaktion der verschiedenen Zellen beeinflusst werden. Dabei kommunizieren die Zellen entweder direkt über Zell-Zell-Kontakte miteinander oder über die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren oder Proteasen.

Nur wenige zirkulierende Tumorzellen überleben die Passage durch die Blutgefäße. Jedoch existieren bereits während dieser frühen Phase der Metastasierung immunologische Prozesse, die die erfolgreiche Ausbreitung metastasierender Zellen begünstigen. So kann z. B. die Expression der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 das Überleben der Zellen fördern (Yu et al., 2013; Liao et al., 2013). Aber auch die direkte Interaktion der Tumorzellen mit Makrophagen oder Thrombozyten schützen die metastasierenden Zellen vor Angriffen durch NK-Zellen (Palumbo et al., 2005; Dovas et al., 2012). Außerdem wird die Migration der Tumorzellen

bzw. die Wahl des Metastasierungsortes häufig durch Chemokine wie CXCR4, CCR4, CCR7 und CCR9 mit beeinflusst. Auch die Expression der Adhäsionsmoleküle wird durch pro-inflammatorische Zytokine oder Immunzellen reguliert. So steigert TGF- $\beta$  beispielsweise die Expression von Angptl4, welches wiederum die Integrin-abhängige Adhäsion der Tumorzellen an EC vermittelt (Padua et al., 2008; Li et al., 2011).

Sind die metastasierenden Tumorzellen in das Gewebe des Zielorgans ausgewandert, überwiegt dort zunächst meist ein Tumor-supprimierendes Milieu. So werden maligne Zellen, welche *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) exprimieren, von DC und Makrophagen über *pattern recognition receptors* (PRR) erkannt. Dadurch wird die Freisetzung pro-inflammatorischer Faktoren, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 sowie IL-23 induziert. Daraus resultiert die Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen. DC phagozytieren apoptotische Tumorzellen und wandern anschließend in die regionalen Lymphknoten, um dort prozessierte Tumorpeptide an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu präsentieren. Die aktivierten T-Zellen, wie z. B. CD8<sup>+</sup> CTL, wandern dann auf einen Chemokinstimulus (z. B. CCL2 und CCL3) hin in die Tumore ein, um diese zu bekämpfen (Nakasone et al., 2012). Bei kolorektalen und hepatozellulären Karzinomen, Mammakarzinomen sowie Melanomen ist auch die Expression der Chemokine CCL5 bzw. CCL7 beschrieben. CCL5 wird von einer Vielzahl von Zellen, z. B. T-Zellen, Epithelzellen und Tumorzellen exprimiert und wirkt chemotaktisch auf NK-Zellen und DC, aber auch auf Tumorzellen, die den CCR5-Rezeptor exprimieren. CCL7, das v. a. von Makrophagen und Tumorzellen exprimiert wird, fördert die Rekrutierung von Monozyten und NK-Zellen ins Tumorgewebe. (Bailey et al., 2007; Soria und Ben-Baruch, 2008; Harlin et al., 2009; Charni et al., 2009; Cho et al., 2012). Eingewanderte NK-Zellen und CTL induzieren anschließend zum einen über die Freisetzung löslicher Granzyme und Perforine und zum anderen über den Fas-Signalweg die Apoptose maligner Zellen (Nagata, 1997). Auch der Nachweis von CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen wurde in Kolonkarzinomen, Melanomen und Pankreaskarzinomen mit einer gesteigerten Überlebensrate der Patienten assoziiert (Galon et al., 2006; Swann and Smyth, 2007; Laghi et al., 2009).

Bereits etablierte Tumore haben jedoch Abwehrmechanismen entwickelt, die sie vor den Angriffen des Immunsystems schützen. So verändert sich das Mikromilieu während der Tumorprogression. Vorherrschende Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren sind hier GM-CSF, CCL2, CCL20, CXCL5, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-8, IL-10 und IL-23. Die pro-tumorigene Entzündung ist außerdem gekennzeichnet durch einen *switch* des Tumor-suppressiven Th1-

Phänotyps der CD4<sup>+</sup> Zellen, der u. a. die cytotoxische Aktivität der CTL unterstützt, zu einem Th2-Phänotyp. Th2-Zellen dienen über die Expression der Zytokine IL-4, IL-5, und IL-13 der Etablierung eines pro-tumorigenen Milieus. Besonders Mamma- und Pankreaskarzinome sind häufig mit Th2-Zellen infiltriert, was mit einer schlechteren Prognose für den Patienten in Verbindung gebracht wird (Aspord et al., 2007; Monte et al., 2011). Analog dazu werden auch Makrophagen in einen anti-tumorigenen M1- und einen pro-tumorigenen M2-Phänotyp eingeteilt. M2-Makrophagen werden durch die Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 induziert und exprimieren in Folge v. a. das anti-inflammatorisch wirkende IL-10, aber auch VEGF und EGF. Dadurch werden u. a. die Tumorangiogenese und die Metastasierung von z. B. Mammakarzinomzellen gefördert (Lin et al., 2007; Ruffell et al., 2012). Große Beachtung kommt aktuell auch Tumor-assoziierten neutrophilen Granulozyten (*tumor associated neutrophils*, TAN) zu. Generell sind neutrophile Granulozyten in der Maus durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD11b und Ly6G charakterisiert und werden durch die Chemokine CXCL1 und CXCL2 und die Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  ins Gewebe rekrutiert (Kobayashi, 2008; McDonald und Kubes, 2010). TAN lassen sich, wie T-Zellen und Makrophagen, in einen anti-tumorigenen, pro-inflammatorischen N1-Phänotyp und einen pro-tumorigenen, anti-inflammatorischen N2-Phänotyp einteilen. Fridlender et al. führen dies nicht auf ein differenzielles Genexpressionsprofil zurück, sondern auf einen höheren Aktivierungsgrad der N1-TAN. Somit produzieren N1-TAN die gleichen Mediatoren (u. a. die Chemokine CCL2, -3, -4, und -8 sowie CXCL1 und -2) wie N2-TAN, jedoch in höheren Konzentrationen (Fridlender und Albelda, 2012). Ein Chemokin, das jedoch in N2-TAN höher exprimiert vorliegt ist CCL17, welches die Rekrutierung von Treg-Zellen fördert und somit die pro-tumorigene Immunantwort.

Während einer akuten Entzündungsreaktion werden neutrophile Granulozyten, nachdem sie ihre phagozytotische Funktion ausgeführt haben, innerhalb von 72 h durch Apoptose eliminiert. Durch das pro-tumorigen wirkende GM-CSF, welches chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt, wird außerdem die Überlebenszeit der Zellen gesteigert und somit die pro-tumorigene Entzündung verstärkt (Khajah et al., 2011).

Das pro-tumorigene Milieu begünstigt außerdem die Rekrutierung immun-suppressiver Zellen, wie Treg-Zellen und MDSC. Naive T-Zellen differenzieren über TGF- $\beta$  und IL-2 zu Treg-Zellen. Diese sind über die Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 sowie den Transkriptionsfaktor Foxp3 charakterisiert. Über die Sekretion der Zytokine TGF- $\beta$ , IL-35 und IL-10 unterstützen sie zum einen das immun-suppressive, pro-tumorigene Milieu und

können außerdem über die Produktion von Perforin und Granzymen cytolytisch wirken. Treg-Zellen konnten außerdem bei Lungentumoren sowohl bei Patienten als auch im Tiermodell häufig nachgewiesen werden (Woo et al., 2002; Petersen et al., 2006; Granville et al., 2009).

Weitere häufig detektierte Suppressorzellen sind die MDSC, die von unreifen granulozytischen oder monozytischen Zellen abstammen. Ihre Entwicklung wird durch IL-3, GM-CSF, Prostaglandin 2 (PGE<sub>2</sub>) sowie den *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) stimuliert (Pauleau et al., 2004; Morris, 2004; Rodriguez et al., 2005). MDSC können über verschiedene Mechanismen gegen den Tumor gerichtete Immunantworten inhibieren. Zum einen produzieren sie reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), welches den T-Zell-Rezeptor CD3 $\zeta$  und somit die Funktion der T-Zellen hemmen. Über die Sekretion des Enzyms Arginase-1 und der daraus resultierenden Spaltung der Aminosäuren Arginin und Cystein werden T-Zellen außerdem essentielle Faktoren für deren Aktivierung und Proliferation entzogen (Rodriguez et al., 2004; Ezernitchi et al., 2006).

Die Bedeutung einer lokalen Entzündungsreaktion in verschiedenen Modellen der pulmonalen Metastasierung konnte bereits gezeigt werden. Wurden Mäusen beispielsweise s. c. LLC-Zellen implantiert und an Tag 15 die Tumoreareale in der Lunge analysiert, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Makrophagen im Vergleich zu gesunden Tieren. Wurden die LLC-Zellen hingegen i. v. injiziert, konnten in den pulmonalen Metastasen M2-Makrophagen nachgewiesen werden, die durch die Expression von IL-10<sup>high</sup> und F4/80 charakterisiert waren. Außerdem wurden auch CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup> MDSC detektiert (Kim et al., 2009).

Die erhöhte Expression der NT sowie deren immun-modulatorische Eigenschaften konnten bereits in verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie Asthma bronchiale, nachgewiesen werden (1.4.2). Außerdem exprimieren die meisten Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, mononukleäre Zellen, neutrophile Granulozyten sowie B- und T-Zellen, selbst NT sowie den NGF-Rezeptor TrkA entweder basal oder nach deren Aktivierung. Somit könnte NGF auch an der Regulation immunologischer Prozesse während der Ausbildung pulmonaler Metastasen beteiligt sein.

Da in dieser Arbeit ein syngenes Mausmodell zur Charakterisierung der pulmonalen Metastasierung eingesetzt wurde, d.h. die injizierten Tumorzellen stammen aus Tieren mit gleichem genetischen Hintergrund, war keine Abstoßungsreaktion der Tumorzellen zu

erwarten gewesen. Dadurch konnten auch die möglicherweise während der Metastasierung ablaufenden immunologischen Prozesse charakterisiert werden.

Dazu wurde zunächst das Lungen- bzw. Tumorgewebe der Versuchstiere hinsichtlich der Infiltration mit Immunzellen untersucht. Der histologische Nachweis sowie die Quantifizierung der CD45<sup>+</sup> Immunzellen ergaben bei beiden Versuchsgruppen im Lungengewebe gesunder Tiere deutlich mehr Immunzellen als im unveränderten Lungengewebe der Tiere, die Metastasen ausgebildet hatten. Bei diesen Tieren akkumulierten die Immunzellen jedoch im Tumorgewebe. Dabei war eine tendenziell erhöhte (jedoch keine signifikante) Infiltration der Tumoreale NGF-Tg Tiere zu beobachten (Abb. 7). Dies könnte evtl. auf eine stärkere, gegen den Tumor gerichtete Immunantwort in NGF-Tg Tieren schließen lassen und würde mit den Ergebnissen des Modells der akuten Atemwegsentzündung korrelieren, bei dem in NGF-Tg Mäusen eine stärkere Infiltration mit neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnte (Abb. 14).

Um zu testen, ob trotz der nahezu unveränderten Zellzahlen im Lungengewebe eine differenziell regulierte Entzündungsreaktion zwischen WT- und NGF-Tg Tieren vorliegt, erfolgte die Analyse der Chemokine und Zytokine in der BALF. So ist es denkbar, dass bei WT-Tieren ein pro-tumorigenes Milieu vorliegt, dass z.B über die Expression der Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 charakterisiert ist. Im Umkehrschluss könnten in NGF-Tg Tieren überwiegend anti-tumorigene, pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  exprimiert werden. Allerdings wurden bei den Chemokinen CCL3, CCL7 und GM-CSF keine unterschiedlichen Konzentrationen in WT- und NGF-Tg Mäusen detektiert. Auch die Analyse der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  ergab keinen Unterschied zwischen WT- und NGF-Tg Tieren. Zudem waren die Chemokine und Zytokine nur in sehr niedrigen Konzentrationen nachweisbar (Abb. 7).

Die Analyse der immunologischen Parameter erfolgte hier jedoch erst in einem sehr späten Stadium der pulmonalen Metastasierung, in dem immun-supprimierende Prozesse überwiegen können. Dies wäre zum einen eine Erklärung für die niedrigen Zellzahlen im Lungengewebe der Tiere, die Metastasen ausgebildet hatten, und zum anderen für die niedrigen Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen in der BALF. Die zusätzliche Bestimmung der TGF- $\beta$ -Konzentrationen in der BALF sowie die Charakterisierung der Immunzellpopulationen könnte über den Nachweis immun-suppressiver Treg-Zellen diese Vermutung bestätigen.

Auf Grund der Daten aus dem Modell der akuten Atemwegsentzündung wäre es auch denkbar, dass NGF-Tg Tiere zu einem früheren Zeitpunkt der Metastasierung eine deutlich stärkere anti-tumorigene Immunantwort ausgebildet hatten als WT-Tiere und so das Metastasenwachstum in NGF-Tg Mäusen langsamer vorangeschritten ist. Aus diesem Grund wurden die Anzahl der CD45<sup>+</sup> Immunzellen in der Lunge sowie die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie IL-6 in der BALF von Mäusen bestimmt, denen 24 h zuvor LLC-Zellen injiziert wurden. Dabei ergab die Quantifizierung der CD45<sup>+</sup> Zellen in der Lunge von WT- und NGF-Tg Tieren keinen Unterschied und die Zytokine waren in der BALF beider Versuchsgruppen nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Somit konnten auch zu diesem frühen Zeitpunkt der pulmonalen Metastasierung differenzielle immunologische Regulationsmechanismen zwischen WT- und NGF-Tg Mäusen ausgeschlossen werden. Gegebenenfalls könnte die Analyse zu einem Zeitpunkt wiederholt werden, an dem sich bereits die ersten makroskopisch nachweisbaren Metastasen gebildet haben (ca. an Tag 7-10 nach Injektion der Tumorzellen) um auch in diesem Erkrankungsstadium auszuschließen, dass bei WT- und NGF-Tg Tieren unterschiedlich regulierte Entzündungsreaktionen während der pulmonalen Metastasierung ablaufen.

