

Untersuchungen zu Invasion und Vaskularisierung  
von intrakraniellen Metastasen  
unter besonderer Betrachtung der Rolle von HIF-1 $\alpha$

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Isabelle Greilich  
aus Gießen

Gießen 2017

Aus dem Institut für Neuropathologie  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Prof. Dr. Till Acker

Gutachter: Prof. Dr. Till Acker

Gutachter: PD Dr. Marco Stein

Tag der Disputation: 01.12.2017

# Inhalt

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung</b>   |           |
| <b>1.1</b> | <b>Hirnmetastasen: Epidemiologie, Klinik, Prognose und aktuelle<br/>Therapiestandards</b>                     | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Epidemiologie   | 1         |
| 1.1.2      | Klinik  | 3         |
| 1.1.3      | Therapie und Prognose   | 3         |
| <b>1.2</b> | <b>Der Metastasierungsprozess</b>   | <b>5</b>  |
| 1.2.1      | Mechanismen der Metastasierung und die Rolle des<br>Hirnparenchyms  | 5         |
| 1.2.2      | Epithelial-mesenchymale und Mesenchymal-epitheliale Transition<br>(EMT und MET) der Tumorzellen               | 8         |
| 1.2.3      | Invasionsmuster   | 11        |
| <b>1.3</b> | <b>Angiogenese</b>  | <b>12</b> |
| 1.3.1      | Regulation der Angiogenese und angiogene Wachstumsfaktoren  | 13        |
| 1.3.2      | Tumorangiogenese/Angiogenese und Tumorprogression   | 14        |
| 1.3.3      | Antiangiogenese in der Tumorthherapie   | 16        |
| <b>1.4</b> | <b>Hypoxie und Hypoxia-inducible factors (HIFs)</b>   | <b>16</b> |
| 1.4.1      | Hypoxie und HIF-1 $\alpha$  | 16        |
| 1.4.2      | HIFs bei Tumoren  | 17        |
| 1.4.3      | Die Bedeutung der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1 $\alpha$ und<br>HIF-2 $\alpha$ in der Tumorprogression | 18        |
| 1.4.4      | HIF-1 $\alpha$ -Inhibition als Therapieansatz bei malignen Tumoren  | 19        |
| <b>1.5</b> | <b>Ziel der Arbeit</b>  | <b>21</b> |
| <b>1.6</b> | <b>Fragestellungen der Arbeit</b>   | <b>22</b> |
| <b>2</b>   | <b>Material und Methoden</b>  |           |
| <b>2.1</b> | <b>Material</b>   | <b>23</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Patientenkollektiv und Gewebeproben</b>  | <b>23</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Darstellung der Tumervaskularisierung und Hypoxie durch<br/>immunhistochemische Färbungen</b>              | <b>25</b> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.3.1      | Darstellung der Tumolvaskularisierung (CD34-Färbung)  | 26        |
| 2.3.2      | HIF-1 $\alpha$ -Färbung   | 26        |
| <b>2.4</b> | <b>Morphometrische Auswertung</b>   | <b>27</b> |
| 2.4.1      | Quantifizierung der Gefäßdichte   | 27        |
| 2.4.2      | Quantifizierung der HIF-1 $\alpha$ -Expression  | 29        |
| <b>2.5</b> | <b>Invasionsverhalten der Tumorzellen</b>   | <b>30</b> |
| <b>2.6</b> | <b>Statistik</b>  | <b>36</b> |
| <b>3</b>   | <b>Ergebnisse</b>   |           |
| <b>3.1</b> | <b>Patientenkollektiv und Verteilung der Primärtumore</b>   | <b>37</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Analyse der Gefäßdichte im Tumor mit der CD34-Färbung</b>  | <b>39</b> |
| <b>3.3</b> | <b>HIF-1<math>\alpha</math>-Expression in Metastasen</b>  | <b>43</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Gefäßdichte und HIF-1<math>\alpha</math>-Expression</b>  | <b>44</b> |
| <b>3.5</b> | <b>Invasionsmuster</b>  | <b>46</b> |
| 3.5.1      | Invasion und Gefäßdichte  | 47        |
| 3.5.2      | Invasionsverhalten der Metastasen in das angrenzende Hirnparenchym in Abhängigkeit von der HIF-1 $\alpha$ -Expression | 48        |
| <b>4</b>   | <b>Diskussion</b>   |           |
| <b>4.1</b> | <b>Diskussion der Ergebnisse im Kontext anderer Studien</b>   | <b>50</b> |
| 4.1.1      | Vaskularisierung der Hirnmetastasen und die Rolle von HIF-1 $\alpha$  | 50        |
| 4.1.2      | Invasion bei Hirnmetastasen   | 55        |
| 4.1.3      | Einfluss der Gefäßdichte auf das Invasionsverhalten der Metastasen  | 56        |
| 4.1.4      | Einfluß von HIF-1 $\alpha$ auf das Invasionsverhalten der Metastasen  | 57        |
| <b>4.2</b> | <b>Stärken und Schwächen der Studie</b>   | <b>59</b> |
| 4.2.1      | Bestimmung von Gefäßdichte und HIF-1 $\alpha$ -Expression   | 59        |
| 4.2.2      | Bestimmung der Invasionstypen der Metastasen  | 62        |
| <b>4.3</b> | <b>Epidemiologische Betrachtungen</b>   | <b>63</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Bedeutung der Studie, unbeantwortete Fragestellungen und Ausblick</b>  | <b>63</b> |

|           |                                 |            |
|-----------|---------------------------------|------------|
| <b>5</b>  | <b>Zusammenfassung</b>          | <b>66</b>  |
| <b>6</b>  | <b>Summary</b>                  | <b>67</b>  |
| <b>7</b>  | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>    | <b>68</b>  |
| <b>8</b>  | <b>Abbildungsverzeichnis</b>    | <b>70</b>  |
| <b>9</b>  | <b>Tabellenverzeichnis</b>      | <b>71</b>  |
| <b>10</b> | <b>Anhang</b>                   |            |
| 10.1      | Abbildungen                     | 72         |
| 10.2      | Tabellen                        | 75         |
| <b>11</b> | <b>References</b>               | <b>86</b>  |
| <b>12</b> | <b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> | <b>99</b>  |
| <b>13</b> | <b>Danksagung</b>               | <b>100</b> |

**No son muertos los que en dulce  
paz descansan, bajo la tumba fría.**

**Muertos son los que tienen  
el alma fría y viven todavía**

*Rubén Darío*

# **1 Einleitung**

Tumorerkrankungen sind für 26 % aller Sterbefälle verantwortlich und stellen damit die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt, 2014). Die Metastasierung des Primärtumors in entfernte Gewebe erfolgt dabei zum einen über das Lymphsystem und zum anderen hämatogen, beispielsweise in das zentrale Nervensystem (ZNS). Nicht abschließend geklärt ist, warum bestimmte Tumore, wie Bronchialkarzinome oder Melanome, häufiger ins ZNS metastasieren als andere. Generell ist wenig über die Pathophysiologie von Hirnmetastasen bekannt, derartige Kenntnisse sind aber unentbehrlich für die Entwicklung neuer Therapieoptionen.

In dieser Arbeit soll die Rolle der Vaskularisierung und Bedeutung der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) bei zerebralen Metastasen von unterschiedlichen Primärtumoren untersucht werden.

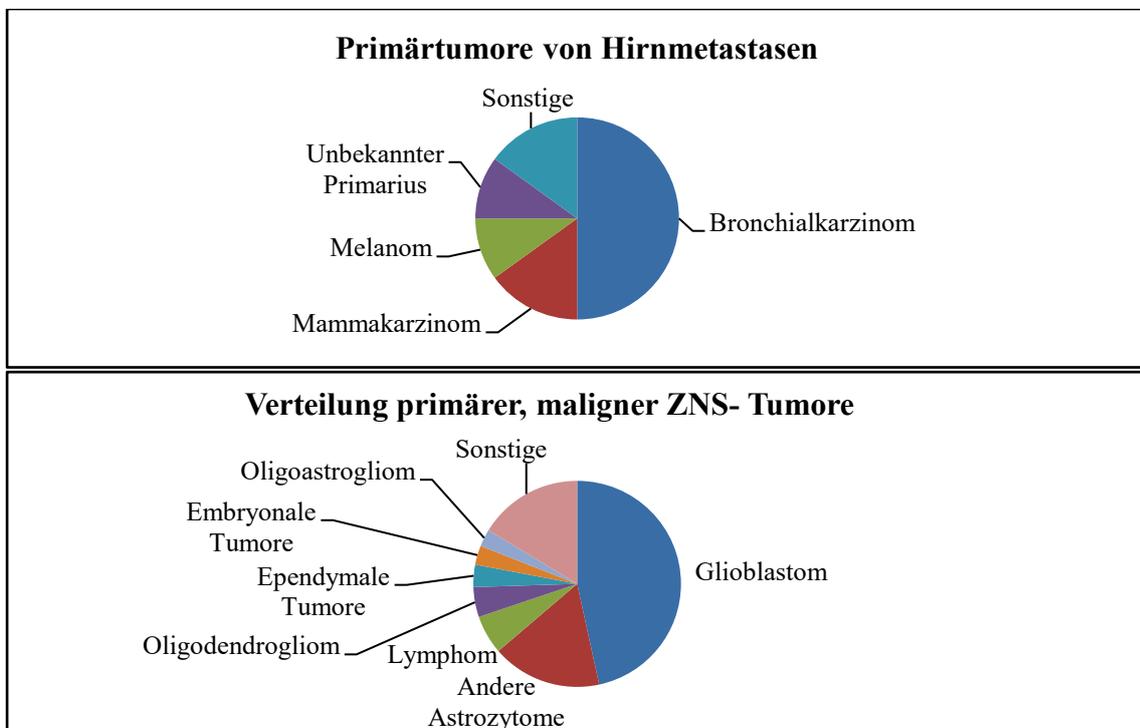
## **1.1 Hirnmetastasen: Epidemiologie, Klinik, Prognose und aktuelle Therapiestandards**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Hirnmetastasen gehören beim Erwachsenen zu den häufigsten malignen Neoplasien des zentralen Nervensystems (ZNS). Die Datenlage über den genauen Anteil ist aufgrund ungenauer Erfassung nicht sicher, so werden in den USA beispielsweise sämtliche primären Hirntumore systematisch vom CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States) erfasst, welches aufgrund seiner hohen Fallzahlen und regelmäßigen Statistiken als eine der wichtigsten Datenquelle auf dem Gebiet der Hirntumore gilt. Allerdings werden Metastasen als sekundäre Hirntumore nicht miterfasst. Studien geben Hinweise darauf, dass Hirnmetastasen mindestens so häufig wie Gliome auftreten, höchstens aber doppelt so oft (Subramanian et al., 2002; Wesseling et al., 2007).

Die Inzidenz von Hirnmetastasen wird als steigend angegeben, wobei bisher nicht abschließend geklärt werden konnte, ob es sich um einen tatsächlichen oder einen scheinbaren Anstieg handelt, der auf verbesserte bildgebende Verfahren, deren häufigere Nutzung und damit bessere Detektion der Metastasen, eine alternde Bevölkerung und bessere Behandlungsmöglichkeiten der Grunderkrankung und damit längere Überlebenszeiten der Patienten zurückgeführt werden kann (Soffietti et al., 2008). In der Literatur finden sich Inzidenzen von u.a. 8,5/100.000 (Walker et al., 1985)

und 11/100.000 (Percy et al., 1972), allerdings wird vermutet, dass diese Zahlen aufgrund von u.a. unzureichender Dokumentation und Diagnostik weitaus höher liegen. In Autopsiestudien konnte gezeigt werden, dass jeder vierte an Krebs verstorbene Patient auch Hirnmetastasen hatte, von denen allerdings nur 2/3 vor dem Tode symptomatisch geworden waren (Gavrilovic und Posner, 2005). Autopsiestudien zeigten außerdem, dass Hirnmetastasen bei 75 % der Patienten multipel auftreten. Häufigkeit und Ursprung der diagnostizierten Hirnmetastasen sind abhängig vom Alter der Patienten, aber nicht vom Geschlecht. Die gefundenen Unterschiede sind möglicherweise auf die unterschiedliche Häufigkeit der jeweiligen Primärtumore wie Bronchial- oder Mammakarzinom bei Mann und Frau zurückzuführen (Barnholtz-Sloan et al., 2004; Suki und Sawaya, 2008). Am häufigsten sind Metastasen von Bronchialkarzinomen (50-60 %), Mammakarzinomen (15-20 %), Melanomen (5-10 %), Nieren- und Kolonkarzinomen (Johnson J. D., Young B., 1996; Patchell et al., 1998). Andere Primärtumore wie beispielsweise Prostata-, Blasen- oder Ovarialkarzinome zeigen seltener eine Metastasierung in das ZNS (Gavrilovic und Posner, 2005). In bis zu 15 % der Fälle ist bei Diagnose einer zerebralen Metastase kein Primärtumor bekannt, dieses Phänomen wird als „cancer of unknown primary“ (CUP) bezeichnet (Maesawa et al., 2000) (Abb. 1).



**Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung der primären, malignen ZNS-Tumore (A) und der Primärtumore von Hirnmetastasen (B).**

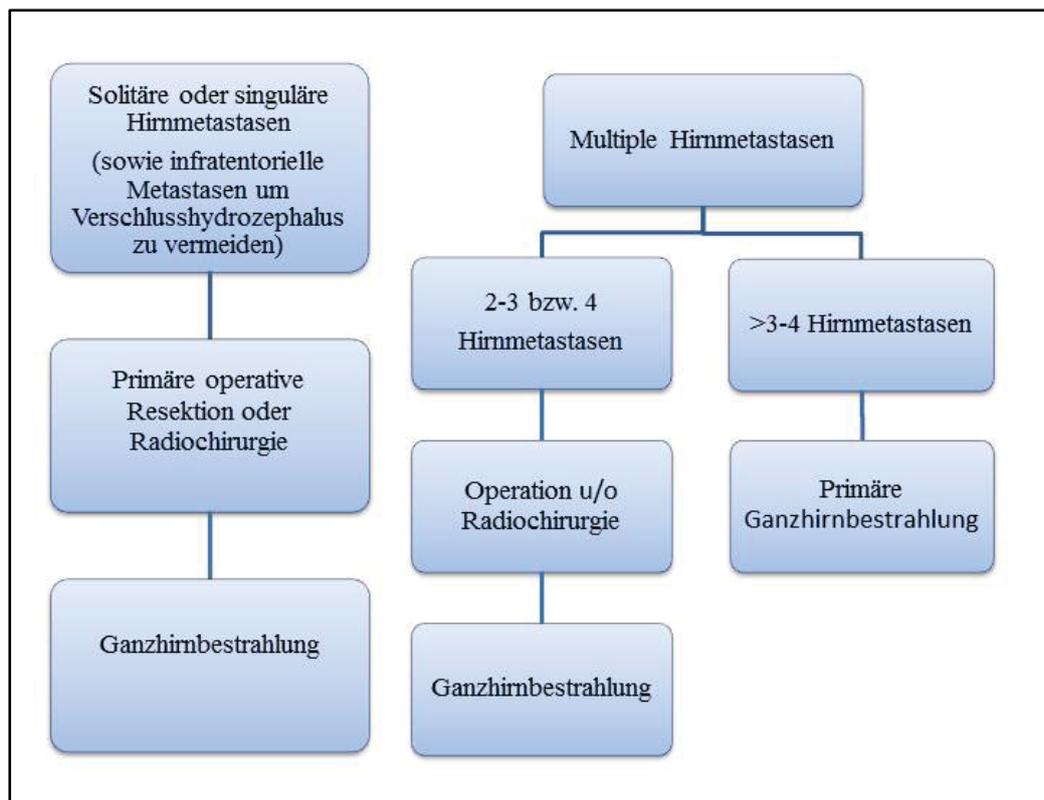
### **1.1.2 Klinik**

Patienten mit zerebralen und/oder zerebellären Metastasen werden meist durch „Kopfschmerzen (50 %), Hemiparesen (50 %), ein organisches Psychosyndrom (30 %), epileptische Anfälle (15 - 20 %) sowie Hirnnervenparesen oder Hirndruckzeichen“ symptomatisch, wobei die Ausfallsymptomatik von der Lokalisation der Metastase(n) abhängt (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2014).

### **1.1.3 Therapie und Prognose**

Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung einer Hirnmetastase liegt auch mit optimaler Therapie bei nur sieben Monaten (Sperduto et al., 2010). Als Behandlung werden aktuell die Resektion der Metastase, offen chirurgisch oder mittels Radiochirurgie, fraktionierte Strahlentherapie sowie medikamentöse Therapien eingesetzt, je nach Therapieplan einzeln oder in Kombination. Dabei werden bei der individuellen Therapieplanung folgende prognostische Faktoren berücksichtigt: Alter des Patienten, Karnofsky-Index, Anzahl der Metastasen und extrazerebrale Tumormanifestationen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2014).

Basierend auf der S2k-Leitlinie „030/060 Hirnmetastasen und Meningeosis neoplastica“ (Stand 03/2014) gelten im deutschen Sprachraum unter Berücksichtigung der aktuellen Forschungsergebnisse folgende Empfehlungen (Abb. 2): Radiochirurgie und Resektion sind nach bisherigen Forschungsergebnissen im Hinblick auf das Behandlungsergebnis (v.a. solitärer oder singulärer Metastasen) prinzipiell gleichwertig und das jeweilige Einsatzgebiet hängt von der klinischen Konstellation ab. Während eine Operation nur bei gut zugänglichen Läsionen sinnvoll ist, kann die Radiochirurgie auch bei tief gelegenen Läsionen eingesetzt werden und ist zudem wesentlich weniger invasiv, die Läsionen sollten für die Radiochirurgie allerdings einen Durchmesser von weniger als 3cm haben. Eine Resektion dient weiterhin der histologischen Diagnosesicherung und der Bestimmung molekularer Veränderungen, die für die Therapie entscheidend sein können (Companion Diagnostik) und führt zu einer schnellen Besserung der klinischen Symptomatik (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2014). Sowohl Radiochirurgie als auch Resektion werden meist mit einer adjuvanten Ganzhirnbestrahlung kombiniert, um die Lokalrezidivrate zu senken, jedoch wird mehreren Studien zufolge hierdurch die Gesamtüberlebenszeit nicht verlängert (Patchell et al., 1998; Kocher et al., 2011).



**Abbildung 2: Therapieschema bei Hirnmetastasen, skizziert nach: Deutsche Gesellschaft für Neurologie, S2-Leitlinie „Metastasen und Meningeosis neoplastica“ (2014).**

Die Prognose ist trotz leitliniengerechter Therapie schlecht, und es wird diskutiert, ob die durch eine Ganzhirnbestrahlung auftretenden kognitiven Störungen nicht vielmehr zusätzlich die Lebensqualität der Patienten beeinträchtigen (Soffietti et al., 2013).

Die medikamentöse Therapie der Metastasen kann allein oder in Kombination mit Strahlentherapie eingesetzt werden. Ein Beispiel ist die Behandlung von Metastasen von kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC, small cell lung cancer) mit den Chemotherapeutika Carboplatin oder Cisplatin.

Eine neue Therapieoption stellt die moderne „targeted therapy“ (gezielte Krebstherapie mit spezifischen Antikörpern und kleinen Molekülen, die gegen Strukturen des Tumors gerichtet sind) dar, die zunehmend auch zur Behandlung von Hirnmetastasen an Bedeutung gewinnt. Die Auswahl des geeigneten Pharmakons richtet sich grundsätzlich nach Histologie und Rezeptor- bzw. molekularen Eigenschaften des Primarius. Dies stellt aber genau die gegenwärtige Limitation dieser Therapien dar: Sie wirken nur auf oft recht begrenzte Subgruppen einer Tumorentität, die über eine bestimmte Struktur

verfügen, beispielsweise einen bestimmten Rezeptor, gegen den das Pharmakon gerichtet ist.

Bei Hirnmetastasen erfolgreich angewendete „targeted therapies“ sind unter anderem Lapatinib plus Capecatebin bei HER2/neu-positiven (human epidermal growth factor receptor 2) Mammakarzinomen (das bei anderen Organmanifestationen häufig verabreichte Trastuzumab ist nicht Blut-Hirn-Schranken-gängig), die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib bei Melanommetastasen oder der EGFR-Inhibitor (epidermal growth factor receptor) Erlotinib bei Metastasen von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC, non-small cell lung cancer) mit distinkten EGFR-Mutationen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2014). Ein Problem der „targeted therapies“ liegt darin, dass es sich bei Tumoren und deren Metastasen um heterogene Zellpopulationen handelt, was die Expression der Rezeptoren angeht, gegen den die Pharmaka gerichtet sind. So wurden für viele Karzinome Diskordanzen zwischen Primärtumoren und deren Metastasen bei der Expression eines Zielrezeptors beschrieben, beispielsweise von HER2/neu beim Mammakarzinom. Selbst zwischen verschiedenen Metastasen desselben Primärtumors wurden derartige Diskordanzen beschrieben. Außerdem erreichen viele systemisch angewendete Pharmaka aufgrund der Besonderheiten von Blut-Hirn- bzw. Blut-Tumor-Schranke in den Hirnmetastasen keine ausreichenden Wirkspiegel (Preusser et al., 2012; Berghoff et al., 2014).

Zusammengenommen bedeutet dies, dass weitere Forschung zum Verständnis der zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen der zerebralen Metastasierung dringend erforderlich ist, um neue spezifische Therapien zu entwickeln.

## **1.2 Der Metastasierungsprozess**

### **1.2.1 Mechanismen der Metastasierung und die Rolle des Hirnparenchyms**

Nach der „seed and soil“-Hypothese von Paget aus dem Jahre 1889 kann eine erfolgreiche Metastasierung nur dann stattfinden, wenn die Tumorzellen als „seed“ mit den ihnen inhärenten Eigenschaften und der Boden, „soil“, auf den sie treffen, kompatibel sind (Paget, 1889). Ein wegweisendes Experiment zur Bestätigung dieser Theorie stammt aus dem Jahr 1980. In einem Mausversuch wurden Melanomzellen intravenös injiziert und obwohl die Melanomzellen auf dem Blutweg in verschiedenste Gewebe und Organe gelangten, kam es nicht in allen Organen zu einer Metastasenbildung (Hart und Fidler, 1980). Damit gut vereinbar ist, dass Lungen-,

Nieren-, Mamma- sowie kolorektale Karzinome und Melanome häufig ins Gehirn metastasieren, dagegen Prostata-, Leber-, Blasen-, Magen- oder Pankreaskarzinome nur sehr selten (Weiss, 1992).

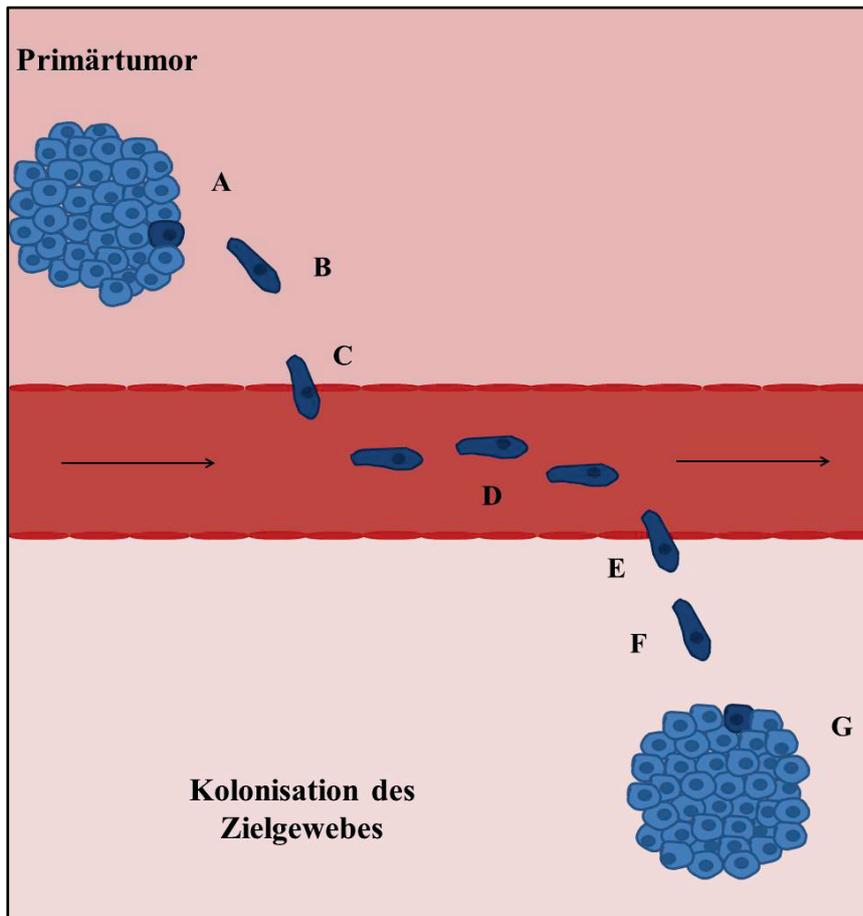
Die Metastasierung eines Primärtumors ist ein anspruchsvoller, hochselektiver Vorgang. Die Tumorzelle muss eine Reihe von Hürden überwinden, von denen jede das potentielle Ende der Metastasierungskaskade bedeutet (Abb.3). Ausgehend von einer epithelialen Tumorzelle löst diese in einem ersten Schritt ihre Zell-Zell-Kontakte sowie die Kontakte zur Basalmembran. Dann bewegt sie sich durch das darunterliegende Mesenchym, um schließlich zwischen Endothelzellen hindurch in ein Blutgefäß einzuwandern (Intravasation). Einmal im Blutkreislauf angekommen, muss sie der drohenden Apoptose aufgrund von fehlenden Zellkontakten (Anoikis) entgehen und dem Immunsystem entkommen. Im Zielgewebe angekommen bindet sie an Endothelzellen und verlässt den Blutstrom wieder (Extravasation). Die letzten Schritte, einmal am Zielort angekommen, stellen die erfolgreiche Implantation, Proliferation und Induktion der Angiogenese dar (Mendoza und Khanna, 2009).

Das Hirnparenchym als „soil“ weist dabei einige wichtige Besonderheiten im Vergleich mit anderen Zielgeweben von Metastasierung auf. Neben einer veränderten Zusammensetzung der extrazellulären Matrix besitzt das ZNS kein Lymphsystem und die intakte Blut- Hirn-Schranke (BHS) verhindert das Eindringen vieler Pharmaka. So konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass sowohl primäre Hirntumore als auch Metastasen resistent zumindest gegenüber den untersuchten Chemotherapeutika waren (Felgenhauer, 1986).

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die BHS in Hirnmetastasen mit einer Tumorfläche von mehr als 0,2mm<sup>2</sup> allerdings nicht intakt war und schloss daraus, dass die Blut-Hirn-Schranke für das vorgenannte Phänomen der weitgehenden Chemoresistenz nicht allein verantwortlich sein konnte (Fidler, 2011). Auch eine radiologische Studie kam zu dem Ergebnis, dass die BHS in 70 % der Metastasen nicht intakt war, da die Gefäße im Tumor durchlässig für Kontrastmittel waren (Rowley et al., 2008; Langley und Fidler, 2011).

Vielmehr scheint das Hirnparenchym nicht nur Opfer sondern auch (Mit-)Täter zu sein. Astrozyten, die eigentlich Neurone vor toxischen Substanzen schützen sollen, werden von Tumorzellen instrumentalisiert und schützen diese durch direkte Zell-Zell-Kontakte

vor den Effekten der chemotherapeutischen Agenzien (Langley et al., 2009; Fidler, 2011). Außerdem erleichtern Astrozyten den Tumorzellen die Invasion ins Hirnparenchym, indem sie Heparanase und Hyaluronidase sezernieren (Delpech et al., 2002; Wang et al., 2013) bzw. von Tumorzellen zur Sekretion von protumorigenen Zytokinen umprogrammiert werden (Chen et al., 2016).



**Abbildung 3: Metastasierungskaskade. Modifiziert nach Chaffer und Weinberg (2011).**

Eine (epitheliale) Tumorzelle löst ihre Zellkontakte sowie die Kontakte zur Basalmembran (A), löst sich vom Primärtumor ab und migriert durch das umgebende Stroma (B). Die Tumorzelle trifft auf ein Blutgefäß, wandert in dieses ein (Intravasation) (C) und wird mit dem Blutstrom in entfernte Organe transportiert (D). Im Zielgewebe angekommen bindet sie an Endothelzellen und verlässt den Blutstrom wieder (Extravasation) (E). Die Tumorzelle wandert in das Zielgewebe ein (F), es kommt schließlich zu Implantation sowie Proliferation der Tumorzelle und der Induktion der Angiogenese (G).

### **1.2.2 Epithelial-mesenchymale und Mesenchymal-epitheliale Transition (EMT und MET) der Tumorzellen - Schlüssel zu erfolgreicher Metastasierung und infiltrativem Metastasenwachstum?**

Die amerikanische Entwicklungsbiologin Elisabeth Hay prägte in den 60er Jahren bei Forschungsarbeiten zur Gastrulation das Konzept und den Begriff der EMT (epithelial-mesenchymal transition) (Trelstad et al., 1967), welche eine große Rolle in der Pathophysiologie der Metastasenbildung spielt. Aufgrund der später gezeigten Reversibilität wird die epithelial-mesenchymale Transition heute als „epithelial-to-mesenchymal transition“ bezeichnet (Hay, 1968, 1995).

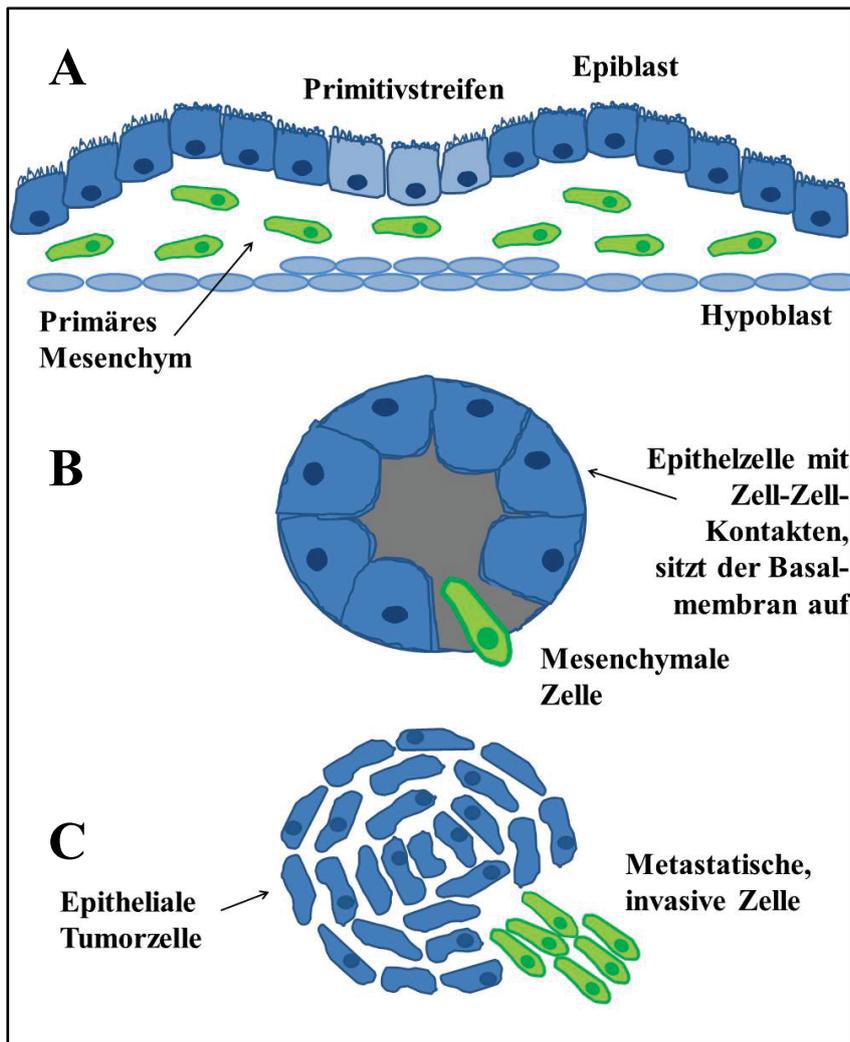
Bei der EMT differenzieren sich Epithelzellen in mesenchymale Stammzellen, während bei der MET dementsprechend eine Differenzierung von mesenchymal zu epithelial erfolgt. Epithelzellen verfügen über ausgeprägte Zellkontakte, z.B. Tight Junctions, Gap Junctions und Adhaerens Junctions, sowie eine apiko-basale Polarisierung und sitzen einer Basalmembran auf. Mesenchymale Zellen verfügen demgegenüber nicht über diese Polarität. Sie sind spindelförmig und ihre Zellkontakte beschränken sich auf „focal-points“ (Thiery und Sleeman, 2006). Dafür sind sie allerdings in der Lage, sich als Einzelzellen durch die extrazelluläre Matrix (EZM) zu bewegen (Hay, 1995).

Seit ihrer Erstbeschreibung wurden verschiedene Funktionen der EMT/MET beschrieben und in drei Typen eingeteilt (Kalluri und Weinberg, 2009) (Abb. 4).

Typ 1: Physiologische EMT im Rahmen der embryologischen Entwicklung, beispielsweise bei Gastrulation oder Neuralrohrbildung, also dem Zusammenhang, in dem sie auch entdeckt wurde.

Typ 2: EMT bei Wundheilung oder Fibrose, die als eine überschießende Wundheilung verstanden werden kann.

Typ 3: EMT bei Tumoren.



**Abbildung 4: EMT Typen. Modifiziert nach Kalluri und Weinberg (2009).**

(A) EMT Typ 1: Es handelt sich um die physiologische EMT während der embryologischen Entwicklung (beispielsweise bei Gastrulation oder Neuralrohrbildung).

(B) EMT Typ 2: EMT bei Wundheilung oder Fibrose.

(C) EMT Typ 3: EMT bei Tumoren.

