

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie

Untersuchungen zur Bedeutung des Tetraspanins CD63 für  
die Metastasierung von humanen und murinen  
Tumorzelllinien

Bastian Nils Christopher Seubert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Haller
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. H. Daniel
	2. apl. Prof. Dr. A. Krüger

Die Dissertation wurde am 08.01.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.03.2015 angenommen.



Für Doris und Maja

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Die Biologie der Krebserkrankung .....	2
2.1.1 Grundlagen der Krebsentstehung.....	2
2.1.2 Krebs als Zivilisationskrankheit – Das Problem der Metastasierung.....	3
2.1.3 Hauptmerkmale von malignen Krebserkrankungen .....	4
2.2 Die metastatische Kaskade.....	5
2.2.1 Der Organtropismus von Metastasen.....	9
2.3 Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT).....	12
2.3.1 Einführung in die epitheliale-mesenchymale Transition.....	12
2.3.2 Die Rolle der EMT bei der Tumorprogression.....	13
2.3.3 EMT-induzierende Signalwege .....	15
2.3.4 Biomarker der EMT in der Tumorprogression.....	17
2.3.4.1 Zelloberflächenmarker der EMT .....	17
2.3.4.2 Zytoskelettale Proteine als EMT-Marker .....	18
2.3.4.3 Extrazelluläre Proteine als EMT-Marker.....	19
2.3.4.4 Transkriptionsfaktoren.....	20
2.4 Die Tetraspanin-Proteinfamilie .....	20
2.4.1 Bedeutung der Tetraspanine in der humanen Tumorprogression.....	22
2.4.2 Das Tetraspanin CD63.....	23
2.4.3 Die Bedeutung von CD63 bei humanen Krebserkrankungen.....	24
2.4.4 Der <i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i> (TIMP)-1 .....	25
3. Ziel der Arbeit.....	27
4. Material und Methoden.....	29
4.1 Tierexperimentelle Methoden .....	29
4.1.1 Verwendete Versuchstiere .....	29
4.1.2 Metastasierungsmodelle.....	30
4.1.2.1 Das experimentelle Metastasierungsmodell SKOV3ipL.....	30
4.1.2.2 Das experimentelle Metastasierungsmodell B16F10L.....	32
4.1.2.3 Das experimentelle Metastasierungsmodell Eb288L .....	32
4.1.2.4 Das experimentelle Metastasierungsmodell PyMTL.....	34
4.1.2.5 Tiermodell zur Analyse der TIMP-1-induzierten Veränderungen in der Mikroumgebung des Zielorgans der Metastasierung .....	36
4.1.2.6 Das Metastasierungsmodell zur Analyse der TIMP-1-induzierten prä-metastatischen Nische.....	36
4.1.3 Probengewinnung .....	38

4.1.4 X-Gal-Färbung.....	38
4.1.5 Immunhistochemische Methoden .....	39
4.1.5.1 Herstellung von Kryoschnitten .....	39
4.1.5.2 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten .....	39
4.1.5.3 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von Kryoschnitten.....	40
4.1.5.4 Herstellung von Paraffinschnitten .....	41
4.1.5.5 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten am Bondmax .....	41
4.2 Methoden der Zellkultur .....	41
4.2.1 Verwendete Zelllinien.....	41
4.2.2 Kultivierung der Zellen.....	42
4.2.3 Passagieren der Zelllinien .....	43
4.2.4 Bestimmung der Zellzahl.....	44
4.2.5 Herstellung lentiviraler Partikel und Infektion von adhären Zellen .....	44
4.2.6 Bestimmung der Zellproliferation .....	45
4.2.7 Viabilitätsassay .....	46
4.2.8 Analyse der Tumorzellmigration .....	46
4.2.9 Analyse der Invasivität der Tumorzellen.....	47
4.2.10 Analyse des Tumorzellscatterings .....	47
4.2.11 Klonogener Assay.....	48
4.3 Adenovirale Methoden.....	49
4.3.1 Adenovirale Konstrukte.....	49
4.3.1.1 Addl70-3 .....	49
4.3.1.2 AdTIMP-1.....	49
4.3.1.3 AdNTIMP-1 .....	49
4.3.1.4 AdTIMP-1/T2G .....	50
4.3.1.5 AdNTIMP-1/T2G .....	50
4.3.1.6 AdshNT.....	50
4.3.1.7 AdshCD63 .....	50
4.3.2 Amplifikation von Adenoviren.....	51
4.3.3 Aufreinigung von Adenoviren .....	51
4.3.4 Titration der verschiedenen Adenoviren.....	52
4.4 Molekularbiologische Methoden .....	53
4.4.1 Der Bakterienstamm TOP10.....	53
4.4.2 Verwendete Plasmide .....	53
4.4.3 Transformation von Bakterien .....	55
4.4.4 Selektion und Kultivierung <i>E. coli</i> TOP10.....	56

4.4.5 DNA-Maxipräparation.....	56
4.4.6 RNA-Präparation .....	56
4.4.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	57
4.4.8 Agarosegelelektrophorese.....	57
4.4.9 Reverse Transkription.....	58
4.4.10 Quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion (TaqMan®-Analyse).....	59
4.5 Proteinbiochemische Methoden .....	60
4.5.1 Proteinisolation .....	60
4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA.....	61
4.5.3 Westernblot.....	61
4.5.4 Humaner phospho-Kinase Array .....	63
4.5.5 Panorama® Antibody Mircoarray .....	63
4.5.6 Immunzytochemische Färbungen .....	64
4.6 Statistische Analyse .....	64
5. Ergebnisse .....	66
5.1 <i>Knockdown</i> von CD63 in humanen und murinen Tumorzelllinien .....	66
5.2 Notwendigkeit von CD63 für den Arrest von SKOV3ipL Ovarialkarzinomzellen in der Lunge .....	68
5.3 Notwendigkeit von CD63 für das Auswachsen von SKOV3ipL Ovarialkarzinomzellen in der Lunge.....	69
5.4 Notwendigkeit von CD63 für das Auswachsen von B16F10L Melanomzellen in der Lunge.....	71
5.5 Der <i>Knockdown</i> von CD63 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen <i>in vitro</i> .....	72
5.6 Der <i>Knockdown</i> von CD63 hat keinen Einfluss auf das Tumorzellüberleben.....	73
5.7 Der <i>Knockdown</i> von CD63 reduziert die Migration von Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs .....	74
5.8 Der <i>Knockdown</i> von CD63 reduziert die Invasion von Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs .....	76
5.9 CD63 stabilisiert die spindelförmige Morphologie von Tumorzellen .....	78
5.10 Notwendigkeit von CD63 für das Scattering von Tumorzellen.....	79
5.11 Der <i>Knockdown</i> von CD63 führt zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts ..	81
5.12 Unabhängigkeit der CD63-regulierten Tumorzellmorphologie von Hypoxie .....	82
5.13 CD63 reguliert die mRNA-Expression von metastasierungs-assoziierten Genen ..	83
5.14 CD63 unterdrückt die Expression von E-Cadherin.....	84
5.15 Der <i>Knockdown</i> von CD63 reduziert die Expression der E-Cadherin-Repressoren Slug und Zeb1 .....	86
5.16 Abhängigkeit der miR-141-Expression von CD63 .....	88

5.17 CD63 stabilisiert die Expression von mesenchymalen Markerproteinen .....	89
5.18 CD63 reguliert die Kinaseaktivität in SKOV3ipL Tumorzellen.....	91
5.19 <i>Panorama Protein Microarray®</i> der SKOV3ipL CD63 <i>Knockdown</i> Zellen .....	92
5.20 CD63 stabilisiert $\beta$ -Catenin auf Proteinebene .....	93
5.21 Notwendigkeit von CD63 für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften von Tumorzellen .....	96
5.22 CD63 stabilisiert die Aktivität von GSK-3 $\beta$ .....	98
5.23 CD63 stabilisiert die Aktivität von PI3K/Akt.....	100
5.24 Notwendigkeit von CD63 für die TGF- $\beta$ 1-induzierte EMT .....	102
5.25 Herstellung von SKOV3ipL Tumorzellvarianten mit einer stabilen Überexpression von CD63 .....	104
5.26 Die Überexpression von CD63 erhöht die Migration von SKOV3ipL Tumorzellen .....	104
5.27 Die Überexpression von CD63 erhöht die Invasion von SKOV3ipL Tumorzellen .....	105
5.28 Die Überexpression von CD63 erhöht das zell-intrinsische metastatische Potential der SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie .....	107
5.29 Die TIMP-1-induzierte Lungenmetastasierung ist abhängig vom CD63-Status der Tumorzellen .....	108
5.30 Der Tumorzellphänotyp nach <i>Knockdown</i> von TIMP-1 ähnelt dem Phänotyp nach <i>Knockdown</i> von CD63 .....	110
5.31 Die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung ist unabhängig vom CD63-Status der Tumorzellen .....	111
5.32 Die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung ist unabhängig vom zell-intrinsischen metastatischen Potential der Tumorzellen .....	113
5.33 Notwendigkeit der C-terminalen Domäne von TIMP-1 für die Induktion der Lebermetastasierung .....	115
5.34 Charakterisierung der TIMP-1-induzierten pro-metastatischen Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber .....	116
5.35 Notwendigkeit der SDF-1/CXCR4-Achse für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung .....	120
5.36 Primärtumor-sezerniertes TIMP-1 induziert die Lebermetastasierung.....	124
6. Diskussion.....	128
6.1 CD63 – Ein pro-metastatischer Faktor.....	128
6.1.1 CD63 fördert das Auswachsen von Metastasen in der Lunge .....	130
6.2 CD63 moduliert die zelluläre Plastizität von Tumorzellen.....	131
6.3 CD63 stabilisiert die Stammzeleigenschaften von Tumorzellen .....	133
6.4 Die CD63-abhängige Regulation von $\beta$ -Catenin .....	134
6.5 CD63 fördert die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber TGF- $\beta$ 1 .....	137
6.6 Bedeutung der CD63/TIMP-1-Interaktion für die Metastasierung.....	138

6.6.1 Die Bedeutung der CD63/TIMP-1-Interaktion für die Lungenmetastasierung	138
6.6.2 Die Bedeutung der CD63/TIMP-1-Interaktion für die Lebermetastasierung ....	140
6.7 Die CD63/TIMP-1-Achse als vielversprechendes therapeutisches Ziel .....	142
7. Ausblick .....	144
8. Literaturverzeichnis .....	147
9. Abbildungsverzeichnis.....	175
10. Abkürzungsverzeichnis.....	179
11. Danksagungen.....	183
12. Anhang .....	i
12.1 Publikationsverzeichnis.....	i



## 1. Zusammenfassung

Dem Tetraspanin CD63 wird eine Funktion in pro-metastatischen Signalwegen zugeschrieben. Allerdings ist CD63 in der Klinik sowohl als pro-metastatischer als auch als anti-metastatischer Faktor beschrieben. Diese widersprüchlichen Ergebnisse zur Rolle von CD63 während der Tumorprogression können darauf zurückgeführt werden, dass bisher unklar ist, wie CD63 die Metastasierung von Tumorzellen beeinflusst. Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von CD63 für die Metastasierung zu untersuchen.

Der shRNA-vermittelte *Knockdown* von CD63 in humanen und murinen Tumorzelllinien führte *in vitro* zu einer mesenchymalen-epithelialen Transition. Die Transition des Tumorzellphänotyps ging mit einer verringerten Motilität, einer verminderten Expression von E-Cadherin, sowie einer erhöhten Expression von mesenchymalen Markerproteinen einher. In Übereinstimmung mit den *in vitro* Ergebnissen hatte der *Knockdown* von CD63 im experimentellen Metastasierungsmodell eine massive Reduktion der Lungenmetastasierung zur Folge, während eine Überexpression von CD63 zu einem deutlichen Anstieg der Gesamttumorlast führte. Durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren konnte der PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin-Signalweg als Mediator des pro-metastatischen Effekts von CD63 identifiziert werden. Eine mögliche pro-metastatische Funktion von CD63 wird in der Literatur auf eine Interaktion mit TIMP-1 auf der Tumorzelloberfläche zurückgeführt. Im experimentellen Metastasierungsmodell führte der *Knockdown* von CD63 in Tumorzellen zur Inhibition der durch erhöhte systemische TIMP-1 Level-induzierten Lungenmetastasierung. Auf die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung hatte der *Knockdown* von CD63 jedoch keinen Einfluss. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass hohe systemische TIMP-1 Level eine prä-metastatische Nische in der Leber induzieren, die – unabhängig vom metastatischen Potential der Tumorzellen – die Lebermetastasierung induziert. Als ein zugrunde liegender Mechanismus der TIMP-1-induzierten Nische konnte eine SDF-1-abhängige Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Leberparenchym identifiziert werden. Für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung war die C-terminale Domäne des Proteins, die die Bindung an CD63 vermittelt, notwendig. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Tetraspanin CD63 im Zusammenspiel mit TIMP-1 eine bestimmende Rolle in der Regulation der Metastasierung einnimmt und eine therapeutische Hemmung der CD63/TIMP-1-Achse eine mögliche anti-metastatische Strategie darstellt.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die Biologie der Krebserkrankung

#### 2.1.1 Grundlagen der Krebsentstehung

Anfang des 19. Jahrhunderts ermöglichten die ersten Mikroskope die Entdeckung der Zelle als Grundbaustein aller Lebewesen (Schwann und Schleiden, 1838/39). Basierend auf der Zelltheorie entwickelte Virchow das Konzept der „Cellular-Pathologie“: Er vermutete, dass alle Krankheiten auf Störungen bzw. veränderte Funktionen von Zellen zurückzuführen seien (Virchow, 1860). Diese Theorie ebnete den Weg für die moderne Krebsforschung.

Die Aufrechterhaltung von adultem Gewebe über die gesamte Lebensspanne eines Organismus wird durch die Fähigkeit vieler Zellen gewährleistet, sich auch nach Abschluss des Wachstums weiter zu teilen. Von dieser Autonomie der Zellen geht gleichzeitig eine große Gefahr für den Organismus aus. So können Zellen Zugang zu genetischen Informationen erhalten, die unter physiologischen Bedingungen für ihre Funktion nicht vorgesehen sind. Zusätzlich ist das Genom der Zellen verschiedenen Einflüssen ausgesetzt, die Veränderungen in der Struktur verursachen und damit den Informationsgehalt verändern können. Die veränderte genetische Information kann völlig neue, häufig abnormale Zelltypen entstehen lassen, die mit der ursprünglichen Funktion der Zellen nicht mehr kompatibel sind. Betreffen diese unerwünschten Veränderungen das Zellwachstum, kann dies zur Entstehung einer großen Population von Zellen führen, die nicht länger die Regeln zur Aufrechterhaltung von normalem Gewebe einhalten. Ein solcher Tumor kann also auf Zellen zurückgeführt werden, bei denen die normale Entwicklung fehlgeschlagen ist (Weinberg, 2007).

Mehrzellige Organismen verfügen über außergewöhnliche Sicherheitsvorkehrungen, die die Entstehung von Tumoren verhindern und so die Integrität des Organismus gewährleisten. Trotzdem können Krebszellen überleben und proliferieren. Im Gegensatz zu normalen Zellen scheinen diese entarteten Zellen nur darauf aus zu sein, eine möglichst hohe Kopienzahl ihrer selbst zu erreichen. Die daraus resultierenden Tumoren können benigne (gutartig) sein; hier durchbrechen die Krebszellen nicht die Basalmembran. Von malignen (bösartig) Tumoren wird wiederum gesprochen, wenn die Krebszellen in der Lage sind, die Basalmembran zu durchbrechen, den Primärtumor zu verlassen und Tochtergeschwülste in entfernten Organen zu bilden (Weinberg, 2007). Dieser Prozess – die Metastasierung – ist für mehr als 90 % der krebsbedingten Todesfälle verantwortlich (Sporn, 1996).

Die Klassifikation von Krebs wird anhand des Zelltyps oder Organs vorgenommen, aus dem er stammt. Tumoren, die aus epithelialen Zellschichten des gastrointestinalen Trakts, der Haut, der Milchdrüsen, des Pankreas, der Lunge, der Leber, des Ovars, der Gallen- oder Harnblase entstehen, werden in die Gruppe der Karzinome eingeordnet (Weinberg, 2007). Epithelien sind ein- oder mehrlagige Gewebe, die alle inneren und äußeren Körperoberflächen bedecken. Auf Krebsarten epithelialen Ursprungs können mehr als 80 % der krebsbedingten Todesfälle zurückgeführt werden (Weinberg, 2007). Des Weiteren entstehen Tumoren aus nicht-epithelalem Gewebe innerhalb des Körpers. Hierzu gehören die Sarkome, die auf das Stützgewebe, Tumoren, die auf das hämatopoetische System, und Tumoren, die auf das zentrale oder das periphere Nervensystem zurückzuführen sind (Weinberg, 2007).