Der einzige Unterschied zwischen WT- und NGF-Tg Tieren hinsichtlich der getesteten immunologischen Parameter wurde bei der Analyse der Gesamtzellzahlen in der BAL beobachtet. Hier waren bei WT-Tieren nach der Ausbildung pulmonaler Metastasen signifikant mehr Zellen nachweisbar als bei NGF-Tg Tieren (Abb. 7). Dies ist allerdings nicht auf eine gesteigerte Entzündungsreaktion in WT-Tieren zurückzuführen, sondern auf die erhöhte Einwanderung von Tumorzellen in die Atemwege. Auf Grund des stärkeren Tumorstadiums in der Lunge dieser Tiere, kann es auch zur Zerstörung des Epithels und so zum Übertritt der Tumorzellen in die Atemwege kommen. Der Nachweis maligner Zellen in der BAL sowie die zytologische Analyse dieser Zellen werden z. T. auch zur Diagnose neoplastischer Erkrankungen der Lunge eingesetzt (Poletti et al., 2007).

In dem hier durchgeführten Mausmodell der pulmonalen Metastasierung wurde im Gegensatz zu anderen keine starke Entzündungsreaktion nachgewiesen. Da bei den publizierten Studien jedoch unterschiedliche Tumorzellen bzw. -zelllinien in unterschiedlichen Zellzahlen appliziert und die Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden, liegen in den verschiedenen Modellen der pulmonalen Metastasierung viele Variablen vor, die die Ausbildung einer lokalen Entzündungsreaktion beeinflussen können.



### 4.3 Der Einfluss von NGF auf die Funktion von LLC-Zellen *in vitro* konnte nicht nachgewiesen werden

Obwohl von einem Mechanismus ausgegangen wird, der unabhängig von der primären Herkunft der Tumorzellen ist, können direkte Effekte auf die Tumorzellen bisher nicht vollständig ausgeschlossen werden. Deshalb wurden die im Modell der pulmonalen Metastasierung eingesetzten LLC- und B16/F10-Zellen zunächst auf die Expression von NGF und den Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup> untersucht. Dabei ergab sich, dass LLC-Zellen sowohl NGF als auch beide Rezeptoren exprimieren, wohingegen bei B16/F10-Melanomzellen nur die Expression der Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup> nachgewiesen werden konnte (Abb. 8). Somit sind beide Zelllinien in der Lage auf einen exogenen NGF-Stimulus zu reagieren. LLC-Zellen könnten außerdem über autokrine Mechanismen die Signaltransduktion aktivieren.

Die durchgeführten *in vitro* Experimente sollten dazu beitragen die Funktion von NGF auf Tumorzellen während des komplexen Vorgangs der Metastasierung näher zu charakterisieren. Dazu wurde zunächst der Einfluss von NGF auf die Vitalität und die Anoikis der LLC-Zellen untersucht. Außerdem wurde die Wirkung von NGF auf die Adhäsion der Tumorzellen an eine konfluente EC-Schicht getestet. In weiteren *in vitro* Experimenten sollte die Funktion von NGF auf die Migration sowie die Proliferation der LLC-Zellen näher charakterisiert werden (Abb. 9).

Tumore entstehen auf Grund der malignen Veränderungen der Tumorzellen. Eine davon ist die gesteigerte Überlebensfähigkeit bzw. Vitalität dieser Zellen. Auch während des gesamten Metastasierungsprozesses ist die Vitalität der metastasierenden Tumorzellen essentiell. Besondere Bedeutung besitzt die Überlebensfähigkeit der Tumorzellen jedoch v. a. während der Passage durch die Blutgefäße und der Besiedelung des Zielorgans mit der anschließenden Bildung von Mikrometastasen. Dort müssen sich die extravasierten Tumorzellen zunächst an das Mikromilieu anpassen und bis zur Initiierung der Proliferation überleben. In den Blutgefäßen liegen die zirkulierenden Tumorzellen überwiegend als Einzelzellen vor. Da viele Tumorzellen wie z. B. auch LLC-Zellen epithelialen Ursprungs sind, sind diese jedoch auf Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte angewiesen. Auf Grund des Kontaktverlusts unterlaufen zirkulierende Tumorzellen häufig den Prozess der Anoikis. Dieser wird u. a. über den mitochondrialen Signalweg gesteuert, der zur Aktivierung der Caspasen-3 und -7 und in der Folge zur Apoptose der Zellen führt. Die Freisetzung Apoptose-induzierender Faktoren durch Mitochondrien ins Zytoplasma wird von pro- bzw. anti-

apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie moduliert (Simpson et al., 2008). Auch NGF kann Signale vermitteln, die zur Expression von Genen der Bcl-2 Familie führen. So fördert die Bindung von NGF an den p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor zum einen über NFκB die Transkription des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 und zum anderen über JNK die Transkription des pro-apoptotischen Gens Bax.

Verschiedene Arbeiten belegen diese z. T. entgegengesetzte Wirkung von NGF auf die Vitalität bzw. die Anoikis von Tumorzellen sowie die Liganden-unabhängige Aktivierung des TrkA-Rezeptors in Karzinomzellen. Die Aktivierung des TrkA-Rezeptors durch NGF fördert beispielsweise die mitogenen Eigenschaften von Mammakarzinomzellen, wohingegen die Signaltransduktion über den p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor zur Induktion von NFκB führt, was in der Apoptose dieser Zellen mündet (Descamps, 2001). Auch Allen et al. konnten nachweisen, dass die Induktion der Apoptose von Prostatakarzinomzellen über den p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor erfolgt. Dabei führte die unabhängige Aktivierung sowohl des NFκB- als auch des JNK-Signalwegs zu einer reduzierten Vitalität der Zellen (Allen et al., 2005). Bei *in vitro* in Suspension kultivierten Mammakarzinomzellen wurde in einem Anoikistest außerdem nachgewiesen, dass die TrkA-Überexpression zur Bildung großer Zellaggregate und einer gesteigerten Proliferationsrate der Zellen führt. Die exogene Stimulation dieser Zellen mit NGF förderte die Anoikis-Resistenz jedoch nicht zusätzlich. Da auch die Neutralisation von NGF durch die Zugabe spezifischer AK keinen Effekt auf die Anoikis der Mammakarzinomzellen hatte, wurde von einem Liganden-unabhängigen Mechanismus ausgegangen. Dies konnte damit bestätigt werden, dass in TrkA-überexprimierenden Zellen eine konstitutive Aktivierung der Akt-, ERK- und p38-Signalwege beobachtet wurde (Lagadec et al., 2009). Die Autonomie maligner Zellen wird häufiger beobachtet. So sind die Signaltransduktionswege für den Zellstoffwechsel und die Proliferation in gesunden und malignen Zellen hoch konserviert. In gesunden Zellen ist für die Initiierung der Signalweiterleitung die extrazelluläre Stimulation erforderlich, wohingegen in Tumorzellen meist durch Mutationen verursachte Mechanismen existieren, welche die Signaltransduktion Liganden-unabhängig verstärken. Dadurch wird die metabolische Aktivität der Zellen gewährleistet, ohne auf eine exogene Stimulation angewiesen zu sein (DeBerardinis et al., 2008).

Da NGF-Tg Tiere im Mausmodell jedoch weniger pulmonale Metastasen ausgebildet hatten als WT-Tiere, ist es denkbar, dass NGF die Vitalität der LLC-Zellen vermindert. Obwohl die Daten von Lagadec et al. die Liganden-unabhängige Inhibition der Anoikis über

TrkA in Mammakarzinomzellen nachweisen konnten, ist es auf Grund der vielfältigen Mechanismen, über die NGF seine Effekte vermitteln kann auch denkbar, dass NGF die Anoikis anderer Tumorzellen fördern könnte (Lagadec et al., 2009).

Deshalb wurde *in vitro* der Einfluss von NGF auf die metabolische Aktivität der LLC-Zellen bestimmt, die abnimmt geht, sobald in den Zellen die Apoptose induziert wird. In einem weiteren *in vitro* Experiment wurde außerdem getestet, ob NGF die Anoikis in LLC-Zellen induziert. Die Stimulation der Zellen mit NGF hatte jedoch keinen Effekt auf die Vitalität und die Anoikis. Allerdings zeigten LLC-Zellen, die adhären wuchsen, wie erwartet eine geringere Anoikis als Tumorzellen, die in Suspension kultiviert wurden. Somit wurde durch den Verlust der Zell-Zell-Kontakte die Anoikis der Tumorzellen induziert, die jedoch durch die exogene NGF-Gabe nicht beeinflusst wurde.

Demnach kann die reduzierte Metastasierung der Lunge in NGF-Tg Mäusen sehr wahrscheinlich nicht auf die, durch NGF vermittelte, geringere Überlebensfähigkeit oder die gesteigerte Anoikis der Tumorzellen zurückgeführt werden.

Ein weiterer Schritt in der Metastasierungskaskade ist die Adhäsion der zirkulierenden Tumorzellen an das Kapillarendothel des Zielorgans. Der Ablauf der Tumorzelladhäsion ist vergleichbar mit der Adhäsion von Immunzellen an EC. So kommt es zunächst zu einer schwachen Bindung der Tumorzellen an Selektine, die auf EC exprimiert werden und zum *rolling* der metastasierenden Zellen entlang des mikrovaskulären Endothels. Dadurch verringert sich die Geschwindigkeit der Zellen. Diese können dann leichter über Integrin-vermittelte Mechanismen stabile Bindungen mit den EC eingehen.

Die Familie der Selektine besteht aus drei Mitgliedern: P-, E- und L-Selektin. P-Selektin wird in der  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten sowie in Weibel-Palade-Körperchen von EC gespeichert und kann somit direkt nach deren Aktivierung an die Zelloberfläche translozieren. Die E-Selektin-Expression in EC erfordert im Gegensatz dazu die *de novo* Transkription und ist erst 4-6 Stunden nach Stimulation der Zellen nachweisbar (Kansas, 1996). L-Selektin wird von den meisten Leukozytenpopulationen konstitutiv exprimiert. Selektin-Liganden sind meist Glykoproteine und Glykolipide, die eine gemeinsame Sialyl-Lewis-X/A-Tetrasaccharid-Struktur aufweisen ( $sLE^X/sLe^a$ ). Diese Strukturen werden häufig bei der malignen Transformation von Tumorzellen überexprimiert und sind auch auf LLC-Zellen nachweisbar (Kannagi et al., 2004; Brown, 2006).

Die ebenfalls an der Adhäsion beteiligten Integrine sind komplexe transmembrane Glykoproteine, die als nicht-kovalent gebundene Heterodimere aus jeweils einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette vorliegen (Morgan et al., 2007). Integrine werden ubiquitär von Tumorzellen, hämatopoetischen Zellen, EC sowie Stromazellen exprimiert. Neben der Adhäsion von Tumorzellen an EC regulieren Integrine u. a. auch die Proliferation und das Überleben der Zellen sowie die Angiogenese. In einem B16-Melanomzell-Modell der pulmonalen Metastasierung war die  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-vermittelte Interaktion mit VCAM-1 auf EC essentiell für die Adhäsion der Melanomzellen sowie deren Transmigration durch die EC-Schicht (Klemke et al., 2007).

Das Adhäsionsmolekül VCAM-1 wird von EC bereits basal exprimiert und durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 oder TNF- $\alpha$  weiter induziert. (Osborn et al., 1989; Bayat et al., 2007; Lim et al., 2012). VCAM-1 konnte auch auf in die Lunge metastasierenden Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden, wo es mit dem  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin auf Tumor-assoziierten Makrophagen interagiert. Dadurch wird, über die Aktivierung des PI3K-Signalwegs in Mammakarzinomzellen deren Überleben und die Proliferation gefördert (Chen und Massague, 2012). Wie in 1.4.4 bereits beschrieben, führt auch die direkte Interaktion von NGF mit dem  $\alpha 9\beta 1$ -Integrin über die Aktivierung des MAPK/ERK 1/2 Signalwegs zur gesteigerten Migration und Proliferation von Glioblastomzellen. Die direkte Bindung von NGF an das Integrin wurde außerdem durch eine gesteigerte Adhäsion  $\alpha 9\beta 1$ -exprimierender Zellen an immobilisiertes NGF nachgewiesen (Staniszewska et al., 2008).

Diese bisherigen Daten lassen darauf schließen, dass NGF-Integrin-Interaktionen v. a. pro-tumorigene Effekte vermitteln. In dieser Arbeit wird jedoch von einem NGF-induzierten Mechanismus ausgegangen, der die pulmonale Metastasierung inhibiert. Somit sollte mit dem durchgeführten *in vitro* Experiment ausgeschlossen werden, dass NGF auch auf LLC-Zellen eine Adhäsions-fördernde Wirkung ausübt.

Dies konnte durch die unveränderte Adhäsion von LLC-Zellen an konfluente C166-EC mit bzw. ohne NGF-Stimulation der EC nachgewiesen werden. Die Adhäsion der LLC-Zellen an EC wurde in dieser Arbeit nach 30 min analysiert. Da die Adhäsion zwar Tumorzell-abhängig ist, jedoch im statischen Modell innerhalb von 10-30 min erfolgt (Pouliot et al., 2013), war der gewählte Analysezeitpunkt ausreichend, um die Bindung der Tumorzellen an die EC zu gewährleisten. Die Stimulation der EC erfolgte zuvor über einen Zeitraum von 2 h, da viele Adhäsionsmoleküle entweder konstitutiv an der Zelloberfläche exprimiert werden (z. B. Integrine) oder in Weibel-Palade-Körperchen gespeichert sind (z. B. P-Selektin) und somit

schnell an die Zellmembran translozieren können. Allerdings reicht dieser Zeitraum nicht zur *de novo* Synthese bestimmter Adhäsionsmoleküle wie z. B. E-Selektin aus. VCAM-1 ist hingegen bereits basal auf mikrovaskulären EC detektierbar (Binion et al., 2009). Die Blockade von VCAM-1 durch spezifische AK diente hier als Positivkontrolle und führte zur signifikant reduzierten Adhäsion der LLC-Zellen an C166-EC. Somit kann aus dem Ergebnis geschlossen werden, dass LLC-Zellen VCAM-1-Liganden (z. B. die die Integrine  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 4\beta 7$ ) exprimieren, die zumindest teilweise an der Adhäsion an EC beteiligt sind. Der Nachweis bzw. die Identifizierung der auf LLC-Zellen exprimierten Integrine könnte deshalb dazu beitragen, den Mechanismus der pulmonalen Metastasierung weiter zu entschlüsseln.

