

**Der Hühnerembryo als Modell für die  
Melanomforschung**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

vorgelegt von  
**Jelena Katharina Krochmann**

**2015**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Garbe

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Stubenrauch

3. Berichterstatter: Professor Dr. V. Umansky

Für meine Mama

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Das maligne Melanom .....	1
1.2	Das Clark-Modell der Melanomprogression.....	2
1.3	Neue Optionen in der Melanomtherapie .....	3
1.4	Neuralleiste und epithelial-mesenchymale Transformation .....	4
1.5	Der Hühnerembryo als Modell in der Melanomforschung.....	5
1.6	Zielsetzung .....	7
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Ethische Erklärung.....	9
2.2	Zelllinien .....	9
2.3	Zellkultur .....	9
2.4	Boyden-Chamber.....	10
2.5	Organotypische Kultur von humaner Haut und Melanom .....	10
2.6	Herstellung von Zellaggregaten, spezifische Behandlung .....	10
2.7	Vorbereitung der Eier und Fensterung.....	11
2.8	Transplantation der Melanomzellen.....	15
2.8.1	Injektion ins Neuralrohr .....	15
2.8.2	Injektion in den Augenbecher .....	16
2.8.3	Injektion in den IV. Hirnventrikel.....	16
2.9	Fixierung der Embryonen und Einbettung in Paraffin .....	19
2.10	Serienschnitte, Tumorgröße und Immunhistochemie .....	19
2.11	Spezies-spezifische Marker.....	20
3	Ergebnisse .....	21
3.1	Die Injektion in das embryonale Neuralrohr führt zu spontaner Neuralleistenwanderung von Melanomzellen .....	21
3.1.1	Nicht transformierte primäre humane Melanozyten verrichten keine Neuralleistenwanderung.....	22
3.2	Transplantation in den embryonalen Augenbecher als Modell für invasive Migration von Melanomzellen .....	23
3.3	Transplantation in die Gehirnbläschen als Modell für Hirnmetastasen	23

3.3.1	Überleben der Melanomzellen in Aggregaten oder angeheftet an die Deckplatte.....	27
3.3.2	Tumorformation in der Deckplatte .....	30
3.3.3	Spezifische Anheftung und Invasion an der ependymalen Deckplatte .....	30
3.3.4	Sekundäre und retrograde Invasion des Wirtsgewebes .....	34
3.3.5	Unterschiedliche Wachstumsmuster verschiedener Melanomzelllinien.....	37
3.4	Das Clark Modell .....	41
4	Diskussion.....	46
4.1	Transplantation ins Rhombenzephalon als Modell für Hirnmetastasierung.....	46
4.2	Grundvoraussetzung für das Überleben von Melanomzellen in der Liquorumgebung.....	47
4.3	Selektive Anheftung an und Einwanderung in die Zilien-tragende ependymale Deckplatte .....	47
4.4	Bildung eines großen Tumorknotens in der Mittellinie des Dachs des IV. Ventrikels.....	48
4.5	Sekundäre Invasion und Streuung von Melanomzellen.....	49
4.6	Spezifisches Verhalten unterschiedlicher Melanomzelllinien.....	50
4.7	Das Clark Modell .....	51
5	Zusammenfassung.....	52
6	Literaturverzeichnis .....	54

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das maligne Melanom**

Trotz immenser Fortschritte in der modernen Medizin stellen Tumorerkrankungen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar. Gerade mit zunehmendem Alter steigt die Häufigkeit vieler Krebserkrankungen, und aufgrund der demographischen Entwicklung ist in den kommenden Jahrzehnten mit einer dramatischen Zunahme dieses sehr schwierigen und komplexen Krankheitsbildes zu rechnen. Insbesondere das maligne Melanom, im Volksmund auch „schwarzer Hautkrebs“ genannt, zeigt weltweit einen steilen Anstieg der Inzidenz in weißen Bevölkerungsgruppen und ist mittlerweile in Deutschland etwa die fünfhäufigste Krebserkrankung, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter der Betroffenen bei etwa 54 Jahren liegt. Besonders im Vergleich zur Tumormasse zeichnet sich das Melanom durch eine frühe und sehr hohe Metastasierungsrate aus. Damit verbunden ist eine allgemein schlechte Prognose: Das maligne Melanom ist für mehr als 90% der Hauttumor-assoziierten Mortalität verantwortlich [1].

Da das Melanom vom melanozytären Zellsystem ausgeht, ist der Tumor normalerweise stark pigmentiert, doch auch amelanotische Formen sind möglich. Es manifestiert sich überwiegend an der Haut, seltener am Auge, an den Meningen oder diversen Schleimhäuten [1]. In etwa 90% der Fälle handelt es sich bei Diagnosestellung eines Melanoms um einen primären Tumor ohne Hinweis auf Metastasen. In diesen Fällen (Tumorstadien 0 bis II) liegt das 10-Jahres-Überleben derzeit bei 75-85%. Eine Metastasierung kann beim malignen Melanom sowohl über den lymphatischen als auch über den hämatogenen Weg erfolgen. Sind regionale Metastasen aufgetreten (Tumorstadium III) sinkt das 10-Jahres-Überleben auf derzeit 30-70%. Treten Fernmetastasen auf (Tumorstadium IV), reduziert sich das Gesamtüberleben unbehandelter Patienten aktuell noch auf nur 6-9 Monate, nach Auftreten von Hirnmetastasen gar auf nur 3-5 Monate [2-4].

Eine solche Metastasierung des ZNS wird bei 40-60% der Patienten mit metastasiertem Melanom diagnostiziert, bzw. in bis zu 90% bei der Autopsie gefunden [5]. Insgesamt sind Hirnmetastasen eine der häufigsten Todesursachen bei metastasierten Melanompatienten und stellen ein großes therapeutisches Problem dar [6].

### **1.2 Das Clark-Modell der Melanomprogression**

Die wichtigsten prognostischen Faktoren beim primären malignen Melanom ohne Metastasen waren bis 2009 die vertikale Tumordicke nach Breslow, das Vorhandensein von Ulzerationen und das Invasionslevel nach Clark. In der aktuellen S3-Leitlinie von 2013 gilt die vertikale Tumordicke nach Breslow als wichtigster prognostischer Faktor in den Anfangsstadien des Melanoms. Zusätzlich wird bei dünneren Melanomen mit <1mm Tumordicke die Mitoserate als prognostischer Aussagewert hinzugezogen [7].

Das Clark-Modell beschreibt, basierend auf histopathologischen Veränderungen, die Progression normaler Melanozyten zum malignen Melanom. Das Modell schlägt die Abfolge von 5 einzelnen Schritten vor (zusammengefasst in [8]):

- (I) benigner Nävus
- (II) dysplastischer Nävus
- (III) Melanom in radialer Wachstumsphase (radial growth phase, RGP)
- (IV) Melanom in vertikaler Wachstumsphase (vertical growth phase, VGP)
- (V) metastatisches Melanom.

Allerdings wiesen Forschungsarbeiten der letzten 10 Jahre eindeutig darauf hin, dass das Clark-Modell allein nicht die große Komplexität der Melanomentstehung und -progression widerspiegeln kann. Melanomzellen aus der radialen Wachstumsphase und metastatische Zellen sind durch eindeutige RNA-Signaturen [9] und deutliche Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen charakterisiert [10]. Die Steigerung von zytomorphologischen Atypien von RGP- zu VGP-Zellen spiegelt sich in einer Erhöhung von NRAS- und BRAF-Mutationen wider [11]. Der Wechsel von RGP zu VGP und zum metastatischen Phänotyp ist verbunden mit erhöhtem CD1, Verlust von E-Cadherin, cKIT und

AP2, Expression von N-Cadherin, MMP2, Osteonectin, Survivin,  $\beta$ FGF und  $\alpha$ V $\beta$ 3 Integrin (zusammengefasst durch [12-15]). Außerdem gibt es kaum Telomer-Krisen in pigmentierten Läsionen, die sich nicht mindestens in der vertikalen Wachstumsphase befinden [16]. Des Weiteren findet sich bei der Progression von Melanomen aus Melanozyten ein Wechsel der Expression von epitheliale E-Cadherin zu mesenchymalem N-Cadherin [17].

### **1.3 Neue Optionen in der Melanomtherapie**

Betrachtet man die entscheidende Bedeutung von zellulärer Wanderung (die zu Invasion und schließlich zu Metastasierung führt) für das Überleben eines betroffenen Patienten, ist es seltsam, dass sich in den letzten Jahrzehnten die therapeutischen Ansätze für Patienten im Stadium IV des metastasierten Melanoms im Wesentlichen darauf konzentrierten, die Proliferation der Melanomzellen zu unterdrücken (z.B. mittels Chemotherapie oder Bestrahlung), den Patienten immunologisch zu stimulieren (Impfung gegen Tumorantigene, Blockierung von CTLA-4) oder die Therapie gezielt auf Onkogene zu richten (zum Beispiel BRAF V600E-Mutation [18]), wobei letzteres nur für eine Untergruppe der Melanome anwendbar ist.

Alle diese Ansätze ignorieren jedoch die Bedeutung von einzelnen migrierenden Melanomzellen und deren Fähigkeit, in entfernten Organen Metastasen zu verursachen. Melanomzellen können einen „Phänotyp-Wechsel“ durchführen - von einem proliferierenden Zustand in einen migrierenden und umgekehrt [19]. Dieser Wechsel des Phänotyps könnte ein Grund sein, weshalb die meisten gängigen Therapien längerfristig unwirksam sind. Sie sind nicht fähig, auf einzelne wandernde (und daher wahrscheinlich nicht proliferierende) Melanomzellen abzielen, sollten diese nicht zufällig eine BRAF V600E-Mutation aufweisen.

Der gegenwärtige Mangel an Medikamenten, die spezifisch die Migration von Melanomzellen inhibieren, ist sicherlich zum Teil durch das Fehlen von geeigneten *in vivo*-Modellen mitbedingt, welche die komplexe 3D *in vivo*-Situation imitieren können, mit der Melanomzellen im Patienten konfrontiert sind.



Trotz der beiden 2012 für die Melanomtherapie zugelassenen Wirkstoffe Ipilimumab und Vemurafenib ist eine Heilung von metastasierten Melanompatienten bisher nicht möglich. Daher werden aktuell weltweit neue experimentelle Therapieansätze für die Behandlung des Melanoms untersucht und für einen klinischen Einsatz evaluiert. Äußerst interessant scheinen nach aktuellem Kenntnisstand Substanzen zu sein, die in embryonale Signalwege eingreifen, welche in Melanomzellen „angeschaltet“ sind. Dabei könnte der Einleitungsprozess für zelluläre Invasion im Melanom eine verbreitete Eigenschaft in allen Melanomen sein, entweder durch die Hochregulation von frühen embryonalen Genen wie *Notch1* [20] und *Nodal* [21], oder über die Hochregulation des Neuralleisten-Signalwegs [22].

Für das genaue Verständnis der molekularen Vorgänge während der Invasion von Melanomzellen und auch für die präklinische Evaluation von neuen pharmakologischen Substanzen ist es unerlässlich, die Wirkung der zu untersuchenden Pharmaka unter *in vivo*-Bedingungen zu testen. Vor allem im Hinblick auf das große Invasions- und Metastasierungspotential von Melanomzellen ist die Verfügbarkeit von geeigneten *in vivo*-Modellen für die Untersuchung des Invasionsvorganges auf Einzelzellebene und dessen pharmakologische Unterdrückung unabdingbar.

### **1.4 Neuralleiste und epithelial-mesenchymale Transformation**

Melanozyten stammen ursprünglich von der embryonalen Neuralleiste ab. Eine Auswanderung von Neuralleistenzellen aus dem Neuralrohr im Embryo wird durch die sogenannte epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) ermöglicht. Die EMT ist ein Prozess, bei dem Epithelzellen im dorsalen Neuralrohr ihre Polarität und Zellkontakte zu den umliegenden Zellen verlieren und sich zu mesenchymalen Zellen mit invasiven Fähigkeiten umwandeln. Dies ist verbunden mit einem komplexen Wechsel in der Morphologie und dem Migrationspotential der embryonalen Zellen und wird in der Neuralleiste u.a. durch Proteine der transforming growth factor beta (TGF $\beta$ )-Familie wie bone morphogenetic

protein (BMP) induziert und durch sonic hedgehog, noggin und andere inhibitorische Signalwege antagonisiert [23].

Die EMT umfasst in diesem Zusammenhang zwei aufeinanderfolgende Schritte [24]: Zuerst wird im Epithel des Neuralrohres das zelluläre Kompartiment der Neuralleiste induziert. Dieser Schritt ist morphologisch charakterisiert durch die Auflösung der Basallamina in der Region der dorso-lateralen Deckplatte. Im zweiten Schritt beginnen die Neuralleistenzellen von den dorsalen Rändern des Neuralrohres entlang des (dorso-)medialen und des (dorso-)lateralen Wanderweges auszuwandern. Neuralleistenzellen, die dem medialen Weg folgen, bilden nach erfolgter Auswanderung und terminaler Differenzierung Spinalganglien und die autonomen Ganglien des sympathischen Grenzstranges. Die Vorläufer der Melanozyten (Melanoblasten) wandern in einem etwas späteren embryonalen Stadium aus und folgen der lateralen Bahn. Diese Melanoblasten besiedeln dann die Epidermis und bilden die Quelle für Melanozyten im erwachsenen Individuum [25]. Sowohl aus Melanoblasten als auch aus Melanozyten können in der Epidermis Melanome hervorgehen. Ein Erwerb der Fähigkeit zur Migration durch eine EMT wird bei Tumorzellen mit einem erhöhten Metastasierungspotential in Verbindung gebracht [23, 26].

### **1.5 Der Hühnerembryo als Modell in der Melanomforschung**

Diverse genetisch modifizierte Maus-Modelle (zum Beispiel Hgf-Cdk4(R24C)-Mäuse [27]) werden in der Melanomforschung zur Untersuchung von Melanomentstehung und -entwicklung oder als Modell für Primärtumorausbildung [28] verwendet. Obwohl sie von eminenter Bedeutung für die Prüfung neuer Medikamente sind, die in die Proliferation der Melanomzellen eingreifen oder eine Immunreaktion gegen experimentell generierte Melanome induzieren, scheinen Maus-Modelle auf diesen Einsatzbereich beschränkt zu sein.

Weit verbreitet in der Melanomforschung sind auch Mensch-zu-Maus Melanom-Xenografts, da sie die Phänotypen wiederholen, die in Melanopatienten im Stadium IV auftreten. Schon vor etwas mehr als 20 Jahren haben Schackert und Kollegen Melanomzellen in die Arteria carotis interna von Nacktmäusen inji-

ziert, um Hirnmetastasen zu generieren [29]. Für eine detaillierte Übersicht über präklinische Modelle in Mäusen und Zebrafischen stehen verschiedene Übersichtsarbeiten zur Verfügung [30-32]. Aufgrund der Beschränkungen, mit denen experimentelle murine Tumormodelle belegt werden, soll hier ein neues, ergänzendes *in vivo*-Modell etabliert werden, welches geeignet sein mag für Anwendungen, die in Mäusen aus verschiedenen Gründen nicht durchführbar sind.

Der Hühnerembryo als experimentelles System hat mehrere Vorteile. Der Embryo im Ei ist leicht zugänglich. Transplantate werden nicht abgestoßen, da sich das Immunsystem noch nicht ausgebildet hat. Nach gezielter Inokulation von Melanomzellen wachsen Tumoren schnell in der embryonalen Umgebung. Rechtliche und ethische Beschränkungen limitieren sich auf die Stadien vor und nach dem Schlüpfen (ab Embryonaltag E18).

Das klassische Aufbringen von Tumorzellen auf die Chorioallantoismembran (CAM) am embryonalen Tag 10 (E10) wurde verwendet, um Wachstum und Metastasierung von primären Melanomen zu untersuchen [33]. Chambers et al. injizierten B16-F1-Melanomzellen sowohl in die CAM-Venen von E11 Hühnerembryonen, als auch in die Schwanzvene von Mäusen und begutachteten die Tumorbildung nach sieben Tagen im Hühnerembryo und nach 20 Tagen in den Mäusen [34]. Die Anzahl an Tumoren pro vorgegebener Anzahl an injizierten Zellen war im Hühnerembryo größer als in der Maus. B16-F1-Tumoren wuchsen in den meisten Organen des Hühnerembryos, während ihr Wachstum in der Maus primär auf die Lungen begrenzt war. Der Hühnerembryo wurde auch als Modell für uveale Melanome genutzt [35]. Humane uveale und kutane Melanomzellen wurden an Tag E3,5 in den Augenbecher injiziert und das Tumorstadium bis E19 verfolgt.

In dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten experimentellen System wird mit dem Hühnerembryo in den Somitenstadien (E2-E6) gearbeitet, und die Melanomzellen werden an den Ort ihrer embryonalen Vorläuferzellen, die Neuralleiste, oder an ektope Stellen wie Augenbecher oder Hirnbläschen transplantiert. 1998 wurde erstmals das embryonale Neuralrohr als Ort für die Transplantation von Melanomzellen präsentiert. SKMel28-Melanomzellen wurden in das Lumen des Neuralrohres transplantiert, und eine spontane Integration in die Neural-

leiste mit darauf folgender physiologischer Neuralleistenwanderung der transplantierten Melanomzellen beobachtet [36]. Neuralleisten-Zellwanderung von Melanomzellen wird im lebenden Embryo durch Verwendung der GFP-markierten B16-F1-Melanomzelllinie der Maus direkt sichtbar [37]. Die Fähigkeit zur Wiederaufnahme der Neuralleistenwanderung hängt von der konstitutiven Produktion von BMP-2 ab und kann durch Vorbehandlung der Melanomzellen mit dem embryonalen BMP-Antagonisten Noggin verhindert werden [38]. Nach Transplantation in den Augenbecher zeigen die B16-F1-Melanomzellen spontan invasives, malignes Wachstum, welches sich ebenfalls durch Vorbehandlung mit Noggin verhindern lässt [39].