### **2.1.2 Krebs als Zivilisationskrankheit – Das Problem der Metastasierung**

Krebs zählt mit weltweit ca. 7,6 Millionen Toten (13 %) und ca. 12,7 Millionen Neuerkrankungen im Jahr 2008 zu einer der häufigsten Todesursachen. 56 % der neuen Krebsfälle und 63 % der Krebstoten treten in Entwicklungsländern auf (Ferlay et al., 2010). In Deutschland müssen 50 % der Männer und 43 % der Frauen damit rechnen, im Laufe ihres Lebens an Krebs zu erkranken. 25 % der erkrankten Männer und 20 % der erkrankten Frauen erliegen ihrem Krebsleiden (Robert Koch Institut, Krebs gesamt, 2009/10). Die weltweite Krebsbelastung wird aufgrund der wachsenden und alternden Bevölkerung, aber auch durch die Zunahme von Krebs-assoziierten Lebensweisen wie Rauchen, Bewegungsmangel und der westlichen Ernährung, weiter zunehmen (Jemal et al., 2011). Bei mehr als 90 % der Krebspatienten ist die Metastasierung, also die Streuung von Tumorzellen in fremde Organe, für den Tod verantwortlich (Hanahan und Weinberg, 2000; Sporn, 1996). Bis dato beruht die erfolgreichste Behandlungsmethode bei einer Krebserkrankung auf der Entfernung des Primärtumorgewebes durch einen operativen Eingriff, ehe die Streuung des Tumors stattgefunden hat. Allerdings sind die aktuellen diagnostischen Methoden für eine frühe Diagnose von Krebs trotz intensiver Forschung nach wie vor noch nicht ausreichend, und erste Studien weisen darauf hin, dass die Metastasierung schon sehr früh während der Tumorprogression stattfindet (Klein, 2009; Rhim et al., 2012). Aus diesem Grund kann die systemische Streuung von Krebszellen innerhalb des Körpers meist ungehindert voranschreiten. Die therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten von Krebspatienten, die bereits Metastasen tragen, ist meist nur mehr palliativ und zielt auf das Schrumpfen des

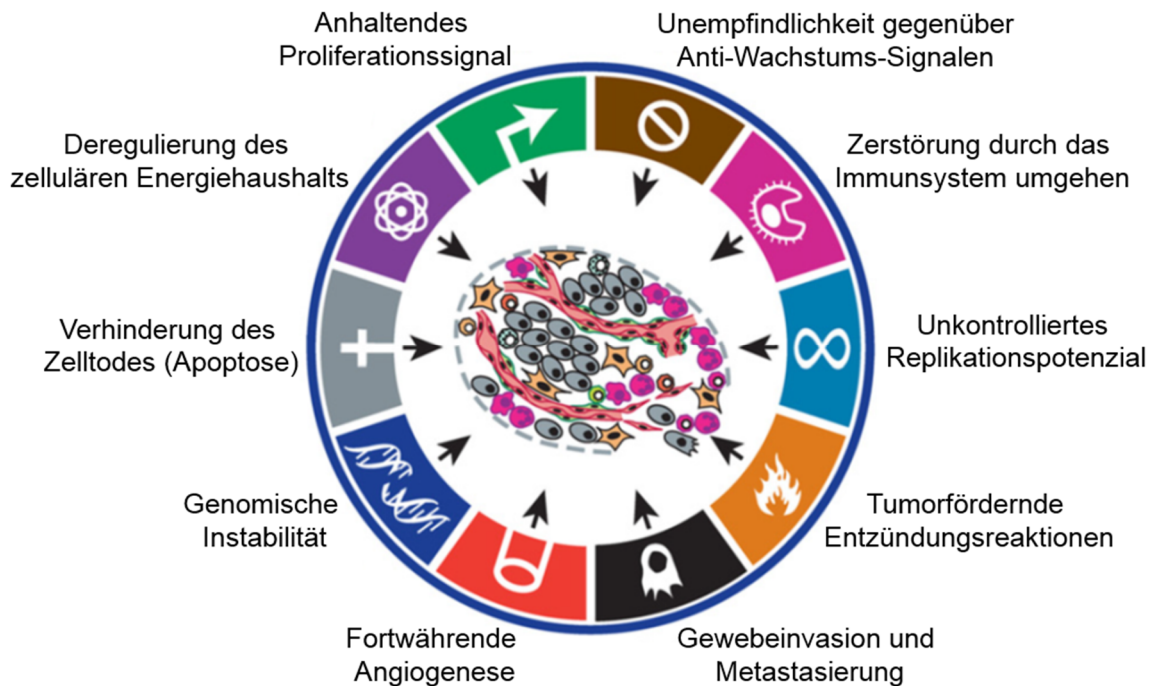
Primärtumors während früher Krebsstadien, die Verlängerung der progressionsfreien Überlebenszeit und die Verbesserung der Lebensqualität der Krebspatienten ab (Brabletz et al., 2013). Die fehlende Möglichkeit, Krebs auch in fortgeschrittenen Stadien effektiv behandeln zu können, ist einer der Hauptgründe für die niedrige Überlebensrate von Krebspatienten. Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die das Anwachsen von Metastasen im Zielorgan ermöglichen, könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze führen, die eine Behandlung des Krebspatienten auch in späten Stadien der Tumorprogression ermöglichen.

Ein weiteres großes Problem derzeitiger Krebstherapien ist die mangelhafte Selektivität der eingesetzten Medikamente. Sie treffen neben den Krebszellen auch gesunde Körperzellen und schwächen durch starke Nebenwirkungen die Patienten zusätzlich. Daher stehen neue Therapieansätze, die eine höhere Selektivität aufweisen, im Fokus der Krebsforschung.

### **2.1.3 Hauptmerkmale von malignen Krebserkrankungen**

Alle malignen Krebsarten teilen eine spezifische Reihe von Kerncharakteristika, die sogenannten „*hallmarks of cancer*“. Diese einzigartigen Fähigkeiten von Krebszellen wurden von Hanahan und Weinberg dargelegt (Hanahan und Weinberg, 2000) und sollen i) die unabhängige Eigenversorgung mit wachstumsstimulierenden Signalen garantieren (Proliferation), ii) resistent gegenüber dem Zelltod (Apoptose) sein, iii) wachstumshemmende Signalwege hemmen bzw. umgehen, iv) das Wandern in zellfremdes Gewebematerial (Metastase) ermöglichen bzw. das Absterben in zellfremdem Material (Anoikis) verhindern, v) die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) für eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen und vi) die uneingeschränkte Weitergabe von Information gewährleisten. Diese Kerncharakteristika wurden 2011 auf der Grundlage neuer Forschungsergebnisse erweitert (Hanahan und Weinberg, 2011). So beinhalten die Kerncharakteristika neben den zell-intrinsischen Eigenschaften der Krebszellen jetzt überdies wichtige Funktionen der Mikroumgebung am Ort des Primärtumors und des Sekundärorgans. Gleichzeitig deuten diese Kerncharakteristika auf mögliche Interventionsmöglichkeiten für die Behandlung von Krebspatienten hin. Es ist wahrscheinlich nicht notwendig, dass Krebszellen sämtliche Eigenschaften gleichzeitig aufweisen müssen. Für eine maligne Transformation von normalen Zellen könnten drei oder vier dieser Eigenschaften vollkommen ausreichen. Die Reihenfolge oder die Kombination

der einzelnen Kennzeichen spielt dabei keine entscheidende Rolle. Abbildung 2.1 zeigt die erweiterten Hauptcharakteristika von Krebs.



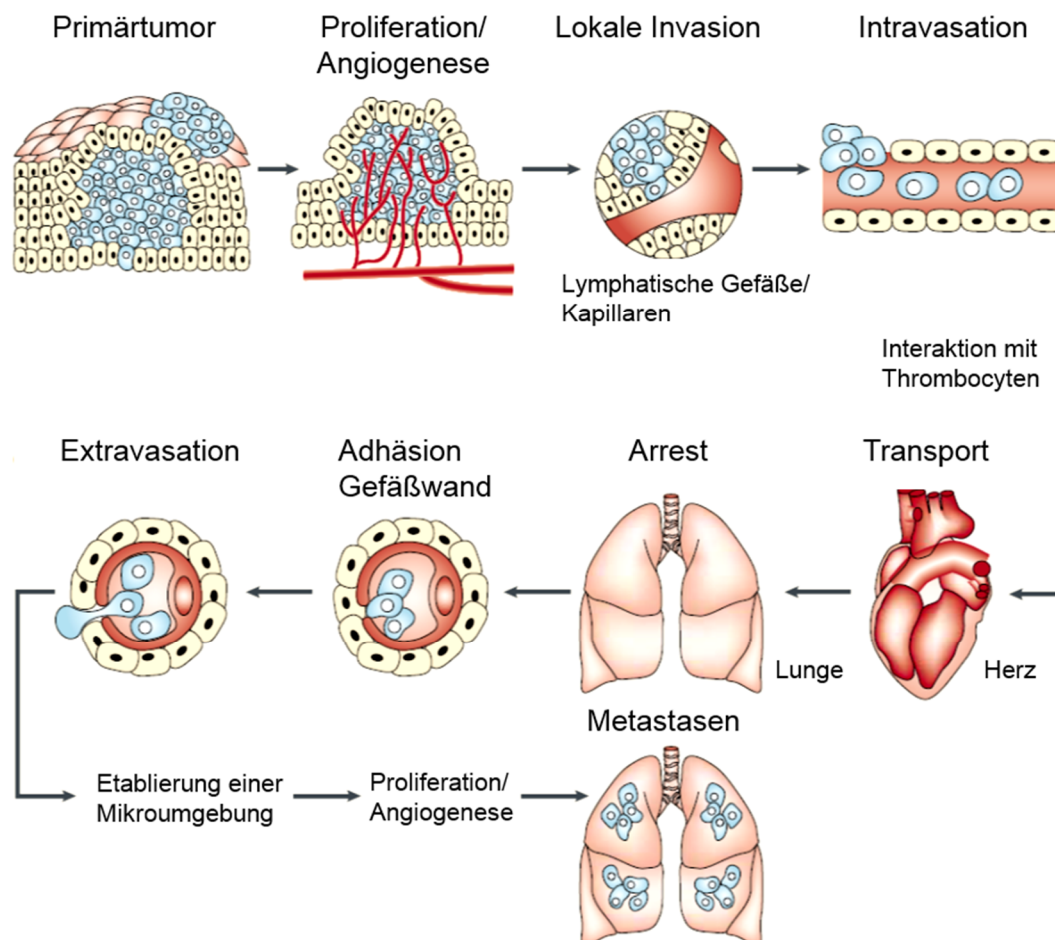
**Abbildung 2.1: Die Hauptmerkmale von Krebs.** Die Hauptmerkmale von Krebs wurden erstmals 2000 von D. Hanahan und R. Weinberg zusammengefasst und 2011 erweitert. Dargestellt sind die zehn heute bekannten Hauptmerkmale von Krebs (verändert nach (Hanahan und Weinberg, 2011)).

## 2.2 Die metastatische Kaskade

Die klinische Manifestation von metastatischen Läsionen ist das Endresultat eines komplexen Prozesses, der als „metastatische Kaskade“ bezeichnet wird (Fearon und Vogelstein, 1990; Geiger und Peeper, 2009; Hanahan und Weinberg, 2000). Dieser Prozess besteht aus einer Reihe von aufeinanderfolgenden Schritten. Das Fehlschlagen nur eines dieser Schritte kann den gesamten Prozess stoppen (Fidler, 2002; Poste und Fidler, 1980). Neuere Studien weisen darauf hin, dass Tumorzellen schon sehr früh während der Krebsprogression metastasieren können (Podsypanina et al., 2008; Rhim et al., 2012; Stoecklein et al., 2008).

Das Konzept der metastatischen Kaskade begründet sich auf der Untersuchung von epithelialen Tumoren (Karzinomen), es kann allerdings auch auf andere Tumorarten übertragen werden (Weinberg, 2007). Für die Metastasierung spielt sowohl das zell-

intrinsische metastatische Potential der Tumorzellen als auch die Mikroumgebung des Wirts eine wichtige Rolle. Die einzelnen Schritte der metastatischen Kaskade sind in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt.



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der metastatischen Kaskade** (verändert nach (Fidler, 2003)). Die einzelnen Schritte der metastatischen Kaskade sind vereinfacht dargestellt.

Der erste Schritt der metastatischen Kaskade ist die Transformation von normalen Zellen und die anschließende Proliferation der neoplastischen Zellen, die zur Ausbildung eines Primärtumors führt. Erreicht der Primärtumor eine Größe von 1 bis 2 mm, reicht die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff nicht mehr aus, und es kommt zur Neubildung von Blutgefäßen, der sogenannten Angiogenese (Folkman, 1986). Unter physiologischen Bedingungen trennt die Basalmembran, eine glykoproteinreiche extrazelluläre Matrix (EZM), Epithelzellen vom darunterliegenden Stützgewebe (Stroma) (Gupta und Massagué, 2006; Liotta, 1984). Die Basalmembran stellt somit die erste physikalische Barriere für invadierende Tumorzellen dar (Liotta 1984). Tumoren, bei denen die Basalmembran noch nicht durchbrochen ist, werden als *benigne* (gutartig) oder *in-situ*-Karzinome bezeichnet,

wohingegen Tumoren, welche die Basalmembran bereits penetriert haben, als maligne (bösartig) bezeichnet werden (Geiger und Peeper, 2009; Hood und Cheresch, 2002). Die Penetration der Basalmembran wird durch eine erhöhte proteolytische Aktivität und eine erhöhte Zellmotilität der Tumorzellen ermöglicht. Dies führt zu einer lokalen Invasion der Tumorzellen an Orten und zu Zeitpunkten, die unter physiologischen Bedingungen für normale Zellen nicht möglich ist (Crnic und Christofori, 2004; Liotta und Stetler-Stevenson, 1991). Matrix-Metalloproteasen (MMPs), z. B. MMP-2 und MMP-9, spielen bei der proteolytischen Degradation der Basalmembran und EZM eine entscheidende Rolle (Deryugina und Quigley, 2006; Gerg et al., 2008). Zusätzlich zu den invasionsfördernden Effekten setzt die Proteolyse der EZM sequestrierte Wachstumsfaktoren und Chemokine frei, die in der Lage sind, das Tumorzellwachstum weiter zu fördern (Egeblad und Werb, 2002; Overall und Kleifeld, 2006). Zusätzlich ist für die lokale Invasion des umliegenden Gewebes eine Transition des Tumorzellphänotyps notwendig. In der Tat weisen invasive Tumorzellen epithelialen Ursprungs einen spindelförmigen Phänotyp auf, der eine erhöhte Motilität der Zellen ermöglicht (Kalluri und Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009).

Nach der Penetration der Basalmembran und der Infiltration des umliegenden Stützgewebes vermögen Tumorzellen in das Lymph- und Blutgefäßsystem einzudringen (Weinberg, 2007). Die Intravasation der Tumorzellen in das Gefäßsystem ermöglicht letztendlich die systemische Verbreitung von Krebszellen innerhalb des gesamten Organismus. Dieser Prozess erfolgt zumeist an Blutgefäßen, die innerhalb des Primärtumors gebildet werden. Der Grund hierfür ist, dass neugebildete Blutgefäße meist ein irreguläres Endothel mit einer unvollständigen Basalmembran aufweisen (Carmeliet und Jain, 2000). Unter physiologischen Bedingungen induziert der Verlust des Zell-Matrix-Kontakts eine spezielle Form des programmierten Zelltods (Anoikis) (Frisch und Francis, 1994). Dieser Prozess verhindert unter physiologischen Bedingungen das Absiedeln von normalen Epithelzellen und gewährleistet so die Integrität des Organismus. Ein Teil der Tumorzellen ist dagegen in der Lage, diesen körpereigenen Sicherheitsmechanismus zu umgehen und adhäsionsunabhängig in der Zirkulation zu überleben (Hanahan und Weinberg, 2000). Zusätzlich wirken im Gefäßsystem auf Tumorzellen große Scherkräfte, die zusammen mit einem Mangel an Wachstumsfaktoren und der erhöhten Präsenz von Immunzellen die Anzahl der überlebenden Tumorzellen in der Zirkulation weiter reduzieren (Gupta und Massagué, 2006; Joyce und Pollard, 2008).

Im Sekundärorgan erfolgt der Arrest der zirkulierenden Tumorzellen im Kapillarbett. Einerseits können Tumorzellen aufgrund ihrer Größe in den Kapillargefäßen stecken bleiben

(Weinberg, 2007). Andererseits interagieren Tumorzellen direkt oder indirekt, z. B. durch die Bindung an Thrombozyten (Gay und Felding-Habermann, 2011), mit dem Endothel (Gupta und Massagué, 2006) und ermöglichen so wiederum den Arrest. Nach der Adhäsion der Tumorzellen an die Gefäßwand des Sekundärorgans erfolgt die Extravasation. Die diesem Prozess zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. So können Tumorzellen nach Arrest in den Gefäßen die Proliferation induzieren und mithilfe der wachsenden Tumormasse die Blutgefäße durchbrechen (Chambers et al., 2002). Adhärirte Tumorzellen können aber auch aktiv extravadiieren. Dieser Vorgang wird dabei durch die Induktion eines Prozesses ermöglicht, der mit der Intravasation vergleichbar ist (Fidler, 2003). Zusätzlich erleichtern die mechanischen Kräfte, die auf die Tumorzellen im Gefäßsystem wirken, die Extravasation der adhärirten Tumorzellen (Hughes und King, 2012; Mitchell und King, 2013; Wirtz et al., 2011).

Der Ort der Extravasation der Tumorzellen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. U. a. spielt hierbei das Chemokine-Milieu im Sekundärorgan eine wichtige Rolle (Müller et al., 2001), aber auch der Blutfluss beeinflusst den Ort der Extravasation (Chambers et al., 2002; Gout et al., 2008).

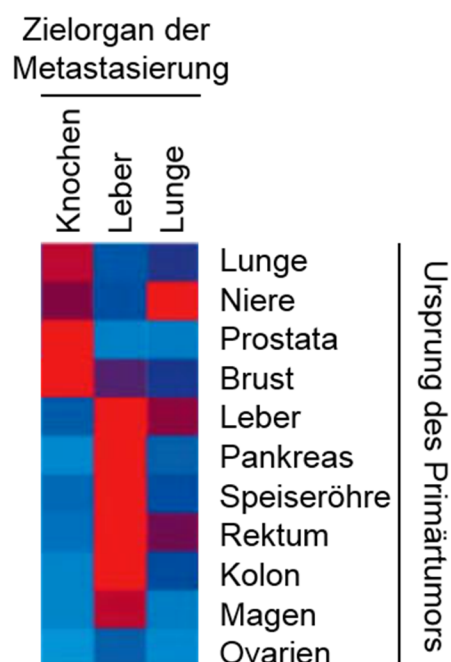
Obwohl Butler und Gullino 1975 in einem Tiermodell zeigen konnten, dass sich pro Gramm Primärtumorgewebe am Tag mehrere Millionen Tumorzellen vom Zellverband des Primärtumors lösen und in die Zirkulation gelangen (Butler und Gullino, 1975), entstehen trotzdem nur wenige Metastasen (Sugarbaker, 1993; Weiss, 1990). Dies kann u. a. darauf zurückgeführt werden, dass viele Tumorzellen in der feindlichen Mikroumgebung des Sekundärorgans absterben (Fidler, 1970; Tarin et al., 1984) oder dort in einen Zustand der *dormancy* (ruhende Tumorzellen) übergehen (Chambers et al., 2002). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen sind nach intravenöser Inokulation 80 % der Tumorzellen in der Lage zu extravadiieren, während nur 0,02 % der Zellen zu Makrometastasen auswachsen (Luzzi et al., 1998). Somit stellt die Anpassung an die feindliche Mikroumgebung des Sekundärorgans, die sich meist fundamental von der Mikroumgebung des Primärtumors unterscheidet, die größte Hürde für eine erfolgreiche Metastasierung dar (Weinberg, 2008). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Konzept der Krebsstammzellen (*cancer stem cell*, CSC) entwickelt, welches besagt, dass nur eine kleine Population der Krebszellen, die sogenannten Krebsstammzellen, in der Lage sind, im Zielorgan zu überleben und zu Metastasen auszuwachsen (Dalerba und Clarke, 2007; Hermann et al., 2007). Nach dem Auswachsen einer Tumorzelle zu einer soliden Metastase unterliegt diese dem gleichen Selektionsdruck wie der Primärtumor. Somit können sich ausgehend von einer Metastase



erneut Tumorzellen lösen und die sogenannte sekundäre Invasion induzieren. Dieser Prozess hat mitunter eine explosionsartige Vermehrung der Krebszellen zur Folge (Gerg et al., 2008; Kopitz et al., 2007; Nguyen, 2011).