Während der EMT verliert die Epithelzelle ihre Zellkontakte und Polarität und gewinnt die Fähigkeit zur Migration. Diese Eigenschaft ist wichtig für eine Metastasierung und Tumorprogression (Thiery, 2002).

Ein wesentlicher Schritt zur Einleitung der EMT ist der sogenannte „cadherin switch“: Während Epithelzellen E-Cadherin exprimieren, welches für den Zellzusammenhalt und damit die Integrität des Epithelverbandes unverzichtbar ist, findet sich auf Mesenchymzellen N-Cadherin. Um die EMT einzuleiten, muss E-Cadherin reprimiert

werden. Ein bedeutender Vertreter der Repressoren ist der Transkriptionsfaktor TWIST-1, der in diesem Zusammenhang beispielsweise bei Mammakarzinomen oder Melanomen beobachtet werden konnte (Rahmathulla et al., 2012). Weitere Transkriptionsfaktoren, die via Repression von E-Cadherin die EMT aktivieren, sind Snail, Slug oder SIP-1. Die Aktivität der E-Cadherin-Repressoren wird dabei streng kontrolliert (Acloque et al., 2008). Interessant ist, dass für viele dieser Faktoren ein Zusammenhang mit Tumorinvasion und Metastasierung gezeigt werden konnte (Yang und Weinberg, 2008).

Bei der Aktivierung der EMT ist das den Tumor umgebende Mikromilieu ebenso wichtig wie die intrinsischen Faktoren. Der am besten untersuchte Weg ist die Aktivierung von Snail, Slug und Sip-1 durch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) (Peinado et al., 2003), der beispielsweise von Astrozyten sezerniert wird (Sierra et al., 1997). TGF- $\beta$  induziert EMT synergistisch mit den beiden Wachstumsfaktoren PDGF (platelet-derived growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor) (Ostman und Heldin, 2007).

Interessanterweise konnte zuletzt in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Hypoxie/HIF die EMT aktiviert und damit als wichtige Schnittstelle zwischen Tumorphoxie und Invasivität betrachtet werden kann. HIF- $\alpha$  induziert hierbei bei verschiedenen Zelltypen die Expression von Faktoren, die bedeutend für die Einleitung der EMT sind, so zum Beispiel den bereits zuvor erwähnten TGF- $\beta$  oder auch die Aktivierung u.a. der für die EMT wichtigen Transkriptionsfaktoren Twist, Snail oder Slug (Jiang et al., 2011; Bednarz-Knoll et al., 2012).

EMT/MET ist wichtig für die Invasion der Tumorzellen, also den ersten Schritt der Metastasierungskaskade (Rahmathulla et al., 2012; Ramakrishna und Rostomily, 2013). Bisher nicht sicher geklärt ist allerdings, ob im Zielgewebe der umgekehrte Vorgang, also MET, eingeleitet wird, sich die Tumorzellen in einem Gleichgewicht aus EMT/MET befinden oder vielmehr gänzlich andere genetische Programme in den weiteren Ablauf involviert sind. Für den Ablauf von MET der Tumorzellen, nachdem sie erfolgreich im Hirnparenchym angekommen sind, sprechen die Expression von epithelialen Markern wie E-Cadherin und die Ähnlichkeit der Metastasen mit dem Ursprungstumor (Ramakrishna und Rostomily, 2013). Zudem wird angenommen, dass eine zweite Phase von EMT (Ramakrishna und Rostomily, 2013) für die Invasivität der

gebildeten Metastasen verantwortlich ist und in Abhängigkeit vom Mikromilieu reguliert wird.

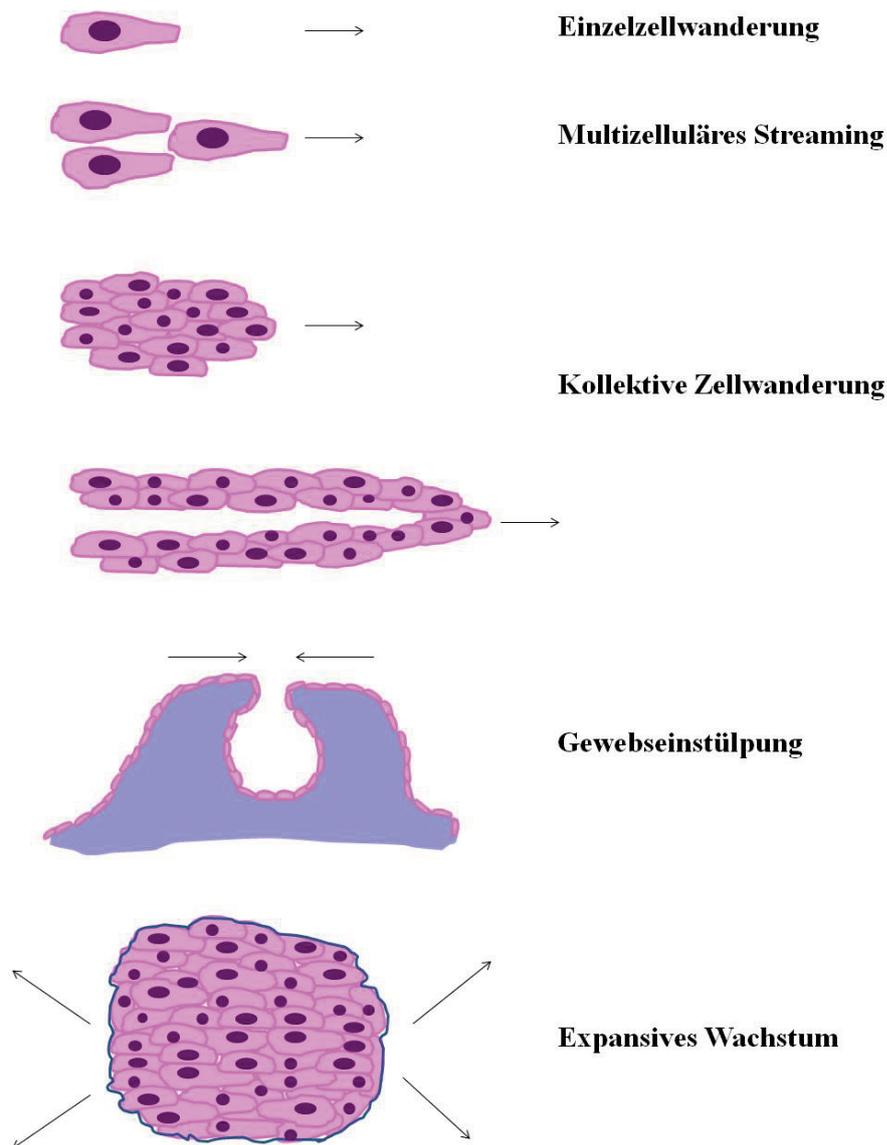
### **1.2.3 Invasionsmuster**

Bei der Invasion von Tumoren handelt es sich um einen heterogenen Prozess, der stark vom Mikromilieu abhängig ist. Die Tumorzellen wandern dabei einzeln oder in Gruppen (Friedl und Wolf, 2010), zum Beispiel durch die Einzelzellablösung von einem Primärtumor bzw. Einzelzellwanderung durch (vollständige) EMT, wie sie bei Lymphomen, Leukämien oder einzelnen soliden Tumoren gezeigt werden konnte.

Wie in Abbildung 5 dargestellt unterscheidet Friedl Einzelzellmigration, multizelluläres Streaming, kollektive Zellmigration, „tissue folding“ (Einstülpung von Gewebe) und expansives Wachstum als unterschiedliche aber überlappende Formen, wobei bei den beiden letztgenannten keine aktive Zellbewegung vorliegt. Mehrere Formen können bei ein und demselben Tumor vorliegen (Friedl et al., 2012).

Für viele Tumorentitäten, wie zum Beispiel einen Großteil der Mamma- oder Bronchialkarzinome, ist die kollektive Zellwanderung die am häufigsten beobachtete Invasionsform (Friedl et al., 1995; Nabeshima et al., 1999). Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind noch nicht geklärt. Möglicherweise spielt die EMT auch bei diesem Prozess eine wichtige Rolle (Friedl et al., 2012). Partielle EMT ist ein interessantes Phänomen, welches physiologisch im Rahmen der Wundheilung (Typ 2 der EMT) beobachtet werden kann. Es handelt sich um ein Nebeneinander von Zellmotilität bei vorhandenen Zellkontakten (Arnoux et al., 2008).

Möglicherweise wird die kollektive Zellwanderung von EMT-Signalen in einer Höhe unter dem Schwellenwert der kompletten EMT oder über kurzfristige Oszillationen von EMT-Triggern aktiviert und es handelt sich um quantitative statt qualitative Änderung von Zellkontakten und Mobilität (Friedl et al., 2012). Unter dem Konstrukt der kollektiven Zellwanderung wurden verschiedene Subformen beschrieben, die von kleinen Zellclustern bis zu größeren Strukturen reichen, die ihrerseits ein eigenes Lumen ausbilden können und bei denen nicht mehr jede Zelle Kontakt zur EZM besitzt. Als Ursache der verschiedenen Muster werden unter anderem eine unterschiedliche Kombination aus Proteolyse, Protrusion, Expansion und Gewebetyp, auf den die Zellen treffen, vermutet (Friedl et al., 2012).



**Abbildung 5: Formen der Tumorzellinvasion. Modifiziert nach Friedl (2012).** Typische Muster der Tumorzellinvasion sind Einzelzellmigration, multizelluläres Streaming, kollektive Zellmigration, „tissue folding“ (Einstülpung von Gewebe) und expansives Wachstum. Es handelt sich grundsätzlich um unterschiedliche Formen, aber Überlappungen konnten beobachtet werden. Außerdem können mehrere der genannten Formen bei ein und demselben Tumor vorliegen.

### 1.3 Angiogenese

Die Bildung eines ersten, primitiven Gefäßnetzwerkes aus endothelialen Vorläuferzellen während der Embryogenese wird als Vaskulogenese bezeichnet, während der geordnete Umbau dieses primären Gefäßsystems und die Gefäßneubildung

durch kapilläre Aussprossung aus bestehenden Gefäßen im adulten Organismus Angiogenese genannt wird (Carmeliet, 2005a).

Damit eine neue Kapillare entstehen kann, müssen zunächst Endothelzellen eines bestehenden Gefäßes die Basalmembran und die das Gefäß umgebende EZM auflösen, um durch die Gefäßwand hindurch auf einen angiogenen Stimulus zuwandern zu können. Bei diesem Stimulus kann es sich beispielsweise um eine kleine Tumorzellansammlung handeln. Der vordersten, auch als „tip cell“ bezeichneten Zelle folgend, bewegen sich die Endothelzellen auf den angiogenen Stimulus zu, proliferieren und bilden eine kapilläre Sprosse, die dann ein Lumen ausbildet. Im nächsten Schritt verbinden sich die Spitzen zweier solcher Sprossen, sodass Blut fließen kann. Zum Schluss wird das entstandene Gefäß u.a. durch die erneute Ausbildung einer Basalmembran sowie Perizyten stabilisiert. Nun können sich die Tumorzellen um die neu entstandenen Gefäßknäuel herum ansiedeln (Ausprunk und Folkman, 1977; Folkman, 1985, 1986).

Physiologisch kommt die Angiogenese im adulten Organismus bei der Wundheilung oder in den weiblichen Reproduktionsorganen, z.B. während Ovulation oder Schwangerschaft, vor und findet zeitlich selbstlimitierend statt (Hanahan und Folkman, 1996; Folkman, 2007).

Pathologisch spielt die Angiogenese als zentraler Prozess für eine große Anzahl von Erkrankungen eine Rolle, beispielsweise bei der altersbedingten Makuladegeneration, Psoriasis, rheumatoider Arthritis aber auch bei malignen Tumoren (Folkman, 1995). Die pathologische Angiogenese ist im Gegensatz zu der physiologischen Angiogenese oft nicht zeitlich begrenzt und kann für Jahre andauern (Folkman, 2007).

### **1.3.1 Regulation der Angiogenese und angiogene Wachstumsfaktoren**

Damit in einem Gewebe die Angiogenese aktiviert wird, muss es zuvor zum sogenannten „angiogenic switch“ kommen. Hierbei kommt es zu einer Störung des Gleichgewichtes aus pro- und antiangiogenen Faktoren (Carmeliet, 2003), welches sich zugunsten der Angiogenese verschiebt (Folkman, 1985, 1986; Hanahan und Folkman, 1996). Ein entscheidender Mechanismus, vor allem im Hinblick auf Tumorangiogenese, ist die Aktivierung der Angiogenese durch Hypoxie. Mit Zunahme der Tumorgöße wächst auch der Sauerstoffbedarf kontinuierlich; kann dieser nicht mehr gedeckt werden, weil der Tumor beispielsweise zu schnell wächst, kommt es zu lokaler

Hypoxie. Durch die Hypoxie kommt es zu einer Aktivierung von Hypoxie-induzierbaren Faktoren wie z.B. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), und dann zur Sezernierung von VEGF (Semenza, 2003; Mohamed et al., 2004). VEGF fungiert als angiogener Stimulus, die Endothelzellen bestehender Gefäße proliferieren und sprossen aus. Damit kommt es zur Ausbildung neuer Kapillaren und zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Gewebes.

Es sind sieben verschiedene VEGF-Isoformen beschrieben (VEGF-A-G), wobei VEGF-C und -D bei der Lymphangiogenese eine Rolle spielen (Karkkainen et al., 2002). VEGF ist ein homodimeres Glykoprotein, welches strukturelle Ähnlichkeit zum „platelet-derived growth factor“ (PDGF) aufweist. Darüber hinaus besitzt VEGF-A eine Wirkung auf die Gefäßpermeabilität: Ein zunächst als „vascular permeability factor“ (VPF) bezeichnetes Molekül (Senger et al., 1983) wurde später als strukturell identisch mit dem von Ferrara isolierten VEGF-A erkannt. Die erhöhte Permeabilität wird durch direkte Wirkung an VEGF-Rezeptoren am Endothel bedingt. In Mausmodellen führt bereits der Verlust eines Allels für VEGF-A zum Tod des Embryos (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996).

### **1.3.2 Tumorangiogenese/Angiogenese und Tumorprogression**

Eine erhöhte VEGF-A-Expression konnte in vielen Tumoren nachgewiesen werden (Ferrara und Keyt, 1997). Außer durch Hypoxie kann die VEGF-A-Genexpression auch durch andere, onkogene Mechanismen eingeleitet werden. Darunter finden sich beispielsweise das mutierte Ras-Gen, erbB2/HER2, der aktivierte EGF-Rezeptor und BCR/ABL (Rak et al., 1995; Carmeliet, 2005b; Mac Gabhann und Popel, 2008; Ferrara, 2009). VEGF-A bindet an die Tyrosinkinaserzeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. Für die Angiogenese im Rahmen des Tumorwachstums ist vor allem VEGFR-2 relevant (Holmes et al., 2007).

Neben dem System aus VEGF-A mit seinen Rezeptoren VEGFR1 und -2 nehmen zwei weitere gefäßendothelspezifische Systeme aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen eine Schlüsselrolle bei Angio- und Vaskulogenese ein.

Das zweite wichtige Rezeptortyrosinkinasesystem bilden die Angiopoetine (Ang1-Ang4) mit ihren Rezeptoren Tie1 und -2. Alle bekannten Angiopoetine binden vor allem an Tie2. Von Bedeutung für die Angiogenese, bzw. für das Remodeling und die Gefäßreifung, ist vor allem Angiopoetin-1 in seiner Bindung an den Tie2-Rezeptor.

Angiopoetin-1 sorgt außerdem für den Erhalt des Ruhezustands und die Stabilisierung des Endothels. In dieser Funktion wird es von Angiopoetin-2 antagonisiert. Außerdem wird vermutet, dass Angiopoetin-1 als Antagonist von VEGF in seiner Wirkung auf die Gefäßpermeabilität fungiert. Die dritte wichtige Gruppe von Rezeptortyrosinkinase-systemen sind die Ephrine A und B mit den EphA und -B Rezeptoren. Ephrin B2 ist nach bisherigen Erkenntnissen neben seiner Rolle für eine korrekte arteriovenöse Differenzierung auch Partner von Angiopoetin-1/Tie2 bei Remodelling und Gefäßreifung zu sein (Yancopoulos et al., 2000).

Ging man zunächst vom Modell des avaskulären Tumors aus, der aufgrund von Hypoxie VEGF ausschüttet, woraufhin Kapillaren einsprossen, konnte später die Existenz eines weiteren Mechanismus auf der Grundlage der sogenannten „vessel co-option“ gezeigt werden: Dabei wird vom Tumor ein bereits bestehendes Gefäß zur Sauerstoff- und Nährstoffversorgung angezapft („ko-optiert“). In einem späteren Stadium kann über die Induktion von Ang2 eine endotheliale Apoptose eingeleitet werden. In der Folge wird der Tumor aufgrund fehlender Gefäßversorgung hypoxisch. Dies wiederum führt, sofern der Tumor über diesen Escapemechanismus verfügt, zur Expression von VEGF, der darauf folgenden Einleitung der Angiogenese und weiterem Tumorwachstum. Allerdings kommt es bei beiden Mechanismen zur Expression von VEGF, sodass VEGF als zentraler Ansatzpunkt für Therapie und Forschung betrachtet werden kann. Für die Ausbildung von Hirnmetastasen konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von VEGF eine notwendige Bedingung ist (Fidler et al., 2002).

Wie Ferrara in seinem Review „VEGF und die Suche nach Angiogenesefaktoren“ beschreibt, beobachteten deutsche Pathologen, unter ihnen Virchow, schon im späten 19. Jahrhundert, dass Tumorwachstum oft von gesteigerter Vaskularisierung begleitet wird. Ide und Mitarbeiter postulierten 1939 sogar, dass Tumore selbst Faktoren sezernieren, um das Gefäßwachstum zu fördern und Algire et. Al zeigten, dass Tumorwachstum auf Gefäßwachstum angewiesen ist (Ferrara, 2002).

Tumore sind ab einer Größe von 1-2mm<sup>3</sup> in ihrem Wachstum auf einen Anschluss an das Blutgefäßsystem z.B. über Angiogenese angewiesen, da hier die Versorgung über Diffusion aus Nachbargefäßen nicht mehr ausreicht (Folkman und Long, D. M. Jr., Becker F. F., 1963). Dabei ist nicht nur das Überleben sondern auch die Möglichkeit zur Metastasierung von Tumoren von der Angiogenese abhängig (Folkman, 1985; Hanahan und Folkman, 1996; Berghoff et al., 2015).

### **1.3.3 Antiangiogenese in der Tumorthherapie**

Der Begriff Antiangiogenese steht für die intensiven Bemühungen während der letzten Jahrzehnte, die Angiogenese aufgrund ihrer Bedeutung für (Tumor-)erkrankungen gezielt zu blockieren, um die Erkrankung zu heilen oder in der Progression zu stoppen.

Folkman hatte bereits 1971 postuliert, dass die gezielte Blockade der Angiogenese eine mögliche Strategie darstellt, einen Tumor in seinem Wachstum aufzuhalten, da Tumorwachstum und Metastasierung von funktionierender Angiogenese abhängig sind (Folkman, 1971). Als erstes antiangiogen wirkendes Medikament wurde 2004 der monoklonale Anti-VEGF-A-Antikörper Bevacizumab (Avastin®), in Kombinationstherapie mit Fluoruracil und Leucovorin, für die Behandlung des metastatischen kolorektalen Karzinoms zugelassen und zeigte ein besseres Überleben der Patienten im Vergleich zur Monotherapie mit Leucovorin (Ferrara und Kerbel, 2005; Hurwitz et al., 2005). Allerdings waren trotz anfänglicher Euphorie auch relativ schnell die Grenzen der neuen Therapiemöglichkeiten deutlich geworden. So erreichte die Anti-VEGF-Therapie mit Bevacizumab wie oben beschrieben nur in Kombination mit Chemotherapie eine Verbesserung des Überlebens (Hurwitz et al., 2005). Die Therapie war nur bei bestimmten Krebsarten wirksam und es kam häufig zu einer Metastasierung (Loges et al., 2009). Forschungen zum Verständnis der Tumorpathophysiologie sind daher unabdingbar, um neue, umfassendere Therapiemöglichkeiten aufzuzeigen.

## **1.4 Hypoxie und Hypoxia-inducible factors (HIFs)**

### **1.4.1 Hypoxie und HIF-1 $\alpha$**

Der menschliche Körper benötigt zur Aufrechterhaltung seiner Stoffwechsellhomöostase genauestens auf seinen Bedarf abgestimmte Mengen an Sauerstoff und Nährstoffen. Dies gilt im Besonderen für das gegenüber Hypoxie sehr empfindliche Gehirn und für schnell wachsende Gewebe wie z.B. Tumore. Während das Blutgefäßsystem als notwendige Infrastruktur unverzichtbar für mehrzellige Organismen ist, nimmt das Hypoxia-inducible transcription factor (HIF)-System eine zentrale Rolle bei der Feinregulation von Sauerstoffangebot und -nachfrage ein. Der heute als HIF-1 bekannte Transkriptionsfaktor wurde erstmals 1992 von Semenza et al. beschrieben und isoliert. Er beschrieb, dass HIF-1 aus zwei Untereinheiten besteht. Es handelt sich um einen heterodimeren Transkriptionsfaktor, der aus der konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit und einer hypoxieabhängig exprimierten  $\alpha$ -Untereinheit besteht. Im Zellkern bindet HIF

an das HRE (hypoxia-response element) (Wang et al., 1995; Wang und Semenza, 1995; Jiang et al., 1996; Semenza et al., 1996; Iyer et al., 1998). Derzeit sind drei Isoformen von HIF $\alpha$  bekannt (HIF1-3 $\alpha$ ), von denen aber nur HIF-1 $\alpha$  ubiquitär exprimiert wird (Semenza, 2003). Die HIF-Aktivität wird durch die sauerstoffsensiblen Enzyme PHDs (prolyl hydroxylase domain) und FIH1 (factor inhibiting HIF1) streng reguliert (Kaelin und Ratcliffe, 2008). PHDs induzieren unter Normoxie den Abbau von HIF-1 $\alpha$ , welches eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt. HIF-1 $\alpha$  wird ubiquitiniert und degradiert, wobei beim Abbau z.B. das Von-Hippel-Lindau (VHL)-Protein eine Rolle spielt (Salceda und Caro, 1997; Huang et al., 1998; Maxwell et al., 1999).

Unter hypoxischen Bedingungen akkumuliert HIF-1 $\alpha$  und leitet so die Transkription hunderter Zielgene ein (Ratcliffe et al., 1998; Semenza, 2001), die das Überleben der Zelle unter einem aktuell reduzierten Sauerstoffangebot sichern sollen. Zur Anpassung an Sauerstoffmangel wird u.a. der angiogene VEGF ausgeschüttet. Zur Förderung der anaeroben Glykolyse wird vermehrt Glucosetransporter-1 (Ebert et al., 1995) und Laktatdehydrogenase (Firth et al., 1995) exprimiert. Außerdem wird IGF (insulin-like growth factor) ausgeschüttet (Tazuke et al., 1998), der wichtig für das Zellüberleben ist.

#### **1.4.2 HIFs bei Tumoren**

Die autonome Regulation der Sauerstoffversorgung hat neben all ihren lebenswichtigen Schutzfunktionen auch negative Folgen, nämlich dann, wenn Tumore sie sich zu Nutzen machen, um sich beispielsweise im Gehirn anzusiedeln (Wenger, 2002). Schon seit längerem ist bekannt, dass HIF-1 $\alpha$  von einer großen Gruppe von Tumoren im Vergleich zum gesunden Ursprungsgewebe überexprimiert wird, so z.B. von kolorektalen Karzinomen, Mamma- und Bronchialkarzinomen sowie Glioblastomen (Zhong et al., 1999); ähnliches gilt für HIF-2 $\alpha$  (Talks et al., 2000).

Der von HIF-1 $\alpha$  vermittelte Effekt geht dabei über die Angiogeneseinduktion durch eine VEGF-Ausschüttung hinaus. HIF-1 $\alpha$  trägt durch E-Cadherin-Downregulation (Evans et al., 2007) mit nachfolgender EMT dazu bei, dass Zellen sich aus dem Tumorverband lösen und migrieren können. Für viele Tumorentitäten konnte bereits eine Rolle von HIF-1 $\alpha$  sowohl bei Tumorinvasion und Metastasierung als auch bei Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie gezeigt werden (Semenza, 2003, 2013). Im Falle des Mammakarzinoms korreliert die Höhe der HIF-1 $\alpha$ -Expression im

Primärtumor direkt mit dem Risiko einer Metastasierung (Gilkes und Semenza, 2013).

Es ist nicht nur die Stärke der HIF-1 $\alpha$ -Expression wichtig, sondern auch das Verteilungsmuster innerhalb des Tumors. In Glioblastomen wird HIF-1 $\alpha$  vor allem im Bereich der perinekrotischen Pseudopallisadenstellung der Tumorzellen und in der Invasionszone exprimiert. Interessanterweise korreliert bei Gliomen die HIF-1 $\alpha$ -Expression direkt mit dem Tumorgrad, wobei sich eine stärkere HIF-1 $\alpha$ -Expression in höhergradigen Gliomen zeigt. Im Vergleich dazu zeigt sich beim Hämangioblastom, einem gutartigen, stark vaskularisierten Hirntumor, eine gleichmäßige HIF-1 $\alpha$ -Expression, was seine Ursache in einer onkogenen, über Verlust des Von-Hippel-Lindau (VHL)-Tumorsuppressorgens, und nicht in einer hypoxischen HIF-1 $\alpha$ -Induktion hat (Zagzag et al., 2000). Die HIF-Induktion bei Tumoren ist also nicht auf eine Induktion durch Hypoxie beschränkt. Ähnlich wie im Hämangioblastom akkumuliert HIF-1 $\alpha$  im klarzelligen Nierenkarzinom im Nukleus, allerdings nicht infolge von Hypoxie, sondern aufgrund einer Inaktivierung des VHL-Gens. Dieses spielt normalerweise eine wichtige Rolle beim HIF-1 $\alpha$ -Abbau unter Normoxie. Dieser Prozess ist beim klarzelligen Nierenkarzinom gestört und in der Folge akkumuliert HIF-1 $\alpha$  hypoxieunabhängig. Diese VHL-Inaktivierung findet sich sowohl beim familiären VHL-Syndrom als auch bei sporadischen Nierenzellkarzinomen (Maxwell et al., 1999; Krieg et al., 2000; Jaakkola et al., 2001; Miller et al., 2005). Die Rolle der einzelnen HIF-Untereinheiten bei der Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms ist noch nicht sicher geklärt. Zunächst hatte man angenommen, dass HIF-1 $\alpha$  eine tumorinduzierende Wirkung besitzt, aber mittlerweile geht man davon aus, dass HIF-1 $\alpha$  als Tumorsuppressor agiert mit HIF-2 $\alpha$  als tumorinduzierendem Gegenspieler (Shen et al., 2011; Gudas et al., 2014). Andere Beispiele für Tumoronkogene, die eine hypoxieunabhängige HIF-1 $\alpha$ -Transkription und -translation verursachen, sind z.B. Mutationen, die mTOR, PI3Ka oder AKT1 aktivieren (Brugarolas und Kaelin, 2004).

### **1.4.3 Die Bedeutung der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ in der Tumorprogression**

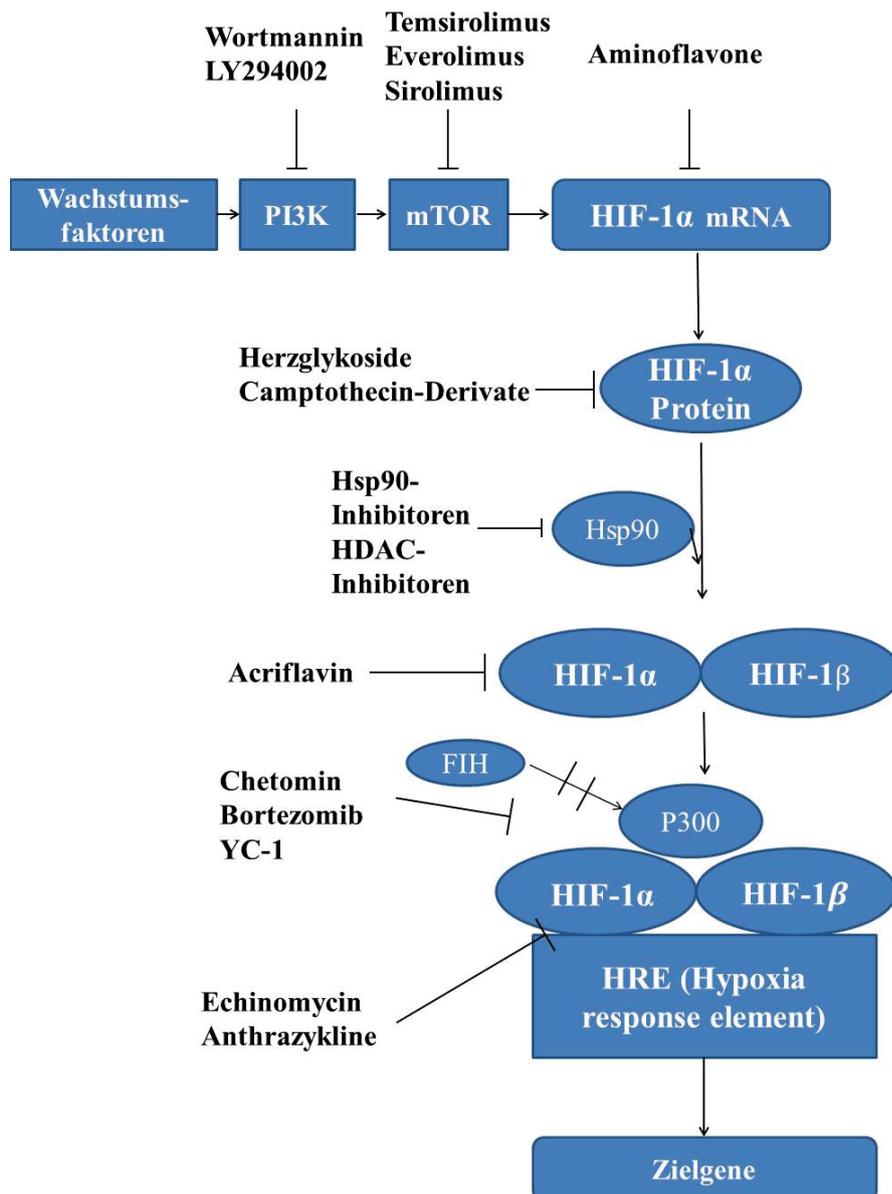
HIF-1 $\alpha$  und -2 $\alpha$  verfügen trotz großer struktureller Ähnlichkeit über unterschiedliche Regulationsmechanismen und Zielgene (Loboda et al., 2010; Brian Keith et al., 2012) wobei Endothelwachstum und -migration als Antwort auf Hypoxie überwiegend durch HIF-1 $\alpha$  initiiert wird (Sowter et al., 2003; Tang et al., 2004; Fraisl et al., 2009).

Für die Adaption an Hypoxie sind sowohl HIF-1 $\alpha$  als auch HIF-2 $\alpha$  verantwortlich, wobei die zeitliche Komponente wichtig ist. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass es in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Zellen gegenüber Hypoxie zu einem „HIF subunit switch“ kommt. Während unter akuter Hypoxie HIF-1 $\alpha$  hochreguliert wird, erfolgt bei chronischer Hypoxie aufgrund von negativen Feedback-mechanismen ein Switch, d.h. Hochregulation von HIF-2 $\alpha$ . Dabei sinkt die HIF-1-Expression zwischen 6 - 12h Hypoxieexpositionszeit, während die HIF-2-Expression in demselben Zeitraum stabil bleibt (Uchida et al., 2004). Eine andere Studie zeigte ähnliche Ergebnisse: HIF-1 $\alpha$  wurde vor allem während kurzer Zeitintervalle (2 - 24 Stunden) und stark ausgeprägter Hypoxie exprimiert, während HIF-2 $\alpha$  bei chronischer, eher schwacher oder physiologischer Hypoxie in einem Zeitraum von 48 - 72 Stunden aktiv ist (Holmquist-Mengelbier et al., 2006). Mittlerweile sind mehrere Faktoren bekannt, die einen HIF-Switch auslösen können: Z.B. fördert der hypoxia-associated factor (HAF) den Abbau von HIF-1 $\alpha$  und die Aktivität von HIF-2 $\alpha$  während länger andauernder Hypoxie und führt zu aggressiverem Tumorwachstum und Tumorinvasion.

#### **1.4.4 HIF-1 $\alpha$ -Inhibition als Therapieansatz bei malignen Tumoren**

HIF-1 $\alpha$  ist im Rahmen der Hypoxieadaptation nicht nur verantwortlich für grundlegende Prozesse wie Angiogenese sondern verursacht auch eine verstärkte Invasion und Metastasierung von Tumoren und deren Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie. Aufgrund dieser Rolle bei der Tumorprogression stellt die Inhibierung oder Modulation von HIF-1 $\alpha$  einen vielversprechenden Ansatz zur Tumorthherapie dar. Derzeit werden (noch) keine spezifischen, direkten HIF-1 $\alpha$ -Inhibitoren zur Therapie eingesetzt. Allerdings werden viele Wirkstoffe bereits als Tumorthapeutika verwendet, die entweder als „targeted therapies“ für andere Moleküle entworfen wurden oder als unspezifische Zytostatika Einsatz fanden und deren (indirekte) HIF-1 $\alpha$ -inhibierende Wirkung erst später erkannt wurde (Gilkes und Semenza, 2013). Zu dieser Gruppe gehören z.B. die Topoisomerase-I-Inhibitoren Camptothecin oder Topotecan sowie DNA-Interkalantien wie Echinomycin oder die Anthrazykline Daunorubicin oder Doxorubicin (Lee et al., 2009a). Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff Acriflavine, ein Inhibitor der HIF-Dimerbildung, die Angiogenese und das Tumorwachstum von Prostatakarzinomen hemmt (Lee et al., 2009b). Eine Übersicht über den aktuellen Stand der Therapie mit HIF-1-Inhibitoren und deren Angriffspunkte ist in Abbildung 6 dargestellt (Masoud und Li, 2015).

