

Frauenklinik der Technischen Universität München,
Klinische Forschergruppe

Biologische Effekte der
Spleißvariante des Tumorsuppressors KAI1 (CD82)
auf die Integrin $\alpha\beta_3$ /Vitronektin-vermittelte Adhäsion und
Proliferation humaner Ovarialkarzinomzellen

Alexandra Lisa Karle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. U. Reuning
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt

Die Dissertation wurde am 03.04.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.05.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das Tetraspanin KAI1 – ein putativer Metastasierungssuppressor	2
1.1.1 Das Tetraspanin KAI1	2
1.1.2 Die Bedeutung des KAI1 in Tumoren	4
1.1.3 Interaktionspartner des Tetraspanins KAI1	5
1.2 Die Superfamilie der Integrine	7
1.2.1 Integrine	7
1.2.2 Die tumorbiologische Rolle der Integrine am Beispiel des Integrins $\alpha\beta_3$	10
1.2.3 Interaktionen zwischen KAI1 und Integrinen	11
1.3 Alternatives Spleißen und der Funktionsverlust des KAI1 in Tumoren	13
1.4 Das humane Ovarialkarzinom als experimentelles Zellmodell	15
1.4.1 Die Metastasierung des Ovarialkarzinoms	15
1.4.2 Die Rolle des Integrins $\alpha\beta_3$ im humanen Ovarialkarzinom	16
1.4.3 Die Rolle des KAI1 im humanen Ovarialkarzinom.....	18
2 Zielsetzung	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Reagenzien und Materialien.....	21
3.1.1 Zellmodell.....	21
3.1.2 Zellkultur.....	22
3.1.3 Stabile Zelltransfektion	23

3.1.4	Proteinbestimmung, SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot-Analyse	23
3.1.5	Durchflusszytometrie.....	24
3.1.6	Immunzytochemie	24
3.1.7	Zellbiologische Assays	24
3.1.8	Antikörper.....	24
3.1.9	Matrixproteine	25
3.1.10	Geräte und Software	25
3.1.11	Verbrauchsmaterialien	26
3.2	Methoden	27
3.2.1	Zellkultur.....	27
3.2.2	Stabile Transfektion humaner Ovarialkarzinomzellen	28
3.2.3	Isolierung individueller, stabil transfizierter Zellklone mit unterschiedlicher KAI1-WT/KAI1-Splice-Oberflächenexpression	29
3.2.4	Immunzytochemie und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	30
3.2.5	Durchflusszytofluorometrie.....	31
3.2.6	Westernblot.....	32
3.2.7	Nachweis der Zell-Matrix-Adhäsionseigenschaften mittels eines In-vitro-Zelladhäsionsassays.....	38
3.2.8	Untersuchung der Proliferationsaktivität KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierter OV-MZ-6-Zellen mithilfe eines In-vitro-MTT-Assays	39
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Charakterisierung stabil KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-transfizierter OV-MZ-6-Ovarialkarzinomzellen	41
4.1.1	Nachweis der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe in stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen mittels Westernblot Analyse und Durchflusszytofluorometrie.....	41
4.1.2	Nachweis der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression in stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen mittels Durchflusszytofluorometrie	46

4.1.3	Charakterisierung der KAI1-WT/KAI1-Splice-Expression in transfizierten OV-MZ-6-Zellen durch Immunzytochemie und Auswertung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop	46
4.2	Ermittlung der Adhäsionskapazität KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-transfizierter OV-MZ-6-Zellen mittels eines In-vitro-Zelladhäsionstests.....	49
4.2.1	Adhäsionskapazität von KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierten WT-OV-MZ-6-Zellen	50
4.2.2	Ermittlung der Adhäsionskapazität von KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierten, Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen	52
4.3	Untersuchung der Proliferationsaktivität KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-transfizierter OV-MZ-6-Zellen	55
5	Diskussion	57
5.1	Etablierung eines KAI1-Splice-exprimierenden Zellmodells	58
5.2	Zellbiologische Effekte in humanen Ovarialkarzinomzellen als Funktion der Expression der KAI1-Spleißvariante	59
5.3	Welche Relevanz ist für KAI1-Splice im Hinblick auf das Ovarialkarzinom vorstellbar?	64
6	Zusammenfassung.....	66
7	Literaturverzeichnis	67
8	Danksagung.....	77

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AK	Antikörper
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ED	Extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fötale Kälberserum
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FN	Fibronektin
GAM	<i>Growth arrest medium</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperazin]ethanolsulfonsäure
ICC	Immunzytochemie
Ig	Immunglobulin
KAI1-Splice	Spleißvariante des KAI1
KAI1-WT	Wildtyp-KAI1
KITENIN	<i>KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin</i>
LEL	Große extrazelluläre Schleife
mAK	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGD	Zelladhäsionssequenz L-Arginin-L-Glycin-L-Aspartat
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEL	Kleine extrazelluläre Schleife
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEM	Tetraspaninreiche Mikrodomäne
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranregion
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
VEC	Vektor
VN	Vitronektin
WT	Wildtyp
WT OV-MZ-6-Zellen	OV-MZ-6-Wildtypzellen
WT-KAI1-Splice	KAI1-Splice-transfizierte OV-MZ-6-Wildtyp-Zellen
WT-KAI1-WT	KAI1-WT-transfizierte OV-MZ-6-Wildtypzellen
WT-Vektor	OV-MZ-6-Wildtypzellen, die mit dem Expressionsvektor ohne cDNA-Insert transfiziert worden waren
$\alpha\beta 3$ -KAI1-Splice	Integrin $\alpha\beta 3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen, die mit KAI1-Splice-cDNA transfiziert worden waren
$\alpha\beta 3$ -KAI1-WT	Integrin $\alpha\beta 3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen, die mit KAI1-WT-cDNA transfiziert worden waren
$\alpha\beta 3$ -Vektor	Integrin $\alpha\beta 3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen, die mit dem Expressionsvektor ohne cDNA-Insert transfiziert worden waren

1 Einleitung

Ein wichtiger Prozess bei der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms ist auf zellbiologischer Ebene die Interaktion der Tumorzelle mit der extrazellulären Matrix (EZM). Hierbei sind die Wechselwirkungen zwischen den Adhäsions- und Signaltransduktionsrezeptoren der Superfamilie der Integrine und ihren EZM-Liganden von besonderer Bedeutung für die zelladhäsiven Phänomene im Ovarialkarzinom (Tan et al., 2006).

Ovarialkarzinomzellen exprimieren sowohl eine Reihe von Integrinen der β_1 -Subfamilie als auch die Integrine $\alpha\beta_3$ und $\alpha_6\beta_4$ (Carreiras et al., 1999). Darüber hinaus sind sie in der Lage Vitronektin (VN) zu synthetisieren (Carreiras et al., 1999; Reuning, 2011). Die Interaktion des Integrin $\alpha\beta_3$ mit seinem Liganden VN ist u.a. für die Adhäsion zirkulierender Ovarialkarzinomzellen verantwortlich und trägt so zur Implantation metastasierender Zellen auf dem peritonealen Mesothel bei (Carreiras et al., 1999; Heyman et al., 2008).

Zwischen den Familien der Integrine und der Tetraspanine gibt es physikalische und funktionelle Wechselwirkungen (Boucheix und Rubinstein, 2001). Tetraspanine sind biologisch bedeutsame Membranproteine, die innerhalb ihrer Transmembranregionen hoch konservierte Aminosäurereste aufweisen. Sie sind an vielen intra- und interzellulären Prozessen beteiligt und spielen z.B. in der Tumor- und Immunbiologie eine wichtige Rolle (Bienstock und Barrett, 2001). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das Tetraspanin KAI1 (CD82) modulierend auf die Funktion zahlreicher β_1 -Integrine wirkt und so zellbiologische Prozesse wie die Zell-Zelladhäsion und Zellmigration beeinflusst (Lee et al., 2011a; Takaoka et al., 1998b; Liu et al., 2003b). Ruseva und Mitarbeiter konnten erstmals eine funktionelle und physikalische Interaktion des KAI1 mit dem Integrin $\alpha\beta_3$ nachweisen. In diesem Zusammenhang zeigten sie, dass die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zell-EZM-Adhäsion, Zellmigration und -proliferation durch den Tumorsuppressor KAI1 beeinflusst werden (Ruseva et al., 2009).

Ein Verlust von Tumorsuppressoren, wie beispielweise des Tetraspanins KAI1, trägt zur Progression des Ovarialkarzinoms bei (Liu et al., 2000). So konnte der KAI1-Expression auch im Ovarialkarzinom eine prognostische Bedeutung nachgewiesen werden (Schindl et al., 2001b; Romanska und Berditchewski, 2011). Bislang sind die Ursachen eines Funktions- bzw. Expressionsverlustes des KAI1 im Ovarialkarzinom jedoch nicht geklärt.

Im Magenkarzinom wurde erstmals eine Spleißvariante des KAI1, KAI1-Splice, beschrieben, welche funktionelle Unterschiede im Hinblick auf das Metastasierungspotenzial *in vivo* sowie auf zelladhäsive und zellproliferative Prozesse *in vitro* aufwies (Lee et al., 2003b).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der Expression des KAI1-Splice im Vergleich zur Expression des KAI1-Wildtyp (KAI1-WT) in Bezug auf die Funktion des Integrin $\alpha\beta_3$ in humanen Ovarialkarzinomzellen untersucht. Dabei standen vor allem funktionelle Unterschiede zwischen KAI1-Splice und KAI1-WT in Hinblick auf die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion und Zellproliferation im Fokus.

Im Folgenden wird deshalb auf den Metastasierungssuppressor KAI1, Integrine als Interaktionspartner des KAI1, dessen Spleißvariante KAI1-Splice und die für das Ovarialkarzinom spezifische Metastasierung näher eingegangen.

1.1 Das Tetraspanin KAI1 – ein putativer Metastasierungssuppressor

1.1.1 Das Tetraspanin KAI1

Nach heutigem Kenntnisstand handelt es sich bei dem Tetraspanin KAI1 um einen in vielen soliden Organen vorkommenden putativen Tumorsuppressor. Da KAI1 ein sogenanntes *cluster of differentiation* Antigen ist, findet man in der Literatur als Synonym für KAI1 auch die Bezeichnung CD82 (Miranti, 2009). In dieser Arbeit wird einheitlich die Bezeichnung KAI1 verwendet. Der Name KAI1 geht auf das chinesische Wort *kang ai* zurück und steht für *anticancer* (Dong et al., 1995).

KAI1 gehört zur Familie der Tetraspanine (Jackson et al., 2005). Diese besteht aus einer Gruppe evolutionär bedeutsamer Membranproteine, welche innerhalb ihrer vier Transmembranregionen hochkonservierte Aminosäurereste aufweisen (Bienstock und Barrett, 2001). Tetraspanine sind an zahlreichen intra- sowie interzellulären Interaktionen beteiligt und ubiquitär im menschlichen Organismus anzutreffen (Miranti, 2009). Funktionell spielen Tetraspanine in zahlreichen zellbiologischen Prozessen z.B. im Rahmen der Tumor- oder Immunbiologie eine Rolle (Levy und Shoham, 2005b, 2005a; Boucheix und Rubinstein, 2001).

Das humane KAI1-Gen wurde erstmals von Dong und Mitarbeitern auf dem Chromosom 11p11.2-13 identifiziert und als Tumorsuppressor-Gen in einem Rattenzellmodell des Prostatakarzinoms beschrieben (Dong et al., 1995). Es besteht aus 10 Exons und 9 Introns und beinhaltet ca. 80 kb DNA. Die Größe der Exons reicht von 73 bp (Exon 4) bis zu mehr als 715 bp (Exon 10). Exon 1, 2 und Teile von Exon 3 kodieren für das nicht-translatierte 5'-Ende des KAI1-Gens. Die Region, die für das KAI1-Protein kodiert, beginnt mit Base 25 des Exons 3 und endet mit Base 75 des Exons 10. Ein weiterer Teil des Exons 10 kodiert für das untranslatierte 3'-Ende. Die Größe der Introns variiert zwischen 29 kb (Intron 1) und 0,2 kb (Intron 5) (Dong et al., 1997). Wie sich in Dongs Studie herausstellte, ist das KAI1-Gen mit cDNA-Klonen (R2, C33, IA4) aus humanen Lymphozyten identisch, die bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben

worden waren (Dong et al., 1995; Imai et al., 1992; Gaugitsch et al., 1991; Gil et al., 1992).

Das KAI1-Protein besteht aus 267 Aminosäuren und verfügt über einen für alle Tetraspanine typischen Proteinaufbau mit vier Transmembranregionen (TM). Dabei begrenzen die TM 1 und 2 die sogenannte kleine extrazelluläre Schleife (*small extracellular loop*, SEL), TM 3 und 4 die große extrazelluläre Schleife (*large extracellular loop*, LEL) (Abb. 1). Zwischen den Transmembranregionen 2 und 3 befindet sich eine zytoplasmatisch gelegene Schleife. Das aminotermine und das carboxyterminale Ende befinden sich im Zytoplasma (Levy und Shoham, 2005a).

Die LEL des KAI1-Proteins weist unter den Tetraspaninen die größte Varianz auf und wird von 76–131 Aminosäuren gebildet (Liu und Zhang, 2006; Bienstock und Barrett, 2001). Sie enthält charakteristische Cystein-Cystein-Glycin-Motive, die für die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken mit anderen Cysteinresten innerhalb der LEL verantwortlich sind. Bei allen Tetraspaninen, mit Ausnahme von CD81 und CD9, findet man in der LEL potenzielle Stellen, an denen das Protein N-glykosyliert bzw. phosphoryliert werden kann (Levy und Shoham, 2005a; Liu und Zhang, 2006). Bei KAI1 konnten drei N-Glykosylierungsstellen in der LEL an den Asparaginresten Asn129, Asn157 und Asn198 identifiziert werden (Wang et al., 2011). Aufgrund dieser Glykosylierung weist die Molekularmasse des KAI1 eine Variationsbreite zwischen 46 und 60 kDa auf und nicht die Molekularmasse von 28 kDa, die durch den reinen Aminosäuregehalt des Proteins ermittelt werden kann (White et al., 1998).

Die SEL besteht aus 20–28 Aminosäuren (Boucheix und Rubinstein, 2001).

Charakteristisch für Tetraspanine sind ebenfalls hochkonservierte zytoplasmatische Cysteinreste, die oft in palmitoylierter Form vorliegen (Liu und Zhang, 2006; Zoller, 2009).

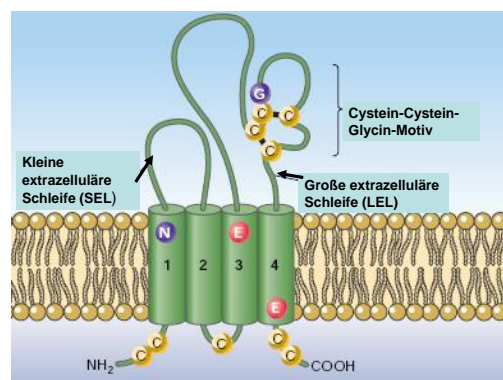


Abb. 1: Strukturelle Eigenschaften der Familie der Tetraspanine.

Tetraspanine besitzen vier TM, die LEL und die SEL und eine zytoplasmatisch gelegene Schleife. In der LEL befinden sich Cystein-Cystein-Glycin-Motive, die an der Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt sind. Das aminotermine und das carboxyterminale Ende befinden sich im Zytoplasma. Dort findet man auch hochkonservierte Cysteinreste als potenzielle Stellen einer Palmitoylierung (verändert nach Levy und Shoham, 2005a).

1.1.2 Die Bedeutung des KAI1 in Tumoren

In vielen soliden Tumoren, wie z.B. dem Prostata-, dem Pankreas-, dem Magen-, dem Mamma-, dem Endometrium-, dem Zervix-, und dem Blasenkarzinom, sowie in oralen, hepatozellulären und kolorektalen Karzinomen ist der Verlust der KAI1-Expression für die Tumorprogression und die Metastasierung von Bedeutung (Romanska und Berditshevski, 2011; Christgen et al., 2009; Guo et al., 1996; Dong et al., 1995; Guo et al., 2000; Friess et al., 1998; Guo et al., 1998; Guan-Zhen et al., 2007; Lombardi et al., 1999; Yang et al., 2000; Liu et al., 2003a; Liu et al., 2001; Uzawa et al., 2002; White et al., 1998; Jackson et al., 2000a).

Die KAI1-Expression korreliert bei vielen dieser Tumore mit einem längeren krankheitsfreien Intervall und somit mit einem besseren Gesamtüberleben der Patienten (Higashiyama et al., 1998; Adachi et al., 1996; Liu et al., 2003a; Schindl et al., 2001b; Malik et al., 2009a). KAI1 konnte daher eine prognostische Bedeutung zugesprochen werden (Romanska und Berditshevski, 2011).

In vivo konnte ein suppressiver Einfluss des KAI1 auf das Metastasierungspotential unterschiedlicher Tumore gezeigt werden. So ist eine erhöhte KAI1-Expression beispielsweise im Kolon-, Mamma- und Pankreaskarzinom sowie im malignen Melanom im Tiermodell mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von Tumormetastasen assoziiert (Takaoka et al., 1998a; Takaoka et al., 1998b; Yang et al., 2001; Xu et al., 2008).

In vitro zeigten KAI1-exprimierende Zellen in verschiedenen Zellmodellen eine verstärkte Zell-Zell-Aggregation (Liu et al., 2003b; Takaoka et al., 1998a) und eine verminderte Invasivität (Takaoka et al., 1998b; Yang et al., 2001), Migration (Malik et al., 2009b; Takaoka et al., 1998b; Ruseva et al., 2009; Ono et al., 1999) und Proliferation (Ruseva et al., 2009). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass KAI1 die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion in humanen Ovarialkarzinomzellen verstärkt (Ruseva et al., 2009) sowie die Zelladhäsion an Fibronectin (FN) in Prostata- und Colonkarzinomzellen vermindert (Lee et al., 2003b; Takaoka et al., 1998b). Nachweislich spielt KAI1 auch eine wichtige Rolle bei der Apoptoseinduktion in Tumorzellen (Ono et al., 1999).

Über welchen Mechanismus KAI1 auf für die Metastasierung wichtige zellbiologische Prozesse Einfluss nimmt, ist noch nicht vollständig geklärt. Bislang konnten für KAI1 keine intrinsischen Aktivitäten nachgewiesen werden. Es wird daher vermutet, dass Protein-Protein-Interaktionen für die Vermittlung der Effekte verantwortlich sind (Liu und Zhang, 2006).

1.1.3 Interaktionspartner des Tetraspanins KAI1

Eine gemeinsame Eigenschaft aller Vertreter der Tetraspanin-Superfamilie, so auch des Tetraspanins KAI1, ist die Fähigkeit, laterale Zusammenschlüsse mit Interaktionspartnern, z.B. Integrinen, Immunglobulinen, Cadherinen oder anderen Tetraspaninen, einzugehen (Yunta und Lazo, 2003). Ein Tetraspanin kann mehrere solcher Verbindungen eingehen. Der resultierende dynamische Verbund mehrerer Tetraspanine untereinander wird als *tetraspanin web* bezeichnet (Levy und Shoham, 2005a).

Innerhalb des *tetraspanin web* unterscheidet man verschiedene Organisationsebenen und Interaktionstypen, welche durch Koimmunpräzipitationsstudien ermittelt wurden (Charrin et al., 2003; Charrin et al., 2009; Yunta und Lazo, 2003; Hemler, 2001):

Unter Typ-I-Interaktionen versteht man Interaktionen eines bestimmten Tetraspanins mit einem Nicht-Tetraspanin. Hierbei handelt es sich um direkte Interaktionen. Diese Nicht-Tetraspanine werden aus diesem Grund als „Partnerproteine“ des jeweiligen Tetraspanins bezeichnet (Charrin et al., 2009). In der Interaktion zwischen Tetraspaninen und ihren Partnerproteinen spielt die LEL eine entscheidende Rolle (Bienstock und Barrett, 2001; Yunta und Lazo, 2003).

Die meisten Tetraspanin/Tetraspanin- und Tetraspanin/Integrin-Interaktionen werden als Typ-II-Interaktionen bezeichnet (Zoller, 2009). Hierbei handelt es sich auch um Interaktionen des Partnerproteins eines bestimmten Tetraspanins mit einem anderen Tetraspanin (Charrin et al., 2009).

Bei Typ-III-Interaktionen handelt es sich um schwache Interaktionen, zum Beispiel mit bestimmten Kinasen (Charrin et al., 2003; Zoller, 2009).

Tetraspanin/Tetraspanin-Interaktionen findet man gehäuft in tetraspaninreichen Mikrodomänen der Zellmembran (*tetraspanin-enriched microdomain*, TEM) (Abb. 2). Sie ermöglichen eine dynamische laterale Organisation der Membran sowie ein Zusammenspiel mit intrazellulären Signalkaskaden oder Strukturen des Zytoskeletts (Levy und Shoham, 2005a; Charrin et al., 2009). Die Palmitoylierung von intrazellulären Cysteinresten wird als essentiell für die Ausbildung des *tetraspanin web* erachtet. Des Weiteren schützt die Palmitoylierung dieser Cysteinreste Tetraspanine vor lysosomaler Degradation und dient als Bindungsstelle für Cholesterol und Ganglioside. Die Assoziation der Tetraspanine mit Cholesterol und Gangliosiden spielt in der Ausbildung der TEM eine wichtige Rolle (Zoller, 2009; Berditchevski et al., 2002).

Für das Tetraspanin KAI1 wurden unterschiedliche Interaktionspartner identifiziert, denen in der Signalübertragung eine bedeutende Rolle zukommt, darunter Wachstumsfaktorrezeptoren wie ErbB2 und EGFR, Immunrezeptoren und Immunglobuline wie das zur Immunglobulinfamilie gehörende EWI, intrazelluläre Signalmoleküle wie die Serin/Threoninkinase (Proteinkinase C- α), Integrine, Cadherine, B-Zell-Rezeptoren wie CD4, CD8 und CD19 und Zytokinrezeptoren (Szollosi et al., 1996; dZhang et al., 2001;

Sridhar und Miranti, 2006; Charrin et al., 2001; Bienstock und Barrett, 2001; Jee et al., 2003; Odintsova et al., 2000; Miranti, 2009; Ruseva et al., 2009).

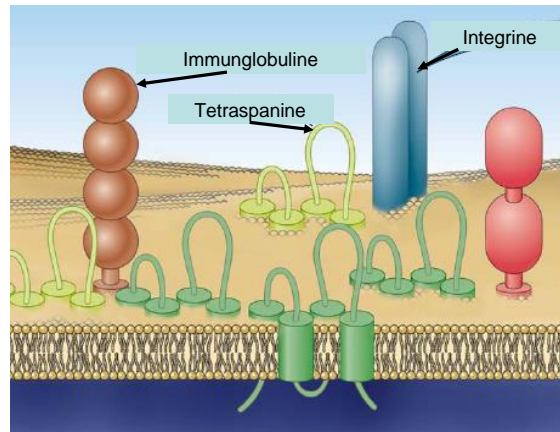


Abb. 2: Tetraspaninreiche Mikrodomäne (TEM).

Schema einer TEM. Dargestellt sind Tetraspanine, die in einer Mikrodomäne der Zellmembran mit verschiedenen Partnerproteinen wie Integrinen und Immunglobulinen interagieren (verändert nach Levy und Shoham, 2005a).

Relevant für die Inhibierung der Zellmigration scheint das EWI2/PGRL aus der Ig-Familie zu sein. EWI2/PGRL wurde sowohl in Komplexen mit den Tetraspaninen CD9 und CD81 als auch mit dem Tetraspanin KAI1 gefunden. EWI2/PGRL selbst wirkt inhibitorisch auf die Zellmigration auf FN- und Laminin-beschichteten Substraten. Im Zusammenschluss mit KAI1 wurde zudem beobachtet, dass es synergistisch mit KAI1 agiert und so mit diesem gemeinsam die Zellmigration inhibiert (Zhang et al., 2003b). Die zyttoplasmatische Domäne des EWI2 stellt eine Bindungsstelle für Aktin-verbundene Ezrin-Radixin-Moesin-Proteine (ERM) dar. Die direkte Interaktion des EWI2 mit diesen ERM fungiert als Verbindung der TEM mit dem Aktinzytoskelett (Salavades et al., 2006). Möglicherweise kontrolliert KAI1 auch die Lokalisierung des EWI2-Proteins, um die Reorganisation des Zytoskeletts im Rahmen der Zellmigration einzugrenzen und so die Zellmotilität zu regulieren (Miranti, 2009).

Für die hämatogene und lymphogene Tumormetastasierung ist die Interaktion der zirkulierenden Tumorzellen mit dem Gefäßendothel von entscheidender Bedeutung. Bandyopadhyay und Mitarbeiter beschrieben in diesem Zusammenhang erstmals den Duffy Antigenrezeptor (DARC) als Interaktionspartner des KAI1. Sie konnten zeigen, dass KAI1 in Anwesenheit von DARC auf der Zelloberfläche der Endothelzellen zu einer Inhibierung der Proliferation und zur Seneszenz zirkulierender Prostatakarzinomzellen führte (Bandyopadhyay et al., 2006). Dies legt nahe, dass DARC für die suppressive Funktion des KAI1 im Zusammenhang mit der hämatogenen und lymphogenen Metastasierung wichtig ist (Iiizumi et al., 2007).

Neben verschiedenen Partnerproteinen gibt es auch andere Mitglieder der Tetraspanin-Familie wie CD9, CD63 und CD81, mit denen KAI1 innerhalb des *tetraspanin web* interagiert (Hammond et al., 1998; Charrin et al., 2001). Es wurde zudem ein neues Tetraspaninmolekül namens KITENIN (*KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin*)

beschrieben, welches sich als Interaktionspartner des KAI1 herausstellte. KITENIN bindet das carboxyterminale Ende des KAI1-Moleküls (Lee et al., 2011b, 2004; Zoller, 2009). In verschiedenen Studien führte die Überexpression von KITENIN so zu einer Steigerung der Zellinvasivität und -adhäsion an FN und zu einer Begünstigung des Tumorwachstums sowie der Ausbildung von Metastasen (Lee et al., 2009; Rowe und Jackson, 2006; Ryu et al., 2010; Lee et al., 2010).

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den Interaktionen des KAI1 mit Vertretern der Integrinfamilie. Diese stellen ebenfalls Partnerproteine des KAI1 dar. Im Folgenden soll als Grundlage zunächst allgemein auf Integrine eingegangen und dann die Rolle der Integrine als Interaktionspartner des KAI1 beleuchtet werden.

1.2 Die Superfamilie der Integrine

1.2.1 Integrine

Integrine sind transmembrane Zelloberflächenrezeptoren, die Glykoproteine der EZM, z.B. FN, VN, Kollagene und Laminin, binden. Die Interaktion der Integrine mit diesen Proteinen der EZM wird u.a. über eine Zelladhäsionssequenz, z.B. Arg-Gly-Asp (RGD), vermittelt, die in einigen EZM-Liganden vorhanden ist (Lawler et al., 1988). Die Bezeichnung „Integrin“ wurde erstmals im Jahr 1986 eingeführt und bringt sowohl die Lokalisierung dieser Membranproteine als auch ihre funktionelle Rolle als Bindeglied zwischen Strukturen der EZM und intrazellulärer Komponenten zum Ausdruck (Tamkun et al., 1986).

Integrine sind Heterodimere, die sich aus einer größeren (150–180 kD) α - und einer kleineren (~90 kD) β -Untereinheit, die nicht-kovalent miteinander verknüpft sind, zusammensetzen (Abb. 3). Es sind 18 verschiedene α - und acht β -Untereinheiten bekannt, die 24 unterschiedliche Heterodimere ausbilden können. Bei beiden Untereinheiten handelt es sich um Typ I Membranproteine (Moser et al., 2009; Xiong et al., 2001). Jede Untereinheit hat eine Transmembranregion, eine kurze C-terminale zytoplasmatische und eine N-terminale extrazelluläre Domäne. Mit Ausnahme der β_4 -Untereinheit mit über 1000 Aminosäuren besteht der zytoplasmatische Teil aus nur ca. 50 Aminosäuren. Die β -Untereinheit beinhaltet vier repetitive Sequenzen, die 40 Aminosäuren und ein cysteinreiches Motiv umfassen. Das aminoternale Ende aller α -Untereinheiten beinhaltet sieben *tandem repeats*, die β -Faltblatt-Strukturen ausbilden. Außerdem findet man bei manchen Integrinen eine sogenannte I-Domäne. In dieser I-Domäne befindet sich eine Bindungsstelle für divalente Kationen (*metal ion-dependent adhesion site*, MIDAS). Divalente Kationen spielen bei der Ligandenbindung eine wichtige Rolle (Bella und Berman, 2000; Moser et al., 2009).

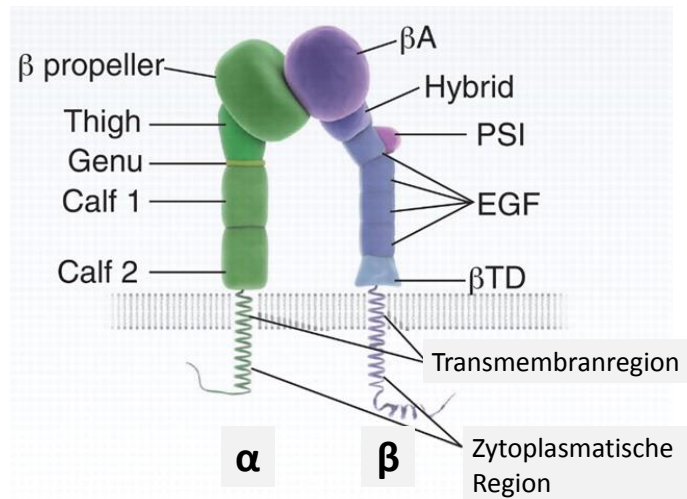


Abb. 3: Struktureller Aufbau eines transmembranen Integrins.