Die Expression der Adhäsionsmoleküle auf EC hängt z. T. auch von den auf diese Zellen wirkenden Scherkräften ab. So führte die Adhäsion von Tumorzellen an EC in einem statischen *in vitro* Modell zur Hochregulation der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, E-Selektin und *inter cellular adhesion molecule* (ICAM) auf EC. Wurde das gleiche Experiment jedoch unter dynamischen Bedingungen (*shear flow conditions*) durchgeführt, blieb die Expression der Adhäsionsmoleküle unverändert (Haddad et al., 2010). Deshalb könnte die Durchführung des Versuchs unter dynamischen Versuchsbedingungen weiteren Aufschluss über die an der Adhäsion der Tumorzellen beteiligten Moleküle liefern.

Dass EC eine enorme strukturelle und funktionelle Heterogenität aufweisen, zeigt sich auch an einem Organ-spezifischen Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle (Aird, 2012). Deshalb könnte die Durchführung des Tests mit primären murinen EC aus der Lunge dazu beitragen, die hier mit einer Zelllinie generierten Daten zu verifizieren. Jedoch besitzen EC keine spezifischen Oberflächenmoleküle, anhand derer sie schnell und mit hoher Reinheit isoliert werden können. Aus diesem Grund sind bei der EC-Isolation z. B. mittels *magnetic-activated cell sorting* (MACS) mehrere Separationsschritte nötig. Beispielsweise können erst  $CD45^+$  Immunzellen isoliert werden und anschließend aus dem Durchfluss  $CD144^+$  (*vascular endothelial cadherin*, VE-Cadherin) EC aufgereinigt werden. Allerdings machen EC nur etwa 1-2 % des gesamten Lungengewebes aus, wodurch die Ausbeute der isolierten Zellen gering ist. Außerdem proliferieren primäre EC sehr langsam und können im Gegensatz zu Zelllinien nur kurzzeitig für *in vitro* Experimente eingesetzt werden, da sie bereits nach wenigen Zellkulturpassagen Seneszenz entwickeln.

Während dem anschließenden Metastasierungsschritt, der Extravasation der Tumorzellen, ist die aktive Migration der Tumorzellen durch die endotheliale Barriere erforderlich. Der

dazu nötige Umbau der Aktinfilamente wird überwiegend durch Rho-GTPasen gesteuert (Ridley, 2011). Auch NGF kann den Ras/Rho-Signalweg aktivieren, was z. B. die Aussprossung neuronaler Zellen sowie deren Differenzierung fördert (Estrach et al., 2002). Brackenbury et al. zeigten außerdem, dass NGF die Migration von Pankreaskarzinomzellen in einem *in vitro Transwell*-Test begünstigt (Brackenbury und Djamgoz, 2007). Ebenso konnte NGF die Migration von Glioblastomzellen und TrkA-überexprimierenden Mammakarzinomzellen *in vitro* steigern (Brown et al., 2008; Lagadec et al., 2009). Erneut deuten die vorliegenden Daten auf eine Metastasierungsfördernde Wirkung von NGF hin. Wie bereits im vorausgegangenen Experiment sollte diese jedoch, auf Grund der vorliegenden Ergebnisse in der NGF-Tg Maus, mit Hilfe eines *in vitro* Ansatzes ausgeschlossen werden.

Dies gelang mit Hilfe eines *Transwell*-Systems, in dem ein löslicher NGF-Gradient (10 ng/ml und 100 ng/ml) keine chemotaktische Wirkung auf LLC-Zellen ausübte. Der Versuch wurde unter Serum-armen Bedingungen (1 % FCS) durchgeführt, um die Aktivierung durch im FCS enthaltene Wachstumsfaktoren auszuschließen. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde durch die niedrige Serumkonzentration jedoch nicht beeinträchtigt. Dies ergab die Bestimmung der Zellvitalität (2.15.4) über einen Zeitraum von 1 h bis zu 24 h im Vergleich zu Zellen, die in Medium mit 10 % FCS inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Auch Brackenbury et al. sowie Lagadec et al. führten die Migrationstests unter ähnlichen Bedingungen durch. Brackenbury et al. testeten für 7 h die Wirkung von NGF (20 ng/ml) in Serum-freiem Medium auf die Migration von Pankreaskarzinomzellen. Bei Lagadec et al. wurde der Migrationstest mit Mammakarzinomzellen mit Medium mit einem FCS-Zusatz von 0,1 % und 200 ng/ml NGF für 6 h durchgeführt (Brackenbury und Djamgoz, 2007; Lagadec et al., 2009). Auch in diesen Experimenten führte die Serum-freie bzw. Serum-arme Kultivierung der jeweiligen Tumorzellen somit nicht zur Inaktivierung dieser Zellen.

Als finaler Prozess der Metastasierungskaskade wird die Proliferation der ausgewanderten Tumorzellen initiiert und somit die Ausbildung makroskopisch sichtbarer Metastasen ausgelöst. Die Proliferation der Tumorzellen wird durch Komponenten des umgebenden Parenchyms mit beeinflusst, da sowohl die EZM als auch Stromazellen ein Reservoir für viele Wachstumsfaktoren darstellen, die meist die Proliferation der Tumorzellen fördern.

NGF kann die Proliferation von Tumorzellen (entsprechend der Vitalität und der Anoikis) sowohl induzieren als auch inhibieren. Einerseits fördert NGF die Proliferation von Mamma- und Pankreaskarzinomen sowie Melanomen (Zhu et al., 2002; Com et al., 2007; Truzzi et al.,

2008; Lagadec et al., 2009). Andererseits führt die Aktivierung des p75<sup>NTR</sup>-Rezeptors zur Apoptose von Prostatakarzinom- und Neuroblastomzellen (Kuner und Hertel, 1998; Krygiar und Djakiew, 2001). Aber auch die NGF-induzierte, TrkA-vermittelte Signaltransduktion kann den Zelltod von z. B. Glioblastom- und Medulloblastomzellen begünstigen (Hansen et al., 2007; Harel et al., 2010). Außerdem ist beschrieben, dass die endogene NGF-Expression von Melanomzellen ausreicht, um die Proliferation dieser Zellen zu induzieren (die exogene NGF-Applikation hatte hier keinen Einfluss auf die Zellen). Dies wird durch die Zugabe löslicher Trk-Rezeptoren bestätigt, welche die Proliferation hemmen. Die löslichen Trk-Rezeptoren binden dabei an NGF, welches dadurch nicht mehr mit den von den Melanomzellen exprimierten Trk-Rezeptoren interagieren kann (Truzzi et al., 2008).

In dem hier durchgeführten Proliferationstest hatte NGF jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation der LLC-Zellen, die mit einem Zusatz von 1 % FCS inkubiert wurden. Erfolgte die Inkubation jedoch in Medium mit 10 %igem FCS-Zusatz war ein signifikanter Anstieg der proliferierenden Zellen zu beobachten, der auf die im FCS enthaltenen Wachstumsfaktoren zurückzuführen ist. Da durch die Zugabe neutralisierender Anti-NGF-AK auch die Wirkung des endogen produzierten NGF gehemmt wurde, können außerdem die von Truzzi et al. beschriebenen autokrinen Mechanismen ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente keine direkte Wirkung von NGF auf verschiedene funktionelle Aspekte der Tumorzellen während einzelner Schritte im Metastasierungsprozess. Somit beruht die reduzierte pulmonale Metastasierung höchstwahrscheinlich auf Veränderungen der NGF-Tg Maus. Da metastasierende Tumorzellen die endotheliale Barriere überwinden müssen, um Metastasen auszubilden, wurde in den folgenden Experimenten die Wirkung von NGF auf EC und pulmonale Blutgefäße näher untersucht.

#### **4.4 Funktionelle Veränderungen der pulmonalen Blutgefäße und reduzierte Extravasation von Tumorzellen in NGF-Tg Tieren**

Wie die bisherigen Daten gezeigt haben, ist die reduzierte pulmonale Metastasierung in NGF-Tg Mäusen nicht auf eine veränderte lokale Entzündungsreaktion im Endstadium der pulmonalen Metastasierung zurückzuführen. Außerdem konnte *in vitro* keine direkte Wirkung von NGF auf verschiedene funktionelle Prozesse der LLC-Zellen nachgewiesen

werden. Deshalb sollte nun der Einfluss von NGF auf die pulmonalen Blutgefäße näher charakterisiert werden.

Generell liegt in der Lunge unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe intrinsische Permeabilität vor. Pathologische Prozesse, wie akute und chronische Entzündungen sowie Tumorerkrankungen, werden jedoch meist von einer Hyperpermeabilität der Gefäße begleitet. Die Permeabilität der endothelialen Barriere wird durch interzelluläre Verbindungen, den *tight junctions* (TJ) und den *adherens junctions* (AJ) aufrecht erhalten. Zu den AJ zählen Komplexe, die aus in den meisten Gefäßen exprimierten VE-Cadherin und Cateninen gebildet werden. Wird die homophile Interaktion von VE-Cadherin gestört, resultiert dies in der interstitiellen Ödembildung, wie z. B. bei der akuten Lungenschädigung (*acute lung injury*).

Auch metastasierende Krebszellen sezernieren häufig vasoaktive Substanzen, wie VEGF, EGF und Angptl4 sowie pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine, die die Hyperpermeabilität des Endothels induzieren. Außerdem können Tumorzellen auch proteolytische Enzyme wie MMPs freisetzen, die zur Degradation der endothelialen Barriere beitragen.

Sowohl die Angiogenese als auch die vaskuläre Permeabilität wird durch VEGF gefördert. Da die Malignität von Krebserkrankungen häufig mit der erhöhten Sekretion von VEGF assoziiert ist, wird davon ausgegangen, dass auch die Extravasation der Tumorzellen durch VEGF gefördert wird. Dies bestätigen Studien mit humanen, mikrovaskulären EC aus dem Gehirn, deren Permeabilität durch VEGF gesteigert wird, was die erhöhte transendotheliale Migration von Mammakarzinomzellen zur Folge hat (Lee et al., 2003). Hiratsuka et al. zeigten außerdem, dass das von Mammakarzinomzellen sowie Lungenkarzinomzellen sezernierte VEGF eine hyperpermeable Region in der Lunge induziert. Dies geschieht über die Aktivierung von FAK, was wiederum zur Überexpression von E-Selektin in EC führt. Durch diese Vorgänge wird schließlich auch die pulmonale Metastasierung begünstigt (Hiratsuka et al., 2011).

Neben den Angiogenese-fördernden Eigenschaften, die für NGF beschrieben wurden, kann NGF auch die endotheliale Permeabilität steigern. So zeigten Romon et al., dass *in vitro* kultivierte und mit NGF stimulierte HUVEC eine erhöhte Permeabilität für FITC-Dextran aufweisen (Romon et al., 2010).



Im Gegensatz dazu hatte in dieser Arbeit, in einem ähnlich durchgeführten Experiment, NGF keinen Einfluss auf die Permeabilität einer konfluenten C166-EC-Schicht. Auch die Stimulation der Zellen mit VEGF führte zwar zu einer tendenziell gesteigerten, jedoch keiner signifikant erhöhten Permeabilität (Abb. 10). Diese widersprüchlichen Ergebnisse können auf die bereits beschriebene Heterogenität der EC zurückzuführen sein (4.3). Auch hier könnte die Verwendung primärer muriner Lungenendothelzellen dazu beitragen, Organ-spezifische Prozesse besser zu charakterisieren.

Die basale Permeabilität pulmonaler Blutgefäße wurde außerdem im *ex vivo* Modell an perfundierten und ventilerten Lungen von WT- und NGF-Tg Tieren von der AG Weißmann in Gießen gemessen. Bei NGF-Tg Tieren ist dabei im Vergleich zu WT-Tieren kein Perfusionschaden nach wiederholten hydrostatischen Provokationen entstanden. So war bei NGF-Tg Mäusen keine erhöhte vaskuläre Permeabilität und die daraus resultierende Ödembildung in der Lunge nachzuweisen (Abb. 11).

Dies kann durch die erhöhte oder veränderte Expression interendothelialer AJ- und TJ-Moleküle in NGF-Tg Tieren zurückzuführen sein. Auch die parazelluläre Migration der Tumorzellen könnte durch eine erhöhte bzw. eine veränderte Expression der AJ- und TJ-Moleküle beeinflusst werden. Dass diese an der Extravasation von Tumorzellen beteiligt sind konnte von Haidari et al. nachgewiesen werden. Die Gruppe zeigte, dass die Integrin-abhängige endotheliale Transmigration von Mammakarzinomzellen *in vitro* über die Phosphorylierung von VE-Cadherin gesteuert wird. Durch dessen Aktivierung kommt es zur Dissoziation von  $\beta$ -Catenin aus dem VE-Cadherin-Komplex und letztendlich zur Beschädigung der vaskulären Integrität (Haidari et al., 2012).

Deshalb sollte überprüft werden, ob auch im hier durchgeführten Modell die Permeabilität der pulmonalen Blutgefäße mit der Extravasation von LLC-Zellen in die Lunge assoziiert ist. Dazu wurden WT- und NGF-Tg Mäusen Fluoreszenz-markierte LLC-Zellen i. v. injiziert und die Anzahl dieser in der Lunge 8 h bzw. 24 h nach Injektion mittels FACS-Analyse bestimmt. Dabei zeigte sich, dass zu beiden Zeitpunkten in der Lunge NGF-Tg Tiere signifikant weniger Tumorzellen nachgewiesen werden konnten als in WT-Tieren (Abb. 12). Allerdings sollte die 24 h Messung wiederholt werden, da in der WT-Gruppe nur die Werte von 3 Versuchstieren bestimmt werden konnten.

Im peripheren Blut beider Versuchsgruppen wurden insgesamt nur sehr wenige Tumorzellen detektiert. Dies kann evtl. darauf zurückzuführen sein, dass ein Großteil der injizierten

Tumorzellen bereits nach 8 h in Apoptose gegangen ist und die überlebenden Tumorzellen hauptsächlich in der Lunge akkumulieren.