Allerdings ist die Wirkung von HIF-inhibierenden Substanzen abhängig vom jeweiligen Tumor und dem Mikromilieu (Acker und Plate, 2002) und eine anti-HIF-1 $\alpha$ -Therapie mit Vorsicht anzuwenden ist, da HIF vielfältige, darunter auch tumorinhibierende, Eigenschaften besitzt; hierunter fallen beispielsweise Mechanismen, die zum Zellzyklusarrest oder Zelltod führen (Acker und Acker, 2004; Henze und Acker, 2010).



**Abbildung 6: HIF- Inhibitoren in der Tumorthherapie.** Modifiziert nach Masoud und Li (2015). Es sind bereits mehrere Pharmaka im klinischen Einsatz, die den HIF-Signalweg an unterschiedlichen Stellen, von der mRNA bis zur Wirkung am HRE im Zellkern, angreifen und so die HIF-1 $\alpha$ -Wirkung inhibieren.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Hirnmastasen stellen ein zunehmendes Problem in der Behandlung von Patienten mit malignen Tumoren dar. Zum einen deuten Studien auf eine steigende Inzidenz hin, zum anderen ist die Grunderkrankung mittlerweile oft gut behandelbar, so dass die Hirnmastasen entscheidend für die Prognose der Patienten werden (Berghoff et al., 2013; Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2014). Trotz leitliniengerechter Therapie, die derzeit aus Resektion der Mastasen und/oder Ganzhirnbestrahlung sowie, bei bestimmten Konstellationen, „targeted therapies“ besteht, ist die Prognose der Patienten schlecht geblieben. Um Hirnmastasen besser behandeln zu können, müssen die zugrunde liegenden Mechanismen besser verstanden werden, nicht zuletzt da sich die für die hämatogene und lymphogene Mastasen anderer Lokalisation, z.B. in Lunge und Leber, gewonnenen Erkenntnisse nicht auf Hirnmastasen übertragen lassen. Das Gehirn mit seinen Besonderheiten wie der andersartig zusammengesetzten extrazellulären Matrix, der Blut-Hirn-Schranke und anderen Faktoren nimmt einen Sonderstatus im Körper ein.

Sicher ist, dass es sich bei Hirnmastasen um eine heterogene Gruppe handelt und je nach Primärtumor Unterschiede bestehen. So metastasieren Bronchialkarzinome oder Melanome bevorzugt ins Gehirn. Die Metastasierung ins Gehirn findet beim Mammakarzinom nur zu 19 % im ersten Jahr statt gegenüber 91 % beim Bronchialkarzinom (Schouten et al., 2002).

Mastasen haben eine hohe (Lokal-) Rezidivrate, daher besteht nach wie vor die Empfehlung zur Ganzhirnbestrahlung post Resektion. In der Bildgebung zeigen die Mastasen ein ausgeprägtes peritumorales Ödem und eine starke Kontrastmittelanreicherung; Befunde, die sich auch bei höhergradigen hirneigenen Tumoren wie Glioblastomen zeigen, die über hohe Invasioneigenschaften verfügen. Daher stellt sich die Frage, ob Hirnmastasen, die bisher als gut abgegrenzte, expansiv in das Hirnparenchym wachsende, Tumore galten, über infiltrative Eigenschaften verfügen und welche Faktoren/Mechanismen dafür verantwortlich sind.

Hirnmastasen sind in ihrem Wachstum und ihrer Progression ebenso wie die Primärtumore auf ein funktionierendes Gefäßsystem angewiesen, welches eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellt. Für die Entwicklung neuer Therapien von Hirnmastasen werden daher die Mechanismen der Tumorangiogenese, mögliche Inhibitoren sowie die Rolle des HIF-Systems untersucht. Für Hirnmastasen liegen im Gegensatz zu anderen Tumoren bisher allerdings kaum

Daten über die Bedeutung der Angiogenese und des HIF-Systems für die Tumorprogression vor.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, welche Faktoren einen Einfluss auf das Invasionsverhalten der zerebralen und zerebellären Karzinometastasen haben. Insbesondere wurde der Einfluss der Tumolvaskularisierung sowie die Rolle von Hypoxie und HIF-1 $\alpha$  in Hirnmetastasen unterschiedlicher Primärtumoren analysiert.

### 1.6 Fragestellungen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Zeigen Hirnmetastasen ein **invasives Wachstum in das Hirnparenchym** und zeigt sich hierbei eine Abhängigkeit vom Primärtumor?
- Zeigt sich eine Abhängigkeit der **Tumolvaskularisierung vom Invasionsverhalten** der zerebralen/zerebellären Metastasen?
- Welchen Einfluss hat **Hypoxie** und insbesondere HIF-1 $\alpha$  auf das Invasionsverhalten der Metastasen in das umgebende Hirnparenchym und wodurch wird die Expression beeinflusst?
- Zeigt sich eine Korrelation zwischen **HIF-1 $\alpha$ -Expression** mit der Angiogenese, der Tumorinvasion oder mit einem bestimmten Tumortyp?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang gelistet (Tabellen 2-5).

### 2.2 Patientenkollektiv und Gewebeproben

Untersucht wurden Biopsien von 80 von insgesamt 142 Hirnmetastasen (s. 2.3) aus den Jahren 2005 bis 2010. Die Patientendaten wurden mit Hilfe einer Archivrecherche (DC Pathos) im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Gießen ermittelt.

Als Kontrollgewebe wurden 5 Gewebeproben aus dem frontalen Kortex von post mortem Gehirnen untersucht. Gehirne wurden bei Vorliegen globaler Hypoxie, Metastasen, hirneigenen Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen oder Einblutungen ausgeschlossen. Zusätzlich wurden 10 Fälle von Glioblastomen untersucht. Die Ausschlusskriterien bei den Glioblastomen waren Rezidive sowie pleomorphe Glioblastome. Aus dem Archiv wurden die entsprechenden Paraffinblöcke sowie vorhandene Schnittpräparate herausgesucht. Die Gewebeproben wurden unter Zuweisung einer Fallnummer anonymisiert verwendet. Die **Genehmigung des Ethikrates** für die Verwendung der Gewebeproben liegt unter dem **AZ 07/09 mit Bewilligung vom 03.03.2009** vor.

Alle 142 Fälle wurden mikroskopiert und aufgrund folgender Kriterien 62 Fälle ausgeschlossen: Rezidive, Biopsie nach Bestrahlung, zu wenig Gewebe mit Tumor-/Hirngewebe und/oder Invasionszone sowie einer schlechten Darstellung der Gefäße.

Die Biopsien wurden entsprechend der histomorphologischen und der bereits für die Diagnostik durchgeführten enzym- und immunhistochemischen (IHC) Befunde bzw. im Rahmen der Doktorarbeit erweiterten Analysen erneut beurteilt und Primärtumoren zugeordnet (siehe Abbildung 7). Diese Antikörper gehören zur Routinediagnostik im Institut für Neuropathologie und sind in Tabelle 10-16 aufgelistet.

Von allen Metastasen, bei denen als Primärtumor laut Befund und/oder Nachbeurteilung ein Bronchialkarzinom bekannt war wurde zusätzlich eine IHC Färbung mit Antikörper gegen CD56 (Cluster of Differentiation 56) durchgeführt (Tab.9), um zusätzlich zwischen SCLC und NSCLC zu unterscheiden. CD56 ist ein Marker der neuroendokrinen Differenzierung und wird daher von SCLC exprimiert, nicht aber von NSCLC. Im Kollektiv fand sich nur ein Fall eines SCLC, sodass auf eine weitere

Subtypisierung verzichtet wurde. Die NSCLC wurden ebenfalls nicht weiter subtypisiert.

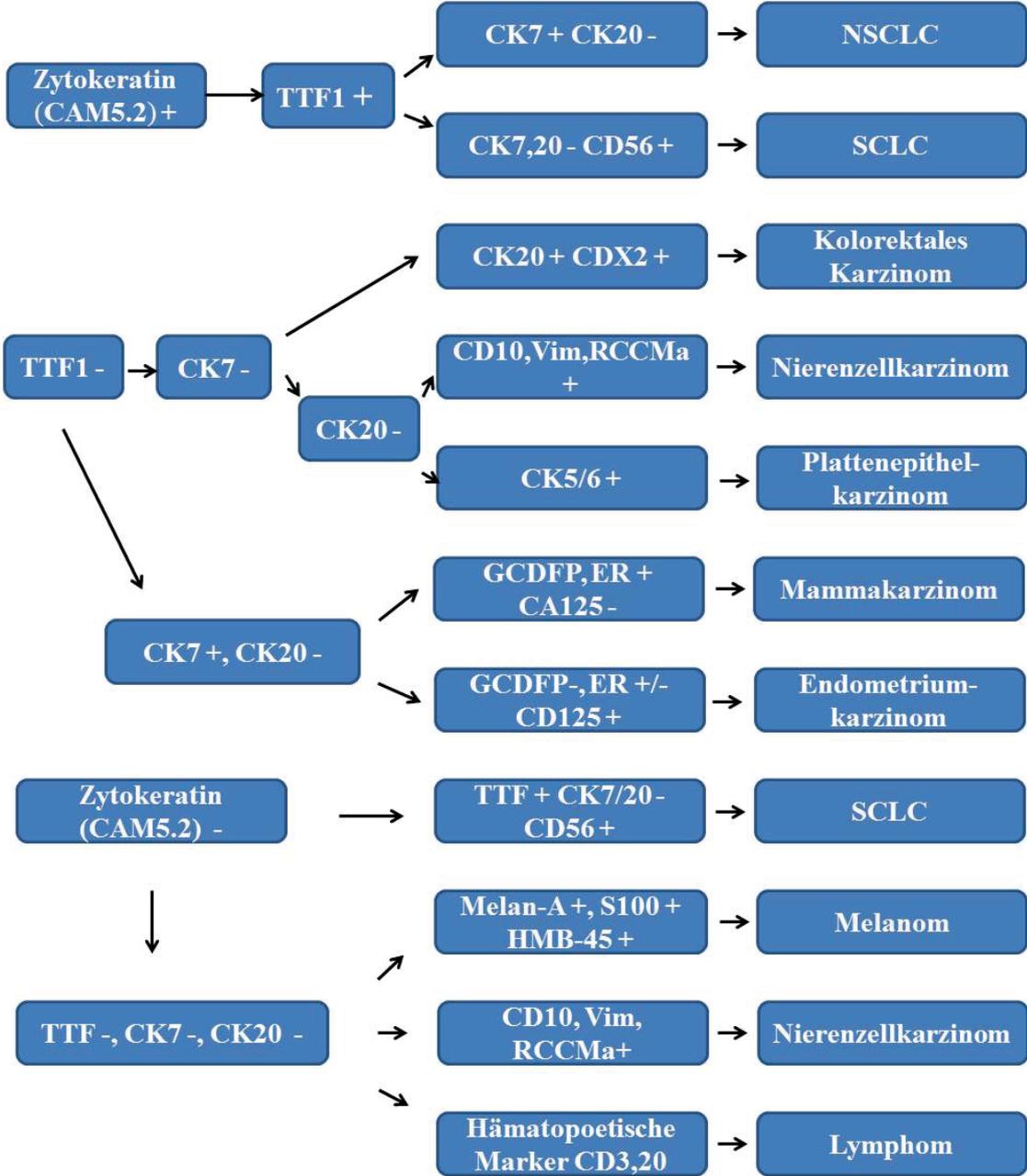


Abbildung 7: Flussdiagramm zur Darstellung der Verwendung von Antikörpern von Hirnmetastasen zur Eingrenzung des Primarius nach „WHO classification of tumours of the central nervous system“, 4. Ausgabe (Wesseling et al., 2007), modifiziert nach Becher et. al (2006).

### 2.3 Darstellung der Tumervaskularisierung und Hypoxie durch immunhistochemische Färbungen

An allen Fällen wurde eine Standard HE-Färbung durchgeführt. Diese diente als Übersichtsfärbung um festzustellen, ob die vorliegende Biopsie ausreichend Metastasen-, Hirngewebe und Invasionszone enthielt und zur späteren Bestimmung des Invasionsmusters (Protokoll siehe Tabelle 7 im Anhang). Die IHC Färbungen wurden mit dem Ventana® BenchMark® XT IHC Färbemodul durchgeführt. Ziel der Immunhistologie ist die Darstellung von spezifischen Gewebsantigenen. Bei der hier dargestellten vollautomatischen Färbemethode wurde dabei zur Detektion das XT ultraView DAB Detection Kit der Firma Roche verwendet. In diesem Detection Kit kommt eine indirekte 2-Schritt-Methode zur Anwendung und das Kit kann universal, also sowohl für Primärantikörper aus dem Kaninchen als auch aus der Maus verwendet werden. Wie in Abbildung 8 zu sehen, reagiert der unkonjugierte Primärantikörper in einem ersten Schritt mit dem darzustellenden Gewebsantigen und schließlich im zweiten Schritt mit dem enzymkonjugierten Sekundärantikörper. Dieser liegt als multimeres Molekül vor, das Enzym (HRP, horseradish peroxidase) wurde direkt via langen Verbindungsärmchen an den Zweitantikörper gekoppelt. Bei dem verwendeten System handelt es sich um eine biotinfreie Variante, der Nachweis macht sich also nicht die starke Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin zunutze. Dies bietet den Vorteil, dass eine Bindung an endogenes Biotin und eine daraus resultierende Hintergrundfärbung verhindert wird, die Spezifität der Färbung wird so erhöht. Das von dem Enzym umgesetzte Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) liefert schließlich ein braunes Endprodukt für den Nachweis des Zielantigens (Antikörper siehe Tabelle 8).

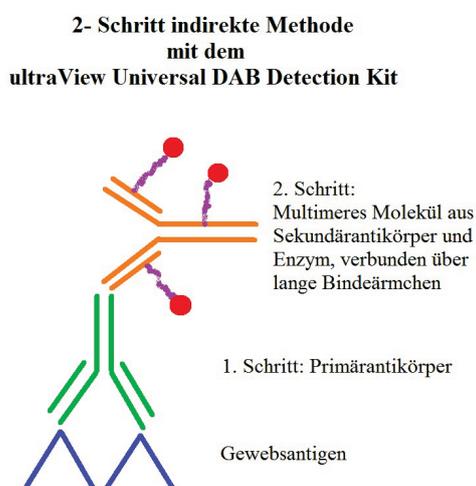


Abbildung 8: Funktionsweise des XT ultraView DAB Detection Kit.

### **2.3.1 Darstellung der Tumervaskularisierung mit Antikörper gegen CD34**

Das CD34-Antigen ist ein transmembranäres Glykoprotein, welches auf humanen lymphoiden und myeloischen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird. Daher findet es Anwendung in der Leukämie-/Lymphomtypisierung und Quantifizierung von Blutstammzellen (Thomas, 2012). CD34 wird auch auf Endothelzellen exprimiert und hat sich zur Evaluierung der Vaskularisierung in der Tumorforschung etabliert (Ramani et al., 1990; Vermeulen et al., 2002). Für alle untersuchten Metastasen wurde eine CD34-Antikörper Färbung wie beschrieben durchgeführt (Protokoll siehe Tabelle 17 im Anhang).

### **2.3.2 HIF-1 $\alpha$ -Färbung**

Es gibt wenig Beschreibungen über die Rolle und Expression von HIF-1 $\alpha$  bei Hirnmetastasen. Die Durchführung der HIF-1 $\alpha$  IHC musste daher etabliert werden. An Glioblastomen wurde eine HIF-1 $\alpha$ -Expression über IHC bereits nachgewiesen (Seidel et al., 2010). Die HIF-1 $\alpha$ -Färbung hat grundsätzlich die Besonderheit, dass aufgrund der Instabilität des Antigens für ein optimales Ergebnis nur frisch geschnittene Paraffinschnitte verwendet werden dürfen. Daher wurde pro Fall ein frischer Paraffinschnitt angefertigt und innerhalb 24h gefärbt. Die passende Antikörperkonzentration für vom Menschen stammende Hirnmetastasen musste zunächst etabliert werden, wir färbten nach demselben Protokoll (Tabelle 18 im Anhang) mit Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$  (siehe Tabelle 8 im Anhang) in den Konzentrationen 1:100, 1:200+Verstärker (VE), 1:500+VE und 1:300+VE. Ausgewählt und verwendet wurde schließlich 1:300+VE, da sich hier das beste Färbeergebnis zeigte sich bei einer Verwendung von 1:300+VE. Kriterien für eine optimale Färbung waren eine selektive, für die morphometrische Auswertung mit ImageJ ausreichend starke, spezifische nukleäre Expression von HIF-1 $\alpha$ -positiven Tumorzellen ohne unspezifische Hintergrundanfärbung.

Die Auswertung der HIF-1 $\alpha$ -Expression wurde als HIF-positive Fläche/Tumorfläche, d.h. als HIF-1 $\alpha$ -Dichte (s. 2.4.2) an 60 Fällen vorgenommen; aufgrund der Anfälligkeit der HIF-Färbung für Fixationsartefakte war nicht an allen Fällen eine HIF-Färbung auswertbar. Für die Nierenkarzinome (n=5) waren zwar Färbung und Auswertung möglich, sie wurden aber nicht berücksichtigt, da HIF-1 $\alpha$  hier nicht durch oxidativen Stress, sondern mutationsbedingt in 100 % der Zellkerne akkumuliert.

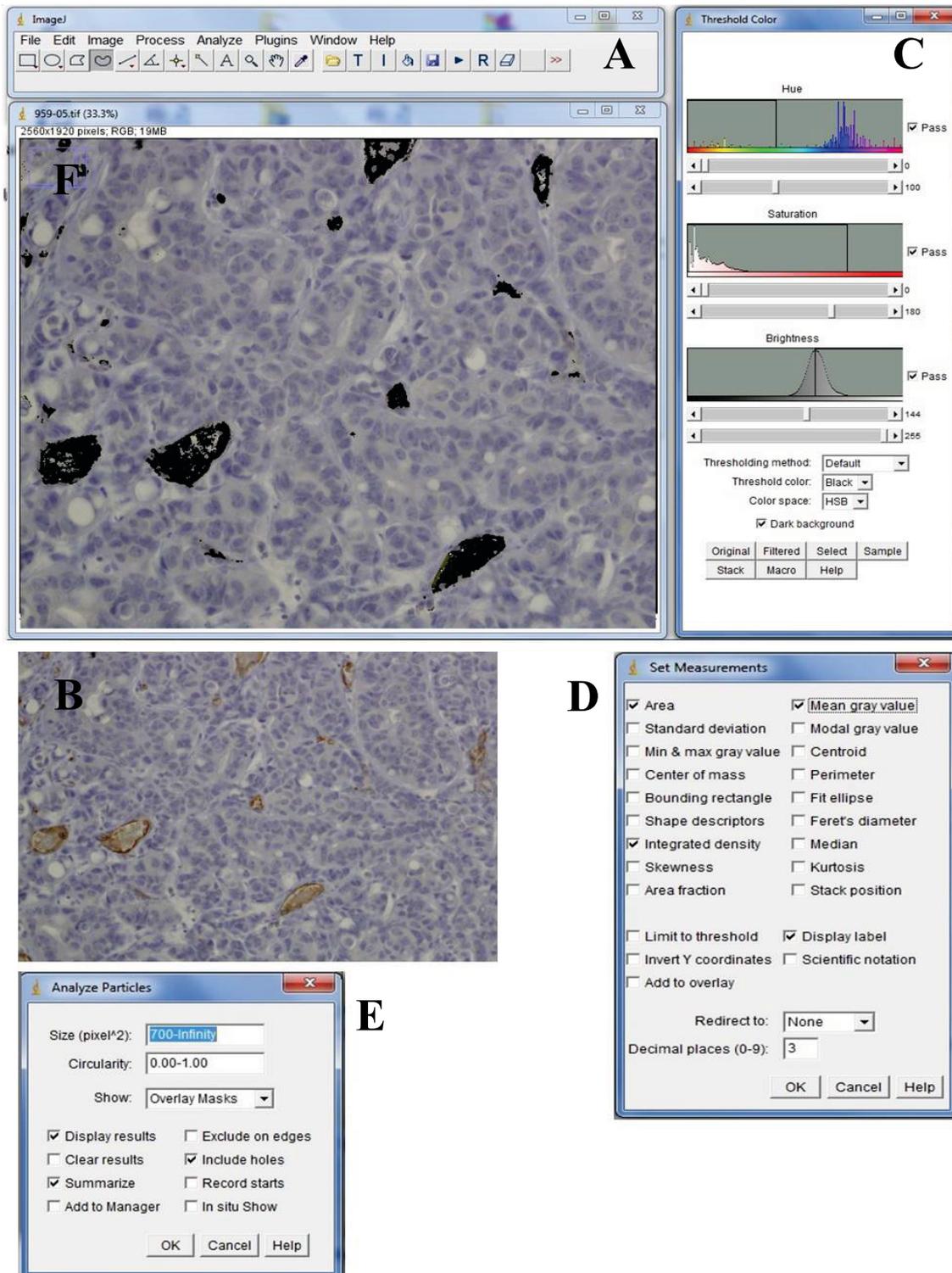
## **2.4 Morphometrische Auswertung**

Die Analyse von Gefäß- und HIF-1 $\alpha$ -Expression erfolgte quantitativ morphometrisch mit dem Programm ImageJ. Es handelt sich um eine Java basierte open source Software. Programm und Quelltext sind frei zugänglich (Website: <http://imagej.nih.gov/ij/>) und können durch zahlreiche Plugins und Makros personalisiert erweitert werden. Für die quantitative morphometrische Auswertung der Gewebsschnitte wurde ein Macro für ImageJ erstellt. Der Quelltext dieses Macros ist der Abbildung 28 im Anhang zu entnehmen. Das Programm wurde von Wayne Rasband, einem Mitarbeiter der US-amerikanischen National Institutes of Health, entwickelt und dient als viel verwendetes Bildverarbeitungsprogramm im Bereich der Naturwissenschaften. Für die morphometrische Auswertung wurden alle Gewebsschnitte verblindet.

Von immunhistochemisch gefärbten Präparaten von 4 $\mu$ m dicken Schnitten wurden unter dem Mikroskop (Nikon ECLIPSE80i) 10 Aufnahmen pro Fall bei 200x Vergrößerung mit einer digitalen Kamera (Nikon DS Camera Unit DS-L2, Camera Head DS-Fi1) angefertigt. Die Aufnahmen erfolgten an zufällig ausgewählten Tumorauschnitten, und nicht im Sinne einer Hotspot-Analyse in Bereichen starker Vaskularisierung oder HIF-1 $\alpha$ -Expression. Die Aufnahmen wurden dann am Computer mit dem Programm ImageJ analysiert. Das Grundprinzip ist hierbei „colour threshold“: Das Programm erkennt Pixel mit einem Farbwert, der über einem vorher festgelegten Schwellenwert liegt, beispielsweise durch IHC mit Antikörper gegen CD34 bräunlich angefärbte Endothelzellen. Ausgeschlossen wurden Bereiche mit flächigen Nekrosen, normalem Hirnparenchym und/oder Fragmentierungen, da die Blutgefäßfläche/HIF-1 $\alpha$ -Expression pro Tumorfläche ermittelt werden sollte (siehe auch Abbildung 8). Die morphometrische Auswertung wurde an den Hirnmetastasen, Normalhirn und Glioblastomen durchgeführt.

### **2.4.1 Quantifizierung der Gefäßdichte**

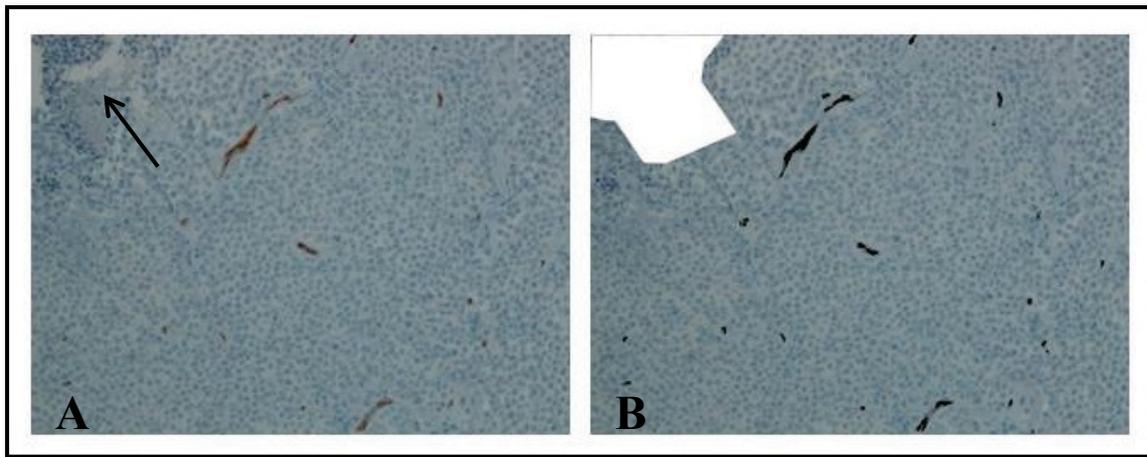
Die Auswertung von Gefäßdichte und –anzahl wurde an mit Antikörper gegen CD34 gefärbten Schnitten mit ImageJ bereits an Glioblastomen etabliert. Allerdings wurden in dieser Arbeit dickere Schnitte (20 $\mu$ m) verwendet (Henze et al., 2014). Für die vorliegende Analyse wurden die bereits existierenden Makros, nach Adaptation an Humangewebe, zur Auswertung genutzt, die in ImageJ semiautomatisch erfolgte. Das Programm erkannte mittels Thresholdfunktion (farblicher Schwellenwert) die durch die CD34-Färbung bräunlich markierten Endothelzellen (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Analyse der Gefäßdichte an CD34 gefärbten Paraffinschnitten einer zerebralen Metastase mit ImageJ: Parameter.** Hauptmenü von ImageJ (A). Nach Öffnen der auszuwertenden Originalaufnahme (B) werden die festgelegten, für alle Fälle gleichen, Parameter ausgewählt (C-E). Durch die Festlegung und Anwendung eines farblichen Schwellenwertes werden die durch CD34-Färbung bräunlich angefärbten Endothelzellen vom Programm erkannt und schwarz angefärbt (F).

Es wurden pro Fall 10 Bilder in 20x (Objektiv) Vergrößerung nach dem Zufallsprinzip aufgenommen. Eine Schwierigkeit bestand darin, dass bei den dünneren Schnitten ( $4\mu\text{m}$  im Gegensatz zu Schnitten von  $20\mu\text{m}$  in Vorarbeiten), häufig nicht die komplette Endothelzellschicht des Gefäßes dargestellt wurde und diese manuell nachgezogen werden musste. Per Hand ausgeschlossen wurden außerdem Bereiche mit flächigen Nekrosen, normalem Hirnparenchym und/oder Fragmentierungen, da die Blutgefäßfläche pro vitaler Tumorfläche ermittelt wurde (siehe Abbildung 10).

Die Gesamtgefäßdichte des jeweiligen Tumors wurde als Mittelwert der Gefäßdichten der 10 Bilder/ Fall angegeben.



**Abbildung 10: Gefäßdichtebestimmung mit ImageJ.**

(A) Unbearbeitete Originalaufnahme, Blutgefäße sind durch eine IHC Färbung gegen CD34 bräunlich angefärbt. Das Programm ImageJ erkennt mit Hilfe eines farblichen Schwellenwertes die bräunlich angefärbten Endothelzellen und markiert diese schwarz (B). Bei dem weißen Areal in (B) handelt es sich um eine nekrotische Zone, die im linken oberen Bildrand von (A) zu erkennen ist (Pfeil). Nekrosen wurden von ImageJ nicht automatisch erkannt und daher manuell markiert und aus der Auswertung genommen. Gefäße, die ImageJ nicht als Ganzes erkannt hatte, wurden ebenfalls per Hand nachgezogen.

#### **2.4.2 Quantifizierung der HIF-1 $\alpha$ -Expression**

Bestimmt wurde die HIF-1 $\alpha$ -positive Fläche pro vitaler Tumorfläche. Dafür wurden 10 Bilder pro Fall in 20x (Objektiv) Vergrößerung angefertigt und mit ImageJ über die Thresholdfunktion ausgewertet. Die Fläche wurde als Summe der Fläche der einzelnen Partikel über dem Schwellenwert (anstatt als Fläche über dem Schwellenwert) berechnet, um die Erfassung von Hintergrundpixeln zu vermeiden. Bei der durchgeführten Bestimmung handelte es sich nicht um eine Hotspot-Analyse, sondern es wurden die Bereiche, in denen ersichtlich war, dass die Färbung aus technischen

Gründen nicht funktioniert hatte, herausgenommen (z.B. offensichtliche Nekrose aber keinerlei HIF-1 $\alpha$ -Hochregulation) und aus den verbleibenden Bereichen Fotos nach dem Zufallsprinzip gemacht.

## **2.5 Invasionsverhalten der Tumorzellen**

Die Invasion der Tumorzellen in das angrenzende Hirnparenchym wurde semiquantitativ an HE gefärbten Paraffinschnitten ausgewertet. Mit dem Mikroskop Nikon ECLIPSE80i wurde in 20x und 40x (Objektiv) Vergrößerung die gesamte Invasionszone ausgewertet. In Anlehnung an die Arbeiten von P. Friedl zur kollektiven Zellmigration wurden 3 Invasionstypen festgelegt und jedem Fall wurde die Ziffer des sich in der Invasionszone als dominant darstellenden Musters angegeben (Abbildung 11-15):

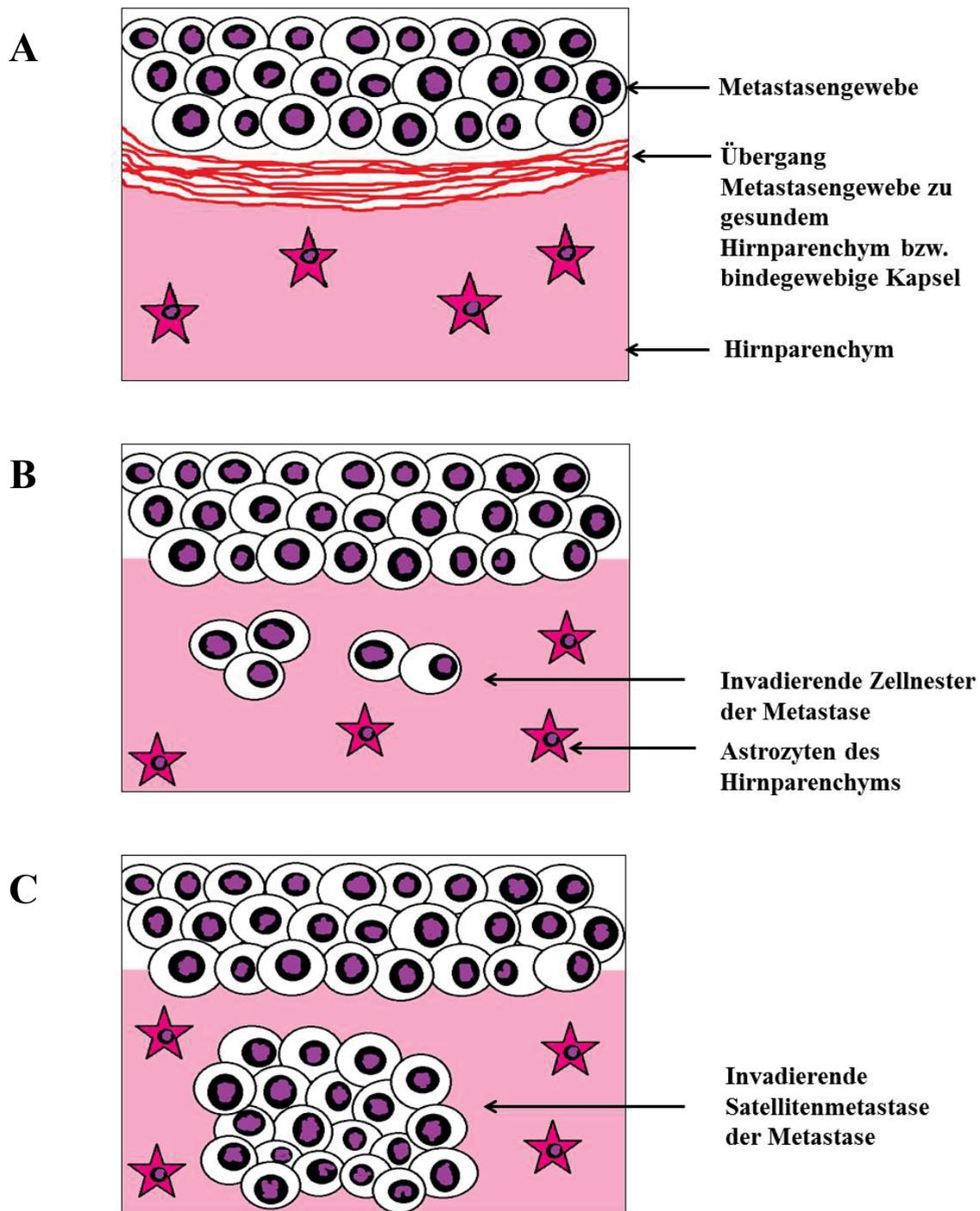
**Typ 0 (Keine Invasion)** - Die Metastase wächst gut abgegrenzt vom gesunden Hirnparenchym, zum Teil liegt eine bindegewebige Kapsel vor.

**Typ 1 (Zellcluster)** - Kleinere Zellansammlungen haben sich vom Haupttumor losgelöst, invadieren das Hirnparenchym und sind von diesem umgeben. Zellcluster wiesen einen Durchmesser von unter 50 $\mu$ m auf, größtenteils lag ein Durchmesser von  $\sim$ 15 $\mu$ m vor, was ungefähr 8 Zellen entsprach.