Schematische Darstellung eines Integrins in der Zellmembran. Integrine bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Der Hauptteil des Integrins befindet sich extrazellulär. Hier ist auch das N-terminale Ende des Integrins. Die α -Untereinheit enthält eine siebenblättrige β -Propellerstruktur, welche die Kopfgruppe bildet. Des Weiteren umfasst sie die *tigh*-, *cal1*- und *cal2*-Domäne. Innerhalb der α -Untereinheit gibt es bei den meisten Integrinen auch die I-Domäne, in der sich die Bindungsstelle für divalente Kationen, MIDAS, befindet. Die β -Untereinheit besteht aus der β I-, Hybrid-, PSI-(Plexin/Semaphoring/Integrin)Domäne, vier EGF-Domänen sowie einer membranproximalen β -tail-Domäne (β TD). Die β I-Domäne entspricht der I-Domäne der α -Untereinheit. Zudem umfasst ein Integrin eine Transmembranregion sowie eine kurze zyttoplasmatische Region, wo sich das carboxyterminale Ende des Integrins befindet (verändert nach Moser et al., 2009).

Die α - und β - Bestandteile eines Integrin-Heterodimers befinden sich im Gleichgewicht zwischen einem inaktiven und einem aktiven Zustand. Im inaktiven Zustand sind die α - und β -Heterodimere abgewinkelt (*bent conformation*). Die transmembranen Bestandteile der beiden Untereinheiten sind eng miteinander assoziiert. Dagegen sind die Ektodomänen der Heterodimere im aktiven Zustand aufgerichtet. In diesem Zustand werden die Integrine entweder durch intra- oder extrazelluläre Liganden stabilisiert (Hynes, 2003). In welchem Aktivierungszustand ein Integrin vorliegt, entscheidet über dessen Ligandenspezifität und -affinität und hat somit Einfluss auf die intrazelluläre Signalübertragung. So findet beispielsweise im inaktiven Zustand nur eine schwache Bindung extrazellulärer Liganden statt. Zudem ist ein lateraler Zusammenschluss der Integrine durch sogenanntes *lateral clustering* im inaktiven Zustand nicht möglich. Durch Homo-Oligomerisation der α - und β - Bestandteile eines Integrin-Heterodimers beim *lateral clustering* scheint die Interaktion des Integrins mit extra- und intrazellulären Liganden, Signalmolekülen und Bestandteilen des Zytoskeletts begünstigt zu sein (Felding-Habermann, 2003; Hynes, 2002, 2003).

Sowohl die Aktivierung als auch die Signaltransduktion der Integrine erfolgt bidirektional über die Zellmembran hinweg. So erfolgt die Aktivierung der Integrine durch die Bindung von Liganden von extrazellulärer sowie intrazellulärer Seite. Hinsichtlich der Signaltransduktion unterscheidet man zum einen ein *inside-out-signalling*, bei dem die Bindung zyttoplasmatischer Proteine an die zyttoplasmatische Domäne eine Änderung

der Affinität des Integrins zu Bestandteilen der EZM bewirkt, zum anderen ein *outside-in-signalling*, bei der die Bindung eines Ligandens an die extrazelluläre Domäne eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt (Bella und Berman, 2000; Hynes, 2002, 2003).

Als Adhäsions- und Signaltransduktionsrezeptoren üben Integrine Einfluss auf die Zelladhäsion, -migration, -invasion sowie auf die Zellproliferation und das Überleben der Zellen aus. Die Signalübertragung innerhalb dieser Prozesse erfolgt zum einen sowohl durch die Bindung der Integrine an Bestandteile der EZM als auch durch intrazelluläre Mechanismen. Da Integrine über keine Kinaseaktivität verfügen, rekrutieren und aktivieren sie Kinasen zur Transduktion intrazellulärer Signale (Hynes, 2002). Eine zentrale Kinase in der Integrin-vermittelten Signalübertragung ist die fokale Adhäsionskinase (FAK). Wenn ein Integrin Matrixbestandteile bindet, wird die FAK phosphoryliert und dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt. Dabei bindet die FAK direkt an das zytoplasmatische Ende der Integrin- β -Untereinheiten, so auch bei der Untereinheit β_3 . Von Bedeutung für die intrazelluläre Signalübertragung der FAK ist die Aktivierung zytoplasmatischer Tyrosinkinase der Src-Familie, welche an die FAK binden und von dort aus z.B. deren Substrat p130Cas phosphorylieren. Das tyrosinphosphorylierte p130Cas wiederum stellt eine Bindungsstelle für Adapterproteine wie das CrkII dar. Die Bindung des p130Cas an CrkII wird benötigt um Zellmigration zu induzieren (Zhang et al., 2003a; Felding-Habermann, 2003; Sridhar und Miranti, 2006; Desgrosellier und Cheresch, 2010). Die Signaltransduktion über die FAK ist jedoch nicht nur auf Integrine beschränkt, sondern erfolgt auch über Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren, so dass FAK eine Verbindung zwischen beiden Systemen darstellt. Sowohl Wachstumsfaktorrezeptoren als auch Integrine tragen so zur Zellmigration bei (Zhang et al., 2003a).

Für die Motilität und somit die Migration der Zellen ist eine Reorganisation des Zytoskeletts sowie eine bestimmte Verteilung der Integrine an der Zelloberfläche unabdingbar: Unter Ausbildung und Auflösung von Zellmatrixkontakten bewegt sich die Zelle vorwärts und verändert dabei beständig ihre Form. Während sich die Zelle in eine bestimmte Richtung bewegt, werden Integrine am hinteren Ende der Zelle internalisiert, durch das Zytoplasma an die vorderen Front transportiert und dort wieder in die Zellmembran eingebaut. Um die Zellbewegung zu unterstützen, befindet sich an bestimmten Zellmatrixkontaktstellen, sogenannten *focal adhesions*, eine Konzentration von Integrienen. Dort verbinden sich Integrine und Bestandteile des Zytoskeletts unter Vermittlung sogenannter Adapterproteine, wie Talin, Paxillin, α -Actinin, Tensin und Vinculin. Die Interaktion des zytoplasmatischen Schwanzes der Integrinuntereinheit mit diesen Proteinen führt zu einer Reorganisierung des Zytoskeletts (Desgrosellier und Cheresch, 2010; Felding-Habermann, 2003).

In vielen physiologischen sowie pathophysiologischen Prozessen fungieren Integrine als Zelladhäsionsrezeptoren. Unter anderem spielen sie in der Embryonalentwicklung,

der Hämostase, der Wundheilung, der Blutgerinnung, der Immunabwehr, der Zelltransformation und der Angiogenese eine Rolle. (Contois et al., 2009; Hynes, 1987, 2002).

1.2.2 Die tumorbiologische Rolle der Integrine am Beispiel des Integrins $\alpha\beta_3$

Das Integrin $\alpha\beta_3$ zählt zu den bestuntersuchten Integrinen in Tumoren (Desgrosellier und Cheresh, 2010). Es ist der Hauptrezeptor für VN. Daneben sind multiple andere Liganden, wie FN, Fibrinogen, Disintegrine, Thrombospondin und Osteopontin für das Integrin $\alpha\beta_3$ bekannt (Felding-Habermann, 2003; Giancotti und Mainiero, 1994). Der Rezeptor ist in viele für die Tumorprogression wichtige Prozesse wie die Metastasierung und Angiogenese involviert (Felding-Habermann, 2003).

Das Integrinrepertoire neoplastischer Zellen unterscheidet sich von jenem normaler Zellen. Veränderungen der Integrinexpression und -funktion sind für die neoplastische Transformation von signifikanter Bedeutung (Giancotti und Mainiero, 1994; Felding-Habermann, 2003; Desgrosellier und Cheresh, 2010). Das Integrin $\alpha\beta_3$ wird in normalem Epithel auf niedrigem Niveau exprimiert. Dagegen findet man in einigen Tumoren die Expression des Integrin $\alpha\beta_3$ drastisch erhöht (Desgrosellier und Cheresh, 2010). Nachweislich spielt das Integrin $\alpha\beta_3$ eine wichtige Rolle in der Metastasierung und Progression von Tumoren, wie dem Mamma- und dem Prostatakarzinom sowie dem Glioblastom, dem malignen Melanom und dem Ovarialkarzinom. Die Expression des Integrin $\alpha\beta_3$ korreliert bei diesen Tumoren oft mit aggressiven Eigenschaften (Felding-Habermann, 2003; Nemeth et al., 2003; Giancotti und Mainiero, 1994; Desgrosellier und Cheresh, 2010). Auf die Rolle des Integrin $\alpha\beta_3$ im Ovarialkarzinom wird im Abschnitt 1.4.2 gesondert eingegangen.

Zusätzlich zur Expressionshöhe haben Veränderungen des Aktivierungszustands der Integrine eine Bedeutung für die Tumormetastasierung (Desgrosellier und Cheresh, 2010). Ist ein wichtiger Integrinrezeptor in Tumorzellen permanent im aktiven Zustand, wird die Interaktion der Tumorzellen mit ihrer Umgebung beeinflusst und die Umwandlung eines stationären zu einem migrierenden, invasiven Phänotyp der Tumorzellen ermöglicht. Beispielsweise wurde in metastasierenden Brustkrebszelllinien eine konstitutive Aktivierung des Integrins $\alpha\beta_3$ nachgewiesen, die mit einem hohen Metastasierungspotential korrelierte (Felding-Habermann et al., 2001, 2003; Byzova und Plow, 1998).

Für das Tumorwachstum ist die Angiogenese von zentraler Bedeutung. Das Integrin $\alpha\beta_3$ nimmt sowohl in der Tumorangiogenese als auch in physiologischen Prozessen wie der Wundheilung eine Schlüsselposition ein und wird deshalb auch als Angiogenesemarker bezeichnet (Preissner und Reuning, 2011; Brooks et al., 1994). Tumorassoziierte Blutgefäße exprimieren Integrin $\alpha\beta_3$ stärker als bereits vorhandene physiologische Gefäße. Erst eine erhöhte Integrin $\alpha\beta_3$ -Expression ermöglicht es den Endothelzellen an EZM-Bestandteile des tumorumgebenden Gewebes zu binden. In die-

sem Fall begünstigen adhäsive Interaktionen mit der EZM die Invasion von Endothelzellen in die Umgebung des Tumors (Desgrosellier und Cheresh, 2010). Wichtige EZM-Proteine in diesem Kontext sind Matrixproteine, die das RGD-Motiv enthalten, wie VN, Laminin-10 und FN. Im Gegensatz zur embryonalen Angiogenese konnte im Zusammenhang mit der Tumorangiogenese eine erhöhte Expression dieser Matrixproteine nachgewiesen werden (Contois et al., 2009). Des Weiteren sind Interaktionen zwischen Integrinen und bestimmten angiogenetischen Wachstumsfaktoren bekannt. So wurden Interaktionen zwischen dem Integrin $\alpha\beta_3$ und dem *fibroblast growth factor receptor*, FGFR, sowie dem *vascular endothelial growth factor*, VEGF, beschrieben (Desgrosellier und Cheresh, 2010). Neben der Bildung neuer Blutgefäße ist auch die Umstrukturierung der unmittelbaren extrazellulären Umgebung des Tumors für die Tumorangiogenese von Bedeutung. Hier konnte für Integrin $\alpha\beta_3$ eine Interaktion mit der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) nachgewiesen werden. Die Expression des Integrins $\alpha\beta_3$ ist mit der Produktion der enzymatisch aktiven MMP-2 assoziiert (Felding-Habermann et al., 2002; Preissner und Reuning, 2011).

Die Kenntnisse um die Funktion des Integrins $\alpha\beta_3$ in der Tumorangiogenese führten zur Entwicklung neuer Therapeutika. Neue Therapieansätze in der Behandlung von Tumoren verfolgen die Antagonisierung bzw. Inhibierung der Integrin-Funktion (Desgrosellier und Cheresh, 2010; Hersey et al., 2010; Stipp, 2010).

Um die Integrinfunktion zu inhibieren bzw. modulieren, könnten neben dem Einsatz von Biologika, wie z.B. Antikörpern, auch natürlich vorkommende Interaktionspartner der Integrine von Interesse sein. Eine solche Interaktion ist u.a. für den Tumorsuppressor KAI1 beschrieben (Ruseva et al., 2009; Lee et al., 2011a).

1.2.3 Interaktionen zwischen KAI1 und Integrinen

Zellmigration, -adhäsion und -invasion sind essenzielle Bestandteile der Tumormetastasierung. Integrine als Oberflächenrezeptoren stellen eine Verbindung zwischen der EZM und dem Zytoskelett dar und kontrollieren somit die Zellbewegung. Diese wiederum beruht auf adhäsiven Phänomenen und deren Modulation (Boucheix und Rubinstein, 2001). Um zu verstehen, wie das Tetraspanin KAI1 auf diese zellulären Prozesse im Rahmen der Metastasierung Einfluss nimmt, sind Interaktionen des KAI1 mit Integrinen von besonderem Interesse (Boucheix und Rubinstein, 2001).

Durch verschiedene zellbiologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass KAI1 einen modulierenden Einfluss auf die Integrinfunktion ausübt. Bislang sind vor allem β_1 -Integrine als Interaktionspartner des KAI1 beschrieben worden. Deshalb konzentrierten sich die meisten Studien auf die Zelladhäsion an EZM-Bestandteile wie FN und Kollagen IV, I und Laminin, die hauptsächlich durch β_1 -Integrine vermittelt wird (Lee et al., 2011a; Lee et al., 2003b; Takaoka et al., 1998b; Liu et al., 2003b). Hierbei scheint der Effekt des KAI1 auf die Zelladhäsion an den Kollagenen IV und I sowie an Laminin tumorgewebsabhängig zu variieren. In Prostata- und Kolonkarzinomzellen

blieb die Zelladhäsion an Kollagen IV und I unter dem Einfluss von KAI1 unverändert (Takaoka et al., 1998b; Lee et al., 2003b). Im Ovarialkarzinomzellmodell führte die Anhebung der KAI1-Expression nach stabiler Transfektion zu einer Steigerung der Zelladhäsion an Kollagen I (Ruseva et al., 2009). Die Zelladhäsion an Laminin war in Kolonkarzinomzellen unbeeinflusst durch KAI1, dagegen war in Prostatakarzinomzellen eine Adhäsionssteigerung zu verzeichnen. In Prostata- und Kolonkarzinomzellen konnte zudem eine Verminderung der Zelladhäsion an FN durch die KAI1-Expression beobachtet werden (Lee et al., 2011a; Takaoka et al., 1998b; Liu et al., 2003b; Lee et al., 2003b).

Im Ovarialkarzinomzellmodell wurde erstmals das Integrin $\alpha\beta_3$ als möglicher Interaktionspartner des KAI1 beschrieben. Hier führte die KAI1-Expression dosisabhängig zu einer Steigerung der Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelten Zelladhäsion. Die Verstärkung der zelladhäsiven Kapazität der Ovarialkarzinomzellen durch die Anhebung der KAI1-Expression ging mit einer verminderten Zellmigration einher. Des Weiteren wirkte sich die KAI1-Expression suppressiv auf die Proliferation der Zellen aus. Außerdem konnte mittels Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden, dass KAI1 und das Integrin $\alpha\beta_3$ in enger Nachbarschaft auf der Zelloberfläche humaner Ovarialkarzinomzellen lokalisiert sind (Ruseva et al., 2009). Da VN als einer der Hauptliganden des Integrins $\alpha\beta_3$ gilt, wurde angenommen, dass die beobachteten Effekte auf eine Modulation der Funktion des Integrins $\alpha\beta_3$ zurückzuführen sind (Ruseva et al., 2009; Hapke et al., 2003). Über welchen Mechanismus KAI1 Einfluss auf die Integrinfunktion ausübt, ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für eine veränderte Integrinfunktion in KAI1-exprimierenden Zellen. Diskutiert wird die Rolle der Tetraspanine, so auch des KAI1, bei der Koordinierung sowie Prozessierung von Interaktionspartnern (Berditchevski und Odintsova, 2007; Miranti, 2009; Stipp, 2010; Jee et al., 2007). Mitglieder der Tetraspaninfamilie sind an Prozessen wie der Endozytose und dem intrazellulären Transport von Membranproteinen beteiligt. Über dieses sogenannte *protein trafficking* üben Tetraspanine Einfluss auf die Oberflächenexpression, den Einbau und die Verteilung ihrer Interaktionspartner in der Zellmembran aus (Berditchevski und Odintsova, 2007). Zudem übt KAI1 Einfluss auf die Regulierung des Aktivitätszustands des Partnerproteins aus (Lee et al., 2011a). Denkbar ist auch eine Modulierung Integrin-vermittelter intrazellulärer Signalwege durch KAI1 (Zhang et al., 2003a; Miranti, 2009).

Interaktionen zwischen dem Tetraspanin KAI1 und Integrinen spielen in der Biologie unterschiedlichster Tumore eine wichtige Rolle (Ruseva et al., 2009; Takaoka et al., 1998b; Lee et al., 2011a). Aus diesem Grund sind Mechanismen, die dieses System stören, von besonderem Interesse, um biologische Vorgänge besser zu verstehen.

1.3 Alternatives Spleißen und der Funktionsverlust des KAI1 in Tumoren

Nachdem für KAI1 in vielen Tumoren eine metastasensupprimierende Funktion nachgewiesen werden konnte, ist die Entschlüsselung von Mechanismen, die einen Funktions- bzw. Expressionsverlust des KAI1 in Tumorzellen bewirken, von besonderer Bedeutung.

Weder der Verlust der Heterozygotität, Genmutation oder Promotorhypermethylierung, noch der Effekt verschiedener Transkriptionsfaktoren oder bestimmter Mediatoren konnte bislang als Erklärung für einen KAI1-Expressionsverlust in Tumorzellen herangezogen werden (Tagawa et al., 1999; Kawana et al., 1997; Sekita et al., 2001; Jackson et al., 2000b; Dong et al., 1997; Marreiros et al., 2003; Jackson und Puisieux, 2000; Ruseva et al., 2009). In diesem Zusammenhang ist der Einfluss des p53 auf die KAI1-Expression jedoch noch nicht abschließend geklärt (Mashimo et al., 2000, 1998; Marreiros et al., 2003; Jackson et al., 2003; Jackson et al., 2002; Duriez et al., 2000; Schindl et al., 2001b, 2001a). Als weitere mögliche Ursachen für einen KAI1-Funktionsverlust in bestimmten Tumorzellen wurden auch posttranslationale Mechanismen untersucht, die z.B. zu einer Degradierung des KAI1 führen (Tsai et al., 2007; Tsai und Weissman, 2011).

Denkbar als Ursache für einen Funktionsverlust des KAI1 in Tumorzellen sind auch Mechanismen auf Ebene der Transkription, die mit der Expression von strukturell veränderten Proteinen einhergehen (Miranti, 2009). Alternatives Spleißen ist ein solcher Mechanismus, der dazu führt, dass während der Reifung der RNA die Exons in unterschiedlicher Weise aneinandergereiht oder einzelne Exons nicht transkribiert werden. Somit können aus einem einzigen Gen verschiedene mRNAs entstehen, die wiederum zur Entstehung strukturell und funktionell unterschiedlicher Proteine führen. Je nach Lokalisierung und kodierten Eigenschaften der jeweiligen nicht eingebauten Exons können diese Proteine über eine verminderte Funktion bzw. Funktionsverlust verfügen (Berg, 2003b).

Lee und Mitarbeiter (2003) identifizierten eine solche Spleißvariante des KAI1, KAI1-Splice, während Untersuchungen zur differentiellen Expression verschiedener Gene, welche bei der Metastasierung des Magenkarzinoms eine Rolle spielen. Hierzu nutzte man Primer, die die gesamte kodierende Region des KAI1-Gens flankierten und erhielt zwei verschiedene Amplifikationsprodukte, von denen eines 801, das andere 717 Basenpaare enthielt. Eine Sequenzanalyse identifizierte das 801 bp umfassende Produkt als KAI1-Wildtyp(WT)-cDNA. Es stellte sich heraus, dass das 717 bp Produkt ebenfalls der KAI1-Sequenz entsprach, hier jedoch 84 bp am carboxyterminalen Ende fehlten. Bei einer Genomanalyse wurde ermittelt, dass es sich um einen selektiven Verlust des Exon 7, vermutlich durch alternatives Spleißen, handelte. Exon 7 kodiert für eine Regi-

on von 28 Aminosäuren, die sich vom distalen Schenkel der LEL zur vierten Transmembranregion erstrecken (Abb. 4). Es besteht also ein struktureller Unterschied am carboxyterminalen Ende des KAI1-Splice im Vergleich zu KAI1-WT-Molekül (Lee et al., 2003b).

Die Entdeckung des KAI1-Splice veranlasste Lee und Mitarbeiter (2003) dazu, etwaige funktionelle Unterschiede sowohl *in vitro* als auch *in vivo* am Magenkarzinom zu untersuchen.

Dabei konnten sie zeigen, dass sich die Expression von KAI1-Splice in Magenkarzinomzellen im Gegensatz zur Expression von KAI1-WT begünstigend auf Tumorwachstum und Metastasierung auswirkte. So erfolgte der Nachweis von KAI1-Splice in Proben von Primärtumoren des Magens, deren Metastasierung bis zum Peritoneum fortgeschritten war, sowie in Lymphknoten- und Fernmetastasen. Anhand klinischer Daten wurde die Relevanz der KAI1-Splice-Expression für die Prognose der Patienten evaluiert. Dabei hatten Patienten mit einer KAI1-Splice-Expression in hepatischen sowie peritonealen Fernmetastasen im Vergleich zu Patienten ohne KAI1-Splice-Expression eine signifikant reduzierte Überlebensrate nach einem chirurgischen Eingriff. Das Gleiche galt für Patienten mit Metastasen in regionalen Lymphknoten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein hoher Gehalt an KAI1-Splice im Primärtumor mit einer schlechten Prognose assoziiert war (Lee et al., 2003b).

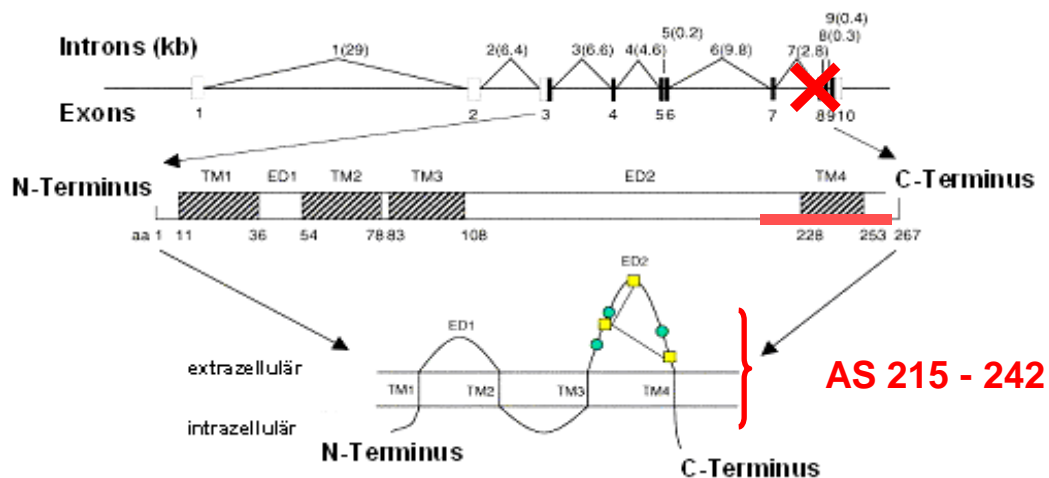


Abb. 4: Schematische Darstellung des KAI1-WT-Gens und KAI1-Proteins.

Dargestellt ist der Aufbau des KAI1-WT-Gens und KAI1-Proteins. Die weißen Boxen stellen nicht-kodierende Introns, die schwarzen Boxen kodierende Exons dar. Die schraffierten Flächen in der Proteinstruktur zeigen die Transmembranregionen (TM) innerhalb des Proteins. Als ED werden die extrazellulären Domänen des Proteins bezeichnet. Die grünen Kreise in der Sekundärstruktur stehen für die potentiellen Glykosylierungsstellen, die gelben Kästchen für Cysteinreste, die als Ausgangspunkt für Disulfidbrücken fungieren. Dieses Schema soll den Mechanismus des alternativen Spleißens des KAI1 verdeutlichen. Hierbei kommt es zu einem selektiven Verlust des Exon 7 und folglich zu einer veränderten KAI1-Struktur. Dem so entstandenen Protein, KAI1-Splice, fehlen 28 Aminosäuren (AS) 215–242 (verändert nach Jackson et al., 2005 und Lee et al., 2003b)

KAI1-WT- und KAI1-Splice-exprimierende Tumorzellen zeigten im Vergleich ein unterschiedliches Metastasierungspotential. So wiesen Mäuse, denen KAI1-Splice-transfizierte Zellen injiziert worden waren, Metastasen in der Lunge, der Leber und dem Peritoneum auf. Bei Mäusen mit KAI1-WT-transfizierten Zellen wurden hingegen nur Metastasen in der Lunge gefunden (Lee et al., 2003b).

In In-vitro-Tests konnte gezeigt werden, dass die Expression von KAI1-Splice in Kolonkarzinomzellen im Vergleich zu KAI1 zu einer gesteigerten Proliferation, Zelladhäsion an FN sowie Zellmigration führte (Lee et al., 2003b).

Hohenester und Mitarbeitern gelang es aus einem Ovarialkarzinomgewebemix die RNA des KAI1-Splice zu isolieren (Hohenester et al., unveröffentlichte Daten). Dies stellt die Grundlage der vorliegenden Arbeit dar. Im Folgenden soll deshalb auf die für das Ovarialkarzinom spezifische Metastasierung sowie auf die Rolle des Integrins $\alpha\beta_3$ und des KAI1 im Ovarialkarzinom eingegangen werden.

1.4 Das humane Ovarialkarzinom als experimentelles Zellmodell

1.4.1 Die Metastasierung des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom hat die höchste Mortalität aller Tumoren des weiblichen Genitaltraktes. Ursächlich hierfür ist das bei Diagnosestellung oft bereits fortgeschrittene Tumorstadium, das auf das Fehlen spezifischer Frühsymptome zurückzuführen ist (Ozols et al., 2004).

Die meisten Ovarialkarzinome entstehen aus dem Oberflächenepithel des Ovars. 70% der Ovarialkarzinome werden im FIGO Stadium III diagnostiziert, wenn bereits eine Ruptur der Organkapsel des Ovars und eine Absiedelung der Tumorzellen auf angrenzende Strukturen und das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens stattgefunden hat (Chan et al., 2003; Ozols et al., 2004).

Beim Ovarialkarzinom unterscheidet man verschiedene Metastasierungswege, wobei die intraperitoneale sowie lymphogene Ausbreitung am häufigsten vorliegen. Dagegen ist die hämatogene Metastasierung eher selten.

Intraperitoneal erfolgt die Tumorausbreitung *per continuitatem*. Die Tumorzellen disseminieren mithilfe peritonealer Flüssigkeit oder Aszites. Dabei folgt die Verbreitung der Zellen im Bauchraum der Flussrichtung der intraperitonealen Flüssigkeit, die atemabhängig vom Becken über die Kolonrinnen bis zum Zwerchfell zirkuliert. Tumorabsiedelungen findet man am häufigsten im Peritoneum des kleinen Beckens und im Bereich des Colon sigmoideum, im Peritoneum entlang der rechten und linken Kolonrinne, im Omentum majus sowie an der Oberfläche der Leberkapsel und des Zwerchfells (Tan et al., 2006).

Zellbiologisch stehen bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms vor allem Zelladhäsionsphänomene im Vordergrund. Zunächst lösen sich Tumorzellen aus der primären Tumormasse, wobei der Herunterregulierung von E-Cadherin, einem homotypischen Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, eine besondere Bedeutung zugeschrieben wird. Nachdem sich die Zellen vom Primärtumor abgelöst haben, kommt es durch Zell-Zell-Aggregation zur Ausbildung von sphäroidartigen Strukturen. Diese Sphäroide sind gegen Mechanismen der Immunabwehr resistent, da sie zum Beispiel die Penetration von Antikörpern und Bestandteilen des Komplementsystems verhindern. Durch Wechselwirkung mit dem peritonealen Mesothelium kommt es zu einer Aufhebung des sphäroidartigen Zellzusammenschlusses, zur Implantation der metastasierenden Tumorzellen und schließlich zum Metastasenwachstum (Shield et al., 2009; Tan et al., 2006). Als potenzielle Mechanismen dieser Wechselwirkungen werden die Bindung der Tumorzellen an Strukturen der EZM, wie Kollagen I und IV, Laminin, VN und FN, unter Vermittlung durch Zelladhäsions- und Signaltransduktionsrezeptoren der Superfamilie der Integrine betrachtet (Tan et al., 2006; Heyman et al., 2010; Reuning, 2011).

In der Progression des Ovarialkarzinoms sind demnach Zell-Zell- sowie Zell-EZM-Adhäsionsmechanismen und deren Modulierung von Bedeutung. Ein Bestandteil der Integrin-vermittelten Zell-EZM-Adhäsion und Zellmigration bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms ist hierbei die Interaktion des Integrin $\alpha\beta_3$ und seinem Liganden VN (Preissner und Reuning, 2011).