### 2.2.1 Der Organtropismus von Metastasen

Vor mehr als 100 Jahren stellte Paget anhand einer Analyse von über 900 Obduktionsberichten von Brustkrebspatientinnen fest, dass die Ausbildung von Metastasen nicht zufällig erfolgt. So waren einige Organe stärker von Metastasen befallen als andere (Paget, S., 1889). Auf Grundlage dieser Beobachtung stellte Paget die sogenannte „*seed and soil*“-Hypothese auf, die besagt, dass Tumorzellen (*seed*, Samen) nur an einem geeigneten Ort (*soil*, Erde) zu Metastasen auswachsen können. Eine genaue Analyse der Metastasierungsmuster von Adenokarzinomen bestätigt diese Hypothese. In der Tat weisen die meisten Karzinome bei der Metastasierung eine „Vorliebe“ für bestimmte Organe auf (Hess et al., 2006). Abbildung 2.3 stellt das Ursprungsgewebe des Primärtumors und die nachfolgend von Metastasen betroffenen Sekundärorgane dar.



**Abbildung 2.3: Metastasierungsmuster von verschiedenen Adenokarzinomen.** Der Mosaikplot zeigt die relative Häufigkeit, mit der ein bestimmter Primärtumor in die verschiedenen Organe streut (verändert nach (Hess et al., 2006)). Die Färbung zeigt die Häufigkeit, mit der das entsprechende Sekundärorgan von Metastasen betroffen ist (selten (dunkelblau) bis sehr häufig (dunkelrot)).

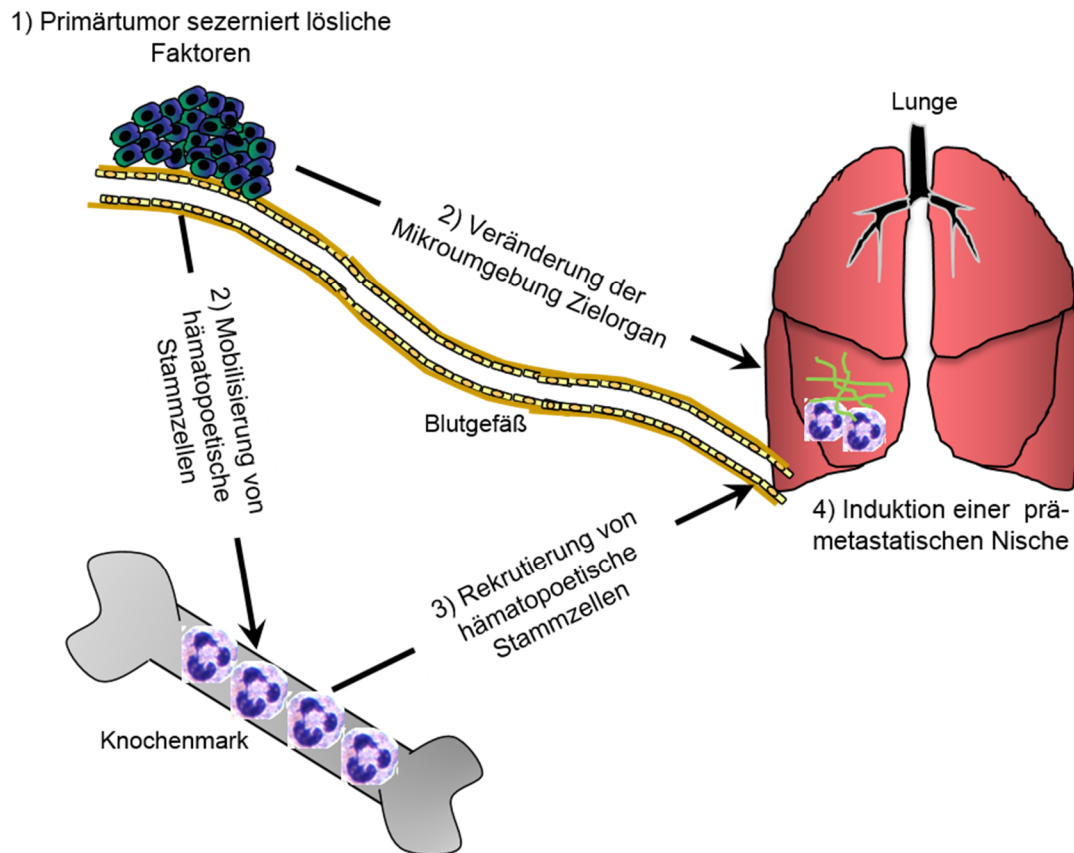
Durch den Blutstrom allein ist dieser Tropismus von Tumorzellen/Metastasen nicht vollständig zu erklären (Fidler, 2003; Poste und Fidler, 1980). Tatsächlich ist dieser Faktor

in nur etwa 66 % der Fälle für den Organotropismus der Metastasen verantwortlich (Weiss, 1992). Neben den zell-intrinsischen Eigenschaften der Tumorzellen spielen auch die Mikroumgebung und die Homöostase im Sekundärorgan eine wichtige Rolle für die Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2011). Ein besseres Verständnis dieser Prozesse, die im Zusammenspiel die Metastasierung entscheidend beeinflussen, ist für die Entwicklung neuer anti-metastatischer Therapien unerlässlich.

Das Konzept der prä-metastatischen Nische liefert einen möglichen Erklärungsansatz für den vom Blutfluss unabhängigen Organotropismus von Metastasen dar (Kaplan et al., 2005). Der Begriff „Nische“ ist hierbei von der Stammzellnische abgeleitet, die ein Kompartiment darstellt, welches die Erhaltung einer bestimmten Zellpopulation ermöglicht (Psaila und Lyden, 2009). Die Mikroumgebung der Nische ist dabei der Besiedelung und Expansion der Zellen angepasst (Yin, 2006). Bezogen auf das Konzept der prä-metastatischen Nische bedeutet dies, dass sich die Mikroumgebung im Sekundärorgan vor der Disseminierung der Tumorzellen verändert. Diese Veränderungen ermöglichen nachfolgend eine erfolgreiche Kolonisierung des Sekundärorgans. Die Entstehung einer prä-metastatischen Nische wird dabei durch den Primärtumor induziert. Dieser sezerniert lösliche Faktoren, die sowohl auf das Knochenmark als auch auf die Mikroumgebung des Sekundärorgans wirken und so die Suszeptibilität des Zielorgans für Tumorzellen mitunter stark erhöhen (Erler et al., 2009; Hiratsuka et al., 2006; Kaplan et al., 2005; Kowanetz et al., 2010; Sceneay et al., 2013). Abbildung 2.4 zeigt schematisch die Entstehung der prä-metastatischen Nische.

Zu den vom Primärtumor sezernierten Faktoren gehören u. a. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGFA) (Kaplan et al., 2005), der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) (Hiratsuka et al., 2006) sowie die chemotaktischen Faktoren S100A8 und S100A9 (Psaila und Lyden, 2009) und die Lysyloxidase (LOX) (Erler et al., 2009). Diese Faktoren führen zu Veränderungen im Genexpressionsprofil der Mikroumgebung des Sekundärorgans und induzieren gleichzeitig die Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen (*haematopoietic progenitor cells*, HPCs) aus dem Knochenmark (Psaila und Lyden, 2009). Zusätzlich wird die Adhäsion der Tumorzellen in der prä-metastatischen Nische durch die Produktion von Adhäsionsmolekülen erhöht und die Extravasation der Tumorzellen durch die Produktion von Protease erleichtert, sodass nachfolgend die Produktion weiterer Wachstumsfaktoren die Proliferation der Tumorzellen stimuliert (Peinado et al., 2011; Psaila und Lyden, 2009; Sleeman, 2012). Während das Konzept der prä-metastatischen Nische weitgehend auf Analysen der Lungenmetastasierung basiert, ist

über die Entstehung von prä-metastatischen Nischen in anderen Organen wenig bekannt (Yamamoto et al., 2008; Zhang et al., 2013).



**Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Entstehung einer prä-metastatischen Nische.** 1. Der Primärtumor sezerniert lösliche Faktoren, wie z.B. VEGFA (Kaplan et al., 2005). 2. Diese Faktoren führen zur Mobilisierung von hämatopoetische Stammzellen (HSC, engl. *hematopoietic stem cells*) und zu Veränderungen in der Mikroumgebung des Zielorgans. 3. Die Rekrutierung von HSC in das Zielorgan. 4. Diese Veränderungen führen zur Ausbildung einer prä-metastatischen Nische.

Das Auswachsen von Metastasen im Sekundärorgan bestimmt die Lebenserwartung von über 80 % der Krebspatienten (Chambers et al., 2002; Weinberg, 2007). Aus diesem Grund stehen nicht die Krebsentstehung als solche, sondern vielmehr die Abläufe, die das Auswachsen von Tumorzellen im Sekundärorgan ermöglichen, im Fokus dieser Arbeit. Welche Signalwege sind aufseiten der Tumorzellen entscheidend für das zell-intrinsische metastatische Potential? Welche Signalwege sind in der Mikroumgebung des Wirtsgewebes wichtig für die Metastasierung? Ein besseres Verständnis dieser Abläufe ist für die Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen unerlässlich.

## 2.3 Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

### 2.3.1 Einführung in die epitheliale-mesenchymale Transition

Unter physiologischen Bedingungen weisen Epithelzellen eine apikal-basale Polarität auf und sind an die Basalmembran gebunden. Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist ein zellbiologischer Prozess, der dazu führt, dass sich Epithelzellen aus ihrem Zellverband lösen und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Dieser mesenchymale Phänotyp geht mit einer erhöhten Migration, Invasion und Apoptoseresistenz der Tumorzellen einher und ermöglicht es ihnen, das Ursprungsepithel zu verlassen (Kalluri und Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Zusätzlich ist die Produktion von EZM-Proteinen erhöht. Diese Transformation von Epithelzellen wurde erstmals 1908 von Frank R. Lillie beobachtet (Lillie, 1908), doch erst 1968 im Zuge neuerer entwicklungsbiologischer Erkenntnisse und der fortschreitenden Krebsforschung als „epitheliale-mesenchymale Transformation“ (EMT) bezeichnet (Hay E., 1968) – in Abgrenzung zur sogenannten neoplastischen Transformation und aufgrund der Reversibilität des Prozesses, der umgekehrt als „mesenchymale epitheliale Transition“ (MET) bezeichnet wird (Brabletz, 2012; Thiery, 2003; Thompson und Haviv, 2011).

Von physiologischer Bedeutung ist dieser Prozess vor allem bei der Embryonalentwicklung (Kalluri und Weinberg, 2009). In der Embryonalentwicklung entstehen Zellen an Orten, die noch nicht ihrem endgültigen Bestimmungsort entsprechen. Um an diesen Bestimmungsort zu gelangen, durchlaufen die Zellen eine EMT (Thiery, 2003). Auf diese Weise wird die Invagination während der Gastrulation (Katow und Solursh, 1980; Viebahn, 1995) und die Einstülpung des Neuralrohrs in der Embryonalentwicklung der Vertebrata ermöglicht (Duband et al., 1995; Mancilla und Mayor, 1996; Selleck und Bronner-Fraser, 1995). Für die Bildung des Mesoderms, der inneren Organe und des Nervensystems ist dieser Prozess unerlässlich (Kalluri und Weinberg, 2009). Die EMT spielt außerdem bei der Geweberegeneration und der Wundheilung eine entscheidende Rolle. Dabei ermöglicht die EMT die Entstehung von fibroblastenähnlichen Zelltypen, die zur Rekonstruktion des Gewebes nach Traumata oder einer entzündlichen Verletzung führen (Kalluri und Weinberg, 2009). Zusätzlich spielt die zelluläre Plastizität von Zellen bei pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. So kann eine anhaltende Entzündung nach der Geweberegeneration zu einer verstärkten Produktion von EZM-Molekülen durch Fibroblasten führen. Dies führt zur Entstehung von Fibrosen und schlussendlich zum Funktionsausfall des Organs (Kalluri und Neilson, 2003; Wynn und Ramalingam, 2012). Darüber hinaus spielt die EMT bei malignen Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle, da

sie die Loslösung von Karzinomzellen aus dem Primärtumor – eine Grundvoraussetzung für die Metastasierung – ermöglicht (Polyak und Weinberg, 2009).

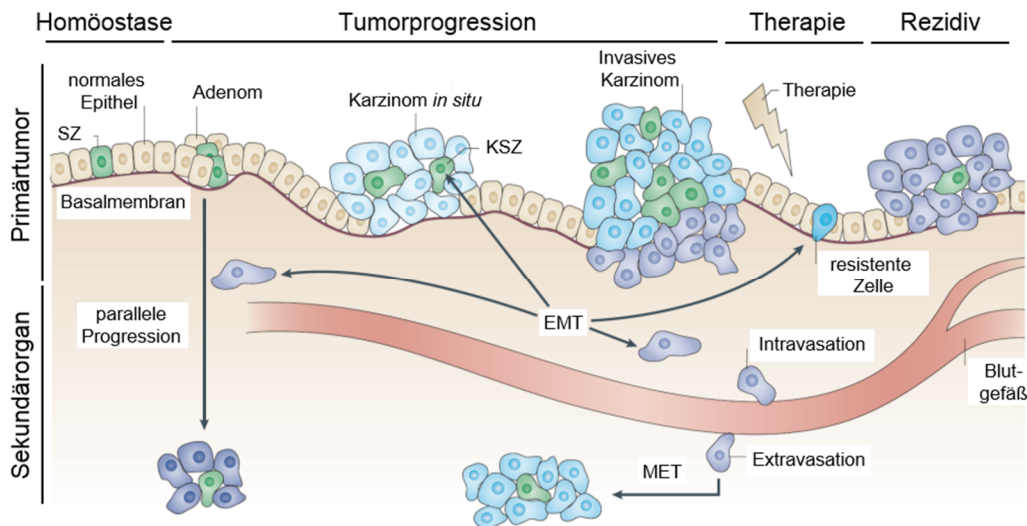
Aufgrund dieser unterschiedlichen physiologischen Situationen, in denen die EMT eine Rolle spielt, werden drei verschiedene Subtypen von EMTs unterschieden (Kalluri und Weinberg, 2009; Polyak und Weinberg, 2009; Zeisberg und Neilson, 2009): i) Typ-1-EMTs verursachen weder Fibrosen noch einen invasiven Phänotyp, der zu einer unkontrollierten systemischen Streuung der Zellen führt. Vielmehr generiert dieser EMT-Subtyp mesenchymale Zellen, die in der Lage sind, Gewebe mit unterschiedlichsten Funktionen aufzubauen. ii) Als Subtyp 2 werden EMTs bezeichnet, die die Geweberegeneration, Wundheilung und die Entstehung von Fibrosen ermöglichen. Dieser Subtyp ist im Gegensatz zu Subtyp 1 mit einer Entzündungsreaktion assoziiert. iii) Dem Subtyp 3 werden EMTs zugeordnet, die nach genetischen und epigenetischen Veränderungen von somatischen Zellen zur Entstehung neoplastischer Zellen führen. Dieser Subtyp führt zu Tumorzellen mit spindelförmigem Phänotyp, die eine hohe Invasivität aufweisen.

Ein besseres Verständnis der Faktoren und Signalwege, die an der Aktivierung der EMT beteiligt sind, spielt nicht nur bei der Entwicklung von neuen anti-metastatischen Therapien eine wichtige Rolle. Vielmehr würde eine mögliche therapeutische Intervention dieser Signalwege auch für die Geweberegeneration, Wundheilung und die Behandlung von Fibrosen bedeutsam sein. Im Fokus der Forschung stehen vor allem die Faktoren, die die Transition von epithelialen Zellen hin zu mesenchymalen Zellen induzieren bzw. den mesenchymalen Phänotyp der Zellen stabilisieren. Mögliche Targets, die die zelluläre Plastizität der Tumorzellen effektiv einschränken, könnten als zentrale Drehscheibe in der Krebstherapie verwendet werden, da sich durch sie vermutlich sämtliche Schritte der metastatischen Kaskade kontrollieren ließen.