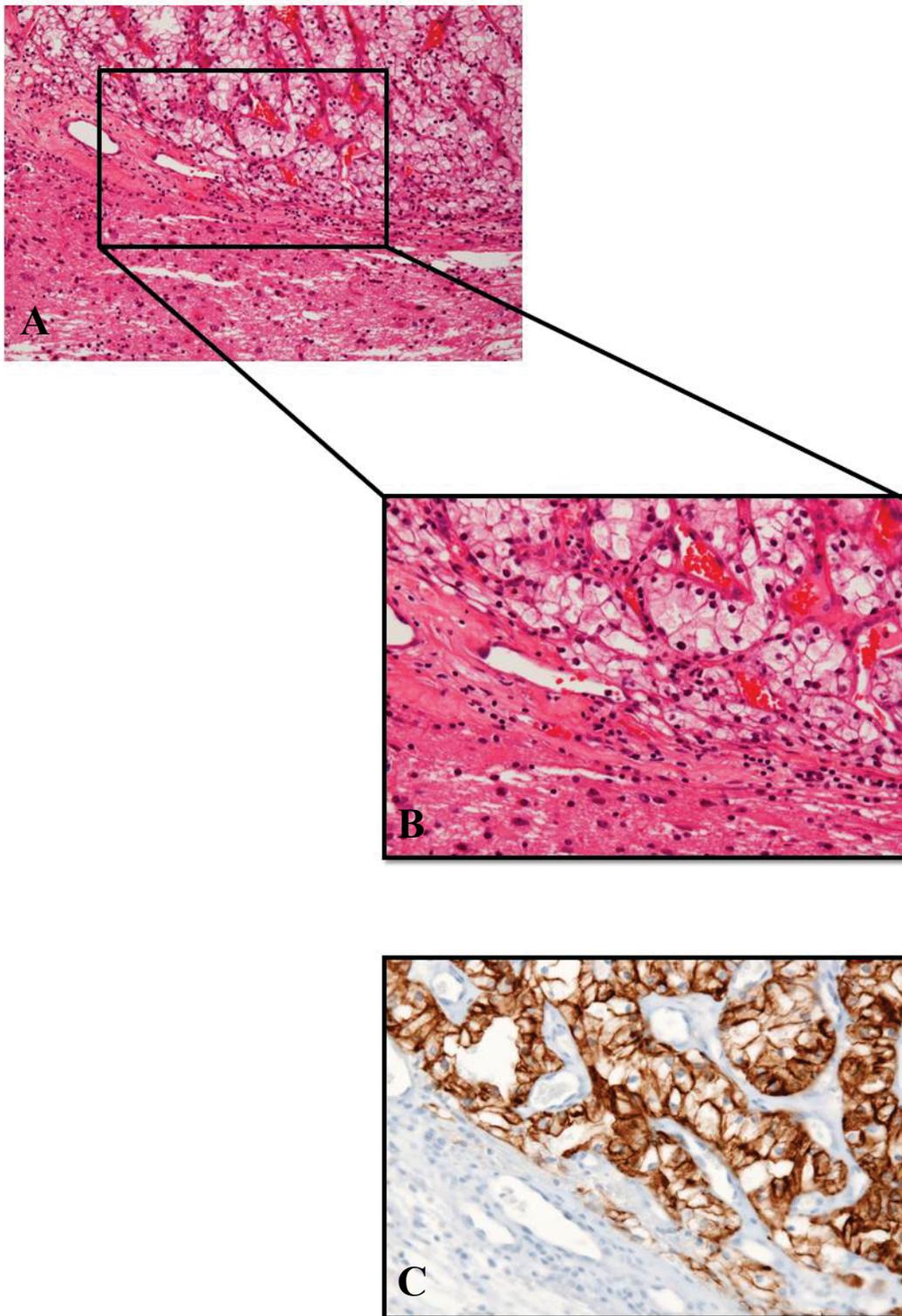
**Typ 2 (Satellitentumore)** - Deutlich größere Zellansammlung, die in das Hirnparenchym invadiert und von diesem umgeben ist. Als Satellitentumore wurden Zellansammlungen von >50 $\mu$ m gewertet. In den meisten Fällen lag ihre Größe bei über 100 $\mu$ m, was 80+ Zellen entsprach.

Die Unterscheidung zwischen Typ 1 und 2 wurde anhand der Größe des invadierenden Zellverbandes getroffen.

Um eine mögliche Einzelzellinvasion nicht zu übersehen wurde an allen Fällen, in denen sich keine Invasion gezeigt hatte, eine Färbung mit dem KL-1- und GFAP-Antikörper durchgeführt. KL-1 ist ein panepithelialer Marker, der die Tumorzellen, nicht aber das Hirnparenchym markiert (= Darstellung von Tumorzellen im Hirnparenchym) (Abb.12C, 13C, 14C). Beim glial fibrillary acidic protein (GFAP) handelt es sich um ein zytoplasmatisches Antigen. Mithilfe der IHC lassen sich Astrozyten, die dieses Antigen exprimieren, und damit das ortsständige Hirnparenchym, darstellen (Protokolle s. Anhang, Tab.19 und 20) (= Darstellung von ortsständigem Hirnparenchym im Tumor), Invasion wird also indirekt sichtbar gemacht.

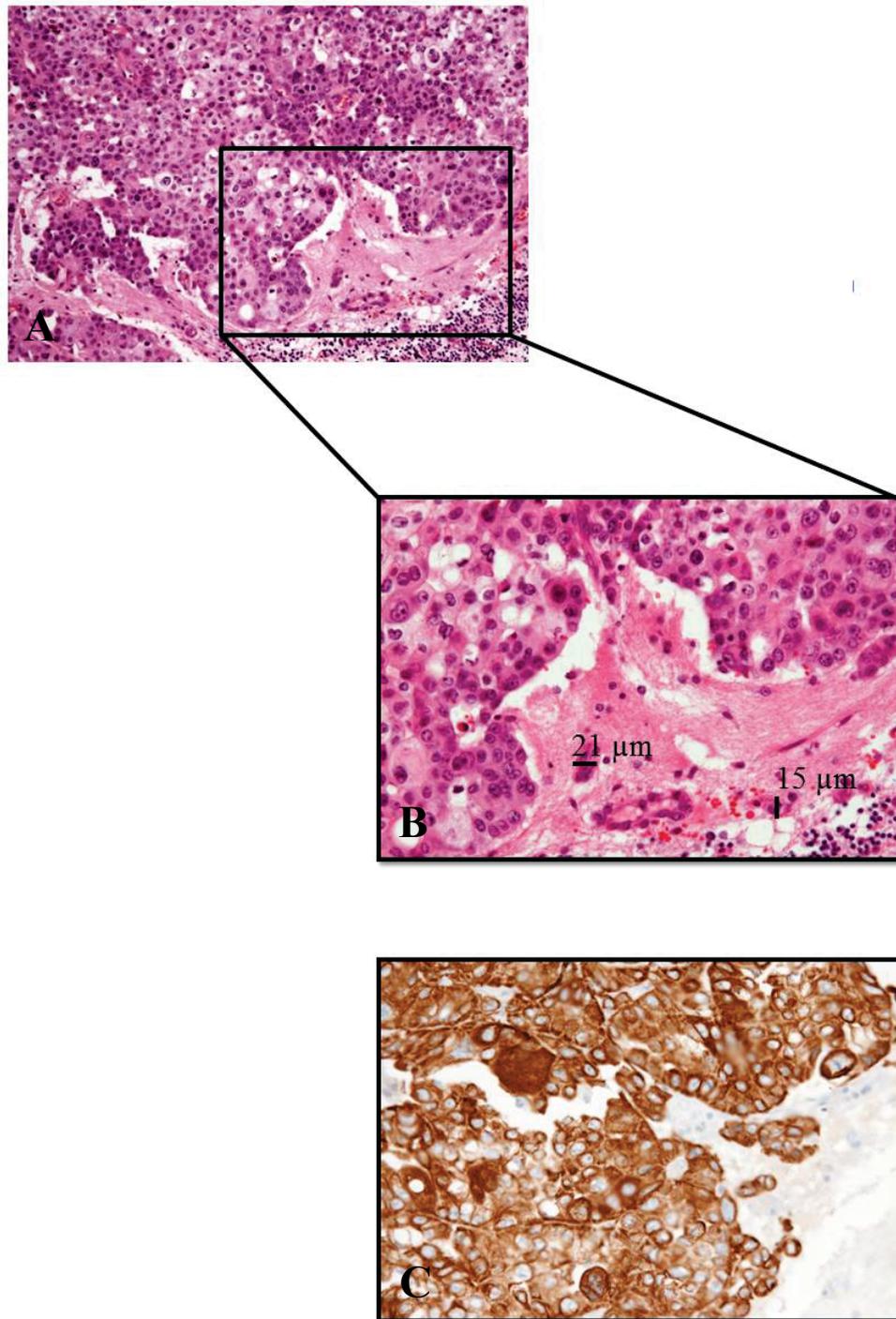


**Abbildung 11: Schematische Darstellung der drei Invasionstypen von Tumorzellen in das angrenzende Hirnparenchym.** (A) Keine Invasion, die Metastase wächst expansiv, zum Teil ist sie durch eine bindegewebige Kapsel vom Hirnparenchym getrennt. (B) Zellcluster, kleinere Zellnester lösen sich vom Haupttumor ab und invadieren das umgebende Hirnparenchym; (C) Satellitentumor. Deutlich größere Zellnester als in (B) invadieren das umgebende Hirnparenchym.

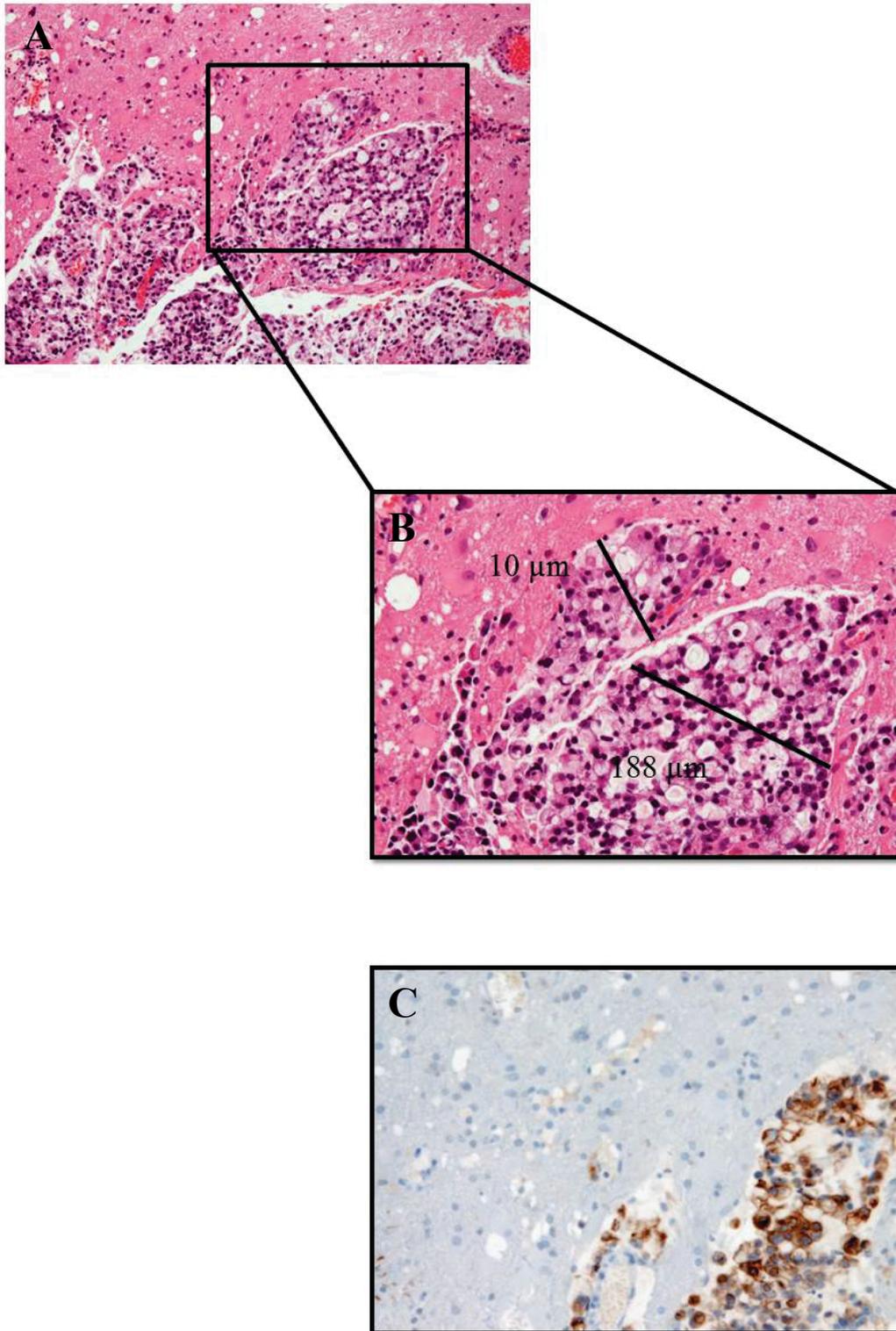


**Abbildung 12: Typ 0: Beispiel für gut abgegrenztes Wachstum der Metastase (= keine Invasion) am Beispiel eines Nierenzellkarzinoms.**

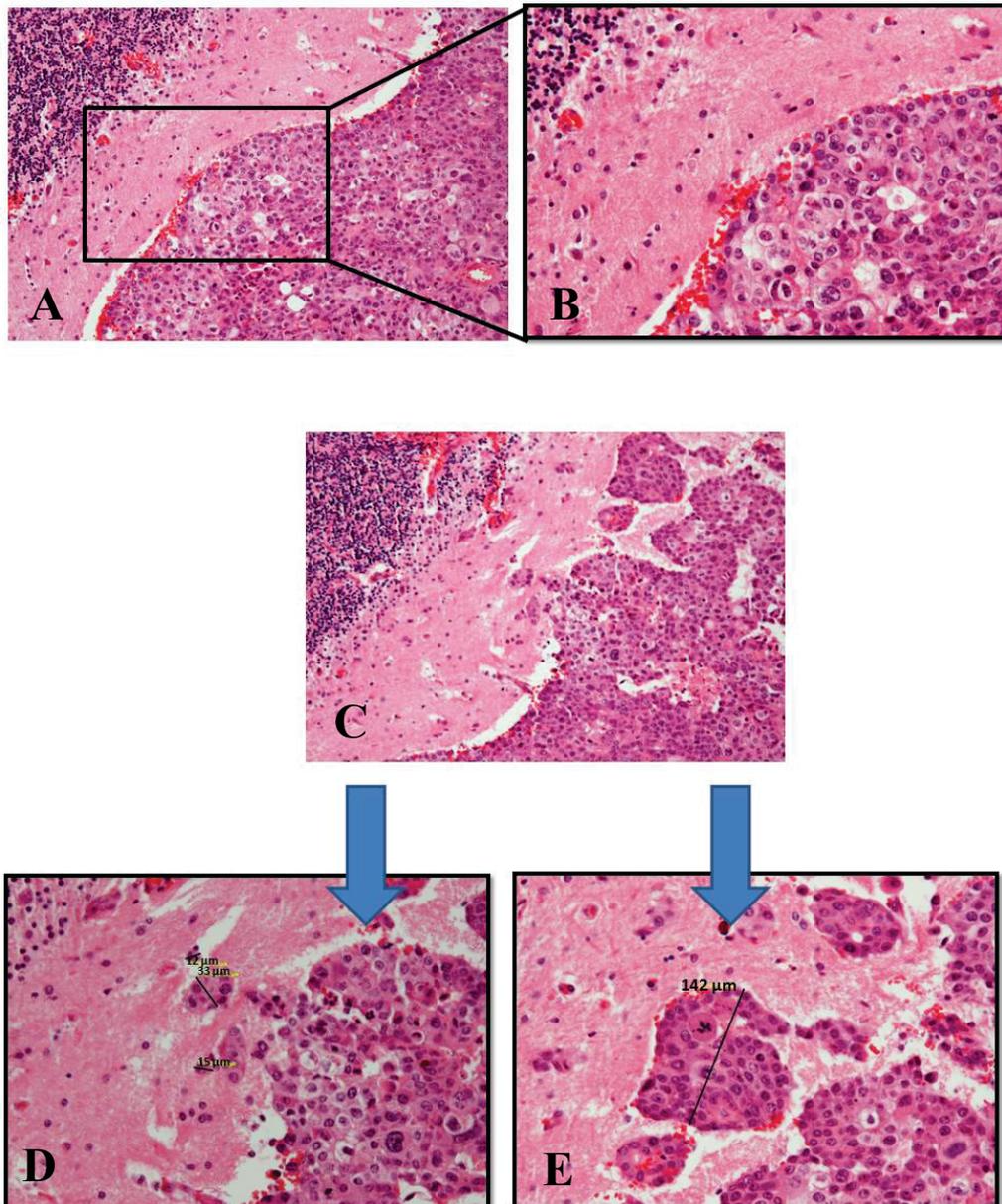
(A) HE-Färbung, Gesamtvergrößerung x200; (B) HE-Färbung, Ausschnittsvergrößerung aus (A), Gesamtvergrößerung x400; (C) Darstellung der epithelialen Tumorzellen mit Antikörper gegen KL1, Gesamtvergrößerung x400.



**Abbildung 13: Typ 1. Beispiel für Invasion in Form von Zellclustern am Beispiel eines NSCLC.**  
 (A) HE-Färbung, Gesamtvergrößerung x200; (B) HE-Färbung, Ausschnittsvergrößerung aus (A), Gesamtvergrößerung x400, (C) Darstellung der epithelialen Tumorzellen mit Antikörper gegen KL1, Gesamtvergrößerung x400.



**Abbildung 14: Invasion Typ 2: Invasion in Form von Satellitentumoren am Beispiel eines NSCLC vom Typ Adenokarzinom.** (A) HE-Färbung, Gesamtvergrößerung x200; (B) HE-Färbung, Ausschnittsvergrößerung aus (A), Gesamtvergrößerung x400. (C) Darstellung der epithelialen Tumorzellen mit Antikörper gegen KL1, Gesamtvergrößerung x400.



**Abbildung 15: Beispiel für das Vorliegen aller Invasionstypen bei einer zerebralen Metastase.**

HE-Färbungen eines NSCLC.

(A),(B) Gut abgegrenztes Wachstum (Typ 0). Gesamtvergrößerung x200 (A) bzw. x400 (B);

(D) Invasion in Form von Zellclustern (Typ 1). Ausschnittsvergrößerung aus (C), Gesamtvergrößerung 400x.

(E) Invasion in Form von Satellitentumoren (Typ 2). Ausschnittsvergrößerung aus C, Gesamtvergrößerung x400. In die Auswertung floss der dominierende Invasionstyp ein.

## 2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse und die Erstellung der Graphiken wurde mit der GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Benutzt wurde der Kruskal-Wallis-Test (mit Posttest nach Dunn) zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen sowie die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman ( $r_{Sp}$ ).

Zur Untersuchung der Abhängigkeit zwischen Invasionsstyp und Primärtumortyp wurde der Exakte Fisher-Test für 5x3 Felder unter Zuhilfenahme von Onlineressourcen verwendet:

[http://www.physics.csbsju.edu/cgi-bin/stats/exact\\_form.sh?nrow=5&ncolumn=3](http://www.physics.csbsju.edu/cgi-bin/stats/exact_form.sh?nrow=5&ncolumn=3)

Die Ergebnisse werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Stichprobenmittelwertes (MW+/-SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf  $p < 0,05$  festgesetzt. Werte von  $p < 0,01$  wurden als hochsignifikant betrachtet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientenkollektiv und Verteilung der Primärtumore

In Anbetracht fehlender Inzidenzraten aus dem letzten Jahrzehnt und abweichender Literaturangaben bezüglich der Verteilung von Hirnmetastasen auf verschiedene Primärtumore war es interessant herauszuarbeiten, wie sich die Verteilung im Kollektiv des Institutes für Neuropathologie Gießen darstellt.

Die untersuchten 80 Fälle waren den verschiedenen Primärtumoren wie folgt zuzuordnen: NSCLC n=29, Mammakarzinome n=10, kolorektale Karzinome n=15 und Nierenkarzinome n=5. In 8 Fällen war der Primarius unbekannt (CUP). Die verbleibenden 13 Fälle wurden unter „Sonstige“ zusammengefasst, da es sich um Einzelfälle eines bestimmten Primarius handelte und sich eine weitere Gruppenbildung daher nicht anbot (Abb. 16).

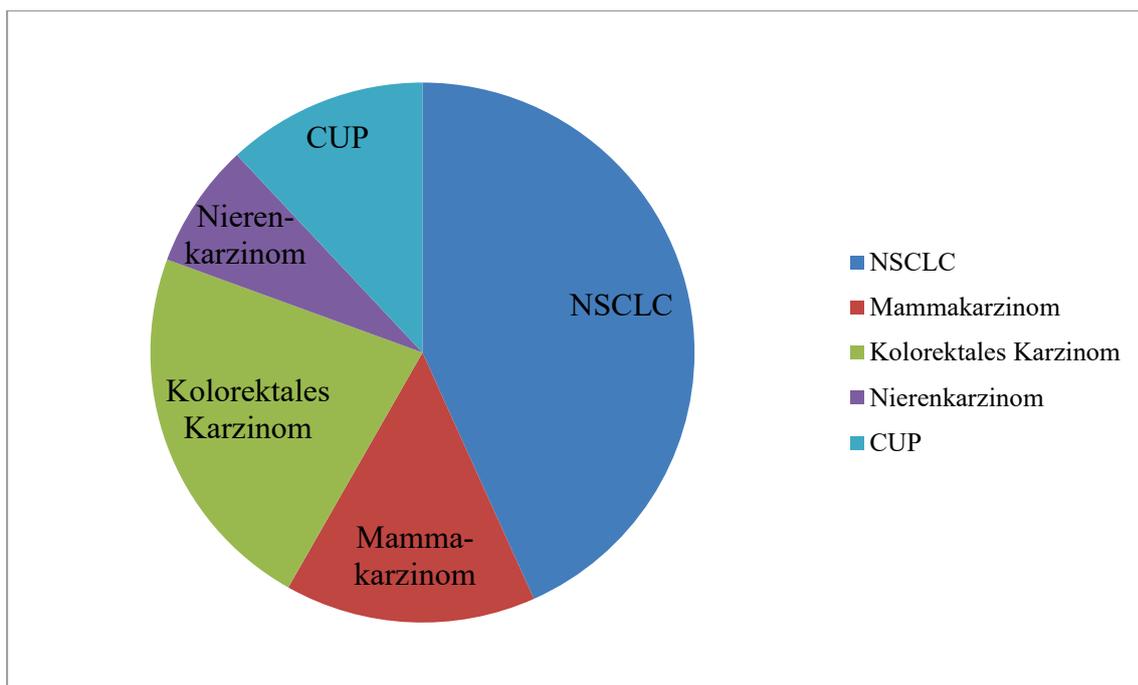


Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der Metastasen in Bezug auf ihre verschiedenen Primärtumore.

Die Geschlechterverteilung in Bezug auf die verschiedenen Primärtumore sah wie folgt aus: Beim NSCLC fanden sich 5 Frauen und 24 Männer, beim Mammakarzinom 10 Frauen, beim kolorektalen Karzinom 6 Frauen und 9 Männer und beim Nierenzellkarzinom 3 Frauen und 2 Männer. Die Verteilung der restlichen, selteneren, Tumorentitäten ist der detaillierten Tabelle im Anhang zu entnehmen (Tabelle 21).

Im aus 80 Fällen bestehenden Kollektiv der Patienten mit Hirnmetastasen befanden sich 35 Frauen und 45 Männer im Alter von 25 bis 85 Jahren (Median für beide Geschlechter 62 Jahre, Mittelwert 61,9 Jahre).

Das Alter der Frauen lag zwischen 41 und 85 Jahren und hatte somit eine Spannweite von 44 Jahren. Der Median des Alters lag bei 63 Jahren (Mittelwert 63,5 Jahre).

Bei den Männern lag das Alter zwischen 25 und 79 Jahren, die Spannweite betrug 54 Jahre. Der Median lag bei 60 Jahren (Mittelwert 60,6 Jahre).

Auf die einzelnen Tumorentitäten bezogen ergab sich der niedrigste Median mit 57,5 Jahren beim Mammakarzinom (Mittelwert 56,7 Jahre) und der höchste mit 71 Jahren bei Nierenzellkarzinom (Mittelwert 71,6 Jahre).

Die Patienten, von denen das Material für die Gefäßauswertungen am Normalhirn stammte, waren zum Zeitpunkt der Autopsie zwischen 49 und 81 Jahre alt, der Median des Alters für beide Geschlechter betrug 63 Jahre (Mittelwert 62,8 Jahre). Das Kollektiv bestand aus einer Frau und 4 Männern.

Die Patienten, von denen das Tumormaterial für die Gefäßauswertungen an Glioblastomen stammt, waren zwischen 43 und 83 Jahre alt, der Median des Alters für beide Geschlechter lag bei 65,5 Jahren (Mittelwert 63,8 Jahre). Das Patientenkollektiv bestand aus 6 Frauen und 4 Männern. Die Verteilung von Alter und Geschlecht in Bezug auf die untersuchten Gewebetypen ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 17).

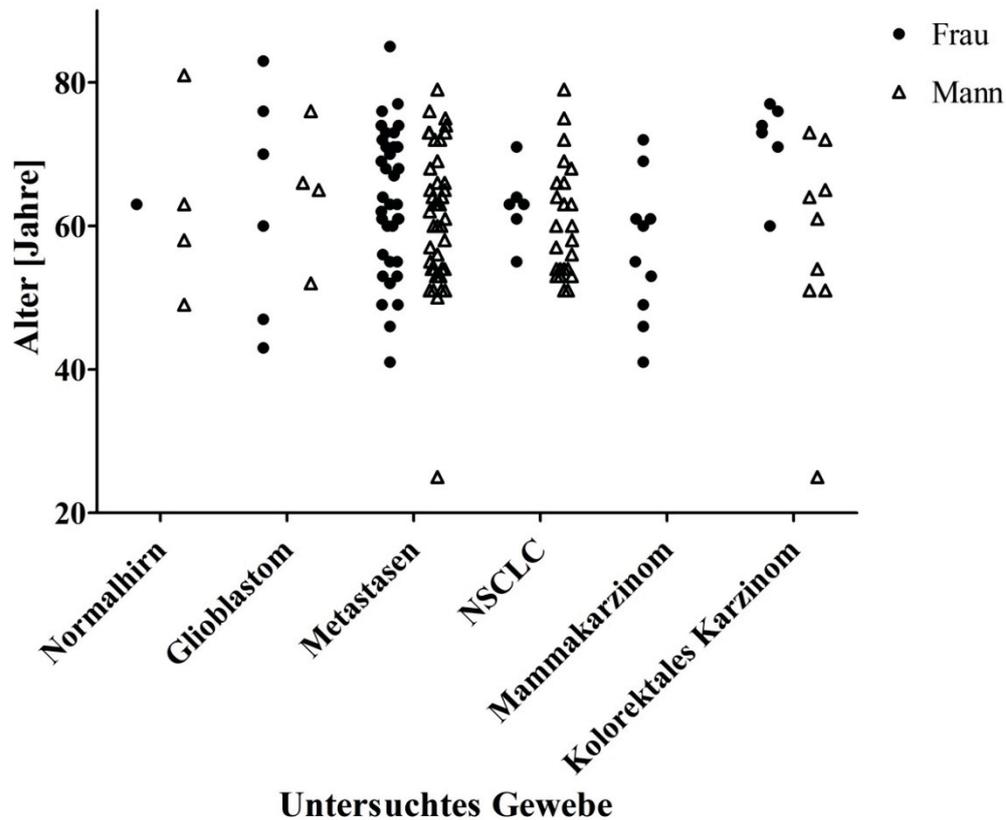


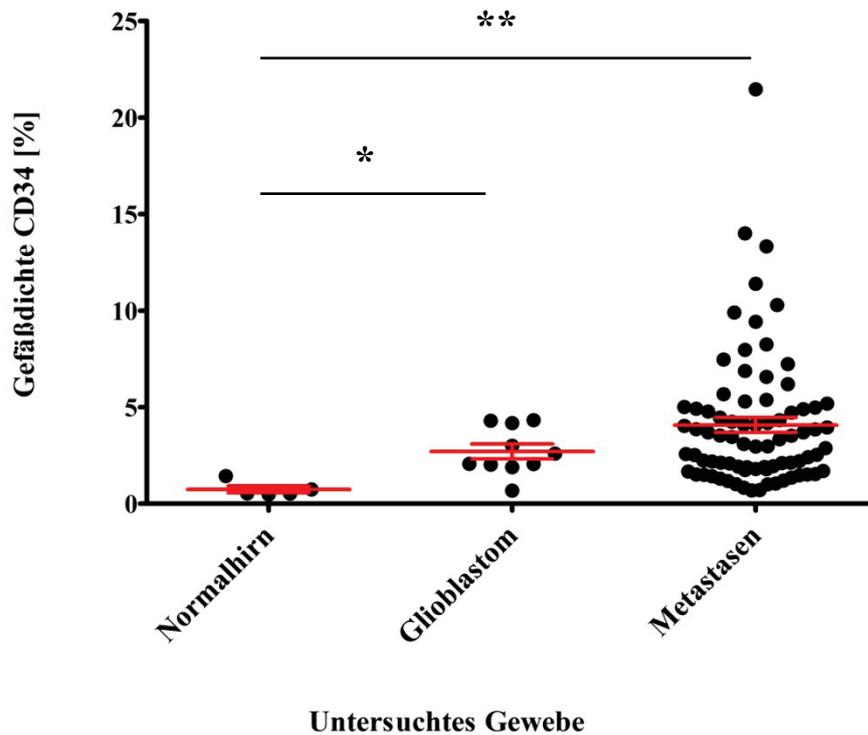
Abbildung 17: Verteilung von Alter und Geschlecht bei den untersuchten Fällen.

### 3.2 Analyse der Gefäßdichte im Tumor mit der CD34-Färbung

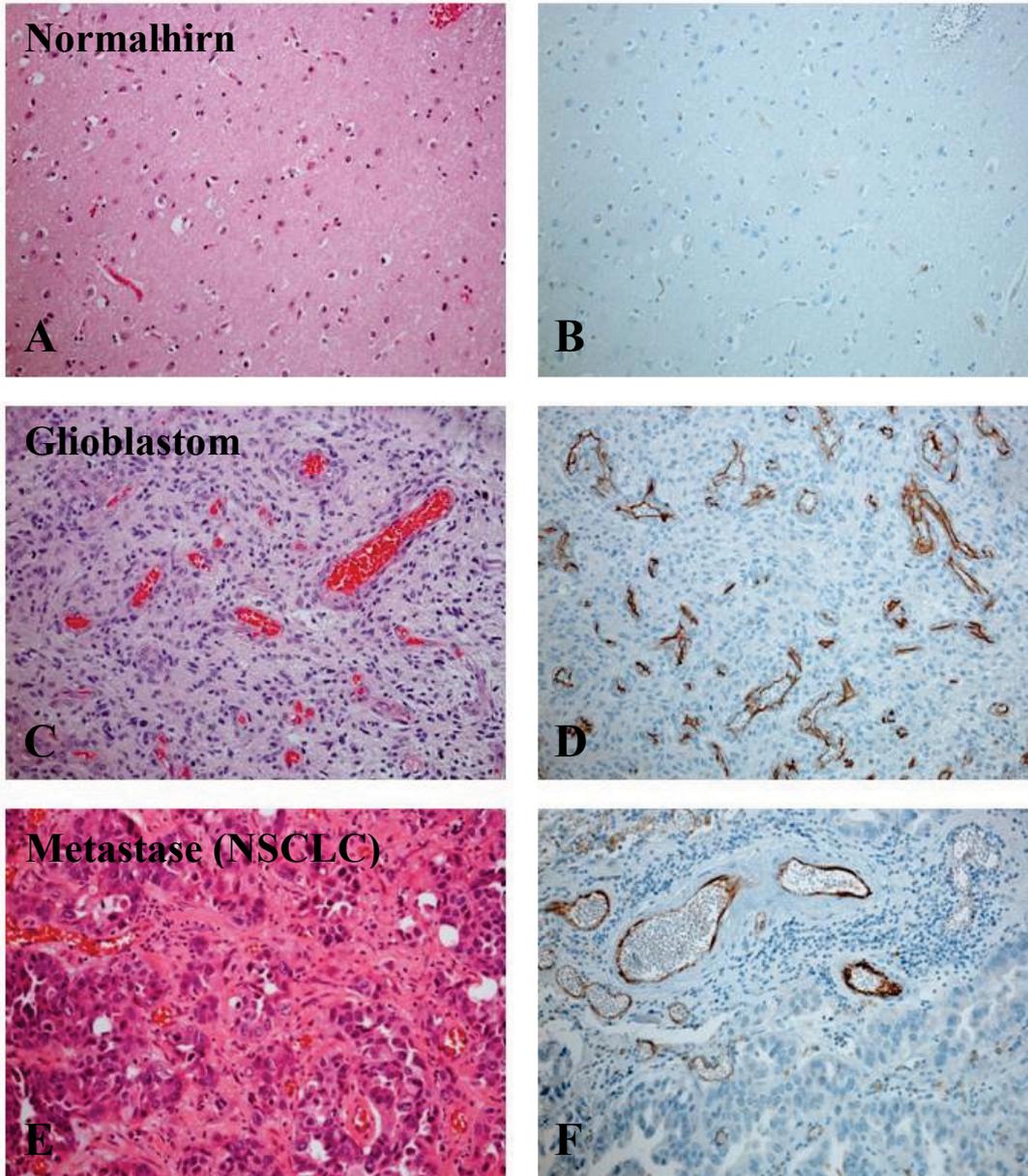
Nach der dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothese sollte Hypoxie im Tumor zur Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  mit nachfolgender Aktivierung von Neoangiogenese Prozessen und Steigerung der Invasivität führen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Gefäßdichte der Metastasen in der Färbung mit Antikörper gegen CD34 bestimmt. Für alle 80 untersuchten Fälle lag der Mittelwert der Gefäßdichte bei 4,08 +/- 0,39 %, die größte Gefäßdichte betrug 21,46 % und die kleinste 0,69 %. Um zu untersuchen, wie die Vaskularisierung in den Karzinommetastasen im Vergleich zu normalem Hirnparenchym und zu Glioblastomen ist, wurden zusätzlich die Gefäßdichte von gesundem Hirnparenchym (jeweils frontaler Kortex) und Glioblastomen, welche stark vaskularisiert sind, bestimmt. Hierbei zeigte sich für Normalhirn eine Gefäßdichte von 0,74 +/- 0,18 % und für die Glioblastome von 2,7 +/- 0,39 %.