1.4.2 Die Rolle des Integrins $\alpha\beta_3$ im humanen Ovarialkarzinom

Ovarialkarzinomzellen wie auch andere Zelltypen exprimieren verschiedene Vertreter der Integrinfamilie. Neben einer Reihe von Integrinen der β_1 -Subfamilie findet man auch eine Expression des Integrins $\alpha\beta_3$ (Carreiras et al., 1999). Bei der Tumorprogression des Ovarialkarzinoms sind u.a. Veränderungen im Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-System von Bedeutung (Carreiras et al., 1999; Carreiras et al., 1996; Carreiras et al., 1995; Kaur et al., 2009).

Der Integrinrezeptor $\alpha\beta_3$ wird sowohl in normalem Ovarialepithel als auch in differenzierten Ovarialkarzinomen exprimiert (Carreiras et al., 1996; Cannistra et al., 1995). Es gibt jedoch Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke. Im Vergleich zu Karzinomen des Ovars wird das Integrin $\alpha\beta_3$ in Borderline-Tumoren weniger oft exprimiert (Liapis et al., 1997). Außerdem wird in schlecht differenzierten Tumoren nur die α -Untereinheit exprimiert, während eine Expression der β_3 -Untereinheit in diesen Tumoren häufig nicht nachweisbar ist (Carreiras et al., 1996). Die Expression der β_3 -Integrine war zudem in Tumoren des Stadiums IV deutlich weniger häufig als in Tumoren der FIGO-Stadien I-III (Maubant et al., 2005). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Integrin- β_3 -Untereinheit zu einer verstärkten Adhäsion, zu einem langsameren Tumorwachstum und einer verminderten Tumormetastasierung führte. Dies korrelierte mit einer besseren Prognose von Patientinnen, bei denen eine

Expression der Integrin- β_3 -Untereinheit nachgewiesen werden konnte (Kaur et al., 2009; Partheen et al., 2009).

Dem Hauptliganden VN kommt ebenfalls eine besondere Bedeutung in der Progression des Ovarialkarzinoms zu. So ist die VN-Expression in normalem Ovarialgewebe und in gut differenzierten Tumoren nachweisbar, jedoch nicht in den meisten moderat oder schlecht differenzierten Tumoren (Carreiras et al., 1996). Normalerweise wird VN in der Leber synthetisiert und von dort in die Blutbahn abgegeben. Die Beobachtung, dass in schlecht differenzierten Ovarialtumoren kein VN mehr nachweisbar ist, veranlasste Carreiras und Mitarbeiter den zellulären Ursprung des VN in Ovarialkarzinomen zu untersuchen. Dabei konnten sie zeigen, dass Adenokarzinome des Ovars in der Lage sind VN zu synthetisieren (Carreiras et al., 1999). Darüber hinaus konnte in einer Studie eine Steigerung der VN-Synthese auf die Funktion des Integrin $\alpha\beta_3$ zurückgeführt werden. Diese verstärkte VN-Synthese wird über eine Beteiligung von Rel-Transkriptionsfaktoren vermittelt (Reuning, 2011). Zusätzlich zur endogenen Synthese durch die Ovarialkarzinomzellen selbst wird VN von mesothelialen Zellen exprimiert. Die VN-Matrix begünstigt die durch α -Integrine vermittelte Adhäsion der Ovarialkarzinomzellen und wirkt stimulierend auf die Migration humaner Ovarialkarzinomzellen (Preissner und Reuning, 2011). Diese Mechanismen könnten der Implantation metastasierender Zellen auf dem peritonealen Mesothel zugrunde liegen (Heyman et al., 2010, 2008). Die Überexpression des Integrins $\alpha\beta_3$ und dessen Bindung an VN führte im Ovarialkarzinomzellmodell darüber hinaus zu einer Steigerung der Adhäsion, Motilität und Proliferation (Hapke et al., 2003; Kaur et al., 2009). Dabei nimmt das Integrin $\alpha\beta_3$ über verschiedene Signalwege Einfluss auf diese zellbiologischen Prozesse: In einer Studie mit den humanen Ovarialkarzinomzelllinien IGROV und SKOV konnte nachgewiesen werden, dass das Integrin αv die Aktivität der *integrin-linked kinase* (ILK) und somit die Zellproliferation beeinflusst. Die ILK stellt einen wichtigen Bestandteil der Regulierung des Zellzyklus der Ovarialkarzinomzellen dar. So wurde durch eine Hemmung des Integrins αv mit RGD-Peptiden eine Inhibierung der ILK herbeiführt (Cruet-Hennequart et al., 2003). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass das Integrin $\alpha\beta_3$ die ILK-Genexpression in Ovarialkarzinomzellen induziert (Lössner et al., 2009). Außerdem ist die Interaktion des Integrins $\alpha\beta_3$ mit Wachstumsfaktoren für die Zellproliferation von Bedeutung. So führt eine Interaktion des Integrins $\alpha\beta_3$ mit VN in Ovarialkarzinomzellen der Zelllinie OV-MZ-6 zu einer erhöhten Expression und Aktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGF-R). Die Phosphorylierung des EGF-R führt über eine intrazelluläre Signalkaskade zu einer verstärkten Aktivität der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p44/42 (erk-1/erk-2), welche wiederum die Zellproliferation steigert. Von Bedeutung für die Interaktion des Integrins $\alpha\beta_3$ und des EGF-R ist auch die FAK. So konnte diese mittels Immunpräzipitation in Integrin- $\alpha\beta_3$ /EGF-R-Komplexen in OV-MZ-6-Zellen nachgewiesen werden (Lössner et al., 2008). Auch die Zell-EZM-Adhäsion der Tumorzellen erfolgt unter Ausbildung fokaler Adhäsionskontakte und der Rekrutierung der aktivierten tyrosinphos-

phorylierten FAK (Hapke et al., 2003). Nachweislich bedingt eine Inter-aktion des Integrins $\alpha\beta_3$ mit seinem Liganden VN in OV-MZ-6-Zellen zudem eine gesteigerte Aktivität und Expression der FAK (Lössner et al., 2008).

Aufgrund seiner Bedeutung in wichtigen tumorbiologischen Prozessen des Ovarialkarzinoms ist das Integrin $\alpha\beta_3$ auch Gegenstand der Erforschung neuer Therapiestrategien für das Ovarialkarzinom. So wurde zum Beispiel Etaracizumab in der Therapie des Ovarialkarzinoms präklinisch erprobt (Landen et al., 2008; Kim et al., 2009).

Neben dem Integrin $\alpha\beta_3$ selbst könnten auch dessen Interaktionspartner wie das KAI1, die Einfluss auf die Integrinfunktion nehmen, für die Entwicklung neuer Therapiestrategien im Ovarialkarzinom interessant werden.

1.4.3 Die Rolle des KAI1 im humanen Ovarialkarzinom

Wie in vielen anderen soliden Tumoren besitzt KAI1 auch im humanen Ovarialkarzinom metastasierungssuppressive Eigenschaften. Eine Expression des KAI1 konnte jedoch sowohl in gesundem epitheliales Gewebe als auch in Tumorgewebe des Ovars nachgewiesen werden (Houle et al., 2002; Romanska und Berditchewski, 2011).

In normalem gesundem Ovarialgewebe hat KAI1 eine physiologische Bedeutung in der follikulären und lutealen Entwicklung. Dabei ist KAI1 in den Granulosazellen des wachsenden Follikels nachweisbar. Unmittelbar vor der Ovulation wird der KAI1-Gehalt reduziert. In der Differenzierungsphase des Follikels zum Corpus luteum wird die KAI1-Expression hochreguliert (Houle et al., 2002).

In Ovarialtumoren konnte eine deutliche Verminderung der KAI1-Expression nachgewiesen werden. In benignen bzw. Borderline-Läsionen des Ovars war diese schwächer ausgeprägt als in metastasierenden und rezidivierenden invasiven Tumoren (Houle et al., 2002). Der Verlust der KAI1-Expression im Ovarialkarzinom ereignet sich dabei vor allem in frühen Tumorstadien (Romanska und Berditchewski, 2011; Liu et al., 2000; Houle et al., 2002). Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Stadium und Grading des Tumors und der Expressionsrate von KAI1 gezeigt werden (Liu et al., 2000; Schindl et al., 2001b). Hingegen scheint es eine Relation zwischen dem histologischen Typ und der KAI1-Expressionsverminderung zu geben (Schindl et al., 2001b; Houle et al., 2002).

Hinsichtlich der Prognose zeigten Patientinnen mit einer starken oder moderaten KAI1-Expression ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben im Gegensatz zu Patientinnen mit einer niedrigen oder nicht nachweisbaren Expression. Dabei scheint die KAI1-Expression nicht nur Einfluss auf die Ausbildung von Metastasen, sondern auch auf die Entwicklung eines lokalen Rezidivs auszuüben. In beiden Fällen wirkt sich eine hohe KAI1-Expression günstig für die Patientin aus (Schindl et al., 2001b).

Ruseva und Mitarbeiter zeigten in ihrer In-vitro-Studie erstmals tumorsuppressive Funktionen des KAI1 in tumorbiologischen Prozessen des Ovarialkarzinoms. In einem Ovarialkarzinomzellmodell konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von KAI1 die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion verstärkt und die Zellmigration der Tumorzellen vermindert. Außerdem wirkte sich die KAI1-Expression suppressiv auf die Zellproliferation aus (Ruseva et al., 2009).

Welche Mechanismen jedoch einem Funktionsverlust bzw. einer Herunterregulierung der KAI1-Expression zugrunde liegen, ist auch im Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom nicht geklärt. Im Ovarialkarzinom scheinen ein p53-abhängiger Mechanismus als Erklärung für eine Herunterregulierung der KAI1-Expression oder eine Mutation als Ursache für den Funktionsverlust des KAI1 keine Rolle zu spielen (Schindl et al., 2001b; Liu et al., 2000).

2 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen des alternativen Spleißens des putativen Tumorsuppressors und Tetraspanins KAI1 auf den tumorzellbiologischen Phänotyp humaner Ovarialkarzinomzellen untersucht.

Der Fokus der Experimente lag auf den funktionellen Unterschieden zwischen KAI1-WT und seiner Spleißvariante KAI1-Splice in Bezug auf die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion und Zellproliferation. Die Untersuchung basiert auf bereits vorliegenden Daten, die zeigen, dass die Expression von KAI1-Splice mit einer schlechteren Prognose im Magenkarzinom assoziiert ist (Lee et al., 2003b).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob das fehlende Exon 7 bei KAI1-Splice dazu führt, dass die Spleißvariante nicht die tumorsuppressiven Eigenschaften des KAI1-WT aufweist. Die KAI1-Splice-Expression könnte so in humanen Ovarialkarzinomzellen zellbiologische Prozesse begünstigen, die im Zusammenhang mit der für das Ovarialkarzinom spezifischen Metastasierung stehen.

Zusammengefasst wurden folgende Arbeitsschritte und Fragestellungen bearbeitet:

- Etablierung eines In-vitro-Ovarialkarzinomzellmodells, in das entweder KAI1-WT oder KAI1-Splice wiedereingeführt wurde.
- Welchen Einfluss nimmt die KAI1-Splice-Expression auf den zelladhäsiven Phänotyp humaner Ovarialkarzinomzellen im Gegensatz zu KAI1-WT?
- Welche Auswirkungen hat die KAI1-Splice-Expression auf die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zellproliferationsaktivität humaner Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu Zelltransfektanten, in die KAI1-WT wiedereingeführt wurde?

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien und Materialien

3.1.1 Zellmodell

Für diese Arbeit wurden humane Ovarialkarzinomzellen der Zelllinie OV-MZ-6 verwendet. Diese Zellen waren ursprünglich aus dem malignen Aszites einer 70-jährigen Patientin mit fortgeschrittenem serösem Adenokarzinom des Ovars (FIGO IV) isoliert und als Zelllinie etabliert worden (Möbus et al., 1992).

Neben WT-OV-MZ-6-Zellen wurden in unseren Untersuchungen auch OV-MZ-6-Zellen verwendet, welche das Integrin $\alpha\beta_3$ überexprimierten. Diese Zellen waren in einem früheren Projekt durch stabile Transfektion erzeugt (Hapke et al., 2001) und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.

In den Experimenten dieser Arbeit fanden sowohl KAI1-WT- als auch KAI1-Splice-Transfektanten Verwendung, welche durch stabile Transfektion von WT- sowie Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen generiert wurden. Der Vorgang der stabilen Transfektion ist im Kapitel 3.2.2 näher erläutert. Die verwendeten Expressionsvektoren wurden in Vorarbeiten erzeugt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Hierfür war die verwendete KAI1-WT- und KAI1-Splice-cDNA durch Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) unter Verwendung von RNA aus humanem Ovarialkarzinomgewebe hergestellt worden (Ruseva et al., 2009; Hohenester et al., unveröffentlichte Daten). Die jeweilige cDNA war anschließend in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Hygro kloniert worden (Ruseva et al., 2009).

Als Kontrollen dienten in allen für die vorliegende Arbeit durchgeführten Untersuchungen Zellen, welche lediglich mit dem Expressionsvektor ohne cDNA-Insert transfiziert worden waren. Auch diese Zellen stammten aus einer vorangegangenen Studie (Ruseva et al., 2009).

3.1.1.1 Nomenklatur

Zur Vereinfachung wird folgende Nomenklatur für die unterschiedlichen Zelltypen verwendet:

WT OV-MZ-6-Zellen	OV-MZ-6-Wildtypzellen
WT-KAI1-Splice	KAI1-Splice-transfizierte OV-MZ-6-Wildtyp-Zellen
WT-KAI1-WT	KAI1-Wildtyp-transfizierte OV-MZ-6-Wildtypzellen
WT-Vektor	OV-MZ-6-Wildtypzellen, die mit dem Expressionsvektor ohne cDNA-Insert transfiziert worden waren
$\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice	Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen, die mit KAI1-Splice transfiziert worden waren
$\alpha\beta_3$ -KAI1-WT	Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen, die mit KAI1-WT transfiziert worden waren
$\alpha\beta_3$ -Vektor	Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen, die mit dem Expressionsvektor ohne cDNA-Insert transfiziert worden waren

3.1.2 Zellkultur

Arginin, Asparagin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DPBS (<i>Dulbecco's Phosphate buffered saline</i>)	Gibco, Invitrogen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen
Geneticin G418	Gibco, Invitrogen
2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperazin]ethanolsulfonsäure (HEPES)	Gibco, Invitrogen
Hygromycin B	Gibco, Invitrogen

Trypanblau-Lösung 0,4% (w/v)	Sigma-Aldrich
Trypsin	Biochrom AG
Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

3.1.3 Stabile Zelltransfektion

Lipofektin®-Reagenz	Gibco, Invitrogen
KAI1-WT cDNA	Der Expressionsvektor für KAI1-WT wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Ute Reuning, Klinische Forschung der Frauenklinik der TUM bereitgestellt.
KAI1-Splice cDNA	Der Expressionsvektor für KAI1-Splice wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Eva Gross, Tumorgenetische Arbeitsgruppe der Frauenklinik der TUM, zur Verfügung gestellt.
Plasmid pcDNA3.1/Hygro	Gibco, Invitrogen

3.1.4 Proteinbestimmung, SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot-Analyse

Acrylamid (Rotiphorese Gel 40)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
BCA <i>Protein Assay Kit</i> (mit BSA)	Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, USA
Coomassie-Blau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Roth
Ethanol (99,8%)	Apotheke (Klinikum Rechts der Isar, München)
Glycin	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck
Milchpulver	Sigma-Aldrich
Pierce ECL Westernblot-Substrat	Thermo Scientific Pierce Protein Research Products

Proteinmarker	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PVDF Gel-Blotting-Membran	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween®-20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.1.5 Durchflusszytometrie

FACS <i>Flow Sheath Fluid</i>	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
-------------------------------	---

3.1.6 Immunzytochemie

<i>Cell Culture Chamber Slides</i> (8 Kammern)	Nunc Lab-Tek, Naperville, IL, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

3.1.7 Zellbiologische Assays

4-Nitrophenyl N-Acetyl- β -D-Glucosamid	Sigma-Aldrich
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich

3.1.8 Antikörper

Monoklonaler Mausantikörper gerichtet gegen KAI1-WT (CD82), Klon Ts82b	Diaclone, Tepnel Research Products & Services, Besançon, France
Monoklonaler Maus-Antikörper gerichtet gegen Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase	Chemicon international, Temecula, CA, USA
Monoklonales Maus IgG3 gerichtet gegen die Aminosäuren 95-267 am Carboxy-Terminus des KAI1-WT (G-2)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
Polyklonaler Kaninchenantikörper gerichtet gegen die Aminosäuren 95-267 am Carboxy-Terminus von KAI1-WT (H-173)	Santa Cruz Biotechnology Inc.

Polyklonaler Antikörper Ziege-anti-Maus IgG, Alexa-488-konjugiert	JacksonImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG, HRP(<i>horseradish peroxidase</i>)-konjugiert	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	Dianova

3.1.9 Matrixproteine

Kollagen Typ I	Sigma-Aldrich
Fibronektin (FN)	Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Vitronektin (VN)	Becton-Dickinson Biosciences

3.1.10 Geräte und Software

Sicherheitswerkbank Hera Safe für die Zellkultur	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zellkulturbrutschrank Hera Cell	Heraeus
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
konfokales Laser-Scanning-Mikroskop Axiovert 35 (Zeiss) mit Laserscandetektionseinheit (Leica)	Zeiss Leica, Wetzlar, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gel Lufttrockner	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
SLT Spectra Elisa Reader, Software easy WIN fitting	SLT, Crailsheim, Deutschland
Software Scion Image	Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA
Power-supply Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories
Wet-Blot-Kammer	Bio-Rad Laboratories
Elektrophoresekammer, Kämme, Gießstation	Bio-Rad Laboratories
FACS Calibur Sort Cytofluorometer, Software CellQuest	Becton Dickinson Biosciences
pH-Meter	Schott, Mainz, Deutschland
Röntgenfilmentwickler Cawomat 2000IR	Cawo, Schrobenhausen, Deutschland
Software CellQuest	Becton Dickinson Biosciences

3.1.11 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen, Falcon-Röhrchen, Zellkulturplatten, Petrischalen sowie serologische Pipetten	Becton Dickinson Biosciences
Pipettenspitzen und 1,5/2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Combitips® plus 1, 2,5, 5 ml	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
FACS Röhrchen, konisch, 4,5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pasteur Glaspipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Sterile Injektionsnadeln	Braun, Melsungen, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Für die Kultivierung der OV-MZ-6-Zellen und deren Transfektanten wurden verschiedene Zellmedien verwendet:

WT-OV-MZ-6-Zellen wurden mit einem Komplettmedium behandelt (s.u.). Für die WT-KAI1-WT-, WT-KAI1-Splice- oder WT-Vektor-Zellen wurde ein Zellkulturmedium mit Hygromycin (200 µg/ml) verwendet. Die $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT, $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice oder $\alpha\beta_3$ -Vektor-Zellen wurden in einem Selektionsmedium kultiviert, das sowohl Hygromycin (200 µg/ml) als auch Geneticin G418 (1 µg/ml) enthält.

Die Zellen wurden bei 37°C/ 5% (v/v) CO₂ im Zellinkubator kultiviert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

Bei einer Konfluenz des Zellmonolayers von 80-90% wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Hierzu wurde das Zellmedium abgesaugt und die Zellen nach einem Waschschrift mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) für ungefähr 10 min mit PBS, 0,05% (w/v) EDTA (Splitting-Lösung) inkubiert. Sobald die Zellen abgerundet und gelöst waren, wurden diese mit PBS abgespült und für 3 Minuten bei 246 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in dem jeweiligen (Selektions-)medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Zur Vorratshaltung der verschiedenen Transfektanten wurden kontinuierlich Zellpellets eingefroren. Hierzu wurde das Pellet in 500 bis 1000 µl kaltem Einfriermedium resuspendiert, in ein Einfrierröhrchen gegeben und unmittelbar danach auf Eis gestellt. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C gelagert und nach 2 bis 3 Tage in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die Zellen aufzutauen wurden die Einfrierröhrchen auf Eis gestellt und dann in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben, in dem das jeweilige kalte (Selektions-)medium vorgelegt worden war. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden mit warmem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche transferiert. Am Tag darauf erfolgte nach einem Waschschrift in PBS ein Mediumwechsel mit dem jeweiligen (Selektions-)medium.

GAM (growth arrest medium):	500	DMEM
	10	mM HEPES
	550	mM Arginin
	272	mM Asparagin

Komplettmedium:	500		DMEM
	10	mM	HEPES
	550	mM	Arginin
	272	mM	Asparagin
	10%	(v/v)	FCS
Selektionsmedium:			Komplettmedium
	1	g/l	Genitacin G418
	200	µg/ml	Hygromycin B
	550	mM	Arginin
	272	mM	Asparagin
			Komplettmedium
	200	µg/ml	Hygromycin B
	550	mM	Arginin
	272	mM	Asparagin
Einfriermedium:	90%	(v/v)	FCS
	10%	(v/v)	DMSO
Zell-Splitting-Lösung:	0,05%	(w/v)	EDTA in PBS

3.2.2 Stabile Transfektion humaner Ovarialkarzinomzellen

Um KAI1-WT- und KAI1-Splice-exprimierende Zellen zu generieren wurde eine stabile Transfektion der Zellen durchgeführt. Dazu wurden WT-OV-MZ-6-Zellen und bereits stabile Transfektanten, die das Integrin $\alpha\beta_3$ überexprimierten, auf Petrischalen ausgesät und für 2-3 Tage im Brutschrank bei 37°C/ 5% (v/v) CO₂ kultiviert. Die adhärennten Zellen wurden bei einer Konfluenz von ungefähr 60% mit einem Expressionsvektor transfiziert, welcher entweder die KAI1-WT- oder die KAI1-Splice-cDNA sowie ein Antibiotikumresistenzgen für Hygromycin beinhaltet. Als Kontrolle diente der entsprechende Expressionsvektor jedoch ohne das cDNA-Insert.

Für die stabile Transfektion wurden zunächst in einem konischen Röhrchen mit abgerundetem Boden 400 µl FCS-freies *growth arrest*-Medium (GAM) (s.o.) mit 15 µl Lipofektin®-Reagenz 45 min bei Raumtemperatur (RT) vorinkubiert. Danach wurden 5 µg DNA hinzupipettiert und das Gemisch weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend

wurde die DNA/Lipofektin-Lösung auf den Zellmonolayer gegeben. Dieser war zuvor mit PBS gewaschen und mit GAM bedeckt worden.

Nach einer Inkubationszeit von 6 h bei 37°C/ 5% (v/v) CO₂ wurde das Transfektionsmedium vorsichtig entfernt und Komplettmedium hinzugegeben.

Die transfizierten Zellen wurden bei 37°C/ 5% (v/v) CO₂ im Brutschrank für weitere 2 Tage kultiviert. Bei einer Konfluenz der Zellmonolayer von ungefähr 80%, welche nach 2-3 Tagen erreicht war, wurde mit der Selektion unter Antibiotikumgabe begonnen. Hierzu wurde ein Zellkulturmedium, welches mit Hygromycin in einer Konzentration von 200 µl/ml versetzt worden war, den Zellen hinzugegeben. Für die WT-OV-MZ-6-Zellen wurde als Zellkulturmedium Komplettmedium, für die bereits stabilen OV-MZ-6-Transfektanten, welche das Integrin $\alpha\beta_3$ überexprimierten, ein Komplettmedium mit Genitacin G418 (1g/l) verwendet.

Erfolgreich transfizierte Zellen verfügten über eine Hygromycin-Resistenz. Zellen, die den Expressionsvektor nicht aufgenommen hatten, starben unter Behandlung mit Hygromycin ab.

Der Selektionsprozess war nach etwa 10 Tagen abgeschlossen.

3.2.3 Isolierung individueller, stabil transfizierter Zellklone mit unterschiedlicher KAI1-WT/KAI1-Splice-Oberflächenexpression

Durch erfolgreiche Transfektion der Zellen erhielten wir zunächst Zellen mit einer heterogenen Expressionshöhe von KAI1-WT bzw. KAI1-Splice. Um für unsere Untersuchungen Zellen mit vergleichbarer Expressionshöhe an KAI1-WT bzw. KAI1-Splice zu erhalten, führten wir zunächst eine Subklonierung der jeweiligen Zelltransfektanten durch. Hierzu wurde zunächst eine stark verdünnte Zellsuspension verwendet. Die Zellen wurden für ungefähr 10 min in PBS, 0,05% (w/v) EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, in PBS gewaschen und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 246 x g wurde der Überstand bis auf das Zellpellet abgesaugt und die Zellen in Selektionsmedium resuspendiert. Anschließend wurden ca. 5-10 µl der Zellsuspension in einer mit Selektionsmedium versehenen Petrischale verdünnt. Die Petrischale wurde ungefähr 10 Tage bei 37°C/ 5% (v/v) CO₂ kultiviert, bis die einzelnen Zellen zu sichtbaren Zellkolonien herangewachsen waren. Daraufhin wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in PBS gewaschen und die Zellen in 2 ml PBS, 10% (v/v) Trypsin bedeckt und für 2 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die einzelnen Zellkolonien mit einer 100 µl-Pipette mit etwas Selektionsmedium aufgenommen und auf eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen überführt, auf welcher Selektionsmedium vorgelegt worden war. Nach einer Kultivierungszeit von 7 bis 10 Tagen hatten die Zellen in den einzelnen Vertiefungen eine Konfluenz von ungefähr 70%. Bei dieser Konfluenz wurden die Zellen erneut abgelöst und auf Glasobjektträger mit mehreren kleinen Zellkammern (*microchamber slides*) überführt. Die KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe wurde mittels Immunzytochemie (ICC) und

Auswertung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) (siehe 3.2.4) sowie Durchflusszytometrie (3.2.5) bestimmt. Der Isolierungsprozess für transfizierte Zellklone wurde in mehreren solcher „Klonierungrunden“ wiederholt, bis die Zellen eine annähernd homogene KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe aufwiesen.

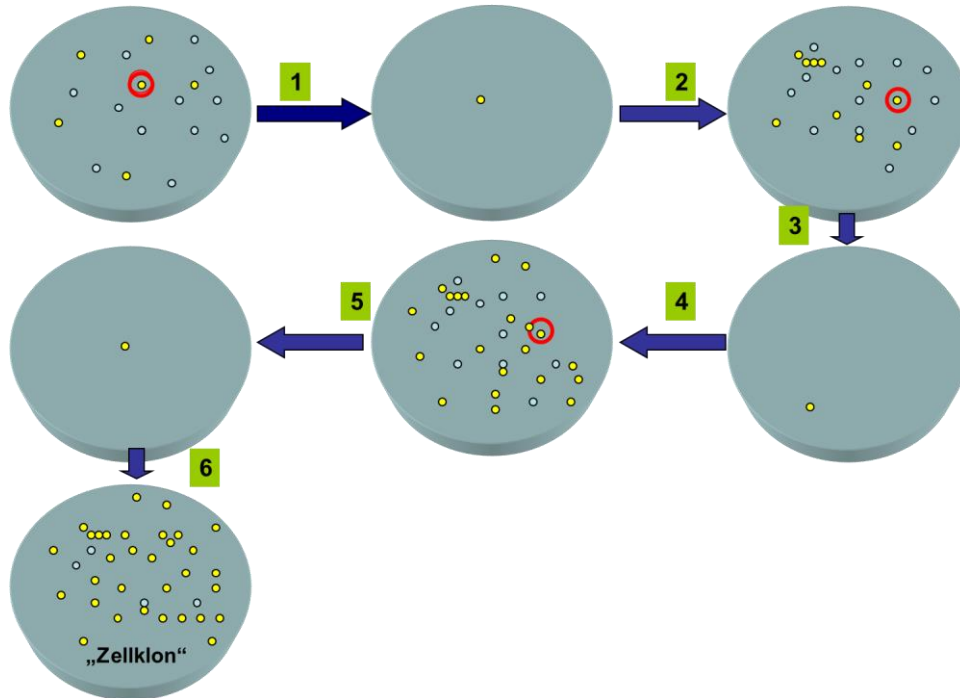


Abb. 5: Isolierung einzelner stabil transfizierter Zellklone mittels Grenzwertverdünnung.

Schematisch abgebildet ist die Isolierung einzelner KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-exprimierender Zellen mittels Grenzwertverdünnung. Die gelben Punkte stellen vereinfacht Zellen bzw. Zellkolonien mit starker, die blauen Punkte Zellen bzw. Zellkolonien mit niedriger KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression dar. Ausgangspunkt waren OV-MZ-6-Zellen, die nach stabiler Transfektion der OV-MZ-6-Zellen mit KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-cDNA in Selektionsmedium bis zum Absterben aller nicht erfolgreich transfizierten Zellen kultiviert wurden. Diese Zellen wurden so dünn auf eine Petrischale ausgesät und ein paar Tage kultiviert, bis aus der einzelnen Zelle eine sichtbare Zellkolonie in der Petrischale herangewachsen war. Diese wurde vorsichtig mit einer Pipette, in der Zellmedium vorgelegt worden war, aufgenommen und in je eine Vertiefung einer 24-well-Platte überführt (1). Dort wuchsen die Zellen bis auf eine Konfluenz von ca. 70% heran (2). Anschließend wurden die Zellen jeweils in eine Vertiefung eines *microchamber slides* aufgebracht, mittels Immunzytochemie (ICC) gefärbt und durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) die KAI1-WT-bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe ermittelt. So wurden einzelne Zellkolonien mit stärkerer KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expressionshöhe im Vergleich zu den WT-OV-MZ-6-Zellen mit niedriger endogener KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expressionshöhe herausselektiert (3). Diese Zellkolonien wurden schließlich wieder auf einer Petrischale vereinzelt und der Vorgang wiederholt (4–6). Nach mehreren Klonierungrunden erhielten wir Zellklone, aus denen wir für experimentelle Untersuchungen solche mit etwa gleicher KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe selektieren konnten.