### **1.6 Zielsetzung**

Das kutane Melanom ist eine hochaggressive Malignität mit steigender Inzidenz. In Stadium IV sind die therapeutischen Optionen gering und die mittlere Überlebenszeit unbehandelter Patienten ist auf 6-9 Monate begrenzt, nach Auftreten von Hirnmetastasen sogar auf nur 5 Monate [2, 4]. Jedoch wird nicht das primär kutane Melanom den betroffenen Patienten töten, sondern dessen Metastasen. Daher benötigt die Melanomforschung geeignete *in vivo*-Modelle, um den malignen Zustand in einer komplexen 3D-Umgebung untersuchen zu können, die den Umständen und Gegebenheiten im Patienten während der Krebsentstehung und -entwicklung ähnelt.

Hier wird der Hühnerembryo als Modell für *in vivo*-Studien von Migration und Invasion von Melanomzellen beschrieben. Auch die technischen Aspekte des Hühnerembryomodells werden im Detail präsentiert. Besonderes Augenmerk wird dabei auf das invasive maligne Wachstum von Melanomzellen im Rhombenzephalon gelegt – als neues Modell für Hirnmetastasierung.

Malignes Wachstum kann als unpassende und ektopische Reaktivierung von embryonalen Genen in erwachsenen ruhenden Stammzellpopulationen interpretiert werden. Embryonale Gene, Transkriptionsfaktoren und Signalwege regulieren die Migration und Proliferation von Zellen im Embryo und werden während der Differenzierung inaktiviert. Eine Reaktivierung im erwachsenen

Individuum ist assoziiert mit malignem Wachstum. Ein Ansatz der vorliegenden Arbeit ist es, Melanomzellen zurück in ihre ursprüngliche embryonale Umgebung zu bringen, wo die in den Tumorzellen konstitutiv reaktivierten Onkogene ihre originale Funktion erfüllen können. Es soll gezeigt werden, dass nach Transplantation von Melanomzellen in ihre ursprüngliche Abstammungsumgebung (die Neuralleiste) die Onkogene „gezähmt“ werden können und die Melanomzellen nach erfolgter Auswanderung durch Apoptose sterben, während sie nach Transplantation an ektope Stellen malignes, invasives Wachstum zeigen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Ethische Erklärung**

Gemäß den deutschen Tierhaltungs-Leitlinien war keine IACUC-Genehmigung notwendig, um die Experimente mit den Hühnerembryonen durchzuführen. Die örtlichen Leitlinien verlangen nur für Experimente mit Embryonen ab Stadium E18 eine IACUC-Genehmigung. Alle Embryonen in den vorliegenden Studien befanden sich aber in früheren Stadien ihrer embryonalen Entwicklung (zwischen E2 und E6).

Die Verwendung von humanem Gewebe wurde von dem medizinischen Ethik-Komitee der Universität Tübingen genehmigt und wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Jeder Patient unterschrieb vor seiner Operation eine Einverständniserklärung, welche sowohl die Generierung einer Melanomgewebe-Datenbank erlaubte als auch die Isolierung von Zellen aus diesen Geweben zu Forschungszwecken.

### **2.2 Zelllinien**

In den Studien wurden folgende humane Melanomzelllinien verwendet: BLM, 451LU, WM115, SKMel28, SBCL2 und M14 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Meenhard Herlyn, Wistar Institute, Philadelphia, USA oder käuflich erworben als NCI60-Zelllinien des National Cancer Institute, USA). Vom Patienten stammende metastatische Zellen (PIH-Zellen) wurden aus Hirnmetastasen isoliert wie in [40] beschrieben. Außerdem wurden humane Melanozyten und murine B16-F1-Zellen verwendet.

### **2.3 Zellkultur**

Bis auf die Zelllinie SBCL2 wurden alle Melanomzellen in RPMI-Medium (RPMI 1640, Biochrom, Berlin, Deutschland) kultiviert, ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (Biochrom), 2mM L-Glutamin, 100U/ml Pen-Strep und 25mM Hepes-

Puffer (Biochrom). Die SBCL2-Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert: 200ml T2%-Medium (Sigma), versetzt mit 50ml L-15 (Biochrom), 5ml FCS (Biochrom), 250µl Insulin (Sigma) und 250µl Gentamycin (Sigma).

Die Kultur der Zellen erfolgte bei 37°C in einer Atmosphäre aus 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> bei 100% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, trypsinisiert und die Zelldichte auf 10<sup>6</sup> Zellen/ml angepasst.

### **2.4 Boyden-Chamber**

Die Boyden-Chamber-Versuche wurden durchgeführt wie in [41] beschrieben. Für die Auswertung wurde der Prozentsatz migrierter oder eingewanderter Zellen aus den gezählten Zellen berechnet und über der Anzahl der in die Kammer ausgesäten Zellen normalisiert.

### **2.5 Organotypische Kultur von humaner Haut und Melanom**

Organotypische Kulturen menschlicher Haut und Melanome wurde hergestellt wie in [13] beschrieben. Melanomzellen wurden auf menschliche Epidermis-Rekonstrukte ausgesät. Nach 16 Tagen Kultur wurden die Hautrekonstrukte geerntet, für 8 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Für die Beurteilung des invasiven Tumorwachstums wurden 3µm dicke Paraffinschnitte erzeugt und mit HE und anti-MIB1-Antikörpern gefärbt, um die Proliferation (bzw. DNA-Synthese) der Melanomzellen zu bestimmen.

### **2.6 Herstellung von Zellaggregaten, spezifische Behandlung**

Der Vorteil in der Verwendung von Zellaggregaten anstelle der ursprünglichen Zellsuspensionen liegt in einer besseren Reproduzierbarkeit der ortsspezifischen Transplantation der Melanomzellen in das Lumen des Neuralrohres. Während sich Suspensionen aus Melanomzellen innerhalb des gesamten Lumens des Neuralrohres ausbreiteten, verblieben die Aggregate am Ort der Transplantation (zwischen dem 14. und 20. Somitenpaar).

Zur Bildung der Aggregate wurde ein doppelt rotierendes Kulturverfahren in gasdurchlässigen Biofolienbeuteln verwendet, welches zur reproduzierbaren Erzeugung von kleinen Organkulturen entwickelt wurde [42]. Eingesetzt wurden Zellsuspensionen mit  $10^6$  Zellen pro 1ml, welche sich unter Rotation für 24 Stunden zu Melanomzellaggregaten transformierten [39].

Während der Aggregation lassen sich die Melanomzellen mit verschiedenen Medikamenten oder embryonalen Morphogenen (wie BMP-2, Noggin, Nodal, Lefty oder SB431542) behandeln. So können auf diese Weise vorbehandelte Zellen bzw. Melanomzellaggregate transplantiert werden, anstatt der Behandlung des gesamten Embryos *in ovo*.

### **2.7 Vorbereitung der Eier und Fensterung**

Die Behandlung der Eier und die Transplantation in den Hühnerembryo wurden durchgeführt wie in [36, 38] beschrieben.

Befruchtete Eier des Leghorn-Huhns (*Gallus gallus domesticus*) aus einer Brutanstalt (Weiss, Kilchberg, Deutschland) wurden bei 38°C in einer Temperaturkontrollierten Brutmaschine (BRUJA Typ 400a, Brutmaschinen Janeschitz, Hammelburg, Deutschland) bebrütet (Abbildung 1A). Der höchste Punkt der Eischale (und damit indirekt die Keimscheibe, die sich immer in Richtung des obersten Teils des Eis ausrichtet) wurde auf jedem Ei mit einem schwarzen Permanent-Marker gekennzeichnet (Abbildung 1B).

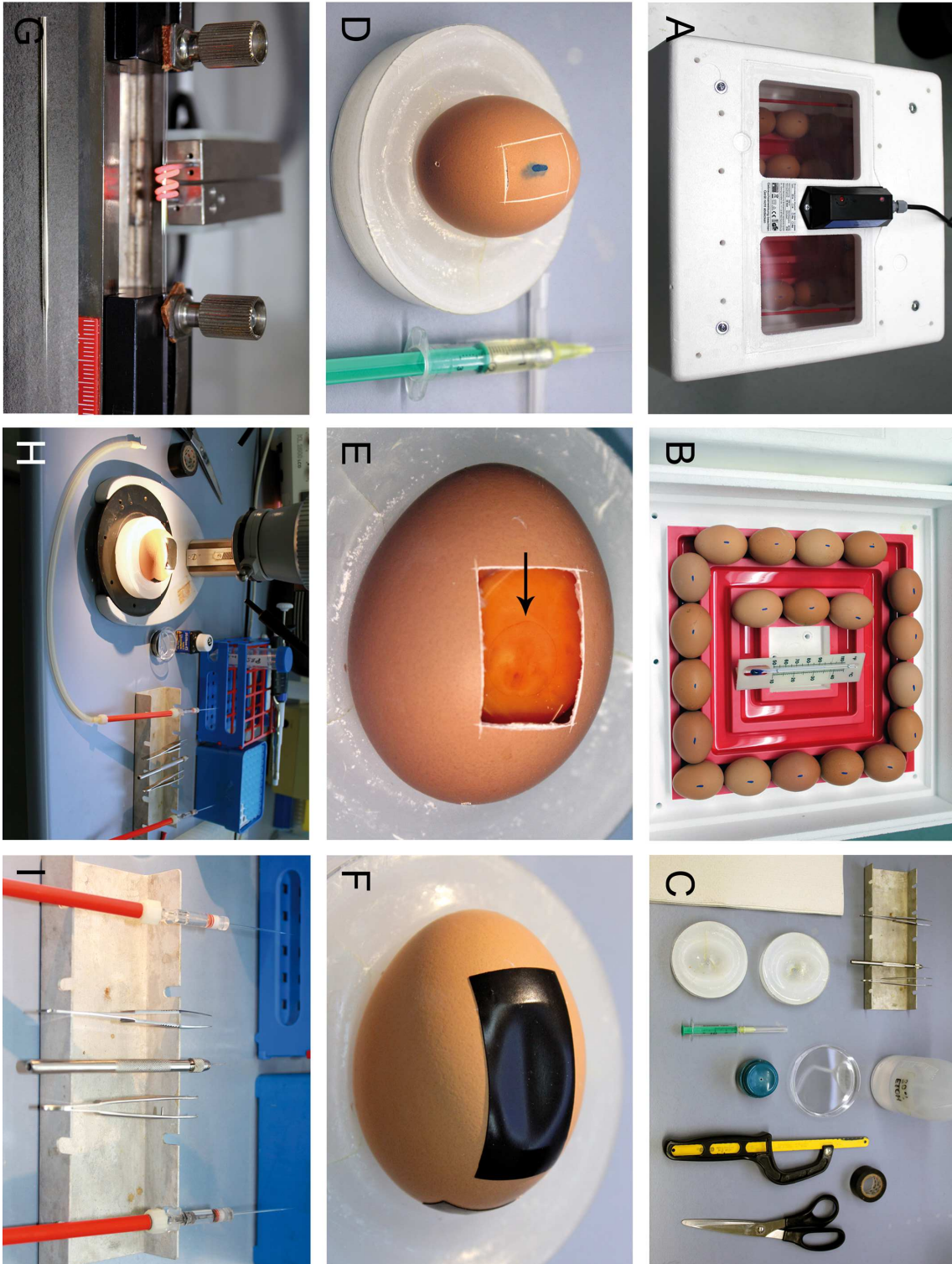
Die für die Fensterung benötigten Utensilien sind in Abbildung 1C dargestellt. Zuerst wurden die Eier mit 80% Ethanol besprüht, um etwaige Oberflächenverunreinigungen zu reduzieren. Danach wurden sie in vorbereitete Haltevorrichtungen platziert, die aus einer mit Paraffin gefüllten Petrischale aus Plastik mit Ei-Abdruck besteht. Als nächstes wurde mittels eines herkömmlichen Eierpiekers (freundlicherweise von Ute Drews zur Verfügung gestellt) ein kleines Loch im lateralen Rand des Eis generiert und mit einer Spritze (Injekt<sup>®</sup> 2ml, B. Braun Melsungen AG; benutzte Nadel: BD Microlance 3, 20G x 1 ½ inch, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 2ml Eiweiß abgezogen, um



die Keimscheibe abzusenken. Das Ei wurde dann für die Fensterung präpariert, indem auf der Schale um den im Vorfeld markierten Punkt unter Verwendung einer Metallsäge (250mm, 15-802; Stanley, New Britain, Australia) eine rechteckige Sollbruchstelle (etwa 15x25 mm) generiert wurde (Abbildung 1D). Als nächstes wurde dieses „Fenster“ geöffnet, indem die Eischale mit einer gebogenen Pinzette (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) abgetragen wurde. Der Embryo befindet sich im Somitenstadium und sichtbar auf der Oberseite der Keimscheibe auf dem Dotter (Abbildung 1E). Das Ei wurde dann mit Isolierband (Super88, 3 M, St. Paul, MN, USA) abgedichtet und in den Inkubator zurückgelegt (Abbildung 1F).

Für die Transplantation wurden frisch gezogene Kapillaren aus Kwik-Fil™ Borosilikat-Glas (World Precision Instruments) mit einem Pipettenpuller (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland) hergestellt, wie in Abbildung 1G dargestellt. Das Arbeitsumfeld unter dem Stereomikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit Schwanenhals-Kaltlichtapparatur (Schott, Mainz), die Mundpipetten und benötigten Gerätschaften auf einer sterilen Arbeitsfläche sind in Abbildung 1H und Abbildung 1I gezeigt.

Die Eier wurden nach 48 Stunden Bebrütung für die Transplantation der Zellen in das Neuralrohr und ins Rhombencephalon vorbereitet (Stadium 12-13 nach Hamburger und Hamilton (HH) [43]); für die Transplantation in den Augenbecher geschah dies erst nach 72-80 Stunden Inkubationszeit (entsprechend Stadium 19-20HH).



### **Abbildung 1: Vorbereitung der Eier und Fensterung (aus [44])**

- (A)** Inkubator mit einliegenden Eiern.
- (B)** Die Oberseite eines jeden Eis wird markiert, um die Lage des Embryos auf dem Blastoderm zu kennzeichnen.
- (C)** Werkzeuge, die zum Fenster der Eier benötigt werden.
- (D)** Eine Sollbruchstelle wird generiert, nachdem 2ml Eiweiß entfernt wurden, um die Keimscheibe abzusenken.
- (E)** Nach Entfernung der Schale ist die Keimscheibe mit Embryo sichtbar (Pfeil).
- (F)** Das Ei wird mit Isolierband verschlossen und weiter bebrütet.
- (G)** Mikrokapillaren werden vor der Transplantation gezogen.
- (H)** Arbeitsplatz für die Transplantation: Binokular mit Kaltlichtbeleuchtung, verdünnte schwarze Tusche, PBS-Puffer, Pipetten.
- (I)** Für die Transplantation benötigte Werkzeuge: Mundpipette, Pinzette, Wolfram-Nadel.

## **2.8 Transplantation der Melanomzellen**

Um die Sichtbedingungen zu verbessern wurde schwarze Tusche (Pelikan, Hannover) mit physiologischer Kochsalzlösung (PBS) verdünnt und mit einer Glaspipette behutsam unter die Keimscheibe zwischen Dotter und Embryo injiziert (Abbildung 2A und Abbildung 2I).

Die zu injizierenden Zellen wurden aus einer Zwischenschicht zwischen Pellet und Überstand einer bei 1200rpm zentrifugierten Probe von 200µl Zellsuspension entnommen. Die Lebensfähigkeit der Zellen (>95%) wurde vor der Injektion mittels Tryptan-Blau-Färbung verifiziert.

In die Vitellinmembran, die den Dotter des Eis bedeckt, wurde vor der Injektion mit dem Wolframdraht ein kleines Loch gestochen, um das Einführen der Mikropipette an dieser Stelle zu erleichtern. Anschließend wurden für die Injektion unter dem Stereomikroskop jeweils 2-3µl Zellsuspension (etwa 100.000 Zellen) mit der Mundpipette in die gewünschte Nische des Hühnerembryos injiziert.

Für die Injektion der Melanomzellaggregate wurden die Aggregate mittels einer gelben Eppendorf-Pipettenspitze auf einen sterilen Objektträger (B. Braun Melsungen AG) aufgebracht, und dann unter stereomikroskopischer Kontrolle in die Mundpipette aufgezogen. Die Injektionsprozedur entsprach derjenigen der injizierten Melanomzellsuspension. Insgesamt überlebten 80-100% der Embryonen die Transplantationsprozedur der verschiedenen Zelllinien sowie die anschließenden Inkubationszeiten zwischen 24 und 96 Stunden.