Wie die Abbildungen 18 und 19 zeigen, war die Gefäßdichte bei Glioblastomen signifikant und bei Metastasen sogar hoch signifikant erhöht gegenüber dem

Normalhirn ( $p= 0,0015$ , Kruskal-Wallis-Test für drei Gruppen). Glioblastome und Metastasen unterschieden sich in ihrer Gefäßdichte hingegen nicht signifikant voneinander. Maligne Tumore haben nach diesen Ergebnissen also eine gegenüber dem gesunden Hirnparenchym eindeutig erhöhte Gefäßdichte gemeinsam, egal ob es sich um Metastasen als sekundäre oder Glioblastome als primäre Hirntumore handelt.



**Abbildung 18: Gefäßdichte von Normalhirn, Glioblastomen und Metastasen in der CD34-Färbung.** Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei den Glioblastomen und hoch signifikanter Unterschied bei den Metastasen im Vergleich zum normalen Hirnparenchym ( $p=0,0015$  Kruskal-Wallis-Test für alle drei Gruppen).



**Abbildung 19: Unterschiedlich starke Vaskularisierung von Metastasen, Glioblastomen und normalem Hirnparenchym.**

In der HE-Färbung (A, C, E) und in der CD34-Färbung (B, D, F) wird die stärkere Vaskularisierung von Glioblastomen und Metastasen im Vergleich zum Normalhirn deutlich. Gesamtvergrößerung x200. (A, B) Normalhirn; (C, D) Glioblastom; (E, F) adenoides Bronchialkarzinom als Vertreter der Metastasen.

Die Gefäßdichte der Metastasen war gegenüber dem normalen Hirnparenchym hochsignifikant erhöht. Als nächstes sollte untersucht werden, ob sich die verschiedenen Metastasen, in Bezug auf ihren Primärtumor, in ihren Gefäßdichten unterscheiden. Dahinter steht die Frage, ob die Gefäßdichte eher abhängig vom Tumortyp und den ihm inhärenten Eigenschaften und/oder von anderen Faktoren wie beispielsweise dem umgebenden Mikromilieu und den Eigenschaften der extrazellulären Matrix (EZM) ist. Die Gefäßdichte war bei den NSCLC 5,03 +/- 0,86 %, bei Mammakarzinomen 4,42 +/- 1,19 %, bei kolorektalen Karzinomen 3,40 +/- 0,53 %, bei Nierenkarzinomen 3,4 +/- 1,09 % und bei den sonstigen Tumore 3,24 +/- 0,44 % (Abbildung 20). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p= 0,7117$ , Kruskal-Wallis-Test für 5 Gruppen). Die Gefäßdichte zeigte sich in den Metastasen unabhängig vom zugrunde liegenden Primärtumor erhöht gegenüber dem Hirnparenchym.

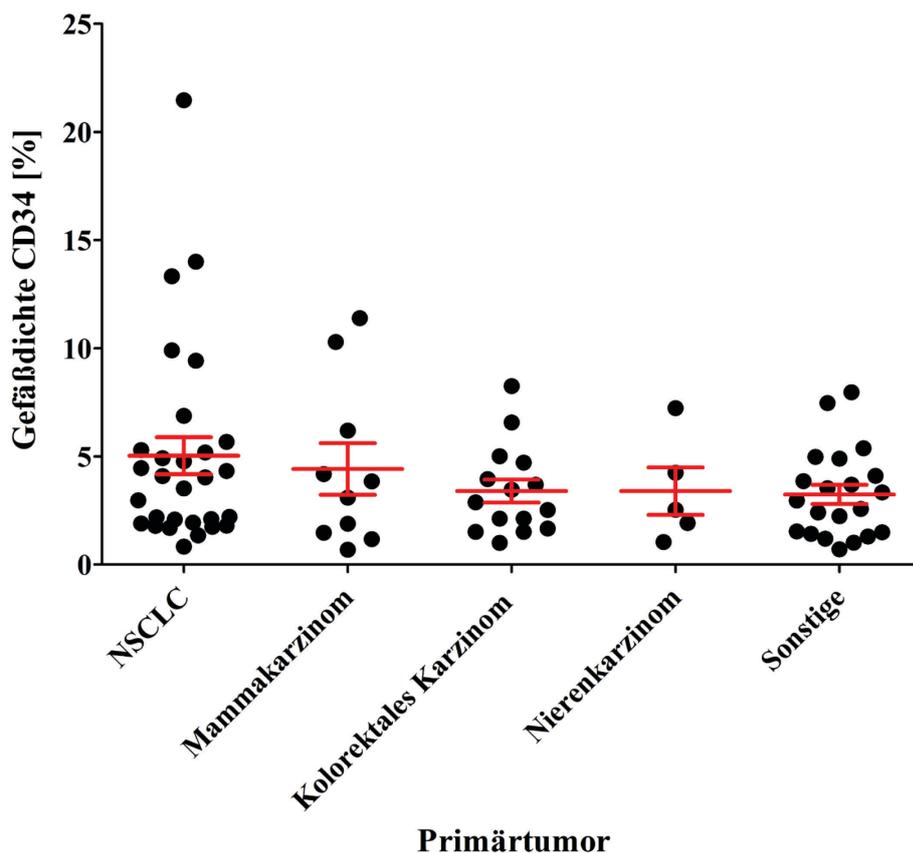
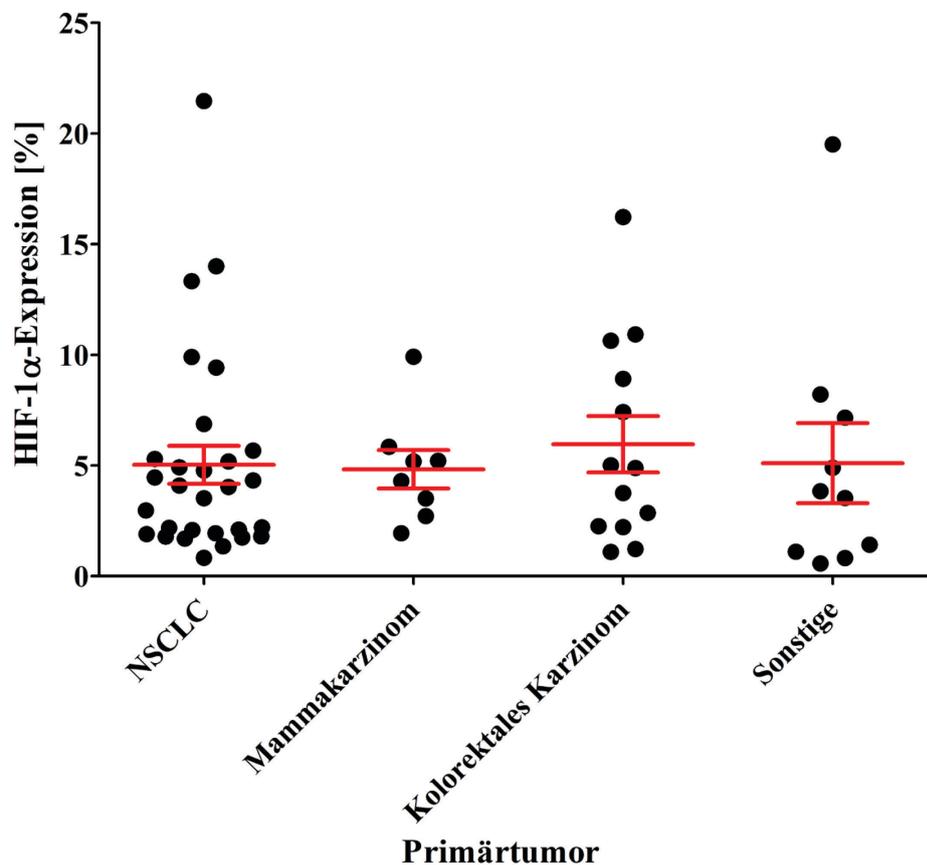


Abbildung 20: Die Analyse der Gefäßdichte der Metastasen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Tumorentitäten der Metastasen (Kruskal-Wallis-Test,  $p=0.71$ ).

### 3.3 HIF-1 $\alpha$ -Expression in Metastasen

HIF-1 $\alpha$  nimmt eine Schlüsselrolle bei der Hypoxie-Adaptation von Zellen ein. Im nächsten Schritt wurde daher die HIF-1 $\alpha$ -Expression für die verschiedenen Metastasentypen bestimmt, um zu untersuchen, ob sich die HIF-1 $\alpha$ -Expression, im Gegensatz zur Gefäßdichte, bei den unterschiedlichen Tumorentitäten unterscheidet. Die morphometrische Analyse der nukleären HIF-Expression in den Tumorzellen zeigte, dass die HIF-1 $\alpha$ -Expression 5,03 +/- 0,86 % für NSCLC, 4,83 +/- 0,87 % für Mammakarzinome, 5,96 +/- 1,27 % für kolorektale Karzinome und 5,10 +/- 1,81 % für die verbleibenden Tumortypen betrug (Abb.21). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der HIF-1 $\alpha$ -Expression zwischen den verschiedenen Tumorentitäten ( $p=0,6647$ , Kruskal-Wallis-Test für 4 Gruppen).



**Abbildung 21: HIF-1 $\alpha$ -Expression in Abhängigkeit von der Primärtumorentität der Metastasen.**

HIF-1 $\alpha$ -Expression von Metastasen von NSCLC, Mammakarzinomen, kolorektalen und sonstigen Karzinomen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,6647$ , Kruskal-Wallis-Test für 4 Gruppen).

Interessanterweise zeigte sich allerdings ein typisches Expressionsmuster von HIF-1 $\alpha$  innerhalb des Tumors mit einer starken HIF-1 $\alpha$ -Expression perinekrotisch und gehäuft im Bereich der Invasionsfront.

### 3.4 Gefäßdichte und HIF-1 $\alpha$ -Expression

Die Daten zeigen, dass die verschiedenen Tumorentitäten keinen signifikanten Unterschied in der HIF-1 $\alpha$  -Dichte und in der Gefäßdichte aufweisen. Interessant ist aber, ob sich eine Korrelation von HIF-1 $\alpha$ -Expression und Gefäßdichte zeigt, d.h. ob Tumore mit einer hohen HIF-1 $\alpha$ -Expression, eine eher hohe oder niedrige Vaskularisierung aufweisen. Zum einen könnte eine niedrige Gefäßdichte über verminderte Perfusion zu einer erhöhten Hypoxie und damit HIF-Expression führen. Zum anderen könnte eine erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Expression über Stimulierung der Angiogenese zu einer erhöhten Gefäßdichte führen. In der Analyse aller Metastasen, zunächst ohne Aufschlüsselung nach Primärtumor, zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Gefäßdichte und HIF-1 $\alpha$ -Dichte ( $r_{Sp}= 0,23$ ,  $p= 0,1$ ) (Abb.22).

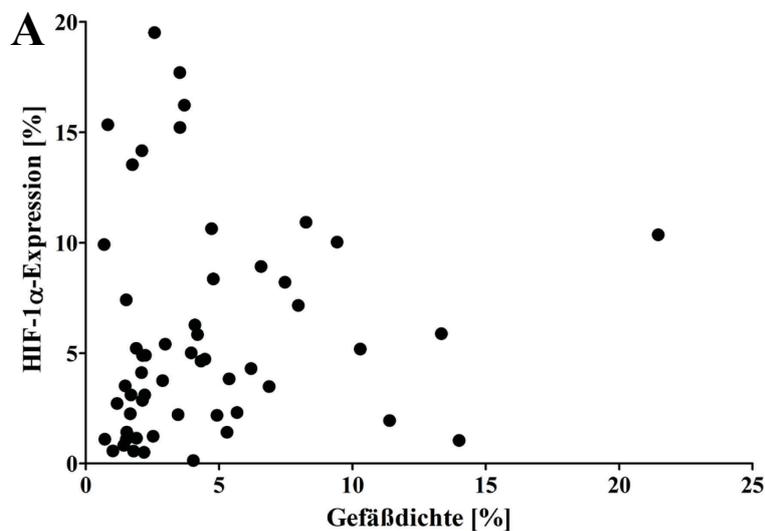


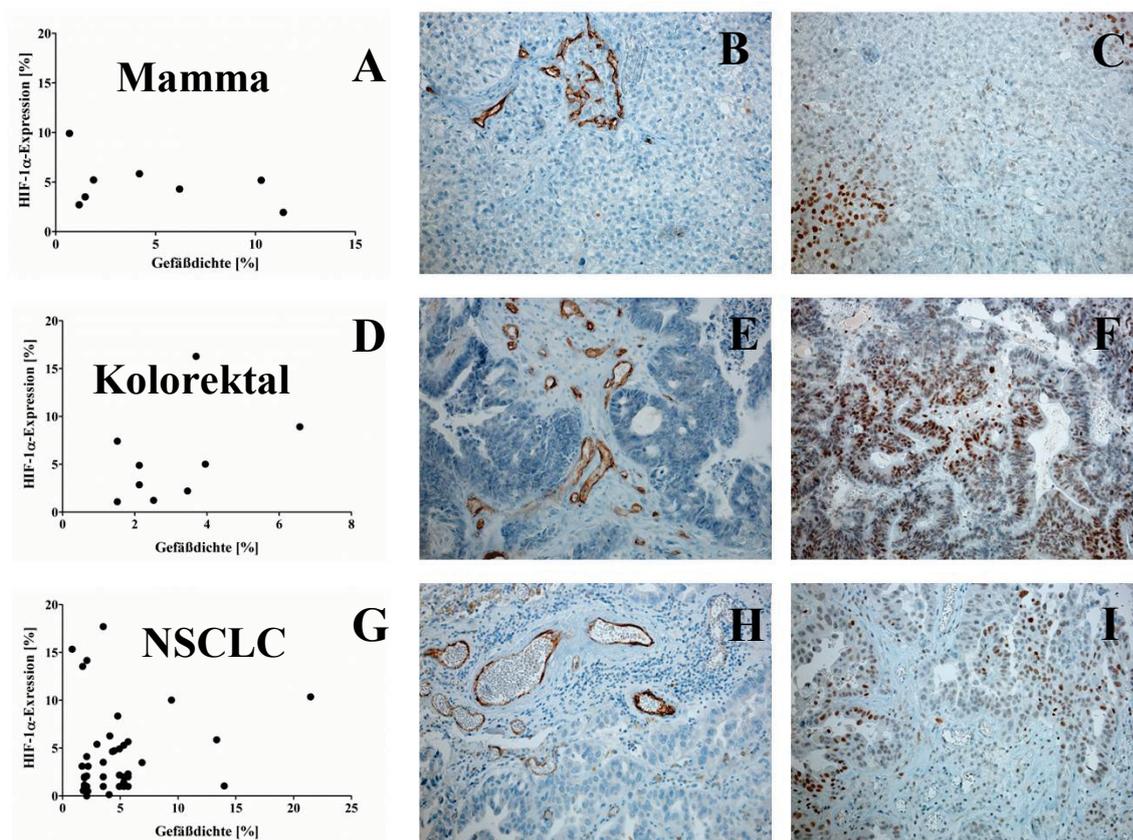
Abbildung 22: Korrelationsanalyse von Gefäßdichte mit der HIF-1 $\alpha$ -Expression bei Metastasen von NSCLC, Mamma- und kolorektalen Karzinomen.

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang ( $r_{Sp}= 0,23$ ,  $p= 0,1$ ).

Allerdings lässt die Betrachtung der einzelnen Tumorentitäten vermuten, dass je nach Tumorentität spezifische Unterschiede bestehen könnten (Abb.23).

Bei Mammakarzinomen zeigte sich eine negative Korrelation ( $r_{Sp} = -0,36$ ,  $p = 0,39$ ): Mit steigender Gefäßdichte nahm die HIF-1 $\alpha$ -Expression ab (bzw. mit steigender HIF-1 $\alpha$ -Expression sank die Gefäßdichte). Bei kolorektalen Karzinomen zeigte sich eine positive Korrelation ( $r_{Sp} = 0,55$ ,  $p = 0,13$ ), mit steigender HIF-1 $\alpha$ -Expression stieg auch die Gefäßdichte (und umgekehrt). Bei NSCLC deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass keine Korrelation ( $r_{Sp} = -0,03$ ,  $p = 0,89$ ) zwischen Gefäß- und HIF-1 $\alpha$ -Expression besteht.

Für alle drei Tumortypen waren die Korrelationen allerdings nicht signifikant und können daher allenfalls als Trend betrachtet werden.



**Abbildung 23: Korrelationsanalyse von Gefäßdichte mit der HIF-1 $\alpha$ -Expression bei Metastasen von NSCLC, Mamma- und kolorektalen Karzinomen.**

(A-C) Korrelationsanalyse von Gefäßdichte und HIF-1 $\alpha$ -Expression für Metastasen von Mammakarzinomen ( $r_{Sp} = -0,36$ ,  $p = 0,39$ ).

(D-F) Korrelationsanalyse von Gefäßdichte und HIF-1 $\alpha$ -Expression für Metastasen von kolorektalen Karzinomen ( $r_{Sp} = 0,55$ ,  $p = 0,13$ ).

(G-I) Korrelationsanalyse von Gefäßdichte und HIF-1 $\alpha$ -Expression für Metastasen von NSCLC ( $r_{Sp} = -0,03$ ,  $p = 0,89$ ).

(B,E,H) Immunreaktion mit Antikörper gegen CD34; (C,F,I): Immunreaktion mit Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$ ; Gesamtvergrößerung x200.

### 3.5 Invasionsmuster

Um der Frage nachzugehen, ob Hirnmetastasen das Hirnparenchym nach einem typischen Invasionsmuster infiltrieren, wurde das vorherrschende Invasionsmuster gemäß der Invasionstypen (s. Abb.11-15) semiquantitativ ausgewertet.

Ein abgegrenztes Tumorwachstum ohne Invasion (Invasionstyp 0) zeigte sich in lediglich 6/80 Fällen (7,5 %). Dies wurde zusätzlich über eine IHC Färbung mit dem panepithelialen Marker KL-1 bestätigt, die es ermöglicht, auch Einzelzellinvasionen zu visualisieren. Eine Invasion in Form von Zellclustern (Typ 1) lag bei 12/80 Fällen (15 %) vor, in der Mehrzahl der Fälle, nämlich bei 62/80 Fällen (77,5 %), war der prädominierende Invasionsstyp in Form von Satellitentumoren (Typ 2) (Abb.24).

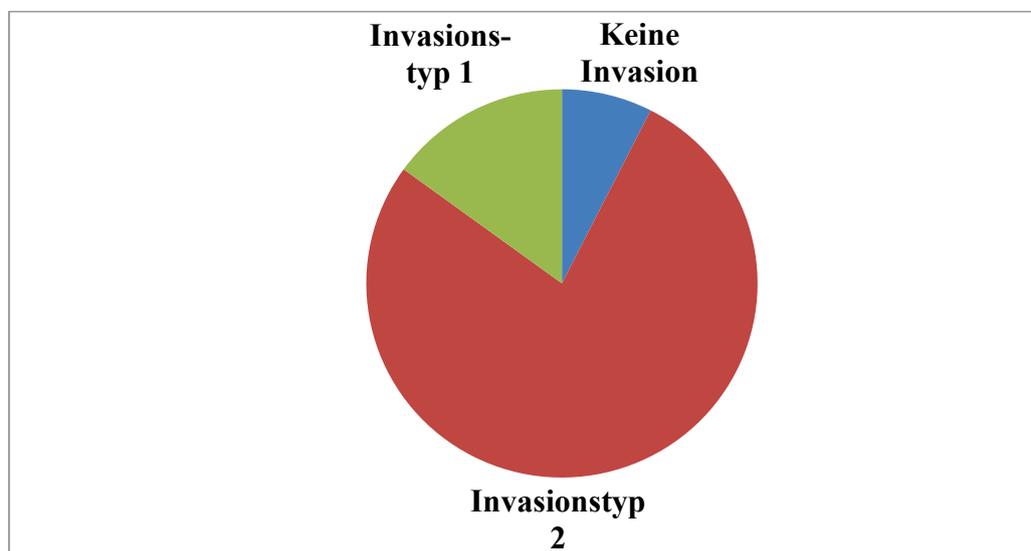


Abbildung 24: Invasionsstyp der Metastasen in das angrenzende Hirnparenchym.

Diese Daten zeigen, dass in 92,5 % der Fälle eine Invasion von Metastasenzellen in das umgebende Hirnparenchym stattfand, so dass man nicht, wie bisher angenommen, von einem scharf abgegrenzten Tumorwachstum ausgehen kann.

Bei Mamma- und kolorektalen Karzinomen, NSCLC sowie bei Betrachtung der Gesamtheit der Metastasen ist Invasionstyp 2 am häufigsten. Invasionstyp 0, also das abgegrenzte Wachstum, zeigte sich bei keinem der Mamma- und kolorektalen Karzinome. Beim NSCLC zeigten sich hingegen alle Invasionstypen, wobei Invasionstyp 2 mit 69 % seltener auftrat als bei Mamma- und kolorektalen Karzinomen; bei den betrachteten drei Haupttumorgruppen zeigte sich Invasionstyp 1 am häufigsten beim NSCLC (Tabelle 1).

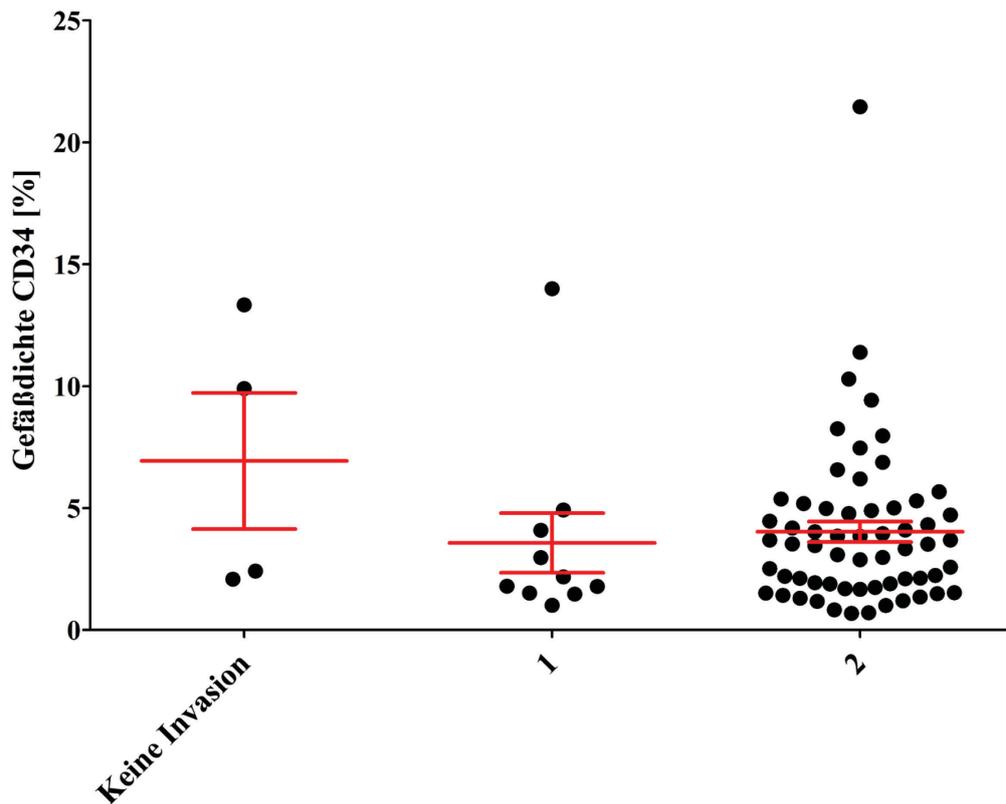
Der Invasionstyp zeigte sich unabhängig vom Primärtumortyp der Metastasen (Exakter Fisher Test,  $p=0,05$ )

**Tabelle 1: Häufigkeit der drei Invasionstypen bei den Metastasen der verschiedenen Primärtumore**

|                       | Invasionstyp 0 |              | Invasionstyp 1 |               | Invasionstyp 2 |               |
|-----------------------|----------------|--------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
|                       | n              | %            | n              | %             | n              | %             |
| Mammakarzinom         | 0              | 0 %          | 1              | 10,0 %        | 9              | 90,0 %        |
| Kolorektales Karzinom | 0              | 0 %          | 1              | 6,7 %         | 14             | 93,3 %        |
| NSCLC                 | 3              | 10,3 %       | 6              | 20,7 %        | 20             | 69,0 %        |
|                       |                |              |                |               |                |               |
| Nierenkarzinom        | 2              | 40,0 %       | 2              | 40,0 %        | 1              | 20,0 %        |
| Sonstige              | 1              | 4,8 %        | 2              | 9,5 %         | 18             | 85,7 %        |
|                       |                |              |                |               |                |               |
| <b>Gesamt</b>         | <b>6</b>       | <b>7,5 %</b> | <b>12</b>      | <b>15,0 %</b> | <b>62</b>      | <b>77,5 %</b> |

### 3.5.1 Invasion und Gefäßdichte

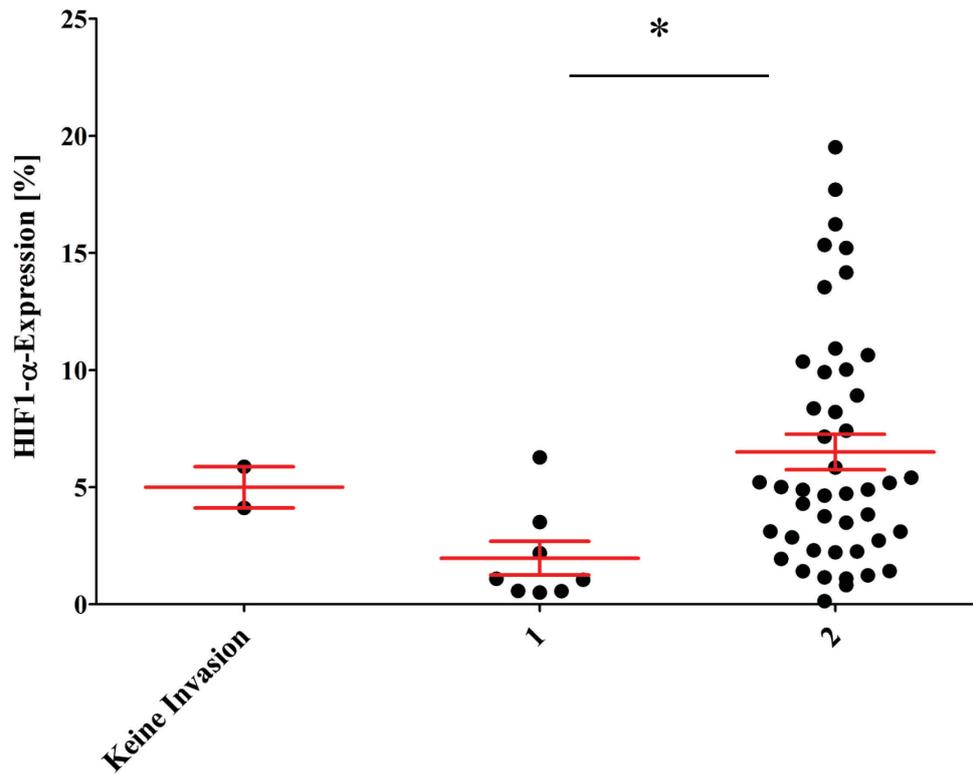
Unter der Annahme, dass Hypoxie über das HIF-System zu einer Steigerung der Invasion führt und die Gefäßdichte einen Parameter darstellt, der durch das HIF-System beeinflusst wird bzw. das HIF-System beeinflusst, wurde die Gefäßdichte für die einzelnen Invasionstypen untersucht. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in den Gefäßdichte in Abhängigkeit vom Invasionstyp ( $p= 0,5205$  Kruskal-Wallis-Test für Gesamtheit der Metastasen) (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Gefäßdichte in Abhängigkeit des Invasionstyps.**  
 Untersucht wurden die Metastasen sämtlicher Primärtumorentitäten.

### 3.5.2 Invasionsverhalten der Metastasen in das angrenzende Hirnparenchym in Abhängigkeit von der HIF-1 $\alpha$ -Expression

Als nächstes wurde die HIF-1 $\alpha$ -Expression mit dem Invasionstyp korreliert. Die Analyse der HIF-1 $\alpha$ -Expression in Abhängigkeit vom Invasionstyp zeigte eine signifikante Korrelation zwischen HIF-1 $\alpha$ -Expression und Invasionsverhalten. So war die HIF-1 $\alpha$ -Expression für den Invasionstyp 2, also den Typ mit stärkerer bzw. weiter fortgeschrittener Invasion, signifikant höher als bei Typ 1 ( $p= 0,0101$  Kruskal-Wallis-Test, Posttest signifikant 1 vs. 2) (Abb. 26.).



**Abbildung 26: Invasionsverhalten in Abhängigkeit der HIF-1 $\alpha$ -Expression.**

Es zeigte sich eine signifikant höhere HIF-1 $\alpha$ -Expression bei Tumoren mit Invasionstyp 2 im Vergleich zu Typ 1. Betrachtung von Metastasen sämtlicher Primärtumorentitäten.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Ergebnisse im Kontext anderer Studien**

Durch verbesserte systemische Tumorthérapien, die bereits in vielen Fällen zu einer verbesserten Prognose von malignen Tumoren führen, stehen die durch Hirnmetastasen verursachte Morbidität und Mortalität zunehmend im Vordergrund und verlangen nach neuen, effektiveren Therapieansätzen. Hierfür ist Forschung zur Pathophysiologie und zum Wachstumsverhalten von Hirnmetastasen unbedingt notwendig.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Vaskularisierung/Angiogenese das Invasionsverhalten von Hirnmetastasen beeinflusst, so wie es für die entsprechenden Primärtumore gezeigt werden konnte und ob und wie stark Hirnmetastasen, die lange als gut abgegrenzt und primär expansiv wachsende Tumore galten, überhaupt zu invasivem Wachstum in das angrenzende Hirnparenchym neigen. Insbesondere wurde dabei die Rolle des proangiogen und proinvasiv wirkenden Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1 $\alpha$  in der Kontrolle der Vaskularisierung und Invasion von Hirnmetastasen untersucht. Hierzu wurden insgesamt 80 Hirnmetastasen unterschiedlicher Tumorentitäten untersucht, mit Mamma-, Bronchial- und kolorektalem Karzinom als häufigsten Primärtumoren. Zusätzlich wurden normales Hirnparenchym (Obduktionsfälle) sowie Fälle von Glioblastomen untersucht. Die Fälle wurden sowohl histomorphologisch als auch mithilfe morphometrischer Analysen zur Gefäßdichte, HIF Expression und Invasionsverhalten in das angrenzende Hirnparenchym beurteilt.

Zusammenfassend zeigte sich, dass HIF-1 $\alpha$  in allen Hirnmetastasen in etwa 5 % der Tumorfläche exprimiert wurde und Hirnmetastasen eine signifikant erhöhte Gefäßdichte gegenüber dem Hirnparenchym haben. Als weiteres wichtiges Ergebnis konnten wir zeigen, dass Hirnmetastasen durchaus invasiv wachsen und dass stark invadierende Metastasen eine signifikant höhere HIF-1 $\alpha$ -Expressionsdichte aufweisen.

#### **4.1.1 Vaskularisierung der Hirnmetastasen und die Rolle von HIF-1 $\alpha$**

Die Gefäßdichte wurde in der vorliegenden Studie an Schnitten analysiert, in denen die Endothelzellen der Gefäße mit einem Antikörper gegen CD34 dargestellt wurden. Dies ist eine etablierte Methode in der Tumorpathologie (Ramani et al., 1990; Vermeulen et al., 2002). Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Gefäßdichte in den Metastasen gegenüber dem Hirnparenchym. Allerdings zeigten sich keine signifikanten

Unterschiede der Gefäßdichte zwischen den Metastasen mit unterschiedlichem Primarius.

Diese Befunde legen nahe, dass die Gefäßdichte nicht vom Primärtumor und den ihm inhärenten Eigenschaften/genetische Ausstattung abhängt, sondern möglicherweise direkt vom umgebenden Mikromilieu und/oder den Eigenschaften der EZM. Ebenso ist aber auch vorstellbar, dass beispielsweise alle im ZNS wachsenden Metastasen über eine ähnliche genetische Ausstattung bzw. transkriptionelle Programme verfügen, die eine hohe Vaskularisierung bedingen.

Beide Theorien widersprechen sich dabei nicht grundsätzlich: Zum einen selektiert der Metastasierungsprozess für angiogene, hypoxieadaptierte Zellen. Zum anderen könnte die weitere Vaskularisierung vom Mikromilieu und den Eigenschaften des Hirnparenchyms abhängen. Möglicherweise müssen aber auch zusätzliche Faktoren berücksichtigt werden wie beispielsweise Alter und Größe der Metastase: Da Tumorzellen in der Lage sind sich schneller als Endothelzellen zu teilen, ist die Zellumsatzrate bei Tumoren bis zu halb so kurz wie die für Endothel (Tannock, 1970; Langley und Fidler, 2011), dies könnte in der Folge zu unterschiedlichen Tumorfläche-Gefäß-Verhältnissen je nach Alter des Tumors führen.