Die direkte Wirkung von NGF auf die Extravasation von Tumorzellen sollte wie schon im Modell der pulmonalen Metastasierung, durch die exogene Gabe von rhNGF in WT-Tiere bestätigt werden. Jedoch zeigten WT-Mäuse, denen ab 11 Tagen vor Injektion der Tumorzellen viermal i. t. NGF verabreicht wurde, keine veränderte Extravasation der Tumorzellen im Vergleich zu WT-Tieren, denen als Kontrolle PBS appliziert wurde. In NGF-Tg Mäusen waren, wie im vorausgegangenen Experiment, 8 h nach Tumorzellinjektion signifikant weniger Tumorzellen in der Lunge nachweisbar als in WT-Mäusen (Abb. 13). Dass exogen appliziertes NGF keine Auswirkungen auf die Extravasation der Zellen in WT-Tieren hatte, kann verschiedene Ursachen haben. Da NGF bei der i. t. Gabe erst aus den Atemwegen in die Blutgefäße diffundieren muss, wäre die i. v. NGF-Applikation unter Umständen erfolgreicher gewesen, da in diesem Fall NGF direkt auf die EC wirken kann (4.1). Die i. t. Gabe wurde jedoch bewusst gewählt, um den lokalen Effekt von NGF auf pulmonale Blutgefäße untersuchen zu können. Sollten jedoch strukturelle Veränderungen der Blutgefäße für die reduzierte pulmonale Metastasierung NGF-Tg Tiere verantwortlich sein, ist es wiederum möglich, dass der Zeitraum der NGF-Applikation über 11 Tage nicht ausgereicht hat diese Veränderungen auszubilden. Dass die erhöhte NGF-Expression in der NGF-Tg Maus strukturelle Umbauprozesse in der Lunge induziert konnte bereits in der eigenen Arbeitsgruppe im Modell der chronischen allergischen Atemwegsentzündung gezeigt werden. In diesem Modell fördert NGF die subepitheliale Fibrose über die Induktion der KollagenIII-Expression (Kılıç et al., 2011).

Generell unterscheidet sich die Struktur des Gefäßendothels in verschiedenen Organen und Geweben erheblich. Dies resultiert hauptsächlich in funktionellen Unterschieden, wie der Permeabilität, der Transmigration von Zellen und der Homöostase. Beim Endothel der Lunge handelt es sich um ein kontinuierliches, nicht-fenestriertes Endothel, das nur eine geringe intrinsische Permeabilität aufweist. Auch die Zirkulation in den pulmonalen Blutgefäßen unterscheidet sich grundlegend von der systemischen Zirkulation. Zum einen ist die Konzentration der Leukozyten in pulmonalen Kapillaren 35- bis 100-mal höher als in den großen Blutgefäßen der systemischen Zirkulation. Zum anderen findet die Extravasation in der Lunge hauptsächlich in den Kapillaren statt, wohingegen die Extravasation in der systemischen Zirkulation in post-kapillären Venolen erfolgt (Downey et al., 1993). Außerdem

ist der Durchmesser der pulmonalen Kapillaren mit etwa 2-15  $\mu\text{m}$  zu gering, um das *rolling* der Zellen zu ermöglichen.

In dieser Arbeit wurden bei der Extravasation von Immunzellen bzw. Tumorzellen gegensätzliche Effekte beobachtet. So war in NGF-Tg Mäusen, im Vergleich zu WT-Tieren, im Modell der LPS-induzierten akuten Atemwegsentzündung eine erhöhte Infiltration der Lunge mit neutrophilen Granulozyten zu beobachten (Abb. 14), während die pulmonale Extravasation von Tumorzellen signifikant reduziert war (Abb. 12). Somit ist anzunehmen, dass die verringerte Permeabilität der pulmonalen Blutgefäße in NGF-Tg Tieren nicht der alleinige Grund für die verringerte Auswanderung der Tumorzellen ist. Neben der differentiellen Beteiligung verschiedener Adhäsionsmoleküle unterscheiden sich die Extravasation von Tumorzellen und Immunzellen vor allem bei der Diapedese durch das Endothel. Leukozyten transmigrieren durch die endotheliale Barriere ohne diese irreversibel zu schädigen. Dies kann auf zwei Wegen erfolgen: zum einen ist dies die Transmigration zwischen zwei EC, die als parazelluläre Route bezeichnet wird; zum anderen kann die Migration transzellulär erfolgen, d.h. durch eine EC hindurch. Welche Route gewählt wird, hängt u. a. von der Subpopulation der Leukozyten ab und davon wie lange das Endothel durch verschiedene Stimuli bereits aktiviert wurde. So bevorzugen neutrophile Granulozyten bei einer kurzen Aktivierung des Endothels *in vitro* die parazelluläre Transmigration, während bei länger aktivierten EC die transzelluläre Migration überwiegt (Yang et al., 2005). Im Gegensatz zu Leukozyten hinterlassen Tumorzellen bei der Diapedese normalerweise kein intaktes Endothel. Dies wird z.T. damit begründet, dass Tumorzellen im Vergleich zu Leukozyten größer sind und sich schlechter durch das Endothel zwängen können. Dadurch werden die EC beschädigt oder vom Zellverband losgelöst und gehen daraufhin in Apoptose (Heyder et al., 2002; Brandt et al., 2005). Ob dies auch im hier durchgeführten Modell der Fall ist, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

Abgesehen von den unterschiedlichen Mechanismen, die von Leukozyten bzw. Tumorzellen während der Extravasation aus den pulmonalen Kapillaren genutzt werden, können Immunzellen auch aus der systemischen Zirkulation in die Lunge rekrutiert werden. Dies geschieht v. a. in Modellen, bei denen die Applikation verschiedener Stimuli intratracheal erfolgt. Bei i. t.-Modellen wird zunächst die Extravasation von Immunzellen aus der bronchialen Zirkulation in die größeren Atemwege induziert, die in den distalen Lungenabschnitten von der Rekrutierung der Immunzellen aus der pulmonalen Zirkulation abgelöst wird (Wagner und Roth, 2000).

Dieser Prozess ist auch in dem in dieser Arbeit durchgeführten LPS-induzierten Modell der akuten Atemwegsentzündung wahrscheinlich, der mit der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge einhergeht. Dies ist auch eine mögliche Erklärung dafür warum bei der Extravasation von Tumorzellen bzw. Immunzellen in NGF-Tg Tieren gegensätzliche Effekte nachgewiesen wurden. So wandern in den Modellen der pulmonalen Metastasierung die Tumorzellen aus den pulmonalen Kapillaren ins Lungengewebe ein, wohingegen die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten wahrscheinlich größtenteils aus systemischen Gefäßen erfolgt. Diese Gefäße können sich in der Expression der Adhäsionsmoleküle unterscheiden und so über die Induktion der entsprechenden Signalwege die Extravasation der Zellen fördern bzw. inhibieren. Grundsätzlich kann jedoch davon ausgegangen werden, dass der Extravasation von Immun- bzw. Tumorzellen unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen.

## 4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte die reduzierte pulmonale Metastasierung der Lunge in NGF-Tg Mäusen nachgewiesen werden. Die Metastasierung ist die Abfolge mehrerer von einander abhängiger Schritte. In welchen dieser Schritte der Metastasierungskaskade NGF eingreift, konnte in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden.

Der erste Schritt in dem hier durchgeführten Modell war das Überleben der Tumorzellen in der Zirkulation. Die Wirkung von NGF ist hier unwahrscheinlich, da im peripheren Blut von WT- und NGF-Tg Tieren die gleiche Anzahl an Tumorzellen 8 h bzw. 24 h nach Injektion nachweisbar war. Jedoch ist es nicht ausgeschlossen, dass die mögliche Interaktion der Tumorzellen mit Immunzellen oder Thrombozyten, welche das Überleben der zirkulierenden Tumorzellen sowie die Adhäsion der Tumorzellen ans Endothel des Zielorgans fördert, in NGF-Tg Tieren inhibiert ist.

So könnte auch beim Arrest der metastasierenden Zellen in der Lunge die NGF-Überexpression eine Rolle spielen. Da in den Extravasations-Experimenten nur die Anzahl der Tumorzellen im Lungenhomogenisat bestimmt wurde, ist nicht zweifelsfrei nachgewiesen, ob die Zellen noch an den EC adhären oder bereits ins Lungengewebe ausgewandert sind. Dies könnte z. B. histologisch mittels Intravital- oder Konfokalmikroskopie nachgewiesen werden.

Da in NGF-Tg Mäusen die Permeabilität der pulmonalen Blutgefäße vermindert und die Extravasation der zirkulierenden Tumorzellen ins Lungengewebe ebenfalls reduziert ist, wirkt NGF mit großer Sicherheit auf diesen Metastasierungsschritt. Um die Rolle von NGF auf die Gefäße nachzuweisen, könnten diese mittels Lasermikrodissektion isoliert und anschließend Mikroarrays durchgeführt werden. Dies würde dazu beitragen differenziell exprimierte Gene, z.B. für Adhäsionsmoleküle oder AJ- und TJ-Moleküle, in WT- und NGF-Tg Mäusen identifizieren zu können.

Der Einfluss von NGF auf die Bildung von Mikrometastasen und die folgende Kolonisation der Lunge mit makroskopisch detektierbaren Metastasen ist hingegen sehr unwahrscheinlich. Bereits 8 h und 24 h nach der Injektion ist die Anzahl der in der Lunge nachweisbaren Tumorzellen in NGF-Tg Tieren signifikant reduziert, obwohl die Tumorzellen zu diesem Zeitpunkt maximal eine Zellteilung durchlaufen haben. Deshalb ist die reduzierte pulmonale Metastasierung in NGF-Tg Tieren darauf zurückzuführen, dass weniger Tumorzellen in die Lunge ausgewandert sind und somit weniger Zellen proliferieren und Metastasen ausbilden können.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass NGF strukturelle oder funktionelle Veränderungen pulmonaler Blutgefäße verursacht und so die Extravasation von Tumorzellen im Mausmodell reduziert. Das Verständnis für die, der Extravasation von Tumorzellen zu Grunde liegenden Prozesse kann durch die Identifizierung eines neuen, NGF-induzierten Tumor-suppressiven Mechanismus gefördert werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Metastasierung sekundärer Organe ist die Haupttodesursache vieler Krebspatienten. Ein häufig von Metastasen befallenes Organ ist die Lunge, da sie ein sehr dichtes Kapillarnetz aufweist und bei der systemischen venösen sowie der lymphatischen Drainage als eines der ersten Organe durchlaufen wird. Die pathologischen Mechanismen, die der pulmonalen Metastasierung zu Grunde liegen, sind jedoch noch wenig verstanden. Einen Mediator der Metastasierung und des Tumorwachstums stellt das Neurotrophin *nerve growth factor* (NGF) dar. NGF wurde ursprünglich im ZNS identifiziert, wo es die Entwicklung und den Erhalt neuronaler Zellen fördert. Inzwischen ist belegt, dass NGF auch in anderen Organen und Zellen eine Vielzahl biologischer Funktionen steuert. Bei Lungenkarzinomen wird die Rolle von NGF jedoch kontrovers diskutiert. Einerseits fördert NGF die Proliferation von isolierten Lungenkarzinomzellen über autokrine Mechanismen. Andererseits wird die Proliferation von kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (*small cell lung cancer, SCLC*) durch NGF *in vitro* sowie deren tumorigene Eigenschaften *in vivo* inhibiert. Daten der eigenen Arbeitsgruppe belegen, dass NGF einen Wachstumsfaktor für Epithelzellen darstellt sowie die Atemwegsentzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas fördert. Da sowohl die gesteigerte Proliferation von Tumorzellen als auch ein pro-tumorigenes Entzündungsmilieu die Metastasierung vorantreiben, wurde die Hypothese abgeleitet, dass NGF auch am Prozess der Metastasierung der Lunge beteiligt ist. Dies sollte anhand eines Mausmodells der pulmonalen Metastasierung nachgewiesen werden. Dazu wurde die Anzahl der Oberflächenmetastasen sowie das Metastasenvolumen in der Lunge von Wildtyp- (WT) und NGF-Tg Mäusen quantifiziert, die NGF im Atemwegsepithel überexprimieren. Dabei ergab sich eine signifikante Reduktion der gemessenen Parameter in NGF-Tg Tieren. Diese wurden von einer geringen lokalen Entzündungsreaktion begleitet. Obwohl kein direkter Effekt von NGF auf die Funktionalität der Tumorzellen ersichtlich war, konnte die Wirkung von NGF auf das Gefäßsystem der Lunge nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass die Permeabilität pulmonaler Blutgefäße von NGF-Tg Tieren im *ex vivo* Modell reduziert ist und die Tiere vor der damit einhergehenden Ödembildung geschützt sind. Damit übereinstimmend konnte eine verringerte Extravasation metastasierender Tumorzellen in die Lunge NGF-Tg Mäuse nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die lokale NGF-Überexpression in der Lunge die Funktion pulmonaler Blutgefäße verändert, was zu einer geringeren

---

vaskulären Permeabilität und zur Retention von Tumorzellen im Gefäßsystem führt. Dies belegt die Tumor-supprimierende Wirkung von NGF, die in der verringerten Metastasierung der Lunge resultiert.

## 6 SUMMARY

Metastasis of tumor cells to distant organs remains the major cause of mortality in cancer patients. Generally, lungs are often affected by metastasis since they comprise one of the densest capillary beds in the body and they are one of the first organs reached by systemic venous as well as lymphatic drainage. The pathological mechanisms underlying pulmonary metastasis are still barely understood. In view of new findings, one possible mediator of metastasis and tumor growth is the neurotrophin nerve growth factor (NGF). NGF was first identified as an essential factor for the development and maintenance of the nervous system. Recent studies show that NGF also regulates a variety of biological functions in several organs and cell types. In lung tumors the influence of NGF is controversially discussed. On the one hand, NGF promotes tumor cell proliferation in an autocrine manner and on the other hand, NGF inhibits proliferation of small cell lung carcinoma cells (SCLC) *in vitro* and abrogates their tumorigenic properties *in vivo*. Previously, our group has shown that NGF is an autocrine growth factor for airway epithelial cells and leads to the augmentation of airway inflammation in a mouse model of experimental asthma. Since increased proliferation of tumor cells and a pro-tumorigenic microenvironment are characteristics of metastatic foci, the proliferative and immune-stimulating features of NGF led to the hypothesis that NGF also contributes to pulmonary metastasis. In a mouse model, quantification of lung surface metastases and pulmonary metastases volume in wild type mice (WT) and transgenic mice over-expressing NGF in the airway epithelium (NGF-Tg) showed a significant reduction of these parameters in NGF-Tg mice. However, this outcome was only accompanied by a minor local inflammation. Eventhough no direct effect of NGF on tumor cell functionality was detectable, NGF over-expression affected pulmonary blood vessel function. The *ex vivo* measurement of vascular permeability in the lungs revealed the protection of NGF-Tg animals from perfusion damage and edema formation. In accordance with this, extravasation of tumor cells to the lung parenchyma was reduced in NGF-Tg mice. Altogether, these data demonstrate for the first time that local NGF over-expression alters pulmonary blood vessel function leading to reduced vascular permeability and retention of cancer cells in the vasculature resulting in decreased pulmonary metastasis.