### **2.8.1 Injektion ins Neuralrohr**

Die Injektionen ins Neuralrohr wurden nach 48 Stunden Inkubation im Stadium 12-13HH durchgeführt, also während oder kurz nach Verschluss des kaudalen Neuralrohres (Abbildung 2B). Die Zellen wurden von kaudal durch das Schwanzknospenblastem hindurch in das Lumen des Neuralrohrs injiziert, um Schäden am fragilen Embryonalgewebe zu vermeiden. Durch Verwendung von GFP-markierten B16-F1-Zellen konnte mittels Dokumentation der GFP-Epifluo-

reszenz das ortsspezifische Transplantationsergebnis demonstriert werden (Abbildung 2C). Die Embryonen wurden für weitere 48 Stunden bebrütet; danach ließen sich mittels GFP-Epifluoreszenz in der lateralen Ansicht des Embryos die nach dorso-ventral auswandernden B16-F1-Melanomzellen darstellen (Abbildung 2D).

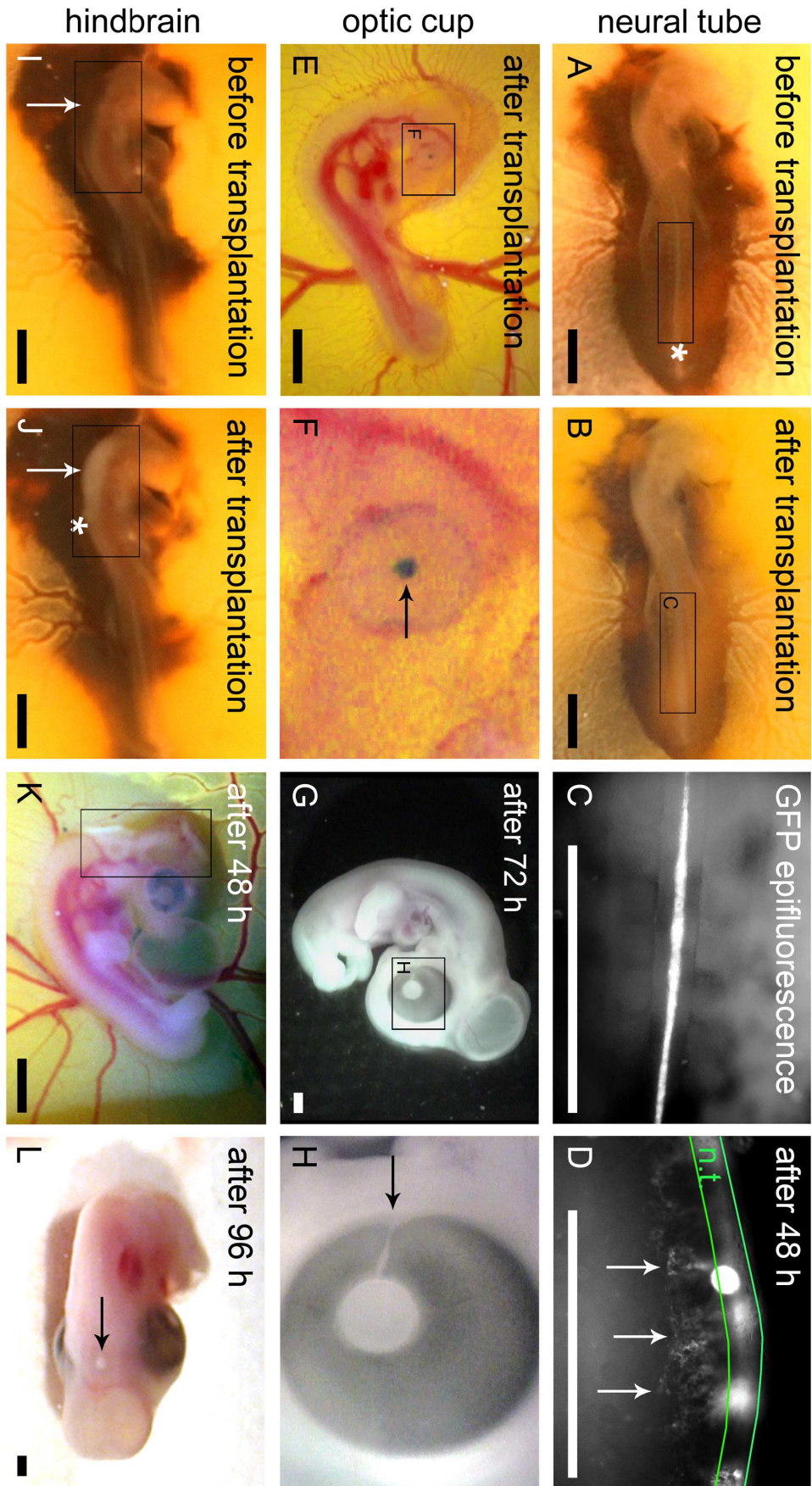
### **2.8.2 Injektion in den Augenbecher**

Im Stadium 20HH befindet sich der Augenbecher an der Oberfläche der Chorionallantoismembran und ist leicht zu erkennen, da sich das Pigmentepithel gerade entwickelt hat. Die Transplantation der B16-F1-Aggregate in den Augenbecher (Abbildung 2E und Abbildung 2F) wurde an der Stelle des physiologischen Koloboms (Choroidea-Fissur) des Augenbechers durchgeführt (hervorgehoben in Abbildung 2H). Für bessere Sichtbarkeit und zu Dokumentationszwecken wurden die B16-F1-Melanomzellaggregate vor der Injektion mit Nilblau-Sulphat (Bayer, Leverkusen) angefärbt. Nach der Injektion verblieben die Aggregate am Transplantationsort und wurden dokumentiert. Die Eier wurden mit Isolierband versiegelt und für weitere 72 Stunden inkubiert (Abbildung 2G).

### **2.8.3 Injektion in den IV. Hirnventrikel**

Für die Injektion in den IV. Hirnventrikel wurde die Kapillare am kaudalsten Ende des Rhombenzephalons von kaudal in den Embryo eingeführt (Abbildung 2I und Abbildung 2J). Die Spitze der Pipette wurde behutsam nach rostral in den IV. Hirnventrikel vorgeschoben und eine ausreichende Menge an Zellen injiziert, um den ganzen IV. Ventrikel zu füllen. Dabei wurde strikt darauf geachtet, kein Gewebe zu beschädigen und somit ein unkontrollierbares Verteilen von Zellen zu vermeiden. Nach der Injektion wurden die Eier mit Isolierband verschlossen und die Embryonen für weitere 48 oder 96 Stunden bebrütet (Abbildung 2K und Abbildung 2L).





### **Abbildung 2: Injektion der Zellen in drei unterschiedliche Kompartimente des Hühnerembryos (aus [44])**

- (A)** Hühnerembryo im Stadium 12-13HH vor und
- (B)** direkt nach Injektion von B16-F1-Melanomzellen ins Neuralrohr. Der Stichkanal der Mikropipette ist markiert (Stern in A). Zu sehen auch das im Vergleich zu (A) aufgrund der injizierten Zellen dilatierte, weißlich erscheinende Neuralrohr (Kasten in B).
- (C)** B16-F1-Zellen lassen sich direkt nach der Injektion mit GFP-Epifluoreszenz im Lumen des Neuralrohres detektieren.
- (D)** 48 Stunden nach Injektion lassen sich in lateraler Ansicht ventral auswandernde B16-F1-Zellen detektieren (Pfeile); die Ränder des Neuralrohres (neural tube, n.t.) sind schematisch grün hervorgehoben.
- (E)** Hühnerembryo im Stadium 19 HH direkt nach Injektion von B16-F1 Melanomzell-Aggregaten in den Augenbecher.
- (F)** Die Aggregate wurden vor der Injektion zur besseren Sichtbarkeit mit Nilblau gefärbt. Höhere Vergrößerung zeigt die Aggregate hinter der Linse des Embryos (Pfeil).
- (G)** 72 Stunden nach Injektion ist makroskopisch kein Tumorwachstum sichtbar.
- (H)** Die ehemalige Einstichstelle der Mikropipette im physiologischen Kolobom der Iris ist markiert (Pfeil).
- (I)** Hühnerembryo im Stadium 12-13 HH vor und
- (J)** direkt nach Injektion von humanen Melanomzellen (Pfeile in I und J) in den Ventrikel des Rhombenzephalons (Kasten in I). Der Stichkanal der Mikropipette ist in (J) mit einem Stern markiert. Gut sichtbar der mit Melanomzellen angefüllte Hirnventrikel (Kasten in J).
- (K)** 48 Stunden nach Injektion ist im Rhombenzephalon bereits ein heranwachsender Tumor sichtbar.
- (L)** Nach 96 Stunden ist in der dorsalen Mittellinie des Neuralepithels ein makroskopisch sichtbarer, solitärer Tumor entstanden (Pfeil).

Balken in A, B und E-L: 1 mm; Balken in C und D: 0,5 mm.

## **2.9 Fixierung der Embryonen und Einbettung in Paraffin**

Am Ende der Inkubationszeit (insgesamt nach 4-6 Tagen) wurden die Embryonen mithilfe von Pinzetten und einer gebogenen Schere (Moria, Antony, Frankreich) aus den Eiern entfernt. Embryonen, die eine Injektion in den Augenbecher erhalten hatten, wurden dekapitiert. Die ganzen Embryonen und die Embryoköpfe wurden je nach Größe für 12-24 Stunden in 4% gepuffertem Paraformaldehyd bei 8°C fixiert. Anschließend wurden sie in Gewebekassetten (Rotilabo<sup>®</sup> Macro, Carl Roth, Karlsruhe) übertragen, wie sie in der Routinehistologie verwendet werden. Nach Spülung mit Wasser wurden die Proben mit Ethanol dehydriert, mit Xylol behandelt und in einem üblichen Histologie-Einbettautomat im Histologielabor der Universitäts-Hautklinik Tübingen in Paraplast eingebettet.

Das endgültige Ausgießen in den Paraffinblock ist entscheidend für die spätere histologische Aufarbeitung und Auswertung und wurde daher bei allen Embryonen auf die gleiche Art und Weise durchgeführt, nachdem ermittelt wurde, ob transversale oder longitudinale Serienschnitte der Transplantationsstelle die besten Ergebnisse liefern. In den vorgestellten Fällen wurde die transversale Schnittführung ausgewählt, um eine vollständige Übersicht über den Embryo zu bekommen. Bei den Embryonen, die eine Injektion in das Neuralrohr erhalten hatten, ermöglichte dies die Darstellung sowohl des medialen als auch des lateralen Neuralleistenwanderweges. Bei den Embryonen, die eine Injektion ins Rhombenzephalon erhalten hatten, erlaubte dies sowohl die Darstellung des gewachsenen Primärtumorknötchens im dorsalen Neuralepithel als auch der die umliegenden Gewebe invadierenden Melanomzellen.

## **2.10 Serienschnitte, Tumorgröße und Immunhistochemie**

Von den eingebetteten Embryonen wurden Serienschnitte von 3µm Dicke angefertigt, auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen und mittels Hämalaun und Eosin (HE) im Routinefärbeautomat der Dermatohistologie gefärbt. Repräsentative Schnitte wurden mit dem Melanom-spezifischen HMB45-



Antikörper oder mit anti-MIB1, einem Proliferationsmarker ohne Kreuzreaktion mit Hühnerzellen (beides Dako, Hamburg, Deutschland) gefärbt. Für die Untersuchung der ausgewanderten Melanomzellen im Neuralleistenkompartiment wurde zusätzlich eine TUNEL-Färbung (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling; R&D Systems, Wiesbaden) durchgeführt, um apoptotische Melanomzellen zu detektieren. Der größte Durchmesser der etwa stecknadelkopfgroßen Primärtumorknötchen im Rhombenzephalon wurde für alle Embryonen auf den HE-Schnitten mit Hilfe von Zeiss AxioVision ausgemessen.

### **2.11 Spezies-spezifische Marker**

Eine große Herausforderung ist es, einzelne auswandernde Melanomzellen zwischen normalen embryonalen Hühnerzellen zu identifizieren. Im frühen Hühnerembryo wurde Immunhistochemie mit den Melanozyten- und Melanomzell-spezifischen Markern HMB45 und MelanA verwendet. Da sich im frühen Hühnerembryo die Zellen der Neuralleiste noch nicht differenziert haben, exprimieren sie keine Marker der späteren Melanozyten-Zelllinie. Dies ändert sich erst im Stadium E6 während der späten Auswanderung von Neuralleistenzellen auf dem dorso-lateralen Neuralleistenwanderungsweg [37]; dann werden auch die Melanozyten-Vorläufer (Melanoblasten) des Hühnerembryos HMB45-positiv. Als absolut spezifischer Marker wurde eine *in situ*-Hybridisierung mit den Spezies-spezifischen DNA-Sequenzen *Alu* für humane und *L1* für murine Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zur Maus gibt es hierbei im Hühnerembryo keine Kreuzreaktion [45]. Immunhistochemie mit anti-MIB1 (Dako) kennzeichnet DNA-synthetisierende, proliferierende Zellen und färbte spezifisch humane Melanomzell-Nuklei ohne Kreuzreaktion mit embryonalen Wirtszellen (Abbildung 3L). Schließlich wurde die GFP-Epifluoreszenz muriner GFP-VASP-transfizierter B16-F1-Zellen verwendet [46]. GFP-VASP macht Lamellipodien und Filopodien migrierender B16-F1-Zellen sichtbar. Diese Technik erlaubte die *in ovo*-Visualisierung der injizierten Melanomzellen, wie sie sowohl von der Neuralleiste auswanderten als auch den Augenbecher invadierten [37].

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Die Injektion in das embryonale Neuralrohr führt zu spontaner Neuralleistenwanderung von Melanomzellen**

Nach Injektion von Melanomzellen in das Neuralrohr des frühen Hühnerembryos im Stadium 13HH (E2) bauten sich die Melanomzellen spontan in die Neuralleiste ein, vollzogen EMT und wanderten entlang der medialen oder der lateralen Bahn aus.

Die EMT (morphologischer „Phänotyp-Wechsel“ [19]) wurde besonders augenscheinlich bei dem direkten Vergleich der Morphologie der im Lumen des Neuralrohres verbliebenen Melanomzellen mit der auswandernden Fraktion der Melanomzellen. Während die ersteren ein kompaktes, rundes, epithelartiges Aussehen zeigten, wiesen die auswandernden Melanomzellen eine eher gestreckte, mesenchymale Morphologie auf (Abbildung 3A-C).

Das segmentale Muster der medialen Neuralleistenwanderung wird bedingt durch inhibitorische Signale in den kaudalen Hälften und chemotaktische Hinweise in den rostralen Hälften der Sklerotome [25]. Transplantierte Melanomzellen folgten dem segmentierten medialen Weg und wurden in den Nestern der sympathischen Grenzstrangganglien nahe der dorsalen Aorta gefunden [36]. In einigen Embryonen wurden einzelne Melanomzellen im Schwann-Zellen-Kompartiment an der motorischen Wurzel des Spinalnervs beobachtet. Der Nachweis einzelner migrierender Melanomzellen im Hühnerembryo war nicht banal. Der lange Weg der vielen transplantierten Zellen zu den sympathischen Ganglien wurde in Serien-Querschnitten dargestellt, senkrecht zu einer Ebene tangential zum gekrümmt verlaufenden Neuralrohr (Abbildung 3A und Abbildung 3D). Ein großer Anteil des kolonisierten sympathischen Grenzstranges wurde sichtbar, wenn der Embryo in der tangentialen Ebene selbst geschnitten wurde [37]. Immunhistochemie (TUNEL-Reaktion und anti-Caspase-8) zeigte, dass die Melanomzellen in den sympathischen Ganglien und zum Teil auch im Mesenchym des Sklerotoms durch Apoptose zugrunde gingen (Abbildung 3C [37]).

Im Hühnerembryo ist die Auswanderung der Neuralleistenzellen entlang des lateralen Neuralleistwanderweges verglichen mit dem medialen Wanderweg um etwa 24 Stunden zeitversetzt. Nach der EMT ruht ein Teil der Neuralleistenzellen im dorsalen Mesoderm zwischen Deckplatte und Oberflächenektoderm („Sammelpunkt“ [25]). Die epithelialen Dermatomyotom-Anteile der Somiten inhibieren eine Neuralleistwanderung zwischen Oberflächenektoderm und den Somiten. Erst nach Auflösung der epithelialen Dermatome beginnt die nicht-segmentale Migration der Melanozytenvorläuferzellen (Melanoblasten) entlang des lateralen Wanderweges. Melanomzellen, die zwischen den Vorläuferzellen der Hühnermelanozyten am „Sammelpunkt“ ruhen, setzen nach vollzogener EMT ebenfalls die Neuralleistwanderung entlang des lateralen Weges fort. Allerdings werden sie während der Wanderung durch Apoptose stark dezimiert, so dass sich am Ende nur wenige in der lateralen Körperwand nachweisen lassen [37].

### **3.1.1 Nicht transformierte primäre humane Melanozyten verrichten keine Neuralleistwanderung**

Um zu zeigen, dass sich die spontan ausgeübte Neuralleistwanderung von Melanomzellen nach Injektion ins embryonale Neuralrohr auf eine Re-Expression embryonaler Merkmale stützt, wurden im gleichen experimentalen Versuchsansatz primäre humane Melanozyten aus menschlicher Vorhaut in das Neuralrohr von Hühnerembryonen injiziert [44]. Die histologische Auswertung zeigte, dass sich die Melanozyten zwar in die Deckplatte einbauten, aber keine Neuralleistwanderung durchführten (Abbildung 3D-F). Dies deutet darauf hin, dass aus der Neuralleiste abstammende Melanozyten, die bereits im differenzierten mehrschichtigen Epithel der Haut angesiedelt sind, die Fähigkeit zu spontaner Neuralleistwanderung verloren haben.