Berghoff et. al. verglichen in einer aktuellen Studie die MVD (micro vessel density) und den HIF-1 $\alpha$ -Index von Hirnmetastasen verschiedener Primärtumore, darunter auch die in unserer Arbeit untersuchten Tumorentitäten (Mammakarzinom, NSCLC, kolorektales Karzinom, Nierenzellkarzinom). Signifikante Unterschiede bezüglich MVD und HIF-1 $\alpha$ -Index im Vergleich der Metastasen unterschiedlichen Primärtumors fanden sie vor allem bei Nierenzellkarzinomen, hier fielen beide Werte am höchsten aus, und Melanomen, wo sich die niedrigsten Werte im Vergleich zu den anderen Tumorentitäten zeigten. Allerdings wurde das Nierenzellkarzinom in der vorliegenden Arbeit aufgrund hypoxieunabhängiger HIF-Expression nicht in die Auswertung mit einbezogen und im Untersuchungskollektiv waren keine Fälle von Hirnmetastasen von Melanomen. Für alle übrigen in dieser Arbeit untersuchten Subtypen kamen auch Berghoff et. al. zu dem Ergebnis, dass kein Unterschied sowohl in Gefäßdichte als auch HIF-1 $\alpha$ -Expression im Vergleich der verschiedenen Metastasentypen untereinander vorlag.

Berghoff et. al. verglichen die Hirnmetastasen soweit vorhanden mit dem jeweiligen Primärtumor in Bezug auf MVD und HIF-1 $\alpha$ -Expression. Dabei lag für NSCLC die

MVD in den Hirnmetastasen höher als beim Primärtumor, für alle anderen zumindest in der derselben Größenordnung mit Mittelwerten um die 60-70 Gefäßstrukturen pro Zählfeld von 0,7 mm<sup>2</sup> (Berghoff et al., 2015). Eine andere Studie untersuchte die MVD bei Glioblastomen, Nierenzell-, Mamma-, kolorektalen und Bronchialkarzinomen und deren jeweiligem Ursprungsgewebe und konnte zeigen, dass die MVD der Tumore stets niedriger war als für das entsprechende Ursprungsgewebe (Eberhard et al., 2000).

In einer weiteren Studie wurde die MVD von Hirnmetastasen mit dem umgebenden Hirnparenchym im Mausmodell verglichen. Die Daten zeigen, dass die MVD in Hirnmetastasen geringer ist als im umgebenden Hirngewebe. Möglicherweise korreliert daher die MVD in Hirnmetastasen nicht mit der Tumoraggressivität (Schackert und Fidler, 1988; Fidler et al., 2002), wie dies für andere Tumore, z.B. das Mammakarzinom, gezeigt werden konnte. Einen Zusammenhang von Tumoraggressivität und Vaskularisierung weißt Fidler jedoch nicht von der Hand, er vermutet vielmehr, dass der Zusammenhang mit nicht sprossenden, alternativen Formen der Gefäßbildung wie vaskulärem Remodelling bestehen könnte. Diese Formen der Gefäßbildung werden mit der von Fidler durchgeführten Bestimmung der MVD nicht abgedeckt. Die im Vergleich zu dieser Studie abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in der wir eine erhöhte Vaskularisierung der Hirnmetastasen gegenüber dem Hirnparenchym fanden, könnten vor allem auf Unterschiede in der Methodik zurückzuführen sein. Hierbei sind unterschiedliche Methoden in der MVD Bestimmung zu erwähnen wie z.B. die Wahl des Antikörpers, der gemessene Gefäßparameter (Gefäßzahl oder Gefäßfläche) sowie die Auswahl des auszuwertenden Tumorgebiets [...] (Fox, 1997). So benutzte Fidler u.a. CD31 als Angiogenesemarker und bestimmte im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit die MVD, also die Anzahl von Mikrogefäßen pro Fläche und nicht die Gefäßfläche. Dabei verwendete er einen Ansatz, der zumindest für unsere Fragestellung nicht sensibel genug ist. Denn Tumore bedienen sich verschiedener Mechanismen, um ihre Gefäßversorgung zu sichern. Hierzu zählen neben der direkten Angiogenese auch die Vaskulogenese, das vaskuläre Remodelling, die Intussuszeption und eventuell das vaskuläre Mimikry (Fox und Harris, 2004). Die letztgenannten drei Formen werden auch als nicht sprossende Angiogenese, im Gegensatz zur sprossenden, echten Angiogenese, bezeichnet (Fidler et al., 2002). Fidler zeigte im Mausversuch, dass in Hirnmetastasen von u.a. Lungenkarzinomen 15-20 Mal weniger Gefäße anzutreffen waren als im angrenzenden Hirnparenchym. Aber wie er selbst zu bedenken gab, handelte es sich z.T. um große, dilatierete Gefäße, in einigen

Fällen mit Querverbindungen und Mehrfachlumen (Fidler et al., 2002; Fidler, 2011). Dies spricht klar für das Vorliegen nicht sprossenden Wachstums (statt sprossender Angiogenese). Durch die gewählte Methode könnte Fidler et al die tatsächliche Gefäßdichte unterschätzt haben. Um auch diese, von der Angiogenese unterschiedlichen Art von Gefäßbildung/-versorgung zu berücksichtigen, ist die von uns gewählte Methode der flächenmäßigen Erfassung sensibler. Die in dieser Arbeit gewählte Methode deckt verschiedene Formen der Gefäßversorgung ab, aber unterscheidet nicht zwischen den verschiedenen Subtypen. So kann eine große Gefäßfläche zum Beispiel durch viele kleine oder wenige aber dilatierte Gefäße oder einer Mischung aus beidem zustande kommen. Verschiedene Autoren legen nahe, dass einige Primärtumore eine spezifische Form des Anschlusses an das Gefäßsystem des Zielgewebes bevorzugen. So geht man beim Bronchialkarzinom v.a. von Angiogenese aus, während beim Melanom bevorzugt die Gefäßko-optierung genutzt wird (Kienast et al., 2010).

Zahlreiche Studien, wie auch die vorliegende, zeigen, dass HIF-1 $\alpha$  in den meisten malignen Tumoren und deren Metastasen überexprimiert wird, während bei non-invasiven, benignen Tumoren keine HIF-1 $\alpha$ -Expression nachgewiesen werden kann (Zhong et al., 1999).

Die Untersuchung der HIF-1 $\alpha$ -Expression zeigte sich in unseren Untersuchungen, ebenso wie die Gefäßdichte, als unabhängig vom Primärtumortyp der Metastase. Dies spricht möglicherweise dafür, dass für keinen der untersuchten Subtypen (außer dem Nierenzellkarzinom) ein potenter alternativer, hypoxieunabhängiger, Induktionsmechanismus für HIF-1 $\alpha$  vorliegt, bzw. dass alle Tumore im Zusammenspiel mit dem sie umgebenden Mikromilieu einen vergleichbaren Mechanismus benutzen, um HIF-1 $\alpha$  zu induzieren. Diese Befunde sind gut vereinbar mit der Studie von Berghoff et al, welche ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich MVD und HIF-1 $\alpha$ -Index in den Metastasen in Abhängigkeit vom Primärtumortyp gefunden haben (Berghoff et al., 2015).

Als wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit soll herausgestellt werden, dass sich in der Gesamtheit aller Metastasen, entgegen der Eingangshypothese, kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der HIF-1 $\alpha$ -Expression nachweisen ließ. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit publizierten Daten, welche ebenfalls keine Korrelation zwischen MVD und HIF-1 $\alpha$ -Index feststellen konnten, obwohl die Methodik der Gefäßanalyse geringe Unterschiede aufwies (Berghoff et al., 2015).

Das beobachtete Expressionsmuster von HIF-1 $\alpha$  legt nahe, dass HIF-1 $\alpha$  in Hirnmetastasen, wenn auch möglicherweise nicht ausschließlich, durch Hypoxie reguliert wird: HIF-1 $\alpha$  positive Zonen fanden sich vor allem perinekrotisch, eine Region, die typischerweise niedrige Sauerstoffkonzentrationen enthält. Darüber hinaus zeigte sich in einer Vielzahl der Fälle eine erhöhte HIF-1 $\alpha$  Expression an der Invasionsfront, in Übereinstimmung mit den von Zagzag et al. berichteten Befunden im Glioblastom (Zagzag et al., 2000). Diese Art der Verteilung der HIF-1 $\alpha$ -Expression konnte auch für Primärtumore/Metastasen in anderen Lokalisationen beobachtet werden (Zhong et al., 1999).

Interessanterweise ließen sich bei Betrachtung der verschiedenen Metastasentypen beim Mamma- und kolorektalen Karzinom Tendenzen der Korrelation von Gefäßdichte/HIF-1 $\alpha$ -Expression erkennen. Auf diese Tendenzen soll im Folgenden kurz eingegangen werden, um zwei grundsätzliche, mögliche Kausalitäten zu verdeutlichen.

Für Mammakarzinome steigt die HIF-Expression mit sinkender Gefäßdichte (sinkt die HIF-1 $\alpha$ -Expression mit steigender Gefäßdichte). Eine mögliche Erklärung für diese negative Korrelation ist die folgende: Eine niedrige Gefäßdichte verursacht durch eine Minderperfusion des Gewebes Hypoxie, die wiederum zur vermehrten Expression von HIF führt. Im Sinne einer Rückkopplung ist natürlich auch die entgegengesetzte Richtung denkbar, nämlich, dass eine steigende Gefäßdichte eine geringere HIF-Expression bewirkt. Die beim Mammakarzinom beobachtete Tendenz könnte also durch einen durch Hypoxie vermittelten Zusammenhang von Gefäß- und HIF-1 $\alpha$ -Expression erklärt werden.

Beim kolorektalen Karzinom hingegen steigt Gefäßdichte mit zunehmender HIF-Dichte. Die nach theoretischen Erwägungen logische Erklärung wäre in diesem Fall, dass eine hohe HIF-Dichte die Angiogenese und letztlich eine höhere Gefäßdichte induziert; HIF selbst könnte in diesem Fall durch andere Mechanismen als Hypoxie vermehrt exprimiert werden. Allerdings gilt es auch zu bedenken, dass Tumorgefäße oft strukturell und funktionell fehlerhaft sind und die perivaskulären Tumorzellen durchaus Hypoxie ausgesetzt sein können (Helmlinger et al., 1997). In diesem Fall ist eine hohe HIF-1 $\alpha$ -Expression bei eigentlich relativ hoher Gefäßdichte zu erwarten und die HIF-Induktion wäre indirekt wieder hypoxiebedingt.

Warum ließ sich also kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Gefäßdichte und HIF-Dichte nachweisen, weder für die Gesamtheit aller Tumore noch für einzelne Tumorentitäten? Eine Möglichkeit wäre, dass beide beschriebenen

Möglichkeiten der Abhängigkeit von HIF1 $\alpha$ - und Gefäßdichte im Tumor auftreten. Unter Umständen außerdem nicht tumortypspezifisch, beide Varianten könnten in derselben Metastase in Abhängigkeit von Zeitpunkt, Mikromileu etc. ablaufen. Dies zusammengenommen könnte dazu führen, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Darstellung kommen.

Zum anderen handelt es sich bei unserer Auswertung um eine Momentaufnahme, die sich der Unterscheidung zwischen akuter und chronischer Hypoxie und möglicher HIF-Switches entzieht, zumal nur HIF-1 $\alpha$  betrachtet wurde, das vor allem für Zustände akuter Hypoxie relevant ist. Ähnlich verhält es sich mit der Gefäßdichte. Die Untersuchung der Gefäßdichte oder MVD mit einem panendothelialen Antikörper wie CD34, der sowohl ruhendes als auch angiogen aktives Endothel darstellt, bildet den *status quo* ab, also das Vorhandensein von Gefäßen, nicht aber ob es sich um aktives Endothel handelt. Letzteres ließe sich besser durch eine Färbung und Auswertung beispielsweise mit Antikörper gegen CD105 (Endoglin) darstellen, einem TGF- $\beta$ -Rezeptor, der in aktivem Tumorendothel hochreguliert ist (Fox und Harris, 2004).

Allerdings bestünde hier das Problem, dass nicht alle Tumore in gleichem Maße echte, sprossende Angiogenese betreiben, sondern auch vaskuläres Mimikry und „vessel co-option“ etc. eine Rolle spielen (Eberhard et al., 2000), die mit diesen Methoden nicht erfasst würden. Ob verschiedene Tumorentitäten unterschiedliche Arten der HIF-abhängigen Regulation von Vaskularisierung und Angiogenese haben, ist eine interessante Hypothese, die weiter im Tiermodell analysiert werden müßte.

#### **4.1.2 Invasion bei Hirnmetastasen**

Hirnmetastasen gelten als expansiv wachsende Tumore ohne nennenswertes invasives Potential in das angrenzende Hirnparenchym (Barnholtz-Sloan et al., 2004). In dieser Arbeit konnte jedoch aufgezeigt werden, dass Hirnmetastasen sehr wohl über die Fähigkeit invasiv zu wachsen verfügen. Das invasive Wachstum war bei unseren Untersuchungen mit 92,5 % sogar der mit Abstand häufigste Wachstumstyp von Metastasen. Ein abgegrenztes Wachstum zeigte sich lediglich bei 7,5 % der Fälle.

Auch Berghoff et. al. konnten in einer Arbeit aus dem Jahre 2013 zeigen, dass Hirnmetastasen invasiv wachsen können, allerdings bei abweichender Einteilung der Invasionsmuster und geringerem Anteil des invasiven Wachstumstyps. Es wurden 3 Invasionsstypen unterschieden (abgegrenzt, Gefäßko-option und diffuse Infiltration),

ohne jedoch wie in dieser Arbeit die diffusen Infiltrationsarten weiter zu unterteilen. In der Studie zeigte sich in 50 % ein invasives und nicht gut abgegrenztes Wachstum der Metastasen, wobei der Invasionstyp nicht von Primärtumortyp abhängt (Berghoff et al., 2013). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich der Invasionstyp unabhängig von der Primärtumorentität. Bei Mamma- und kolorektalen Karzinomen sowie NSCLC kam der Invasionstyp 2 (Invasion in Form von Satellitentumoren) am häufigsten vor. Je nach Tumorentität fanden sich dennoch Unterschiede: Invasionstyp 0, also das abgegrenzte Wachstum, konnten wir bei Mamma- und kolorektalen Karzinomen in keinem der von uns betrachteten Fälle beobachten. Beim NSCLC waren hingegen alle Invasionstypen vertreten, der Anteil an Invasionstyp 2 war zwar nach wie vor dominant, fiel aber geringer aus. Diese Daten legen nahe, dass NSCLCs möglicherweise über ein anderes Invasionsverhalten verfügen. Unter Umständen wäre es mit deutlich größeren Fallzahlen und damit mehr Fällen pro Primärtumortyp möglich, Unterschiede aufzuzeigen.

Berghoff untersuchte Autopsiefälle, die den Vorteil bieten, von jeder Metastase einen größeren Abschnitt oder gar die gesamte Invasionszone untersuchen zu können. Allerdings wurden in dieser Studie auch Fälle nach Therapien wie Ganzhirnbestrahlung und/oder systemischer Chemotherapien betrachtet, welche zu einer Veränderung des Gewebes führen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Fälle hingegen nicht eingeschlossen. Interessanterweise beschreibt Berghoff einen Trend zu diffuser Infiltration nach Ganzhirnbestrahlung oder Chemotherapie (Berghoff et al., 2013).

Das invasive Wachstumsmuster von Hirnmetastasen steht in guter Übereinstimmung mit der Tatsache, dass Hirnmetastasen nach Resektion eine hohe Lokalrezidivrate aufweisen; um dies zu verhindern wird soweit möglich eine adjuvante Ganzhirnbestrahlung vorgenommen (McPherson et al., 2010; Spanberger et al., 2013).

#### **4.1.3 Einfluss der Gefäßdichte auf das Invasionsverhalten der Metastasen in das angrenzende Hirnparenchym**

Viele Studien wurden durchgeführt um zu untersuchen, unter welchen Voraussetzungen es zu einer Metastasierung in das ZNS kommt, allerdings gibt es nur wenige Erkenntnisse darüber, was nach erfolgter Metastasierung im Zielgewebe passiert. Dieses Wissen ist aber unentbehrlich, um neue, gezielte Therapien für die betroffenen Patienten zu entwickeln. Was führt nun also dazu, dass Hirnmetastasen sich invasiv verhalten? Was macht sie aggressiver? Für Glioblastome konnte gezeigt werden, dass Angiogenese

und Invasivität sehr eng verknüpft sind. Einzelne Tumorzellen invadieren entlang bestehender Gefäße des Hirnparenchyms und induzieren vaskuläres Remodelling und Angiogenese (Winkler et al., 2009). Für Hirnmetastasen konnten wir in der vorliegenden Arbeit keinen Zusammenhang zwischen Gefäßdichte und Invasivität nachweisen. Auch die Aufteilung nach einzelnen Tumorentitäten ergab keine signifikanten Zusammenhänge. Möglicherweise besteht ein solcher Zusammenhang zwischen Gefäßdichte und Invasivität, aber man müsste eine lokalere Auswertung der Gefäßdichte vornehmen und die Gefäßdichte beispielsweise lediglich an der oder in der Nähe der Invasionszone des Tumors bestimmen, statt wie in der vorliegenden Arbeit aus Zufallsgebieten des gesamten Tumors. Dies würde allerdings das Vorhandensein von deutlich mehr Invasionszone pro Präparat erforderlich machen, was bei Resektionspräparaten von menschlichen Hirnmetastasen bei minimalen tumorfreien Rändern schwierig ist.

Es stellt sich dann aber auch die Frage, an welcher Stelle genau untersucht werden sollte, ob an der Invasionszone oder ob man sich vielmehr auf die Suche nach gänzlich anderen Mustern machen müsste, zum Beispiel nach malignen Mikrofoci, wie es unlängst in einer Studie von Glioblastomen gezeigt wurde (Pedeutour-Braccini et al., 2015): Niedriggradige Gliome entwickeln sich praktisch immer zu hochgradigen Gliomen weiter. Die Studienergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei niedriggradigen Gliomen (zumindest teilweise) um heterogene Tumore handelt, die Foci mit bereits fortgeschrittener Tumorprogression als im Rest des Tumors, enthalten. Bei diesen Foci handelte es sich interessanterweise um Tumoranteile mit hoher Zell- und Gefäßdichte. Möglicherweise sind auch Metastasen heterogene Tumore und besitzen Stellen, an denen Tumorprogression fokal stattfindet. In diesem Fall müssten die Untersuchungen in diesen Foci stattfinden, da eine Analyse zufällig ausgewählter Tumoranteile mögliche Unterschiede maskieren würde.

#### **4.1.4 Einfluß von HIF-1 $\alpha$ auf das Invasionsverhalten der Metastasen in das angrenzende Hirnparenchym**

HIF-1 $\alpha$  wird in den meisten gesunden Geweben nicht exprimiert, allerdings in über 50 % der malignen Tumore und ihrer Metastasen (Zhong et al., 1999). Seit längerer Zeit weisen Studien darauf hin, dass HIF-1 $\alpha$  bei verschiedenen Tumoren mit gesteigerter Invasivität (Hockel et al., 1996) und höherer Neigung zur Metastasierung (Brizel et al.,

1996) assoziiert ist. Zum Beispiel besteht für Glioblastome (GBM) eine direkte Korrelation von HIF-1 $\alpha$ -Expression, Tumorgrading und Vaskularisierung (Zagzag et al., 2000).

Wir konnten zeigen, dass auch bei Hirnmetastasen, unabhängig vom Primärtumortyp der Metastase, eine signifikante Korrelation von HIF-1 $\alpha$ -Expression und Invasion besteht. Dies stimmt sehr gut mit der bekannten Rolle von HIF-1 $\alpha$  in der Induktion von Tumorinvasion überein. Dabei verändert Hypoxie zum einen die EZM und steigert so die Tumorinvasivität (Gilkes et al., 2014). Zum anderen zeigen die Ergebnisse mehrerer Studien, dass Hypoxie/HIF über die Aktivierung der EMT zu verstärkter Tumorinvasion führt (Jiang et al., 2011). Daher weisen die Ergebnisse möglicherweise darauf hin, dass durch Hypoxie mit nachfolgender HIF-1 $\alpha$ -Expression eine zweite Welle der EMT eingeleitet wird, die zur Invasion der Tumorzellen ins Hirnparenchym führt, nach der ersten Welle bei der Ablösung der Tumorzellen vom Primärtumor.

Hingegen wird von anderer Seite argumentiert, dass Tumore, die von vornherein hoch aggressiv sind, eher dazu neigen hypoxisch zu werden, weil sie so schnell wachsen, dass ihre Gefäßversorgung insuffizient wird, und HIF-1 $\alpha$  in diesem Fall zwar Marker, nicht aber Ursache des invasiven Verhaltens wäre (Kaelin und Ratcliffe, 2008).

Auch Spanberger et. al. beschäftigten sich mit der Frage nach der Invasivität von Hirnmetastasen. Auf der Suche nach prognostischen Markern von invasivem Wachstum wurde in einer Studie untersucht, ob sich durch das Ausmaß des umgebenden Hirnödems auf das Invasionsverhalten von Hirnmetastasen und letztlich Prognose der Patienten schließen lässt. Allerdings ging ein ausgeprägtes Ödem mit einer positiven Prognose einher: Die Tumore dieser Gruppe wiesen eine hohe MVD, deutliche Neoangiogenese und eine prominente HIF-1 $\alpha$ -Expression auf. Demgegenüber stand ein geringeres Ödem in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose. Die Tumore besaßen eine geringe MVD, zeigten ein invasives Wachstumsmuster (Einteilung mittels intraoperativer Beurteilung des Neurochirurgen) und eine schwache HIF-1 $\alpha$ -Expression (Spanberger et al., 2013). Dies steht im Widerspruch zu den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen, nach denen eine erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Expression zu stärkerer Invasion der Metastasen führt.

Ein Vergleich der Ergebnisse der beiden Studien ist allerdings aufgrund der angewandten Methodik schwierig. Spanberger et. al. führten zum einen eine Hotspot-Analyse der MVD durch, zum anderen wurden alle Parameter lediglich semiquantitativ

bestimmt. Eine weitere methodische Schwierigkeit dieser Studie liegt darin, dass die Tumorinvasivität nicht histologisch, sondern lediglich makroskopisch, durch den Operateur, beurteilt wurde. Spanberger et. al. schlagen vor, dass die beiden Gruppen verschiedenen Vaskularisierungstypen entsprechen: In der Gruppe mit viel Ödem, hoher MVD und hoher HIF-Expression läge vor allem echte sprossende Angiogenese vor, während die Vaskularisierung der Tumors in der Gruppe mit wenig Ödem, niedriger MVD, und geringer HIF-Expression vor allem auf Gefäßkooption beruhe.

HIF könnte somit möglicherweise als Marker dienen, diese beiden Gruppen zu differenzieren und helfen, eine Patientengruppe zu identifizieren, die von einer möglichen gegen HIF gerichteten bzw. anti-angiogenen Therapie profitieren.

## **4.2 Stärken und Schwächen der Studie: Kritische Diskussion der Methodik**

Eine klare methodische Stärke der vorliegenden Arbeit liegt in der Größe des betrachteten Patientenkollektivs. Morphometrisch untersucht wurden 80 Fälle. Fälle nach Ganzhirnbestrahlung wurden ausgeschlossen.

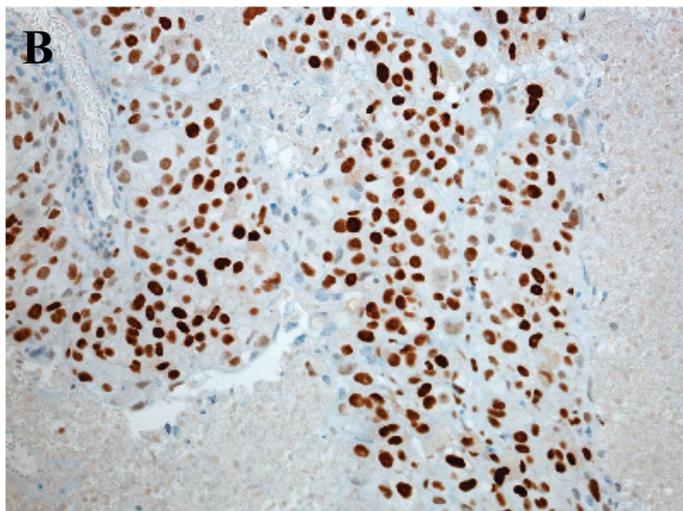
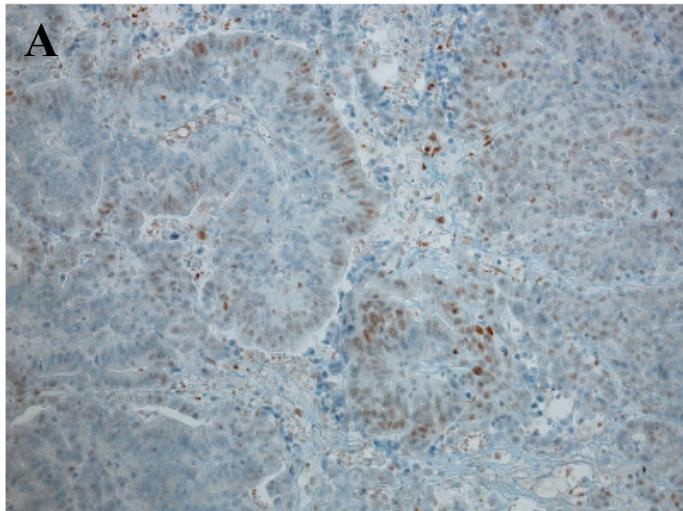
### **4.2.1 Bestimmung von Gefäßdichte und HIF-1 $\alpha$ -Expression**

In onkologischen Studien wurden verschiedene Verfahren zur Bestimmung von Gefäßdichte/-anzahl oder Kombinationen aus beidem etabliert, welche abhängig von der Methode Vor- und Nachteile aufzeigen („Histological quantitation of tumour angiogenesis“) (Fox und Harris, 2004). In der vorliegenden Studie wurden die Gefäße mit einem Antikörper gegen Endothelzellen (CD34) dargestellt. Wir entschieden uns für die Auswertung der Gefäßdichte als Gefäßfläche pro Tumorfläche mithilfe des digitalen Analyseprogrammes ImageJ, wobei die ausgewerteten Tumorauschnitte zufällig ausgewählt wurden und nicht im Sinne einer Hotspot-Analyse. Eine vergleichbare Analyse wurde von Protopapa et al. erfolgreich angewendet (Protopapa et al., 1993), als einziger Unterschied wurde hier Gefäßanzahl (statt -fläche) pro Prozentanteil der vitalen Tumorfläche im untersuchten Gesichtsfeld bestimmt.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Gefäßfläche im Gegensatz zur MVD-Bestimmung in Hotspots oder dem „chalkley counting“ (ebenfalls Bestimmung in Hotspots, aufgrund der Natur des Verfahrens spielt aber eher die Fläche, die die Gefäße im Tumor einnehmen, eine Rolle) hat den Vorteil, dass der Untersucher zufällige Areale untersucht und diese nicht auswählt und eine zusätzliche Beeinflussung vermieden wird. Allerdings sind die Gefäße oft nicht deutlich voneinander abzugrenzen, was zu

untersucherabhängigen Abweichungen führt. Ein Nachteil der quantitativen Bestimmung der Gefäßdichte hingegen ist die größere Streubreite der Gefäßparameter bei Humangewebe, die aufgrund von Unterschieden bei Perfusion, Tumolvolumen und Fixation unvermeidlich entsteht, da diese Parameter im Gegensatz zum Tiermodell nicht konstant gehalten werden können.

Im zweiten großen Abschnitt der Studie wurde die HIF-1 $\alpha$ -Expression in Bezug auf die vitale Tumorfläche bestimmt. Hierbei wurde zwar die Genauigkeit durch die vorgenommene quantitative Auswertung im Gegensatz zu den vielfach verwendeten semiquantitativen Methoden (Zagzag et al., 2000) erhöht, aber Unterschiede bei Kerngröße, Kernplasmarelation und sonstige morphologische Unterschiede der einzelnen Tumorentitäten stellen eine mögliche Fehlerquelle beim Vergleich der einzelnen Tumorentitäten dar. Außerdem wurde nicht zwischen starker und schwacher Expression innerhalb der einzelnen Zellkerne, d.h. hell- und dunkelbraun angefärbten Zellkernen, unterschieden (Abb.27). Aus Zellkulturversuchen ist bekannt, dass HIF-Expression mit sinkenden O<sub>2</sub>-Werten zunimmt, so dass eine lokal unterschiedliche HIF-Expression auf unterschiedliche O<sub>2</sub>-Werte bzw. Mikromilieu-Bedingungen hinweisen kann. Allerdings zeigt sich humanes Gewebe, das unter nicht-standardisierten OP-Bedingungen entnommen und fixiert wird, anfällig für Färbeartefakte bei der sensitiven HIF-Färbung. Aus diesem Grund entschlossen wir uns, HIF-Expression nur als positiv oder negativ zu bewerten (und nicht graduiert nach Expressionsstärke einzuteilen) und stattdessen die HIF-1 $\alpha$ -Expressionsfläche in Relation zur Tumorfläche zu bestimmen.



**Abbildung 27: Morphologische Streubreite bei der quantitativen Auswertung der HIF-1 $\alpha$ -Expression durch unterschiedliche Zellkerngrößen und Heterogenität der HIF-1 $\alpha$ -Expression.**

(A) Hirnmetastase eines Kolonkarzinoms (Adenokarzinom), Gesamtvergrößerung x200, HIF-1 $\alpha$ -Färbung. Die Zellkerne sind relativ klein, im selben Schnitt findet sich ein Nebeneinander von stark und schwach HIF-1 $\alpha$ -positiv angefärbten Zellkernen.

(B) Hirnmetastase eines NSCLC (Plattenepithelkarzinom), Gesamtvergrößerung x200, HIF-1 $\alpha$ -Färbung. Die Zellkerne sind deutlich größer als im oberen Fall und sehr deutlich, aber auch heterogen HIF-1 $\alpha$ -positiv angefärbt, da es sich um eine perinekrotische Zone handelt.

#### **4.2.2 Bestimmung der Invasionstypen der Metastasen in das angrenzende Hirnparenchym**

Friedl unterscheidet in seinen Arbeiten Einzelzellmigration, multizelluläres Streaming, kollektive Zellmigration, „tissue folding“ (Einstülpung von Gewebe) und expansives Wachstum als unterschiedliche aber überlappende Formen der Zellwanderung (Friedl und Alexander, 2011; Friedl et al., 2012). In unserer Arbeit fand sich neben dem expansiven, nicht-invasiven Wachstum ein kollektiver Wanderungs- bzw. Invasionstyp, der nach quantitativen Kriterien in zwei Untertypen eingeteilt wurde. Da es sich um eine Arbeit mit zweidimensionalen Schnitten handelt und uns keine Informationen über Dauer und Art von Zell-Zell-Verbindungen vorliegt, war eine weitere Kategorisierung nicht möglich. Wir ordneten den untersuchten Metastasen den jeweils vorherrschenden Invasionstyp zu. Da Einzelzellinvasion stets lediglich begleitend aber nie als dominantes Muster vorlag, fand dieser Invasionstyp keine weitere Anwendung. An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass sich nicht abschließend klären lässt, ob die als Invasionstyp II kategorisierten, größeren Zellverbände, tatsächlich aggressivere oder nur zeitlich weiter fortgeschrittene Stufen desselben Prozesses sind.

In histologischen Schnittpräparaten wird in der Regel der Tumor nur zweidimensional betrachtet, so dass die Quantifizierung nur eine Approximation darstellt. Serienschnitte zur dreidimensionalen Betrachtung werden in der Regel, und wurden in der vorliegenden Studie, nicht durchgeführt. So kann man bei der Beurteilung der Invasion schlußendlich nicht sicher sein, wie der Tumor gewachsen ist und ob eine als Satellitenmetastase gewertete Zellansammlung nicht möglicherweise ein Teil der Makrometastase ist, der lediglich in der betrachteten Ebene keinen Anschluss zum Haupttumor hat.

Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, ob bei einem Resektionspräparat die tatsächliche Invasionsfront angetroffen wurde oder beispielsweise ein Bereich mit abgegrenztem Wachstum, obwohl die Metastase an einem ihrer nicht angetroffenen Ränder im Rahmen einer Biopsie ein anderes Invasionsmuster aufweist.

### 4.3 Epidemiologische Betrachtungen

Die in der Studie untersuchten 80 Tumore verteilten sich folgendermaßen auf die verschiedenen Primärtumore:

|        |  |
|--------|--|
| 36,3 % | NSCLC  |
| 18,8 % | Kolorektales Karzinom                          |
| 12,5 % | Mammakarzinom                                  |
| 6,3 %  | Nierenkarzinom                                 |
| 10 %   | Unbekannter Primarius                          |
| 16 %   | Sonstige, seltenere Tumorentitäten inkl. SCLC. |

Im Vergleich mit den in der Einleitung dargelegten Zahlen wären mehr Metastasen von NSCLC und weniger von kolorektalen Karzinomen zu erwarten gewesen, während Metastasen von Mamma- und Nierenkarzinomen sowie unbekanntem Primarius in der beschriebenen Frequenz auftraten. Entgegen Angaben in der Literatur bezüglich der Metastasierungswahrscheinlichkeit (Schouten et al., 2002) befand sich im betrachteten Kollektiv nur eine Metastase eines SCLC. Dies dürfte allerdings darauf zurückzuführen sein, dass es sich hier nicht um Sektions- sondern Resektionspräparate handelt und beim SCLC der Leitlinie entsprechend nicht operiert wird bzw. auch ohne Nachweis von Hirnmetastasen eine prophylaktische Ganzhirnbestrahlung durchgeführt wird (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Fälle post Bestrahlung aber zu Beginn aus der Auswertung genommen.