3.2.4 Immunzytochemie und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Zelltransfektanten hinsichtlich ihrer KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expressionshöhe wurde unter anderem die Immunzytochemie (ICC) und die Auswertung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) verwendet.

Hierzu wurden zunächst zur Verbesserung der Zelladhäsion die Zellkammern eines *microchamber slides* (Glasobjektträger) mit Fibronektin (10 µg/ml PBS) für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-transfizierte WT-OV-MZ-6-

Zellen sowie das Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen auf die Zellkammern des *microchamber slides* ausgesät und über Nacht bei 37°C/ 5% (v/v) CO₂ in Selektionsmedium kultiviert.

Am Folgetag wurde das Selektionsmedium vorsichtig abgesaugt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in PBS, 4% (w/v) PFA für 20 min bei 4°C fixiert. Nach der Fixation wurden die Zellen 3x mit PBS gespült und für 1h bei RT in PBS, 2% (w/v) BSA zur Absättigung unspezifischer AK-Bindungsstellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem gegen KAI1 gerichteten mAK Ts82b in einer Verdünnung von 5 µg/ml PBS, 1% (w/v) BSA bei RT für 60 min inkubiert.

Im Anschluss an 5-6 weitere Waschschriffe in PBS wurde den Zellen der Zweitantikörper in Form eines polyklonalen Alexa-488-konjugierten Antikörpers (Ziege-anti-Maus IgG) in einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS, 1% (w/v) BSA für 45 min hinzugegeben. Danach wurden die Zellen 3-5 x mit PBS gewaschen und am CLSM begutachtet.

Zellen, die weder mit dem Erst- noch mit dem Zweitantikörper behandelt worden waren, wurden zur Ermittlung der Autofluoreszenz genutzt. Zellen, welche nur mit dem Zweitantikörper, jedoch nicht mit dem gegen KAI1-WT bzw. KAI1-Splice gerichteten Erstantikörper inkubiert worden waren, dienten zur Kontrolle der Spezifität des Fluoreszenz-markierten AK. WT-OV-MZ-6-Zellen mit niedriger endogener KAI1-WT-Expression dienten ebenfalls zur Kontrolle der Antikörperspezifität. Deren niedrige KAI1-Expression wurde mit der nach erfolgreicher Transfektion erhöhten KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionsrate verglichen.

Die Begutachtung der Zellen mittels CLSM wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm durchgeführt und hierbei die Fluoreszenzintensität als Maß für die zelluläre Expressionshöhe an KAI1-WT bzw. KAI1-Splice ermittelt.

3.2.5 Durchflusszytofluorometrie

Als weiteres Verfahren zur Bestimmung der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe der Zelltransfektanten wurde die Durchflusszytofluorometrie angewendet.

Bei der Durchflusszytofluorometrie wird ein Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge auf einen Probenstrom (mit Partikeln, hier mit Zellen) in einer Messküvette gerichtet. Dabei kommt es zu einer Reflexion und Streuung des Lichts. Man unterscheidet hierbei eine Streuung in Richtung des Laserstrahls, sogenanntes Vorwärtsstreulicht oder *forward-scatter*, sowie eine Streuung des Lichts in einem 90°-Winkel, welches durch Streuung an bestimmten Zellbestandteilen in der Zelle zustande kommt, das sogenannte Seitwärtsstreulicht oder *side-scatter*. Durch das Vorwärtsstreulicht wird die Zellgröße, durch das Seitwärtsstreulicht die Granularität der Zellen bestimmt. Daneben können bestimmte Eigenschaften bzw. Proteinexpressionsmuster der Zellen durch die Verwendung von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern ermittelt werden. Die Fluo-

reszenzfarbstoffe werden durch den Laser angeregt und emittieren dabei Licht einer bestimmten Wellenlänge (Luttmann, 2009a).

Für die Durchflusszytofluorometrie wurden 200.000 Zellen pro Vertiefung auf eine 6-*well*-Zellkulturplatte ausgesät und bei 37°C/ 5% (v/v) CO₂ für 2-3 Tage im Zellinkubator kultiviert. Am Versuchstag wurden die Zellen in PBS, 0,05% (w/v) EDTA gelöst, die Zellsuspension in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und in diesem bei 246 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml des jeweiligen Selektionsmediums resuspendiert. Die Zellen wurden unter Verwendung von Trypanblau zur Differenzierung lebender und toter Zellen mithilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt.

2x 100.000 Zellen wurden in Polystyrol-Röhrchen mit konischem Boden gegeben und bei 246 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf das Zellpellet abgesaugt. Zur Unterbindung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen in PBS, 2% (w/v) BSA resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert.

Im Anschluss an einen Zentrifugationsschritt wurden die Zellen mit dem gegen KAI1 gerichteten Erstantikörper (#Ts82b) in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS, 1% (w/v) BSA für 1h bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zentrifugiert und in PBS mehrmals gewaschen und schließlich der Alexa-488 konjugierte Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus IgG) in einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS, 1% (w/v) BSA für 45 min bei RT hinzugegeben.

Danach wurden die Zellen erneut in PBS gewaschen, die Zellen in 100 µl PBS, 1% (w/v) BSA aufgenommen und die Durchflusszytofluorometrie durchgeführt.

Alle Experimente wurden mit einem FACS Calibur Sort Cytofluorometer Gerät durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software CellQuest. Die Autofluoreszenz der jeweiligen Zellen wurde in Abwesenheit jeglicher Antikörper gemessen. Die Autofluoreszenz wurde von dem unter Verwendung der Antikörper gemessenen *Mean*-Werten der Fluoreszenzintensität der Zellen subtrahiert.

3.2.6 Westernblot

Als weiteres Verfahren zur Bestimmung der KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expressionshöhe wurden *Westernblot*-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Lysate der Zellen gewonnen.

3.2.6.1 Herstellung von Zellaufschlüssen

Zur Gewinnung von Zelllysaten wurden zunächst 300.000 Zellen in eine Vertiefung einer 6-*well*-Zellkulturplatte ausgesät. Die Platten wurden zwei Tage bei 37°C/ 5% (v/v) CO₂ im Inkubator kultiviert und die Zellen schließlich von der Platte abgelöst. Dazu inkubierten die Zellen 15 min mit 80 µl eines Lyse-Puffers auf Eis.

Danach wurden die lysierten Zellen mit einer Pipette aufgenommen und in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde dann bei 246 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Reagenzgefäß pipettiert.

Lyse-Puffer	50	mM	HEPES (pH 7,5)
	150	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	10%	(v/v)	Glycerin
	1%	(v/v)	Triton X-100
	1/5		einer Tablette des Protease-Inhibitor-Cocktails

3.2.6.2 Bestimmung des Proteingehalts der Zelllysate

Der Proteingehalt der Zelllysatsproben wurde mithilfe eines BCA Protein Kits (*bicinchoninic acid, BCA*) bestimmt.

Die Anwendung des BCA Protein Kits beruht auf der sogenannten Biuret-Reaktion, in der die Aminosäurereste der Peptide mit Kupferionen in alkalischem Milieu einen farbigen Chelatkomplex bilden. Gekoppelt an diesen Reaktionsschritt reagiert Bicinchonin-Säure mit den reduzierten Kupferionen. Aus der Reaktion von zwei Molekülen Bicinchoninsäure mit einem Kupferion resultiert eine Komplexverbindung mit violetter Farbe. Die Komplexverbindung ist wasserlöslich und zeigt eine annähernd lineare Absorption, die mit der Proteinkonzentration ansteigt (Herstellerinformation).

Für die Proteinbestimmung wurde zunächst eine TBS-Stammlösung (pH 8,5) angesetzt (*tris-buffered saline, TBS*). Als Gebrauchslösung wurde dieser Puffer 1:10 mit destilliertem H₂O verdünnt.

Danach wurde mithilfe eines Standardproteins aus reinem BSA eine Verdünnungsreihe pipettiert, die der Aufstellung der Standardkurve für die Proteinkonzentration diene. Außerdem wurde ein Fibrinogenstandard der Firma Boehringer Mannheim verwendet, der später als Kontrolle der Messergebnisse fungierte.

Die im Kit enthaltenen Reagenzlösungen A (Bicinchonin-Säure) und B (4% (w/v) Kupfer(II)-Pentahydrat-Lösung) wurden gemäß der Angaben des Herstellers gemischt. Auf der Mikrotiterplatte wurden je 200 µl der Mischung AB vorgelegt und jeweils 50 µl der Kontrolllösung, der Proben der Verdünnungsreihe oder der Proteinproben hinzugegeben.

Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei RT stengelassen und am folgenden Tag in einem Spektralphotometer bei 540 nm gemessen.

Tris-buffered saline (TBS) Stammlösung	0,2	M	Tris/HCl (pH 8,5)
	7,3%	(w/v)	NaCl

3.2.6.3 Auftrennung der Proteine mithilfe der Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode, Proteine aufgrund ihrer Molekularmasse und ihrer Ladung nach Beladung mit den negativ geladenen SDS-Molekülen aufzutrennen. Durch Polymerisation von Acrylamidmonomeren entsteht ein Polyacrylamidgel, welches ein dreidimensionales Netzwerk darstellt und eine Filterwirkung auf die aufzutrennenden Proteine hat. Durch die engen Maschen wandern kleinere Proteinmoleküle nach Anlegen einer Spannung rascher vorwärts, größere Proteinmoleküle dagegen langsamer. Durch SDS werden die Proteine zudem denaturiert. Durch die negative Ladung des SDS entstehen negativ geladene Komplexe aus SDS und dem denaturierten Protein. Die negative Ladung ist der Molekülmasse des zu untersuchenden Proteins proportional, wenn die Proteine etwa gleich entfaltet sind. Durch Anlegen einer Spannung wandern die SDS-Protein-Komplexe in Richtung der Anode am unteren Ende des Gels und werden in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse und Beladung mit SDS aufgetrennt (Berg, 2003a; Luttmann, 2009c; Gallagher, 2012).

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,5 mm dickes 10%-iges (w/v) (Trenngel) sowie ein 4%-iges (w/v) (Sammelgel) Polyacrylamid-Gel gegossen.

Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden 20 µg Protein und ein nicht-reduzierender Ladepuffer in einem Reagenzgefäß gemischt und 4 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde die Probelösung in die jeweiligen Geltaschen aufgetragen.

Für die Elektrophorese wurde zunächst eine Spannung von 100 V eingestellt. Diese wurde, sobald die Proben die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatten, bis zum Ende der Gelelektrophorese auf 150 V erhöht.

nicht reduzierender Ladepuffer	150	mM	Tris-HCl, pH 6
	15%	(w/v)	SDS
	45%	(v/v)	Glyzerin
	0,01%	(w/v)	Bromphenolblau

Elektrophorese-Puffer (10x)	1,6	M	Glycin
	250	mM	Tris
	40	mM	SDS

Trenngel (10%)

1,5	M	Tris-HCl, pH 8,8	2,5	ml
10%	(w/v)	SDS	100	µl
40%	(w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid	2,5	ml
10%	(w/v)	Ammoniumpersulfat	50	µl
		Tetramethylethyldiamin (TEMED)	7,5	µl
		H ₂ O	4,9	ml

Sammelgel (4%)

0,5	M	Tris-HCl, pH 6,5	2,5	ml
10%	(w/v)	SDS	50	µl
40%	(w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid	500	µl
10%	(w/v)	Ammoniumpersulfat	25	µl
		TEMED	5	µl
		H ₂ O	2	ml

3.2.6.4 Bestimmung der zellulären KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expressionshöhe

Beim Blotting werden die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zum Elektrophoresegel auf eine Membran transferiert (Berg, 2003c).

Für die vorliegende Arbeit wurden die durch Elektrophorese aufgetrennten Proteine mittels Wetblotting auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde hierfür zuvor in Methanol und die Filterpapiere in Wetblotting-Puffer gelegt. Die Membran und das SDS-PAGE wurden zwischen je ein Schwämmchen und zwei Filterpapiere geschichtet. Schließlich erfolgte der Proteintransfer vom SDS-PAGE auf die PVDF-Membran bei einer Geräteeinstellung von 350 mA und 220 V über 1,5 h auf Eis.

Blotting-Puffer

25	mM	Tris
192	mM	Glycin
20%	(v/v)	Methanol

Danach wurden die Membranen über Nacht bei 4°C zur Minimierung unspezifischer Bindungen der Antikörper in Blocking-Puffer (s.u.) geblockt. Die Membranen wurden anschließend mehrfach mit einem TBST-Puffer gewaschen.

Als Erstantikörper wurde ein gegen KAI1 gerichteter monoklonaler Maus-AK (Ts82b) bzw. polyklonaler Kaninchen-AK (H-173) oder monoklonaler Maus-AK (G2) verwendet, welcher in einer Verdünnung von 1 µg/ml in TBST-Puffer (s.u.) zur Membran hinzugegeben und für 1,5 h bei RT inkubiert wurde.

Nach dem Erstantikörper erfolgte ein Waschschrift mit TBST-Puffer.

Als Zweitantikörper wurde ein Ziege-anti-Maus IgG bzw. ein Ziege-anti-Kaninchen IgG in einer Konzentration von 0,2 µg/ml hinzugegeben, das mit einer Merettichperoxidase konjugiert worden war. Dieser Antikörper wurde für 45 min bei RT auf der Membran belassen.

Die reaktiven Proteine wurden mit Hilfe eines ECL® Westernblot Detektionskits nach Herstellerangaben auf einem Film sichtbar gemacht.

Unter Verwendung einer Stripping-Lösung, in die die Membran eine Stunde gelegt worden war, wurde die Antikörperbindung an das Antigen auf der Membran aufgehoben, so dass die Membran für eine zweite Detektion zur Verfügung stand. Nach Lösung der Antikörper und nach einem Waschschrift mit TBST wurde die Membran erneut über Nacht geblockt.

Um den Proteingehalt der einzelnen Proben zu normalisieren und so mögliche Abweichungen in Bezug auf die Beladung des Gels und den Proteintransfer auf die Membran zu korrigieren, wurde ein Housekeeping-Protein, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH), zusätzlich auf der Membran nachgewiesen. Bei sogenannten Housekeeping-Proteinen handelt es sich um ubiquitär, d.h. in jeder menschlichen Zelle vorkommende Proteine.

Der monoklonale gegen GAPDH gerichtete Maus-AK wurde in einer Verdünnung von 0,2 µg/ml in TBST-Puffer auf die Membran pipettiert und für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut mit TBST gewaschen und dann ein sekundärer Ziege-anti-Maus-AK, welcher mit der Merettichperoxidase konjugiert worden war, für weitere 45 min bei RT hinzugegeben. Die reaktiven Proteine wurden erneut mithilfe des ECL® *Westernblot* Detektionskits auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Zur Auswertung der Signalintensität der für KAI1 erhaltenen Proteinbande wurde eine densitometrische Messung mithilfe der Scion Image Software durchgeführt. Hierbei wurde die für das KAI1-Protein ermittelte Intensität der Bande mit der Intensität der GAPDH-Bande verglichen. Der so ermittelte spezifische KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Gehalt der jeweiligen Proteinbande wurde als Quotient aus der Signalintensität für KAI1-WT bzw. KAI1-Splice und der Signalintensität für GAPDH angegeben.

TBST-Puffer (1x)	50	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150	mM	NaCl
	0,1%	(v/v)	Tween-20
Blocking-Puffer	2,5%	(w/v)	Magermilchpulver
	0,5%	(w/v)	BSA
			in 1x TBST- Puffer
Stripping-Puffer	160	mM	Glycin, pH 2,2
	0,1%	(w/v)	SDS
	1%	(v/v)	Tween-20 in dH ₂ O

3.2.6.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Als Kontrolle des Proteintransfers vom Gel auf die Membran und der Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung auf das Gel wurden die Gele nach dem Wetblot mittels Coomassie-Färbung gefärbt. Bei der Coomassie-Färbung handelt es sich um eine unspezifische Färbung von Proteinen.

Für die Coomasie-Färbung wurden die Gele zunächst für 20-30 min mit einer Fixationslösung behandelt, nach einem Waschschrift mit destilliertem H₂O in die Färbelösung überführt und in dieser für 1 h belassen. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift wurden die Gele in 10% (v/v) Essigsäure solange entfärbt, bis der Gelhintergrund farblos war. Daraufhin wurden die Gele für weitere 30 min in eine Trockenlösung transferiert und abschließend in Folien getrocknet.

Fixationslösung	40%	(v/v)	Ethanol
	10%	(v/v)	Essigsäure
			in dH ₂ O
Färbelösung	0,1%	(w/v)	Coomassie brilliant blue
	10%	(v/v)	in 10% (v/v) Essigsäure
			in dH ₂ O
Trockenlösung	25%	(v/v)	Ethanol
	5%	(v/v)	Glycerin
			in dH ₂ O

Entfärbelösung

10% (v/v) Essigsäure

3.2.7 Nachweis der Zell-Matrix-Adhäsionseigenschaften mittels eines In-vitro-Zelladhäsionsassays

Der chromogene Zelladhäsionstest wurde von Landegren entwickelt und für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche modifiziert (Landegren, 1984). Das in diesem Adhäsionstest zugrunde liegende Enzym war die endogene N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase, ein ubiquitär vorkommendes, lysosomales Enzym, dessen derivatisiertes Substrat p-Nitrophenol-N-Acetyl- β -D-Glucosamid für die spektrophotometrische Bestimmung seiner Enzymaktivität genutzt werden kann. Die Absorption des Reaktionsproduktes der Hexosaminidase ist proportional zu Zellzahl und Reaktionszeit (Landegren, 1984).

Die für den Test verwendeten Zellen wurden 3 Tage vor der Versuchsdurchführung gezählt und auf eine Zellkulturflasche oder eine Vertiefung einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät.

Für den Adhäsionstest wurden Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen mit Vitronektin (2 μ g/ml in PBS) oder Kollagen Typ I (5 μ g/ml in PBS) für 1 h bei 4°C beschichtet.

Nach zwei Waschschritten in PBS wurden die Platten in PBS, 2% (w/v) BSA, für 30 min bei 4° C geblockt.

Ein Versuchsansatz beinhaltete das Adhäsionsverhalten der Zellen auf unbeschichtetem Zellkulturmaterial, d. h. in Abwesenheit von Proteinen der EZM. Hierzu wurden die Vertiefungen unbeschichtet in PBS, 2% (w/v) BSA zur Minderung unspezifischer Bindungen der Zellen geblockt.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz des Zellmonolayers von 60-80% abgelöst, in Adhäsionsmedium resuspendiert, gezählt und je 25.000 Zellen pro Vertiefung in Triplicaten ausgesät. Um Fehler beim Zählen zu minimieren, wurden die Zellen mindestens 3x gezählt. Die Zellkulturplatten wurden daraufhin für 2 h in den Inkubator bei 37°C/ 5% CO₂ (v/v) gestellt. In dieser Zeit erfolgte die Adhäsion der Zellen an die mit EZM-Proteinen beschichteten bzw. unbeschichteten Zellkulturplatten. Nach Ablauf der Adhäsionszeit wurden die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Anschließend wurden die Zellkulturplatten zweimal mit PBS gewaschen um nicht adhärente Zellen von der Platte zu spülen. In jede Vertiefung der Zellkulturplatte wurden schließlich 50 μ l PBS vorgelegt und weitere 50 μ l des chromogenen Substrats p-Nitrophenol-N-Acetyl- β -D-Glucosamid hinzupipettiert. Die Umsetzung des Substrats durch die N-Acetyl- β -D-Glucosamid-Hexosaminidase erfolgte bei 37°C/ 5% (v/v) CO₂ und wurde nach 1,5 h mit dem Stopppuffer (s.u.) beendet.

Abschließend erfolgte die Auswertung mit dem Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm. Dabei stellte die ermittelte optische Dichte ein Maß für die Anzahl adhärenter Zellen dar.

Die Linearität zwischen Absorptionsänderung und Zellzahl wurde mithilfe einer Standardkurve gezeigt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe auf die Zellkulturplatte pipettiert.

Adhäsionsmedium	20	mM	HEPES
			GAM-Medium
	0,5%	(w/v)	BSA
Hexosaminidasereagenz	100	mM	Natriumcitrat, pH 5,0
	0,5%	(v/v)	Triton-X 100
	10	mM	p-Nitrophenol-N-Acetyl- β -D-Glucosamid
Stoppuffer	0,2	M	NaOH
	5	mM	EDTA

3.2.8 Untersuchung der Proliferationsaktivität KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierter OV-MZ-6-Zellen mithilfe eines In-vitro-MTT-Assays

Zur Bestimmung der Proliferationsaktivität KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierter OV-MZ-6-Zellen kam ein MTT-Assay zur Anwendung. Bei dieser Methode macht man sich die Reduktion des gelben Tetrazoliums Salzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu violetten Formazankristallen zu Nutze. Diese Reaktion wird durch die mitochondriale Dehydrogenase katalysiert, welche nur in vitalen Zellen aktiv ist. Die Menge des gebildeten Formazans wird mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 550–600 nm gemessen und ist proportional zur Anzahl vitaler Zellen im jeweiligen Versuchsansatz (Luttmann, 2009b).

Pro Versuchsansatz wurden je 5.000 Zellen in 100 μ l DMEM, 10% (v/v) FCS in Triplicaten auf 96-well-Platten ausgesät. Die Aussaat erfolgte dabei gleichzeitig auf 5 verschiedene Platten, da der MTT-Assay wurde nach festgelegten Intervallen nach 24, 48, 72 und 96 h wiederholt wurde. Nach 1h wurde auf die erste Mikrotiterplatte jeweils 20 μ l MTT-Reagenz in jede Vertiefung gegeben und die Platte 2 h bei 37°C/ 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 μ l DMSO auf die Platten gege-

ben. Hierdurch wurden kleine blaue Formazankristalle sichtbar. Die Auswertung erfolgte mit dem Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 590 nm.

Zur Bestimmung des Leerwertes, d.h. des Wertes ohne Zellen, wurden 100 µl des Mediums sowie 20 µl MTT und 100 µl DMSO auf die Platte gegeben und ausgewertet. Der Leerwert wurde vom jeweiligen Messergebnis der Zellklone abgezogen. Die so ermittelten Messergebnisse für die einzelnen Zellklone wurden als Maß für die Anzahl vitaler Zellen in Abhängigkeit der Proliferationszeit aufgetragen und so die Proliferationsaktivität der Zellen bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung stabil KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-transfizierter OV-MZ-6-Ovarialkarzinomzellen

In vielen Tumorarten konnte ein Verlust der KAI1-Expression nachgewiesen werden (Romanska und Berditshevski, 2011). Auch das Ovarialkarzinomzellmodell OV-MZ-6 verfügt nur über eine niedrige endogene KAI1-Expression. Deshalb etablierten wir für die vorliegende Studie ein Ovarialkarzinomzellmodell, bei dem wir zur Wiedereinführung der KAI1-WT- sowie KAI1-Splice-Expression in humane Ovarialkarzinomzellen OV-MZ-6 eine stabile Transfektion durchführten. Hierzu wurden Expressionsvektoren verwendet, welche durch die Klonierung von KAI1-WT- oder KAI1-Splice-cDNA aus humanem Ovarialkarzinomgewebe in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Hygro in vorangegangenen Studien hergestellt worden waren (Ruseva et al., 2009; Hohenester 2010, unveröffentlichte Daten). Für unsere Untersuchungen wurden sowohl WT-OV-MZ-6-Zellen als auch OV-MZ-6-Zellen transfiziert, die bereits in einem vorangegangenen Projekt generiert worden waren und das Integrin $\alpha\beta_3$ überexprimierten (Hapke et al., 2001). Aus den so erzeugten Zelltransfektanten isolierten wir mithilfe einer Grenzwertverdünnung einzelne stabil transfizierte Zellklone (siehe auch 3.2.3). Durch diese Subklonierung über mehrere Klonierungsrunden konnten wir annähernd klonale Zellen isolieren, welche über eine erhöhte KAI1-WT- oder KAI1-Splice-Expression im Vergleich zur endogenen KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expressionshöhe der Vektorkontrolle verfügten.

4.1.1 Nachweis der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe in stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen mittels Westernblot Analyse und Durchflusszytometrie

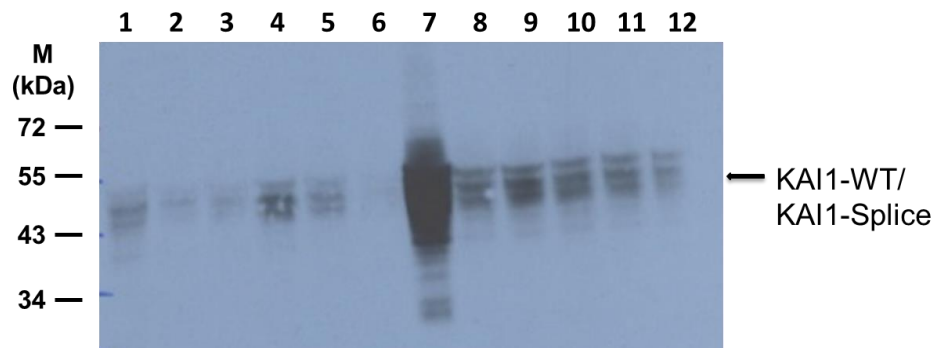
Zur Charakterisierung KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-transfizierter OV-MZ-6-Zellen auf Proteinebene fanden sowohl die Westernblot-Analyse als auch die Durchflusszytometrie Anwendung. Für beide Proteinnachweismethoden wurden verschiedene kommerziell erhältliche KAI1-Antikörper ausgetestet:

1. Ein polyklonales Kaninchen-IgG, welches gegen die Aminosäuren 95–267 am Carboxy-Terminus von KAI1-WT gerichtet ist (Klon H-173, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA),
2. ein monoklonales Maus-IgG, das gegen die Aminosäuren 95–267 am Carboxy-Terminus des KAI1-WT gerichtet ist (Klon G-2, Santa Cruz Biotechnology Inc.),

3. ein monoklonales Maus-IgG, welches gegen KAI1-WT gerichtet ist (Ts82b, Diaclone, Telpel Research Products & Services, Besançon, Frankreich).

Unter Verwendung der Antikörper H-173 und G-2 erhielten wir in der Westernblot-Analyse zahlreiche unspezifische Proteinbanden (Abb. 6). Mit dem gegen KAI1 gerichteten monoklonalen Antikörper (mAK) Ts82b ließ sich eine Proteinbande für KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice nachweisen, welche sich aufgrund der starken Glykosylierung des KAI1-Moleküls von 72 kDa bis 34 kDa erstreckte. Es zeigte sich in den entsprechend transfizierten OV-MZ-6-Zellen im Vergleich zu Vektor-transfizierten OV-MZ-6-Zellen mit niedriger endogener KAI1-Expression eine deutlich höhere KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde aus diesem Grunde einheitlich der mAK Ts82b verwendet.

a)



b)

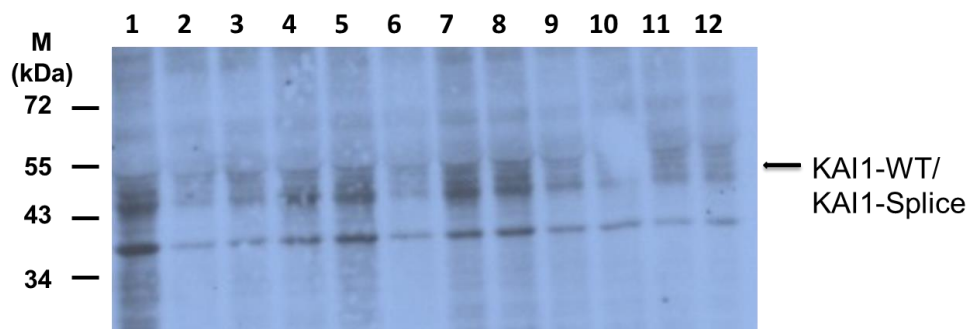


Abb. 6: Austestung verschiedener kommerziell erhältlicher KAI1-Antikörper zum Nachweis von KAI1 in Zelltransfektanten mittels Westernblot.

Hier dargestellt sind Westernblot-Analysen, in der zwei unterschiedliche KAI1-Antikörper hinsichtlich ihrer Fähigkeit das KAI1-Splice-Protein zu detektieren ausgetestet wurden. Die stabilen Zelltransfektanten wurden hierfür lysiert, die zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und das KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Protein mit dem mAK Ts82b (a) sowie dem mAK G-2 (b), die beide gegen KAI1 gerichtet sind, detektiert. In die Geltaschen (1–12) waren jeweils unterschiedliche KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-transfizierte OV-MZ-6-WT- und OV-MZ-6-Zellklone, die das Integrin $\alpha\beta_3$ überexprimierten, aufgetragen worden (1 = WT-KAI1-WT, 2 = WT-KAI1-Splice, 3 = WT-Vektor, 4 = WT-KAI1-WT, 5 = WT-KAI1-Splice, 6 = WT-Vektor, 7 = $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT, 8 = $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice, 9 = $\alpha\beta_3$ -Vektor, 10 = $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT, 11 = $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice, 12 = $\alpha\beta_3$ -Vektor).