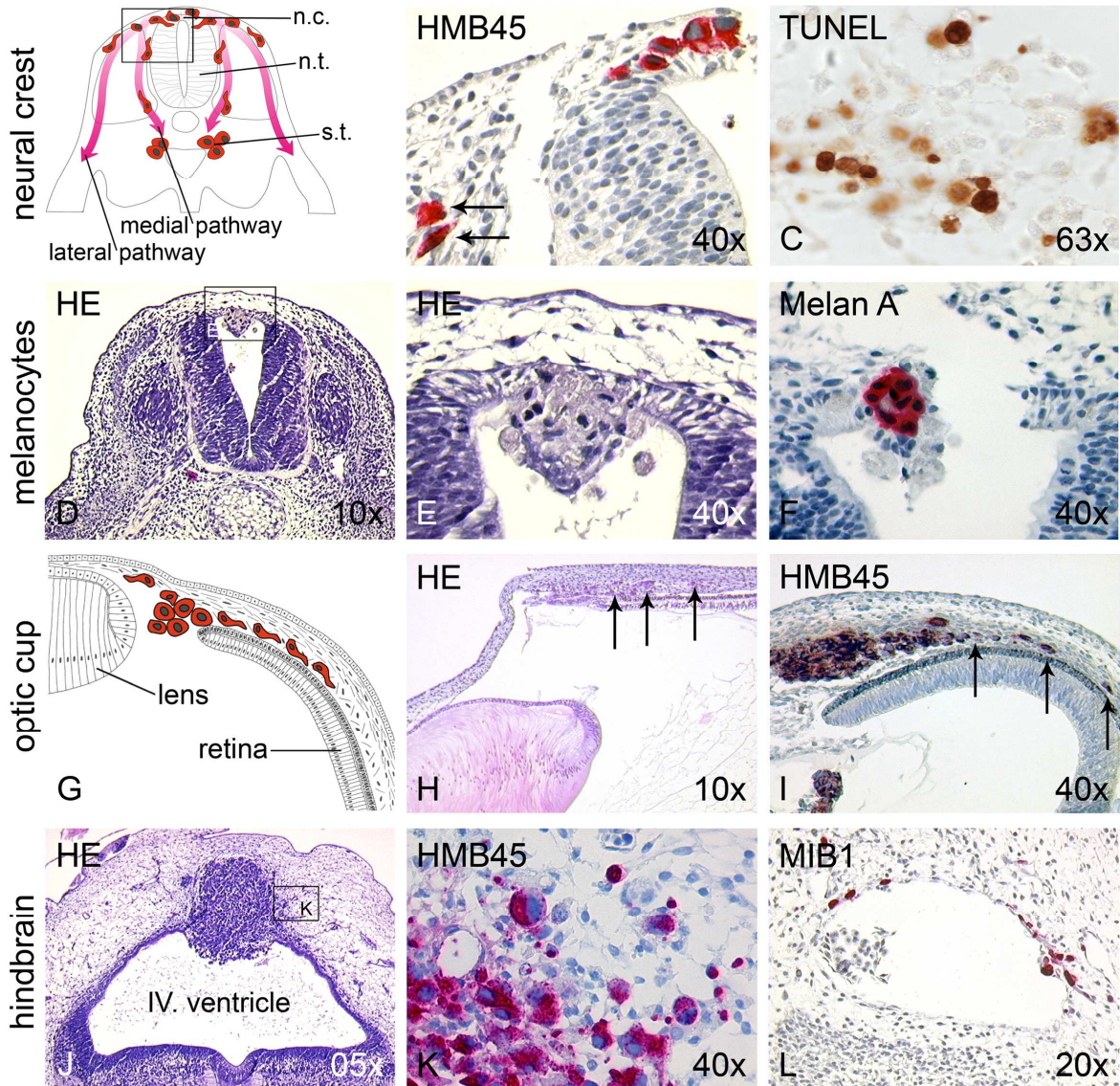
### **3.2 Transplantation in den embryonalen Augenbecher als Modell für invasive Migration von Melanomzellen**

Als ein zweites Kompartiment zur Erforschung der Invasion wurde der embryonale Augenbecher gewählt. Nach Transplantation von B16-F1-Melanomzellen in Hühnerembryonen im Stadium 19-20HH und anschließender Inkubation für 72 Stunden zeigte die histologische Auswertung, dass ein Teil der Melanomzellen hinter der Linse am Ort der Transplantation verblieb, während ein anderer Teil Tumoren im Choroid (ein stark vaskularisiertes, loses mesenchymales Bindegewebe) ausbildete und dieses in der Region der späteren vorderen Augenkammer infiltrierte (Abbildung 3G-I). In einigen Embryonen hatten die Zellen die Linse zerstört und waren in die hyaloiden Gefäße eingewandert (nicht gezeigt). Das maligne Wachstum der Melanomzellen im embryonalen Augenbecher wird von BMP-2 verstärkt und durch Noggin blockiert [39].

### **3.3 Transplantation in die Gehirnbläschen als Modell für Hirnmetastasen**

Als drittes embryonales Kompartiment für malignes Wachstum wurden die Gehirnbläschen untersucht [47]. Melanomzellen wurden in das sich entwickelnde Rhombenzephalon (Rautenhirn) von Hühnerembryonen im Stadium 12-13HH transplantiert. In diesem Stadium ist die Neuralleistenauswanderung im Rhombenzephalon bereits abgeschlossen. Das Kompartiment entspricht damit einer weitgehend der Liquoraussaat von Melanomzellen bei Melanompatienten in Stadium IV, was mit einer außerordentlich schlechten Prognose verbunden ist. In dieser besonderen Nische bildeten die injizierten Melanomzellen in dem schmalen Gewebestreifen zwischen der Deckplatte der Rautengrube und dem Oberflächenektoderm nach 4 weiteren Tagen Inkubationszeit einen Tumorknoten, zerstörten vollkommen die dorsale Deckplatte und drangen invasiv in das umgebende mesenchymale Gewebe ein (Abbildung 3J und Abbildung 3K). Immunhistochemie mit anti-HMB45 und anti-MIB1 zeigte eine Proliferation in etwa 90% der invasiv wachsenden Melanomzellen (nicht gezeigt). Interessan-

terweise war die ventrale, bereits differenzierte Neuralplatte des Rhombenzephalons von der Invasion der injizierten Melanomzellen ausgenommen. Einzelne invadierte Melanomzellen wurden zwischen wirtseigenen Blutzellen in Blutgefäßen gefunden (Abbildung 3L), ein Zeichen einer aufgetretenen hämatogenen Streuung. Somit ist das embryonale rhombenzephalische Hirnbläschen ein geeignetes Modell für die Induktion und das biologische Verhalten von Melanomzellen während der Hirnmetastasierung.



### **Abbildung 3: Histologie, Immunohistochemie und *in situ*-Hybridisierung der Hühnerembryonen (aus [44])**

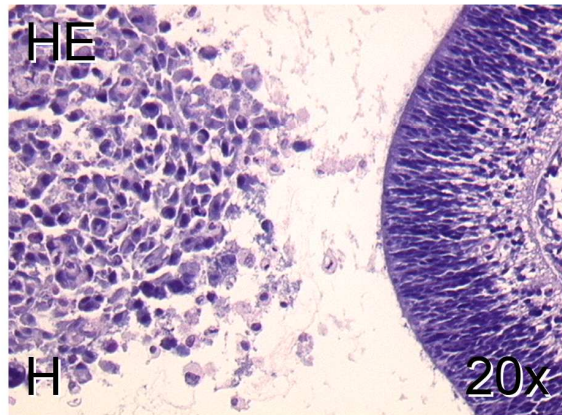
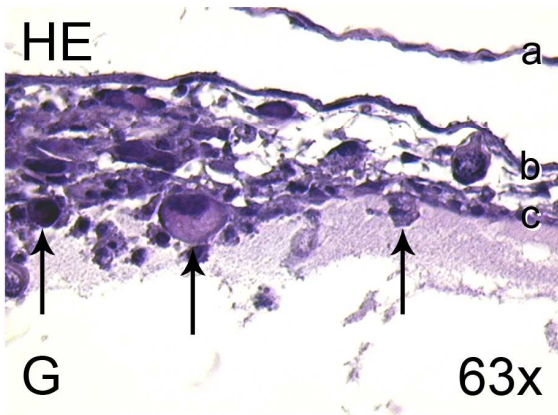
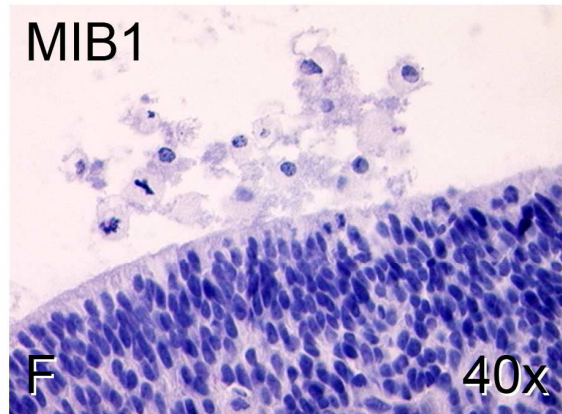
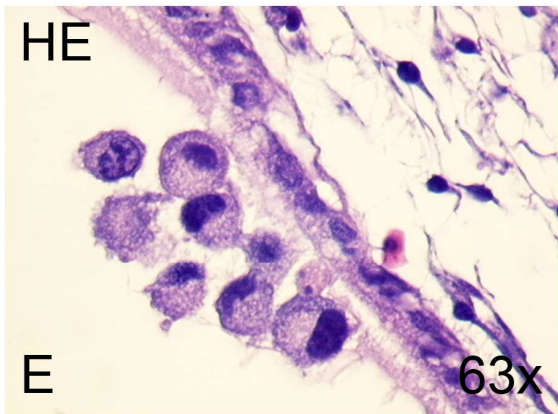
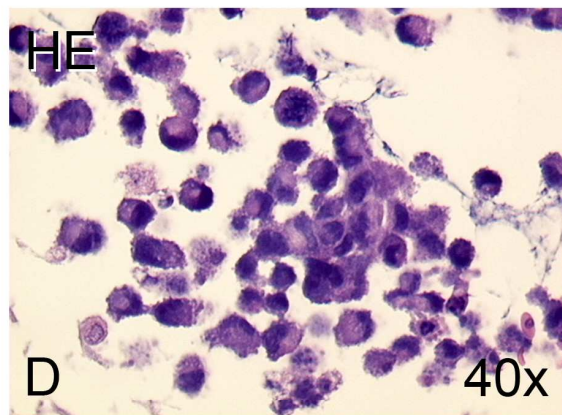
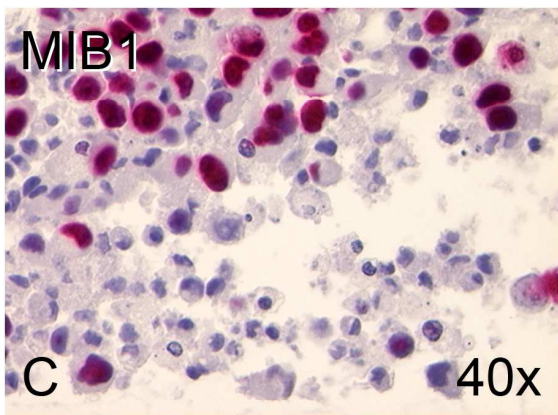
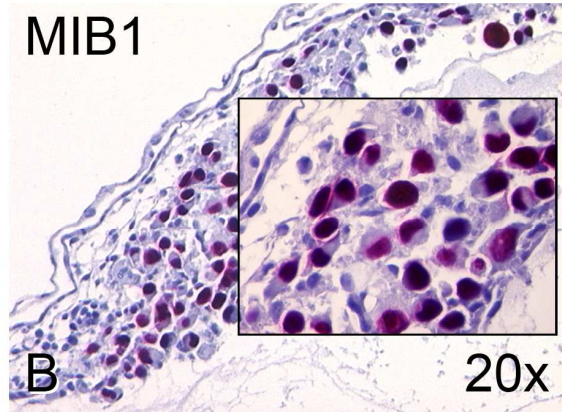
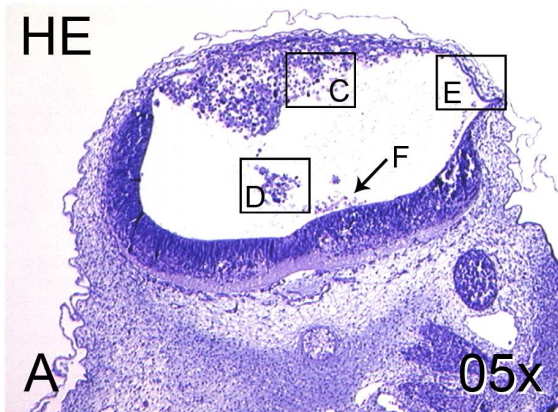
- (A)** Schematische Skizze des ventralen und des lateralen Neuralleistenwanderweges.
- (B)** Hühnerembryo 24 Stunden nach Injektion von SKMel28-Melanomzellen in das Neuralrohr. Melanomzellen (sichtbar gemacht durch Immunreaktion mit anti-HMB45), die spontan die Neuralleistenwanderung wieder aufnehmen, zeigen eine gestreckte, Mesenchym-ähnliche Morphologie (Pfeile).
- (C)** Am Bestimmungsort entlang des ventralen Migrationsweges, den para-aortalen sympathischen Ganglien, begehen die Melanomzellen Apoptose, was durch TUNEL-Färbung sichtbar wird. n.c. = Neuralleiste, n.t. = Neuralrohr, s.t. = sympathischer Trunkus.
- (D, E)** Hühnerembryo 24 Stunden nach Injektion von primären humanen Melanozyten in das Neuralrohr. Melanozyten (mit kompakter, epithelartiger Morphologie) finden sich nur im Lumen des Neuralrohrs und, zum Teil, ohne Neuralleistenwanderung in die Deckplatte integriert.
- (F)** Immunreaktion mit Melan-A bestätigt den melanozytischen Hintergrund der Zellen.
- (G)** Schemazeichnung eines Hühnerembryonen 72 Stunden nach Injektion von B16-F1-Melanomzellen in den Augenbecher.
- (H)** Die injizierten B16-F1 Melanomzellen bilden einen Tumor in der Aderhaut aus.
- (I)** Einzelne Melanomzellen (eindeutig identifiziert durch *in situ*-Hybridisierung mit Maus-spezifischer *mL1*-Probe) invadieren entlang des Umfangs des gesamten Augenbechers die Aderhaut.
- (J)** Hühnerembryo 96 Stunden nach Injektion humaner metastatischer Melanomzellen in das Hirnbläschen des Rhombenzephalons. Die Melanomzellen (HMB45-positiv) formen einen großen Tumorknoten im dorsalen Neuroepithel mit
- (K)** einzelnen HMB45-positiven Zellen, die das umgebende Hirngewebe infiltrieren.
- (L)** Anti-MIB1-Immunhistochemie, ein Proliferationsmarker welcher nicht mit Hühnerzellen kreuzreagiert, identifiziert Melanomzellen während hämatogener Streuung in Blutgefäßen zwischen Wirts-Erythrozyten und -Lymphozyten, und im umgebenden mesenchymalen Gewebe.

### **3.3.1 Überleben der Melanomzellen in Aggregaten oder angeheftet an die Deckplatte**

Nach der Injektion in das Gehirnbläschen verschwanden die meisten Melanomzellen während der weiteren Bebrütung. Nach 48 Stunden waren noch viele apoptotische Einzelzellen und lose Melanomzellaggregate im Lumen des IV. Ventrikels vorhanden (Abbildung 4A). Die in das Wirtsgewebe eingelagerten Melanomzellen formten ein lockeres, ausgestrecktes Aggregat, welches die 3-4 mesenchymalen Zellschichten zwischen Deckplatte und Oberflächenektoderm infiltrierte und in die Liquorhöhle des IV. Ventrikels herausragte. Im dorsalen Anteil proliferierten mehr als 90% der einzelnen und aggregierten Melanomzellen, was durch immunhistochemische Färbung mit anti-MIB1 dargestellt wurde (Abbildung 4B). Melanomzellen, die an die Deckplatte angeheftet waren oder in naher Umgebung des dorsal sitzenden lockeren Aggregates lagen, proliferierten (Abbildung 4C), während Melanomzellen im Lumen des Rhombenzephalons, ohne direkten (zellulären) Kontakt zum Hühnerwirt, unterschiedliche morphologische Stadien der Apoptose aufwiesen (Abbildung 4D). Nach der Injektion reichte die Verteilung der Zellsuspension auch bis an das Prosenzephalon heran, von wo aus das optische und das prosenzephalische Bläschen ausknospen und welches später zum Dienzephalon wird. Hier waren 48 Stunden nach Injektion die Melanomzellen weder am Epithel angeheftet noch in das differenzierte Neuroepithel von Mesenzephalon und Prosenzephalon eingewandert. Allerdings fand sich in der Liquorhöhle des Dienzephalons ein großes, frei flottierendes Aggregat proliferierender Melanomzellen (Abbildung 4H). Auch nach 96 Stunden fand sich an dieser Stelle ein ähnliches frei flottierendes Aggregat. Die Melanomzellen waren dicht gepackt und das Aggregat war klar abgegrenzt (vergl. Abbildung 5H). Auch zu diesem späteren Zeitpunkt fand sich an dieser Stelle jedoch keine Invasion der Melanomzellen in das Wirtsgewebe, trotz dichtem Kontakt zum Neuroepithel des Dienzephalons.