### 4.4 Bedeutung der Studie, unbeantwortete Fragestellungen und Ausblick

Als klares Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann festgehalten werden, dass alle Metastasen über eine höhere Gefäßdichte als das umgebende Hirnparenchym verfügen. Außerdem wird HIF-1 $\alpha$  bei allen Metastasen (über-)exprimiert. Sowohl Gefäßdichte als auch HIF-1 $\alpha$ -Expression sind bei allen Metastasen unabhängig vom Primärtumortyp der Metastasen. Obwohl zwischen Gefäß- und HIF-1 $\alpha$ -Expression nach bisherigen Erkenntnissen ein Zusammenhang zu erwarten wäre, ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen Gefäßdichte und HIF1 $\alpha$ -Expression ermitteln, auch wenn sich je nach Primärtumortyp Tendenzen abzeichneten. In nachfolgenden Studien könnte es interessant sein, diese Tendenzen mit einem größeren Kollektiv weiter zu verfolgen. Eine deutlich höhere Patientenzahl für die Haupttumortypen würde außerdem die

Möglichkeit bieten, die Tumore zusätzlich noch stärker nach Histologie aufzuschlüsseln, da es sich beispielsweise bei NSCLC um eine heterogene Gruppe von Tumoren handelt.

Außerdem legt das beobachtete Muster der HIF-1 $\alpha$  Akkumulation die Überlegung nahe, dass HIF-1 $\alpha$  (und möglicherweise auch CD34) viel lokaler und in Bezug auf die Heterogenität des Tumors ausgewertet werden müssten, z.B. mit einer Unterscheidung zwischen Invasionsfront und Haupttumor, um einen klaren Zusammenhang zur Gefäßdichte herstellen zu können. Dies war in der vorliegenden Arbeit aufgrund der nur spärlich vorhandenen Invasionszone bei Resektionspräparaten kaum möglich. Vielmehr bedarf dies einer Studie an Autopsiepräparaten, die wie bereits erwähnt die komplette Invasionszone sowie ausreichend gesundes Hirnparenchym für weitere Untersuchungen bietet.

Im Rahmen einer prospektiven Studie wäre es außerdem sinnvoll zu untersuchen, wie sich HIF-1 $\alpha$ /Gefäßdichte/lokalinvasives Verhalten im Vergleich zum Primärtumor verhalten. Möglicherweise ließe sich so in Zukunft durch Untersuchungen am Primärtumor und Bildung eines Scores auf die Patienten schließen, die beispielsweise von vornherein größeren Resektionsrändern oder bestimmten „targeted therapies“ profitieren.

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass Metastasen regelhaft das Hirnparenchym invadieren und das invasive Verhalten signifikant mit erhöhter HIF Dichte korreliert. Nun da sich klar zeigte, dass Hirnmetastasen überhaupt invadieren, wäre es von großem Interesse, diese Invasion noch genauer zu quantifizieren und mögliche Unterschiede bezüglich Tumorentität etc. präziser herauszuarbeiten. Eine Follow-up-Studie könnte der zuvor zitierten Studie von Berghoff et al. ähneln, mit dem klaren Vorteil durch das prospektive Design alle Ränder gewinnen zu können und die Ergebnisse möglichst in Verbindung mit der Patientengeschichte zu betrachten um der Frage auf den Grund zu gehen, ob ein bestimmter Invasionstyp oder eine hohe HIF-1 $\alpha$ -Expression eine Aussage über den weiteren klinischen Verlauf ermöglicht. Eine gegen HIF-1 $\alpha$  gerichtete Therapie böte sich hierbei prinzipiell als guter Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Medikamente an, zumal wir zeigen konnten, dass HIF-1 $\alpha$  bei allen Tumoren (über-)exprimiert wurde.

Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei der HIF-1 $\alpha$ -Expression um einen feinregulierten Prozess mit vielen Faktoren handeln dürfte und der

Versuch, ein einzelnes Molekül zu blockieren würde, wie in der Vergangenheit am Beispiel der Anti-VEGF-Therapie deutlich wurde, möglicherweise keinen Erfolg zeigen: So hemmen gegen VEGF gerichtete Pharmaka zwar das Wachstum des Primärtumors, aber fördern mehreren Studien zufolge Invasivität und Metastasierung. Als mögliche Erklärung wird Hypoxie im Tumor und eine daraus folgende Selektierung hypoxieresistenter, besonders aggressiver Tumorzellen postuliert (Loges et al., 2009). Daher sind weitere Studien zwingend erforderlich, um die zu Grunde liegenden Mechanismen und fördernden Faktoren der Tumorzellinvasion zu untersuchen.

Auf der Suche nach neuen Therapieansätzen liegt es außerdem an zukünftigen Studien zunächst herauszuarbeiten, ob HIF-1 $\alpha$  tatsächlich kausal an der vermehrten Invasion beteiligt ist, wie es aufgrund experimenteller Untersuchungen und Erkenntnissen bei anderen Tumoren naheliegt, beispielsweise über Induktion der EMT, oder ob HIF eher Marker der Invasion ist. MVD-Zählungen haben sich als zu subjektiv erwiesen um als prognostischer Marker zu dienen, aber möglicherweise wäre die Nutzung von HIF-1 $\alpha$  in jedem Fall als prognostischer Marker für das Invasionspotential von Hirnmetastasen in der Zukunft eine gute Option.

## 5 Zusammenfassung

Hirnmetastasen stellen ein zunehmendes Problem in der Behandlung von Tumorpatienten dar, denn ihre Inzidenz ist steigend, aber die Prognose bei Diagnosestellung ist selbst unter aktueller, leitliniengerechter Therapie fast unverändert schlecht. Da die Grunderkrankung mittlerweile oft gut behandelbar ist, werden Hirnmetastasen so zum prognosebestimmenden Faktor. Grundlagenforschung über die Pathophysiologie von Hirnmetastasen ist dringend erforderlich, um den betroffenen Patienten in Zukunft innovative, erfolgreiche Therapien anbieten zu können. Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) und Angiogenese sind in zahlreichen Studien als zentrale Faktoren der Tumorprogression und Metastasierung identifiziert worden. Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Hirnmetastasen, auch in Abhängigkeit von der Tumorentität, invasiv in das umgebende Hirnparenchym wachsen, welche Faktoren diese Invasivität beeinflussen und ob ein Zusammenhang zwischen Vaskularisierung der Metastasen und ihrem Invasionsverhalten besteht. Eine zentrale Fragestellung war, ob ein Zusammenhang von HIF-1 $\alpha$ -Expression und Vaskularisierung, Invasionsverhalten und/oder Tumorentität in intrakraniellen Metastasen besteht. Dazu wurden an 80 Fällen von Hirnmetastasen verschiedener Tumorentitäten, insbesondere Mamma-, kolorektale sowie nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC), sowie an Vergleichsgewebe (normales Hirnparenchym und Glioblastome) sowohl die Gefäßdichte als auch die HIF-1 $\alpha$ -Expression quantitativ morphometrisch bestimmt. Zur Untersuchung des Invasionsverhaltens wurden drei Invasionstypen definiert: Keine Invasion, Invasion in Form von Zellclustern und Invasion in Form von Satellitentumoren. Die Ergebnisse zeigen, dass Metastasen häufig invasiv wachsen (92,5 % der untersuchten Fälle), Invasion ist demnach keine Ausnahme, sondern vielmehr die Regel. Hierbei spielt HIF-1 $\alpha$  eine zentrale Rolle. So zeigten Metastasen mit höherer HIF-Dichte eine signifikant stärkere Invasion. Die Gefäßdichte war in Hirnmetastasen deutlich gegenüber dem normalen Hirnparenchym erhöht, eine Korrelation zur Invasivität zeigte sich nicht. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit aktuellen Studien, die zeigen, dass Metastasen im Gehirn invasiv wachsen und unterstützen die zentrale Rolle von HIF-1 $\alpha$  in der Regulation der Invasion. Folgestudien müssen klären, ob HIF-1 $\alpha$  lediglich Marker oder kausal an der vermehrten Invasion beteiligt ist. So könnte HIF-1 $\alpha$  in Zukunft als Marker für besonders invasive Metastasen, im Idealfall als vielversprechendes therapeutisches Ziel eingesetzt werden.

## 6 Summary

Brain metastases are a major challenge in the treatment of tumor patients since their incidence increases while patients' prognosis remains poor even under clinical guideline approved treatment. As oncology treatments for the primary tumor have improved considerably over the past years, brain metastases now constitute a prognosis determining factor. Hence, basic research on the pathophysiology of brain metastases is urgently needed in order to offer patients innovative and effective therapy options in the future.

Various studies have identified hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and angiogenesis as main factors in tumor progression and metastasis. The aim of this study was to investigate whether brain metastases (depending on the tumor type) infiltrate the surrounding brain tissue, to determine the factors influencing this invasion and to assess a potential link between vascularization of brain metastases and their infiltrative behaviour. One of the central questions was if there is a connection between HIF-1 $\alpha$  expression and vascularization, infiltrative behaviour and/or primary tumor type in brain metastases.

For this purpose we determined vessel density and HIF-1 $\alpha$  expression in a quantitative, morphometric study of 80 cases of brain metastases of different primary tumor types (predominantly breast, colon and non-small cell lung cancer) as well as in comparison with tissue from normal brain and glioblastoma. In order to investigate infiltrative behaviour we defined three invasion patterns: no invasion, cell clusters and satellite tumours. Our results clearly demonstrate that metastases frequently show an infiltrative pattern (in 92,5 % of the examined cases) as opposed to the common belief of brain metastases being non-infiltrative lesions. Our results indicate that HIF-1 $\alpha$  plays a crucial role in this process as metastasis with a higher HIF-1 $\alpha$  expression showed a significantly stronger infiltrative pattern. Moreover, vessel density was significantly increased in brain metastases in comparison to normal brain tissue, yet there was no connection found between vessel density and invasion. These results are in line with recent studies demonstrating an infiltrative growth pattern of brain metastases and underline the crucial role of HIF-1 $\alpha$  in regulating tumor cell invasion. Further studies need to address the question if HIF-1 $\alpha$  is merely an indicator or a cause of an increased tumor invasion. By this means HIF-1 $\alpha$  could be used as an indicator of brain metastases with an increased invasive potential or even serve as a promising therapeutic target.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| BHS            | Blut-Hirn-Schranke  |
| CBTRUS         | Central Brain Tumor Registry of the United States                           |
| CA125          | Cancer Antigen 125  |
| CAM5.2         | Zytokeratin   |
| CDX2           | Homeobox Protein CDX-2  |
| CC1            | Cell Conditioning 1   |
| CD, u.a. 56    | Cluster of Differentiation, u.a.56  |
| CK, u.a. 7     | Zytokeratin, u.a. 7   |
| CUP            | Cancer of Unknown Primary   |
| EGF(R)         | Epidermal Growth Factor (Receptor)  |
| EMT            | Epithelial-to-Mesenchymal Transition/<br>Epithelial-Mesenchymale Transition |
| EZM            | Extrazelluläre Matrix   |
| FIH1           | Factor Inhibiting HIF-1   |
| GBM            | Glioblastom (-e)  |
| GFAP           | Glial fibrillary acidic protein   |
| HAF            | Hypoxia-Associated Factor   |
| HMB-45         | Homatropines Methylbromid 45  |
| HDAC(s)        | Histon-Deacetylase (n)  |
| HIF-1 $\alpha$ | Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha  |
| HRE            | Hypoxia Response Element  |
| Hsp90          | Heat Shock Protein 90/Hitzeschockprotein 90                                 |
| IGF            | Insulin-like Growth Factor  |
| IHC            | Immunhistochemie/immunhistochemisch   |
| Min            | Minuten   |
| mTor           | Mechanistic Target of Rapamycin   |
| MW             | Mittelwert  |
| MVD            | Micro Vessel Density  |
| NSCLC          | Non-Small Cell Lung Cancer/<br>Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom        |
| PHDs           | Prolyl Hydroxylase Domain(s)  |
| PI3K           | Phosphoinositid-3-Kinasen   |

|              |   |
|--------------|---|
| rSp          | Korrelationskoeffizient nach Spearman                                 |
| PDGF         | Platelet-Derived Growth Factor  |
| SEM          | Standard Error of the Mean  |
| SCLC         | Small Cell Lung Cancer/Kleinzelliges Bronchialkarzinom                |
| TGF- $\beta$ | Transforming Growth Factor Beta                                       |
| TTF-1        | Thyroid Transcription Factor 1/<br>Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1 |
| VE           | Verstärker  |
| VEGF         | Vascular Endothelial Growth Factor                                    |
| VHL          | Von Hippel-Lindau   |
| ZNS          | Zentrales Nervensystem  |

## 8 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung der primären, malignen ZNS-Tumore und der Primärtumore von Hirnmetastasen                | 2  |
| Abbildung 2: Therapieschema bei Hirnmetastasen  | 4  |
| Abbildung 3: Metastasierungskaskade   | 7  |
| Abbildung 4: EMT Typen  | 9  |
| Abbildung 5: Formen der Tumorzellinvasion   | 12 |
| Abbildung 6: HIF- Inhibitoren in der Tumorthherapie   | 20 |
| Abbildung 7: Flussdiagramm zur Darstellung der Verwendung von Antikörpern von Hirnmetastasen zur Eingrenzung des Primarius  | 24 |
| Abbildung 8: Funktionsweise des XT ultraView DAB Detection Kit  | 25 |
| Abbildung 9: Analyse der Gefäßdichte an CD34 gefärbten Paraffinschnitten einer zerebralen Metastase mit ImageJ: Parameter   | 28 |
| Abbildung 10: Gefäßdichtebestimmung mit ImageJ  | 29 |
| Abbildung 11: Schematische Darstellung der drei Invasionstypen von Tumorzellen in das angrenzende Hirnparenchym             | 31 |
| Abbildung 12: Beispiel für gut abgegrenztes Wachstum der Metastase (= keine Invasion) am Beispiel eines Nierenzellkarzinoms | 32 |
| Abbildung 13: Beispiel für Invasion in Form von Zellclustern am Beispiel eines NSCLC  | 33 |
| Abbildung 14: Invasion in Form von Satellitentumoren am Beispiel eines NSCLC vom Typ Adenokarzinom                          | 34 |
| Abbildung 15: Beispiel für das Vorliegen aller Invasionstypen bei einer zerebralen Metastase                                | 35 |
| Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der Metastasen  | 37 |
| Abbildung 17: Verteilung von Alter und Geschlecht bei den untersuchten Fällen   | 39 |
| Abbildung 18: Gefäßdichte von Normalhirn, Glioblastomen und Metastasen in der CD34-Färbung                                  | 40 |
| Abbildung 19: Unterschiedlich starke Vaskularisierung von Metastasen, Glioblastomen und normalem Hirnparenchym              | 41 |
| Abbildung 20: Analyse der Gefäßdichte der Metastasen  | 42 |
| Abbildung 21: HIF-1 $\alpha$ -Expression in Abhängigkeit von der Primärtumorentität   | 43 |
| Abbildung 22: Korrelationsanalyse von Gefäßdichte mit der HIF-1 $\alpha$ -Expression  | 44 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 23: Korrelationsanalyse von Gefäßdichte mit der HIF-1 $\alpha$ -Expression                     | 45 |
| Abbildung 24: Invasionstyp der Metastasen  | 46 |
| Abbildung 25: Gefäßdichte in Abhängigkeit des Invasionstyps  | 48 |
| Abbildung 26: Invasionsverhalten in Abhängigkeit der HIF-1 $\alpha$ -Expression                          | 49 |
| Abbildung 27: Morphologische Streubreite bei der quantitativen Auswertung der HIF-1 $\alpha$ -Expression | 61 |
| Abbildung 28: Quelltext des Makros zur Bestimmung der HIF-1 $\alpha$ -positiven Fläche                   | 74 |

## 9 Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Häufigkeit der drei Invasionsstypen bei den Metastasen der verschiedenen Primärtumore                               | 47 |
| Tabelle 2: Geräte und Software   | 75 |
| Tabelle 3: Materialien   | 75 |
| Tabelle 4: Chemikalien   | 76 |
| Tabelle 5: Ansätze von Hämatoxylin- und Eosinlösung  | 76 |
| Tabelle 6: Lösungen und Puffer der Firma Roche zur Verwendung im Ventana BenchMark XT IHC Färbemodul                           | 77 |
| Tabelle 7: Protokoll HE-Färbung  | 78 |
| Tabelle 8: Primärantikörper  | 78 |
| Tabelle 9: Protokoll CD56  | 80 |
| Tabelle 10: Protokoll CK5/6  | 80 |
| Tabelle 11: Protokoll CK7  | 80 |
| Tabelle 12: Protokoll CK8  | 81 |
| Tabelle 13: Protokoll GCDFP  | 81 |
| Tabelle 14: Protokoll CK20   | 81 |
| Tabelle 15: Östrogenrezeptor- $\alpha$   | 82 |
| Tabelle 16: Protokoll Progesteronrezeptor  | 82 |
| Tabelle 17: Protokoll CD34   | 82 |
| Tabelle 18: Protokoll HIF-1 $\alpha$   | 83 |
| Tabelle 19: Protokoll KL-1   | 83 |
| Tabelle 20: Protokoll GFAP   | 83 |
| Tabelle 21: Patientenkollektiv mit Ergebnissen der Untersuchungen von Gefäßdichte, HIF-1 $\alpha$ -Expression und Invasionstyp | 84 |

## 10 Anhang

### 10.1 Abbildungen

```
// "Quantification of HIF-positive cells"

macro "Open Action Tool -
CbbbDfbCca2D13D1aD22D29D32D42D52CffD67C666DddDeaDebCeeeD00D01D0
2D03D0dD0eD0fD10D11D12D1eD1fD20D21D2fD30D31D3fD40D41D4fD50D51D5
fD60D61D62D6fD70D71D72D73D7fD80D81D82D83D8fD90D91D92D93D9fDa0Da
1Da2Da3DafDb0Db1Db2Db3DbfDc0Dc1Dc2Dc3DcfDd0Dd1Dd2Dd3Dd4DdfDe0De
1De2De3De4De5DeeDefDf0Df1Df2Df3Df4Df5Df6DfcDfdDfeDffCfd8D17CfffD14D
23D33D43D47D53D57D64D75D77D85D87D95D97Da5Da7Db5Db7Dd7Dc91D04D0
5D06D07D08D09D0aD0bD0cD1bD1cD27D28D36D46D56D63D66D74D76D84D86
D94D96Da4Da6Db4Db6Dc4Dc5Dc6Dd6DdaCffaD39Cfd7D18C888D2eDdeDedDf7D
faCff8D25D35D45D55D65C971Dd5DdbDe8Cff9D24D2cD34D3aD3bD44D48D54D5
8D68D78D88D98Da8Db8Ccb5Dd9Cb92DccCff8D38Cfe7D4bD5bD6bD7bD8bD9bDa
bCff9D49D59D69D79D89D99Da9Db9Cff9Dd8Cdb4DcbC777D3eD4eD5eD6eD7eD8
eD9eDaeDbeDceDecDf8Df9Cfe8D16D4aD5aD6aD7aD8aD9aDaaCfd7DbbCa71De7C
fd6D3cD4cD5cD6cD7cD8cD9cDacDbcCfe8DbaDc7Cec5D26Cff9D15Ceb4D19Cfe7D
2bCb81De6Cdb6D37Cdb4D2aCfc5Dc8Ceb4DcaCeb5Dc9 [o]"
    {open();
    }

macro "Invert Selection Action Tool - C037T2f18I [i]"
    {run("Make Inverse");
    }

macro "Measure Action Tool - C037T2f18M [m]"
    {run("Set Measurements...", "area display redirect=None decimal=3");
    run("Measure");
    }

macro "Clear Outside Action Tool - C037R0aa4 P0a61f1aa0Pbef5f1"
    {run("Clear Outside");
    }

macro "Threshold Colour Image Action Tool - C037T3f18T [t]"
    {run("Color Threshold...");
```

```
}
```

```
macro "Analyze Particles Action Tool -  
Cf00B43L1131L1252L1373L1494L1595L1676L1757L1838 [A]"  
  {run("Analyze Particles...", "size=125-Infinity circularity=0.00-1.00  
show=Outlinesinclude summarize");  
  }
```

```
macro "Save Results Action Tool - C037T3f18R [r]"  
  {selectWindow("Results");  
  saveAs("Text");  
  }
```

```
macro "Save Summary Action Tool -  
CbcdD8dC45aDcaDd9CdeeD8cC348DcdCcdfD05D06D07D08D1fD4fD5fD6fD7fD8f  
D97D9fDafDb5DbfDcfDdfDf5Df6Df7Df8DfcC88cD19D34CfffD42D43D44D45D46D  
47D52D53D54D55D56D57D62D63D64D65D66D72D73D74D75D82D83D84D92D9  
3Da2C238Db8Dc7CbcfD22Db7C77aDacCeefD96Da5C458D9aCddfDf4C88dD69C22  
7Dd3CabfD29D39C55bDd8CdefD00D01D10D20D30D40D50D60D70D80D87D90D9  
cDa0Db0Db4Dc0Dd0De0Df0Df1C449DbbDc4C89cD17C457D7aD7eD8aCcfdD0eD2  
fD3fDf9DfaDfbC67cD99CfffD67D76D85D94Da3Db2C559D3eDc2De3CddfD02D03  
D04D9bDf2Df3CaaeD14C236DeeCcdfD0fDfeDffC55aD58C448De7C88cD18D33C33  
8DddCcefD09DfdC77bD35Dc1CeeD77Db3C459D78Dc3C89eD2dC447D8eD9eCcdf  
DefC56cDb9C449D88DdaCaacD61C458D5bD6aD6eC77dDd4C55aDd2CaafD2bD3a  
C125D5dCabeD13C55aD68DbaC349D98Dc5DdbC89bDa1C238Da8Dc6CccfD0aD0b  
D0cD0dC77bDd1CeffD86D95Da4C459D4eD5aDe4De5De6C89dD4aC347DaeDbeCb  
bfD23D24D25D26D27D28C56bDd7C349DccC99dD32C67cDd5C559De2CbbdD41C  
337DdeDecDedCddeD8bDa6C66aD37C458D5cD5eC88dD4bC447DadC88bDb1C99e  
D3bC347DbdDeaDebC56cDd6C44aDcbCabD51D6dC778D7cC78dD3dD79C67aDab  
CaafD2aC334D7bCbDdD11C348D4dC77bD36C88eD3cC337DceCbDfD38C55bDc9C9  
acD71C77bD1aCabeD1eC66aD2eC348DbcC77bD1bC89eD59C56cDc8CabcD7dC78d  
D89C56aDaaC9afD49C335D6cCccfDa7Db6C99bD81D91C67bD1cC9adD15C66bD48  
C99dD16C78cD4cCabeD12D31C67aD1dC448De8De9C99fD2cC67cDa9C77aDe1Cbc  
eD9dCbbeD21C339Ddc [s]"  
  {selectWindow("Summary");  
  saveAs("Text");  
  }
```

```
macro "Adjust Brightness and Contrast Action Tool -  
C000D0dD0eD13D14D15D16D17D18D19D1aD1bD1cD1dD20D21D22D23D24D25  
D26D27D28D29D2aD2bD2cD2fD33D34D35D36D37D38D39D3aD3bD3eD3fD47D4
```

```

8D49D4aD4dD4eD4fD5cD5dD5eD5fD6bD6cD6dD6eD6fD7dD7eD7fD8dD8eD8fD9d
D9eD9fDaeDafDbeDbfDcfDdfDefDffC000C111C222C333C444D1fD2eD3dD4cD5bD
6aD79D87D88D96Da5Db4Dc3Dd2De1Df0C444C555C666C777C888C999CaaaCbbb
CcccD0fD1eD2dD3cD4bD5aD69D78D86D95Da4Db3Dc2Dd1De0CcccCdddCeeeCfff
"
    {run("Brightness/Contrast...");
}

macro "Invert Selection Action Tool - C037T7f18I [i]"
    {run("Make Inverse");
}

macro "Close All Windows Without Saving Action Tool - Cf00R12ccL12ddLd22d
[q]"
    {run("Close All Without Saving");
}

macro "Set Scale Action Tool - C037T1d13μT8d13mC555 [1]"
    {run("Set Scale...");
}

macro "Clear Action Tool - C037R0aa4 P0a61f1aa0Pbef5f1"
    {run("Clear", "slice");
}

```

**Abbildung 28: Quelltext des Makros zur Bestimmung der HIF-1 $\alpha$ -positiven Fläche.**

## 10.2 Tabellen

**Tabelle 2: Geräte und Software**

| <b>Gerät</b>  | <b>Bezeichnung</b>                                    | <b>Hersteller</b>  |
|---|---|--|
| Bearbeitung der Abbildungen                                       | Adobe Photoshop<br>Version 9.0                        | Adobe, San José, CA, USA   |
| Software für Bestimmung von Gefäß- und HIF-1 $\alpha$ -Expression | ImageJ  | Public Domain/ Open Source, Entwickler Wayne Rasband (National Institutes of Health) |
| Anlage zur Herstellung von Aqua dest.                             | Milli-Q 8/16 Direkt System                            | Merck-Millipore, Billerica, MA, USA  |
| Schlittenmikrotom   | Leica SM2000R   | Leica Microsystems, Nussloch   |
| Digitale Kamera zur Aufnahme der histologischen Präparate         | Nikon DS Camera Control Unit DS-L2 Camera Head DS-Fi1 | Nikon, Tokio, Japan  |
| Mikroskop   | Nikon ECLIPSE80i                                      | Nikon, Tokio, Japan  |
| Vollautomatisches Färbemodul für IHC-Färbungen                    | Ventana®<br>BenchMark® XT IHC                         | Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA                                       |

**Tabelle 3: Materialien**

| <b>Material</b>       | <b>Bezeichnung</b> | <b>Hersteller</b>                                       |
|-----------------------|--------------------|---|
| Deckgläser            |                    | R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen |
| Objektträger          | SuperFrost® Plus   | R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen |
| Pipetten und -spitzen |                    | Eppendorf   |

**Tabelle 4: Chemikalien**

| <b>Chemikalien</b>   | <b>Hersteller</b>  |
|--|--|
| Aqua dest.   | Hergestellt in Anlage des Instituts für Neuropathologie (Milli-Q 8/16 Direkt System) |
| Eosin  | Chroma   |
| Hämatoxylin  | Merck, Darmstadt   |
| Isopropanol  | Stockmeier, Dillenburg   |
| Natriumjodat   | Merck, Darmstadt   |
| Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat                           | Merck, Darmstadt   |
| Chloralhydrat  | Merck, Darmstadt   |
| Zitronensäure  | Serva, Heidelberg  |
| NaCl 0,9 %   | B. Braun, Melsungen  |
| Richard-Allan Scientific™<br>CYTOSEAL™XYL<br>(Eindeckmittel) | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA  |
| Xylol  | Carl Roth, Karlsruhe   |

**Tabelle 5: Ansätze von Hämatoxylin- und Eosinlösung**

| <b>Lösungen</b>     | <b>Ansatz</b>  |
|---------------------|--|
| Hämalaun nach Mayer | 1g Hämatoxylin in 1000ml Aqua dest. unter Erwärmen lösen<br>+ 0,2g Natriumjodat<br>+ 50g Kaliumaluminiumsulfat<br>+ 50g Chloralhydrat<br>+ 1g Zitronensäure<br>Filtrieren, Lösung ist sofort gebrauchsfertig |
| Eosinlösung         | 0,1 % wässriges Eosin + 5 Tropfen 100 % Essigsäure/1000ml Lösung   |

|  |   |
|--|---|
|  | Stammlösung 1 %:<br>6g Eosin in 600ml Aqua dest. lösen<br><br>0,1 % Gebrauchslösung: 100 ml<br>Stammlösung +900 ml aqua dest. |
|--|---|

**Tabelle 6: Lösungen und Puffer der Firma Roche zur Verwendung im Ventana BenchMark XT IHC Färbemodul**

| <b>Lösungen, Puffer etc.</b>             | <b>Zusammensetzung<br/>(soweit bekannt)</b>        | <b>Roche Nummer</b> |
|--|--|---------------------|
| 10X SSC Solution                         |  | 05353947001         |
| Amplification Kit, CE                    |  | 05266114001         |
| Antibody Diluent                         |  | 0526189001          |
| Bluing Reagent                           | Wässrige Lösung von<br>gepuffertem Lithiumcarbonat | 05266769001         |
| Hematoxylin                              | Modifizierte Hämatoxylin<br>nach Gill              | 05266726001         |
| Liquid Coverslip (LCS)                   |  | 05264839001         |
| Protease 1                               |  | 05266688001         |
| Reaction Buffer<br>Concentrate (10X)     |  | 05353955001         |
| ultraView Universal DAB<br>Detection Kit | Enzym: HRP<br>Chromogen: DAB                       | 05269806001         |

**Tabelle 7: Protokoll HE-Färbung**

|  |                |
|--|----------------|
| Entparaffinieren mit Xylol                               | 2x5 Min.       |
| Absteigende Alkoholreihe<br>Isopropanol 100, 96 und 70 % | Jeweils 2 Min. |
| Wässern mit Aqua dest.                                   | 2 Min.         |
| Färbung mit Hämalaunlösung nach Meyer                    | 5 Min.         |
| Wässern mit Aqua dest.                                   | 5 Min.         |
| Eosinlösung  | 5 Min.         |
| Aufsteigende Alkoholreihe<br>Isopropanol 70, 96 100 %    | Jeweils 2 Min. |
| Xylol  | 2 Min.         |
| Eindecken mit 1 Tropfen Cytoseal®<br>XYL                 |                |

**Tabelle 8: Primärantikörper**

| <b>Antigen</b>                  | <b>AK-Klon</b> | <b>Klonalität</b> | <b>Her-<br/>kunft</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller/<br/>Bezugsquelle</b>          |
|---------------------------------|----------------|-------------------|-----------------------|-------------------|--|
| CD34<br>Class II                | QBEnd-10       | Monoklonal        | Maus                  | 1:150             | Dako<br>Cytomation,<br>Glostrup,<br>Dänemark |
| CD56<br>(Maus<br>Anti-<br>SCLC) | 123C3          | Monoklonal        | Maus                  | 1:300             | Invitrogen™,<br>Camarillo, CA,<br>USA        |
| CK20                            | Ks20.8         | Monoklonal        | Maus                  | 1:1000            | Dako<br>Cytomation,<br>Glostrup,<br>Dänemark |

|  |                |            |                |          |   |
|--|----------------|------------|----------------|----------|---|
| CK5/6  | D5/16 B4       | Monoklonal | Maus           | 1:100    | Dako<br>Cytomation,<br>Glostrup,<br>Dänemark                    |
| CK7  | OV-TL<br>12/30 | Monoklonal | Maus           | 1:2000   | Dako<br>Cytomation,<br>Glostrup,<br>Dänemark                    |
| CK8  | TS1            | Monoklonal | Maus           | 1:100    | Leica Biosystems,<br>Newcastle, UK                              |
| GCDFP-15   | 23A3           | Monoklonal | Maus           | 1:50     |   |
| GFAP   |                | Polyklonal | Kanin-<br>chen | 1:5000   | Dako<br>Cytomation,<br>Glostrup,<br>Dänemark                    |
| HIF-1 $\alpha$<br>(C-Term)                       |                | Polyklonal | Kaninc<br>hen  | 1:300+VE | Cayman<br>Chemical,<br>Ann Arbor,<br>MI, USA                    |
| IOPath®<br>Cyto-<br>keratin<br>Large<br>Spectrum | KL-1           | Monoklonal | Maus           | 1:100    | Beckman Coulter,<br>Immunotech SAS,<br>Marseille,<br>Frankreich |
| Östrogen-<br>rezeptor- $\alpha$                  | 1D5            | Monoklonal | Maus           | 1: 200   | Dako<br>Cytomation,<br>Glostrup,<br>Dänemark                    |
| Pro-<br>gesteron-<br>rezeptor                    | PgR 636        | Monoklonal | Maus           | 1:200    | Dako<br>Cytomation,<br>Glostrup,<br>Dänemark                    |

**Tabelle 9: Protokoll CD56**

|                                      |                                   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Antikörper                           | CD56                              |
| Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung | Hitzevorbehandlung                |
| CC1 (Cell Conditioning 1)            | 30 Min.<br>dann 60 Min.           |
| Inkubationstemperatur                | 37°                               |
| Inkubationsdauer                     | 36 Min.                           |
| Gegenfärbung I                       | Hematoxylin (+ LCS) für 4 Min.    |
| Gegenfärbung II                      | Bluing Reagent (+ LCS) für 4 Min. |

**Tabelle 10: Protokoll CK5/6**

|                                      |                                   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Antikörper                           | CK5/6                             |
| Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung | Hitzevorbehandlung                |
| CC1                                  | 30 Min.<br>dann 60 Min.           |
| Inkubationstemperatur                | 37°                               |
| Inkubationsdauer                     | 32 Min.                           |
| Gegenfärbung I                       | Hematoxylin (+ LCS) für 4 Min.    |
| Gegenfärbung II                      | Bluing Reagent (+ LCS) für 4 Min. |

**Tabelle 11: Protokoll CK7**

|                                      |                                   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Antikörper                           | CK7                               |
| Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung | Protease 1 (+LCS) für 4 Min.      |
| Inkubationstemperatur                | Raumtemperatur                    |
| Inkubationsdauer                     | 32 Min.                           |
| Gegenfärbung I                       | Hematoxylin (+ LCS) für 4 Min.    |
| Gegenfärbung II                      | Bluing Reagent (+ LCS) für 4 Min. |

**Tabelle 12: Protokoll CK8**

|                       |                                  |
|-----------------------|----------------------------------|
| Antikörper            | CK8                              |
| Vorbehandlung         | Hitzevorbehandlung               |
| CC1                   | 30 Min.                          |
| Inkubationstemperatur | 42°                              |
| Inkubationsdauer      | 36 Min.                          |
| Gegenfärbung I        | Hematoxylin (+LCS) für 4 Min.    |
| Gegenfärbung II       | Bluing Reagent (+LCS) für 4 Min. |