Durch die Westernblot-Analyse konnte nach stabiler Transfektion eine Erhöhung der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression in den transfizierten OV-MZ-6-Zellen bestätigt und die jeweilige KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe ermittelt werden. Als Kontrolle dienten untransfizierte WT-OV-MZ-6-Zellen sowie WT-OV-MZ-6-Zellen, die mit dem Expressionsvektor ohne cDNA-Insert für KAI1-WT bzw. KAI1-Splice transfiziert worden waren und nur über eine niedrige endogene KAI1-Expression verfügten. Für die Charakterisierung der Transfektanten wurden verschiedene WT-OV-MZ-6-Zellklone lysiert, welche über eine unterschiedliche KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression verfügten (KAI1-WT #1, KAI1-WT #2, KAI1-Splice #1, KAI1-Splice #2) (Abb. 7). Die zellulären Proteine wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression mithilfe des mAK Ts82b nachgewiesen. Die reaktiven Proteine wurden wie unter 3.2.6 beschrieben schließlich unter Verwendung des ECL® Kits auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Zur Quantifizierung der Expressionshöhe führten wir anhand einer repräsentativen Westernblot-Analyse eine densitometrische Auswertung mithilfe einer speziellen Software (ScionImage) durch. Um Unregelmäßigkeiten bzgl. der Proteinbeladung der Gele und der Blottingeffizienz zu normalisieren, wurde zusätzlich der Gehalt des Housekeeping-Enzyms Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) bestimmt und ebenfalls densitometrisch ausgewertet. Aus den so ermittelten Werten wurde ein Quotient aus der Bandensignalintensität für KAI1-WT bzw. KAI1-Splice und GAPDH gebildet. Der Quotient für Vektor transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurde als Ausgangswert verwendet (d.h. = 1 gesetzt), und die n-fache Expressionshöhe für KAI1-WT bzw. KAI1-Splice angegeben. Zur Vereinfachung wird einheitlich die Nomenklatur wie im Methodenteil unter 3.1.1 beschrieben verwendet.

Die so ermittelten Ergebnisse zeigten, dass das KAI1-Splice-Expressionsniveau von WT-KAI1-Splice-Zellen um das 3-fache, die KAI1-WT-Expression von WT-KAI1-WT-Zellen um das 2- bis 3-fache über der endogenen KAI1-WT-Expression der WT-Vektor-Zellen lag. Bei zwei WT-KAI1-Splice-Zellklonen (KAI1-Splice #2, #3) konnte in einer Messung sogar eine 9- bzw. 13-fach erhöhte KAI1-Splice-Expression über dem endogenen KAI1-WT-Expressionsniveau der WT-OV-MZ-6-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 7).

Nach dem gleichen Vorgehen wurde die KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression der das Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen nach stabiler Transfektion mit KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-cDNA mittels der Westernblot-Analyse bestimmt. Auch die das Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen verfügen nur über eine geringe endogene KAI1-Expression. Durch Wiedereinführung der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression in diese Zellen sollte der Effekt der KAI1-Spleißvariante auf die Funktion des Integrins $\alpha\beta_3$ untersucht werden.

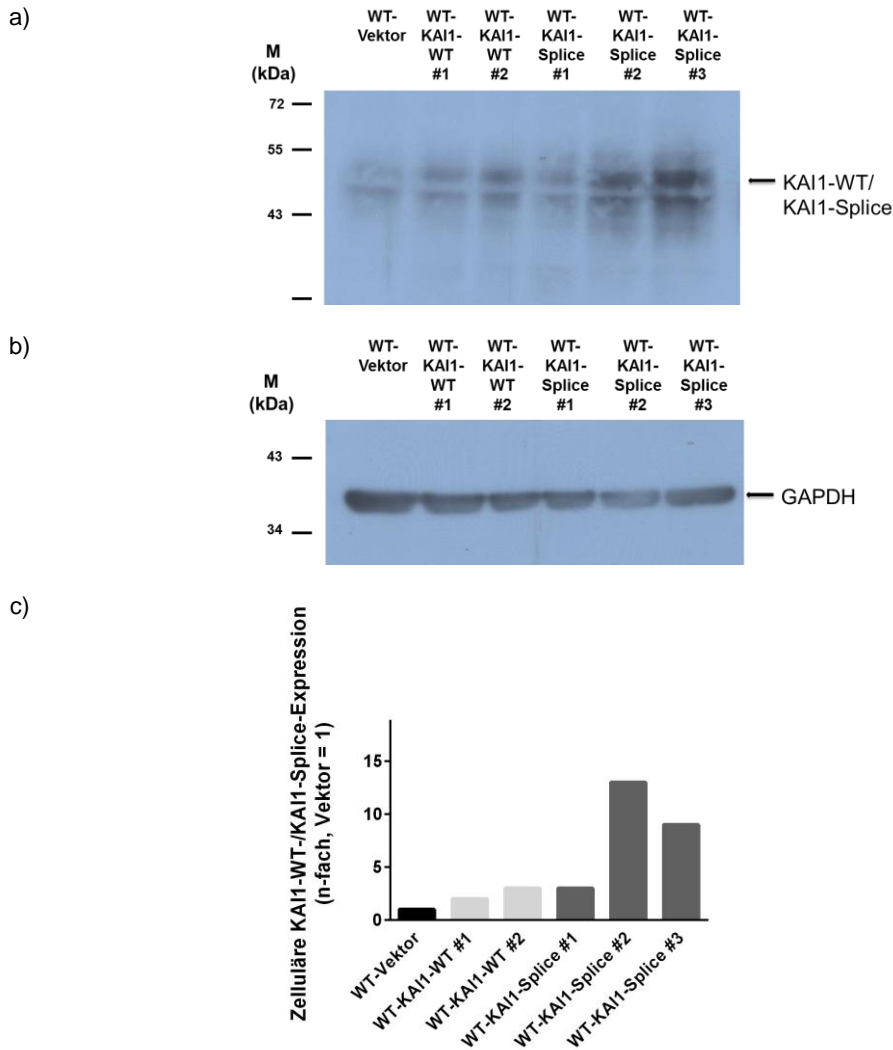


Abb. 7: Nachweis der KAI1-WT/KAI1-Splice-Expression in WT-KAI1-WT- bzw. WT-KAI1-Splice-Zellen mithilfe der Westernblot-Analyse.

Die KAI1- bzw. KAI1-Splice-Proteinexpression wurde in Zelllysaten von WT-KAI1-WT- bzw. WT-KAI1-Splice- sowie WT-Vektor-Zellen mittels Westernblot-Analyse ermittelt. (a) Stabile Transfektanten wurden lysiert, die zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und das KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Protein mit dem mAK Ts82b, der gegen KAI1 gerichtet ist, nachgewiesen. (b) Um unterschiedliche Proteinbeladungen der Gele und Unterschiede der Blottingeffizienz auszugleichen, wurde zusätzlich der Gehalt des Housekeeping-Enzyms GAPDH bestimmt. (c) Die Signalintensität der Proteinbanden wurde densitometrisch ausgewertet und ein Quotient aus den Werten für KAI1-WT bzw. KAI1-Splice und GAPDH gebildet. Als Ausgangswert wurde der so ermittelte Wert für die WT-Vektor-Zellen, welche eine niedrige endogene KAI1-WT-Expression aufwiesen, verwendet (=1) und so die n-fache KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe angegeben. Hier dargestellt ist eine repräsentative Westernblot-Analyse mit Zelllysaten sowohl WT-Vektor- als auch verschiedener WT-KAI1-WT- bzw. WT-KAI1-Splice-Zellklone (WT-Vektor, WT-KAI1-WT #1, WT-KAI1-WT #2, WT-KAI1-Splice #1, WT-KAI1-Splice #2, WT-KAI1-Splice #3).

Die mittels Westernblot-Analyse ermittelte KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expressionshöhe der $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- bzw. $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen wurde mit dem KAI1-Gehalt in Vektor-transfizierten, Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen ($\alpha\beta_3$ -Vektor-Zellen) verglichen. Als Ausgangswert wurde nach densitometrischer Auswertung sowie Normalisierung mit GAPDH der Wert für die KAI1-Expression der $\alpha\beta_3$ -Vektor-Zellen gleich

1 gesetzt, um die n-fache Expressionshöhe der $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- bzw. $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen angeben zu können. Hier zeigte sich in einer repräsentativen Westernblot-Analyse, dass die KAI1-Splice-Expression der $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen um das 3-fache, die KAI1-WT-Expression der $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT-Zellen um das 1,5-fache über der endogenen KAI1-WT-Expression der $\alpha\beta_3$ -Vektor-Zellen lag (Abb. 8)

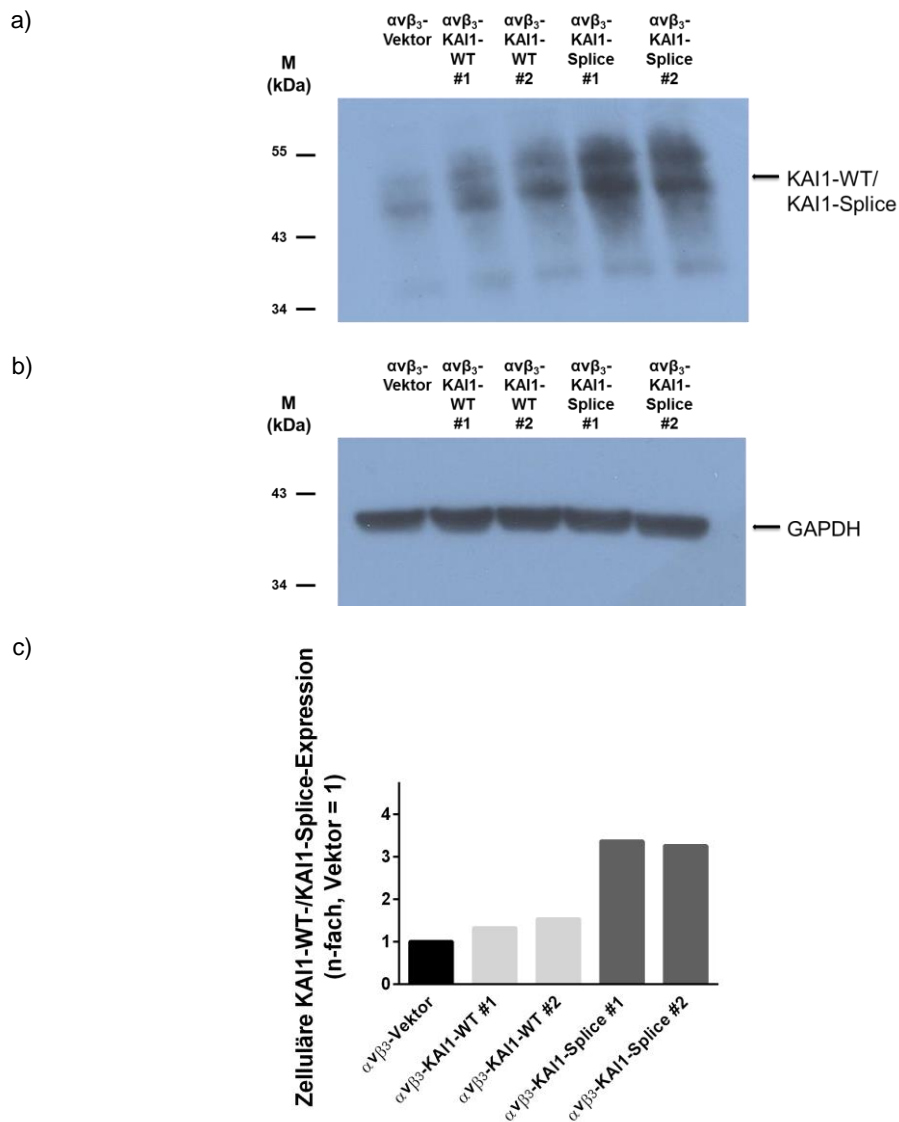


Abb. 8: Nachweis der KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression in KAI1-WT- bzw. KAI1-Spice-transfizierten, Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen mithilfe der Westernblot-Analyse.

Mittels Westernblot-Analyse wurde die KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe der $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-, $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- und $\alpha\beta_3$ -Vektor-Zellen ermittelt. (a) Stabile Transfektanten wurden lysiert, die zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und das KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Protein mit mAK Ts82b nachgewiesen. (b) Um unterschiedliche Proteinbeladungen der Gele und Unterschiede der Blottingeffizienz auszugleichen, wurde zusätzlich der Gehalt des Housekeeping-Enzyms GAPDH bestimmt. (c) Hier dargestellt ist eine densitometrische Analyse einer repräsentativen Westernblot-Analyse mit Lysaten von Vektor sowie KAI1-WT- bzw. KAI1-Spice-transfizierten, Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellklonen ($\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice #1, $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice #2, $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT #1, $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT #2 und $\alpha\beta_3$ -Vektor). Die Signalintensität der Proteinbanden wurde densitometrisch ausgewertet und ein Quotient aus den Werten für KAI1-WT/KAI1-Splice und GAPDH erstellt. Als Ausgangswert wurde der so ermittelte Wert für die $\alpha\beta_3$ -Vektor-Zellen, welche eine niedrige endogene KAI1-WT-Expression aufweisen, verwendet (= 1 gesetzt) und so die n-fache KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression angegeben.

4.1.2 Nachweis der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression in stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen mittels Durchflusszytofluorometrie

Parallel zur Westernblot-Analyse wurde die KAI1-WT/KAI1-Splice-Expression in stabilen Zelltransfektanten mittels Durchflusszytofluorometrie bestimmt. Die Vektor-transfizierten WT-OV-MZ-6-Zellen mit niedriger endogener KAI1-WT-Expression dienten auch für die Durchflusszytofluorometrie als Kontrolle. Zur Detektion der KAI1-Oberflächenproteine wurden der gegen KAI1 gerichtete mAK Ts82b sowie ein sekundäres Alexa-488-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG hinzugegeben. Die Durchflusszytofluorometrie wurde, wie im Material- und Methodenteil unter 3.2.5 beschrieben, durchgeführt. Die Autofluoreszenz der Zellprobe wurde in Abwesenheit jeglicher Antikörper gemessen. Für die Auswertung wurde der jeweilige Mittelwert der Fluoreszenzintensität (FACS Mean) als Maß für die KAI1-WT-/KAI1-Splice-Oberflächenexpression verwendet. Für die WT-KAI1-Splice-Zellen konnte in einer repräsentativen Durchflusszytofluorometrie eine 2-fache KAI1-Splice-Expression, für WT-KAI1-WT-Zellen eine 1,3-fache KAI1-Expression im Vergleich zur endogenen KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression der WT-Vektor-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 9).

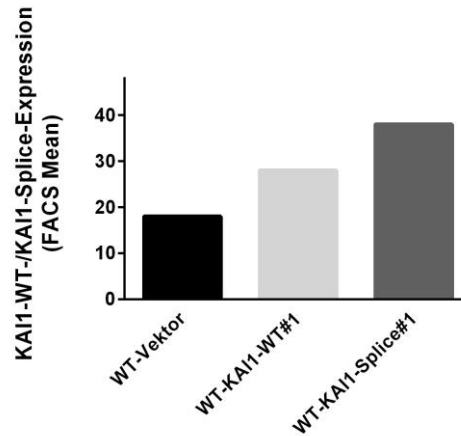
Die FACS-Analysen der Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen wurden nach dem gleichen Vorgehen durchgeführt. In einer repräsentativen Durchflusszytofluorometrie ließ sich für die $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT-Zellen im Vergleich zur endogenen KAI1-WT-Expression der Vektorkontrolle eine 2,4-fach erhöhte KAI1-WT-Expression, für die $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen eine 4,5- bzw. 3,3-fach erhöhte KAI1-Splice-Expression nachweisen (Abb. 9).

4.1.3 Charakterisierung der KAI1-WT/KAI1-Splice-Expression in transfizierten OV-MZ-6-Zellen durch Immunzytochemie und Auswertung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Zusätzlich zur Westernblot- und FACS-Analyse wurde die KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression in stabilen Zelltransfektanten durch immunzytochemische Färbung (ICC) und Auswertung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) bestimmt.

Für die ICC wurden sowohl KAI1-WT- als auch KAI1-Splice-transfizierte WT-OV-MZ-6-Zellen auf FN-beschichtete *microchamber slides* ausgesät. Vektor-transfizierte WT-OV-MZ-6-Zellen mit niedriger endogener KAI1-Expression dienten zum Vergleich. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und in 4% (w/v) PFA fixiert. Das KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Antigen wurde immunzytochemisch mit dem gegen KAI1 gerichteten mAK Ts82b nachgewiesen. Anschließend wurde ein sekundäres Alexa-488-konjugiertes IgG hinzugegeben. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde mithilfe der CLSM bei einer Anregungswellenlänge (*excitation*) von 488 nm ausgewertet.

a)



b)

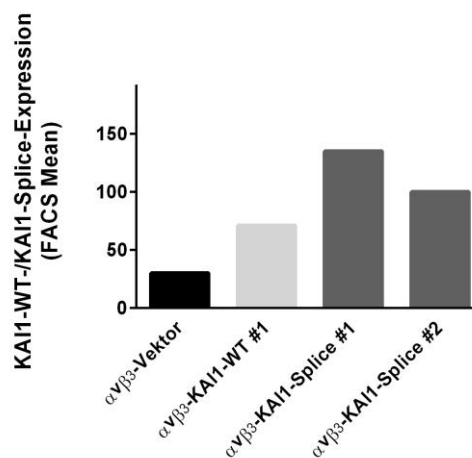


Abb. 9: Nachweis der KAI1-WT-/KAI1-Splice-Oberflächenexpression vitaler Zelltransfektanten mithilfe der Durchflusszytometrie.

Dargestellt ist das Ergebnis einer repräsentativen Durchflusszytometrie. Untersucht wurden verschiedene vitale WT-KAI1-WT, WT-KAI1-Splice- und WT-Vektor-Zellklone (a) sowie $\alpha\text{V}\beta_3$ -KAI1-WT-, $\alpha\text{V}\beta_3$ -KAI1-Splice- und $\alpha\text{V}\beta_3$ -Vektor-Zellklone (b). Die jeweils korrespondierenden Vektor-transfizierten Zellen mit niedriger endogener KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression dienten als Vergleich. Zur Detektion der KAI1-Oberflächenproteine wurden der gegen KAI1 gerichtete mAK Ts82b sowie ein sekundäres Alexa-488-konjugiertes IgG verwendet. Die durch die FACS-Analyse ermittelten Mittelwerte für die Fluoreszenzintensität (FACS Mean) stellen ein Maß für die KAI1-WT-/KAI1-Splice-Oberflächenexpression der Zellen dar.

Auch mit diesem methodischen Ansatz konnte eine erfolgreiche Wiedereinführung der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression nach stabiler Transfektion von WT-OV-MZ-6-Zellen nachgewiesen werden. Zudem wiesen die stabil transfizierten WT-OV-MZ-6-Zellklone (KAI1-WT#1, #2, KAI1-Splice #1, #2) jeweils eine unterschiedliche KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe auf (Abb. 10).

So ließ sich für den WT-KAI1-Splice-Zellklon 1 gegenüber dem WT-KAI1-Splice-Zellklon 2 eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität und damit KAI1-Splice-Expression nachweisen.

WT-Vektor WT-KAI1-WT #1 WT-KAI1-WT #2 WT-KAI1-Splice #1 WT-KAI1-Splice #2

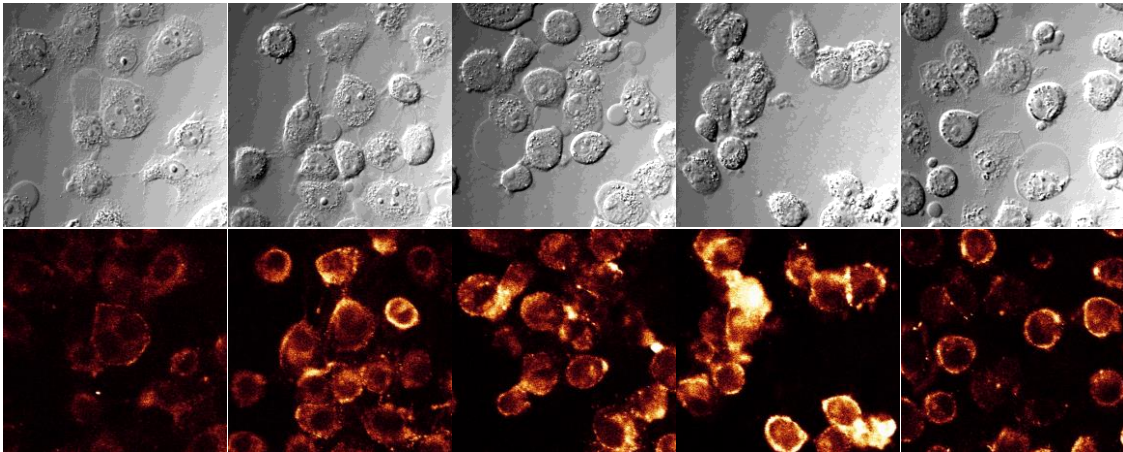


Abb. 10: Detektion der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression in stabil transfizierten WT-OV-MZ-6-Zellen mittels ICC sowie Auswertung am CLSM.

KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-transfizierte WT-OV-MZ-6-Zellklone wurden auf *mircochamber slides* ausgesät und für 48 h kultiviert. Nach Fixation der Zellen in 4% (w/v) PFA wurden die Zellen in PBS, 2% (w/v) BSA geblockt. Die KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression wurde mit dem gegen KAI1 gerichteten mAK Ts82b nachgewiesen. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ausgewertet. Dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen stabil transfizierter Zellklone sowie die korrespondierenden Differential-Interferenz-Kontrast-Bilder. Ersichtlich ist eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität und somit KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression nach stabiler Transfektion mit KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-cDNA. Zudem wiesen die individuellen, stabil transfizierten WT-OV-MZ-6-Zellklone (WT-KAI1-WT #1, #2, WT-KAI1-Splice #1, #2) eine unterschiedlich hohe KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression auf.

Analog zu den WT-KAI1-WT- und WT-KAI1-Splice-Zellen wurde die KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression in den stabil transfizierten, Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellklonen mittels ICC und Auswertung am CLSM nachgewiesen. $\alpha\beta_3$ -Vektor-Zellen mit niedriger endogener KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression dienten zum Vergleich. Nach stabiler Transfektion ließ sich auch in diesen Untersuchungen eine erhöhte KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression in $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- sowie $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen nachweisen. Außerdem ließen sich auch hier zwischen den individuellen stabil transfizierten Zellklonen ($\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice #1, $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice #2) Unterschiede hinsichtlich der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe beobachten (Abb.11). So wies der $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklon 1 gegenüber dem $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklon 2 eine stärkere Fluoreszenzintensität und damit KAI1-Splice-Expressionshöhe auf. Für beide $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklone ließ sich eine stärkere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT-Zellen nachweisen.

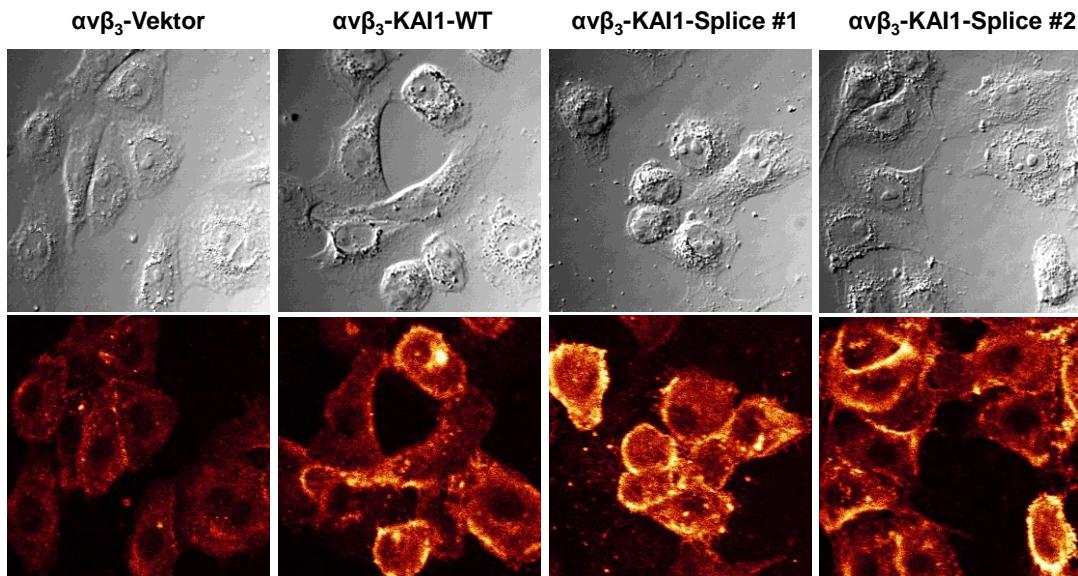


Abb. 11: Detektion der KAI1-WT/KAI1-Splice-Expression in stabil transfizierte, Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen mittels ICC sowie Auswertung am CLSM.

Integrin- $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- und - $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklone wurden auf *mircochamber slides* ausgesät und für 48 h kultiviert. Nach Fixation der Zellen in 4% (w/v) PFA wurden die Zellen in PBS, 2% (w/v) BSA geblockt. Die KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression wurde mit dem gegen KAI1 gerichteten mAK Ts82b nachgewiesen. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ausgewertet. Dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen stabil transfizierter Zellklone sowie die korrespondierenden Differential-Interferenz-Kontrast-Bilder. Ersichtlich ist eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität und somit KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression nach stabiler Transfektion von Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen. Zudem wiesen die individuellen stabil transfizierten, Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellklone ($\alpha\beta_3$ -KAI1-WT #1, $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice #1, #2) eine unterschiedlich starke KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression auf. So zeigte sich für $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen #1 gegenüber den $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen #2 eine stärkere Fluoreszenzintensität und damit KAI1-Splice-Expressionshöhe. Beide $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklone wiesen eine höhere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT-Zellen auf.

4.2 Ermittlung der Adhäsionskapazität KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-transfizierter OV-MZ-6-Zellen mittels eines In-vitro-Zelladhäsionstests

In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Integrin $\alpha\beta_3$ im humanen Ovarialkarzinom fast ausschließlich seinen EZM-Liganden VN bindet und dass eine erhöhte Integrin $\alpha\beta_3$ -Expression zu einer verstärkten Adhäsion an VN führt (Hapke et al., 2003). Als Effekt der Wiedereinführung der KAI1-WT-Expression in humane Ovarialkarzinomzellen konnte zusätzlich eine dosisabhängig verstärkte Integrin $\alpha\beta_3$ -vermittelte Adhäsion an VN beobachtet werden (Ruseva et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden daher funktionelle Unterschiede zwischen KAI1-WT und KAI1-Splice hinsichtlich der Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelten Adhäsion untersucht.

4.2.1 Adhäsionskapazität von KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierten WT-OV-MZ-6-Zellen

Für die Untersuchung der Adhäsionskapazität KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-transfizierter WT-OV-MZ-6-Zellen wurden die Zellen sowohl auf VN-beschichteten als auch auf unbeschichteten 96-well-Zellkulturplatten innerhalb von 2 h zur Adhärenz gebracht. Anschließend wurde den Zellen ein chromogenes Substrat für das lysosomale Enzym N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase hinzugegeben und die Umsetzung des Substrats nach 1,5 h mit einem Stopppuffer beendet (siehe 3.2.7). Der damit einhergehende Farbumschlag des Substrates wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und verhält sich proportional zur Anzahl adhärenter Zellen. Diese Linearität zwischen Absorptionsänderung und Zellzahl wurde anhand einer Standardkurve, welche mithilfe einer Verdünnungsreihe aus OV-MZ-6-Zellen erstellt wurde, gezeigt. Für die unten aufgeführte statistische Auswertung (Abb. 12) wurden die Werte aus 5 Versuchen mit gleichem Versuchsansatz verwendet. Nach Normalisierung der einzelnen Versuche, indem der Wert der optischen Dichte (OD) der adhärenen WT-KAI1-WT-Zellen auf 100% gesetzt wurde, zeigten WT-KAI1-Splice-Zellen eine 1,2-fach stärkere Adhäsion an VN als WT-KAI1-WT-Zellen.

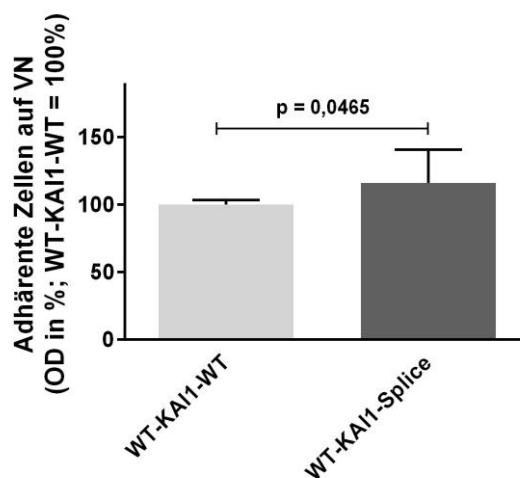


Abb. 12: Adhäsionskapazität KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierter WT-OV-MZ-6-Zellen an VN.