48h after injection



**Abbildung 4: Anheftung an die Deckplatte und Primärtumorknotenformation 48 Stunden nach Injektion von Melanomzellen in den IV. Ventrikel des 13HH Hühnerembryos (aus [47])**

- (A, B)** Hühnerembryo nach Injektion von humanen PIH-Melanomzellen in das Rhombenzephalon. (A) HE-gefärbte Schnitte zeigen ein gestrecktes, lockeres Aggregat aus Melanomzellen zwischen der Deckplatte und dem Oberflächen-Ektoderm. (B) Immunohistochemische anti-MIB1-Färbung kennzeichnet Melanomzellen, die diffus in den Hühnerembryo einwandern.
- (C, D)** Die Mehrzahl der locker an der Deckplatte anheftenden Melanomzellen sind MIB1-positiv (C), während im Lumen des Rhombenzephalons schwimmende Zellen morphologisch verschiedene Stadien der Apoptose zeigen (D).
- (E, F)** Kleine Aggregate aus vitalen Melanomzellen heften dem zilienträgenden Epithel der dorsalen Deckplatte an (E). Entsprechende Aggregate angeheftet am ventralen, bereits differenzierten Neuroepithel sind apoptotisch (F).
- (G, H)** Einzelne Melanomzellen durchdringen die Deckplatte (Pfeile in G). Im Hirnbläschen des Dienzephalons bildeten die Melanomzellen lose Aggregate aus, ohne Invasion des Wirtsgewebes.

### **3.3.2 Tumorformation in der Deckplatte**

In der Entwicklung des Hühnerembryos von Tag E4 zu Tag E6 (48-96 Stunden nach Injektion) bilden die 3-4 Zelllagen losen Mesenchyms zwischen Oberflächenektoderm und neuraler Deckplatte eine dicke dorsale Körperwand aus vaskularisiertem Bindegewebe, noch ohne skelettale oder muskuläre Strukturen. Das 48 Stunden nach Injektion noch sichtbare lose Melanomzellinfiltrat wandelte sich regelmäßig in einen verdichteten, massiv proliferierenden Tumorknoten in der Mitte der kuppelartigen Deckplatte um (Abbildung 5A). 96 Stunden nach Injektion war der Tumor durchsetzt mit Hühnerkapillaren (Abbildung 5B). Der kugelförmige Tumor reichte dorsal bis in das dichte embryonale Mesenchym der dorsalen Körperwand und ventral bis in den Liquorraum des IV. Ventrikels. Auf der vorspringenden Oberfläche war das Epithel der Deckplatte unterbrochen und die weitere Aggregation von Melanomzellen aus dem Liquor war offensichtlich.

### **3.3.3 Spezifische Anheftung und Invasion an der ependymalen Deckplatte**

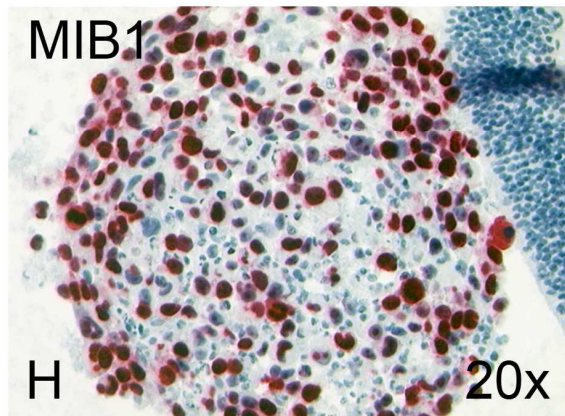
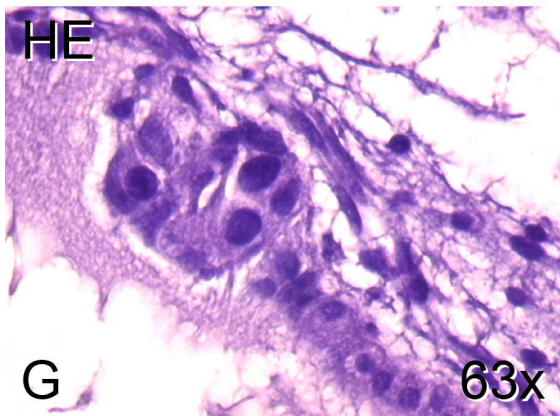
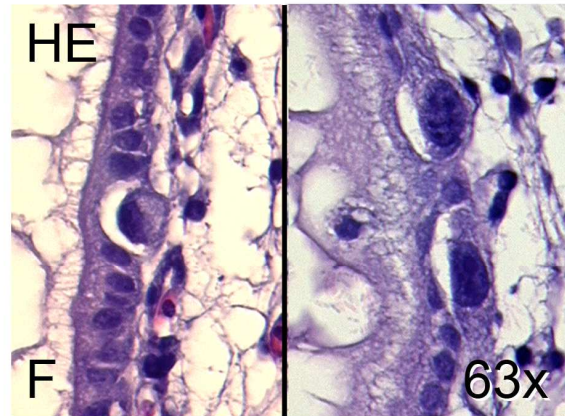
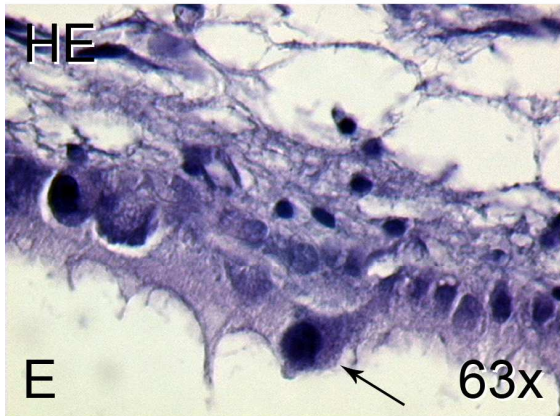
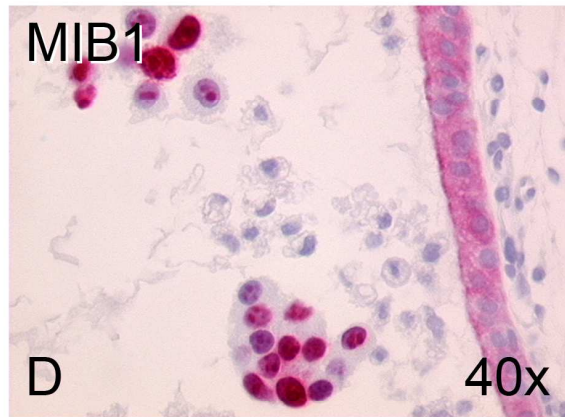
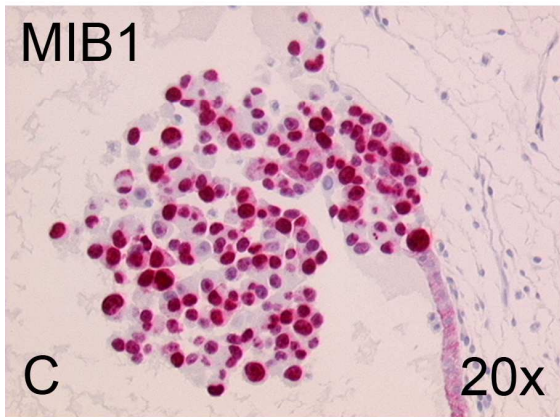
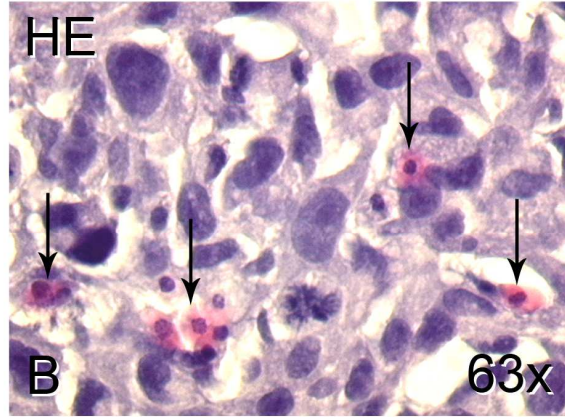
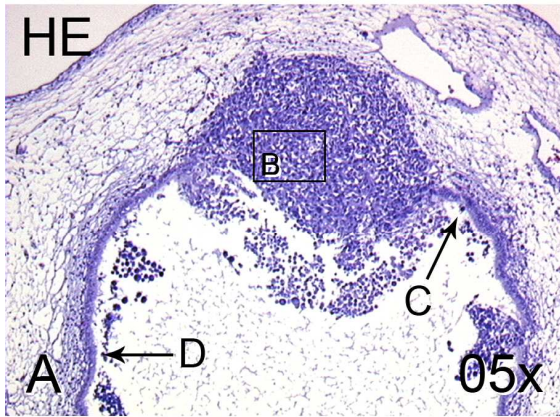
48 Stunden nach Injektion der Melanomzellen besteht das Ependym der Deckplatte aus einer dünnen, endothelartigen Schicht. Beim Vergleich verschiedener Gruppen von Melanomzellen, die an das auskleidende Epithel der Hirnblase angeheftet waren, wurde deutlich, dass nur solche Melanomzellen lebendig waren, die an das eher dorsal gelegene, quaderförmige Deckplattenepithel angeheftet waren (Abbildung 4E). Dagegen konnten an der Oberfläche des ventralen Neuralepithels des Rhombenzephalon keine Anzeichen einer Invasion gefunden werden, und die anhaftenden Melanomzellen waren apoptotisch (Abbildung 4F).

Nach 96 Stunden waren proliferierende Melanomzellen an die dorsale Deckplatte angeheftet und wanderten in das Epithel ein (Abbildung 5C), während sie weiter lateral nur in kleinen Aggregaten überlebten und am Epithel anhaftende Einzelzellen apoptotisch waren (Abbildung 5D).

48 Stunden nach Injektion durchbrachen einzelne Melanomzellen die Deckplatte (Abbildung 4G). Ähnliche Beobachtungen zeigten sich auch nach 96 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt ist das dünne Deckepithel quaderförmig geworden und mit Zilien besetzt, so dass unterschiedliche Stadien der Einwanderung von Melanomzellen klar und im Detail beobachtet werden konnten. Die Invasion des Deckplattenepithels sowohl durch einzelne als auch durch kleine Gruppen von Melanomzellen setzte sich auch in der Umgebung des zentralen Tumorknötchens fort. Einige noch an den Zilien anhaftende Melanomzellen reichten mit Pseudopodien zwischen die ependymalen Zellen (Abbildung 5E). Andere Melanomzellen waren im Deckplattenepithel wie transmigrierende Lymphozyten gefangen (Abbildung 5F, linkes Bild), während wieder andere bereits die Basallamina des Deckplattenepithels durchbrochen hatten (Abbildung 5F, rechtes Bild). Auch nach 96 Stunden waren noch kleine Aggregate vitaler Melanomzellen am lateralen Rand der Deckplatte und am Neuralepithel angeheftet (Abbildung 5G).



96h after injection



**Abbildung 5: Anheftung an die Deckplatte und Primärtumorknotenformation 96 Stunden nach Injektion von Melanomzellen in den IV. Ventrikel des 13HH Hühnerembryos (aus [47])**

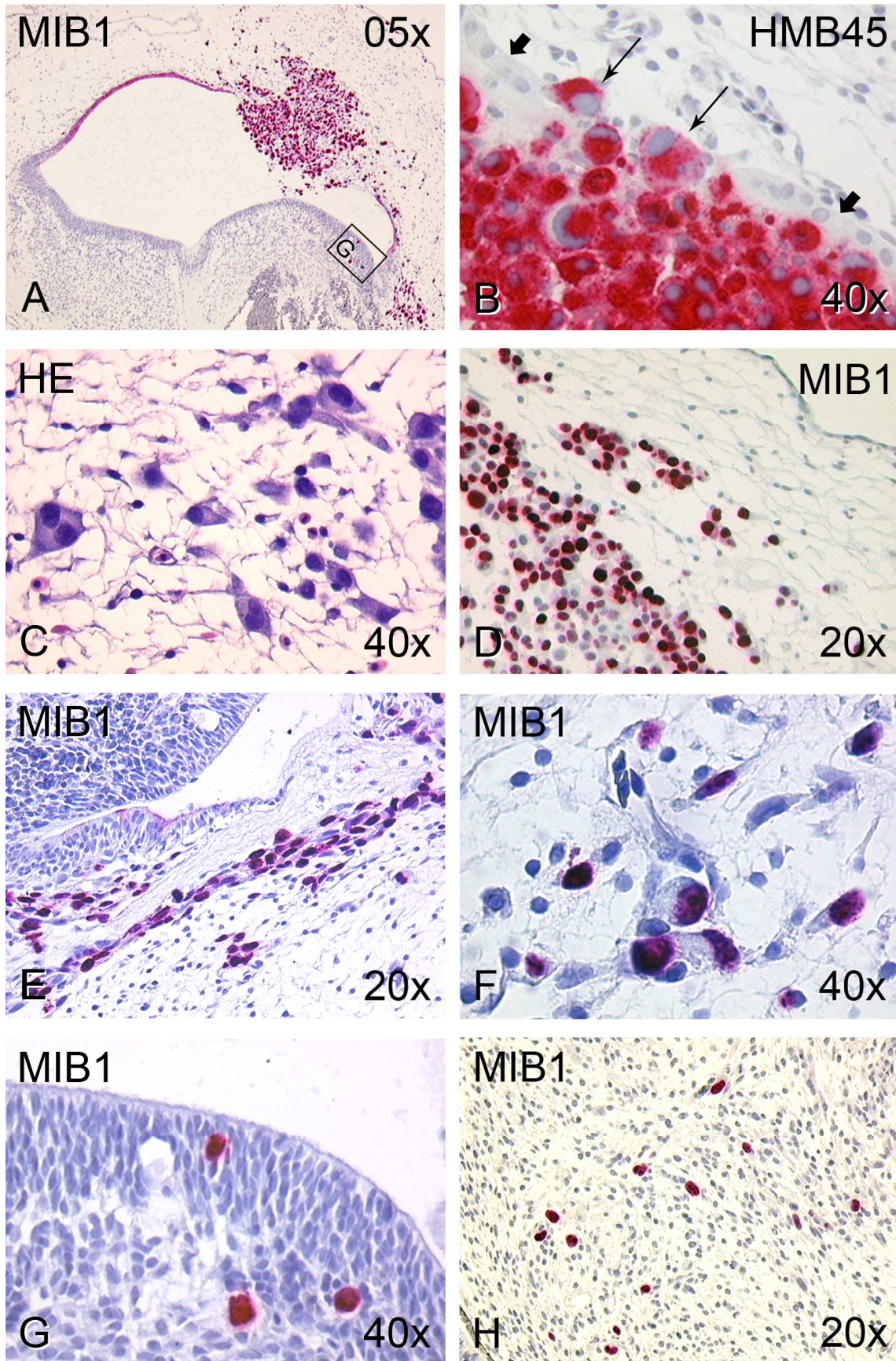
- (A, B)** HE-gefärbte Schnitte eines Hühnerembryos 96 Stunden nach Injektion von BLM-Zellen in den IV. Ventrikel. Die Zellen bilden einen großen, infiltrativen Tumor in der dorsalen Deckplatte und dem angrenzenden Mesenchym (A). Hühnerkapillaren (Pfeile) sind in den hochproliferativen Tumor eingesprossen (B).
- (C, D)** An das dorsale Deckplatten-Epithel angeheftete einzelne BLM-Zellen und Aggregate proliferieren weiter (C), während weiter ventral einzelne BLM-Zellen apoptotisch sind und sich die Proliferation auf kleine Melanomzellaggregate beschränkt (D).
- (E, F)** Einzelne SKMEL28-Zellen und Aggregate heften sich an die Deckplatte an und strecken Pseudopodien (Pfeil) zwischen die Zilien-tragenden ependymalen Wirtszellen aus (E). M14-Melanomzellen im Deckplattenepithel während der invasiven Durchwanderung (F, linkes Bild). SKMEL28-Zellen, die gerade die Basallamina durchbrechen (F, rechtes Bild).
- (G, H)** Kleine Melanomzell-Aggregate wandern auch nach 96 Stunden noch in die Deckplatte ein (G). In der weiter rostral gelegenen Hirnblase des Dienzephalons formen PIH-Melanomzellen an das Neuraepithel angeheftete, MIB1-positive Aggregate, ohne in das Wirtsgewebe einzuwandern (H).