**Tabelle 13: Protokoll GCDFP**

|                                      |                                   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Antikörper                           | GCDFP                             |
| Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung | Hitzevorbehandlung                |
| CC1                                  | 30 Min.                           |
| Inkubationstemperatur                | 37°                               |
| Inkubationsdauer                     | 32 Min.                           |
| Gegenfärbung I                       | Hematoxylin und LCS für 4 Min.    |
| Gegenfärbung II                      | Bluing Reagent und LCS für 4 Min. |

**Tabelle 14: Protokoll CK20**

|                                      |                                   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Antikörper                           | CK 20                             |
| Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung | Protease 1 (+LCS) für 8 Min.      |
| Inkubationstemperatur                | Raumtemperatur                    |
| Inkubationsdauer                     | 32 Min.                           |
| Gegenfärbung I                       | Hematoxylin (+ LCS) für 4 Min.    |
| Gegenfärbung II                      | Bluing Reagent (+ LCS) für 4 Min. |

**Tabelle 15: Östrogenrezeptor- $\alpha$** 

|                                      |                                  |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| Antikörper                           | Östrogenrezeptor- $\alpha$       |
| Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung | Hitzevorbehandlung               |
| CC2                                  | 30 Min.                          |
| Inkubationstemperatur                | Raumtemperatur                   |
| Inkubationsdauer                     | 1 Stunde                         |
| Gegenfärbung I                       | Hematoxylin (+LCS) für 4 Min.    |
| Gegenfärbung II                      | Bluing Reagent (+LCS) für 4 Min. |

**Tabelle 16: Protokoll Progesteronrezeptor**

|                                      |                                  |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| Antikörper                           | Progesteronrezeptor              |
| Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung | Hitzevorbehandlung               |
| CC1                                  | 30 Min.<br>dann 60 Min.          |
| Inkubationstemperatur                | Raumtemperatur                   |
| Inkubationsdauer                     | 1 Stunde                         |
| Gegenfärbung I                       | Hematoxylin (+LCS) für 4 Min.    |
| Gegenfärbung II                      | Bluing Reagent (+LCS) für 4 Min. |

**Tabelle 17: Protokoll CD34**

|                                      |                                  |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| Antikörper                           | CD34                             |
| Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung | Hitzevorbehandlung               |
| CC1                                  | 30 Min.                          |
| Inkubationstemperatur                | 42°                              |
| Inkubationsdauer                     | 32 Min.                          |
| Gegenfärbung                         | Hematoxylin (+LCS) für 4 Min.    |
| Nach-Gegenfärbung                    | Bluing Reagent (+LCS) für 4 Min. |

**Tabelle 18: Protokoll HIF-1 $\alpha$** 

|   |                                  |
|---|----------------------------------|
| Antikörper  | HIF-1 $\alpha$                   |
| Herstellen frischer Schnitte und Färben<br>binnen 24h |                                  |
| Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung                  | Hitzevorbehandlung               |
| CC2   | 30 Min.                          |
| Inkubationstemperatur                                 | 37° C                            |
| Inkubationsdauer                                      | 60 Min.                          |
| Gegenfärbung I  | Hematoxylin (+LCS) für 8 Min.    |
| Gegenfärbung II                                       | Bluing Reagent (+LCS) für 8 Min. |

**Tabelle 19: Protokoll KL-1**

|                                      |                                  |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| Antikörper                           | KL-1                             |
| Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung | Hitzevorbehandlung               |
| CC1                                  | 30 Min.<br>dann 60 Min           |
| Inkubationstemperatur                | 42° C                            |
| Inkubationsdauer                     | 44 Min.                          |
| Gegenfärbung I                       | Hematoxylin (+LCS) für 4 Min.    |
| Gegenfärbung II                      | Bluing Reagent (+LCS) für 4 Min. |

**Tabelle 20: Protokoll GFAP**

|                                      |                                  |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| Antikörper                           | GFAP                             |
| Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung | Protease 1 (+LCS) für 8 Min.     |
| Inkubationstemperatur                | Raumtemperatur                   |
| Inkubationsdauer                     | 32 Min.                          |
| Gegenfärbung I                       | Hematoxylin (+LCS) für 4 Min.    |
| Gegenfärbung II                      | Bluing Reagent (+LCS) für 4 Min. |

**Tabelle 21: Patientenkollektiv mit Ergebnissen der Untersuchungen von Gefäßdichte, HIF-1 $\alpha$ -Expression und Invasionsstyp (0= keine Invasion, 1= Zellcluster, 2= Satellitentumore)**

| <b>Geschlecht</b> | <b>Alter</b> | <b>Primarius</b>          | <b>Gefäßdichte</b> | <b>HIF-1<math>\alpha</math>-Expression</b> | <b>Invasionsstyp</b> |
|-------------------|--------------|---------------------------|--------------------|--|----------------------|
| m                 | 54           | Blasenkarzinom            | 1,02 %             | 0,58 %                                     | 1                    |
| m                 | 60           | NSCLC                     | 5,67 %             | 2,31 %                                     | 2                    |
| m                 | 51           | NSCLC                     | 2,09 %             | 4,12 %                                     | 0                    |
| w                 | 61           | NSCLC                     | 5,30 %             | 1,41 %                                     | 2                    |
| m                 | 66           | NSCLC                     | 1,79 %             |  | 1                    |
| m                 | 68           | NSCLC                     | 4,92 %             | 2,18 %                                     | 1                    |
| m                 | 60           | NSCLC                     | 3,52 %             | 17,71 %                                    | 2                    |
| m                 | 58           | NSCLC                     | 1,90 %             | 1,15 %                                     | 2                    |
| m                 | 57           | NSCLC                     | 9,43 %             | 10,03 %                                    | 2                    |
| m                 | 53           | NSCLC                     | 4,32 %             | 4,64 %                                     | 2                    |
| w                 | 64           | NSCLC                     | 21,46 %            | 10,36 %                                    | 2                    |
| m                 | 56           | NSCLC                     | 0,83 %             | 15,35 %                                    | 2                    |
| m                 | 69           | NSCLC                     | 4,09 %             | 6,27 %                                     | 1                    |
| m                 | 63           | NSCLC                     | 2,18 %             | 0,51 %                                     | 1                    |
| m                 | 75           | NSCLC                     | 2,21 %             | 3,11 %                                     | 2                    |
| m                 | 51           | NSCLC                     | 13,34 %            | 5,88 %                                     | 0                    |
| m                 | 79           | NSCLC                     | 1,80 %             | 0,57 %                                     | 1                    |
| m                 | 63           | NSCLC                     | 1,35 %             |  | 2                    |
| m                 | 66           | NSCLC                     | 6,88 %             | 3,49 %                                     | 2                    |
| w                 | 63           | NSCLC                     | 4,03 %             | 0,14 %                                     | 2                    |
| m                 | 54           | NSCLC                     | 9,90 %             |  | 0                    |
| m                 | 53           | NSCLC                     | 4,78 %             | 8,36 %                                     | 2                    |
| m                 | 64           | NSCLC                     | 2,98 %             | 5,41 %                                     | 2                    |
| w                 | 63           | NSCLC                     | 4,46 %             | 4,73 %                                     | 2                    |
| m                 | 54           | NSCLC                     | 1,69 %             | 3,11 %                                     | 2                    |
| w                 | 55           | NSCLC                     | 1,94 %             |  | 2                    |
| m                 | 54           | NSCLC                     | 14,00 %            | 1,05 %                                     | 1                    |
| w                 | 71           | SCLC                      | 3,53 %             | 15,22 %                                    | 2                    |
| m                 | 53           | NSCLC                     | 1,75 %             | 13,54 %                                    | 2                    |
| m                 | 54           | NSCLC                     | 5,19 %             |  | 2                    |
| m                 | 72           | NSCLC                     | 2,10 %             | 14,17 %                                    | 2                    |
| w                 | 52           | Endometriumkarzinom       | 1,49 %             |  | 2                    |
| w                 | 74           | Endometriumkarzinom       | 7,97 %             | 7,16 %                                     | 2                    |
| w                 | 62           | Karzinom der Tuba uterina | 4,98 %             |  | 2                    |
| m                 | 65           | Kolorektales Karzinom     | 3,95 %             | 5,01 %                                     | 2                    |
| m                 | 25           | Kolorektales Karzinom     | 1,01 %             |  | 2                    |
| m                 | 51           | Kolorektales Karzinom     | 2,52 %             | 1,23 %                                     | 2                    |
| w                 | 73           | Kolorektales Karzinom     | 2,12 %             | 2,86 %                                     | 2                    |

|   |    |                       |         |         |   |
|---|----|-----------------------|---------|---------|---|
| m | 72 | Kolorektales Karzinom | 3,70 %  | 16,23 % | 2 |
| w | 71 | Kolorektales Karzinom | 6,57 %  | 8,92 %  | 2 |
| m | 73 | Kolorektales Karzinom | 1,52 %  | 7,42 %  | 2 |
| w | 74 | Kolorektales Karzinom | 2,13 %  | 4,89 %  | 2 |
| w | 77 | Kolorektales Karzinom | 3,46 %  | 2,22 %  | 2 |
| m | 64 | Kolorektales Karzinom | 1,52 %  | 1,09 %  | 1 |
| m | 54 | Kolorektales Karzinom | 5,01 %  |         | 2 |
| m | 61 | Kolorektales Karzinom | 2,88 %  | 3,76 %  | 2 |
| w | 76 | Kolorektales Karzinom | 1,67 %  | 2,26 %  | 2 |
| w | 60 | Kolorektales Karzinom | 4,72 %  | 10,64 % | 2 |
| m | 51 | Kolorektales Karzinom | 8,25 %  | 10,93 % | 2 |
| w | 41 | Mammakarzinom         | 0,69 %  | 9,91 %  | 2 |
| w | 53 | Mammakarzinom         | 1,89 %  | 5,22 %  | 2 |
| w | 61 | Mammakarzinom         | 1,18 %  | 2,72 %  | 2 |
| w | 55 | Mammakarzinom         | 10,29 % | 5,19 %  | 2 |
| w | 49 | Mammakarzinom         | 6,20 %  | 4,30 %  | 2 |
| w | 61 | Mammakarzinom         | 1,48 %  | 3,52 %  | 1 |
| w | 60 | Mammakarzinom         | 3,85 %  |         | 2 |
| w | 69 | Mammakarzinom         | 3,09 %  |         | 2 |
| w | 72 | Mammakarzinom         | 4,19 %  | 5,84 %  | 2 |
| w | 46 | Mammakarzinom         | 11,39 % | 1,94 %  | 2 |
| w | 71 | Nierenzellkarzinom    | 1,92 %  |         | 2 |
| m | 73 | Nierenzellkarzinom    | 7,23 %  |         | 0 |
| m | 76 | Nierenzellkarzinom    | 1,05 %  |         | 1 |
| w | 70 | Nierenzellkarzinom    | 2,53 %  |         | 1 |
| w | 68 | Nierenzellkarzinom    | 4,25 %  |         | 0 |
| m | 63 | Ösophaguskarzinom     | 5,38 %  | 3,84 %  | 2 |
| m | 62 | Ösophaguskarzinom     | 3,69 %  |         | 2 |
| m | 55 | Ösophaguskarzinom     | 4,90 %  |         | 2 |
| w | 68 | Ovarialkarzinom       | 2,41 %  |         | 0 |
| w | 67 | Ovarialkarzinom       | 7,47 %  | 8,21 %  | 2 |
| w | 56 | Pulmonare Metastasen  | 2,58 %  | 19,51 % | 2 |
| m | 53 | Tonsillenkarzinom     | 1,20 %  |         | 2 |
| m | 60 | unbekannt             | 3,34 %  |         | 2 |
| w | 85 | unbekannt             | 2,97 %  |         | 1 |
| m | 50 | unbekannt             | 1,30 %  |         | 2 |
| m | 73 | unbekannt             | 1,42 %  | 0,82 %  | 2 |
| m | 65 | unbekannt             | 1,53 %  | 1,43 %  | 2 |
| w | 49 | unbekannt             | 2,24 %  | 4,90 %  | 2 |
| w | 73 | unbekannt             | 4,10 %  |         | 2 |
| m | 74 | unbekannt             | 0,71 %  | 1,10 %  | 2 |
| w | 53 | Zervixkarzinom        | 3,86 %  |         | 2 |

## 11 References

Acker, T. und Acker, H. (2004). Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *J. Exp. Biol.* 207, 3171-3188.

Acker, T. und Plate, K.H. (2002). A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J. Mol. Med.* 80, 562-575.

Acloque, H., Thiery, J.P. und Nieto, M.A. (2008). The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition. *EMBO reports* 9, 322-326.

Arnoux, V., Nassour, M., L'Helgoualc'h, A., Hipskind, R.A. und Savagner, P. (2008). Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing. *Mol. Biol. Cell* 19, 4738-4749.

Ausprunk, D.H. und Folkman, J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* 14, 53-65.

Barnholtz-Sloan, J.S., Sloan, A.E., Davis, F.G., Vigneau, F.D., Lai, P. und Sawaya, R.E. (2004). Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J. Clin. Oncol.* 22, 2865-2872.

Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabières, C. und Pantel, K. (2012). Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 673-687.

Berghoff, A.S., Bartsch, R., Wöhrer, A., Streubel, B., Birner, P., Kros, J.M., Brastianos, P.K., Deimling, A. von und Preusser, M. (2014). Predictive molecular markers in metastases to the central nervous system: recent advances and future avenues. *Acta Neuropathol.* 128, 879-891.

Berghoff, A.S., Ilhan-Mutlu, A., Dinhof, C., Magerle, M., Hackl, M., Widhalm, G., Hainfellner, J.A., Dieckmann, K., Pichler, J. und Hutterer, M., et al. (2015). Differential role of angiogenesis and tumour cell proliferation in brain metastases according to primary tumour type: analysis of 639 cases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 41, e41-e55.

Berghoff, A.S., Rajky, O., Winkler, F., Bartsch, R., Furtner, J., Hainfellner, J.A., Goodman, S.L., Weller, M., Schittenhelm, J. und Preusser, M. (2013). Invasion patterns in brain metastases of solid cancers. *Neuro Oncol.* 15, 1664-1672.

Brian Keith, Randall S. Johnson und M. Celeste Simon (2012). HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* 12, 9-22.

Brizel, D.M., Scully, S.P., Harrelson, J.M., Layfield, L.J., Bean, J.M., Prosnitz, L.R. und Dewhirst, M.W. (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 56, 941-943.

Brugarolas, J. und Kaelin, W.G. (2004). Dysregulation of HIF and VEGF is a unifying feature of the familial hamartoma syndromes. *Cancer Cell* 6, 7-10.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653-660.

Carmeliet, P. (2005a). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.

Carmeliet, P. (2005b). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 *Suppl* 3, 4-10.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K. und Eberhardt, C., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.

Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, E.E., Lopez-Soto, A., Jacob, L.S., Patwa, R., Shah, H. und Xu, K., et al. (2016). Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature* 533, 493-498.

Delpech, B., Laquerriere, A., Maingonnat, C., Bertrand, P. und Freger, P. (2002). Hyaluronidase is more elevated in human brain metastases than in primary brain tumours. *Anticancer Res.* 22, 2423-2427.

Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2014). S2-Leitlinie: Metastasen und Meningeosis neoplastica. URL: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-0601\\_S2k\\_Hirnmetastasen\\_Meningeosis\\_neoplastica\\_2015-02.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-0601_S2k_Hirnmetastasen_Meningeosis_neoplastica_2015-02.pdf).

Eberhard, A., Kahlert, S., Goede, V., Hemmerlein, B., Plate, K.H. und Augustin, H.G. (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer research* 60, 1388-1393.

Ebert, B.L., Firth, J.D. und Ratcliffe, P.J. (1995). Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J. Biol. Chem.* 270, 29083-29089.

Evans, A.J., Russell, R.C., Roche, O., Burry, T.N., Fish, J.E., Chow, Vinca W. K., Kim, W.Y., Saravanan, A., Maynard, M.A. und Gervais, M.L., et al. (2007). VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and Snail. *Mol. Cell Biol.* 27, 157-169.

Felgenhauer, K. (1986). The blood-brain barrier redefined. *J. Neurol.* 233, 193-194.

Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer* 2, 795-803.

Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 789-791.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J. und Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.

Ferrara, N. und Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-974.

Ferrara, N. und Keyt, B. (1997). Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS* 79, 209-232.

Fidler, I.J. (2011). The role of the organ microenvironment in brain metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 21, 107-112.

Fidler, I.J., Yano, S., Zhang, R.-d., Fujimaki, T. und Bucana, C.D. (2002). The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *Lancet Oncol.* 3, 53-57.

Firth, J.D., Ebert, B.L. und Ratcliffe, P.J. (1995). Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* 270, 21021-21027.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-1186.

Folkman, J. (1985). Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* 43, 175-203.

Folkman, J. (1986). How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res.* 46, 467-473.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27-31.

Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 273-286.

Folkman, J. und Long, D. M. Jr., Becker F. F. (1963). Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* *16*, 453-467.

Fox, S.B. (1997). Tumour angiogenesis and prognosis. *Histopathology* *30*, 294-301.

Fox, S.B. und Harris, A.L. (2004). Histological quantitation of tumour angiogenesis. *APMIS* *112*, 413-430.

Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T. und Carmeliet, P. (2009). Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev. Cell* *16*, 167-179.

Friedl, P. und Alexander, S. (2011). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* *147*, 992-1009.

Friedl, P., Locker, J., Sahai, E. und Segall, J.E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* *14*, 777-783.

Friedl, P., Noble, P.B., Walton, P.A., Laird, D.W., Chauvin, P.J., Tabah, R.J., Black, M. und Zänker, K.S. (1995). Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro. *Cancer research* *55*, 4557-4560.

Friedl, P. und Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* *188*, 11-19.

Gavrilovic, I.T. und Posner, J.B. (2005). Brain metastases: epidemiology and pathophysiology. *J. Neurooncol.* *75*, 5-14.

Gilkes, D.M. und Semenza, G.L. (2013). Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. *Future Oncol.* *9*, 1623-1636.

Gilkes, D.M., Semenza, G.L. und Wirtz, D. (2014). Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 430-439.

Gudas, L.J., Fu, L., Minton, D.R., Mongan, N.P. und Nanus, D.M. (2014). The role of HIF1 $\alpha$  in renal cell carcinoma tumorigenesis. *J. Mol. Med.* *92*, 825-836.

Hanahan, D. und Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* *86*, 353-364.

Hart, I.R. und Fidler, I.J. (1980). Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res.* *40*, 2281-2287.

Hay, E.D. (1968). Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo. Epithelial-mesenchymal interactions. R. Fleischmajer and R.E. Billingham, editors. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA, 31-55.

Hay, E.D. (1995). An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Acta Anatomica* 154, 8-20.

Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. und Jain, R.K. (1997). Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.* 3, 177-182.

Henze, A.-T. und Acker, T. (2010). Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle* 9, 2749-2763.

Henze, A.-T., Garvalov, B.K., Seidel, S., Cuesta, A.M., Ritter, M., Filatova, A., Foss, F., Dopeso, H., Essmann, C.L. und Maxwell, P.H., et al. (2014). Loss of PHD3 allows tumours to overcome hypoxic growth inhibition and sustain proliferation through EGFR. *Nature communications* 5, 5582.

Hockel, M., Schlenger, K., Aral, B., Mitze, M., Schaffer, U. und Vaupel, P. (1996). Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 56, 4509-4515.

Holmes, K., Roberts, O.L., Thomas, A.M. und Cross, M.J. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* 19, 2003-2012.

Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Löfstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, A. und Gradin, K., et al. (2006). Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 10, 413-423.

Huang, L.E., Gu, J., Schau, M. und Bunn, H.F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7987-7992.

Hurwitz, H.I., Fehrenbacher, L., Hainsworth, J.D., Heim, W., Berlin, J., Holmgren, E., Hambleton, J., Novotny, W.F. und Kabbinavar, F. (2005). Bevacizumab in combination

with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 3502-3508.

Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M. und Yu, A.Y., et al. (1998). Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12, 149-162.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A. von, Hebestreit, H.F., Mukherji, M. und Schofield, C.J., et al. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.

Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C. und Marti, H.H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am. J. Physiol.* 271, C1172-80.

Jiang, J., Tang, Y.-l. und Liang, X.-h. (2011). EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol. Ther.* 11, 714-723.

Johnson J. D., Young B. (1996). Demographics of brain metastasis. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 7, 337-344.

Kaelin, W.G. und Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* 30, 393-402.

Kalluri, R. und Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420-1428.

Karkkainen, M.J., Mäkinen, T. und Alitalo, K. (2002). Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell Biol.* 4, E2-5.

Kienast, Y., Baumgarten, L. von, Fuhrmann, M., Klinkert, Wolfgang E F, Goldbrunner, R., Herms, J. und Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat. Med.* 16, 116-122.

Kocher, M., Soffiatti, R., Abacioglu, U., Villà, S., Fauchon, F., Baumert, B.G., Fariselli, L., Tzuk-Shina, T., Kortmann, R.-D. und Carrie, C., et al. (2011). Adjuvant whole-brain radiotherapy versus observation after radiosurgery or surgical resection of one to three cerebral metastases: results of the EORTC 22952-26001 study. *J. Clin. Oncol.* 29, 134-141.

Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., Acker, T., Flamme, I. und Plate, K.H. (2000). Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* 19, 5435-5443.

Langley, R.R., Fan, D., Guo, L., Zhang, C., Lin, Q., Brantley, E.C., McCarty, J.H. und Fidler, I.J. (2009). Generation of an immortalized astrocyte cell line from H-2Kb-tsA58 mice to study the role of astrocytes in brain metastasis. *Int. J. Oncol.* 35, 665-672.

Langley, R.R. und Fidler, I.J. (2011). The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int. J. Cancer* 128, 2527-2535.

Lee, K., Qian, D.Z., Rey, S., Wei, H., Liu, J.O. und Semenza, G.L. (2009a). Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2353-2358.

Lee, K., Zhang, H., Qian, D.Z., Rey, S., Liu, J.O. und Semenza, G.L. (2009b). Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 17910-17915.

Loboda, A., Jozkowicz, A. und Dulak, J. (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol. Cells.* 29, 435-442.

Loges, S., Mazzone, M., Hohensinner, P. und Carmeliet, P. (2009). Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell* 15, 167-170.

Mac Gabhann, F. und Popel, A.S. (2008). Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation* 15, 715-738.

Maesawa, S., Kondziolka, D., Thompson, T.P., Flickinger, J.C. und Dade, L. (2000). Brain metastases in patients with no known primary tumor. *Cancer* 89, 1095-1101.

Masoud, G.N. und Li, W. (2015). HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* 5, 378-389.

Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. und Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.

- McPherson, C.M., Suki, D., Feiz-Erfan, I., Mahajan, A., Chang, E., Sawaya, R. und Lang, F.F. (2010). Adjuvant whole-brain radiation therapy after surgical resection of single brain metastases. *Neuro Oncol.* *12*, 711-719.
- Mendoza, M. und Khanna, C. (2009). Revisiting the seed and soil in cancer metastasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1452-1462.
- Miller, F., Kentsis, A., Osman, R. und Pan, Z.-Q. (2005). Inactivation of VHL by tumorigenic mutations that disrupt dynamic coupling of the pVHL-hypoxia-inducible transcription factor-1alpha complex. *J. Biol. Chem.* *280*, 7985-7996.
- Mohamed, K.M., Le, A., Duong, H., Wu, Y., Zhang, Q. und Messadi, D.V. (2004). Correlation between VEGF and HIF-1alpha expression in human oral squamous cell carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* *76*, 143-152.
- Nabeshima, K., Inoue, T., Shima, Y., Kataoka, H. und Kono, M. (1999). Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. *Histol. Histopathol.* *14*, 1183-1197.
- Ostman, A. und Heldin, C.-H. (2007). PDGF receptors as targets in tumor treatment. *Adv. Cancer Res.* *97*, 247-274.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev.* *8*, 98-101.
- Patchell, R.A., Tibbs, P.A., Regine, W.F., Dempsey, R.J., Mohiuddin, M., Kryscio, R.J., Markesbery, W.R., Foon, K.A. und Young, B. (1998). Postoperative radiotherapy in the treatment of single metastases to the brain: a randomized trial. *JAMA* *280*, 1485-1489.
- Pedeutour-Braccini, Z., Burel-Vandenbos, F., Gozé, C., Roger, C., Bazin, A., Costes-Martineau, V., Duffau, H. und Rigau, V. (2015). Microfoci of malignant progression in diffuse low-grade gliomas: towards the creation of an intermediate grade in glioma classification? *Virchows Arch.* *466*, 433-444.
- Peinado, H., Quintanilla, M. und Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* *278*, 21113-21123.
- Percy, A.K., Elveback, L.R., Okazaki, H. und Kurland, L.T. (1972). Neoplasms of the central nervous system. Epidemiologic considerations. *Neurology* *22*, 40-48.

Preusser, M., Capper, D., Ilhan-Mutlu, A., Berghoff, A.S., Birner, P., Bartsch, R., Marosi, C., Zielinski, C., Mehta, M.P. und Winkler, F., et al. (2012). Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies. *Acta Neuropathol.* 123, 205-222.

Protopapa, E., Delides, G.S. und Révész, L. (1993). Vascular density and the response of breast carcinomas to mastectomy and adjuvant chemotherapy. *Eur. J. Cancer* 29A, 1391-1393.

Rahmathulla, G., Toms, S.A. und Weil, R.J. (2012). The molecular biology of brain metastasis. *J. Oncol.* 2012, 723541.

Rak, J., Mitsuhashi, Y., Bayko, L., Filmus, J., Shirasawa, S., Sasazuki, T. und Kerbel, R.S. (1995). Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 55, 4575-4580.

Ramakrishna, R. und Rostomily, R. (2013). Seed, soil, and beyond: The basic biology of brain metastasis. *Surg Neurol. Int.* 4, S256-64.

Ramani, P., Bradley, N.J. und Fletcher, C.D. (1990). QBEND/10, a new monoclonal antibody to endothelium: assessment of its diagnostic utility in paraffin sections. *Histopathology* 17, 237-242.

Ratcliffe, P.J., O'Rourke, J.F., Maxwell, P.H. und Pugh, C.W. (1998). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J. Exp. Biol.* 201, 1153-1162.

Rowley, H.A., Scialfa, G., Gao, P.-y., Maldjian, J.A., Hassell, D., Kuhn, M.J., Wippold, F.J., Gallucci, M., Bowen, B.C. und Schmalfuss, I.M., et al. (2008). Contrast-enhanced MR imaging of brain lesions: a large-scale intraindividual crossover comparison of gadobenate dimeglumine versus gadodiamide. *AJNR.* 29, 1684-1691.

Salceda, S. und Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272, 22642-22647.

Schackert, G. und Fidler, I.J. (1988). Development of in vivo models for studies of brain metastasis. *Int. J. Cancer* 41, 589-594.

Schouten, L.J., Rutten, J., Huvencers, Hans A. M. und Twijnstra, A. (2002). Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. *Cancer* 94, 2698-2705.

Seidel, S., Garvalov, B.K., Wirta, V., Stechow, L. von, Schanzer, A., Meletis, K., Wolter, M., Sommerlad, D., Henze, A.-T. und Nister, M., et al. (2010). A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain : a journal of neurology* 133, 983-995.

Semenza, G.L. (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 167-171.

Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 721-732.

Semenza, G.L. (2013). Advances in cancer biology and therapy. *J. Mol. Med.* 91, 409.

Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P. und Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 271, 32529-32537.

Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S. und Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.

Shen, C., Beroukhi, R., Schumacher, S.E., Zhou, J., Chang, M., Signoretti, S. und Kaelin, W.G. (2011). Genetic and functional studies implicate HIF1 $\alpha$  as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discov.* 1, 222-235.

Sierra, A., Price, J.E., García-Ramírez, M., Méndez, O., López, L. und Fabra, A. (1997). Astrocyte-derived cytokines contribute to the metastatic brain specificity of breast cancer cells. *Lab. Invest.* 77, 357-368.

Soffietti, R., Kocher, M., Abacioglu, U.M., Villa, S., Fauchon, F., Baumert, B.G., Fariselli, L., Tzuk-Shina, T., Kortmann, R.-D. und Carrie, C., et al. (2013). A European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial of adjuvant whole-brain radiotherapy versus observation in patients with one to three brain metastases from solid tumors after surgical resection or radiosurgery: quality-of-life results. *J. Clin. Oncol.* 31, 65-72.

Soffietti, R., Rudà, R. und Trevisan, E. (2008). Brain metastases: current management and new developments. *Curr. Opin. Oncol.* 20, 676-684.

Sowter, H.M., Raval, R.R., Moore, J.W., Ratcliffe, P.J. und Harris, A.L. (2003). Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res.* 63, 6130-6134.

Spanberger, T., Berghoff, A.S., Dinhof, C., Ilhan-Mutlu, A., Magerle, M., Hutterer, M., Pichler, J., Wöhrer, A., Hackl, M. und Widhalm, G., et al. (2013). Extent of peritumoral brain edema correlates with prognosis, tumoral growth pattern, HIF1a expression and angiogenic activity in patients with single brain metastases. *Clinical & experimental metastasis* 30, 357-368.

Sperduto, P.W., Chao, S.T., Sneed, P.K., Luo, X., Suh, J., Roberge, D., Bhatt, A., Jensen, A.W., Brown, P.D. und Shih, H., et al. (2010). Diagnosis-specific prognostic factors, indexes, and treatment outcomes for patients with newly diagnosed brain metastases: a multi-institutional analysis of 4,259 patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 77, 655-661.

Statistisches Bundesamt (2014). Todesursachen. URL: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>. 26.08.2016.

Subramanian, A., Harris, A., Piggott, K., Shieff, C. und Bradford, R. (2002). Metastasis to and from the central nervous system--the 'relatively protected site'. *Lancet Oncol.* 3, 498-507.

Suki, D. and Sawaya, R. (2008). Intracranial Metastases: Current Management Strategies. *The Epidemiology of Brain Metastasis* (Malden, Massachusetts, USA: Blackwell Publishing, Inc.).

Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. und Harris, A.L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* 157, 411-421.

- Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F.J., Huang, Y., Gerber, H.-P., Ferrara, N. und Johnson, R.S. (2004). Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* 6, 485-495.
- Tannock, I.F. (1970). Population kinetics of carcinoma cells, capillary endothelial cells, and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor. *Cancer research* 30, 2470-2476.
- Tazuke, S.I., Mazure, N.M., Sugawara, J., Carland, G., Faessen, G.H., Suen, L.F., Irwin, J.C., Powell, D.R., Giaccia, A.J. und Giudice, L.C. (1998). Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10188-10193.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442-454.
- Thiery, J.P. und Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131-142.
- Thomas, L. (2012). Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik (Frankfurt am Main: TH-Books Verlagsgesellschaft).
- Trelstad, R.L., Hay, E.D. und Revel, J.D. (1967). Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.* 16, 78-106.
- Uchida, T., Rossignol, F., Matthay, M.A., Mounier, R., Couette, S., Clottes, E. und Clerici, C. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J. Biol. Chem.* 279, 14871-14878.
- Vermeulen, P.B., Gasparini, G., Fox, S.B., Colpaert, C., Marson, L.P., Gion, M., Beliën, J.A., Waal, R.M. de, van Marck, E. und Magnani, E., et al. (2002). Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur. J. Cancer* 38, 1564-1579.
- Walker, A.E., Robins, M. und Weinfeld, F.D. (1985). Epidemiology of brain tumors: the national survey of intracranial neoplasms. *Neurology* 35, 219-226.

- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. und Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 5510-5514.
- Wang, G.L. und Semenza, G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* *270*, 1230-1237.
- Wang, L., Cossette, S.M., Rarick, K.R., Gershan, J., Dwinell, M.B., Harder, D.R. und Ramchandran, R. (2013). Astrocytes directly influence tumor cell invasion and metastasis in vivo. *PLoS ONE* *8*, e80933.
- Weiss, L. (1992). Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin. Exp. Metastasis* *10*, 191-199.
- Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J.* *16*, 1151-1162.
- Wesseling et al. (2007). WHO classification of tumours of the central nervous system (Lyon: International Agency for Research on Cancer).
- Winkler, F., Kienast, Y., Fuhrmann, M., Baumgarten, L. von, Burgold, S., Mitteregger, G., Kretschmar, H. und Herms, J. (2009). Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia* *57*, 1306-1315.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J. und Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* *407*, 242-248.
- Yang, J. und Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* *14*, 818-829.
- Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J.M., Laughner, E., Simons, J.W. und Semenza, G.L. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors. Association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* *88*, 2606-2618.
- Zhong, H., De Marzo, A M, Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L. und Simons, J.W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* *59*, 5830-5835.

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

### Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Madrid, den 14.12.2017

Ort, Datum



Unterschrift

## 13 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt zuallererst Prof. Acker für die Überlassung des Themas, stets kritische Rückmeldungen und seine geduldige Betreuung über diesen langen Zeitraum.

Außerdem danke ich Frau Dr. Schänzer für die herzliche Betreuung, ihre Anleitung zum erfolgreichen Mikroskopieren und ihre bis heute andauernde Hilfsbereitschaft bei Fragen jeder Art.

Mein aufrichtiger Dank gilt ebenso Frau Schmidt und Frau Rötering für die technische Einarbeitung und Überlassung ihrer Arbeitsplätze sowie allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Neuropathologie, die mir stets offen und hilfsbereit zur Seite standen.

Diese Arbeit gäbe es außerdem nicht ohne die Hilfe meiner Familie, in meinen Dank möchte ich daher weitere Personen einschließen:

Meinen allerbesten Opa Manni, ohne den ich heute nicht dort stünde, wo ich stehe.

Meinen Bruder Philipp für humorvolle informatische Katastrophenhilfe ohne Wochenend- und Feiertagszuschlag.

Meine Schwester Laura für unermüdliches Korrekturlesen und Lästersessions.

Meine Eltern und meine Omas, ohne deren Hilfe ich schon früh auf dem steinigen Weg zur Dissertation verhungert wäre oder aufgegeben hätte.

Meinen Mann Rodrigo, der Woche für Woche an meiner Seite ausharrte und mich versorgte, während ich schrieb, fluchte und korrigierte.