### **2.3.2 Die Rolle der EMT bei der Tumorprogression**

Der Erwerb von invasiven Eigenschaften stellt in der Tumorprogression ein Schlüsselereignis dar, das die Entstehung von Metastasen ermöglicht (Weinberg, 2007). Der Zusammenhang zwischen Tumorprogression und EMT wurde lange nicht intensiv erforscht, da sich Metastasen und das entsprechende Primärtumorgewebe morphologisch ähneln; außerdem können mesenchymale Tumorzellen leicht mit fibroblastenähnlichen Zellen des Tumorstroma verwechselt werden. Diese Ähnlichkeit stellt einerseits die Relevanz der EMT für die Krebsprogression infrage, lässt im Umkehrschluss aber die Zuordnung von

Metastasen zum Ursprungsgewebe zu, die bei der Auswahl der richtigen Behandlung von großer Bedeutung ist. Erst die Beobachtung, dass sich an der invasiven Front des Primärtumors einzelne Tumorzellen lösen, die einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen (Brabletz et al., 2001; Prall, 2007), führte dazu, dass die genetischen und biochemischen Mechanismen, die dieser Transition zugrunde liegen, umfangreich erforscht wurden. Die Relevanz der EMT für die Tumorprogression konnte mittels *in-vivo*-Imaging dargelegt werden (Wyckoff et al., 2007). Weiter ist ein mesenchymaler Phänotyp bei epithelialen Krebsarten mit einer erhöhten Chemoresistenz und einer erhöhten Anoikis-Resistenz assoziiert (Creighton et al., 2009, 2010). Der Verlust von epithelialen Eigenschaften der Tumorzellen erhöht die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von Metastasen (Spaderna et al., 2006). Interessanterweise legen die Tumorzellen im Zielorgan der Metastasierung ihren mesenchymalen Phänotyp ab, um die Proliferation zu ermöglichen (Brabletz, 2012; Thompson und Haviv, 2011). Diese Reversion der EMT erklärt die phänotypische Ähnlichkeit zwischen Primärtumor und Metastasen. Die EMT ermöglicht also die Progression der Krebserkrankung hin zum malignen Status, während die MET nach der Extravasation für eine erfolgreiche Kolonisierung des Sekundärorgans notwendig ist (Thompson und Haviv 2011). Somit stellt die zelluläre Plastizität der Tumorzellen, die durch die EMT und die MET ermöglicht wird, die Grundvoraussetzung für die Metastasierung dar. Abbildung 2.5 zeigt eine schematische Darstellung der zellulären Plastizität, die während der Tumorprogression zu beobachten ist.



**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der zellulären Plastizität während der Tumorprogression** (verändert nach (Craene und Berx, 2013)). EMT, epitheliale-mesenchymale Transition. MET, mesenchymale-epitheliale Transition.

### 2.3.3 EMT-induzierende Signalwege

Die EMT wird durch ein Zusammenspiel von verschiedenen extrazellulären Faktoren induziert, die meist von umliegenden stromalen Zellen sezerniert werden. Zu diesen Faktoren gehören sowohl Komponenten der EZM, wie z. B. Fibronektin, als auch lösliche Wachstumsfaktoren, wie z. B. transformierende Wachstumsfaktoren  $\beta$  ( $TGF-\beta$ ). Diese Moleküle lösen eine rezeptorvermittelte Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen aus, die zur Auflösung der Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakte sowie zu einer Reorganisation des Zytoskeletts führen. Bei diesem Prozess spielen Transkriptionsfaktoren eine besondere Rolle. Sie induzieren in den Zellen das typische EMT-assoziierte Genexpressionsprofil. Die verschiedenen intrazellulären Signalwege, die bei einer EMT aktiviert werden, stehen dabei in enger Verbindung zueinander (Polyak und Weinberg, 2009). Hierbei kann eine anhaltende Aktivierung der EMT zu epigenetischen Veränderungen führen, die auch nach dem Wegfall des EMT-Induktors die spindelförmige Morphologie der Tumorzellen stabilisieren und sogar an Tochterzellen weitergeben können (Dumont et al., 2008).

Mitglieder der  $TGF-\beta$ -Proteinfamilie sind die am besten charakterisierten Induktoren der EMT (Massagué, 2008; Xu et al., 2009; Zavadil und Böttinger, 2005). Der Zusammenhang zwischen einer EMT von Epithelzellen und  $TGF-\beta 1$  konnte zuerst in der Zellkultur nachgewiesen werden (Miettinen et al., 1994). Die Stimulation von Epithelzellen mit  $TGF-\beta$  führt zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalproteine. Die Smad-Proteine –

abgeleitet von Mad (*Drosophila melanogaster*) und Sma (*Caenorhabditis elegans*) – nehmen hierbei eine besondere Rolle ein (Derynck und Zhang, 2003). Allerdings aktiviert TGF- $\beta$  neben den Smads auch alternative Signalwege. Hierzu gehört u. a. die Aktivierung des Ras- und MAP-Signalwegs sowie die Aktivierung von Rho-ähnlichen GTPasen (Zhang, 2009). Vergleichbar zu anderen Wachstumsfaktoren, die über Tyrosinkinase-Rezeptoren ihre Wirkung vermitteln, ist TGF- $\beta$ 1 auch in der Lage, PI3K und nachfolgend Akt zu aktivieren (Lee et al., 2010; Perry et al., 2011; Tenbaum et al., 2012). Darüber hinaus beeinflusst TGF- $\beta$  auch andere EMT-initiiierende Signalwege, wie z. B. Wnt/ $\beta$ -Catenin, Notch und EGF. Gemeinsam regulieren diese EMT-initiiierenden Signalwege den Phänotyp der Zellen. So sind z. B. sekretierte Wnt-Proteine nicht per se in der Lage, eine EMT zu induzieren. Allerdings kann der von diesen Proteinen ausgelöste kanonische Signalweg, der wiederum für die Regulation von Wnt-Zielgenen verantwortlich ist, in Zusammenarbeit mit TGF- $\beta$  die EMT von Epithelzellen induzieren (Larue und Bellacosa, 2005; Zhang, 2009). Der kanonische Wnt-Signalweg wird intrazellulär von  $\beta$ -Catenin vermittelt, einer Komponente der *adherens junctions*, die E-Cadherin an das Aktinzytoskelett bindet. Zusätzlich agiert  $\beta$ -Catenin als Co-Aktivator der Transkription von verschiedenen EMT-assoziierten Zielgenen und moduliert die Expression dieser Gene abhängig von extrazellulären Signalen (Bienz, 2005). Interessanterweise ist  $\beta$ -Catenin wiederum in der Lage, eine EMT zu induzieren (Fu et al., 2011; Jiang et al., 2007; Malanchi et al., 2008; Yan et al., 2012). In der Abwesenheit von Wnt-Signaling wird  $\beta$ -Catenin von der Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) konstitutiv phosphoryliert (Cross et al., 1994). Diese Phosphorylierung führt zu einer E3-Ligase- $\beta$ -TrCP-vermittelten Ubiquitinierung von  $\beta$ -Catenin, die schließlich im proteasomalen Abbau endet, wodurch die zyttoplasmatischen Level von  $\beta$ -Catenin niedrig gehalten werden (Kim et al., 2013b). Darüber hinaus wird  $\beta$ -Catenin durch die Bindung an E-Cadherin an die Plasmamembran sequestriert und kann so die Expression von Zielgenen im Zellkern nicht induzieren (Gottardi et al., 2001; Logan und Nusse, 2004).

Da die EMT von Tumorzellen für die Metastasierung eine entscheidende Rolle spielt, ist es von großer Bedeutung, die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen. Die Identifikation von neuen Faktoren, die für die EMT eine bestimmende Rolle einnehmen, ist für die Entwicklung neuer anti-metastatischer Therapien unerlässlich.



### 2.3.4 Biomarker der EMT in der Tumorprogression

Die EMT von Epithelzellen ist gekennzeichnet durch eine Herunterregulation von Zell-Zell-Adhäsionsstrukturen, den Verlust der apikal-basalen Polarität, eine Reorganisation des Zytoskeletts und die Erlangung eines motilen spindelförmigen Phänotyps (Kalluri und Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009; Zeisberg und Neilson, 2009). Darüber hinaus ist die Sezernierung von Proteasen und die Expression von Molekülen der extrazellulären Matrix nach der EMT häufig erhöht. Diese biochemischen Veränderungen ermöglichen es Tumorzellen, die Basalmembran zu penetrieren und in Gefäße der Lymphe oder der Blutbahn zu invadieren (Kalluri und Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Diese Faktoren können für die Unterscheidung von epithelialen und mesenchymalen Tumorzellen herangezogen werden und spielen in der Klinik als prognostische Marker eine wichtige Rolle (Zeisberg und Neilson, 2009). Im Folgenden werden die Markerproteine zur Unterscheidung von epithelialen und mesenchymalen Zellen kurz aufgezeigt.

#### 2.3.4.1 Zelloberflächenmarker der EMT

Ein Kerncharakteristikum der EMT ist der Verlust der E-Cadherin-Expression (Birchmeier und Behrens, 1994; Thiery, 2002). E-Cadherin (epitheliales Cadherin) ist der Hauptbestandteil von epithelialen *adherens junctions*, die die interzelluläre Adhäsion vermitteln (Angst et al., 2001; Yilmaz und Christofori, 2009; Zavadil und Böttinger, 2005). Diese Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakte sind ein bestimmendes Merkmal von Epithelien (Fristrom, 1988) und ermöglichen deren Strukturfestigkeit und Integrität. Während einer EMT kann der Verlust der Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakte beobachtet und auf den Verlust der E-Cadherin-Expression zurückgeführt werden (Kang und Massagué, 2004; Thiery et al., 2009). Die Expression von E-Cadherin wird während der Tumorprogression von unterschiedlichen Mechanismen reguliert (Kang und Massagué 2004). Einerseits können Mutationen die Expression von E-Cadherin vermindern. In der Tat weisen 50 % der Krebspatientinnen, die an einem lobulären Mammakarzinom erkrankt sind, E-Cadherin-Mutationen auf (Bex et al., 1996), und auch im erblichen Magenkarzinom spielen Mutationen in der kodierenden Region von E-Cadherin eine bedeutende Rolle (Guilford et al., 1998). Des Weiteren führt epigenetisches Silencing von E-Cadherin zu einer erhöhten Krebsrate (Graff et al., 1998) und fördert die Metastasierung (Onder et al., 2008). Bei verschiedenen Krebsarten, wie z. B. im Melanom und Prostatakarzinom, geht eine verminderte E-Cadherin-Expression mit einer erhöhten Expression von N-Cadherin (neuronales Cadherin) einher (Li und Herlyn, 2000; Tomita et al., 2000). Dieser sogenannte

„*cadherin switch*“ führt zu einer starken Veränderung der adhäsiven Eigenschaften der Tumorzellen. So verlieren die Zellen die Affinität zu den umliegenden Epithelzellen; gleichzeitig erhöht sich die Affinität gegenüber Myofibroblasten und Endothelzellen. Die veränderte Adhäsion der Zellen könnte bei der Disseminierung, beim Transport und Arrest der Tumorzellen im Sekundärorgan eine wichtige Rolle spielen. Diverse Studien belegen, dass N-Cadherin die Invasion, die Motilität und die Metastasierung von Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs fördert (Hazan et al., 2000; Li et al., 2001; Nieman et al., 1999).

#### **2.3.4.2 Zytoskelettale Proteine als EMT-Marker**

Das Intermediärfilament Vimentin ist ein wichtiger Marker für den Subtyp 3 der EMT, der während der Tumorprogression beobachtbar ist (Boyer et al., 2000; Yang et al., 2004). Unter physiologischen Bedingungen ist die Expression von Vimentin im adulten Organismus meist auf Zellen mesenchymaler Herkunft (Fibroblasten, Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur) beschränkt (Franke et al., 1982; Larsson et al., 2004). In der Klinik korreliert die Expression von Vimentin im Prostatakarzinom mit der Rezidivrate und dem invasiven Potential von Tumorzellen (Lang et al., 2002; Vuoriluoto et al., 2011; Zhang et al., 2009). Zusätzlich ist die Vimentin-Expression mit einer erhöhten Invasivität von Tumorzellen assoziiert (Gilles et al., 2003; Korsching et al., 2005) und korreliert mit der Metastasierung verschiedener Krebsarten (Hu et al., 2004; Satelli und Li, 2011). In Übereinstimmung mit der Rolle als Markerprotein der EMT wird Vimentin während einer MET herunterreguliert (Chaffer et al., 2006). Darüber hinaus führt das Silencing der beiden EMT-initiiierenden Faktoren Snail und Zeb1 zu einer verminderten Expression von Vimentin (Bindels et al., 2006; Olmeda et al., 2007), die nachfolgend zu einem epithelialen Phänotyp der Tumorzellen führt.

Das Protein  $\beta$ -Catenin übt in der Zelle zwei unterschiedliche Funktionen aus (Bienz, 2005): Einerseits stellt es den Kontakt zwischen Cadherinen und dem Zytoskelett her, andererseits fungiert es als Transkriptionsfaktor. Die transkriptionelle Aktivität von  $\beta$ -Catenin wird auf Proteinebene v. a. über die Verfügbarkeit des Proteins im Zytoplasma reguliert. So kann  $\beta$ -Catenin einerseits über die Interaktion mit Cadherinen an die Plasmamembran sequestriert, andererseits aber auch nach Phosphorylierung abgebaut werden (Bienz, 2005). Als Transkriptionsfaktor reguliert  $\beta$ -Catenin die Expression von EMT-initiiierenden Proteinen und ist nach einer EMT v. a. im Zytoplasma und im Kern von Tumorzellen lokalisiert (Brabletz et al., 1998, 2001; Kirchner und Brabletz, 2000). Die Expression von  $\beta$ -Catenin

korreliert mit einer schlechten Prognose bei einer Vielzahl von Krebsarten (Inagawa et al., 2002; Kazem et al., 2013; Li et al., 2013; Lin et al., 2000).

Das Aktinzytoskelett ist eine hoch dynamische Struktur, die sich im ständigen Umbau befindet (Pollard und Borisy, 2003; Wear et al., 2000). Unter physiologischen Bedingungen ist der Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakt von Epithelzellen über  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin direkt an kortikale Fasern des Aktinzytoskeletts gebunden. Eine EMT führt zu einer dramatischen Reorganisation dieses Aktinzytoskeletts (Zavadil und Böttinger, 2005). Diese Neuorganisation ermöglicht nachfolgend die Ausbildung von Filopodien und Invadopodien, die für die horizontale beziehungsweise ventrale Bewegung von Tumorzellen unerlässlich sind (Haynes et al., 2011; Yilmaz und Christofori, 2009). Die erhöhte Motilität der Tumorzellen wird durch die Ausbildung von sogenannten „Stressfasern“ ermöglicht (Ridley und Hall, 1992; Yilmaz und Christofori, 2009). Diese Strukturen können als Marker der EMT verwendet werden (Thiery, 2002; Xu et al., 2009).

#### **2.3.4.3 Extrazelluläre Proteine als EMT-Marker**

Fibronektin ist ein Glykoprotein, das als eine Art Baugerüst für die Entstehung von fibrillärer EZM dient. Eine erhöhte Produktion von Fibronektin geht mit der Tumorprogression bzw. der EMT einher (Lamouille et al., 2014). Die Expression von Fibronektin wird durch eine Vielzahl von EMT-initiiierenden Faktoren induziert. Neben der erhöhten Expression des Glykoproteins nach einer EMT kann Fibronektin auch eine EMT in Tumorzellen induzieren (Park und Schwarzbauer, 2014). Für die Interaktion der Tumorzellen mit Fibronektin spielen Integrine eine wichtige Rolle. Sie steigern die Invasivität der Tumorzellen durch die Interaktion mit Fibronektin (Maschler et al., 2005; Mise et al., 2012). Zusätzlich kann eine erhöhte Expression von Fibronektin im Zielorgan während der Ausbildung einer prä-metastatischen Nische beobachtet werden (Psaila und Lyden, 2009).

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind in der Lage, fast alle Komponenten der EZM und Basalmembran abzubauen (Egeblad und Werb, 2002; Mott und Werb, 2004). Während der Transition der Tumorzellen vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp wird die Expression von MMPs induziert und somit die proteolytische Aktivität von Tumorzellen erhöht (Duivenvoorden et al., 1999; Jordà et al., 2005; Kim et al., 2007; Laffin et al., 2008). Die Veränderung des proteolytischen Gleichgewichts ermöglicht es den Tumorzellen, die Basalmembran zu penetrieren und nachfolgend in die Lymphe oder Blutbahn zu intravadiere (Weinberg, 2007). Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen den EMT-Induktoren SNAI1, ZEB2 und TGF- $\beta$  und einer erhöhten Expression von MMP-2 und

MMP-9 nachgewiesen werden (Jordà et al., 2005; Lee et al., 2008b; Miyoshi et al., 2005; Strutz et al., 2002; Yang et al., 2002). Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) ist ein Serinprotease-Inhibitor und an der Regulation der Blutgerinnung beteiligt (van Meijer und Pannekoek, 1995). Nach einer EMT ist die Expression von PAI-1 in Epithelzellen stark erhöht (Moreno-Bueno et al., 2006). Zusätzlich sind die EMT-Induktoren TGF- $\beta$ 1 und  $\beta$ -Catenin in der Lage, die Expression von PAI-1 zu induzieren (Sekimoto et al., 2007; Zavadil et al., 2001). Somit kann die Expression von Proteasen als Marker der EMT verwendet werden, wobei hier MMP-2, MMP-9 und PAI-1 im Vordergrund stehen.