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aalto, K., L. Korhonen, P. Lahdenne, P. Pelkonen, and D. Lindholm. 2002. Nerve growth factor in serum of children with systemic lupus erythematosus is correlated with disease activity. *Cytokine* 20(3):136–139.
- Aird, W. C. 2012. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(1):a006429.
- Alcantara, M. B., and C. R. Dass. 2013. Regulation of MT1-MMP and MMP-2 by the serpin PEDF: a promising new target for metastatic cancer. *Cell Physiol Biochem* 31(4-5):487–494.
- Allen, J., F. Khwaja, s. Byers, and D. Djakiew. 2005. The p75NTR mediates a bifurcated signal transduction cascade through the NF $\kappa$ B and JNK pathways to inhibit cell survival. *Experimental Cell Research* 304(1):69–80.
- Al-Mehdi, A. B., K. Tozawa, A. B. Fisher, L. Shientag, A. Lee, and R. J. Muschel. 2000. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat. Med.* 6(1):100–102.
- Aspord, C., A. Pedroza-Gonzalez, M. Gallegos, S. Tindle, E. C. Burton, D. Su, F. Marches, J. Banchereau, and A. K. Palucka. 2007. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4<sup>+</sup> T cells that facilitate tumor development. *Journal of Experimental Medicine* 204(5):1037–1047.
- Bailey, C., R. Negus, A. Morris, P. Ziprin, R. Goldin, P. Allavena, D. Peck, and A. Darzi. 2007. Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* 24(2):121–130.
- Bayat, H., S. Xu, D. Pimentel, R. A. Cohen, and B. Jiang. 2007. Activation of thromboxane receptor upregulates interleukin (IL)-1 Induced VCAM-1 expression through JNK signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28(1):127–134.
- Bibel, M. 1999. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors Trk and p75<sup>NTR</sup>. *The EMBO Journal* 18(3):616–622.
- Binion, D. G., J. Heidemann, M. S. Li, V. M. Nelson, M. F. Otterson, and P. Rafiee. 2009. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in human intestinal microvascular endothelial cells is regulated by PI3-kinase/Akt/MAPK/NF- $\kappa$ B: inhibitory role of curcumin. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 297(2):G259.
- Bissell, M. J., and W. C. Hines. 2011. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* 17(3):320–329.

- Brackenbury, W. J., and M. B. Djamgoz. 2007. Nerve growth factor enhances voltage-gated Na<sup>+</sup> channel activity and Transwell migration in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. *J. Cell. Physiol.* 210(3):602–608.
- Brandt, B., C. Heyder, E. Gloria-Maercker, W. Hatzmann, A. Rötger, D. Kemming, K. S. Zänker, F. Entschladen, and T. Dittmar. 2005. 3D-extravasation model – selection of highly motile and metastatic cancer cells. *Seminars in Cancer Biology* 15(5):387–395.
- Braun, A., E. Appel, R. Baruch, U. Herz, V. Botchkarev, R. Paus, C. Brodie, and H. Renz. 1998. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur. J. Immunol.* 28(10):3240–3251.
- Brown, D. M., and E. Ruoslahti. 2004. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell* 5(4):365–374.
- Brown, J. R. 2006. A disaccharide-based inhibitor of glycosylation attenuates metastatic tumor cell dissemination. *Clinical Cancer Research* 12(9):2894–2901.
- Brown, M. C., I. Staniszewska, P. Lazarovici, G. P. Tuszyński, L. Del Valle, and C. Marcinkiewicz. 2008. Regulatory effect of nerve growth factor in  $\alpha 9\beta 1$  integrin-dependent progression of glioblastoma. *Neuro-Oncology* 10(6):968–980.
- Bunn, P. A. 2012. Worldwide overview of the current status of lung cancer diagnosis and treatment. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 136(12):1478–1481.
- Calza, L., L. Giardino, A. Giuliani, L. Aloe, and R. Levi-Montalcini. 2001. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(7):4160–4165.
- Cantarella, G. 2002. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *The FASEB Journal.* 16(10):1307-1309.
- Cardenas, S., M. Scuri, L. Samsell, B. Ducatman, P. Bejarano, A. Auais, M. Doud, K. Mathee, and G. Piedimonte. 2010. Neurotrophic and neuroimmune responses to early-life *Pseudomonas aeruginosa* infection in rat lungs. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 299(3):L334.
- Carmeliet, P., and R. K. Jain. 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 10(6):417–427.
- Chang, L.-Y., Y.-C. Lin, J. Mahalingam, C.-T. Huang, T.-W. Chen, C.-W. Kang, H.-M. Peng, Y.-Y. Chu, J.-M. Chiang, A. Dutta, Y.-J. Day, T.-C. Chen, C.-T. Yeh, and C.-Y. Lin. 2012. Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF- $\beta$ -mediated killing of CD8<sup>+</sup> T cells in colon cancer by T-regulatory cells. *Cancer Research* 72(5):1092–1102.
- Chao, M. V. 2003. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4(4):299–309.

- Chao, M. V., R. Rajagopal, and F. S. Lee. 2006. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin. Sci.* 110(2):167–173.
- Charni, F., V. Friand, O. Haddad, H. Hlawaty, L. Martin, R. Vassy, O. Oudar, L. Gattegno, N. Charnaux, and A. Sutton. 2009. Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1790(10):1314–1326.
- Chen, Q., and J. Massague. 2012. Molecular pathways: VCAM-1 as a potential therapeutic target in metastasis. *Clinical Cancer Research* 18(20):5520–5525.
- Cho, Y. B., W. Y. Lee, S.-J. Choi, J. Kim, H. K. Hong, S.-H. Kim, Y.-L. Choi, H. C. Kim, S. H. Yun, H.-K. Chun, and K. U. Lee. 2012. CC chemokine ligand 7 expression in liver metastasis of colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 28(2):689–694.
- Claesson-Welsh, L., and M. Welsh. 2013. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med* 273(2):114–127.
- Colotta, F., P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, and A. Mantovani. 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30(7):1073–1081.
- Com, E., C. Lagadec, A. Page, I. El Yazidi-Belkoura, C. Slomianny, A. Spencer, D. Hammache, B. B. Rudkin, and H. Hondermarck. 2007. Nerve growth factor receptor TrkA signaling in breast cancer cells involves Ku70 to prevent apoptosis. *Molecular & Cellular Proteomics* 6(11):1842–1854.
- Dalal, R., and D. Djakiew. 1997. Molecular characterization of neurotrophin expression and the corresponding tropomyosin receptor kinases (trks) in epithelial and stromal cells of the human prostate. *Mol. Cell. Endocrinol.* 134(1):15–22.
- DeBerardinis, R. J., J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, and C. B. Thompson. 2008. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism* 7(1):11–20.
- DeNardo, D. G., P. Andreu, and L. M. Coussens. 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29(2):309–316.
- Descamps, S. 2001. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 276(21):17864–17870.
- Dirat, B., L. Bochet, M. Dabek, D. Daviaud, S. Dauvillier, B. Majed, Y. Y. Wang, A. Meulle, B. Salles, S. Le Gonidec, I. Garrido, G. Escourrou, P. Valet, and C. Muller. 2011. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Research* 71(7):2455–2465.

- Dollé, L., E. Adriaenssens, I. El Yazidi-Belkoura, X. Le Bourhis, V. Nurcombe, and H. Hondermarck. 2004. Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 4(6):463–470.
- Dollé, L., I. El Yazidi-Belkoura, E. Adriaenssens, V. Nurcombe, and H. Hondermarck. 2003. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 22(36):5592–5601.
- Dovas, A., A. Patsialou, A. S. Harney, J. Condeelis, and D. Cox. 2012. Imaging interactions between macrophages and tumour cells that are involved in metastasis in vivo and in vitro. *J Microsc.* DOI: 10.1111/j.1365-2818.2012.03667.x
- Dowell, J. E., and J. D. Minna. 2006. EGFR mutations and molecularly targeted therapy: a new era in the treatment of lung cancer. *Nat Clin Prac Oncol* 3(4):170–171.
- Downey, G. P., G. S. Worthen, P. M. Henson, and D. M. Hyde. 1993. Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation: Capillary localization and migration across the interalveolar septum. *Am Rev Respir Dis* 147(1):168–176.
- Estrach, S., S. Schmidt, S. Diriong, A. Penna, A. Blangy, P. Fort, and A. Debant. 2002. The human Rho-GEF trio and its target GTPase RhoG are involved in the NGF pathway, leading to neurite outgrowth. *Curr. Biol.* 12(4):307–312.
- Ezernitchi, A. V., I. Vaknin, L. Cohen-Daniel, O. Levy, E. Manaster, A. Halabi, E. Pikarsky, L. Shapira, and M. Baniyash. 2006. TCR zeta down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs. *J. Immunol.* 177(7):4763–4772.
- Fidler, I. J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3(6):453–458.
- Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1(1):27–31.
- Freund, V., F. Pons, V. Joly, E. Mathieu, N. Martinet, and N. Frossard. 2002. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *European Respiratory Journal* 20(2):458–463.
- Fridlender, Z. G., and S. M. Albelda. 2012. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 33(5):949–955.
- Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pagès, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoué, P. Bruneval, P.-H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.-H. Fridman, and F. Pagès. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313(5795):1960–1964.

- García-Suárez, O., P. Pérez-Pinera, R. Laurà, A. Germana, I. Esteban, R. Cabo, I. Silos-Santiago, J. Cobo, and J. Vega. 2009. TrkB is necessary for the normal development of the lung. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 167(3):281–291.
- Gocheva, V., H.-W. Wang, B. B. Gadea, T. Shree, K. E. Hunter, A. L. Garfall, T. Berman, and J. A. Joyce. 2010. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes & Development* 24(3):241–255.
- Granville, C. A., R. M. Memmott, A. Balogh, J. Mariotti, S. Kawabata, W. Han, J. Lopiccolo, J. Foley, D. J. Liewehr, S. M. Steinberg, D. H. Fowler, M. C. Hollander, and P. A. Dennis. 2009. A central role for Foxp3+ regulatory T cells in K-Ras-driven lung tumorigenesis. *PLoS ONE* 4(3):e5061.
- Grivennikov, S. I., F. R. Greten, and M. Karin. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140(6):883–899.
- Gupta, G. P., J. Massagué. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127(4):679–695.
- Haddad, O., R. Chotard-Ghodsnia, C. Verdier, and A. Duperray. 2010. Tumor cell/endothelial cell tight contact upregulates endothelial adhesion molecule expression mediated by NFκB: Differential role of the shear stress. *Experimental Cell Research* 316(4):615–626.
- Haidari, M., W. Zhang, A. Caivano, Z. Chen, L. Ganjehei, A. Mortazavi, C. Stroud, D. G. Woodside, J. T. Willerson, and R. A. F. Dixon. 2012. Integrin α2β1 mediates tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin induced by invasive breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 287(39):32981–32992.
- Hansen-Algenstaedt, N., P. Algenstaedt, C. Schaefer, A. Hamann, L. Wolfram, G. Cingöz, N. Kilic, B. Schwarzloh, M. Schroeder, C. Joscheck, L. Wiesner, W. Rütther, and S. Ergün. 2006. Neural driven angiogenesis by overexpression of nerve growth factor. *Histochem Cell Biol* 125(6):637–649.
- Hansen, K., B. Wagner, W. Hamel, M. Schweizer, F. Haag, M. Westphal, and K. Lamszus. 2007. Autophagic cell death induced by TrkA receptor activation in human glioblastoma cells. *J Neurochem* 0(0):070717094311002.
- Harel, L., B. Costa, and M. Fainzilber. 2010. On the death Trk. *Dev Neurobiol* 70(5):298–303.
- Harlin, H., Y. Meng, A. C. Peterson, Y. Zha, M. Tretiakova, C. Slingluff, M. McKee, and T. F. Gajewski. 2009. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res.* 69(7):3077–3085.
- Hempstead, B. 2002. The many faces of p75NTR. *Current Opinion in Neurobiology* 12(3):260–267.
- Hermansen, S. E., T. Lund, T. Kalstad, K. Ytrehus, and T. Myrnes. 2011. Adrenomedullin augments the angiogenic potential of late outgrowth endothelial progenitor cells. *AJP: Cell Physiology* 300(4):C783.

- Heyder, C., E. Gloria-Maercker, F. Entschladen, W. Hatzmann, B. Niggemann, K. S. Zänker, and T. Dittmar. 2002. Realtime visualization of tumor cell/endothelial cell interactions during transmigration across the endothelial barrier. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 128(10):533–538.
- Hiratsuka, S., S. Goel, W. S. Kamoun, Y. Maru, D. Fukumura, D. G. Duda, and R. K. Jain. 2011. Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(9):3725–3730.
- Hiratsuka, S., K. Nakamura, S. Iwai, M. Murakami, T. Itoh, H. Kijima, J. M. Shipley, R. M. Senior, and M. Shibuya. 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2(4):289–300.
- Hoehner, J. C., F. Hedborg, L. Eriksson, B. Sandstedt, L. Grimelius, L. Olsen, and S. Pålman. 1998. Developmental gene expression of sympathetic nervous system tumors reflects their histogenesis. *Lab. Invest.* 78(1):29–45.
- Hoyle, G. W., R. M. Graham, J. B. Finkelstein, K. P. Nguyen, D. Gozal, and M. Friedman. 1998. Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18(2):149–157.
- Hsia, C. C. W., D. M. Hyde, M. Ochs, and E. R. Weibel. 2010. An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med* 181(4):394–418.
- Hu, J. 2006. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. *The FASEB Journal* 20(11):1892–1894.
- Hung, J.-J., W.-J. Jeng, T.-Y. Chou, W.-H. Hsu, K.-J. Wu, B.-S. Huang, and Y.-C. Wu. 2013. Prognostic value of the New International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Lung Adenocarcinoma Classification on death and recurrence in completely resected stage I lung adenocarcinoma. *Annals of Surgery*:1. DOI: 10.1097/SLA.0b013e 31828920c0
- Iwamoto, S., R. C. Burrows, S. N. Agoff, M. Piepkorn, M. Bothwell, and R. Schmidt. 2001. The p75 neurotrophin receptor, relative to other Schwann cell and melanoma markers, is abundantly expressed in spindled melanomas. *Am J Dermatopathol* 23(4):288–294.
- Jhun, B. W., K.-J. Lee, K. Jeon, G. Y. Suh, M. P. Chung, H. Kim, O. J. Kwon, J.-M. Sun, J. S. Ahn, M.-J. Ahn, K. Park, J. Y. Choi, K. S. Lee, J. Han, and S.-W. Um. 2013. Clinical applicability of staging small cell lung cancer according to the seventh edition of the TNM staging system. *Lung Cancer* 81(1):65-70.
- Johnson, D., A. Lanahan, C. Buck, A. Sehgal, C. Morgan, E. Mercer, M. Bothwell, M. Chao. 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47(4):545–554.
- Joyce, J. A., and J. W. Pollard. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9(4):239–252.