### **3.3.4 Sekundäre und retrograde Invasion des Wirtsgewebes**

96 Stunden nach Injektion hatten die metastatischen BLM-Zellen begonnen, in das umgebende Wirtsgewebe einzuwandern (Abbildung 6A). Eine Anheftung großer 451LU-Aggregate konnte beobachtet werden, mit einzelnen Zellen, die in die Deckplatte einwanderten (Abbildung 6B). Diese Invasion trat sowohl auf Einzelzellniveau auf (Abbildung 6C, SKMEL28-Zellen), als auch in Clustern aus aggregierten Zellen (Abbildung 6D, M14-Zellen). Die aktiv in den Hühnerwirt einwandernden Melanomzellen zeigten sich MIB1-positiv und waren damit proliferierend. Nach 96 Stunden formten BLM-Zellen invasive Zellstraßen in das neurale und mesenchymale Gewebe (Abbildung 6E). Einzelne Zellen hatten sich vom Primärtumorknoten gelöst und migrierten im Mesenchym entlang der Deckplatte. Darüber hinaus trat über eine Invasion von Blutgefäßen, in denen sich BLM-Zellen zwischen den Wirts-Erythrozyten ausmachen ließen, eine erweiterte Metastasierung auf (Abbildung 6F). Während bei keiner der untersuchten Melanomzelllinien eine direkte Anheftung der Melanomzellen mit folgender Invasion in das ventrale, differenzierte Neuralepithel auftrat, wanderten BLM-Zellen retrograd in das Neuralepithel ein (Abbildung 6G). Erst durch immunhistochemische Färbung mit HMB45 oder anti-MIB1 trat das Ausmaß der Invasion der injizierten Melanomzellen zutage. Einzelne Zellen fanden sich im gesamten Mesenchym und in kleinen Blutgefäßen der dorsalen Hälfte des Hühnerkopfes (Abbildung 6H).



96h after injection





**Abbildung 6: Invasion des Deckplattenepithels und sekundäre Invasion des Wirtsgewebes 96 Stunden nach Injektion von Melanomzellen in den IV. Ventrikel des Hühnerembryos (aus [47])**

- (A, B)** BLM-Zellen im Rhombenzephalon (A). Zusätzlich zum dorsalen Primärtumorknoten findet sich eine Invasion in das umgebende Wirtsgewebe. (B) Aggregate aus 451LU-Zellen, angeheftet an die Deckplatte der Rautengrube, mit einzelnen Melanomzellen (lange Pfeile), die in das auskleidende quaderförmige Epithel des dorsalen Hirnbläschens einwandern (dicke Pfeile).
- (C, D)** Nach Ausbildung des Tumorknotens beginnen die Melanomzellen in das umgebende Wirtsgewebe invasiv einzuwandern, als Einzelzellen (C, SKMEL28-Zellen) oder in kleinen Gruppen von aggregierten Zellen (D, M14-Zellen).
- (E, F)** Immunhistochemische anti-MIB1-Färbung zeigt BLM-Melanomzellen in Straßen in das Mesenchym entlang des Neuralepithels einwandern (E) und hämatogen verteilt in kleinen Blutgefäßen zwischen Wirts-Erythrozyten und -Lymphozyten (F).
- (G, H)** In einigen Fällen fand sich eine retrograde Invasion MIB1-positiver BLM-Zellen in das differenzierte Neuralepithel im zukünftigen Zerebellum (Kasten in A; G). Die eindeutige Identifikation der Melanomzellen mit anti-MIB1 zeigte, dass eine massive Invasion in das Mesenchym des Embryokopfes stattgefunden hatte (H).

### **3.3.5 Unterschiedliche Wachstumsmuster verschiedener Melanomzelllinien**

Um zu analysieren, ob sich verschiedene Zelllinien in diesem Modell unterschiedlich verhalten, wurden die Injektionen mit sieben verschiedenen Melanomzelllinien durchgeführt. Neben Melanomzellen aus der Hirnmetastase eines Patienten (PIH-Zellen) wurden SBCL2-Zellen der radialen Wachstumsphase (RGP), WM115-Zellen der vertikalen Wachstumsphase (VGP) und die metastatischen Melanomzelllinien (MM) M14, BLM, 451LU und SKMEL28 verwendet. Nach der Injektion wurde 96 Stunden lang bebrütet und anschließend in allen Embryonen für die injizierten Zellen das Wachstum des primären Tumorknotens beobachtet. In allen untersuchten Melanomzelllinien war die große Mehrzahl an Zellen MIB1-positiv, befand sich also im Proliferationszustand. Es ließen sich keine Unterschiede im Proliferationsindex (Anzahl / Prozent an MIB1-positiven Zellen) der transplantierten Zellen ausmachen. Der größte Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien lag in ihrem jeweiligen invasiven Potential.

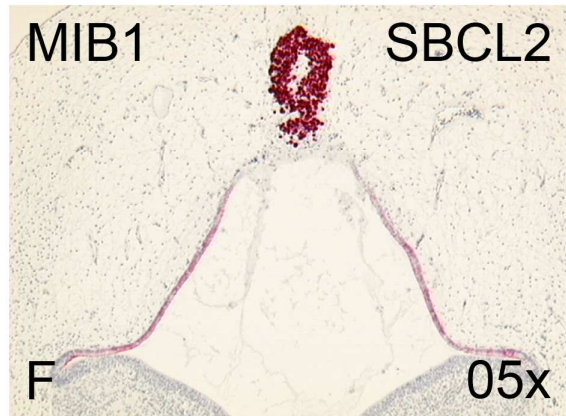
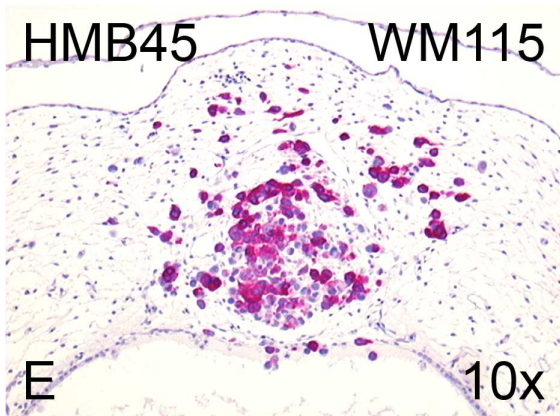
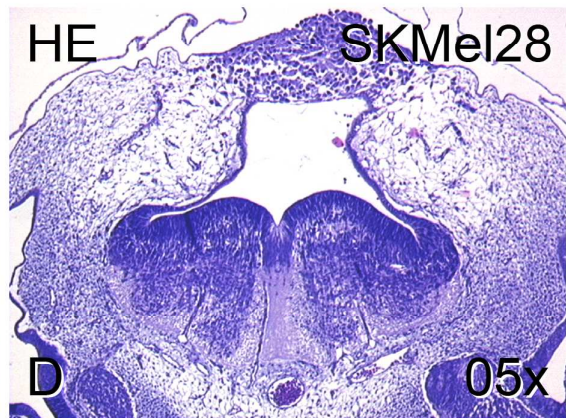
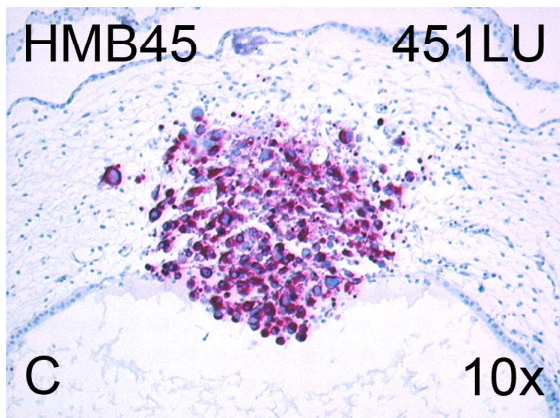
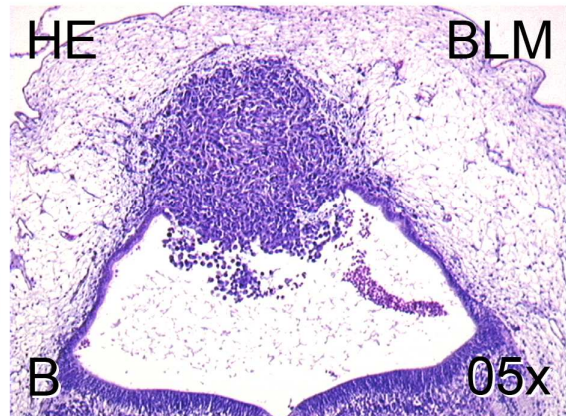
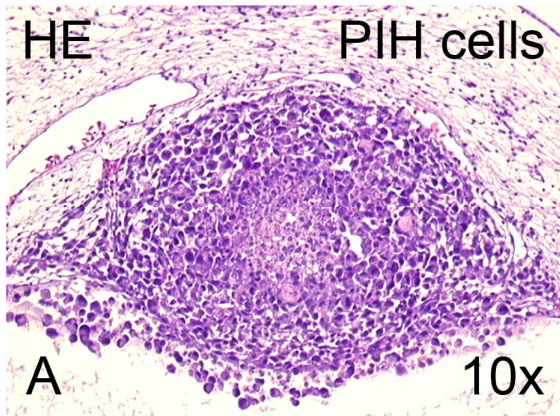
PIH-Zellen formten langgestreckte Tumore nach 48 Stunden (vgl. Abbildung 4A) und eher abgegrenzt proliferierende, große Tumoren mit zentraler Nekrose im dorsalen Mesenchym nach 96 Stunden, welche die Deckplatte des Hirnbläschens zerstörten (Abbildung 7A). Einzelne Zellen wanderten in die umgebenden Gewebe ein. Ähnliche Resultate zeigten sich bei den metastatischen Zelllinien. BLM-Zellen stellten ausgeprägtes Tumorstadium dar (Abbildung 5A und Abbildung 7B) sowie massive Invasion ins Mesenchym, das Neuraletpithel und Blutgefäße (Abbildung 6E-H). 451LU-Zellen zeigten lockeres Tumorstadium mit moderater Invasion des umgebenden Gewebes (Abbildung 7C). SKMEL28- und M14-Zellen zeigten ähnliche Resultate: massives Tumorstadium im dorsalen Mesenchym, welches den dorsalen Kopf des Embryos komplett durchdrang, mit Übergang in ausgeprägte Invasion in umgebende Gewebe und Blutgefäße (Abbildung 7D). Einzelne SKMEL28-Zellen wanderten außerdem in das dorsale Oberflächenektoderm ein (nicht gezeigt). WM115-Zellen bildeten kleinere Tumoren im dorsalen Mesenchym und im Hirnbläschen, sie waren weniger invasiv und verursachten weniger Schaden am Wirtsgewebe als die metastati-

schen Zelllinien (Abbildung 7E). SBCL2-Zellen gaben ein anderes Ergebnis: sie formten eher kleine, kompakte Tumoren im dorsalen Mesenchym ohne Invasion oder Zerstörung der umgebenden Gewebe (Abbildung 7F). Die Größe der Primärtumorknoten (größter Durchmesser) wurde für jede Zelllinie in HE-gefärbten Anschnitten ausgemessen (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Größe des primären Tumorknotens 96 Stunden nach Injektion von unterschiedlichen Melanomzelllinien in den IV. Hirnventrikel des Hühnerembryos.**

<b>Zelllinie</b>	<b>Anzahl Embryos</b>	<b>Primärtumorknoten [<math>\mu\text{m}</math>]</b>
<b>PIH</b>	14	350 $\pm$ 61
<b>BLM</b>	14	509 $\pm$ 51
<b>451LU</b>	14	263 $\pm$ 40
<b>SKMEL28</b>	13	229 $\pm$ 70
<b>M14</b>	12	359 $\pm$ 92
<b>WM115</b>	10	216 $\pm$ 113
<b>SBCL2</b>	10	123 $\pm$ 72

96h after injection



**Abbildung 7: Histologische Auswertung der verschiedenen Melanomzellen 96 Stunden nach Injektion in den IV. Ventrikel (aus [47])**

- (A) HE-gefärbte Schnitte von Hirnmetastasen-abstammenden PIH-Zellen zeigen Wachstum eines großen, gut abgegrenzten, zentral nekrotischen Tumorknotens mit Infiltration einzelner Zellen in das mesenchymale embryonale Gewebe. Der Tumor wölbt sich in das Wirtsgewebe mit moderater Destruktion benachbarter Strukturen vor.
- (B) BLM-Zellen zeigen ein ausgeprägtes Tumorwachstum und Invasion in Mesenchym, Neural-epithel und Blutgefäße. Oft fand sich eine massive Zerstörung des Wirtsgewebes.
- (C) HMB45-Färbung von 451LU-Zellen im Rhombenzephalon zeigt ein eher lockeres Tumorstwachstum mit moderater Invasion und Destruktion des umgebenden Gewebes.
- (D) Injektion von SKMEL28-Zellen ergab ein massives Tumorwachstum im dorsalen Mesenchym, welches den Embryokopf komplett durchsetzte, mit Übergang zu ausgeprägter Invasion in die umgebenden Gewebe, das dorsale Oberflächen-Ektoderm und Blutgefäße.
- (E) HMB45-Färbung von WM115-Zellen (VGP) zeigt Wachstum eines kleinen Tumors mit weniger Zerstörung und Invasion des Wirtsgewebes als bei Zelllinien des metastasierten Melanoms.
- (F) SBCL2-Zellen (RGP) bildeten kleine, kompakte Tumoren im dorsalen Mesenchym ohne Invasion oder ausgeprägte Zerstörung des umgebenden Wirtsgewebes.

### **3.4 Das Clark Modell**

Um herauszufinden, ob Zelllinien mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen aus verschiedenen Wachstumsphasen das jeweilige Wachstumsmuster (horizontal, vertikal, invasiv) ihres ursprünglichen Tumors beibehalten, wurden Migration und Invasion *in vitro* und *in vivo* untersucht [48]. Im ersten Schritt wurde die Migrationsfähigkeit der drei verschiedenen Zelllinien im Boyden chamber Assay ohne Matrigel<sup>®</sup> Zusatz getestet. Anschließend wurde der Versuch wiederholt, diesmal aber unter Hinzunahme einer dünnen Schicht Matrigel<sup>®</sup>, die als Surrogat für die Basalmembran diente, durch welche die ausgesäten Melanomzellen aktiv hindurchwandern sollten. Die Ergebnisse beider Versuchsansätze zeigten, dass sich die Migrations- und die Invasionsfähigkeit von SBCL2-Zellen (RGP) zu WM115-Zellen (VGP) zu metastatischen BLM-Zellen steigerten (Abbildung 8A).

Es wurde im Folgenden untersucht, ob die verschiedenen Migrations- und Invasionseigenschaften der Melanomzellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen auch in dreidimensionalen humanen epidermalen Hautrekonstrukten vorhanden sind. Es zeigte sich, dass SBCL2-Melanomzellen (RGP) auf die basale Schicht des mehrschichtigen Epithels beschränkt blieben und wenig proliferierten (MIB1-positive Zellen) (Abbildung 8B, obere Reihe). Ein ähnliches Bild boten WM115-Zellen (VGP). Sie zeigten keine Invasion, aber eine erhöhte Proliferation und Tumorbildung innerhalb des verhornenden mehrschichtigen Epithels (Abbildung 8B, mittlere Reihe). Im Gegensatz hierzu waren die hochproliferativen BLM-Zellen (metastatisch) invasiv in das Hautrekonstrukt eingewandert (Abbildung 8B, untere Reihe).