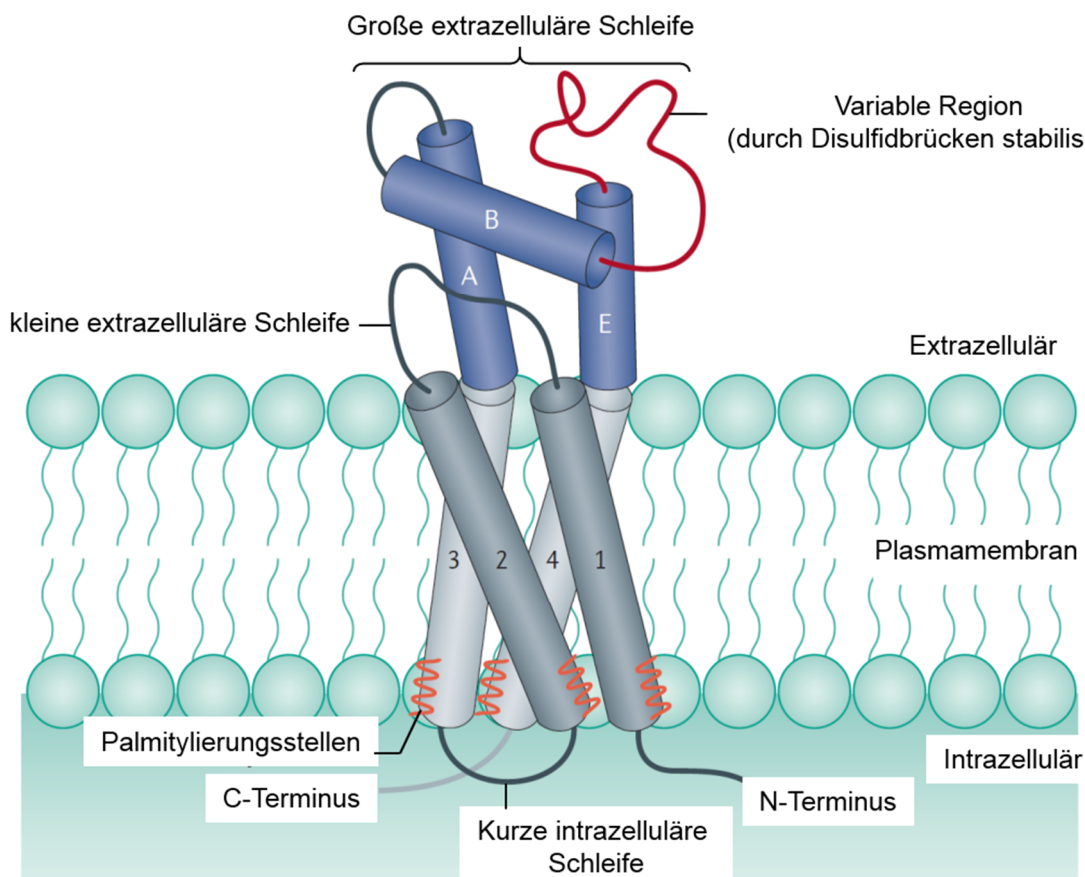
#### **2.3.4.4 Transkriptionsfaktoren**

Bei der zellulären Plastizität von Tumorzellen kommt den Transkriptionsfaktoren (TF) der Snail-, der Zeb-Superfamilie und bHLH- (*basic helix loop helix*) Faktoren eine wichtige Rolle zu (Peinado, Olmeda und Cano 2007). Die beiden TF Snail und Slug stellen die ersten charakterisierten E-Cadherin-Repressoren in der Embryonalentwicklung und Tumorprogression dar (Barrallo-Gimeno und Nieto, 2005; Nieto et al., 1994). Vergleichbar mit den TFs der Zeb-Superfamilie vermitteln diese beiden TF ihre Funktion durch die Bindung an E-Box-Bereiche des proximalen E-Cadherin-Promotors (Peinado et al., 2007). Die Bindung der TF führt zur Rekrutierung von Histon-Deacetylasen mit abschließender Hypermethylierung der DNA und zur Repression der E-Cadherin-Expression. In Übereinstimmung korreliert die Expression dieser TF mit einer verminderten Expression von E-Cadherin in 60 verschiedenen humanen Tumorzelllinien (NCI60) (Reinhold et al., 2010). Auch die Mitglieder der Zinkfingerproteinfamilie Snail spielen für sämtliche Subtypen der EMT eine entscheidende Rolle (Barrallo-Gimeno und Nieto, 2005; Peinado et al., 2007). In der Klinik ist die Expression von Snail und Slug mit einer schlechten Prognose von Krebspatienten assoziiert (Côme et al., 2006; Elloul et al., 2005; Miyoshi et al., 2005; Moody et al., 2005; Shioiri et al., 2006).

## **2.4 Die Tetraspanin-Proteinfamilie**

Tetraspanine sind eine Gruppe von hydrophoben Membranproteinen, die aus vier transmembranen  $\alpha$ -Helices, einer kleinen (EC1) und einer großen (EC2) extrazellulären Schleife sowie kurzen intrazellulären N- und C-terminalen Enden aufgebaut sind

(Berditchevski, 2001; Hemler, 2001; Yunta und Lazo, 2003). Abbildung 2.6 zeigt den typischen Aufbau von Tetraspaninen. Zur humanen Tetraspanin-Familie gehören 33 Mitglieder, die sowohl an der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Organellen und Granulae lokalisiert sind (Hemler, 2014). Wie alle Proteine mit einer ER-Signalsequenz befinden sich Tetraspanine im sekretorischen Weg und werden aufgrund von Sortierungsmotiven in bestimmte Zellkompartimente transportiert (Zöller, 2009). Obwohl diese Proteine in fast allen Zell- und Gewebearten exprimiert werden und an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind (Hemler, 2003, 2005; Wright et al., 2004; Zöller, 2009), ist ihre funktionelle Rolle noch immer unzureichend untersucht.



**Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der typischen Struktur von Tetraspaninen.** Das intakte Protein hat eine stabförmige Struktur, die vier Transmembranhelices (hellgrau und dunkelgrau, 1 bis 4) aufweist. Die große extrazelluläre Schleife verbindet die TM-Domänen 3 und 4 und beinhaltet eine konservierte helikale Region (Helices A, B und E) und eine variable Region (dunkelrot), die bei der Interaktion mit Partnerproteinen eine wichtige Rolle spielt. Die zwei bis vier stabilisierenden Disulfidbrücken sind nicht gezeigt. Die kleine extrazelluläre Schleife verbindet die Transmembranhelices 1 und 2. Zusätzlich weisen Tetraspanine Palmitoylierungsstellen, sowie einen kurzen intrazellulären N- und C-Terminus auf (verändert nach Hemler 2014).

Ein Grund für die mangelnde Charakterisierung dieser Proteinfamilie ist, dass Tetraspanine im Vergleich zu anderen Zelloberflächenproteinen keine offensichtliche Rezeptorfunktion aufweisen (Hemler, 2014). Vielmehr nehmen diese Proteine ihre Funktion wahr, indem sie mit anderen Proteinen Mikrodomänen in der Plasmamembran ausbilden, die in ihrer Funktion vergleichbar mit *lipid rafts* sind. Diese Komplexe werden als Tetraspaninangereicherte Mikrodomänen (TEM) bezeichnet (Hemler, 2005; Levy und Shoham, 2005; Zöller, 2009). TEMs beinhalten neben Tetraspaninen weitere Transmembran- sowie extrazelluläre und zytosolische Proteine (André et al., 2006; Hemler, 2005; Levy und Shoham, 2005). Da Tetraspanine auf diese Art und Weise spezifische Zelloberflächenproteine zueinander in räumliche Nähe bringen und damit die Bildung und die Stabilität von Signalkomplexen ermöglichen, werden die Mitglieder dieser Proteinfamilie auch als „molekulare Vermittler“ bezeichnet (Maecker et al., 1997). Für die Ausbildung der TEMs ist die Palmitoylierung von Tetraspaninen an intrazellulären Cysteinresten wichtig, die die Proteine gleichzeitig vor der lysosomalen Degradation schützt (Berditchewski et al., 2002; Charrin et al., 2002; Sharma et al., 2008). Durch die Ausbildung der Mikrodomänen beeinflussen Tetraspanine die Zelladhäsion, Zellmotilität, Zell-Zell-Fusion, Invasion, Morphologie und das Überleben von Zellen (Hemler, 2005; Yáñez-Mó et al., 2009). Zusätzlich spielen Tetraspanine eine wichtige Rolle bei der Biogenese von Exosomen (Hemler, 2003; Perez-Hernandez et al., 2013; Rana et al., 2012). Für die Tumorprogression sind viele der Prozesse, die von Tetraspaninen moduliert werden, von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wird die Rolle von Tetraspaninen bei der Progression von humanen Krebserkrankungen intensiv erforscht.

### **2.4.1 Bedeutung der Tetraspanine in der humanen Tumorprogression**

Neue Studien legen nahe, dass Tetraspanine einen wichtigen Beitrag zur Tumorprogression leisten (Hemler, 2014; Zöller, 2009). So ist aus der Klinik bekannt, dass die Expression des Tetraspanins CD82 in fortgeschrittenen Krebsstadien häufig herunterreguliert ist und mit einer schlechten Prognose in Prostata-, Kolon-, Gebärmutter-, Ovarial-, Brust-, Blasen- und Lungenkarzinom- sowie in Melanompatienten korreliert (Tonoli und Barrett, 2005). Auch dem Tetraspanin CD9 wird eine metastasierungshemmende Wirkung zugeschrieben (Zöller, 2009). Dem gegenüber steht die metastasierungsfördernde Funktion anderer Mitglieder der Tetraspaninfamilie. So wurde nachgewiesen, dass die CD151-Expression während der Progression verschiedener Tumorerkrankungen häufig erhöht ist und mit einer schlechten

Prognose von Krebspatienten korreliert (Devbhandari et al., 2011; Kwon et al., 2012; Lee et al., 2013; Minner et al., 2012; Mosig et al., 2012; Voss et al., 2011). Eine erhöhte Expression von TSPAN8 korreliert mit einer schlechten Prognose von Leber-, Pankreaskarzinom- und Melanompatienten (Zöller, 2006). Im hepatozellulären Karzinom führt eine erhöhte Expression des Tetraspanin TM4SF5 zu einer Transition des Tumorzellphänotyps, die eine hohe Ähnlichkeit zur EMT aufweist und mit einer erhöhten Aggressivität der Tumorzellen einhergeht (Lee et al., 2008a).

Die vollkommen unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Tetraspanine während der Tumorprogression deuten auf eine komplexe Rolle dieser Proteine hin. Im Licht der Instabilität von Mikrodomänen bzw. TEMs innerhalb der Plasmamembran und der Reversibilität der Palmitoylierung scheint es möglich, dass Mitglieder dieser Proteinfamilie je nach Anforderung verschiedene Aufgaben übernehmen können. Der Hinweis, Tetraspanine spielen während unterschiedlicher Stadien der Metastasierung bzw. Tumorprogression eine bedeutende Rolle, macht eben diese als mögliche Targets in der Krebstherapie besonders interessant, u. a. weil es bisher noch keine therapeutische Strategie gibt, die je nach Stadium der Krebserkrankung eine spezifische Intervention ermöglicht. Zusätzlich würde eine spezifische Therapiemöglichkeit die Nebeneffekte minimieren – bislang eines der größten Probleme der Krebstherapie. Hierfür ist ein besseres Verständnis der Funktionsweise der Tetraspanine unabdingbar.

#### **2.4.2 Das Tetraspanin CD63**

CD63, auch als Melanomantigen 491 (ME491) bezeichnet, wurde als erstes Mitglied der Tetraspaninfamilie auf der Zelloberfläche von aktivierten Thrombozyten und in Gewebeproben von Melanompatienten nachgewiesen (Atkinson et al., 1984; Hotta et al., 1988; Modderman, 1989). Im Vergleich zu anderen CD-Tetraspaninen wird CD63 in eine eigene Gruppe eingeteilt (Garcia-España et al., 2008). CD63 besteht aus 237 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ~ 55 kDa, wobei 30 bis 70 % des Molekulargewichts auf die starke Glykosylierung entfallen. Weiter beinhaltet CD63 ein lysosomales Sortierungsmotiv und wird über die Interaktion mit Adaptorprotein (AP)-2 und AP-3 in die Lysosomen transportiert (Pols und Klumperman, 2009). Allerdings ist CD63 auch in verschiedenen intrazellulären Vesikeln und Exosomen lokalisiert (Pols und Klumperman, 2009), und die Lokalisation von CD63 während der Aktivierung von verschiedenen Zelltypen scheint veränderlich zu sein. So konnten verschiedene Studien zeigen, dass CD63

an der Aktivierung von Thrombozyten (Hildreth et al., 1991; Israels et al., 2001), eosinophilen (Mahmudi-Azer et al., 2002), neutrophilen (Beinert et al., 2000) und basophilen (Eberlein-König et al., 2004; Knol et al., 1991) Granulozyten beteiligt ist. Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von T-Zellen und dem damit verbundenen Transport von CD63 an die Zelloberfläche beschrieben werden (Pfistershammer et al., 2004). Zusätzlich wirkt sich die Modulation der Zelloberflächenpräsenz auf die Zelladhäsion aus (Jang und Lee, 2003; Pols und Klumperman, 2009; Schröder et al., 2009). Dass CD63 auch eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielt, legen Studien nahe, die eine Assoziierung von CD63 mit Integrinen (Berditchevski, 2001; Toricelli et al., 2013), Zelloberflächenrezeptoren (Kitani et al., 1991; Yoshida et al., 2008) und Kinasen (Jung et al., 2006; Skubitz et al., 1996) beschreiben. Im Gegensatz zu der Vielzahl an Daten, die zu den Funktionen von CD63 in der Zellkultur gewonnen werden konnten, hatte der Knockout von CD63 in Mäusen nur einen milden Phänotyp zur Folge. Die Depletion von CD63 in Mäusen offenbarte eine Funktion von CD63 für die Homöostase von Immunzellen, einen schwachen Effekt auf die Adhäsion von Thrombozyten sowie eine Funktion für die Physiologie der Niere (Schröder et al., 2009).

### **2.4.3 Die Bedeutung von CD63 bei humanen Krebserkrankungen**

Ursprünglich wurde das Tetraspanin CD63 in humanen Melanomzellen identifiziert und als Melanom Antigen 491 beschrieben (Atkinson et al., 1984; Hotta et al., 1988). Klinische Studien zur Rolle von CD63 während der Tumorprogression lieferten mehrdeutige Ergebnisse. Einerseits ist die Expression von CD63 während der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms (Sho et al., 1998), des Magenkarzinoms (Chen et al., 2011) und des Brustkarzinoms (Huang et al., 1998) unverändert. Andererseits korreliert eine verminderte Expression von CD63 mit der Progression von Lungenkrebs (Kwon et al., 2007). Dem gegenüber stehen Studien, die eine positive Korrelation der CD63 Expression und der Tumorprogression in Astrozytom- (Rorive et al., 2010), Glioblastom- (Wei et al., 2010), Melanom- (Lewis et al., 2005) und Brustkrebspatienten (Ridnour et al., 2012) aufzeigen. Die klinischen Studien zur Rolle von CD63 legen nahe, dass die Rolle von CD63 derzeit noch unzureichend verstanden ist. Experimentelle Studien deuten indes darauf hin, dass eine Überexpression von humanem CD63 zu einer verminderten Aggressivität der Rattenzelllinie KM3 *in vitro* und *in vivo* führt (Radford et al., 1995, 1997). Übereinstimmend mit diesen



Ergebnissen wurde nachgewiesen, dass der *Knockdown* von CD63 in Melanomzellen zu einer Reduktion der Tumorzellmigration und -invasion führt (Jang und Lee, 2003). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von CD63 in humanen embryonischen Nierenzellen die Zelloberflächenlevel von MT1-MMP, einer pro-metastatischen Protease, durch eine erhöhte Endozytoserate reduziert (Takino et al., 2003). Dem gegenüber stehen Zellkulturexperimente, die eine pro-tumorigene Rolle von CD63 implizieren. So führt die Bindung des *tissue inhibitor of metalloproteinases 1* (TIMP-1) an CD63 an der Zelloberfläche zu einer verminderten Induktion der Apoptose in MCF10A-Zellen. Zusätzlich aktiviert CD63 durch die Bindung von TIMP-1 weitere pro-tumorigene Signalwege. Hierzu gehören u. a. der Phosphoinositol 3-kinase- (Toricelli et al., 2013), der Erk1/2- (Jung et al., 2006, 2012) sowie der  $\beta$ -Catenin- (Egea et al., 2012) Signalweg und die EMT (Jung et al., 2012). Dass CD63 sowohl als pro- als auch als anti-metastatischer Faktor identifiziert wurde, bestätigt die klinischen Daten und weist auf eine komplexe Funktionalität von CD63 während der Tumorprogression hin. Ein besseres Verständnis der Rolle von CD63 während der Tumorprogression könnte neue therapeutische Strategien nach sich ziehen und neue Targets für eine anti-metastatische Therapie identifizieren.

#### **2.4.4 Der *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP)-1**

Enzyme, die die Basalmembran/EZM abbauen, sind Grundvoraussetzung für die invasiven Schritte der metastatischen Kaskade. Aus diesem Grund ist unter physiologischen Bedingungen die proteolytische Aktivität streng reguliert (Brew et al., 2000). In Krebspatienten ist die proteolytische Aktivität oft erhöht, was die lokale Invasion, Intravasation und Extravasation der Tumorzellen zur Folge hat. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten mehrere Studien zeigen, dass eine Überexpression des endogenen MMP-Breitspektrum-Inhibitors TIMP-1 die experimentelle Metastasierung reduziert (Elezkurtaj et al., 2004; Khokha, 1994; Krüger et al., 1997). In der Krebstherapie jedoch scheiterte die Anwendung von synthetischen MMP-Breitspektrum-Inhibitoren. Tatsächlich zeigte keiner der Inhibitoren einen hinreichend starken anti-metastatischen Effekt. Vielmehr hatten diese Inhibitoren keine oder sogar eine schädliche Wirkung auf die Tumorprogression (Coussens et al., 2002). In Übereinstimmung mit dem Versagen der MMP-Inhibitoren in der Klinik konnten fortführende Studien zeigen, dass TIMP-1 oder Batimastat (MMP-Breitspektrum-Inhibitor) unter bestimmten Bedingungen zu einer erhöhten Metastasierung führen (Kopitz et al., 2007; Krüger et al., 2001). So führte eine

systemische Erhöhung der TIMP-1-Level zur Lebermetastasierung, die auf die inhibitorische Funktion von TIMP-1 zurückgeführt werden konnte. In Übereinstimmung mit dieser pro-metastatischen Funktion von TIMP-1 zeigen klinische Studien eine Korrelation zwischen erhöhten systemischen TIMP-1-Level und einer schlechten Prognose in einer Vielzahl von Krebsarten.