- Julio-Pieper, M., H. E. Lara, J. A. Bravo, and C. Romero. 2006. Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGFbeta1 in the rat ovary. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4:57.
- Kannagi, R., M. Izawa, T. Koike, K. Miyazaki, and N. Kimura. 2004. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Science* 95(5):377–384.
- Kansas, G. S. 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88(9):3259–3287.
- Kaplan, D. R., and F. D. Miller. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 10(3):381–391.
- Kerschensteiner, M., E. Gallmeier, L. Behrens, V. V. Leal, T. Misgeld, W. E. Klinkert, R. Kolbeck, E. Hoppe, R.-L. Oropeza-Wekerle, I. Bartke, C. Stadelmann, H. Lassmann, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 1999. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in Inflammatory brain lesions: A neuroprotective role of inflammation? *Journal of Experimental Medicine* 189(5):865–870.
- Khajah, M., B. Millen, D. C. Cara, C. Waterhouse, and D.-M. McCafferty. 2011. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): a chemoattractive agent for murine leukocytes in vivo. *J Leukoc Biol* 89(6):945–953.
- Kılıç, A., S. S. Sonar, A. O. Yildirim, H. Fehrenbach, W. A. Nockher, and H. Renz. 2011. Nerve growth factor induces type III collagen production in chronic allergic airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol* 128(5):1058-66.e1-4.
- Kim, S. Y., C. H. Lee, B. V. Midura, C. Yeung, A. Mendoza, S. H. Hong, L. Ren, D. Wong, W. Korz, A. Merzouk, H. Salari, H. Zhang, S. T. Hwang, C. Khanna, and L. J. Helman. 2008. Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. *Clin Exp Metastasis* 25(3):201–211.
- Kim, S., H. Takahashi, W.-W. Lin, P. Descargues, S. Grivennikov, Y. Kim, J.-L. Luo, and M. Karin. 2009. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457(7225):102–106.
- Klemke, M., T. Weschenfelder, M. H. Konstandin, and Y. Samstag. 2007. High affinity interaction of integrin  $\alpha\beta 1$  (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J. Cell. Physiol.* 212(2):368–374.
- Kobayashi, Y. 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front. Biosci.* 13:2400–2407.
- Kopp, H.-G., T. Placke, and H. R. Salih. 2009. Platelet-derived transforming growth factor- $\beta$  down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Research* 69(19):7775–7783.

- Krygiar, S., and D. Djakiew. 2001. Molecular characterization of the loss of p75NTR expression in human prostate tumor cells. *Mol. Carcinog.* 31(1):46–55.
- Kuner, P., and C. Hertel. 1998. NGF induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line expressing the neurotrophin receptor p75NTR. *J. Neurosci. Res.* 54(4):465–474.
- Lagadec, C., S. Meignan, E. Adriaenssens, B. Foveau, E. Vanhecke, R. Romon, R.-A. Toillon, B. Oxombre, H. Hondermarck, and X. Le Bourhis. 2009. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 28(18):1960–1970.
- Laghi, L., P. Bianchi, E. Miranda, E. Balladore, V. Pacetti, F. Grizzi, P. Allavena, V. Torri, A. Repici, A. Santoro, A. Mantovani, M. Roncalli, and A. Malesci. 2009. CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3–T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *The Lancet Oncology* 10(9):877–884.
- Lambiase, A., L. Manni, S. Bonini, P. Rama, A. Micera, and L. Aloe. 2000. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41(5):1063–1069.
- Lazarovici, P., A. Gazit, I. Staniszewska, C. Marcinkiewicz, and P. Lelkes. 2006. Nerve growth factor (NGF) promotes angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane. *Endothelium* 13(1):51–59.
- Lee, S., S. M. Jilani, G. V. Nikolova, D. Carpizo, and M. L. Iruela-Arispe. 2005. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J. Cell Biol.* 169(4):681–691.
- Lee, T.-H., H. K. Avraham, S. Jiang, and S. Avraham. 2003. Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability. *J. Biol. Chem.* 278(7):5277–5284.
- Levi-Montalcini, R. 1998. The saga of the nerve growth factor. *Neuroreport* 9(16):R71–83.
- Lewin, G. R., and Y.-A. Barde. 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 19(1):289–317.
- Liao, Q., Z. Zeng, X. Guo, X. Li, F. Wei, W. Zhang, P. Chen, F. Liang, B. Xiang, J. Ma, M. Wu, H. Tang, M. Deng, X. Zeng, K. Tang, W. Xiong, and G. Li. 2013. LPLUNC1 suppresses IL-6-induced nasopharyngeal carcinoma cell proliferation via inhibiting the Stat3 activation. *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2013.161
- Li, H., C. Ge, F. Zhao, M. Yan, C. Hu, D. Jia, H. Tian, M. Zhu, T. Chen, G. Jiang, H. Xie, Y. Cui, J. Gu, H. Tu, X. He, M. Yao, Y. Liu, and J. Li. 2011. Hypoxia-inducible factor 1 alpha-activated angiopoietin-like protein 4 contributes to tumor metastasis via vascular cell adhesion molecule-1/integrin  $\beta$ 1 signaling in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 54(3):910–919.



- Lim, S.-T., N. L. G. Miller, X. L. Chen, I. Tancioni, C. T. Walsh, C. Lawson, S. Uryu, S. M. Weis, D. A. Cheresch, and D. D. Schlaepfer. 2012. Nuclear-localized focal adhesion kinase regulates inflammatory VCAM-1 expression. *The Journal of Cell Biology* 197(7):907–919.
- Lin, E. Y., J.-f. Li, G. Bricard, W. Wang, Y. Deng, R. Sellers, S. A. Porcelli, and J. W. Pollard. 2007. Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages. *Mol Oncol* 1(3):288–302.
- Lin, E. Y., A. V. Nguyen, R. G. Russell, and J. W. Pollard. 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.* 193(6):727–740.
- Mapp, P. I., and D. A. Walsh. 2012. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 8(7):390–398.
- Marchetti, D., Y. Denkins, J. Reiland, A. Greiter-Wilke, J. Galjour, B. Murry, J. Blust, and M. Roy. 2003. Brain-metastatic melanoma: a neurotrophic perspective. *Pathol. Oncol. Res.* 9(3):147–158.
- Marconi, A., M. C. Panza, M. Bonnet-Duquennoy, K. Lazou, R. Kurfurst, F. Truzzi, R. Lotti, G. de Santis, M. Dumas, F. Bonte, and C. Pincelli. 2006. Expression and function of neurotrophins and their receptors in human melanocytes. *Int J Cosmet Sci* 28(4):255–261.
- Marconi, A., M. Terracina, C. Fila, J. Franchi, F. Bonte, G. Romagnoli, R. Maurelli, C. M. Failla, M. Dumas, and C. Pincelli. 2003. Expression and function of neurotrophins and their receptors in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 121(6):1515–1521.
- Martin-Zanca, D., R. Oskam, G. Mitra, T. Copeland, and M. Barbacid. 1989. Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 9(1):24–33.
- McDonald, B., and P. Kubes. 2010. Chemokines: Sirens of neutrophil recruitment - but is it just one song? *Immunity* 33(2):148–149.
- Micera, A., E. Vigneti, D. Pickholtz, R. Reich, O. Pappo, S. Bonini, F. X. Maquart, L. Aloe, and F. Levi-Schaffer. 2001. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(11):6162–6167.
- Minn, A. J., G. P. Gupta, P. M. Siegel, P. D. Bos, W. Shu, D. D. Giri, A. Viale, A. B. Olshen, W. L. Gerald, and J. Massagué. 2005. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436(7050):518–524.
- Missale, C., A. Codignola, S. Sigala, A. Finardi, M. Paez-Pereda, E. Sher, and P. F. Spano. 1998. Nerve growth factor abrogates the tumorigenicity of human small cell lung cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(9):5366–5371.

- Monaghan-Benson, E., and K. Burrige. 2009. The regulation of vascular endothelial growth factor-induced microvascular permeability requires Rac and reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry* 284(38):25602–25611.
- Montano, X., and M. B. Djamgoz. 2004. Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer. *FEBS Letters* 571(1-3):1–8.
- Monte, L. de, M. Reni, E. Tassi, D. Clavenna, I. Papa, H. Recalde, M. Braga, V. Di Carlo, C. Doglioni, M. P. Protti. 2011. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *Journal of Experimental Medicine* 208(3):469–478.
- Morgan, M. R., M. J. Humphries, and M. D. Bass. 2007. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12):957–969.
- Morris, S. M. 2004. Recent advances in arginine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7(1):45–51.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88(3):355–365.
- Nakagawara, A., M. Arima-Nakagawara, N. J. Scavarda, C. G. Azar, A. B. Cantor, and G. M. Brodeur. 1993. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 328(12):847–854.
- Nakasone, Y., M. Fujimoto, T. Matsushita, Y. Hamaguchi, D. Le Huu, M. Yanaba, S. Sato, K. Takehara, and M. Hasegawa. 2012. Host-derived MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  regulate protective anti-tumor immunity to localized and metastatic B16 melanoma. *Am. J. Pathol.* 180(1):365–374.
- Nguyen, D. X., P. D. Bos, and J. Massagué. 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* 9(4):274–284.
- Nielsen, B. S., L. R. Lund, I. J. Christensen, M. Johnsen, P. A. Usher, L. Wulf-Andersen, T. L. Frandsen, K. Danø, and H. J. G. Gundersen. 2001. A precise and efficient stereological method for determining murine lung metastasis volumes. *The American Journal of Pathology* 158(6):1997–2003.
- Nockher, W. A., and H. Renz. 2006. Neurotrophins in allergic diseases: From neuronal growth factors to intercellular signaling molecules. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117(3):583–589.
- Noga, O., C. Englmann, G. Hanf, A. Grutzkau, S. Guhl, and G. Kunkel. 2002. Activation of the specific neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC influences the function of eosinophils. *Clin Exp Allergy* 32(9):1348–1354.
- Noga, O., M. Peiser, M. Altenähr, H. Knieling, R. Wanner, G. Hanf, R. Grosse, and N. Suttorp. 2007. Differential activation of dendritic cells by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *Clin Exp Allergy* 37(11):1701–1708.

- Noga, O., M. Peiser, M. Altenähr, B. Schmeck, R. Wanner, Q. T. Dinh, G. Hanf, and N. Suttorp. 2008. Selective induction of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor by LPS and allergen in dendritic cells. *Clin Exp Allergy* 38(3):473–479.
- Okamura, K., T. Harada, S. Wang, K. Ijichi, K. Furuyama, T. Koga, T. Okamoto, K. Takayama, T. Yano, and Y. Nakanishi. 2012. Expression of TrkB and BDNF is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 78(1):100–106.
- Olgart Hoglund, C., F. de Blay, J.-P. Oster, C. Duvernelle, O. Kassel, G. Pauli, and N. Frossard. 2002. Nerve growth factor levels and localisation in human asthmatic bronchi. *European Respiratory Journal* 20(5):1110–1116.
- Osborn, L., C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso, and R. Lobb. 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59(6):1203–1211.
- Padua, D., X. H.-F. Zhang, Q. Wang, C. Nadal, W. L. Gerald, R. R. Gomis, and J. Massague. 2008. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* 133(1):66–77.
- Palma, M. de, M. A. Venneri, R. Galli, L. Sergi Sergi, L. S. Politi, M. Sampaolesi, and L. Naldini. 2005. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8(3):211–226.
- Palumbo, J. S., K. E. Talmage, J. V. Massari, C. M. La Jeunesse, M. J. Flick, K. W. Kombrinck, M. Jirousková, and J. L. Degen. 2005. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 105(1):178–185.
- Parlakian, A., I. Gomaa, S. Solly, L. Arandel, A. Mahale, G. Born, G. Marazzi, D. Sassoon, and M. V. Blagosklonny. 2010. Skeletal muscle phenotypically converts and selectively inhibits metastatic cells in mice. *PLoS ONE* 5(2):e9299.
- Patapoutian, A., and L. F. Reichardt. 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology* 11(3):272–280.
- Patton, J. S., C. S. Fishburn, and J. G. Weers. 2004. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. *Proc Am Thorac Soc* 1(4):338–344.
- Pauleau, A.-L., R. Rutschman, R. Lang, A. Pernis, S. S. Watowich, and P. J. Murray. 2004. Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J. Immunol.* 172(12):7565–7573.
- Perez-Pinera, P., T. Hernandez, O. García-Suárez, F. Carlos, A. Germana, M. Valle, A. Astudillo, and J. A. Vega. 2007. The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Mol Cell Biochem* 295(1-2):19–26.