25.000 WT-KAI1-WT- bzw. WT-KAI1-Splice-Zellen adhärten für 2 h an VN-beschichtete und unbeschichtete Zellkulturplatten. Die experimentellen Ansätze erfolgten in Triplikaten. Im Anschluss wurde den Zellen ein chromogenes Substrat für das lysosomale Enzym N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h wurde die Umsetzung des Substrats mit einem Stopppuffer beendet. Der damit einhergehende Farbumschlag wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm ermittelt und verhielt sich proportional zur Anzahl adhärenter Zellen. Der Wert für die optische Dichte (OD) der WT-KAI1-WT-Zellen wurde gleich 100% gesetzt und so der Prozentwert für die WT-KAI1-Splice-Zellen errechnet. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um die Messwerte aus 5 Experimenten (n=15). Dargestellt ist zudem die Standardabweichung. Die p-Werte wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Eine statistische Signifikanz wird ab einem p-Wert < 0,05 (5%-Signifikanzniveau) angenommen.

Um die erhaltenen Messwerte der Adhäsionstests an einer unterschiedlichen KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expressionshöhe in den transfizierten Zellklonen zu normalisieren, ermittelten wir in zeitlich parallel durchgeführten FACS-Analysen jeweils die KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe. Zur Normalisierung der einzelnen Adhäsionsversuche (= 5) wurde zunächst erneut der Wert für die OD der WT-KAI1-WT-Zellen gleich 100% gesetzt und so der Prozentwert für die WT-KAI1-Splice-Zellen errechnet. Die Prozentwerte der WT-KAI1-WT- bzw. WT-KAI1-Splice-Zellen wurden anschließend durch die jeweilige n-fache Expressionshöhe (s. 4.1.2) dividiert. Nach diesem Verfahren konnte für WT-KAI1-WT-Zellen eine 1,2-fach stärkere Adhäsion an VN im Vergleich zu WT-KAI1-Splice-Zellen ermittelt werden (Abb. 13). Die Ergebnisse erreichten jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau ($p = 0,0539$, 5%-Signifikanzniveau).

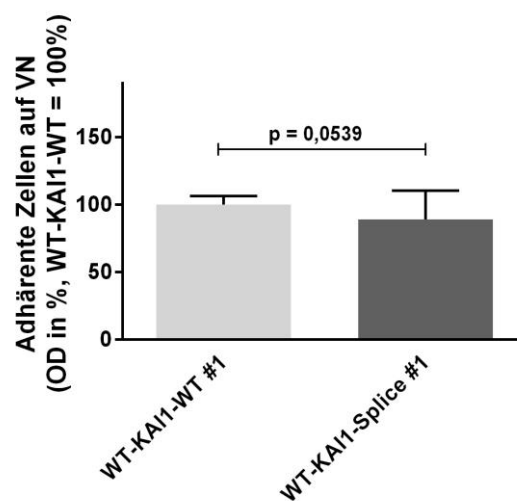


Abb. 13: Adhäsionskapazität KAI1-WT- und KAI-Splice-transfizierter WT-OV-MZ-6-Zellen unter Berücksichtigung der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Oberflächenexpressionshöhe in den eingesetzten transfizierten Zellklonen.

Dargestellt ist die ermittelte OD in Prozentwerten als Maß für die Anzahl adhärenter WT-KAI1-WT- sowie WT-KAI1-Splice-Zellen an VN nach Durchführung einer Normalisierung mit den Mittelwerten der Fluoreszenzintensität (FACS Mean) als Maß für die zelluläre KAI1-WT-/KAI1-Splice-Oberflächenexpressionshöhe. Die OD der adhärenter WT-KAI1-WT- Zellen wurde initial gleich 100% gesetzt und so der korrigierte Wert der adhärenter WT-KAI1-Splice-Zellen aus den Messwerten von 5 Experimenten errechnet. Die Prozentwerte der WT-KAI1-WT- bzw. WT-KAI1-Splice-Zellen wurden anschließend durch die jeweilige n-fache Expressionshöhe, welche in parallel durchgeführten FACS-Analysen ermittelt wurde (s. 4.1.2), dividiert.

Des Weiteren wurden die Unterschiede hinsichtlich der Adhäsionskapazität von WT-KAI1-WT- sowie WT-KAI1-Splice-Zellen in Abhängigkeit von der Anwesenheit von VN als Adhäsionsmatrix untersucht. Die absolute Zellzahl als Maß adhärenter Zellen an VN bzw. an unbeschichtetem Zellkulturmaterial wurde mithilfe der Standardkurve ermittelt. Im Vergleich zu Adhäsionsversuchen in Abwesenheit von VN, zeigte sich auf VN-beschichteten Zellkulturoberflächen eine bis zu 3-fach stärkere Adhäsion von sowohl WT-KAI1-WT- als auch WT-KAI1-Splice-Zellen (Abb. 14).

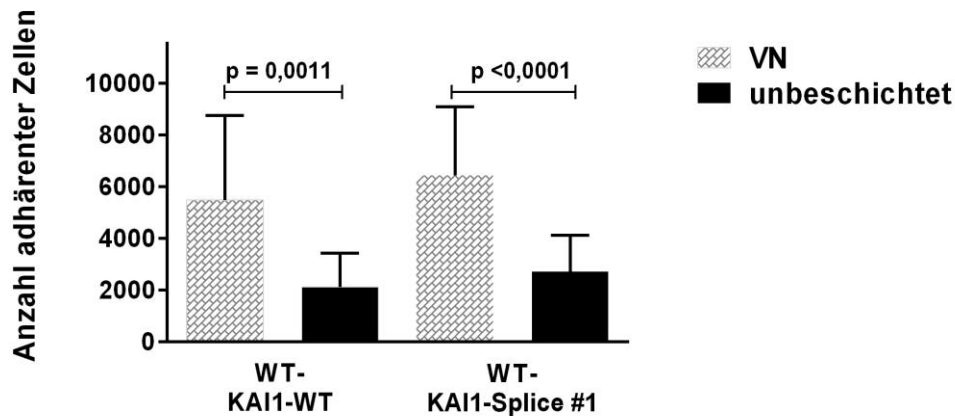


Abb. 14: Effekt von VN auf die Adhäsionskapazität von KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierten WT-OV-MZ-6-Zellen.

Dargestellt ist die Anzahl adhärenter WT-KAI1-WT- als auch WT-KAI1-Splice-Zellen in An- und Abwesenheit des EZM-Liganden VN. Die absolute Zellzahl wurde mithilfe der Standardkurve ermittelt. Dargestellt sind die Messwerte aus 5 verschiedenen Experimenten mit jeweils Triplikaten und die jeweilige Standardabweichung. WT-KAI1-WT- als auch WT-KAI1-Splice-Zellen zeigten eine bis zu 3-fach stärkere Adhäsion auf VN im Vergleich zur Zelladhäsion in Abwesenheit von VN. Die p-Werte wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Eine statistische Signifikanz wird ab einem p-Wert < 0,05 (5%-Signifikanzniveau) angenommen.

4.2.2 Ermittlung der Adhäsionskapazität von KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierten, Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen

In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde für KAI1-WT eine dosisabhängige Steigerung der Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelten Zelladhäsion nachgewiesen (Ruseva et al., 2009). Ein Schwerpunkt der Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Wiedereinführung der KAI1-Splice-Expression in humane Ovarialkarzinomzellen einen Einfluss auf die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion hat. Für die folgenden Adhäsionsstudien wurden $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- sowie $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklone verwendet.

Für die Versuche wurden die Zellen analog zum Versuchsansatz der WT-OV-MZ-6-Zellen sowohl auf VN- als auch auf unbeschichteten *96-well*-Zellkulturplatten zur Adhärenz gebracht und für die unten aufgeführte statistische Auswertung (Abb. 15) Messwerte aus 7 Versuchen mit Triplikaten mit gleichem Versuchsansatz verwendet. Nach Normalisierung der einzelnen Versuche, indem der Wert für die OD der adhärenen $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT-Zellen auf 100% gesetzt und so der jeweilige Prozentwert für die adhärenen $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen ermittelt wurde, zeigte sich nach Wiedereinführung einer KAI1-Splice-Expression in OV-MZ-6-Zellen, die das Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierten, eine dosisabhängige Verminderung der Zelladhäsion an VN:

Der $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklon 1 ($\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice #1) zeigte eine 17%, der $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklon 2 ($\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice #2) eine 13% niedrigere Adhäsion an VN im Vergleich zu $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT-Zellen.

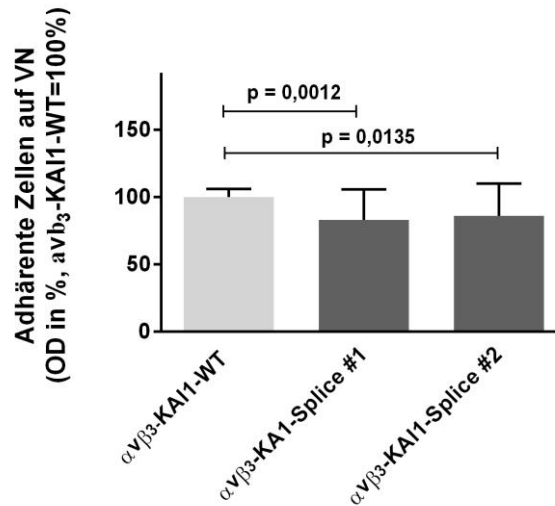


Abb. 15: Adhäsionskapazität von KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierten, Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen.

25.000 $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- und $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen adhärten für 2 h an VN- und unbeschichtete Zellkulturplatten. Im Anschluss wurde den Zellen ein chromogenes Substrat für das lysosomale Enzym N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase hinzugeben. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h wurde die Umsetzung des Substrats mit einem Stoppuffer beendet und der damit einhergehende Farbumschlag photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm als Maß für die Anzahl adhären Zellen ermittelt. Der Wert für die OD der adhären $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT-Zellen wurde gleich 100% gesetzt und so die Prozentwerte für die $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen errechnet. Bei den abgebildeten Ergebnissen handelt es sich um die Messwerte aus 7 Experimenten mit jeweils Triplikaten und die jeweiligen Standardabweichungen. Die p-Werte wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Eine statistische Signifikanz wird ab einem p-Wert < 0,05 (5%-Signifikanzniveau) angenommen.

Um die erhaltenen Messwerte der Adhäsionstests an einer unterschiedlichen KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe in den transfizierten Zellklonen zu normalisieren, ermittelten wir auch für die $\alpha\beta_3$ -Zelltransfektanten in parallel durchgeführten FACS-Analysen jeweils die KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe der individuellen $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- und $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklone. Zur Normalisierung der einzelnen Adhäsionsversuche wurde zunächst der Wert für die OD der $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT-Zellen gleich 100% gesetzt und so der Prozentwert für die $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklone errechnet. Die Prozentwerte der $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT Zellen bzw. $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklone wurden anschließend durch die jeweilige n-fache Expressionshöhe (s. 4.1.2) dividiert. Die so errechnete, korrigierte OD der adhären $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT-Zellen wurde wiederum auf 100% gesetzt und so die korrigierte OD der adhären $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen in Prozent ermittelt. Nach diesem Verfahren zeigte der $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklon #1 eine um mehr als 60%, der $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklon #2 eine um 40% verminderte Adhäsion an VN im Vergleich $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT-Zellen (Abb. 16). Demzufolge führte die Wieder-

eingührung der KAI1-Splice-Expression in OV-MZ-6-Zellen, die das Integrin $\alpha\beta_3$ überexprimierten, zu einer dosisabhängigen Verminderung der Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelten Zelladhäsion.

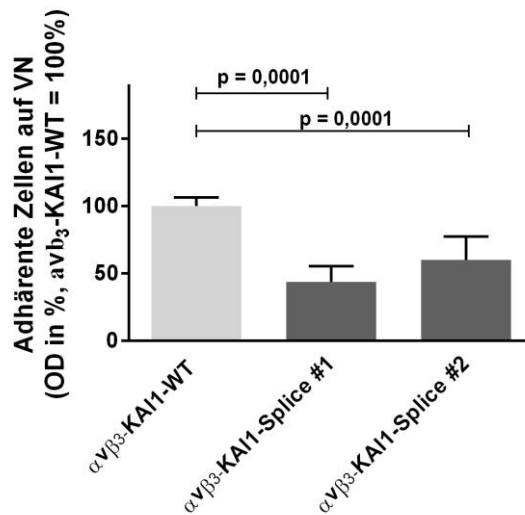


Abb. 16: Adhäsionskapazität von KAI1-WT- und KAI-Splice-transfizierten, das Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen an VN unter Berücksichtigung der KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Oberflächenexpression.

Dargestellt ist die ermittelte OD in Prozent als Maß für die Anzahl adhärenter $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- und $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen nach Durchführung einer Normalisierung mit den Mittelwerten der Fluoreszenzintensität (FACS Mean) als Maß für die KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Oberflächenexpressionshöhe. Die OD der $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT-Zellen wurde 100% gesetzt und so der Prozentwert der $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen ($\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice #1, #2) aus den Messwerten aus 7 Experimenten mit jeweils Triplikaten errechnet. Die Prozentwerte der $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- bzw. $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen wurden anschließend durch die jeweilige n-fache Expressionshöhe, welche in parallel durchgeführten FACS-Analysen ermittelt wurde (s. 4.1.2), dividiert.

Analog zu den WT-OV-MZ-6-Zellen wurde die Adhäsionskapazität der $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- und $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen in An- und Abwesenheit von VN als Matrixprotein untersucht. Hier zeigte sich für $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- und $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen an VN eine bis zu 3-fach stärkere Adhäsion im Vergleich zur Adhäsion auf unbeschichtetem Zellkulturmaterial (Abb. 17). Hier wurde das statistische Signifikanzniveau erreicht ($p = 0,023$).

Die Wiedereinführung der KAI1-Splice-Expression in Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen führte damit zu einer dosisabhängigen Verminderung der Zelladhäsion auf VN. Dagegen blieb die Adhäsionskapazität auf unbeschichtetem Zellkulturmaterial, d.h. in Abwesenheit jeglicher Wachstumssubstrate und Bestandteile der EZM, durch die Wiedereinführung der KAI1-Splice-Expression unbeeinflusst.

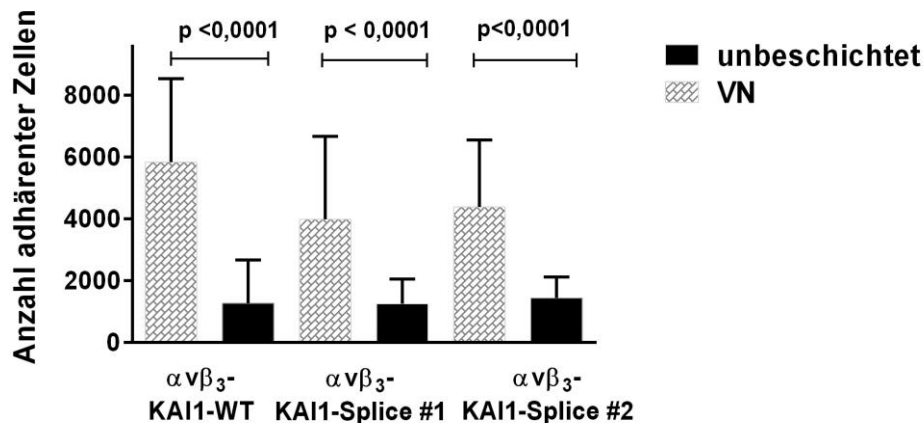


Abb. 17: Effekt von VN auf die Adhäsionskapazität von KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierten, Integrin $\alpha v\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen.

Dargestellt ist die Anzahl adhärenter $\alpha v\beta_3$ -KAI1-WT- als auch $\alpha v\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen in An- und Abwesenheit des EZM-Liganden VN. Die absolute Zellzahl wurde mithilfe der Standardkurve ermittelt. Dargestellt sind die Messwerte aus 5 verschiedenen Experimenten mit jeweils Triplikaten und die jeweilige Standardabweichung. Sowohl $\alpha v\beta_3$ -KAI1-WT- als auch $\alpha v\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen zeigten eine bis zu 3-fach stärkere Adhäsion an VN im Vergleich zur Zelladhäsion in Abwesenheit von VN. Die p-Werte wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Eine statistische Signifikanz wird ab einem p-Wert < 0,05 (5%-Signifikanzniveau) angenommen.

4.3 Untersuchung der Proliferationsaktivität KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-transfizierter OV-MZ-6-Zellen

Als Effekt der Wiedereinführung einer KAI1-WT-Expression konnte in einer vorangegangenen Arbeit gezeigt werden, dass KAI1-WT-exprimierende OV-MZ-6-Zellen im Gegensatz zu OV-MZ-6-Wildtypzellen eine verringerte Proliferationsrate aufwiesen (Ruseva et. al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Effekt der KAI1-Splice-Expression auf die Zellproliferation humaner Ovarialkarzinomzellen untersucht. Für diese Untersuchung kam wie auch in der Arbeit von Ruseva und Mitarbeitern (2009) ein MTT-basierter In-vitro-Proliferationstest zur Anwendung.

Hierfür wurden jeweils 5.000 Zellen von zwei WT-KAI1-Splice- als auch zwei WT-KAI1-WT-Zellklonen sowie WT-Vektor-Zellen in DMEM, 10% (v/v) FCS auf Zellkulturmikrotiterplatten ausgesät. Der MTT-Assay wurde jeweils nach festgelegten Zeitintervallen nach 1, 24, 48, 72 und 96 h durchgeführt und mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 590 nm ausgewertet. Hierbei war die Menge des gebildeten Formazans proportional zur Anzahl vitaler Zellen zum jeweiligen Messzeitpunkt (s. 3.2.8).

Zur statistischen Auswertung wurden Werte für die OD aus 5 Versuchen mit Triplikaten mit jeweils gleichem Versuchsansatz als Maß für die Anzahl vitaler Zellen eines jeden Zellklons in Abhängigkeit der Proliferationszeit aufgetragen und so die Proliferationsaktivität der Zellen bestimmt (Abb. 18).

Hierbei zeigten WT-KAI1-Splice-Zellklone eine erhöhte Proliferationsaktivität gegenüber WT-KAI1-WT-Zellklonen und WT-Vektorzellen. Die Ergebnisse erreichten jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau.

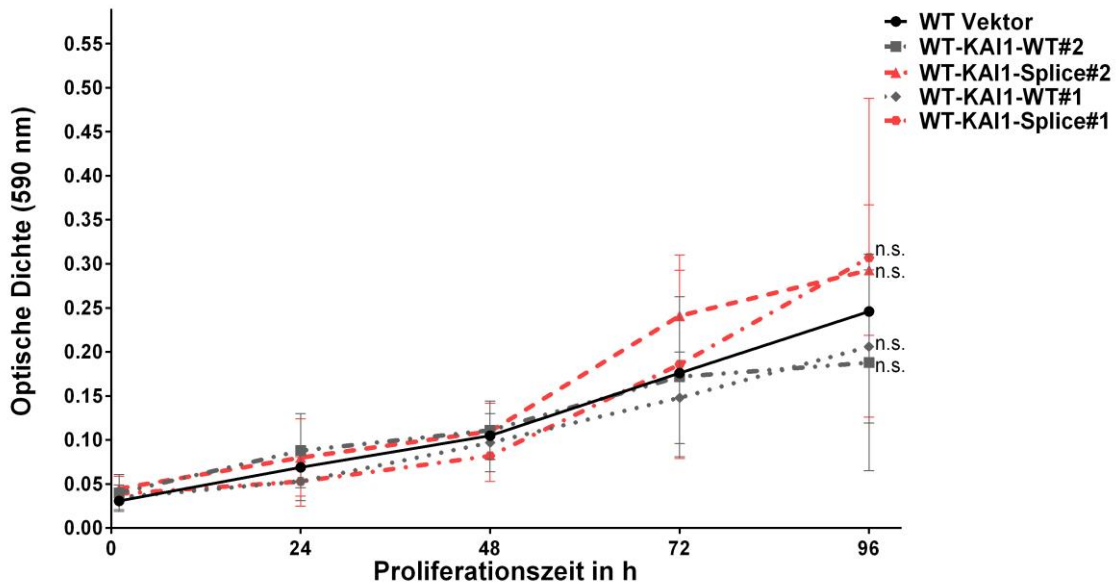


Abb. 18: Untersuchung der Proliferationsaktivität KAI1-WT- und KAI1-Splice-transfizierter OV-MZ-6-WT-Zellen mithilfe eines In-vitro-Proliferationsassays.

Um den Effekt der Wiedereinführung einer KAI1-Splice-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen wurden 5.000 Zellen in DMEM, 10% (v/v) FCS auf Zellkulturmikrotiterplatten ausgesät. Nach festgelegten Zeitintervallen nach 1, 24, 48, 72 und 96 h wurde ein MTT-basierter In-vitro-Proliferationstest durchgeführt. Die gemessene OD war proportional zur Zellzahl der jeweils untersuchten vitalen Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 5 verschiedenen Versuchsansätzen mit jeweils Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte anhand der Messwerte für den jeweiligen Zellklon nach 96 h mithilfe eines unpaired t-tests, welcher die Werte für die WT-Vektor-Zellen jeweils mit den Werten von zwei unterschiedlichen WT-KAI1-WT- und WT-KAI1-Splice-Zellklonen verglich. Eine statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert < 0,05 (5%-Signifikanzniveau) angenommen. Die hier dargestellten Ergebnissen erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau (n.s. = nicht signifikant).

5 Diskussion

Der Metastasierung kommt eine wesentliche Bedeutung für die Mortalität vieler Karzinome zu. Sie besteht aus multiplen Prozessen: Von der Ablösung der Tumorzelle aus dem primären Tumorzellverband, der Invasion in die umgebende EZM, dem Eintritt der Tumorzellen z.B. in Lymph- und Blutkreislauf über die Implantation der Zellen in entfernt gelegenen Lymphknoten und Organen mit der Ausbildung von Fernmetastasen.

Die Erforschung neuer physiologisch vorkommender Metastasierungssuppressorgenen rückt in den letzten Jahren zunehmend in den Vordergrund (Tsai und Weissman, 2011; Malik et al., 2009b; Lee et al., 2003a). Ein mittlerweile in vielen soliden Tumorarten etablierter Metastasierungssuppressor ist das Tetraspanin KAI1. In vielen dieser Tumore, darunter das Lungen-, das Kolon-, das Ovarial- und das Mammakarzinom, ist der Nachweis einer KAI1-Expression von prognostischer Relevanz (Malik et al., 2009a; Adachi et al., 1996; Yang et al., 2002, Schindl et al., 2001b; Wu et al., 2003; Malik et al., 2009b; Romanska und Berditchewski, 2011; Miranti, 2009). Dagegen korreliert eine Herabregulierung der KAI1-Expression sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf Ebene der Translation im klinischen Kontext mit einer Tumorprogression und daher mit einer schlechten Prognose (Christgen et al., 2009; White et al., 1998; Malik et al., 2009b; Romanska und Berditchewski, 2011).

Die Mechanismen, die einer Verminderung der KAI1-Expression oder einem Funktionsverlust des KAI1 in Tumorzellen zugrundeliegen, sind bis heute nicht abschließend verstanden. Untersucht wurden sowohl der Verlust der Heterozygotität, Genmutation oder Promotorhypermethylierung, als auch der Effekt verschiedener Transkriptionsfaktoren oder bestimmter Mediatoren als Ursache eines KAI1-Expressionsverlusts in Tumorzellen (Tagawa et al., 1999; Kawana et al., 1997; Sekita et al., 2001; Jackson und Puisieux, 2000; Jackson et al., 2000b; Dong et al., 1997; Marreiros et al., 2003; Miranti, 2009; Ruseva et al., 2009). Kontrovers diskutiert wird auch der Einfluss des p53 auf die KAI1-Expression (Mashimo et al., 2000, 1998; Marreiros et al., 2003; Jackson et al., 2003, 2002; Duriez et al., 2000; Schindl et al., 2001b, 2001a; Romanska und Berditchewski, 2011). Zudem sind posttranslationale Mechanismen, die z.B. zu einer Degradierung des KAI1 in Tumorzellen führen, als mögliche Ursachen für einen KAI1-Funktionsverlust in bestimmten Tumorzellen denkbar (Tsai und Weissman, 2011; Tsai et al., 2007; Romanska und Berditchewski, 2011; Miranti, 2009).

Im Magenkarzinom wurde erstmals eine Spleißvariante des KAI1, KAI1-Splice, beschrieben, die durch alternatives Spleißen entsteht (Lee et al., 2003b). Unter alternativem Spleißen versteht man das unterschiedliche Aneinanderfügen verschiedener Exone eines Gens. Dabei ist auch ein Auslassen bestimmter Exone in

diesem Zusammenhang möglich. Je nach kodierten Eigenschaften der Exone entstehen so strukturell und funktionell unterschiedliche Proteine (Berg, 2003b). Neben dem Magenkarzinom konnte KAI1-Splice auch in Ovarial- und Blasenkarzinomgewebe nachgewiesen werden (Hohenester et al., unveröffentlichte Daten; Jackson et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden basierend auf diesen publizierten Daten daher die Auswirkungen des alternativen Spleißens auf die tumorsuppressiven Eigenschaften des KAI1 im Ovarialkarzinom untersucht. Von besonderem Interesse waren funktionelle Unterschiede zwischen KAI1-WT und KAI1-Splice im Hinblick auf die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion und -proliferation. Dabei ging es auch um die Frage, ob alternatives Spleißen einen Funktionsverlust des KAI1 als Tumorsuppressor in Ovarialkarzinomzellen erklären könnte.

5.1 Etablierung eines KAI1-Splice-exprimierenden Zellmodells

Für KAI1-WT sind auf zellbiologischer Ebene verschiedene Effekte z.B. auf die Adhäsion, Migration und Invasion der Tumorzellen beschrieben worden (Tsai und Weissman, 2011). Im Ovarialkarzinomzellmodell konnte gezeigt werden, dass eine Wiedereinführung der KAI1-WT-Expression u.a. zu einer dosisabhängigen Steigerung der Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelten Zelladhäsion, zu einer verminderten Zellproliferation und -motilität führte (Ruseva et al., 2009). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde untersucht, wie sich die Wiedereinführung von KAI1-Splice auf verschiedene zellbiologische Funktionen wie die Zellproliferation und -adhäsion im Ovarialkarzinomzellmodell auswirkt.

Hierzu generierten wir ein KAI1-Splice-exprimierendes Ovarialkarzinomzellmodell. Humane Ovarialkarzinomzellen wurden mit KAI1-Splice- oder KAI1-WT-cDNA stabil transfiziert. Bei diesen Zellen handelte es sich sowohl um OV-MZ-6-WT-Zellen als auch um OV-MZ-6-Zellen, die bereits das Integrin $\alpha\beta_3$ überexprimierten. Die stabile Transfektion der Zellen erforderte mehrere Ansätze. Aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz von ca. 5% generierten wir zunächst Zellen mit einer heterogenen Expressionshöhe, darunter wenige Zellen mit einer hohen KAI1-WT-/KAI1-Splice-Expression und viele Zellen mit einer Expression, die annähernd der endogenen KAI1-WT-Expression der OV-MZ-6-Zellen entsprach. Mithilfe einer Grenzwert-Zellverdünnung wurden aus dem Pool transfizierter Zellen solche Zellklone isoliert, die eine stärkere KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression aufwiesen. Nach mehreren solcher Klonierungsrunden (s. Kapitel 3.2.3) gelang die Isolierung von Zellklonen mit signifikanter und vergleichbarer Expressionshöhe von KAI1-WT oder KAI1-Splice. Um auch dosisabhängige Effekte der KAI1-Splice-Expression untersuchen zu können, wurden Versuche an mehreren $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellklonen durchgeführt, welche über eine unterschiedlich hohe KAI1-Splice-Expressionshöhe verfügten.

Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Zellklone hinsichtlich ihrer KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe wurden verschiedene Proteinnachweisverfahren angewendet. Für diese Untersuchungen wurde ein Antikörper benötigt, der in der Lage war, sowohl KAI1-WT als auch KAI1-Splice zu detektieren. Da es sich bei KAI1-Splice um ein dem KAI1-WT identisches Protein handelt, jedoch mit einem selektiven Verlust der von Exon 7 kodierten 28 Aminosäuren am Carboxy-Terminus des Moleküls, musste das Epitop des Antikörpers demnach außerhalb dieser Region liegen (Lee et al., 2003b). Der für die Untersuchungen verwendete monoklonale KAI1-Antikörper Ts82b war zur Detektion beider KAI1-Varianten geeignet. Im Vergleich zur endogenen KAI1-WT-Expression der Vektor-transfizierten Kontrollzellen bzw. Wildtypzellen zeigten die entsprechenden Zelltransfektanten eine signifikant erhöhte KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expression. Durch die angewendeten Nachweisverfahren war jedoch nur eine indirekte Differenzierung zwischen dem endogenen KAI1-WT-Gehalt der Zellen und dem Gehalt an KAI1-Splice nach erfolgter Transfektion möglich. Ein Verfahren, welches eine direkte Differenzierung zwischen KAI1-WT und KAI1-Splice auf mRNA-Ebene erlaubt, stellt daher eine sinnvolle Ergänzung dieser Arbeit dar. Derartige Untersuchungen sind derzeit Gegenstand eines nachfolgenden Projektes unserer Arbeitsgruppe.