TIMP-1 besteht aus 184 Aminosäuren und ist ein N-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 28 kDa (Brew und Nagase, 2010; Brew et al., 2000). TIMP-1 gehört zur Familie der endogenen MMP-Inhibitoren, die im Menschen bisher vier Mitglieder beinhaltet (TIMP-1 bis 4). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie unterscheiden sich sowohl in ihrer Substratspezifität als auch in ihrem Expressionsmuster (Baker et al., 2002). Hinsichtlich der Struktur von TIMPs lassen sich zwei Domänen unterscheiden, die durch je drei Disulfidbrücken stabilisiert werden (Brew und Nagase, 2010). Die N-terminale Domäne beinhaltet die inhibitorische Funktion und bildet, wenn sie rekombinant exprimiert wird, eine stabile Struktur mit der vollen inhibitorischen Eigenschaft aus (Brew und Nagase, 2010). Sie bindet Proteasen im Verhältnis 1:1 und inhibiert MMPs, indem sie nicht-kovalent das Zink-Ion im aktiven Zentrum koordiniert. Im Gegensatz zu anderen TIMPs ist die inhibitorische Funktion von TIMP-1 deutlich eingeschränkt. So inhibiert TIMP-1 keine membrangebundenen MMPs und zeigt auch eine verminderte Inhibition von MMP-16, MMP-19 und MMP-24 (Edwards et al., 2009). Die C-terminale Domäne von TIMPs bestimmt die Wechselwirkung mit anderen Proteinen und ist für eine MMP-unabhängige Funktion von TIMP-1 essenziell. So konnte gezeigt werden, dass TIMPs die Zellproliferation, die Angiogenese und die Apoptose unabhängig von der Inhibition von MMPs regulieren (Stetler-Stevenson, 2008). Überdies wurde kürzlich dargelegt, dass TIMP-1 über die C-terminale Domäne mit CD63 interagiert und diese Interaktion eine anti-apoptotische Wirkung auf Brustkrebsvorläuferzellen hat (Jung et al., 2006). Darüber hinaus beeinflusst TIMP-1 über die Interaktion mit CD63 die Progression von Brust- (Ridnour et al., 2012) und Hautkrebs (Toricelli et al., 2013). Die genannten Studien legen nahe, dass die Funktionsweise von TIMP-1 während der Metastasierung erst ansatzweise verstanden ist, und rücken die Interaktion zwischen TIMP-1 und CD63 in den Fokus für die pro-metastatische Funktionsweise von TIMP-1.

### 3. Ziel der Arbeit

Dem Tetraspanin CD63 wird in klinischen Studien sowohl eine anti-metastatische als auch eine pro-metastatische Funktion zugeschrieben. Die mehrdeutigen Ergebnisse zur Funktion von CD63 während der Metastasierung zeigen sich auch in verschiedenen experimentellen Studien. Die genaue Rolle des Tetraspanins CD63 während der Tumorprogression ist indes nach wie vor unzureichend verstanden.

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen von CD63 auf das zell-intrinsische metastatische Potential von Tumorzellen zu charakterisieren. Ausgangspunkt sollte die Herstellung von Varianten verschiedener Tumorzelllinien sein, die einen stabilen *Knockdown* von CD63 aufweisen. Nachfolgend sollte das zell-intrinsische metastatische Potential der verschiedenen Tumorzellvarianten in experimentellen Metastasierungsassays analysiert werden. Der Fokus sollte dabei besonders auf den Auswirkungen der verminderten CD63-Expression auf den Arrest bzw. die Extravasation der Tumorzellen und die darauffolgende Kolonisierung des Sekundärorgans liegen. Anschließend sollten *in vitro* Mechanismen identifiziert werden, die den Effekt des CD63-*Knockdowns* auf das zell-intrinsische metastatische Potential der Tumorzellen zu erklären vermögen. Hierzu sollten die Proliferation, die Viabilität, die Morphologie, die Motilität und die Chemoresistenz der verschiedenen Tumorzellvarianten analysiert werden. Gleichzeitig sollten die identifizierten CD63-abhängigen Signalwege durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren validiert und ihre Relevanz für die CD63-abhängige Regulation des zell-intrinsischen metastatischen Potentials überprüft sowie abschließend verschiedene lentivirale Vektoren kloniert werden, die zu einer Überexpression von CD63 in Tumorzellen führen. Das zell-intrinsische metastatische Potential der Tumorzellen mit einer erhöhten Expression von CD63 sollte schließlich mit den Auswirkungen des CD63-*Knockdowns* verglichen werden.

Systemisch erhöhte TIMP-1-Level korrelieren mit einer schlechten Prognose von Krebspatienten. Tatsächlich führen systemisch erhöhte TIMP-1-Level zu einer Induktion der Sekundärinvasion von Tumorzellen in die Leber. Dieser pro-metastatische TIMP-1-Effekt kann auf eine Induktion des HGF/cMet-Signalwegs in der Mikroumgebung der Leber zurückgeführt werden, die abhängig von den inhibitorischen Eigenschaften von TIMP-1 ist. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass auch die Interaktion zwischen TIMP-1 und dem Tetraspanin CD63 für die pro-metastatische Funktion von TIMP-1 eine entscheidende Rolle spielt. Für diese Interaktion ist der nicht-inhibitorische Teil von TIMP-1 verantwortlich. Ausgehend von diesen Informationen sollte im zweiten Teil der vorliegenden Studie

untersucht werden, inwiefern sich der *Knockdown* von CD63 aufseiten der Tumorzellen auf die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung auswirkt. Gleichzeitig sollten mögliche TIMP-1-abhängige Effekte auf die Metastasierung anderer Organe untersucht sowie dargelegt werden, ob systemisch erhöhte TIMP-1-Level neben der Sekundärinvasion auch frühere Schritte der metastatischen Kaskade beeinflussen. Da in früheren Studien die Relevanz von CD63 für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung nicht überprüft wurde, sollten im Rahmen der vorliegenden Studie adenovirale Vektoren hergestellt werden, die für TIMP-1-Varianten kodieren, die wiederum nicht mit CD63 interagieren (NTIMP-1, NTIMP-1/T2G). Anschließend sollten die Auswirkungen hoher systemischer Level dieser TIMP-1-Varianten auf die Lebermetastasierung analysiert werden. Durch die Analyse der TIMP-1-induzierten Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber sollten mögliche neue therapeutische Interventionsmöglichkeiten für die TIMP-1-induzierte Metastasierung evaluiert werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Tierexperimentelle Methoden

#### 4.1.1 Verwendete Versuchstiere

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden weibliche Mäuse im Alter von 6 bis 10 Wochen verwendet. Folgende Mausstämme wurden eingesetzt:

##### *NMRI<sup>mu/nu</sup>*

Nacktmäuse, auch athymische Mäuse genannt, entstanden durch eine spontane Mutation bei Albinomäusen (Pantelouris, 1968). Dieser Gendefekt führt neben dem Verlust der Körperbehaarung auch zu einer dramatisch verringerten Anzahl an T-Lymphozyten und damit zu einer stark eingeschränkten adaptiven Immunantwort (Wortis et al., 1971). Der daraus entstandene immunkompromittierte Mausstamm eignet sich sehr gut für die Untersuchung der Metastasierung von humanen Zelllinien. Auf Grund der geringen Viabilität und Fertilität des ursprünglichen Mausstamms wurde der Gendefekt 1974 von Rygaard in den NMRI-Hintergrund eingekreuzt (Rygaard und Friis, 1974).

##### *DBA/2*

Dieser Mausstamm wurde bereits 1909 von C.C. Little etabliert und ist der älteste Inzuchtstamm. Die beiden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Tumorzelllinien L-CI.5s und Eb288 sind *syngen* zu diesem Mausstamm.

##### *FVBN*

Dieser Mausstamm wurde 1991 etabliert (Taketo et al., 1991) und die in dieser Arbeit verwendete PyMT-Brustkrebszelllinie ist *syngen* zu diesem Mausstamm.

##### *C57BL/6J*

Dieser Mausstamm ist der am weitesten verbreitete Inzuchtstamm und wurde von C.C. Little etabliert (Mekada et al., 2009). Die in dieser Arbeit verwendete B16F10 Tumorzelllinie ist *syngen* zu diesem Mausstamm.

Die Versuchstiere wurden mindestens neun Tage vor Versuchsbeginn bestellt und nach Anlieferung unter Standardbedingungen im Tierstall am Zentrum für Präklinische

Forschung des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München gehalten. Somit konnten sich die Tiere mindestens eine Woche an die neue Umgebung anpassen um mögliche Einflüsse, z.B. durch den Transport bedingt, auf die Versuchsergebnisse zu minimieren. Die Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer unter SOPF-Bedingungen (*engl. specific and opportunistic pathogen-free*) gehalten. Alle Tierversuche wurden unter den Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-69-05, 55.2-1-54-2531-72-08, 55.2-1-54-2531-13-09, 55.2-1-54-2531-143-11 und 55.2-1-54-2531-91-13 von der Regierung von Oberbayern genehmigt und es wurden alle Vorkehrungen getroffen, um ein Leiden der Versuchstiere auszuschließen.

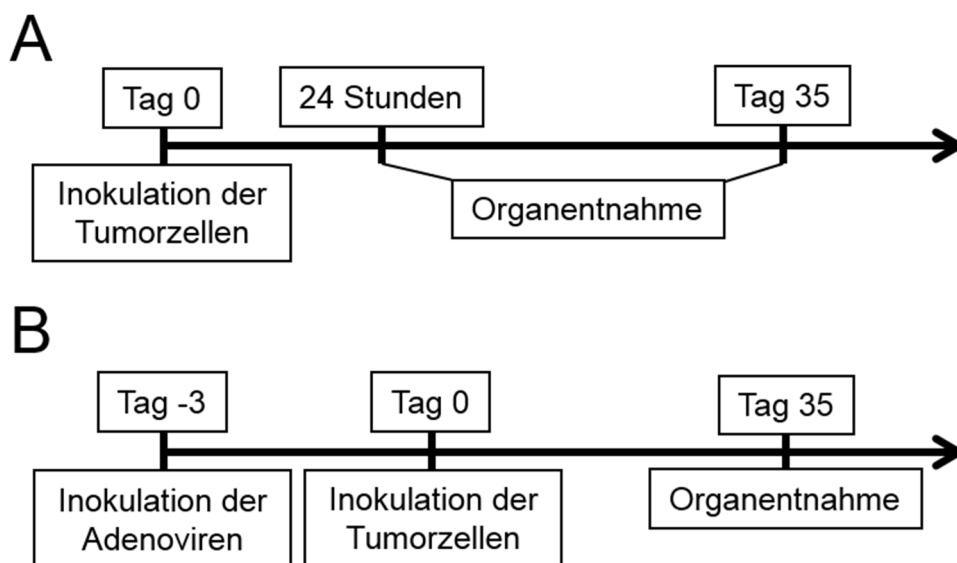
#### **4.1.2 Metastasierungsmodelle**

Die Versuchstiere wurden nach dem Zufallsprinzip in die verschiedenen Versuchsgruppen eingeteilt, um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse zu vermeiden. Vor der Inokulation der Tumorzellen bzw. Adenoviren wurden die Versuchstiere ca. 15 Minuten unter Rotlicht erwärmt, um eine Vasodilatation der Schwanzvenen herbeizuführen. Diese Erweiterung der Blutgefäße erleichtert die intravenöse Inokulation. Für die Applikation in die Schwanzvene wurden 1 ml-Spritzen (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und 27GA7/8-Kanülen (0,4 x 21 mm, Rose GmbH, Trier, Deutschland) verwendet.

##### **4.1.2.1 Das experimentelle Metastasierungsmodell SKOV3ipL**

Um die Bedeutung von CD63 auf Seite der Tumorzellen für die Metastasierung zu untersuchen, wurden verschiedene Varianten der humanen SKOV3ip Ovarialkarzinomzelllinie hergestellt, die entweder normale, niedrige oder erhöhte CD63 Level exprimieren. Die intravenöse (i.v.) Inokulation der SKOV3ip Tumorzelllinie führt unter physiologischen Bedingungen zur Ausbildung von Lungenmetastasen mit hoher Reproduzierbarkeit. Für eine einfache Auswertung des Metastasierungsmusters bis auf Einzelzellebene (Krüger et al., 1994, 1998) wurden die SKOV3ip Zellen *lacZ*-markiert (SKOV3ipL). Vor Inokulation der SKOV3ipL Tumorzelllinie wurden die Zellen mit PBS (*engl. phosphate buffered saline*, Biochrom AG, Berlin; pH = 7,4) gewaschen. Die SKOV3ipL Tumorzellen wurden auf  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen / ml PBS eingestellt und bis zur Inokulation für max. 45 Minuten auf Eis gelagert. Pro Versuchstier wurden  $5,0 \cdot 10^5$  SKOV3ipL-Tumorzellen (entspricht 200  $\mu$ l) in die Schwanzvene inokuliert. Die

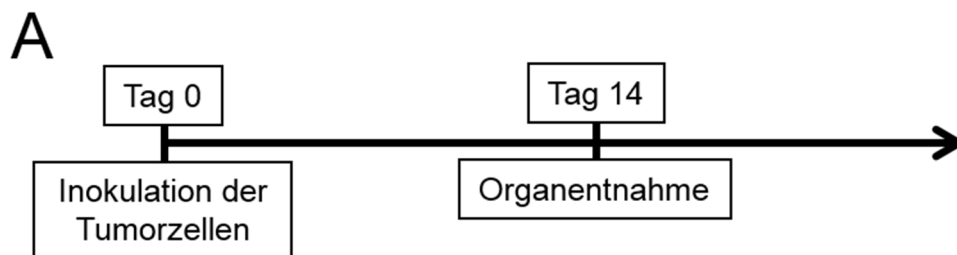
Versuchstiere wurden 24 Stunden bzw. 35 Tage nach Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen (Abbildung 4.1A). Zusätzlich wurde der Einfluss von erhöhten systemischen TIMP-1 Leveln auf die Metastasierung der SKOV3ipL-Tumorzellen untersucht. Für diese Versuche wurden zuerst  $5,0 \cdot 10^8$  pfu (engl. *plaque forming units*) des entsprechenden Viruspartikels in die Schwanzvene der Versuchstiere inokuliert (Add170-3 und AdTIMP-1). Die Viruspartikel wurden in PBS<sup>2+</sup> (PBS mit 0,68 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,56 mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert und pro Tier 200 µl der Virussuspension in die Schwanzvene inokuliert. Drei Tage nach adenoviralem Gentransfer erfolgte die Inokulation der Tumorzellen, die physiologische oder niedrige CD63 Level exprimieren (shNT und shCD63\_49). Vor Inokulation wurden die Tumorzellen mit PBS (engl. *phosphate buffered saline*, Biochrom AG, Berlin, Deutschland; pH = 7,4) gewaschen und auf  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen / ml PBS eingestellt und bis zur Inokulation für max. 45 Minuten auf Eis gelagert. Pro Versuchstier wurden  $5,0 \cdot 10^5$  Tumorzellen (entspricht 200 µl) in die Schwanzvene inokuliert. Die Tiere wurden 35 Tage nach Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen (Abbildung 4.1B).



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Aufbaus der SKOV3ipL Tierversuche.** (A und B) Dargestellt sind jeweils die Zeitpunkte für die Inokulation der Tumorzellen, der Adenoviruspartikel und der Zeitpunkt der Organentnahme. (A) Die *NMR1<sup>mu/mu</sup>* (n = 5) Mäuse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Inokulation der verschiedenen Tumorzellvarianten geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen. Folgende Tumorzellvarianten wurden inokuliert: SKOV3ipL shNT, SKOV3ipL shCD63\_49 und shCD63\_51, SKOV3ipL empty und SKOV3ipL CD63<sup>high</sup>. (B) Für die Analyse der Auswirkungen systemisch erhöhter TIMP-1 Level auf die Lungenmetastasierung von SKOV3ipL-Zellen wurden drei Tage vor Inokulation der Tumorzellen  $5,0 \cdot 10^8$  pfu des entsprechenden Adenovirus appliziert. 35 Tage nach Inokulation der Tumorzellen (shNT und shCD63\_49) wurden die Tiere geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen.

#### 4.1.2.2 Das experimentelle Metastasierungsmodell B16F10L

Um die Bedeutung von CD63 auf Seite der Tumorzellen für die Metastasierung zu untersuchen, wurden verschiedene Varianten der murinen B16F10 Tumorzelllinie verwendet, die entweder normale oder niedrige CD63 Level exprimieren (shNT und shCD63\_5). Die i.v. Inokulation der B16F10 Tumorzelllinie in die Schwanzvene führt zur Ausbildung von Lungenmetastasen mit hoher Reproduzierbarkeit. Für eine einfache Auswertung des Metastasierungsmusters bis auf Einzelzellebene (Krüger et al., 1994, 1998) wurden die Tumorzellen *lacZ*-markiert (B16F10L). Vor Inokulation wurden die Tumorzellen mit PBS (engl. *phosphate buffered saline*, Biochrom AG, Berlin, Deutschland; pH = 7,4) gewaschen und auf  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen / ml PBS eingestellt und bis zur Inokulation für max. 45 Minuten auf Eis gelagert. Pro Versuchstier wurden  $5,0 \cdot 10^5$  Tumorzellen (entspricht 200  $\mu$ l) in die Schwanzvene inokuliert. Die Tiere wurden 14 Tage nach Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen (Abbildung 4.2A).



**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Aufbaus des B16F10L Tierversuchs.** (A) Dargestellt ist der Zeitpunkt für die Inokulation der Tumorzellen. Die *C57BL/6J* Mäuse ( $n = 4$ ) wurden zum angegebenen Zeitpunkt nach Inokulation der verschiedenen Tumorzellvarianten geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen. Folgende Tumorzellvarianten wurden inokuliert: B16F10L shNT, B16F10L shCD63\_5.