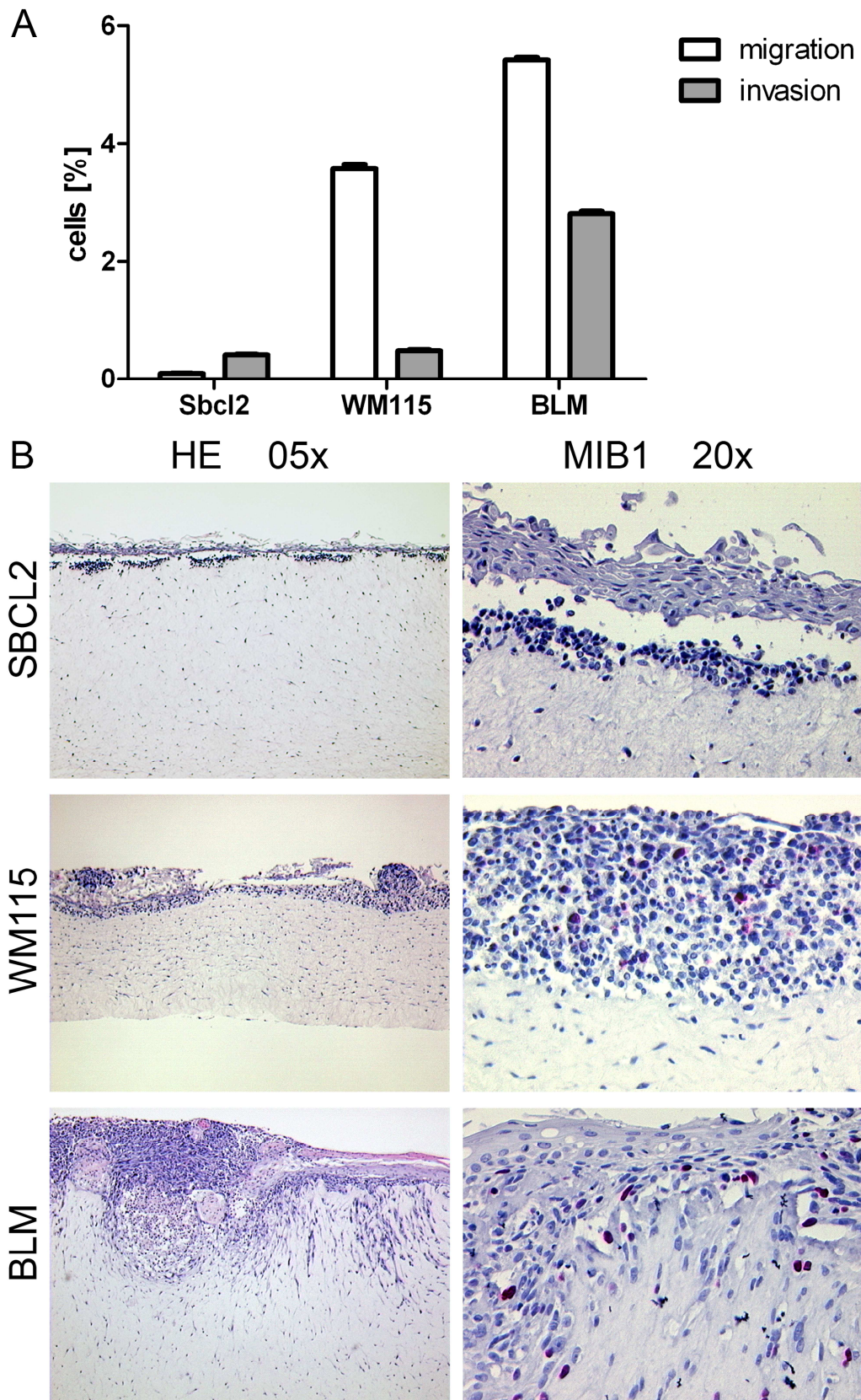
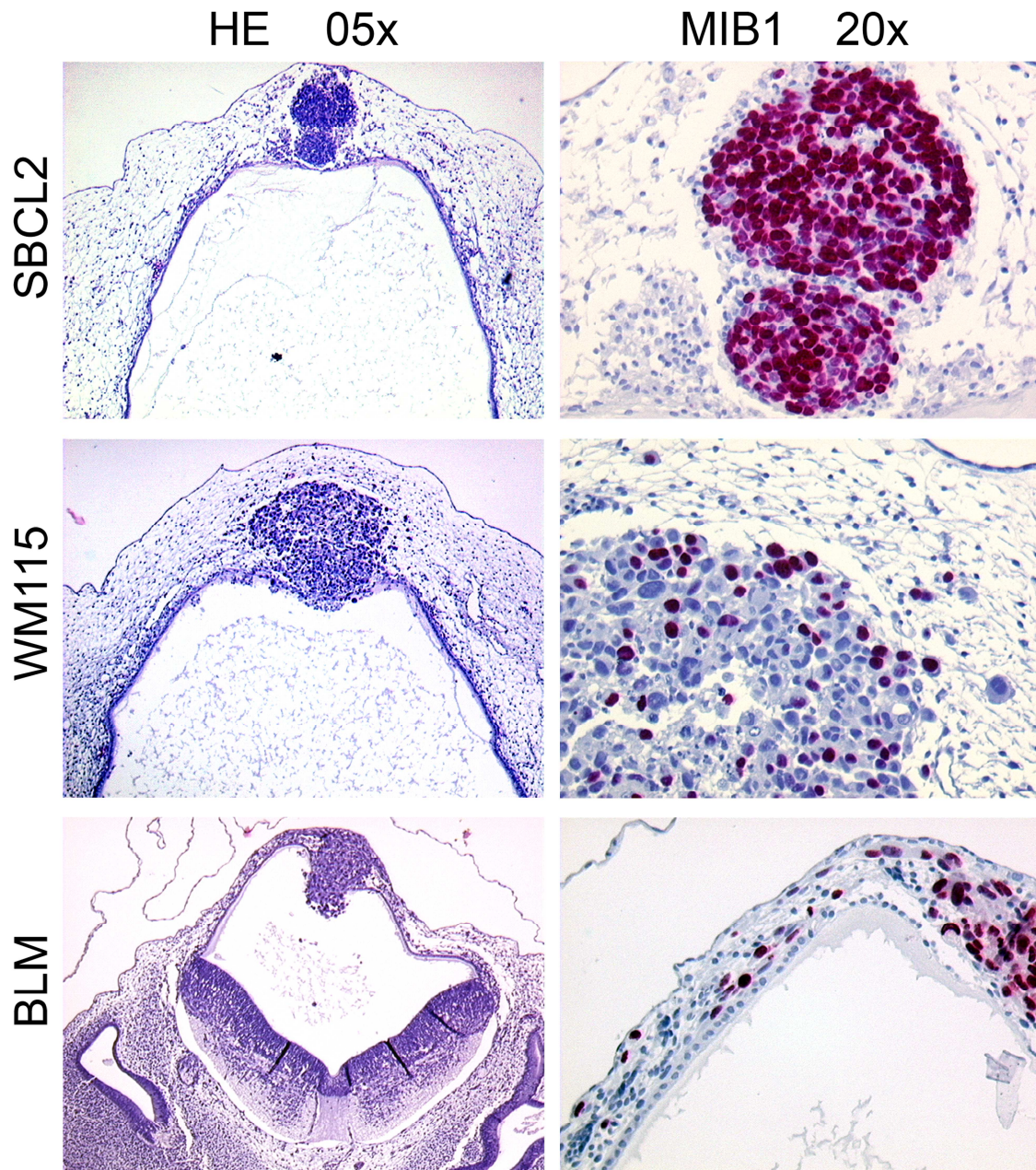


Abbildung 8: Migration und Invasion im Boyden Chamber Assay und in humanen epidermalen Hautrekonstrukten nehmen von RGP (SBCL2-Zellen) über VGP (WM115 Zellen) zu metastatischen Melanomzellen (BLM-Zellen) zu (aus [48]).

Um zu prüfen, ob sich Melanomzellen aus den verschiedenen Wachstumsphasen für Untersuchungen der Melanomprogression *in vivo* eignen, wurden SBCL2-Melanomzellen (RGP), WM115-Zellen (VGP) und metastatische BLM-Zellen in den IV. Ventrikel des sich entwickelnden Hühnerembryogehirns injiziert und die Embryonen für weitere 4 Tage inkubiert. Das Hirnbläschen als Injektionsort ermöglicht es den Melanomzellen in das Neuraepithel einzuwandern um Metastasen-artige Tumorknoten zu bilden. Die histologische Auswertung der jeweils acht Embryonen pro Gruppe ergab, dass SBCL2-Zellen abgegrenzte Metastasen im dorsalen Neuraepithel und dem umgebenden Gewebe formten. Keine einzige SBCL2-Zelle infiltrierte die umliegenden Gewebestrukturen. Im Gegensatz zu dem Verhalten der SBCL2-Zellen im Hautrekonstrukt proliferierten hier beinahe alle Zellen (Abbildung 9, obere Reihe). WM115-Zellen formten ebenfalls scharf abgegrenzte, proliferierende Tumorknoten im dorsalen Neuraepithel und umgebendem Gewebe; allerdings drangen auch einzelne MIB1-positive WM115-Zellen in das angrenzende mesenchymale Gewebe ein (Abbildung 9, mittlere Reihe). Bei den metastatischen BLM-Zellen lagen die ausgebildeten Melanomknoten diffus im Hirngewebe eingebettet. Eine große Zahl an BLM-Zellen wanderte invasiv in das umliegende mesenchymale Gewebe ein (Abbildung 9, untere Reihe).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass Melanomzelllinien aus verschiedenen Wachstumsphasen in einem komplexen *in vivo*-Modell ihre spezifischen invasiven Eigenschaften behalten. Dies unterstreicht, dass RGP-, VGP- und metastatische Melanomzellen geeignet sind, um im Hühnerembryo-Modell verschiedene Gesichtspunkte der Melanomprogression zu erforschen [48].





**Abbildung 9: Metastatische BLM-Zellen wandern umfangreich in das embryonale Hühnergehirn ein (aus [48]).**

Melanomzellen wurden in den IV. Ventrikel des sich entwickelnden Rhombenzephalon (Hinterhirn) von Hühnerembryonen im Stadium 13HH transplantiert. Nach weiteren 4 Tagen Inkubation wurde die Tumorausbildung und Invasion der Melanomzellen in das umgebende mesenchymale Gewebe beurteilt.

**Obere Reihe:** RGP SBCL2-Zellen bildeten gut abgegrenzte, hochproliferative Tumoren (etwa 90% der Zellen sind MIB1-positiv) im dorsalen Neuroepithel und umliegenden Hirngewebe. Es wurde keine Invasion einzelner Melanomzellen beobachtet.

**Mittlere Reihe:** VGP WM115-Zellen bildeten weniger proliferative (etwa 50% MIB1-positiv), abgegrenzte Tumoren in der gleichen Region aus; einzelne Melanomzellen beginnen das angrenzende Gewebe zu invadieren.

**Untere Reihe:** Metastatische BLM-Zellen bildeten unregelmäßige, diffus proliferierende Tumoren (etwa 80% MIB1-positiv), die das dorsale Gehirngewebe zerstörten. Zahlreiche Zellen und Gruppen von BLM-Zellen invadieren die angrenzenden mesenchymalen und neuronalen Gewebe.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Transplantation ins Rhombenzephalon als Modell für Hirnmetastasierung**

In vorausgegangenen Studien wurde der Hühnerembryo in frühen Somitenstadien (E2-E5) verwendet und Melanomzellen entweder an ihren Ursprungsort die Neuralleiste, oder in den Augenbecher als ektope Stelle transplantiert [36-39]. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Melanomzellen nach Transplantation in die autochthone Neuralleistenumgebung spontan eine Neuralleistenwanderung entlang des ventralen und des lateralen Weges durchführen und in den Zielgebieten (dem para-aortalen sympathischen Grenzstrang) Apoptose durchlaufen. Im Augenbecher hingegen zeigten die Melanomzellen malignes Wachstum mit lokaler Invasion von Gewebe und Blutgefäßen. Allerdings ist der Augenbecher technisch schwer für Transplantationen zugänglich, und auch die histologische Auswertung der Melanomzellen in dieser Nische ist aufwändig.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere ektope Transplantationsstelle präsentiert, die malignes Wachstum erlaubt - die Hirnblase des Rhombenzephalons (IV. Ventrikel). Sie ist wesentlich leichter zugänglich und das Tumorstadium ist reproduzierbarer als im Augenbecher [39]. Die Neuralleistenzellen des Rhombenzephalons wandern im Stadium 9-11HH aus [43], wenn der Embryo etwa 6-13 Somitenpaare hat [25]. Verschiedene Melanomzelllinien und Zellen primärer Melanommetastasen wurden im Stadium 13HH mit etwa 19-20 Somitenpaaren in die Hirnblase des Rhombenzephalons injiziert. In diesem Stadium ist die Auswanderung der kranialen Neuralleiste abgeschlossen; eine Einwanderung von Melanomzellen tritt also unabhängig von der Migration der ortsansässigen, autochthonen Neuralleistenzellen auf. Die Embryonen wurden zwei oder vier Tage nach der Melanomzellinjektion untersucht. Hierbei fand sich in allen Embryonen eine Tumorformation in der dorsalen Mittellinie der ependymalen Deckplatte des embryonalen Rhombenzephalons. Von diesem Primärtumorknoten ausgehend trat sekundäre Invasion von umgebendem embryonalem Gewebe (Mesenchym, Neuralgewebe) und Blutgefäßen auf.

## **4.2 Grundvoraussetzung für das Überleben von Melanomzellen in der Liquorumgebung**

Nach der Injektion ging der Großteil der Melanomzellen in der embryonalen Liquorhöhle zugrunde. Es überlebten nur Zellen, die sich an die dorsale Deckplatte angeheftet oder sich zu Aggregaten zusammengeschlossen hatten. Für das Überleben der Zellen in dieser Umgebung sind offensichtlich trophische Faktoren vonnöten, welche entweder durch autokrine Produktion in Aggregaten bereitgestellt werden, oder aber durch das Wirtsgewebe, an welches sich die Melanomzellen anheften und in das sie anschließend invasiv einwandern. Als Promotor von metastatischem Tumorwachstum, Überwindung der Blut-Hirnschranke und Überleben im ZNS wird eine Vielzahl an Faktoren diskutiert. Dazu gehören unter anderem autokrine/parakrine Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche häufig von Astrogliazellen als Antwort auf Hirnschädigung produziert werden (TGF $\beta$ , TGF $\alpha$ ,  $\beta$ FGF, IL1 $\beta$ , IL6) [5].

## **4.3 Selektive Anheftung an und Einwanderung in die Zilien-tragende ependymale Deckplatte**

Anheftung und trophische Interaktion begrenzten sich auf die Mittellinie des ependymalen Epithels des Rhombenzephalondachs. Während der Neurulation bildet das Dach des Neuralrohres nach Fusion der Neuralfalten eine Deckplatte aus, welche das Neuroepithel kennzeichnet. Im Gehirnbläschen des Rhombenzephalons trennen sich basale- und Flügelplatten des Neuroepithels in der dorsalen Mittellinie und bilden den ventralen Boden des IV. Ventrikels. Die Deckplatte wird in eine ependymale Schicht umgewandelt. Am Ende der hier gezeigten Untersuchungen, also vier Tage nach Injektion, besteht das Dach des Rhombenzephalon aus einem kubischen Flimmerepithel, an das sich weiterhin einzelne Melanomzellen und Zellaggregate anheften, welche dann aktiv durch das Epithel und die Basallamina in das angrenzende meningeale Mesenchym auswandern.

In diesem Modell trat die Invasion der Melanomzellen in allen Embryonen am Deckplattenepithel in der dorsalen Mittellinie des embryonalen Rhombenzephalons auf. Interessanterweise war die ventrale, differenzierte Neuralplatte des Rhombenzephalons von der Melanomzellinvasion ausgeschlossen. Diese spezifische Adhäsion der injizierten Melanomzellen an die Deckplatte, unabhängig von der verwendeten Melanomzelllinie, scheint durch spezifische Adhäsionsmoleküle vermittelt zu sein, sowohl an den Melanomzellen als auch am Flimmerepithel der ependymalen Deckplatte. Außerdem scheinen sezernierte Faktoren eine Rolle zu spielen, die eine Zell-Zell-Interaktion mit folgender Invasion erlauben. Dabei kommen auf Melanomzellen exprimierte Chemokinrezeptoren dafür in Betracht, eine entscheidende Funktion bei der organspezifischen Anziehungskraft durch endogene Chemokine und anschließender Anheftung und Überleben zu spielen [5]. Im Hühnerembryo des Stadiums 25HH (E5) werden EAP300 und Claustrin, zwei Barriere-assoziierte Moleküle, in der Deckplatte des sich entwickelnden Rückenmarks und dem Rhombenzephalon exprimiert [49]. Desweiteren werden mehrere Mitglieder der BMP- und Wnt-Familien, beide verantwortlich für die embryonale Differenzierung und Organbildung, während der Entwicklung von Neuralrohr und Rhombenzephalon in der Deckplatte exprimiert. In der Maus geschieht dies im Stadium E11,5 und im Hühnerembryo im Stadium 14-16HH (E2,5) [50], also zeitlich unmittelbar nach Injektion der Melanomzellen im hier vorgestellten Modell. In Anbetracht der Tatsache, dass die Migration von Melanomzellen *in vivo* durch Blockieren von BMP [29] und *in vitro* durch Blockieren des Wnt-Signalwegs [51] inhibiert werden kann, ist es wahrscheinlich, dass die lokale Expression von BMP und Wnt ein wichtiger Motor der spezifischen Zelladhäsion und Invasion in dieser besonderen Hirnregion ist.

#### **4.4 Bildung eines großen Tumorknotens in der Mittellinie des Dachs des IV. Ventrikels**

Vier Tage nach Injektion (E6) bildeten die Melanomzellen regelmäßig einen massiven, vaskularisierten Tumorknoten aus. Diese Zeitspanne zwischen Injektion und Tumorstadium ist wesentlich kürzer als in entsprechenden Mausmo-

dellen. Insofern stellt der Hühnerembryo ein verkürztes Modell experimenteller Melanommetastasierung in Mäusen dar.

Der Tumor zerstört vollständig die dorsale Deckplatte, dringt in das umgebende mesenchymale Gewebe ein und ragt in die Liquorhöhle hervor. Dabei geht der zentrale Tumorknoten wohl eher aus einer Aggregation der Melanomzellen hervor als aus klonaler Proliferation einzelner eingewanderter Melanomzellen. Eine solche Aggregation von Melanomzellen zwischen 48 und 96 Stunden nach Injektion trat nicht nur im zentralen Tumor auf, sondern auch in frei im Liquor treibenden Aggregaten. Sie bedingte wohl die runde, ballförmige Form des Tumorknotens. Der große zentrale Tumor wurde durch Kapillaren des Hühnerembryos vaskularisiert, die kernhaltige embryonale Erythrozyten enthielten. Folglich scheinen die Melanomzellen in dieser embryonalen Umgebung VEGF zu produzieren und gut an die erhöhte O<sub>2</sub>-Bindekapazität von embryonalem Hämoglobin angepasst zu sein. Erhöhte Spiegel von VEGF lassen sich auch im Serum von Melanompatienten im Stadium IV finden [52].