5.2 Zellbiologische Effekte in humanen Ovarialkarzinomzellen als Funktion der Expression der KAI1-Spleißvariante

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nach Wiedereinführung von KAI1-WT in humane Ovarialkarzinomzellen die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion in Abhängigkeit der KAI1-Expressionshöhe gesteigert wurde. Außerdem wurde eine verstärkte Zelladhäsion an Kollagen Typ I beobachtet (Ruseva et al., 2009). Eine verstärkte KAI1-WT-Expression könnte daher dazu führen, dass die Ablösung der Tumorzellen aus dem primären Tumorzellverband und vom Peritoneum erschwert wird. Dies wiederum könnte den tumorsuppressiven Effekt des KAI1-WT im Ovarialkarzinom erklären (Ruseva et al., 2009). Eine verstärkte Zelladhäsion als Effekt einer Wiedereinführung der KAI1-WT-Expression konnte auch im Mammakarzinom beobachtet werden (Malik et al., 2009b). Dagegen war in vielen früheren Studien eine Verminderung der Zelladhäsion als ein Effekt einer verstärkten KAI1-WT-Expression beschrieben worden. So führte die KAI1-WT-Expression in Prostata- und Kolonkarzinomzellen zu einer verminderten Zelladhäsion an Fibronectin (Lee et al., 2011a; Takaoka et al., 1998b; Liu et al., 2003b; Lee et al., 2003b). Die Zelladhäsion an Kollagen Typ IV und Typ I in Prostata- und Kolonkarzinomzellen blieb hingegen durch die KAI1-Expression unverändert. Die Zelladhäsion an Laminin war in Kolonkarzinomzellen unabhängig von KAI1-WT, in Prostatakarzinomzellen hingegen führte die KAI1-WT-Expression zu einer Zelladhäsionssteigerung (Takaoka et al., 1998b; Lee et al., 2011a).

Basierend auf der Studie von Ruseva und Mitarbeitern (2009), wurden im vorliegenden Projekt die Auswirkungen des alternativen Spleißens von KAI1 auf seine funktionellen Eigenschaften im Hinblick auf die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion im humanen Ovarialkarzinomzellmodell untersucht. Im Gegensatz zu WT-KAI1-WT-Zellen zeigten WT-KAI1-Splice-Zellen eine signifikant verminderte Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion. Dies könnte als ein Verlust der tumorsuppressiven Eigenschaften des KAI1 durch alternatives Spleißen gedeutet werden. Durch eine verminderte Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion könnten sich die Tumorzellen leichter vom Peritoneum ablösen und somit die Metastasierung im Ovarialkarzinom begünstigt werden. Unsere Beobachtung steht jedoch im Gegensatz zu Untersuchungen im Kolonkarzinomzellmodell. Hier wurde für KAI1-Splice transfizierte Zellen eine stärkere Adhäsion an FN im Vergleich zur FN-Adhäsion KAI1-WT transfizierter Zellen beschrieben (Lee et al., 2003b). Bezüglich der Adhäsionskapazität von Kolonkarzinomzellen an Kollagen Typ IV konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen einer erhöhten KAI1-WT- und einer erhöhten KAI1-Splice-Expression beobachtet werden (Lee et al., 2003b). Der Effekt der KAI1-Splice-Expression auf die Adhäsion an Laminin und Kollagen Typ I im Ovarialkarzinomzellmodell ist bislang nicht untersucht.

Die unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich der Auswirkungen auf die Adhäsionskapazität der Tumorzellen legen nahe, dass die Effekte einer KAI1-WT- bzw. einer KAI1-Splice-Expression auf die Integrin/EZM-vermittelte Zelladhäsion tumorgewebsabhängig variieren könnten. Außerdem könnte das unterschiedliche Integrinrepertoire der jeweiligen Tumorzellarten für die z.T. gegensätzlichen Beobachtungen als Erklärung herangezogen werden (Malik et al., 2009b). So bezogen sich die von Lee und Mitarbeitern (2003) in ihrer Studie untersuchten zelladhäsiven Eigenschaften von sowohl KAI1-WT als auch KAI1-Splice exprimierenden Tumorzellen hauptsächlich auf Effekte, die durch β_1 -Integrine vermittelt werden. Die Zelladhäsion an VN wird in der Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 jedoch fast ausschließlich über das Integrin $\alpha\beta_3$ vermittelt (Hapke et al., 2003).

Um die Auswirkungen einer Wiedereinführung der KAI1-Splice-Expression in OV-MZ-6-Zellen besser untersuchen zu können, verwendeten wir zusätzlich ein Zellmodell, welches zuvor mit dem Integrin $\alpha\beta_3$ transfiziert worden war und dieses überexprimierte. Als ein weiterer Schwerpunkt unserer Arbeit wurden so die Auswirkungen der KAI1-Splice-Expression auf die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion ermittelt. Zuvor konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Wiedereinführung der KAI1-WT-Expression in humane Ovarialkarzinomzellen zu einer dosisabhängigen Steigerung der Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelten Zelladhäsion führte (Ruseva et al., 2009).

In der vorliegenden Studie konnten wir nun erstmals nachweisen, dass im Gegensatz zu KAI1-WT die Expression seiner Spleißvariante mit einer dosisabhängigen Verminderung der Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelten Zelladhäsion einherging. Dagegen

blieb die Adhäsionskapazität der $\alpha\beta_3$ -KAI1-WT- und der $\alpha\beta_3$ -KAI1-Splice-Zellen auf unbeschichtetem Zellkulturmaterial, d.h. in Abwesenheit jeglicher EZM-Bestandteile, nahezu unbeeinflusst.

Die Interaktion des KAI1-WT mit Integrinen ist sowohl für die Integrin/EZM-vermittelte Adhäsion als auch für die Zellmigration und somit die Motilität der Zellen von Bedeutung (Berditchevski und Odintsova, 1999; Desgrosellier und Cheresh, 2010; Felding-Habermann, 2003). Bei der Zellmigration werden bestehende Zellmatrixkontakte aufgelöst und neue Kontakte ausgebildet. In diesem Zusammenhang ist eine Modulierung der Integrin/EZM-vermittelten Zelladhäsion während der Zellbewegung essentiell (Felding-Habermann, 2003). Neben der Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-Adhäsion wurde mit dem in unserem Projekt generierten Zellmodell im Rahmen einer komplementären Arbeit die Bedeutung der KAI1-Splice-Expression im Hinblick auf die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zellmigration mittels *time lapse video* Mikroskopie untersucht. Hier zeigte sich als Effekt der Wiedereinführung der KAI1-Splice-Expression in humane Ovarialkarzinomzellen eine signifikant gesteigerte Zellmotilität. Dabei ließ sich auch bzgl. der Zellmotilität ein dosisabhängiger Effekt nachweisen (Upheber et al., unveröffentlichte Daten). So scheint eine verstärkte KAI1-Splice-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen über eine verminderte Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion zu einer erhöhten Zellmotilität zu führen. Mit den Ergebnissen von Upheber und Mitarbeitern übereinstimmend ergab sich auch im Kolonkarzinomzellmodell durch die KAI1-Splice-Expression eine gesteigerte *in vitro* Motilität und ein größeres invasives Potential induziert durch FN und Kollagen Typ IV (Lee et al., 2003b). Dagegen zeigten KAI1-WT exprimierende Zellen eine verminderte Motilität (Malik et al., 2009b; Lee et al., 2003b; Ruseva et al., 2009).

Da die Zelladhäsion und -migration von OV-MZ-6-Zellen an VN fast ausschließlich über das Integrin $\alpha\beta_3$ vermittelt wird (Hapke et al., 2003), könnte eine Verminderung der VN-vermittelten Zelladhäsion Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierender OV-MZ-6-Zellen auf eine veränderte Interaktion zwischen KAI1-Splice und dem Integrin $\alpha\beta_3$ hinweisen.

Mitglieder der Tetraspaninfamilie, so auch KAI1-WT, üben über unterschiedliche Mechanismen Einfluss auf Ihre Interaktionspartner aus: So sind sie an Prozessen wie der Endozytose und dem intrazellulären Transport von Membranproteinen beteiligt. Über dieses sogenannte *protein trafficking* beeinflussen Tetraspanine die Oberflächenexpression, den Einbau und die Verteilung ihrer Interaktionspartner in der Zellmembran. Darüber hinaus spielen sie eine Rolle in der Koordination und Prozessierung von Interaktionspartnern (Berditchevski und Odintsova, 2007; Miranti, 2009; Stipp, 2010).

In Prostatakarzinomzellen führte die verstärkte KAI1-WT-Expression zu einer verminderten Integrin- α_6 -Oberflächenexpression durch eine verstärkte Liganden-induzierte Internalisierung dieses Integrinrezeptors. Dies ging mit einer veränderten Integrin α_6 -vermittelten Adhäsion einher (Stipp et al., 2001; Miranti, 2009). In Lungenkarzinomzellen mit hohem migratorischen Potential bedingte die KAI1-WT-Expression Verände-

rungen der Glykosylierung des β_1 -Integrins. Außerdem wurde beobachtet, dass die Expression von KAI1-WT in diesen Zellen zu einer verminderten Expression des reifen β_1 -Integrins an der Zelloberfläche führte. Umgekehrt resultierte eine herunterregulierte KAI1-WT-Expression in denselben Zellen in einer verstärkten Expression des β_1 -Integrins. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass KAI1-WT in diesen Zellen zu einer verminderten Reifung des Integrin- β_1 -Vorläuferproteins führt und auf diese Weise die Migration supprimiert (Jee et al., 2007).

Ein weiterer denkbarer Mechanismus ist die Regulierung des Aktivitätszustands des jeweiligen Partnerintegrins durch KAI1-WT. In einer Studie wurde die Interaktion des KAI1-WT mit den Integrinen α_3 , α_5 , α_6 und β_1 , Untereinheiten der Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$, im Prostatakarzinom untersucht. Hierbei handelt es sich vor allem um Rezeptoren für Fibronektin und Laminin. Dabei zeigte sich durch FACS-Analyse und immunzyto- und -histochemische Färbung mit Antikörpern gegen die aktive Form des Integrins β_1 , dass die aktive Konformation des Integrins β_1 an der Zelloberfläche durch die Expression von KAI1-WT vermindert wurde. Außerdem wurde eine Herabregulierung der FN-Expression durch KAI1-WT beobachtet. Dies lässt vermuten, dass die verminderte Zelladhäsion an FN zum einen auf einer Modifizierung der EZM beruht, zum anderen scheint KAI1-WT einen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivierung von Integrinen auszuüben (Lee et al., 2011a).

Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass KAI1-WT Integrin-vermittelte intrazelluläre Signalwege beeinflusst und so die Integrinfunktion zu modulieren vermag. So konnte in metastasierenden Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden, dass KAI1-WT die Integrinfunktion über eine Inhibierung der Rezeptorkinase c-Met sowie der zytosmatischen Kinase Src reguliert. Dieser Mechanismus führte zu einer Unterdrückung der Integrin vermittelten Zellmigration und -invasion (Sridhar und Miranti, 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass KAI1-WT einen Effekt auf die Signaltransduktion von Integrinen über den FAK-Lyn-p130Cas-CrkII-Weg hat. KAI1-WT führte in Prostatakarzinomzellen zu einem erhöhten FAK/Lyn-Level der Zellen, jedoch nicht zu einer verstärkten Aktivierung der Kinase. Außerdem führte die KAI1-WT-Expression der Zellen zu einer verminderten Kopplung von p130Cas an CrkII. Die Kopplung von p130Cas an CrkII trägt normalerweise zur Migration der Tumorzellen und damit zu deren Invasivität bei. Hier konnte folglich nachgewiesen werden, dass KAI1-WT über den FAK-Lyn-p130Cas-CrkII-Weg einen suppressiven Effekt auf die Migration der Zellen hat (Zhang et al., 2003a). KAI1-WT kontrolliert über die oben genannten Mechanismen im Zusammenschluss mit anderen Tetraspaninen wie CD9, CD81 und CD151 innerhalb der tetraspaninreichen Mikrodomäne die Signalübertragung sowohl durch Integrine als auch durch andere assoziierte Proteine wie z.B. EWI2. Auf diese Weise nimmt KAI1-WT auf zellbiologische Prozesse Einfluss, die wiederum für die Zelladhäsion und -migration von entscheidender Bedeutung sind (Miranti, 2009).

Auch Lee und Mitarbeiter (2003) untersuchten die Auswirkungen der KAI1-Splice-Expression auf die Interaktion mit Integrinen. Hier ließ sich mittels Immunpräzipitation

zeigen, dass die Bindung zwischen KAI1-Splice und dem Integrin $\alpha_3\beta_1$ in Lungen- und Lebermetastasen schwächer ausgeprägt war als im Primärtumor. Dies konnte in In-vitro-Untersuchungen bestätigt werden (Lee et al., 2003b).

In humanen Ovarialkarzinomzellen konnte in der vorangegangenen Arbeit von Ruseva und Mitarbeitern (2009) durch Koimmunpräzipitationsstudien gezeigt werden, dass das Integrin $\alpha\beta_3$ und KAI1-WT in humanen Ovarialkarzinomzellen auf der Zellmembran kolokalisiert vorliegen (Ruseva et al., 2009). Ob es sich hierbei um eine direkte oder indirekte physikalische Wechselwirkung handelt, ist bislang noch unklar. Dennoch ist das Integrin $\alpha\beta_3$ als ein wichtiger Interaktionspartner des KAI1-WT im Ovarialkarzinom analog zu den β_1 -Integrin-Interaktionen denkbar. Somit könnten die für KAI1-WT beschriebenen tumorsuppressiven Eigenschaften auf einer Modulierung der Integrinfunktion beruhen. Immunpräzipitationsstudien, welche Unterschiede zwischen KAI1-WT und KAI1-Splice im Hinblick auf die Bindung und Kolokalisierung mit dem Integrin $\alpha\beta_3$ in humanen OV-MZ-6-Zellen untersuchen, sind daher derzeit Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Neben einer veränderten Integrin-Interaktion scheinen die strukturellen Unterschiede des KAI1-Splice auch einen Einfluss auf andere Interaktionspartner zu haben: Aufgrund seiner alterierten Struktur fehlen KAI1-Splice tumorsuppressive Eigenschaften z.B. in der Interaktion mit KITENIN. KITENIN bindet nachweislich normalerweise das carboxyterminale Ende des KAI1-WT-Moleküls, welches bei KAI1-Splice aufgrund des selektiven Verlusts von Exon 7 fehlt (Zoller, 2009; Lee et al., 2004). Außerdem scheint die Kolokalisierung mit E-Cadherin an Zell-Zell-Kontaktseiten vermindert zu sein (Lee et al., 2003b). Im Ovarialkarzinomzellmodell konnte diese verminderte Kolokalisierung von KAI1-WT und KAI1-Splice mit E-Cadherin übereinstimmend mit den Ergebnissen von Lee und Mitarbeitern (2003) in Koimmunpräzipitationsstudien bestätigt werden (Upheber et al., unveröffentlichte Daten).

Neben dem motilen und invasiven Phänotyp von Tumorzellen ist die Zellproliferationsaktivität für die Aggressivität und die Prognose vieler Karzinome von Bedeutung. In unserer Arbeitsgruppe konnte zuvor gezeigt werden, dass in OV-MZ-6-Zellen die Interaktion zwischen dem Integrin $\alpha\beta_3$ und seinem Liganden VN zu einer verstärkten Zellproliferation führte (Hapke et al., 2003). Im Gegensatz dazu korrelierte eine verstärkte KAI1-WT-Expression mit einer verminderten Zellproliferation in Ovarialkarzinomzellen, was im Einklang mit seiner Tumorsuppressorfunktion steht (Ruseva et al., 2009). Auch in Kolonkarzinomzellen führte eine verstärkte KAI1-WT-Expression zu einer Verminderung der Zellproliferation (Lee et al., 2003b). In anderen Tumorarten, wie dem Mamma- und dem Kolonkarzinom, konnte jedoch kein Effekt des KAI1-WT auf das Tumorstadium nachgewiesen werden (Malik et al., 2009b; Liu et al., 2003b). Auch hier ist ein tumorgewebsabhängige Varianz in den spezifischen Effekten des KAI1 denkbar (Malik et al., 2009b).

Mithilfe eines In-vitro-Proliferationstests untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit, welche Auswirkungen die Wiedereinführung der KAI1-Splice-Expression in humane Ovarialkarzinomzellen auf die Zellproliferation hat. Hier konnten wir bestätigen, dass eine KAI1-WT-Expression zu einer verminderten Proliferationsaktivität der humanen Ovarialkarzinomzellen führt. Im Gegensatz dazu konnten wir auch zeigen, dass KAI1-Splice exprimierende OV-MZ-6-Wildtypzellen eine verstärkte Proliferationsaktivität im Vergleich zu Vektor-transfizierten und KAI1-WT-OV-MZ-6-Zellen aufwiesen. Eine gesteigerte Proliferationsaktivität durch KAI1-Splice konnte auch im Kolonkarzinomzellmodell nachgewiesen werden (Lee et al., 2003b). Dies legt nahe, dass KAI1-Splice auch im Rahmen der Zellproliferation die tumorsuppressiven Eigenschaften des KAI1 fehlen und somit durch eine KAI1-Splice-Expression ein verstärktes Tumorwachstum begünstigt werden könnte.

5.3 Welche Relevanz ist für KAI1-Splice im Hinblick auf das Ovarialkarzinom vorstellbar?

Bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms steht im Gegensatz zu anderen soliden Tumorarten eine peritoneale Aussaat der Tumorzellen gegenüber der hämatogenen Metastasierung im Vordergrund. Im Rahmen der peritonealen Metastasierung kommt es zur Ablösung der Tumorzellen aus dem primären Tumorzellverband. Um sich immunologischen Mechanismen zu entziehen aggregieren Ovarialkarzinomzellen zu größeren Zellverbänden, sogenannten nicht-adhäsiven Sphäroiden, die frei z.B. im Aszites flottieren. In dieser Form werden die Tumorzellen im Peritonealraum verteilt. Durch Interaktion mit Bestandteilen der EZM kommt es dann aber wieder zu einer Aufhebung des Zellverbandes, zur Zell-EZM-Adhäsion und damit zu einer Implantation der Tumorzellen auf der peritonealen Oberfläche und den Organen des kleinen Beckens, was mit der Ausbildung von Metastasen einhergeht. Wichtig in diesem Prozess sind u. a. Interaktionen zwischen Integrinen und Bestandteilen der EZM (Tan et al., 2006; Shield et al., 2009; Burleson et al., 2004a; 2004b).

Ovarialkarzinomzellen exprimieren neben anderen Vertretern der Integrinfamilie das Integrin $\alpha\beta_3$ (Liapis et al., 1997). Ein wichtiger EZM-Ligand dieses Oberflächenrezeptors ist VN. Die Adhäsion humaner OV-MZ-6-Ovarialkarzinomzellen wird fast ausschließlich über das Integrin $\alpha\beta_3$ vermittelt (Hapke et al., 2001).

Im Ovarialkarzinomzellmodell konnte erstmals das Integrin $\alpha\beta_3$ als Interaktionspartner des KAI1-WT beschrieben werden (Ruseva et al., 2009). Die Wiedereinführung der KAI1-WT-Expression in humane Ovarialkarzinomzellen führte dosisabhängig zu einem signifikanten Anstieg der Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelten Zelladhäsion (Ruseva et al., 2009). Neben WT-OV-MZ-6-Zellen wurden Integrin $\alpha\beta_3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen, welche per se über eine erhöhte Adhäsionskapazität auf VN verfügten, mit KAI1-WT transfiziert. Hierdurch ließ sich eine dosisabhängige Steigerung der Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelten Zelladhäsion beobachten. Passend dazu korrelierte in

Migrationsstudien die KAI1-WT-Expression dosisabhängig mit einer Verminderung der Zellmigration (Ruseva et al, 2009). Dies wurde auf eine verstärkte Zell-EZM-Adhäsion zurückgeführt, die die Ovarialkarzinomzellen daran hindert sich aus einem Zellverband und insbesondere von der EZM zu lösen (Ruseva et. al, 2009). Neben einer veränderten Zelladhäsion und -migration zeigte sich in dieser Untersuchung auch eine signifikant reduzierte Proliferationsaktivität der KAI1-WT transfizierten Zellen im Vergleich zu Ovarialkarzinomzellen mit niedriger endogener KAI1-WT-Expression (Ruseva et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Spleißvariante KAI1-Splice aufgrund ihrer alterierten Struktur die tumorsuppressiven Eigenschaften des KAI1-WT auf die Integrin $\alpha\beta_3$ /VN-vermittelte Zelladhäsion fehlen. Dies konnte auch in einer dieser Arbeit komplementären Studie im Hinblick auf die Migration bestätigt werden (Upheber et. al., unveröffentlichte Daten). Auch der suppressive Effekt des KAI1-WT auf die Proliferation humaner Ovarialkarzinomzellen war bei KAI1-Splice-exprimierenden OV-MZ-6-Zellen nicht nachweisbar. Im Gegenteil führte hier eine Wiedereinführung der KAI1-Splice-Expression in humane Ovarialkarzinomzellen zu einer verstärkten Zellproliferation. Zusammengefasst unterstreichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die von Upheber und Mitarbeitern die Bedeutung des KAI1-WT als Tumorsuppressor im Ovarialkarzinom. Gleichzeitig konnte anhand dieser Daten erstmals gezeigt werden, dass alternatives Spleißen von KAI1 zu einem Verlust einiger seiner tumorsuppressiven Eigenschaften im humanen Ovarialkarzinom führte.

Die vorliegenden Daten stehen somit in guter Übereinstimmung zu Resultaten, die beim Magenkarzinom erarbeitet wurden: Im Magenkarzinom wirkte sich die Expression von KAI1-Splice begünstigend auf die Metastasierung und das Tumorwachstum aus. KAI1-Splice konnte in Proben von Primärtumoren nachgewiesen werden, bei denen bereits eine Peritonealkarzinose oder eine Lymphknoten- und Fernmetastasierung vorlag. *In vivo* zeigten zudem Mäuse mit KAI1-Splice-exprimierenden Tumorzellen ein höheres Metastasierungspotential. Eine nachgewiesene KAI1-Splice-Expression korrelierte mit einer deutlich schlechteren Prognose (Lee et al., 2003b). In einer ersten klinischen und immunhistochemischen Studie, die sich mit der Bedeutung des KAI1-WT als Tumorsuppressor im Ovarialkarzinom beschäftigte, konnte KAI1-WT eine prognostische Relevanz nachgewiesen werden (Schindl et al., 2001b; Liu et al., 2000): Eine starke oder moderate KAI1-WT-Expression führte zu einem signifikant längeren krankheitsfreien Gesamtüberleben im Gegensatz zum Gesamtüberleben von Patientinnen mit einer niedrigen oder nicht nachweisbaren KAI1-WT-Expression (Schindl et al., 2001b). Bislang ist jedoch nicht untersucht, welche klinische und prognostische Relevanz eine KAI1-Splice-Expression im humanen Ovarialkarzinom hat. Es bedarf daher weiterführender Untersuchungen und einer Korrelation mit klinischen Daten.

6 Zusammenfassung

Für die peritoneale Metastasierung des Ovarialkarzinoms spielt die Interaktion zwischen Integrinen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle (Tan et al, 2006). In einer vorangegangenen Arbeit unserer Forschungsgruppe konnte hierbei dem Integrin $\alpha\beta_3$ und seinem Liganden Vitronektin eine Bedeutung in zahlreichen für die Metastasierung wichtigen zellbiologischen Prozessen in kultivierten humanen Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden. So führte die Interaktion des Integrins $\alpha\beta_3$ mit seinem Liganden Vitronektin zu einer verstärkten Zelladhäsion, Zellproliferation und zu einer gesteigerten Zellmigration (Hapke et al, 2001; Lössner et al, 2008; Reuning et al., 2011). Es konnte zudem gezeigt werden, dass der putative Tumorsuppressor KAI1 (CD82) in humanen Ovarialkarzinomzellen zu einer verstärkten Integrin $\alpha\beta_3$ /Vitronektin-vermittelten Zelladhäsion, jedoch verminderten Zellmigration und -proliferation in Abhängigkeit von der KAI1-Expressionshöhe führte (Ruseva et al., 2009).

Im Magenkarzinom war erstmals eine Spleißvariante des KAI1 beschrieben worden, deren Nachweis mit einer schlechteren Prognose assoziiert war (Lee et al., 2003b). Da diese Spleißvariante des KAI1 auch im Ovarialkarzinom gefunden wurde (Hohenester et al., unveröffentlichte Daten), untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der Expression der KAI1-Spleißvariante, KAI1-Splice, in humanen Ovarialkarzinomzellen im Hinblick auf die Integrin $\alpha\beta_3$ /Vitronektin-vermittelte Zelladhäsion und -proliferation. Hierzu generierten wir sowohl KAI1-WT- als auch KAI1-Splice-exprimierende OV-MZ-6-Wildtypzellen mittels stabiler Transfektion. Außerdem wurden Doppeltransfektanten hergestellt, die parallel erhöhte Expressionsspiegel des Integrins $\alpha\beta_3$ aufwiesen. Unter der Anwendung von Durchflusszytofluorometrie, Immunzytochemie und CLSM bestimmten wir die jeweilige KAI1-WT- bzw. KAI1-Splice-Expressionshöhe in den einzelnen Zellklonen.

In-vitro-Zelladhäsionsassays zeigten, dass KAI1-Splice im Gegensatz zu KAI1-WT dosisabhängig zu einer verminderten Integrin $\alpha\beta_3$ /Vitronektin-vermittelten Zelladhäsion führte. Außerdem wurden die Auswirkungen einer KAI1-Splice-Expression auf die Proliferationsaktivität der OV-MZ-6-Zellen untersucht. Mithilfe eines In-vitro-Proliferationsassays konnte für KAI1-Splice-exprimierende OV-MZ-6-Wildtypzellen eine verstärkte Zellproliferation gegenüber Vektor- und KAI1-WT-transfizierten OV-MZ-6-Wildtypzellen nachgewiesen werden.

Diese durch KAI1-Splice provozierten und im Vergleich zu KAI1-WT unterschiedlichen (tumor)biologischen Effekte weisen darauf hin, dass über das alternative Spleißen von KAI1-WT dessen tumorsupprimierende Eigenschaften aufgehoben werden, was sich begünstigend auf die Metastasierung beim Ovarialkarzinom auswirken könnte.

7 Literaturverzeichnis

- ADACHI, M., TAKI, T., IEKI, Y., HUANG, C. L., HIGASHIYAMA, M. & MIYAKE, M. 1996. Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 56, 1751-5.
- BANDYOPADHYAY, S., ZHAN, R., CHAUDHURI, A., WATABE, M., PAI, S. K., HIROTA, S., HOSOBÉ, S., TSUKADA, T., MIURA, K., TAKANO, Y., SAITO, K., PAUZA, M. E., HAYASHI, S., WANG, Y., MOHINTA, S., MASHIMO, T., IIZUMI, M., FURUTA, E. & WATABE, K. 2006. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat Med*, 12, 933-8.
- BELLA, J. & BERMAN, H. M. 2000. Integrin-collagen complex: a metal-glutamate handshake. *Structure*, 8, R121-6.
- BERDITCHEVSKI, F. & ODINTSOVA, E. 1999. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol*, 146, 477-92.
- BERDITCHEVSKI, F. & ODINTSOVA, E. 2007. Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic*, 8, 89-96.
- BERDITCHEVSKI, F., ODINTSOVA, E., SAWADA, S. & GILBERT, E. 2002. Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem*, 277, 36991-7000.
- BERG J. M., T. J. L., STRYER L. 2003a. Proteine können durch Gelelektrophorese getrennt und anschließend sichtbar gemacht werden. *Biochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- BERG J. M., T. J. L., STRYER L. 2003b. Synthese und Spleißen von RNA. In: BERG J. M., T. J. L., STRYER L. (ed.) *Biochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- BERG J. M., T. J. L., STRYER L. 2003c. Western-Blotting erlaubt den Nachweis von per Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen. In: BERG J. M., T. J. L., STRYER L. (ed.) *Biochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- BIENSTOCK, R. J. & BARRETT, J. C. 2001. KAI1, a prostate metastasis suppressor: prediction of solvated structure and interactions with binding partners; integrins, cadherins, and cell-surface receptor proteins. *Mol Carcinog*, 32, 139-53.
- BOUCHEIX, C. & RUBINSTEIN, E. 2001. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci*, 58, 1189-205.
- BROOKS, P. C., CLARK, R. A. & CHERESH, D. A. 1994. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 264, 569-71.
- BURLESON, K. M., CASEY, R. C., SKUBITZ, K. M., PAMBUCCIAN, S. E., OEGEMA, T. R., JR. & SKUBITZ, A. P. 2004a. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecol Oncol*, 93, 170-81.