- Petersen, R. P., M. J. Campa, J. Sperlazza, D. Conlon, M.-B. Joshi, D. H. Harpole, and E. F. Patz. 2006. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 107(12):2866–2872.
- Poletti, V., G. Poletti, B. Murer, L. Saragoni, and M. Chilosi. 2007. Bronchoalveolar lavage in malignancy. *Semin Respir Crit Care Med* 28(5):534–545.
- Pouliot, N., H. B. Pearson, and a. Burrows. 2013. Investigating metastasis using in vitro platforms. *Metastatic Cancer: Clinical and Biological Perspectives*. ISBN:978-1-58706-659-7
- Prakash, Y. S., M. A. Thompson, L. Meuchel, C. M. Pabelick, C. B. Mantilla, S. Zaidi, and R. J. Martin. 2010. Neurotrophins in lung health and disease. *Expert Review of Respiratory Medicine* 4(3):395–411.
- Psaila, B., and D. Lyden. 2009. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer* 9(4):285–293.
- Qian, B.-Z., and J. W. Pollard. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141(1):39–51.
- Quarcoo, D., O. Schulte-Herbruggen, M. Lommatzsch, K. Schierhorn, G. Hoyle, H. Renz, and A. Braun. 2004. Nerve growth factor induces increased airway inflammation via a neuropeptide-dependent mechanism in a transgenic animal model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 34(7):1146–1151.
- Raap, U., C. Goltz, N. Deneka, M. Bruder, H. Renz, A. Kapp, and B. Wedi. 2005. Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115(6):1268–1275.
- Radeke, M. J., T. P. Misko, C. Hsu, L. A. Herzenberg, and E. M. Shooter. 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 325(6105):593–597.
- Rahbek, U. L., S. Dissing, C. Thomassen, A. J. Hansen, and K. Tritsarlis. 2005. Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 450(5):355–361.
- Raychaudhuri, S. K., and S. P. Raychaudhuri. 2009. NGF and its receptor system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173(1):470–477.
- Raychaudhuri, S. K., S. P. Raychaudhuri, H. Weltman, and E. M. Farber. 2001. Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Archives of Dermatological Research* 293(6):291–295.
- Reichardt, L. F. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361(1473):1545–1564.

- Ren, Y., H.-T. Tsui, R. T.-P. Poon, I. O.-L. Ng, Z. Li, Y. Chen, G. Jiang, C. Lau, W.-C. Yu, M. Bacher, and S.-T. Fan. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 107(1):22–29.
- Ribatti, D., A. Vacca, and M. Presta. 2000. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen. Pharmacol.* 35(5):227–231.
- Ricci, A., L. Felici, S. Mariotta, F. Mannino, G. Schmid, C. Terzano, G. Cardillo, F. Amenta, and E. Bronzetti. 2004. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(1):12–19.
- Ricci, A., P. Graziano, S. Mariotta, G. Cardillo, B. Sposato, C. Terzano, and E. Bronzetti. 2005. Neurotrophin system expression in human pulmonary carcinoid tumors. *Growth Factors* 23(4):303–312.
- Ricci, A., S. Greco, S. Mariotta, L. Felici, E. Bronzetti, A. Cavazzana, G. Cardillo, F. Amenta, A. Bisetti, and G. Barbolini. 2001. Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(4):439–446.
- Ridley, A. J. 2011. Life at the Leading Edge. *Cell* 145(7):1012–1022.
- Rodriguez, P. C., C. P. Hernandez, D. Quiceno, S. M. Dubinett, J. Zabaleta, J. B. Ochoa, J. Gilbert, and A. C. Ochoa. 2005. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J. Exp. Med.* 202(7):931–939.
- Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno, J. Zabaleta, B. Ortiz, A. H. Zea, M. B. Piazuelo, A. Delgado, P. Correa, J. Brayer, E. M. Sotomayor, S. Antonia, J. B. Ochoa, and A. C. Ochoa. 2004. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.* 64(16):5839–5849.
- Romon, R., E. Adriaenssens, C. Lagadec, E. Germain, H. Hondermarck, and X. Le Bourhis. 2010. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Mol. Cancer* 9:157.
- Roux, P. 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology* 67(3):203–233.
- Ruffell, B., N. I. Affara, and L. M. Coussens. 2012. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* 33(3):119–26
- Santambrogio, L., M. Benedetti, M. V. Chao, R. Muzaffar, K. Kulig, N. Gabellini, and G. Hochwald. 1994. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J. Immunol* 153(10):4488–4495.

- Santos, P. M., J. G. Winterowd, G. G. Allen, M. A. Bothwell, and E. W. Rubel. 1991. Nerve growth factor: increased angiogenesis without improved nerve regeneration. *Otolaryngol Head Neck Surg* 105(1):12–25.
- Schuster, C., A. Berger, M. A. Hoelzl, E. M. Putz, A. Frenzel, O. Simma, N. Moritz, A. Hoelbl, B. Kovacic, M. Freissmuth, M. Muller, A. Villunger, L. Mullauer, A.-I. Schmatz, B. Streubel, E. Porpaczy, U. Jager, D. Stoiber, and V. Sexl. 2011. The cooperating mutation or "second hit" determines the immunologic visibility toward MYC-induced murine lymphomas. *Blood* 118(17):4635–4645.
- Seo, K., J. Choi, M. Park, and C. Rhee. 2001. Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas. *J. Vet. Sci.* 2(2):125–130.
- Shibue, T., and R. A. Weinberg. 2009. Integrin 1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(25):10290–10295.
- Simpson, C. D., K. Anyiwe, and A. D. Schimmer. 2008. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Letters* 272(2):177–185.
- Sjöblom, T., S. Jones, L. D. Wood, D. W. Parsons, J. Lin, T. D. Barber, D. Mandelker, R. J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S. D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J. K. V. Willson, A. F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B. H. Park, K. E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, and V. E. Velculescu. 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314(5797):268–274.
- Solomon, H., Y. Buganim, I. Kogan-Sakin, L. Pomeranec, Y. Assia, S. Madar, I. Goldstein, R. Brosh, E. Kalo, T. Beatus, N. Goldfinger, and V. Rotter. 2012. Various p53 mutant proteins differently regulate the Ras circuit to induce a cancer-related gene signature. *J Cell Sci* 125(Pt 13):3144–3152.
- Soria, G., and A. Ben-Baruch. 2008. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett.* 267(2):271–285.
- Staniszewska, I., I. K. Sariyer, S. Lecht, M. C. Brown, E. M. Walsh, G. P. Tuszyński, M. Safak, P. Lazarovici, and C. Marcinkiewicz. 2008. Integrin  $\alpha 9\beta 1$  is a receptor for nerve growth factor and other neurotrophins. *Journal of Cell Science* 121(4):504–513.
- Starczynowski, D. T., W. W. Lockwood, S. Deléhouzée, R. Chari, J. Wegrzyn, M. Fuller, M.-S. Tsao, S. Lam, A. F. Gazdar, W. L. Lam, and A. Karsan. 2011. TRAF6 is an amplified oncogene bridging the RAS and NF- $\kappa$ B pathways in human lung cancer. *J. Clin. Invest.* 121(10):4095–4105.
- Steinle, J. J., and H. J. Granger. 2003. Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation. *Autonomic Neuroscience* 108(1-2):57–62.

- Stephens, P. J., D. J. McBride, M.-L. Lin, I. Varela, E. D. Pleasance, J. T. Simpson, L. A. Stebbings, C. Leroy, S. Edkins, L. J. Mudie, C. D. Greenman, M. Jia, C. Latimer, J. W. Teague, K. W. Lau, J. Burton, M. A. Quail, H. Swerdlow, C. Churcher, R. Natrajan, A. M. Sieuwerts, J. W. M. Martens, D. P. Silver, A. Langerød, H. E. G. Russnes, J. A. Foekens, J. S. Reis-Filho, L. van 't Veer, A. L. Richardson, A.-L. Børresen-Dale, P. J. Campbell, P. A. Futreal, and M. R. Stratton. 2009. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 462(7276):1005–1010.
- Sutter, A., R. J. Riopelle, R. M. Harris-Warrick, and E. M. Shooter. 1979. Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J. Biol. Chem.* 254(13):5972–5982.
- Swann, J. B., and M. J. Smyth. 2007. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* 117(5):1137–1146.
- Tacconelli, A., A. R. Farina, L. Cappabianca, G. DeSantis, A. Tessitore, A. Vetuschi, R. Sferra, N. Rucci, B. Argenti, I. Screpanti, A. Gulino, and A. R. Mackay. 2004. TrkA alternative splicing. *Cancer Cell* 6(4):347–360.
- Tanaka, A., U. Wakita, N. Kambe, T. Iwasaki, and H. Matsuda. 2004. An autocrine function of nerve growth factor for cell cycle regulation of vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313(4):1009–1014.
- Teng, K. K., B. L. Hempstead. 2004. Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61(1):35–48.
- Teng, M. W. L., J. B. Swann, C. M. Koebel, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth. 2008. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *Journal of Leukocyte Biology* 84(4):988–993.
- Travis, W. D., E. Brambilla, M. Noguchi, A. G. Nicholson, K. R. Geisinger, Y. Yatabe, D. G. Beer, C. A. Powell, G. J. Riely, P. E. van Schil, K. Garg, J. H. M. Austin, H. Asamura, V. W. Rusch, F. R. Hirsch, G. Scagliotti, T. Mitsudomi, R. M. Huber, Y. Ishikawa, J. Jett, M. Sanchez-Cespedes, J.-P. Sculier, T. Takahashi, M. Tsuboi, J. Vansteenkiste, I. Wistuba, P.-C. Yang, D. Aberle, C. Brambilla, D. Flieder, W. Franklin, A. Gazdar, M. Gould, P. Hasleton, D. Henderson, B. Johnson, D. Johnson, K. Kerr, K. Kuriyama, J. S. Lee, V. A. Miller, I. Petersen, V. Roggli, R. Rosell, N. Saijo, E. Thunnissen, M. Tsao, and D. Yankelewitz. 2011. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology* 6(2):244–285.
- Truzzi, F., A. Marconi, R. Lotti, K. Dallaglio, L. E. French, B. L. Hempstead, and C. Pincelli. 2008. Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J. Invest. Dermatol.* 128(8):2031–2040.
- Valastyan, S., and R. A. Weinberg. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147(2):275–292.

- Virchow, J. C., P. Julius, M. Lommatzsch, W. Luttmann, H. Renz, and A. Braun. 1998. Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158(6):2002–2005.
- Wagner, J. G., and R. A. Roth. 2000. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.* 52(3):349–374.
- Wang, Y., C. Hagel, W. Hamel, S. Müller, L. Kluwe, and M. Westphal. 1998. Trk A, B, and C are commonly expressed in human astrocytes and astrocytic gliomas but not by human oligodendrocytes and oligodendroglioma. *Acta Neuropathol.* 96(4):357–364.
- Weis, S., J. Cui, L. Barnes, and D. Cheresh. 2004. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J. Cell Biol.* 167(2):223–229.
- Woo, E. Y., H. Yeh, C. S. Chu, K. Schlienger, R. G. Carroll, J. L. Riley, L. R. Kaiser, and C. H. June. 2002. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J. Immunol.* 168(9):4272–4276.
- Xue, Y., S. Lim, Y. Yang, Z. Wang, L. D. E. Jensen, E.-M. Hedlund, P. Andersson, M. Sasahara, O. Larsson, D. Galter, R. Cao, K. Hosaka, and Y. Cao. 2012. PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. *Nat Med* 18(1):100–110.
- Yamashiro, D. J., A. Nakagawara, N. Ikegaki, X. G. Liu, and G. M. Brodeur. 1996. Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas. *Oncogene* 12(1):37–41.
- Yang, L., R. M. Froio, T. E. Sciuto, A. M. Dvorak, R. Alon, and F. W. Luscinskas. 2005. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106(2):584–592. doi:10.1182/blood-2004-12-4942.
- Yu, M., X. Zhou, L. Niu, G. Lin, J. Huang, W. Zhou, H. Gan, J. Wang, X. Jiang, B. Yin, and Z. Li. 2013. Targeting transmembrane TNF- $\alpha$  suppresses breast cancer growth. *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3946
- Zhang, X. H.-F., Q. Wang, W. Gerald, C. A. Hudis, L. Norton, M. Smid, J. A. Foekens, and J. Massagué. 2009. Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals. *Cancer Cell* 16(1):67–78.
- Zhu, Z., J. Kleeff, H. Kaye, L. Wang, M. Korc, M. W. Büchler, and H. Friess. 2002. Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol. Carcinog.* 35(3):138–147.



## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
Ag	Antigen
AJ	adherens junctions
AK	Antikörper
AM	Adrenomedullin
Ang	Angiopoetin
Angptl4	angiopoietin like 4
APS	Ammoniumpersulfat
B16/F10	B16/F10-Melanomzelllinie
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BCA	Bichinonic-Assay
Bcl	B-cell lymphoma
BCR	B-cell receptor
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BM	Basalmembran
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovine serum albumin
C166	C166-Endothelzelllinie
Ca	Kalzium
CAST	computer-assisted stereological toolbox
CBA	cytometric bead array
CCL	chemokine (C-C motif) ligand
CCR	(C-C motif) chemokine receptor
CCSP	Clara cell secretory protein
CD	cluster of differentiation
cDNA	complimentary DNA
CFSE	Carboxyfluoreszin-Succimidyl-Ester
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CSF-1	colony stimulating factor 1
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
CXCR	C-X-C chemokine receptor
DAB	Diaminobenzidin

---

DAG	Diacylglycerol
DAPI	Diaminphenylindol
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzelle ( <i>endothelial cell</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoetin
ERK	extracellular-regulated kinase
Ex/Em	Anregungs-/Emissionswellenlänge ( <i>excitation/emission</i> )
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAK	focal adhesion kinase
FCS	fetal calve serum
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	forkhead box protein 3
G	Gauge
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's buffered salt solution
HCV	Hepatitis C Virus
HDMEC	human dermal microvascular endothelial cells
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	horseradish peroxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
i. n.	intranasal
i. p.	intraperitoneal
i. t.	intratracheal
i. v.	intravenös

---

ICAM	inter cellular adhesion molecule
ID1	inhibitor of DNA-binding 1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-Trisphosphat
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
IU	International Unit
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K <sub>fc</sub>	capillary filtration coefficient
Konz.	Konzentration
LLC	Lewis lung carcinoma
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	magnetic-activated cell sorting
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP	monocyte chemotactic protein
MDSC	myeloid derived suppressor cells
MIP	macrophage inflammatory protein
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger RNA
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
n	Anzahl
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NFκB	kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGF	nerve growth factor
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen ( <i>natural killer cells</i> )
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht signifikant
NSCLC	non small cell lung cancer
NT	Neurotrophin
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
p	Wahrscheinlichkeit p