### **4.5 Sekundäre Invasion und Streuung von Melanomzellen**

Von dem zentralen Tumor aus trat eine sekundäre Invasion des meningealen Mesenchyms und der Blutgefäße auf. Diese Beobachtung, die sich mit frühen Stadien der Tumorstreuung deckt, wurde wiederholt in allen Embryonen zwei oder vier Tage nach Injektion gemacht. In murinen Metastasenmodellen ist die genaue Untersuchung von einzelnen auswandernden Zellen zu einem solch frühen Zeitpunkt nicht möglich. Die positive anti-MIB1-Färbung nahezu aller einzelnen migrierenden Melanomzellen deutet an, dass bei ihnen sowohl der funktionale Status amöboider Bewegung als auch der der Proliferation angeschaltet wurden. Sekundäre Auswanderung fand sich auch entlang von Nervenfasern, was darauf hinweisen könnte, dass die Schwann-Zellen von den Melanomzellen spezifisch als eine Art Anhaltspunkte für die Orientierung genutzt werden. Während der retrograden Invasion des differenzierten Neuroepithels am Boden des Rhombenzephalon mussten die einzelnen Melanomzellen die Basallamina durchbrechen.

In embryonalen Mäusen proliferieren Neuralleistenzellen während der Migration im Mesenchym des Darms und differenzieren sich zu Neuronen und Glia [53]. Gleichmaßen offenbarte die Immunhistochemie im hier vorgestellten Modell eine Proliferation in etwa 90% der invasiv wachsenden Melanomzellen, was ein Verhalten der migrierenden Melanomzellen ähnlich dem der embryonalen Neuralleistenzellen andeutet.

#### **4.6 Spezifisches Verhalten unterschiedlicher Melanomzelllinien**

Verschiedene an die dorsale Deckplatte angeheftete Melanomzellen durchbrachen das Epithel und bildeten Tumoren. Das Ausmaß des Tumorwachstums, die Zerstörung des umgebenden Gewebes und der Grad der Auswanderung variierten, waren aber für jede verwendete Melanomzelllinie konstant. Alle metastatischen Zelllinien und auch die primären (metastatischen) PIH-Zellen bildeten massive Tumorknoten mit beginnender Nekrosebildung im Zentralbereich. Diese zentrale Nekrose war in den PIH-Tumorknoten (frisch isolierte, in Kurzzeitkultur gehaltene Zellen aus einer Melanomhirnmetastase) am stärksten ausgeprägt.

Einzelne Melanomzellen und Gruppen von Melanomzellen drangen in die umgebenden embryonalen Gewebe ein. Dieses invasive Verhalten war am ausgeprägtesten in BLM-Zellen, welche über nervale und vaskuläre Strukturen in den Wirt eindringen. Retrograde Invasion des ventralen Neuroepithels wurde nur in Embryonen beobachtet, denen BLM-Zellen injiziert worden waren. Vaskuläre Infiltration war besonders ausgeprägt in BLM-, SKMEL28- und M14-Zellen. Ein Einbau in das Oberflächen-Ektoderm wurde in Embryonen beobachtet, denen SKMEL28-Zellen injiziert worden waren. Die (VGP) WM115-Zellen bildeten eher abgegrenzte, proliferierende Tumorknoten aus, die mit herabgesetzter Invasion weniger Zerstörung des Wirtsgewebes verursachten. Eine vaskuläre Infiltration wurde bei WM115-Zellen nicht beobachtet. Die (RGP) SBCL2-Zellen bildeten klar abgegrenzte Tumoren mit nur geringgradiger Destruktion des angrenzenden Wirtsgewebes aus. Obwohl mehr als 90% der SBCL2-Zellen im

Tumorknötchen eine positive anti-MIB1-Färbung zeigten, war die Größe des Tumors signifikant kleiner als in allen anderen eingesetzten Zelllinien. Keine einzelne SBCL2-Zelle infiltrierte das Wirtsgewebe. Die Zellen scheinen in der embryonalen Umgebung die Wachstumsmuster der primären Melanome zu wiederholen, aus denen sie ursprünglich isoliert worden sind. Die erfassten Durchmesser der Tumorknoten unterschieden sich zwischen den einzelnen Zelllinien; interessanterweise bildeten Zellen mit kurzer Verdopplungszeit und schneller Proliferation *in vitro* (BLM, M14) größere Tumoren aus als Zellen, die *in vitro* langsamer proliferieren (SKMEL28, SBCL2), was aufzeigt, dass die embryonale *in vivo*-Umgebung keinen Einfluss auf die Zell-spezifische intrinsische Verdopplungszeit nahm.

### **4.7 Das Clark Modell**

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse bestätigen, dass Melanomzelllinien aus verschiedenen Wachstumsphasen in einem komplexen *in vivo*-Hirnmetastasenmodell ihre spezifischen invasiven Eigenschaften behalten. Dies unterstreicht, dass RGP-, VGP- und metastatische Melanomzellen geeignet sind, um verschiedene Gesichtspunkte der Melanomprogression zu erforschen. Bedenkt man, dass nur eine Zelllinie je charakteristischer Wachstumsphase in dieser Studie verwendet wurde, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass sich andere Zelllinien in dem gleichen experimentellen Umfeld anders verhalten.



## 5 Zusammenfassung

Für die vorliegende Arbeit und die daraus entstandenen Publikationen wurden unterschiedliche Anwendungsbereiche des Hühnerembryo-Modells für die Melanomforschung im Detail herausgearbeitet und in einem zweiten Schritt in experimentellen Studien angewendet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen sich in unterschiedlichen Mikrokompartimenten (Neuralrohr, Augenbecher, Rhombencephalon) des Hühnerembryos unterschiedlich verhalten. Des Weiteren ließen sich anhand der embryonalen Mikrokompartimente die physiologische (Neuralleisten-) Migration von der pathologischen Invasion unterscheiden. Mit Hilfe unterschiedlicher Experimentalserien war es somit möglich, Unterschiede im malignen Wachstum von Melanomzellen herauszuarbeiten und zu zeigen, dass Melanomzellen aus verschiedenen Wachstumsphasen ihr abgestuftes Invasionspotential auch *in vivo* im Rhombencephalon-Modell aufrechterhalten.

Das maligne Melanom hat von allen primären Neoplasien des Erwachsenen die höchste Neigung in das Gehirn zu metastasieren. In dieser Arbeit werden invasives Wachstum und die Bildung von Melanommetastasen aus Suspensionen humaner Melanomzellen im Gehirn von Hühnerembryonen beschrieben. Melanozyten leiten sich von der embryonalen Neuralleiste ab. Nach Transplantation in die Neuralleiste nehmen Melanomzellen die Neuralleistenwanderung entlang des medialen und des lateralen Weges wieder auf und sterben in den Zielregionen, in denen sie sich terminal differenzieren müssten, durch Apoptose. Nach Injektion von Melanomzellen in ektope Gebiete wie das Rautenhirn oder den Augenbecher treten maligne Invasion und lokale Gewebedestruktion auf.

Frisch isolierte Melanomzellen aus Metastasen betroffener Patienten ebenso wie etablierte Melanomzelllinien wurden in die Rhombencephalon-Blase von zwei Tage alten Hühnerembryonen gespritzt. 48 bzw. 96 Stunden später wurde die Tumorentwicklung untersucht, indem Paraffin-Serienschnitte mit dem Melanom-spezifischen HMB45- und dem human-spezifischen anti-MIB1-Proliferationsmarker gefärbt wurden. Der Großteil der in die embryonale Liquorhöhle inji-

zierten Zellen ging nach der Injektion spontan zugrunde. Nur in neugeformten Aggregaten oder wenn sie der dorsalen Deckplatte anhefteten, entkamen die injizierten Melanomzellen der Apoptose. Eine lokale Invasion trat nur im Bereich dieser Deckplatte auf, nicht jedoch im sich ventral differenzierenden Neuroepithel.

Obwohl nach 48h die Melanomzellen zu beiden Seiten breitflächig in die Deckplatte des Rhombenzephalons einwanderten, fand sich nach 96h typischerweise ein großer Tumorknoten, der sich in der Mittellinie zwischen Deckplatte und dorsalem Oberflächenepithel ausgebildet hatte. Von diesem Tumor ausgehend wanderten einzelne Melanomzellen in das Mesenchym und in Blutgefäße ein. Verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen invasiven Eigenschaften behielten dabei ihr jeweiliges Invasionspotential bei. Maximal invasive Zellen (BLM-Zellen) bildeten kontinuierliche Pfade über Blutgefäße und entlang von Nervenfasern.

Dieser zentrale Tumor in der Deckplatte des Hühner-Rhombenzephalons ähnelt einer Metastase in Melanompatienten. Penetration des Deckplattenepithels, Tumorformation und Invasion von umgebenden Geweben durch einzelne Zellen sind zuverlässig reproduzierbar. Das Hühnerembryomodell kann daher für molekulare Studien der frühen Phasen der Hirnmetastasierung eines Melanoms verwendet werden.

Das embryonale Hühnermodell erlaubt die Unterscheidung von physiologischer und invasiver Migration von Melanomzellen in besonderen embryonalen Kompartimenten sowie die Beeinflussung von injizierten Melanomzellen durch Vorbehandlung der Zellen. Die einfache Handhabung, der günstige Preis, die ethische Unbedenklichkeit und die herausragenden Möglichkeiten zur Manipulation mit guter Reproduzierbarkeit machen aus dem Hühnerembryo daher ein ausgezeichnetes *in vivo*-Modell für die Melanomforschung. Es kann beispielsweise dazu verwendet werden, durch embryonale Onkogene induziertes invasives Verhalten zu untersuchen, oder aber auch zur gezielten Manipulation von Melanomzellen mit dem Ziel, invasive Eigenschaften zu entfernen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Garbe, C., et al., *Treatment of melanoma*. Dtsch Arztebl Int, 2008. **105**(49): p. 845-51.
2. Garbe, C., et al., *Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline*. Eur J Cancer, 2010. **46**(2): p. 270-83.
3. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
4. Eigentler, T.K., et al., *Number of metastases, serum lactate dehydrogenase level, and type of treatment are prognostic factors in patients with brain metastases of malignant melanoma*. Cancer, 2011. **117**(8): p. 1697-703.
5. Cranmer, L.D., et al., *Rodent models of brain metastasis in melanoma*. Melanoma Res, 2005. **15**(5): p. 325-56.
6. Bafaloukos, D. and H. Gogas, *The treatment of brain metastases in melanoma patients*. Cancer Treat Rev, 2004. **30**(6): p. 515-20.
7. A. Pflugfelder, C.K., C. Czeschik, D. Schadendorf, C. Garbe *S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms“*. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V., 2013. **Kurzversion 1.1 - Februar 2013**.
8. Miller, A.J. and M.C. Mihm, Jr., *Melanoma*. N Engl J Med, 2006. **355**(1): p. 51-65.
9. Sousa, J.F. and E.M. Espreafico, *Suppression subtractive hybridization profiles of radial growth phase and metastatic melanoma cell lines reveal novel potential targets*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 19.
10. Degenhardt, Y., et al., *Distinct MHC gene expression patterns during progression of melanoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2010. **49**(2): p. 144-54.
11. Greene, V.R., et al., *Frequencies of NRAS and BRAF mutations increase from the radial to the vertical growth phase in cutaneous melanoma*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(6): p. 1483-8.
12. Bar-Eli, M., *Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor*. Pigment Cell Res, 2001. **14**(2): p. 78-85.
13. Meier, F., et al., *Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF*. Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 193-200.
14. Meier, F., et al., *Fibroblast growth factor-2 but not Mel-CAM and/or beta3 integrin promotes progression of melanocytes to melanoma*. Exp Dermatol, 2003. **12**(3): p. 296-306.
15. Sturm, R.A., et al., *Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta(3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells*. Cancer Res, 2002. **62**(1): p. 226-32.
16. Soo, J.K., et al., *Malignancy without immortality? Cellular immortalization as a possible late event in melanoma progression*. Pigment Cell Melanoma Res, 2011. **24**(3): p. 490-503.
17. Kuphal, S. and A.K. Bosserhoff, *Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma*. Oncogene, 2006. **25**(2): p. 248-59.

18. Flaherty, K.T., et al., *Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(9): p. 809-19.
19. Hoek, K.S., et al., *In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states*. Cancer Res, 2008. **68**(3): p. 650-6.
20. Liu, Z.J., et al., *Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and up-regulating N-cadherin expression*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 4182-90.
21. Topczewska, J.M., et al., *Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness*. Nat Med, 2006. **12**(8): p. 925-32.
22. Rothhammer, T., et al., *Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration*. Cancer Res, 2005. **65**(2): p. 448-56.
23. Hay, E.D., *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it*. Dev Dyn, 2005. **233**(3): p. 706-20.
24. Newgreen, D.F. and J. Minichiello, *Control of epitheliomesenchymal transformation. I. Events in the onset of neural crest cell migration are separable and inducible by protein kinase inhibitors*. Dev Biol, 1995. **170**(1): p. 91-101.
25. Le Douarin, N., <<The>> neural crest. Developmental and cell biology. 1982, Cambridge u.a.: Cambridge Univ. Pr. XI, 259 S.
26. Bailey, J.M., P.K. Singh, and M.A. Hollingsworth, *Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins*. J Cell Biochem, 2007. **102**(4): p. 829-39.
27. Landsberg, J., et al., *Autochthonous primary and metastatic melanomas in Hgf-Cdk4 R24C mice evade T-cell-mediated immune surveillance*. Pigment Cell Melanoma Res, 2010. **23**(5): p. 649-60.
28. Sinnberg, T., et al., *Suppression of casein kinase Ialpha in melanoma cells induces a switch in beta-catenin signaling to promote metastasis*. Cancer Res, 2010. **70**(17): p. 6999-7009.
29. Schackert, G., et al., *Regional growth of different human melanomas as metastases in the brain of nude mice*. Am J Pathol, 1990. **136**(1): p. 95-102.
30. Francia, G., et al., *Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(2): p. 135-41.
31. Rakers, S., et al., *'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology*. Exp Dermatol, 2010. **19**(4): p. 313-24.
32. Becker, J.C., et al., *Mouse models for melanoma: a personal perspective*. Exp Dermatol, 2010. **19**(2): p. 157-64.
33. Nishikawa, K., et al., *Experimental model for predicting metastatic ability of tumors using chick embryo*. Jpn J Clin Oncol, 1987. **17**(4): p. 319-25.
34. Chambers, A.F., R. Shafir, and V. Ling, *A model system for studying metastasis using the embryonic chick*. Cancer Res, 1982. **42**(10): p. 4018-25.
35. Luyten, G.P., et al., *A chicken embryo model to study the growth of human uveal melanoma*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **192**(1): p. 22-9.
36. Schriek, G., et al., *Human SK-Mel 28 melanoma cells resume neural crest cell migration after transplantation into the chick embryo*. Melanoma Res, 2005. **15**(4): p. 225-34.

37. Oppitz, M., et al., *Non-malignant migration of B16 mouse melanoma cells in the neural crest and invasive growth in the eye cup of the chick embryo*. Melanoma Res, 2007. **17**(1): p. 17-30.
38. Busch, C., et al., *Neural crest cell migration of mouse B16-F1 melanoma cells transplanted into the chick embryo is inhibited by the BMP-antagonist noggin*. Int J Oncol, 2007. **31**(6): p. 1367-78.
39. Busch, C., et al., *Noggin blocks invasive growth of murine B16-F1 melanoma cells in the optic cup of the chick embryo*. Int J Cancer, 2008. **122**(3): p. 526-33.
40. Mancianti, M.L., et al., *Growth and phenotypic characteristics of human nevus cells in culture*. J Invest Dermatol, 1988. **90**(2): p. 134-41.
41. Sinnberg, T., et al., *Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(6): p. 1500-15.
42. Drews, U., C. Ebensperger, and U. Wolf, *An in vitro model of gonad differentiation in the chick embryo. Roller cultures in gas permeable biofoil bags*. Anat Embryol (Berl), 1988. **178**(6): p. 529-36.
43. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951*. Dev Dyn, 1992. **195**(4): p. 231-72.
44. Busch, C., J. Krochmann, and U. Drews, *The chick embryo as an experimental system for melanoma cell invasion*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53970.
45. Just, L., et al., *Identification of human cells in brain xenografts and in neural co-cultures of rat by in situ hybridisation with Alu probe*. J Neurosci Methods, 2003. **126**(1): p. 69-77.
46. Rottner, K., et al., *VASP dynamics during lamellipodia protrusion*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(5): p. 321-2.
47. Busch, C., J. Krochmann, and U. Drews, *Human melanoma cells in the rhombencephalon of the chick embryo: a novel model for brain metastasis*. Exp Dermatol, 2012. **21**(12): p. 944-7.
48. Krochmann, J., et al., *Melanoma cells in distinct growth phases retain specific invasive qualities during brain metastasis in vivo*. Pigment Cell Melanoma Res, 2012. **25**(1): p. 113-4.
49. McCabe, C.F. and G.J. Cole, *Expression of the barrier-associated proteins EAP-300 and claustrin in the developing central nervous system*. Brain Res Dev Brain Res, 1992. **70**(1): p. 9-24.
50. Chizhikov, V.V. and K.J. Millen, *Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system*. Dev Biol, 2005. **277**(2): p. 287-95.
51. Sinnberg, T., et al., *beta-Catenin signaling increases during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23429.
52. Redondo, P., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and melanoma. N-acetylcysteine downregulates VEGF production in vitro*. Cytokine, 2000. **12**(4): p. 374-8.
53. Fu, M., et al., *Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut*. J Cell Biol, 2004. **166**(5): p. 673-84.