- BURLESON, K. M., HANSEN, L. K. & SKUBITZ, A. P. 2004b. Ovarian carcinoma spheroids disaggregate on type I collagen and invade live human mesothelial cell monolayers. *Clin Exp Metastasis*, 21, 685-97.
- BYZOVA, T. V. & PLOW, E. F. 1998. Activation of alphaVbeta3 on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J Cell Biol*, 143, 2081-92.
- CANNISTRA, S. A., OTTENSMEIER, C., NILOFF, J., ORTA, B. & DICARLO, J. 1995. Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 58, 216-25.
- CARREIRAS, F., CRUET, S., STAEDEL, C., SICHEL, F. & GAUDUCHON, P. 1999. Human ovarian adenocarcinoma cells synthesize vitronectin and use it to organize their adhesion. *Gynecol Oncol*, 72, 312-22.
- CARREIRAS, F., DENOUX, Y., STAEDEL, C., LEHMANN, M., SICHEL, F. & GAUDUCHON, P. 1996. Expression and localization of alpha v integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 62, 260-7.
- CARREIRAS, F., LEHMANN, M., SICHEL, F., MARVALDI, J., GAUDUCHON, P. & LE TALAER, J. Y. 1995. Implication of the alpha v beta 3 integrin in the adhesion of the ovarian-adenocarcinoma cell line IGROV1. *Int J Cancer*, 63, 530-6.
- CHAN, Y. M., NG, T. Y., LEE, P. W., NGAN, H. Y. & WONG, L. C. 2003. Symptoms, coping strategies, and timing of presentations in patients with newly diagnosed ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 90, 651-6.
- CHARRIN, S., LE NAOUR, F., OUALID, M., BILLARD, M., FAURE, G., HANASH, S. M., BOUCHEIX, C. & RUBINSTEIN, E. 2001. The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem*, 276, 14329-37.
- CHARRIN, S., LE NAOUR, F., SILVIE, O., MILHIET, P. E., BOUCHEIX, C. & RUBINSTEIN, E. 2009. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J*, 420, 133-54.
- CHARRIN, S., MANIE, S., BILLARD, M., ASHMAN, L., GERLIER, D., BOUCHEIX, C. & RUBINSTEIN, E. 2003. Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochem Biophys Res Commun*, 304, 107-12.
- CHRISTGEN, M., CHRISTGEN, H., HEIL, C., KRECH, T., LANGER, F., KREIPE, H. & LEHMANN, U. 2009. Expression of KAI1/CD82 in distant metastases from estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Sci*, 100, 1767-71.
- CONTOIS, L., AKALU, A. & BROOKS, P. C. 2009. Integrins as "functional hubs" in the regulation of pathological angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, 19, 318-28.
- CRUET-HENNEQUART, S., MAUBANT, S., LUIS, J., GAUDUCHON, P., STAEDEL, C. & DEDHAR, S. 2003. alpha(v) integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells. *Oncogene*, 22, 1688-702.
- DESGROSELLIER, J. S. & CHERESH, D. A. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 10, 9-22.
- DONG, J. T., ISAACS, W. B., BARRETT, J. C. & ISAACS, J. T. 1997. Genomic organization of the human KAI1 metastasis-suppressor gene. *Genomics*, 41, 25-32.
- DONG, J. T., LAMB, P. W., RINKER-SCHAEFFER, C. W., VUKANOVIC, J., ICHIKAWA, T., ISAACS, J. T. & BARRETT, J. C. 1995. KAI1, a metastasis

- suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*, 268, 884-6.
- DURIEZ, C., FALETTE, N., CORTES, U., MOYRET-LALLE, C. & PUISIEUX, A. 2000. Absence of p53-dependent induction of the metastatic suppressor KAI1 gene after DNA damage. *Oncogene*, 19, 2461-4.
- DZHANG, X. A., BONTRAGER, A. L. & HEMLER, M. E. 2001. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem*, 276, 25005-13.
- FELDING-HABERMANN, B. 2003. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 20, 203-13.
- FELDING-HABERMANN, B., FRANSVEA, E., O'TOOLE, T. E., MANZUK, L., FAHA, B. & HENSLER, M. 2002. Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*, 19, 427-36.
- FELDING-HABERMANN, B., O'TOOLE, T. E., SMITH, J. W., FRANSVEA, E., RUGGERI, Z. M., GINSBERG, M. H., HUGHES, P. E., PAMPORI, N., SHATTIL, S. J., SAVEN, A. & MUELLER, B. M. 2001. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1853-8.
- FRIESS, H., GUO, X. Z., BERBERAT, P., GRABER, H. U., ZIMMERMANN, A., KORC, M. & BUCHLER, M. W. 1998. Reduced KAI1 expression in pancreatic cancer is associated with lymph node and distant metastases. *Int J Cancer*, 79, 349-55.
- GALLAGHER, S. R. 2012. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 10, Unit 10 1 1-44.
- GAUGITSCH, H. W., HOFER, E., HUBER, N. E., SCHNABL, E. & BAUMRUKER, T. 1991. A new superfamily of lymphoid and melanoma cell proteins with extensive homology to *Schistosoma mansoni* antigen Sm23. *Eur J Immunol*, 21, 377-83.
- GIANCOTTI, F. G. & MAINIERO, F. 1994. Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1198, 47-64.
- GIL, M. L., VITA, N., LEBEL-BINAY, S., MILOUX, B., CHALON, P., KAGHAD, M., MARCHIOL-FOURNIGAULT, C., CONJEAUD, H., CAPUT, D., FERRARA, P. & ET AL. 1992. A member of the tetra spans transmembrane protein superfamily is recognized by a monoclonal antibody raised against an HLA class I-deficient, lymphokine-activated killer-susceptible, B lymphocyte line. Cloning and preliminary functional studies. *J Immunol*, 148, 2826-33.
- GUAN-ZHEN, Y., YING, C., CAN-RONG, N., GUO-DONG, W., JIAN-XIN, Q. & JIE-JUN, W. 2007. Reduced protein expression of metastasis-related genes (nm23, KISS1, KAI1 and p53) in lymph node and liver metastases of gastric cancer. *Int J Exp Pathol*, 88, 175-83.
- GUO, X., FRIESS, H., GRABER, H. U., KASHIWAGI, M., ZIMMERMANN, A., KORC, M. & BUCHLER, M. W. 1996. KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases. *Cancer Res*, 56, 4876-80.
- GUO, X. Z., FRIESS, H., DI MOLA, F. F., HEINICKE, J. M., ABOU-SHADY, M., GRABER, H. U., BAER, H. U., ZIMMERMANN, A., KORC, M. & BUCHLER, M. W. 1998. KAI1, a new metastasis suppressor gene, is reduced in metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 28, 1481-8.

- GUO, X. Z., FRIESS, H., SHAO, X. D., LIU, M. P., XIA, Y. T., XU, J. H. & BUCHLER, M. W. 2000. KAI1 gene is differently expressed in papillary and pancreatic cancer: influence on metastasis. *World J Gastroenterol*, 6, 866-871.
- HAMMOND, C., DENZIN, L. K., PAN, M., GRIFFITH, J. M., GEUZE, H. J. & CRESSWELL, P. 1998. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J Immunol*, 161, 3282-91.
- HAPKE, S., KESSLER, H., ARROYO DE PRADA, N., BENGE, A., SCHMITT, M., LENGYEL, E. & REUNING, U. 2001. Integrin alpha(v)beta(3)/vitronectin interaction affects expression of the urokinase system in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem*, 276, 26340-8.
- HAPKE, S., KESSLER, H., LUBER, B., BENGE, A., HUTZLER, P., HOFER, H., SCHMITT, M. & REUNING, U. 2003. Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem*, 384, 1073-83.
- HEMLER, M. E. 2001. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol*, 155, 1103-7.
- HERSEY, P., SOSMAN, J., O'DAY, S., RICHARDS, J., BEDIKIAN, A., GONZALEZ, R., SHARFMAN, W., WEBER, R., LOGAN, T., BUZOIANU, M., HAMMERSHAIMB, L. & KIRKWOOD, J. M. 2010. A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin alpha(v)beta(3), + or - dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. *Cancer*, 116, 1526-34.
- HEYMAN, L., KELLOUCHE, S., FERNANDES, J., DUTOIT, S., POULAIN, L. & CARREIRAS, F. 2008. Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Tumour Biol*, 29, 231-44.
- HEYMAN, L., LEROY-DUDAL, J., FERNANDES, J., SEYER, D., DUTOIT, S. & CARREIRAS, F. 2010. Mesothelial vitronectin stimulates migration of ovarian cancer cells. *Cell Biol Int*, 34, 493-502.
- HIGASHIYAMA, M., KODAMA, K., YOKOUCHI, H., TAKAMI, K., ADACHI, M., TAKI, T., ISHIGURO, S., NAKAMORI, S., YOSHIE, O. & MIYAKE, M. 1998. KAI1/CD82 expression in nonsmall cell lung carcinoma is a novel, favorable prognostic factor: an immunohistochemical analysis. *Cancer*, 83, 466-74.
- HOULE, C. D., DING, X. Y., FOLEY, J. F., AFSHARI, C. A., BARRETT, J. C. & DAVIS, B. J. 2002. Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol*, 86, 69-78.
- HYNES, R. O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48, 549-54.
- HYNES, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87.
- HYNES, R. O. 2003. Structural biology. Changing partners. *Science*, 300, 755-6.
- IIIZUMI, M., BANDYOPADHYAY, S. & WATABE, K. 2007. Interaction of Duffy antigen receptor for chemokines and KAI1: a critical step in metastasis suppression. *Cancer Res*, 67, 1411-4.
- IMAI, T., FUKUDOME, K., TAKAGI, S., NAGIRA, M., FURUSE, M., FUKUHARA, N., NISHIMURA, M., HINUMA, Y. & YOSHIE, O. 1992. C33 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T cell leukemia virus type 1-induced syncytium formation is a member of a new family of transmembrane proteins including CD9, CD37, CD53, and CD63. *J Immunol*, 149, 2879-86.

- JACKSON, P., GRIMM, M. O., KINGSLEY, E. A., BROSIUS, U., ANTALIS, T., YARDLEY, G. & RUSSELL, P. J. 2002. Relationship between expression of KAI1 metastasis suppressor gene, mRNA levels and p53 in human bladder and prostate cancer cell lines. *Urol Oncol*, 7, 99-104.
- JACKSON, P., KINGSLEY, E. A. & RUSSELL, P. J. 2000a. Inverse correlation between KAI1 mRNA levels and invasive behaviour in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett*, 156, 9-17.
- JACKSON, P., MARREIROS, A. & RUSSELL, P. J. 2005. KAI1 tetraspanin and metastasis suppressor. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 530-4.
- JACKSON, P., MILLAR, D., KINGSLEY, E., YARDLEY, G., OW, K., CLARK, S. & RUSSELL, P. J. 2000b. Methylation of a CpG island within the promoter region of the KAI1 metastasis suppressor gene is not responsible for down-regulation of KAI1 expression in invasive cancers or cancer cell lines. *Cancer Lett*, 157, 169-76.
- JACKSON, P., OW, K., YARDLEY, G., DELPRADO, W., QUINN, D. I., YANG, J. L. & RUSSELL, P. J. 2003. Downregulation of KAI1 mRNA in localised prostate cancer and its bony metastases does not correlate with p53 overexpression. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 6, 174-81.
- JACKSON, P. & PUISIEUX, A. 2000. Is the KAI1 metastasis suppressor gene a cellular target of p53? A review of current evidence. *Biochem Biophys Res Commun*, 278, 499-502.
- JACKSON, P., ROWE, A. & GRIMM, M. O. 2007. An alternatively spliced KAI1 mRNA is expressed at low levels in human bladder cancers and bladder cancer cell lines and is not associated with invasive behaviour. *Oncol Rep*, 18, 1357-63.
- JEE, B., JIN, K., HAHN, J. H., SONG, H. G. & LEE, H. 2003. Metastasis-suppressor KAI1/CD82 induces homotypic aggregation of human prostate cancer cells through Src-dependent pathway. *Exp Mol Med*, 35, 30-7.
- JEE, B. K., LEE, J. Y., LIM, Y., LEE, K. H. & JO, Y. H. 2007. Effect of KAI1/CD82 on the beta1 integrin maturation in highly migratory carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 359, 703-8.
- KAUR, S., KENNY, H. A., JAGADEESWARAN, S., ZILLHARDT, M. R., MONTAG, A. G., KISTNER, E., YAMADA, S. D., MITRA, A. K. & LENGYEL, E. 2009. {beta}3-integrin expression on tumor cells inhibits tumor progression, reduces metastasis, and is associated with a favorable prognosis in patients with ovarian cancer. *Am J Pathol*, 175, 2184-96.
- KAWANA, Y., KOMIYA, A., UEDA, T., NIHEI, N., KURAMOCHI, H., SUZUKI, H., YATANI, R., IMAI, T., DONG, J. T., IMAI, T., YOSHIE, O., BARRETT, J. C., ISAACS, J. T., SHIMAZAKI, J., ITO, H. & ICHIKAWA, T. 1997. Location of KAI1 on the short arm of human chromosome 11 and frequency of allelic loss in advanced human prostate cancer. *Prostate*, 32, 205-13.
- KIM, T. J., LANDEN, C. N., LIN, Y. G., MANGALA, L. S., LU, C., NICK, A. M., STONE, R. L., MERRITT, W. M., ARMAIZ-PENA, G., JENNINGS, N. B., COLEMAN, R. L., TICE, D. A. & SOOD, A. K. 2009. Combined anti-angiogenic therapy against VEGF and integrin alphaVbeta3 in an orthotopic model of ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*, 8, 2263-72.
- LANDEGREN, U. 1984. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods*, 67, 379-88.

- LANDEN, C. N., KIM, T. J., LIN, Y. G., MERRITT, W. M., KAMAT, A. A., HAN, L. Y., SPANNUTH, W. A., NICK, A. M., JENNNINGS, N. B., KINCH, M. S., TICE, D. & SOOD, A. K. 2008. Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of alphavbeta3 integrin in ovarian cancer. *Neoplasia*, 10, 1259-67.
- LAWLER, J., WEINSTEIN, R. & HYNES, R. O. 1988. Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol*, 107, 2351-61.
- LEE, H. A., PARK, I., BYUN, H. J., JEOUNG, D., KIM, Y. M. & LEE, H. 2011a. Metastasis suppressor KAI1/CD82 attenuates the matrix adhesion of human prostate cancer cells by suppressing fibronectin expression and beta1 integrin activation. *Cell Physiol Biochem*, 27, 575-86.
- LEE, H. S., LEE, H. K., KIM, H. S., YANG, H. K. & KIM, W. H. 2003a. Tumour suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis. *J Pathol*, 200, 39-46.
- LEE, J. H., PARK, S. R., CHAY, K. O., SEO, Y. W., KOOK, H., AHN, K. Y., KIM, Y. J. & KIM, K. K. 2004. KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin (KITENIN), a member of the tetraspanin family, interacts with KAI1, a tumor metastasis suppressor, and enhances metastasis of cancer. *Cancer Res*, 64, 4235-43.
- LEE, J. H., SEO, Y. W., PARK, S. R., KIM, Y. J. & KIM, K. K. 2003b. Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res*, 63, 7247-55.
- LEE, J. K., BAE, J. A., SUN, E. G., KIM, H. D., YOON, T. M., KIM, K., LEE, J. H., LIM, S. C. & KIM, K. K. 2009. KITENIN increases invasion and migration of mouse squamous cancer cells and promotes pulmonary metastasis in a mouse squamous tumor model. *FEBS Lett*, 583, 711-7.
- LEE, J. K., YOON, T. M., SEO, D. J., SUN, E. G., BAE, J. A., LIM, S. C., CHOI, Y. D., LEE, J. H., JOO, Y. E. & KIM, K. K. 2010. KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin (KITENIN) expression in early and advanced laryngeal cancer. *Laryngoscope*, 120, 953-8.
- LEE, S., SONG, Y. A., PARK, Y. L., CHO, S. B., LEE, W. S., LEE, J. H., CHUNG, I. J., KIM, K. K., REW, J. S. & JOO, Y. E. 2011b. Expression of KITENIN in human colorectal cancer and its relation to tumor behavior and progression. *Pathol Int*, 61, 210-20.
- LEVY, S. & SHOHAM, T. 2005a. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)*, 20, 218-24.
- LEVY, S. & SHOHAM, T. 2005b. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol*, 5, 136-48.
- LIAPIS, H., ADLER, L. M., WICK, M. R. & RADER, J. S. 1997. Expression of alpha(v)beta3 integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Hum Pathol*, 28, 443-9.
- LIU, F. S., CHEN, J. T., DONG, J. T., HSIEH, Y. T., LIN, A. J., HO, E. S., HUNG, M. J. & LU, C. H. 2001. KAI1 metastasis suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma. *Am J Pathol*, 159, 1629-34.
- LIU, F. S., DONG, J. T., CHEN, J. T., HSIEH, Y. T., HO, E. S. & HUNG, M. J. 2000. Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 78, 10-5.

- LIU, F. S., DONG, J. T., CHEN, J. T., HSIEH, Y. T., HO, E. S., HUNG, M. J., LU, C. H. & CHIOU, L. C. 2003a. KAI1 metastasis suppressor protein is down-regulated during the progression of human endometrial cancer. *Clin Cancer Res*, 9, 1393-8.
- LIU, L., WU, D. H., LI, Z. G., YANG, G. Z. & DING, Y. Q. 2003b. Effects of KAI1/CD82 on biological behavior of human colorectal carcinoma cell line. *World J Gastroenterol*, 9, 1231-6.
- LIU, W. M. & ZHANG, X. A. 2006. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett*, 240, 183-94.
- LOMBARDI, D. P., GERADTS, J., FOLEY, J. F., CHIAO, C., LAMB, P. W. & BARRETT, J. C. 1999. Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer. *Cancer Res*, 59, 5724-31.
- LÖSSNER, D., ABOU-AJRAM, C., BENGE, A., AUMERCIER, M., SCHMITT, M. & REUNING, U. 2009. Integrin alphavbeta3 upregulates integrin-linked kinase expression in human ovarian cancer cells via enhancement of ILK gene transcription. *J Cell Physiol*, 220, 367-75.
- LÖSSNER, D., ABOU-AJRAM, C., BENGE, A. & REUNING, U. 2008. Integrin alphavbeta3 mediates upregulation of epidermal growth-factor receptor expression and activity in human ovarian cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2746-61.
- LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M., MYRTEK, D. 2009a. Durchflusscytometrie. In: LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M., MYRTEK, D. (ed.) *Der Experimentator: Immunologie*. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag.
- LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M., MYRTEK, D. 2009b. Tetrazoliumsals-Reduktion. *Der Experimentator: Immunologie*. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag.
- LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M., MYRTEK, D. 2009c. Western-Blot. In: LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M., MYRTEK, D. (ed.) *Der Experimentator: Immunologie*. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag.
- MALIK, F. A., SANDERS, A. J. & JIANG, W. G. 2009a. KAI-1/CD82, the molecule and clinical implication in cancer and cancer metastasis. *Histol Histopathol*, 24, 519-30.
- MALIK, F. A., SANDERS, A. J., KAYANI, M. A. & JIANG, W. G. 2009b. Effect of expressional alteration of KAI1 on breast cancer cell growth, adhesion, migration and invasion. *Cancer Genomics Proteomics*, 6, 205-13.
- MARREIROS, A., CZOLIJ, R., YARDLEY, G., CROSSLEY, M. & JACKSON, P. 2003. Identification of regulatory regions within the KAI1 promoter: a role for binding of AP1, AP2 and p53. *Gene*, 302, 155-64.
- MASHIMO, T., BANDYOPADHYAY, S., GOODARZI, G., WATABE, M., PAI, S. K., GROSS, S. C. & WATABE, K. 2000. Activation of the tumor metastasis suppressor gene, KAI1, by etoposide is mediated by p53 and c-Jun genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 274, 370-6.
- MASHIMO, T., WATABE, M., HIROTA, S., HOSOBÉ, S., MIURA, K., TEGTMEYER, P. J., RINKER-SHAEFFER, C. W. & WATABE, K. 1998. The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11307-11.

- MAUBANT, S., CRUET-HENNEQUART, S., DUTOIT, S., DENOUX, Y., CROUET, H., HENRY-AMAR, M. & GAUDUCHON, P. 2005. Expression of alpha V-associated integrin beta subunits in epithelial ovarian cancer and its relation to prognosis in patients treated with platinum-based regimens. *J Mol Histol*, 36, 119-29.
- MIRANTI, C. K. 2009. Controlling cell surface dynamics and signaling: how CD82/KAI1 suppresses metastasis. *Cell Signal*, 21, 196-211.
- MÖBUS, V., GERHARZ, C. D., PRESS, U., MOLL, R., BECK, T., MELLIN, W., POLLOW, K., KNAPSTEIN, P. G. & KREIENBERG, R. 1992. Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 52, 76-84.
- MOSER, M., LEGATE, K. R., ZENT, R. & FASSLER, R. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*, 324, 895-9.
- NEMETH, J. A., CHER, M. L., ZHOU, Z., MULLINS, C., BHAGAT, S. & TRIKHA, M. 2003. Inhibition of alpha(v)beta3 integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis*, 20, 413-20.
- ODINTSOVA, E., SUGIURA, T. & BERDITCHEVSKI, F. 2000. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol*, 10, 1009-12.
- ONO, M., HANDA, K., WITHERS, D. A. & HAKOMORI, S. 1999. Motility inhibition and apoptosis are induced by metastasis-suppressing gene product CD82 and its analogue CD9, with concurrent glycosylation. *Cancer Res*, 59, 2335-9.
- OZOLS, R. F., BOOKMAN, M. A., CONNOLLY, D. C., DALY, M. B., GODWIN, A. K., SCHILDER, R. J., XU, X. & HAMILTON, T. C. 2004. Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell*, 5, 19-24.
- PARTHEEN, K., LEVAN, K., OSTERBERG, L., CLAEISSON, I., SUNDFELDT, K. & HORVATH, G. 2009. External validation suggests Integrin beta 3 as prognostic biomarker in serous ovarian adenocarcinomas. *BMC Cancer*, 9, 336.
- PREISSNER, K. T. & REUNING, U. 2011. Vitronectin in vascular context: facets of a multitasking matricellular protein. *Semin Thromb Hemost*, 37, 408-24.
- REUNING, U. 2011. Integrin alphabeta3 promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells implicating rel transcription factors. *J Cell Biochem*, 112, 1909-19.
- ROMANSKA, H. M. & BERDITCHEVSKI, F. 2011. Tetraspanins in human epithelial malignancies. *J Pathol*, 223, 4-14.
- ROWE, A. & JACKSON, P. 2006. Expression of KITENIN, a KAI1/CD82 binding protein and metastasis enhancer, in bladder cancer cell lines: relationship to KAI1/CD82 levels and invasive behaviour. *Oncol Rep*, 16, 1267-72.
- RUSEVA, Z., GEIGER, P. X., HUTZLER, P., KOTZSCH, M., LUBER, B., SCHMITT, M., GROSS, E. & REUNING, U. 2009. Tumor suppressor KAI1 affects integrin alphavbeta3-mediated ovarian cancer cell adhesion, motility, and proliferation. *Exp Cell Res*, 315, 1759-71.
- RYU, H. S., PARK, Y. L., PARK, S. J., LEE, J. H., CHO, S. B., LEE, W. S., CHUNG, I. J., KIM, K. K., LEE, K. H., KWEON, S. S. & JOO, Y. E. 2010. KITENIN is associated with tumor progression in human gastric cancer. *Anticancer Res*, 30, 3479-86.

- SALA-VALDES, M., URSA, A., CHARRIN, S., RUBINSTEIN, E., HEMLER, M. E., SANCHEZ-MADRID, F. & YANEZ-MO, M. 2006. EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem*, 281, 19665-75.
- SCHINDL, M., BACHTIARY, B., DREIER, B., BIRNER, P., LATINOVIC, L., KARNER, B., BREITENECKER, G. & OBERHUBER, G. 2001a. Impact of human papillomavirus infection on the expression of the KAI1 metastasis suppressor protein in invasive cervical cancer. *Cancer Lett*, 162, 261-6.
- SCHINDL, M., BIRNER, P., BREITENECKER, G. & OBERHUBER, G. 2001b. Downregulation of KAI1 metastasis suppressor protein is associated with a dismal prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 83, 244-8.
- SEKITA, N., SUZUKI, H., ICHIKAWA, T., KITO, H., AKAKURA, K., IGARASHI, T., NAKAYAMA, T., WATANABE, M., SHIRAIISHI, T., TOYOTA, M., YOSHIE, O. & ITO, H. 2001. Epigenetic regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene in human prostate cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res*, 92, 947-51.
- SHIELD, K., ACKLAND, M. L., AHMED, N. & RICE, G. E. 2009. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol*, 113, 143-8.
- SRIDHAR, S. C. & MIRANTI, C. K. 2006. Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. *Oncogene*, 25, 2367-78.
- STIPP, C. S. 2010. Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. *Expert Rev Mol Med*, 12, e3.
- STIPP, C. S., KOLESNIKOVA, T. V. & HEMLER, M. E. 2001. EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem*, 276, 40545-54.
- SZOLLOSI, J., HOREJSI, V., BENE, L., ANGELISOVA, P. & DAMJANOVICH, S. 1996. Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J Immunol*, 157, 2939-46.
- TAGAWA, K., ARIHIRO, K., TAKESHIMA, Y., HIYAMA, E., YAMASAKI, M. & INAI, K. 1999. Down-regulation of KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 90, 970-6.
- TAKAOKA, A., HINODA, Y., SATO, S., ITOH, F., ADACHI, M., HAREYAMA, M. & IMAI, K. 1998a. Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. *Jpn J Cancer Res*, 89, 397-404.
- TAKAOKA, A., HINODA, Y., SATOH, S., ADACHI, Y., ITOH, F., ADACHI, M. & IMAI, K. 1998b. Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene*, 16, 1443-53.
- TAMKUN, J. W., DESIMONE, D. W., FONDA, D., PATEL, R. S., BUCK, C., HORWITZ, A. F. & HYNES, R. O. 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*, 46, 271-82.
- TAN, D. S., AGARWAL, R. & KAYE, S. B. 2006. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol*, 7, 925-34.
- TAI, Y. C., MENDOZA, A., MARIANO, J. M., ZHOU, M., KOSTOVA, Z., CHEN, B., VEENSTRA, T., HEWITT, S. M., HELMAN, L. J., KHANNA, C. & WEISSMAN, M. 2006. KAI1 is a novel tumor suppressor gene in human prostate cancer. *Cancer Res*, 66, 1053-61.

- A. M. 2007. The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation. *Nat Med*, 13, 1504-9.
- TSAI, Y. C. & WEISSMAN, A. M. 2011. Dissecting the diverse functions of the metastasis suppressor CD82/KAI1. *FEBS Lett*, 585, 3166-73.
- UZAWA, K., ONO, K., SUZUKI, H., TANAKA, C., YAKUSHIJI, T., YAMAMOTO, N., YOKOE, H. & TANZAWA, H. 2002. High prevalence of decreased expression of KAI1 metastasis suppressor in human oral carcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 8, 828-35.
- WANG, H., ZHANG, W., ZHAO, J., ZHANG, L., LIU, M., YAN, G., YAO, J., YU, H. & YANG, P. 2011. N-glycosylation pattern of recombinant human CD82 (KAI1), a tumor-associated membrane protein. *J Proteomics*.
- WHITE, A., LAMB, P. W. & BARRETT, J. C. 1998. Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines. *Oncogene*, 16, 3143-9.
- WU, Q., JI, Y., ZHANG, M. Q., CHEN, Y. Q., CHEN, F., SHI, D. L., ZHENG, Z. H., HUANG, Y. J. & SU, W. J. 2003. Role of tumor metastasis suppressor gene KAI1 in digestive tract carcinomas and cancer cells. *Cell Tissue Res*, 314, 237-49.
- XIONG, J. P., STEHLE, T., DIEFENBACH, B., ZHANG, R., DUNKER, R., SCOTT, D. L., JOACHIMIAK, A., GOODMAN, S. L. & ARNAOUT, M. A. 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science*, 294, 339-45.
- XU, J. H., GUO, X. Z., REN, L. N., SHAO, L. C. & LIU, M. P. 2008. KAI1 is a potential target for anti-metastasis in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*, 14, 1126-32.
- YANG, J. L., JACKSON, P., YU, Y., RUSSELL, P. J., MARKOVIC, B. & CROWE, P. J. 2002. Expression of the KAI1 metastasis suppressor gene in non-metastatic versus metastatic human colorectal cancer. *Anticancer Res*, 22, 3337-42.
- YANG, X., WEI, L., TANG, C., SLACK, R., MONTGOMERY, E. & LIPPMAN, M. 2000. KAI1 protein is down-regulated during the progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res*, 6, 3424-9.
- YANG, X., WEI, L. L., TANG, C., SLACK, R., MUELLER, S. & LIPPMAN, M. E. 2001. Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res*, 61, 5284-8.
- YUNTA, M. & LAZO, P. A. 2003. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal*, 15, 559-64.
- ZHANG, X. A., HE, B., ZHOU, B. & LIU, L. 2003a. Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration. *J Biol Chem*, 278, 27319-28.
- ZHANG, X. A., LANE, W. S., CHARRIN, S., RUBINSTEIN, E. & LIU, L. 2003b. EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 63, 2665-74.
- ZOLLER, M. 2009. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9, 40-55.

8 Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bedanken bei:

- Herrn Prof. Manfred Schmitt, dass ich in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik, Klinikum rechts der Isar, meine Arbeit durchführen durfte.
- Frau Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ute Reuning für die fachliche Unterstützung, die Mühe und Geduld sowohl beim schriftlichen Verfassen der vorliegenden Arbeit als auch bei den praktische Arbeiten im Labor.
- Frau Anke Bengel für die gute praktische Einarbeitung sowie für die Hilfe und fachliche Unterstützung im Labor.
- Frau Dr. rer. nat. Martina Müller, damals biologische Doktorandin, und meiner medizinischen Mitdoktorandin Sina Upheber für den fachlichen Austausch und die stets kollegiale Zusammenarbeit.
- Frau Dr. Eva Gross und Frau Steffi Hohenester, Tumorgenetische Arbeitsgruppe der Frauenklinik der TUM, dafür, dass sie mir den Expressionsvektor für KAI1-Splice für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.
- Frau Zlatna Ruseva dafür, dass sie mir den Expressionsvektor für KAI1-WT und die Vektor-transfizierten Wildtyp-OV-MZ-6-Zellen zur Verfügung gestellt hat.
- Allen Mitarbeitern der Klinischen Forschung der Frauenklinik, Klinikum rechts der Isar, für die gute Zusammenarbeit.
- Meinem Vater Edgar Karle, der mich während meines gesamten Medizinstudiums und während dieser Arbeit unterstützt hat.