---

PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	R-Phycoerythrin
PEEP	positive end-expiratory pressure
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Protein-Kinase C
PLC $\gamma$	PhospholipaseC $\gamma$
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
polyHEMA	Polyhydroxymethacrylat
PRR	Pattern recognition receptors
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac	ras-related C3 botulinum toxin substrate
Raf	rat fibrosarcoma
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted
RAS	rat sarcoma
rh	rekombinant human
rlu	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s. c.	subkutan (sub cutaneous)
SCLC	small cell lung cancer
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardabweichung vom Mittelwert
Shc	Src homology 2 domain containing protein
sLE <sup>x</sup> /sLE <sup>a</sup>	Sialyl-Lewis-X/A-Tetrasaccharid
SPARC	secreted protein acidic and rich in cysteine
Src	sarcoma
STAT	signal transducer and activator of transcription
SURS	systematic uniform randomized sampling

---

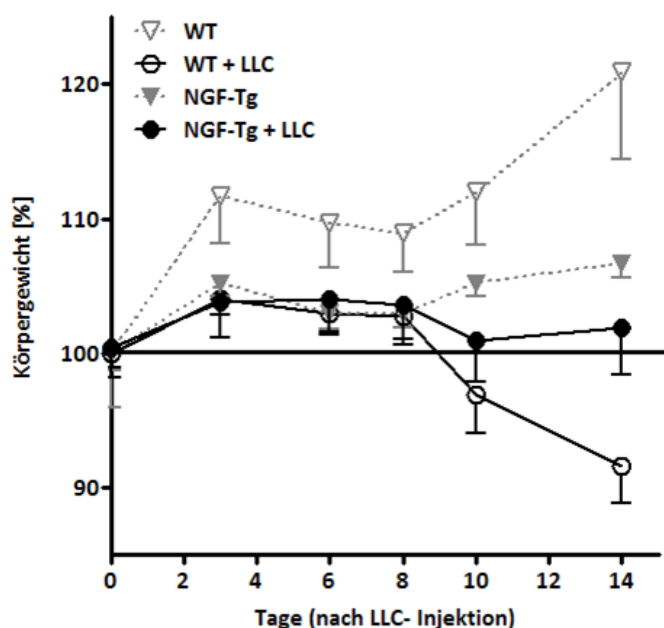
TAM	tumor-associated macrophage
TAN	tumor-associated neutrophil
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST-Puffer	Tris-buffered saline and Tween buffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tg	transgen
TGF	transforming growth factor
Th	T-Helferzelle
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
TJ	tight junctions
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TNF	tumor necrosis factor
TRAF	TNF-receptor-associated factor
Treg-Zellen	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	tropomyosin related kinase
ü. N.	über Nacht
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
V <sub>Lunge</sub>	Lungenvolumen
V <sub>Met</sub>	Metastasenvolumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.	Prozess der Metastasierung .....	10
Abb. 2.	Neurotrophin-Rezeptoren und Signalkaskaden .....	18
Abb. 3.	Hypothese zur NGF-Wirkung bei der pulmonalen Metastasierung .....	26
Abb. 4.	Erhöhte NGF-Konzentration in der BALF im Modell der pulmonalen Metastasierung .....	57
Abb. 5.	Effekt der lokalen NGF-Überexpression auf die pulmonale Metastasierung.....	60
Abb. 6.	Die lokale NGF-Applikation bei WT-Mäusen reduziert die pulmonale Metastasierung nicht. ....	62
Abb. 7.	Lokale Entzündungsreaktion im Modell der pulmonalen Metastasierung .....	65
Abb. 8.	Expression von NGF und NGF-Rezeptoren durch Tumorzellen.....	68
Abb. 9.	Effekt von NGF auf Tumorzellen (LLC-Zellen) <i>in vitro</i> .....	73
Abb. 10.	Effekt von NGF auf die Permeabilität von C166-EC <i>in vitro</i> . ....	75
Abb. 11.	Permeabilität pulmonaler Blutgefäße im <i>ex vivo</i> Modell.....	77
Abb. 12.	Die Extravasation von LLC-Zellen in die Lunge .....	79
Abb. 13.	Extravasation von Tumorzellen in die Lunge nach exogener NGF-Applikation	82
Abb. 14.	Extravasation von Immunzellen im Modell der akuten Atemwegsentszündung	85

## 10 ANHANG

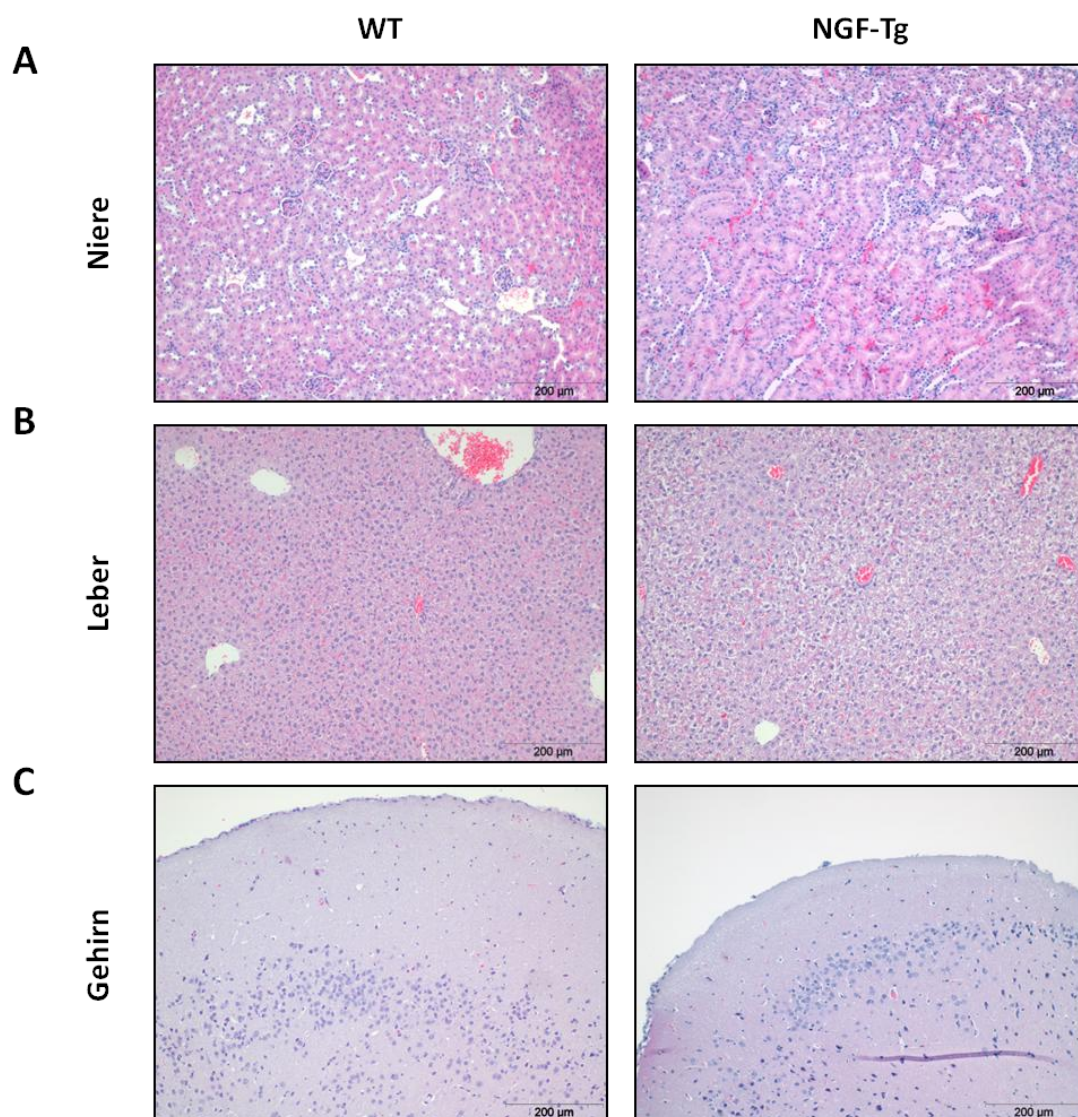
### 10.1 Körpergewicht im Verlauf pulmonalen Metastasierung



Im Modell der pulmonalen Metastasierung über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden die Versuchstiere zweimal wöchentlich gewogen, um einen möglichen Gewichtsverlust festzustellen. Dieser geht häufig mit Tumorerkrankungen einher (Tumorkachexie) und dient als Parameter für den Gesundheitszustand der Tiere.

Es zeigte sich, dass WT- und NGF-Tg Mäuse, denen keine Tumorzellen injiziert wurden eine Gewichtszunahme von 20,8 % (WT) bzw. 6,7 % (NGF-Tg) aufweisen. Wurden den Tieren Tumorzellen injiziert, zeigten NGF-Tg Tiere im Verlauf von 14 Tagen keine auffällige Gewichtsänderung (Zunahme um 1,8 %), wohingegen WT-Tiere, 8,2 % ihres Körpergewichts verloren. Der deutliche Gewichtsverlust der WT-Tiere lässt darauf schließen, dass diese sich in einem schlechteren allgemeinen Gesundheitszustand befinden als die NGF-Tg Tiere

## 10.2 Metastasenbildung in weiteren Organen



An Tag 14 nach Injektion der Tumorzellen wurden die Versuchstiere getötet und Leber, Niere und Gehirn entnommen. Bei der histologischen Analyse der HE-gefärbten Gewebeschnitte konnten keine metastatischen Foci in diesen Organen nachgewiesen werden.



## 11 VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE

### Originalveröffentlichungen:

Sonar SS, Schwinge D, Kilic A, Yildirim AO, Conrad ML, **Seidler K**, Müller B, Renz H, Nockher WA. 2010. Nerve growth factor enhances clara cell proliferation after lung injury. *Eur Respir J*. 36(1):105-15.

### Veröffentlichte Abstracts und Kongressbeiträge:

**K. Seidler**, A. Sydykov, S. Müller-Brüsselbach, R. Müller, N. Weißmann, H. Renz, A. Nockher. 2012. Nerve Growth Factor overexpression in Clara cells suppresses metastasis and tumor growth in a mouse model of experimental lung metastasis. *Pneumologie* 06:319-360. UGMLC/DZL Symposium. 21.-23.06.2012 Marburg. Poster-Präsentation.

**K. Seidler**, A. Sydykov, S. Müller-Brüsselbach, R. Müller, N. Weißmann, H. Renz, A. Nockher. 2012. Nerve Growth Factor overexpression in Clara cells suppresses metastasis and tumor growth in a mouse model of experimental lung metastasis. International vascular biology meeting 2012. 02.-05.06.2012 Wiesbaden. Poster-Präsentation.

**K. Seidler**, A. Nockher, H. Renz. 2011. Impact of NGF on lung metastasis. Joint meeting of the SFB-TR17 'Ras-dependent pathways in human cancer' with the LOEWE Research Cluster 'Tumor and Inflammation'. 10.-13.04.2011 Rothenburg ob der Tauber. Poster-Präsentation.

**K. M. Seidler**, H. Renz, W. A. Nockher. 2009 Proangiogene und Tumor fördernde Eigenschaften des Nerve Growth Factor auf murine Lungenkarzinome *in vitro*. Herbsttagung der Dt. Gesellschaft für Pneumologie, Sektion Zellbiologie. 06.-07.11.2009 Borstel. Vortrag

**K. Seidler**, C. Hahn, H. Renz, A. Nockher. 2008. Lung inflammation and angiogenesis is amplified by epithelial synthesis of nerve growth factor (NGF) during allergic asthma; *CCLM*. 46(9). Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. 21.-24.09.2008 Mannheim; Poster-Präsentation.

**K. Seidler**, S. Sonar, H. Renz, A. Nockher. 2008. Bedeutung des Nerve Growth Factors (NGF) für die Angiogenese im allergischen Asthma bronchiale; *Allergo J*. 17(1). 20. Mainzer Allergie Workshop. 07.-08.03.2008 Mainz. Vortrag.

## **12 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten in Marburg:

Adamkiewicz, Aigner, Bauer, Becker, Daut, del Rey, Eilers, Elsässer, Fritz, Garn, Garten, Grzeschik, Gudermann, Hasilik, Hassel, Jacob, Jungclas, Kirchner, Koolman, Lang, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Lüers, Maisner, Moll, Müller, Müller-Brüsselbach, Nockher, Plant, Renkawitz-Pohl, Renz, Röhm, Röper, Schäfer, Schwarz, Seitz, Suske, Weihe und Westermann

## **13 LEBENS LAUF**

Der Lebenslauf wurde vor dem entgültigen Druck entfernt.

## **14 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Die ehrenwörtliche Erklärung wurde vor dem entgültigen Druck entfernt.

## 15 DANKSAGUNG

- \* Herrn Prof. Dr. Harald Renz danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die Unterstützung während der Promotion.
- \* Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Andreas Nockher danke ich für die gute Zusammenarbeit und vor allem für seine Geduld bis zur Fertigstellung dieser Arbeit.
- \* Prof. Dr. Norbert Weißmann und Dr. Akylbek Sydykov danke ich für die Messung der pulmonalen Permeabilität.
- \* Außerdem danke ich allen Mitgliedern der AG Renz, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
  - Mein besonderer Dank geht an Ayşe Kılıç, die für meine Fragen und Probleme immer ein offenes Ohr und eine konstruktive Lösung hatte.
  - Nicole Disser danke ich für die Zucht und Genotypisierung der vielen Mäuse.
  - Für die harmonische und lustige Zeit im Büro und die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche möchte ich Ayşe Kılıç, Hani Harb, Rouba Ibrahim, Mohammed Al-Rifai und Min Zhao danken. Es war wirklich schön mit Euch!
- \* Für das intensive und schnelle Korrekturlesen des Manuskripts danke ich Ayşe Kılıç und Günter Schmitt.
- \* Ich bedanke mich auch bei meinen Freunden in Marburg und Coburg, die während des Studiums und der Promotion immer wieder für Abwechslung und Aufmunterung gesorgt haben wenn es nötig war.
- \* Mein größter Dank geht an meine Eltern und Tobias, die mir diesen Weg ermöglicht und immer an mich geglaubt haben.