#### 4.1.2.3 Das experimentelle Metastasierungsmodell Eb288L

Um die Rolle der Lebermikroumgebung für die Ausbildung der prä-metastatischen Nische zu untersuchen, wurde die nicht-metastatische Tumorzelllinie Eb288L eingesetzt. Unter physiologischen Bedingungen führt die i.v. Inokulation dieser Tumorzelllinie nicht zur Ausbildung von Metastasen. Für eine einfache Auswertung des Metastasierungsmusters bis auf Einzelzellebene (Krüger et al., 1994, 1998) wurden die Tumorzellen *lacZ*-markiert (Eb288L). Mittels adenoviralem Gentransfer von TIMP-1 wurden die systemischen Level des Inhibitors erhöht. Hierzu wurden zuerst  $5,0 \cdot 10^8$  pfu des entsprechenden Viruspartikel

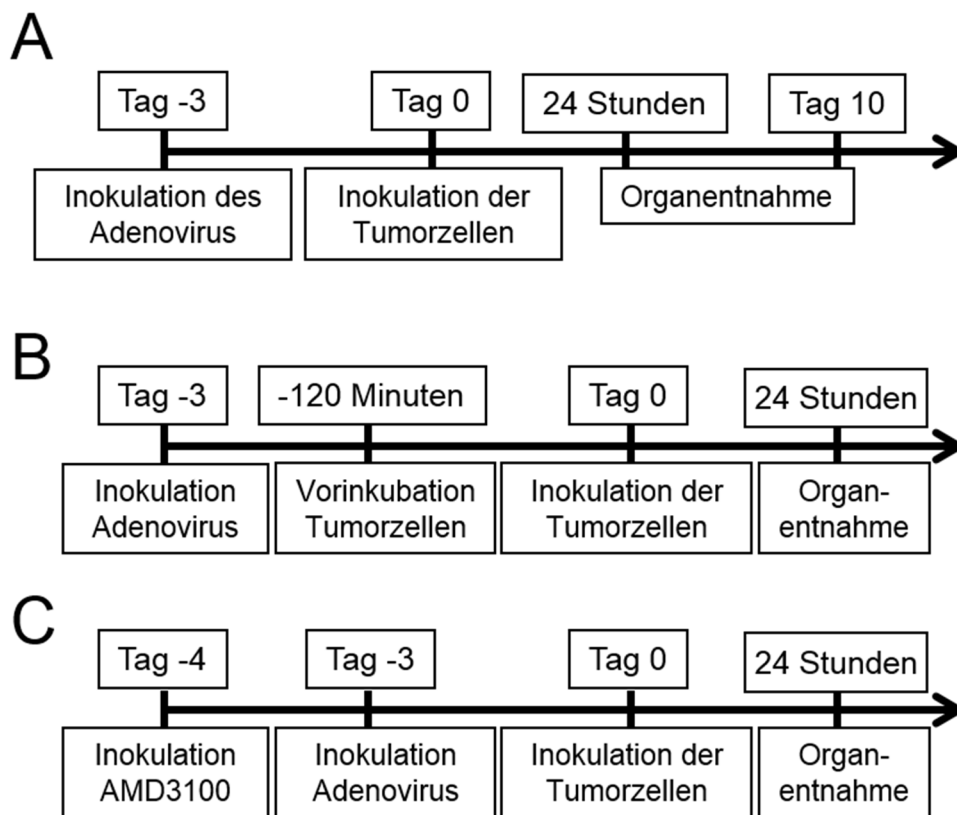


in die Schwanzvene der Versuchstiere inokuliert (Add170-3 und AdTIMP-1). Die Viruspartikel wurden in PBS<sup>2+</sup> (PBS mit 0,68 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,56 mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert und pro Tier 200 µl der Virussuspension eingesetzt. Drei Tage nach adenoviralem Gentransfer erfolgte die Inokulation der Tumorzellen. Vor Inokulation wurden die Tumorzellen mit PBS (engl. *phosphate buffered saline*, Biochrom AG, Berlin, Deutschland; pH = 7,4) gewaschen und auf  $5,0 \cdot 10^6$  Zellen / ml PBS eingestellt und bis zur Inokulation für max. 45 Minuten auf Eis gelagert. Pro Versuchstier wurden  $1,0 \cdot 10^6$  Tumorzellen (entspricht 200 µl) in die Schwanzvene inokuliert. Die Tiere wurden 24 Stunden bzw. 10 Tage nach Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen (Abbildung 4.3A).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Relevanz des SDF-1 Rezeptors CXCR4 für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung untersucht. Hierzu wurde der klinisch zugelassene CXCR4-Inhibitor AMD3100 (Plerixafor<sup>®</sup>, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) verwendet. Die systemischen TIMP-1 Level wurden durch einen adenoviralen Gentransfer erhöht. Dazu wurde den Tieren  $5,0 \cdot 10^8$  pfu des entsprechenden Adenovirus (Add170-3 und AdTIMP-1) in die Schwanzvene inokuliert. Die Viruspartikel wurden in PBS<sup>2+</sup> (PBS mit 0,68 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,56 mM CaCl<sub>2</sub>; pH = 7,4) resuspendiert und 200 µl der Virussuspension wurden pro Tier eingesetzt. Drei Tage später erfolgte die Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  Eb288L Tumorzellen in die Schwanzvene. Die Eb288L Tumorzellen wurden vor der Inokulation für 60 Minuten mit 100 ng / ml AMD3100 vorinkubiert. Die Tiere wurden 24 Stunden nach Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen (Abbildung 4.3B).

In einem weiteren experimentellen Eb288L-Metastasierungsversuch wurde die Relevanz der TIMP-1-induzierten SDF-1 Expression in der Leber für die Ausbildung der hepatischen prä-metastatischen Nische getestet. Hierzu wurde der klinisch zugelassene CXCR4-Inhibitor AMD3100 (Plerixafor<sup>®</sup>) verwendet. Der Inhibitor wurde den Tieren täglich intraperitoneal in einer Konzentration von 10 mg / kg appliziert. Die systemischen TIMP-1 Level wurden einen Tag später durch einen adenoviralen Gentransfer (Add170-3 und AdTIMP-1) erhöht. Dazu wurde den Tieren  $5,0 \cdot 10^8$  pfu des entsprechenden Adenovirus (Add170-3 und AdTIMP-1) in die Schwanzvene inokuliert. Die Viruspartikel wurden in PBS<sup>2+</sup> (PBS mit 0,68 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,56 mM CaCl<sub>2</sub>; pH = 7,4) resuspendiert und 200 µl der Virussuspension wurden pro Tier eingesetzt. Drei Tage später erfolgte die Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  Eb288L Tumorzellen in die Schwanzvene. Die Tiere wurden 24 Stunden nach

Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen (Abbildung 4.3C).



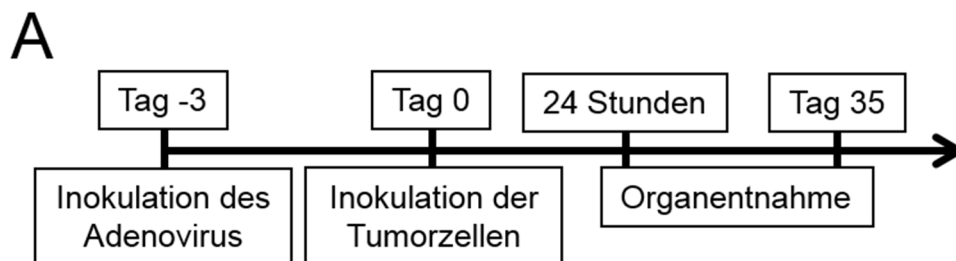
**Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Aufbaus des Eb288L Tierversuchs.** (A) Dargestellt ist der Zeitpunkt für die Inokulation der Tumorzellen. Die *DBA/2* Mäuse ( $n = 4$ ) wurden zum angegebenen Zeitpunkt nach Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen. Drei Tage vor Inokulation der Tumorzellen erfolgte die i.v. Applikation von  $5,0 \cdot 10^8$  pfu des entsprechenden Adenovirus (Add170-3 und AdTIMP-1). Zusätzlich wurden Tiere in einem weiteren Versuch an Tag 0 geopfert und die Organe entnommen, um eine Analyse der TIMP-1-induzierten Veränderungen der Mikroumgebung der Zielorgane zu ermöglichen. (B) Dargestellt ist der Zeitpunkt für die Vorinkubation der Tumorzellen mit 100 ng / ml AMD§100 und die Inokulation der Tumorzellen. Die *DBA/2* Mäuse ( $n = 4$ ) wurden zum angegebenen Zeitpunkt nach Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen. Drei Tage vor Inokulation der Tumorzellen erfolgte die i.v. Applikation von  $5,0 \cdot 10^8$  pfu des entsprechenden Adenovirus (Add170-3 und AdTIMP-1). Zusätzlich wurden Tiere in einem weiteren Versuch an Tag 0 geopfert und die Organe entnommen, um eine Analyse der TIMP-1-induzierten Veränderungen der Mikroumgebung der Zielorgane zu ermöglichen. (C) Dargestellt ist der Zeitpunkt für die Inokulation von AMD3100 (10 mg / kg) und Tumorzellen. Die *DBA/2* Mäuse ( $n = 4$ ) wurden zum angegebenen Zeitpunkt nach Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen. Drei Tage vor Inokulation der Tumorzellen erfolgte die i.v. Applikation von  $5,0 \cdot 10^8$  pfu des entsprechenden Adenovirus (Add170-3 und AdTIMP-1). Zusätzlich wurden Tiere in einem weiteren Versuch an Tag 0 geopfert und die Organe entnommen, um eine Analyse der TIMP-1-induzierten Veränderungen der Mikroumgebung der Zielorgane zu ermöglichen.

#### 4.1.2.4 Das experimentelle Metastasierungsmodell PyMTL

Um die Auswirkungen von systemisch erhöhten TIMP-1 Level auf die Metastasierung zu beleuchten, wurde das PyMTL Metastasierungsmodell verwendet. Unter physiologischen Bedingungen führt die i.v. Inokulation dieser Brustkrebszelllinie in syngene *FVB/N* Mäuse

zur Ausbildung von Lungenmetastasen mit hoher Reproduzierbarkeit (Vasiljeva et al., 2006). Für eine einfache Auswertung des Metastasierungsmusters bis auf Einzelzellebene wurden die Tumorzellen *lacZ*-markiert (PyMTL; (Krüger et al., 1994, 1998)). Die systemischen TIMP-1 Level der FVB/N Mäuse wurden durch einen adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 erhöht. Dazu wurde den Tieren  $5,0 \cdot 10^8$  pfu (engl. *plaque forming units*) des entsprechenden Adenovirus (Add170-3, AdTIMP-1, AdNTIMP-1) in die Schwanzvene inokuliert. Die Viruspartikel wurden in PBS<sup>2+</sup> (PBS mit 0,68 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,56 mM CaCl<sub>2</sub>; pH = 7,4) resuspendiert und 200 µl der Virussuspension wurden pro Tier eingesetzt. Drei Tage später erfolgte die Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Tumorzellen in die Schwanzvene. Die Tiere wurden 24 Stunden bzw. 35 Tage nach Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen (Abbildung 4.4A).

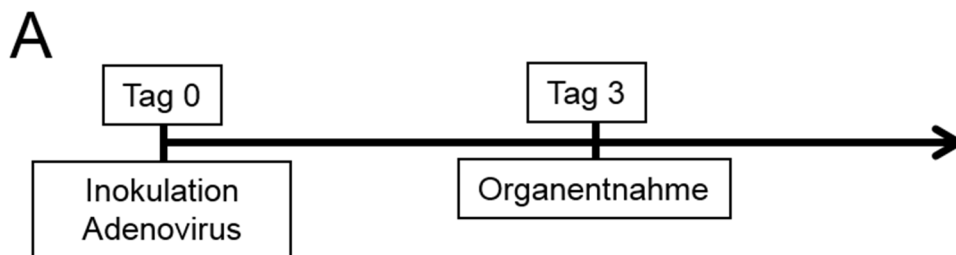
In einem weiteren experimentellen PyMTL-Metastasierungsversuch wurde die Relevanz der TIMP-1-induzierten SDF-1 Expression in der Leber für die Ausbildung der hepatischen prä-metastatischen Nische getestet. Hierzu wurde der klinisch zugelassene CXCR4-Inhibitor AMD3100 (Plerixafor<sup>®</sup>) verwendet. Der Inhibitor wurde den FVB/N Tieren täglich intraperitoneal in einer Konzentration von 10 mg / kg appliziert. Die systemischen TIMP-1 Level wurden einen Tag später mittels adenoviralem Gentransfer erhöht. Dazu wurde den Tieren  $5,0 \cdot 10^8$  pfu des entsprechenden Adenovirus (Add170-3, AdTIMP-1, AdNTIMP-1) in die Schwanzvene inokuliert. Die Viruspartikel wurden in PBS<sup>2+</sup> (PBS mit 0,68 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,56 mM CaCl<sub>2</sub>; pH = 7,4) resuspendiert und 200 µl der Virussuspension wurden pro Tier verwendet. Drei Tage später erfolgte die Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Tumorzellen in die Schwanzvene. Die Tiere wurden 24 Stunden nach Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen.



**Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des Aufbaus des PyMTL Tierversuchs.** (A) Dargestellt ist der Zeitpunkt für die Inokulation der Tumorzellen. Die FVB/N Mäuse (n = 4) wurden zum angegebenen Zeitpunkt nach Inokulation der Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen. Drei Tage vor Inokulation der Tumorzellen erfolgte die Injektion von  $5,0 \cdot 10^8$  pfu des entsprechenden Adenovirus (Add170-3 und AdTIMP-1) in die Schwanzvene.

#### 4.1.2.5 Tiermodell zur Analyse der TIMP-1-induzierten Veränderungen in der Mikroumgebung des Zielorgans der Metastasierung

Um Einblicke in die, durch hohe systemische Level von TIMP-1-induzierten, Veränderungen in der Mikroumgebung der Zielorgane zu erhalten wurden FVB/N und DBA/2 Mäusen eingesetzt. Die systemischen TIMP-1 Level beider Mausstämmen wurden durch einen adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 erhöht. Dazu wurde den Tieren  $5,0 \cdot 10^8$  pfu des entsprechenden Adenovirus (Add170-3, AdTIMP-1, AdNTIMP-1) in die Schwanzvene inokuliert. Die Viruspartikel wurden in PBS<sup>2+</sup> (PBS mit 0,68 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,56 mM CaCl<sub>2</sub>; pH = 7,4) resuspendiert und 200 µl der Virussuspension wurden pro Tier eingesetzt. Die Versuchstiere wurden drei Tage nach Inokulation der Viruspartikel geopfert und die Organe zur biochemischen Analyse der hepatischen Mikroumgebung entnommen (Abbildung 4.5A).

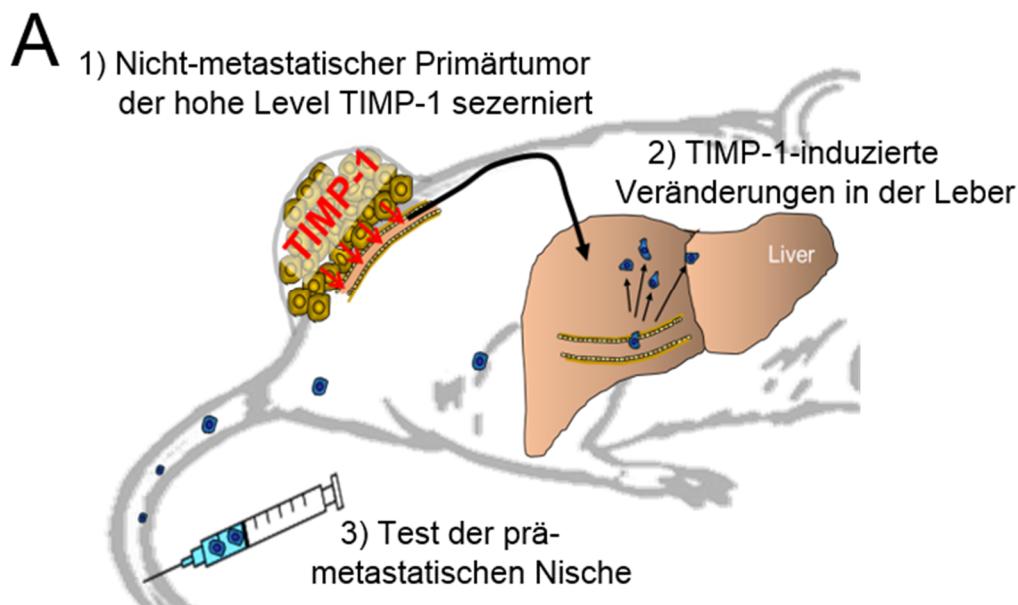


**Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Tierversuchs zur Analyse der TIMP-1-induzierten Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber.** (A) Dargestellt ist der Zeitpunkt für die Inokulation des Adenovirus ( $5,0 \cdot 10^8$  pfu des entsprechenden Adenovirus (Add170-3, AdTIMP-1, AdNTIMP-1) in die Schwanzvene). Die Mäuse (FVB/N, DBA/2; n = 4) wurden zum angegebenen Zeitpunkt nach Inokulation des Adenovirus geopfert und die Organe zur Analyse der Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber entnommen.

#### 4.1.2.6 Das Metastasierungsmodell zur Analyse der TIMP-1-induzierten prä-metastatischen Nische

Um die Relevanz von systemisch erhöhten TIMP-1 Leveln für die Lebermetastasierung zu überprüfen wurde ein Tiermodell entwickelt, das eine Näherung an die klinische Situation ermöglicht. Hierzu wurde NMRI<sup>nu/nu</sup> Mäusen intradermal ein Primärtumor gesetzt, der aus Eb288 Zellen besteht, die entweder wildtypische oder stark erhöhte TIMP-1 Level exprimieren. Bei einem Primärtumordurchmesser von ca. 6 - 7 mm wurde die Suszeptibilität der Leber durch die Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Brustkrebszellen getestet. Die Überexpression von TIMP-1 hatte keine Auswirkungen auf das Primärtumorwachstum und die nicht-metastatischen Eb288 Tumorzellen waren nicht in der Lage, den Primärtumor zu verlassen (Daten nicht gezeigt). Während der prä-metastatischen Phase, also dem Wachstum

des Primärtumors bis zu einem Durchmesser von 6 – 7 mm, sezerniert der Tumor verschiedene lösliche Faktoren, die sich auf die Mikroumgebung der Leber auswirken können. Für eine einfache Auswertung des Metastasierungsmusters bis auf Einzelzellebene (Krüger et al., 1994, 1998) wurden die Tumorzellen *lacZ*-markiert (PyMTL). Vor Inokulation wurden die Eb288 Tumorzellen mit PBS (engl. *phosphate buffered saline*, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewaschen und auf  $1,0 \cdot 10^7$  Zellen / ml PBS eingestellt. Nach erneuter Bestimmung der Zellzahl wurde die Eb288 Zellsuspension auf  $1,0 \cdot 10^7$  Zellen / ml PBS eingestellt und bis zur Inokulation für max. 45 Minuten auf Eis gelagert. Pro Versuchstier wurden  $2,0 \cdot 10^6$  Tumorzellen (entspricht 200  $\mu$ l) intradermal appliziert. Vor Inokulation wurden die PyMTL Tumorzellen mit PBS gewaschen und auf  $1,0 \cdot 10^7$  Zellen / ml PBS eingestellt. Die Tumorzellen wurden bis zur Inokulation für max. 45 Minuten auf Eis gelagert. Pro Versuchstier wurden  $2,0 \cdot 10^6$  Tumorzellen (entspricht 200  $\mu$ l) in die Schwanzvene inokuliert. Abbildung 4.6A stellt den Versuchsaufbau schematisch dar.



**Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des Tierversuchsaufbaus zur Analyse der Auswirkungen einer TIMP-1 Überexpression im Primärtumor auf die Metastasierung von PyMTL Tumorzellen.** (A.1)  $2,0 \cdot 10^6$  Eb288 (empty und TIMP-1) wurden intradermal in *NMRInu/nu* Mäuse inokuliert ( $n = 6$ ). (A.2) Das Primärtumorwachstum wurde beobachtet. In dieser prä-metastatischen Phase wurden von den Tumoren lösliche Faktoren sezerniert, die nachfolgend Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber induzieren. (A.3) Ab einem Primärtumordurchmesser von 6 – 7 mm wurden die Suszeptibilität der Leber durch die Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Tumorzellen analysiert. Die Tiere wurden 24 Stunden nach Inokulation der PyMTL Tumorzellen geopfert und die Organe zur Analyse entnommen. Zusätzlich wurden in einem weiteren Versuch die Tiere geopfert, wenn die Primärtumoren einen Durchmesser von 6 – 7 mm erreicht hatten. Anschließend wurden die Organe entnommen, um eine Analyse der TIMP-1-induzierten Veränderungen der Lebermikroumgebung zu ermöglichen.

### 4.1.3 Probengewinnung

Die Tiere wurden, je nach Tierversuchsantrag, durch Kohlendioxid oder per zervikaler Dislokation zu den angegebenen Zeitpunkten geopfert. Die Lungen und Lebern der Versuchstiere wurden präpariert und wie nachfolgend beschreiben bearbeitet. Der linke Lungenflügel und der mediale Leberlappen der Mäuse wurden für das Anfärben der Tumorzellen mit X-Gal verwendet (s. 4.1.4). Zusätzlich wurde ein Teil des Gewebes (Lunge und Leber) entnommen und für die nachfolgenden biochemischen Untersuchungen (auf mRNA- und Proteinebene) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Herstellung von Kryoschnitten und die nachfolgenden histologischen Analysen wurde ein Teil des Gewebes in Tissue Tek® (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingefroren (auf Trockeneis) und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  asserviert. Zusätzlich wurden Paraffinpräparate hergestellt. Dazu wurde das Gewebe über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  in Formaldehyd (2 % v/v, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) fixiert, nach Standardprotokoll dehydriert (Pathologie, Klinikum rechts der Isar der TUM) und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Quantifizierung der Metastasen erfolgte durch das Auszählen von Metastasen mit bloßem Auge bzw. unter einem Binokular. Die Gesamtumorlast wurde mittels quantitativer RT-PCR der *lacZ* Expression gemessen und auf 18S-rRNA normiert (s. 4.4.10). Primärtumoren wurden halbiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  asserviert.

### 4.1.4 X-Gal-Färbung

X-Gal oder 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid ist ein chromogenes Substrat für die  $\beta$ -Galactosidase. Die Spaltung von X-Gal durch die  $\beta$ -Galactosidase setzt 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl (X) frei. Durch eine anschließende Oxidation wird das enzymatisch abgespaltene Indoxyl in ein unlösliches Indigo mit der typischen Blaufärbung überführt. Diese Farbreaktion kann für den Nachweis von  $\beta$ -Galactosidase verwendet werden. Da die verwendeten Tumorzelllinien genetisch mit dem *lacZ*-Gen markiert wurden, können die Tumorzellen durch eine X-GAL-Färbung problemlos *in situ* detektiert werden. Hierzu wurde der mediale Leberlappen oder der linke Lungenflügel der Mäuse unmittelbar nach Entnahme aus dem Versuchstier kurz in PBS gewaschen und anschließend für ca. 60 Minuten in einer Fixierlösung aus 2% (v/v) Formaldehyd und 0,2% (v/v) Glutaraldehyd (Applichem, Darmstadt, Deutschland) bei RT inkubiert. Danach wurden die Organe 3 x mit PBS gewaschen und bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht in X-Gal-Gebrauchslösung inkubiert. Die

Gebrauchslösung besteht aus der X-Gal-Stocklösung (1 g X-Gal (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in 25 ml Dimethylformamid (Applichem, Darmstadt, Deutschland) gelöst die 1:40 in der X-Gal-Färbelösung (1,64 g  $K_3Fe(CN)_6$ , 2,10 g  $K_4Fe(CN)_6$ , beide Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland; 2 ml 1 M  $MgCl_2$  (Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland), 1 ml 10 % Natrium-Deoxycholat, 2 ml 10 % NP40 in 1l PBS, pH = 7,1) verdünnt wird. Abschließend wurden die Organe mit PBS gewaschen und in Fixierlösung (2% (v/v) Formaldehyd (Applichem, Darmstadt, Deutschland) in PBS bei RT gelagert.

## **4.1.5 Immunhistochemische Methoden**

### **4.1.5.1 Herstellung von Kryoschnitten**

Die in Tissue Tek (Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland) eingebetteten Gewebeproben wurden aus dem  $-80^{\circ}C$  Schrank entnommen und für ca. 1 Stunde bei  $-20^{\circ}C$  gelagert. Zur Generierung von 8 bzw. 4  $\mu M$  dicken Kryoschnitten wurden die Gewebeblöcke für weitere 30 Minuten im Kryotom (Microm HM560) bei  $-16^{\circ}C$  gelagert. Anschließend wurden die Gewebeproben am Mikrotom geschnitten und auf SuperFrost™ Objektträger (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht und für 10 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend für maximal 2 Monate bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}C$  gelagert.

### **4.1.5.2 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten**

Die Kryoschnitte wurden aus dem  $-80^{\circ}C$  Schrank entnommen und für ca. 30 Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Kryoschnitte für 10 Minuten mit eiskaltem Aceton fixiert und nachfolgend für ca. 15 Minuten an der Luft getrocknet. Die Kryoschnitte wurden in TBS-Puffer (engl. *Tris-Base-Solution*) für 10 Minuten rehydriert und überschüssige Lösung von den Objektträgern durch Schütteln entfernt. Weiter wurden die Kryoschnitte zur Blockade der endogenen Peroxidasen für 5 Minuten in Methanol mit 0,3 %  $H_2O_2$  inkubiert und danach 2 x in TBS gewaschen. Um ein Austrocknen der Schnitte während der Färbung zu verhindern, wurden die Schnitte mit einem Fettstift (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland) eingekreist. Anschließend wurde die Avidin-Blocklösung (Cell and Tissue Staining Kit, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) aufgetropft, die Schnitte für 10 Minuten bei RT inkubiert und erneut in TBS gewaschen. Danach erfolgte das Auftragen der Biotin-Blocklösung (Cell and Tissue Staining Kit, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland), eine 10 minütige Inkubation bei RT und eine erneute Waschung der Schnitte

in TBS. Darauf folgend wurde die Primärantikörperlösung aufgebracht und die Schnitte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Primärantikörperlösung besteht aus dem Primärantikörper (NIMP-R14, Hycult Biotechnology) 1:50 verdünnt in TBS. Anschließend wurden die Schnitte erneut 2 x für 5 Minuten in TBS gewaschen. Anschließend wurde die Sekundärantikörperlösung (Cell and Tissue Staining Kit, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) aufgetragen und die Kryoschnitte für 45 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach werden die Schnitte 2 x für 5 Minuten in TBS gewaschen und anschließend mit dem HSS-HRP-Komplex (Cell and Tissue Staining Kit, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Farbentwicklung erfolgte mit DAB (Diaminobenzidin, Cell and Tissue Staining Kit, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) und wurde nach Erkennen einer bräunlichen Färbung durch das Waschen der Kryoschnitte mit Leitungswasser gestoppt. Abschließend wurden die Schnitte Hämalaun-Eosin gefärbt und mit auf 40°C vorgewärmter Glyceringelatine (Kaiser's Glyceringelatine, Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Die Schnitte wurden anschließend unter einem Lichtmikroskop ausgewertet.

#### **4.1.5.3 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von Kryoschnitten**

Die Kryoschnitte wurden aus dem -80°C Schrank entnommen und für ca. 15 Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten mit eiskaltem Aceton fixiert und nachfolgend für ca. 15 Minuten an der Luft getrocknet. Die Kryoschnitte wurden in TBS-Puffer (engl. *Tris-Base-Solution*) für 10 Minuten rehydriert und überschüssige Lösung von den Objektträgern durch Schütteln entfernt. Um ein Austrocknen bzw. Auslaufen während der Färbung zu verhindern, wurden die Schnitte mit einem Fettstift (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland) eingekreist. Anschließend wurden die Schnitte mit der Primärantikörperlösung bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Primärantikörperlösung besteht aus dem Kaninchen anti-Maus SDF-1 Antikörper (SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), der 1:50 in TBS verdünnt wurde. Anschließend wurde der Schnitt 2 x für je 5 Minuten in TBS gewaschen und mit der Entwicklungslösung in einer feuchten Kammer für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entwicklungslösung besteht aus dem Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus Alexa-488 Sekundärantikörper, Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) der 1:100 in TBS verdünnt wurde und der DAPI-Stammlösung (100 µg / ml, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), die 1:150 in TBS verdünnt wurde. Der Objektträger wurde anschließend 3 x mit TBS gewaschen und mit Mowiol (Sigma Aldrich,



Deisenhofen, Deutschland) oder VectaShield® (Vectorlabs, Burlingame, USA) eingedeckt. Anschließend wurden die Proben am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, LSM 700; Software Zen2011) ausgewertet oder bei -20°C für bis zu 8 Wochen gelagert.

#### **4.1.5.4 Herstellung von Paraffinschnitten**

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcke wurden bei RT gelagert. Um das Schneiden der Blöcke zu erleichtern, wurden die Paraffinblöcke vor Beginn für ca. 30 Minuten bei 4°C gekühlt. Zur Generierung von 2 µM dicken Schnitten wurden die Gewebeblöcke mit Hilfe eines elektrischen Rotationsmikrotoms (Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland) geschnitten. Die Paraffinschnitte wurden mit einem feuchten Seidentuch aufgenommen und zur Glättung auf ein Wasserbad (42°C) aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte auf SuperFrost™ Objektträger (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen, bei 37°C über Nacht getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur dunkel gelagert

#### **4.1.5.5 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten am Bondmax**

Die Färbung der Gewebeschnitte erfolgte im Labor von Prof. M. Heikenwälder (Helmholtz Zentrum München). 2 µM dicke Gewebeschnitte wurden mit Bond Primärantikörperverdünnungslösung (Leica, Wetzlar, Deutschland) inkubiert. Folgende Primärantikörper wurden verwendet: anti-F4/80 (BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz), Anti-A6 (zur Verfügung gestellt von Dr. Valentina Factor), Anti-CK19 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA), anti-B220 (BD Pharmigen, Heidelberg, Deutschland) und anti-CD3 (Neomarkers, Fremont, USA). Die Färbung wurde am BOND-MAX Färberoboter (Leica, Wetzlar, Deutschland) unter Verwendung des BOND Kompakt-Polymer Detektionssystems durchgeführt. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden unter einem Lichtmikroskop ausgewertet.

## **4.2 Methoden der Zellkultur**

### **4.2.1 Verwendete Zelllinien**

Die 293T-Zelllinie wird aufgrund ihrer hohen Transfizierbarkeit als Verpackungszelllinie für die Herstellung von lentiviralen Partikeln verwendet. Diese humane embryonale Nierenepithelzelllinie exprimiert das SV40 T-Antigen und ermöglicht somit die episomale

Replikation von Plasmiden mit einem SV-40-*origin of replication* (Pear et al., 1993). Diese Zelllinie wurde käuflich erworben (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland).

HEK-293-Zellen sind ein Transformationsprodukt der humanen embryonalen Nierenzelllinie und gescherter DNA des humanen Adenovirus Typ 5 (Graham et al., 1977; Louis et al., 1997) und zeichnen sich durch eine leichte Transfizierbarkeit aus. Da diese Zelllinie die E1-Region des Ad5-Virus exprimiert, ist diese Zelllinie für die Produktion von E1-deletierten Adenoviren geeignet (Amalfitano et al., 1998). Diese Zelllinie wurde käuflich erworben.

Bei der GTL16-Zelllinie handelt es sich um eine klonale Tumorzelllinie, die von einer Magenkarzinomzelllinie abstammt (Giordano et al., 1988). Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Carla Boccaccio (IRCC, Turin, Italien) zur Verfügung gestellt. Die SKOV3ip-Zelllinie ist eine Variante der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Peter Altevogt (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 ist humanen Ursprungs (Möbus et al., 1992) und wurde freundlicherweise von der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik (Klinikum rechts der Isar der TUM, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Bei der Tumorzelllinie Eb288 handelt es sich um ein murines T-Zell Lymphom, das durch Behandlung von Mäusen mit Methylcholanthren generiert wurde. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Schirmacher (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die murine Brustkrebszelllinie PyMT wurde aus dem Tumorgewebe von PyMT-Mäusen isoliert (Vasiljeva et al., 2006). Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Thomas Reinheckel (Universität Freiburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

#### **4.2.2 Kultivierung der Zellen**

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte unter Standardbedingungen bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub> und 37°C in einem Brutschrank (Scientific CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator, Thermo Quest, Egelsbach, Deutschland). Für die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen wurden die Zellen in einem Hypoxie-Inkubator (HERAcell150, Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland) bei 1% O<sub>2</sub>, 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Suspensionszelllinien wurden in Zellkulturflaschen kultiviert (TPP,

Trasadingen, Schweiz). Alle adhärenenten Zelllinien wurden in Zellkulturschalen kultiviert (TPP, Trasadingen, Schweiz).

**Tabelle 4.1: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien für die entsprechende Zelllinie**

Zelllinie	Medium und Zusätze
<b>293T</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) <sup>1</sup> , 10 % (v/v) FKS (PAN), 2 mM L-Glutamin <sup>1</sup> , 10 mM HEPES <sup>4</sup> , 0,55 mM Asparagin <sup>3</sup> , 0,27 mM Arginin <sup>3</sup>
<b>B16F10L</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) <sup>1</sup> , 10 % (v/v) FKS (PAN)
<b>Eb288L</b>	RPMI 1640 <sup>1</sup> , 10 % (v/v) FKS (PAA Gold <sup>2</sup> ), 50 µM β-Mercaptoethanol <sup>3</sup> , 10 mM HEPES <sup>4</sup> , 2 mM L-Glutamin <sup>1</sup> , 0,55 mM Asparagin <sup>3</sup> , 0,27 mM Arginin <sup>3</sup>
<b>GTL16L</b>	RPMI 1640, 10 % (v/v) FKS (PAN), 2 mM L-Glutamin <sup>1</sup>
<b>HEK-293</b>	DMEM <sup>1</sup> , 10 % (v/v) FKS (PAA Gold <sup>2</sup> ), 2 mM L-Glutamin <sup>1</sup>
<b>OV-MZ-6L</b>	DMEM <sup>1</sup> , 2 mM L-Glutamin <sup>1</sup> , 10 % (v/v) FKS (PAN), 10 mM HEPES <sup>4</sup> , 0,55 mM Asparagin <sup>3</sup> , 0,27 mM Arginin <sup>3</sup>
<b>SKOV3ipL</b>	DMEM <sup>1</sup> , 10 % (v/v) FKS (PAN), 2 mM L-Glutamin <sup>1</sup> , 10 mM HEPES <sup>4</sup> , 0,55 mM Asparagin <sup>3</sup> , 0,27 mM Arginin <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Biochrom AG, Berlin; <sup>2</sup>PAA Gold, PAA Laboratories, Pasching; <sup>3</sup>Sigma-Aldrich, München; <sup>4</sup>Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 4.2.3 Passagieren der Zelllinien

Adhärenente Zelllinien wurden bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 80 % passagiert. Falls möglich, erfolgte das Passagieren der Zelllinien dreimal wöchentlich (Montag, Mittwoch, Freitag). Hierzu wurden die Zellen vor dem Passagieren mit PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (pH = 7,4; Biochrom AG, Berlin, Deutschland) von der Kulturschale abgelöst. Dabei wurden für eine 10 cm Schale 1 ml und für 15 cm Schalen 2 ml der Lösung verwendet. Durch "Klopfen" wurde das Ablösen der Zellen von der Kulturschale unterstützt. Anschließend wurde frisches Medium in eine neue Kulturschale vorgelegt und die Zellen entsprechend ihrem Split-Verhältnis auf der neuen Schale ausgelegt. Durch Schwenken der Kulturschale wurden die Zellen gleichmäßig verteilt.

Suspensionszellen wurden je nach Zelldichte dreimal wöchentlich passagiert (Montag, Mittwoch, Freitag). Hierzu wurde die Zellzahl pro ml Medium bestimmt und frisches Medium in eine neue Kulturflasche vorgelegt. Anschließend wurden die Zellen entsprechend ihrem Split-Verhältnis in die neue Kulturflasche überführt und durch kurzes Schwenken der Flasche verteilt.

#### **4.2.4 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden adhärente Zellen zuerst durch Behandlung mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturschale gelöst und anschließend in frischem Medium resuspendiert. 50 µl dieser Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblau-Lösung (Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland) versetzt und für 2 Minuten bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und unter dem Binokular ausgewertet. Die Trypanblau-Färbung ermöglicht die Unterscheidung von toten (blau) und lebenden Zellen. Durch das Auszählen von zwei sich diagonal gegenüberliegenden Quadraten der Zählkammer erfolgte die Bestimmung der Zellzahl. Die Anzahl der Zellen pro Quadrat entspricht 0,1 µl der Zellsuspension. Unter Miteinbeziehung der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau (1:2) muss also die Anzahl der Zellen mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert werden, um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu erhalten.

#### **4.2.5 Herstellung lentiviraler Partikel und Infektion von adhärennten Zellen**

Der *Knockdown* bzw. die Überexpression von CD63 in den verschiedenen Tumorzelllinien wurde durch das Einbringen von shRNAs gegen CD63 bzw. der cDNA von CD63 mittels lentiviraler Partikel generiert. Für die Produktion der viralen Partikel wurden  $5 \cdot 10^6$  293T Zellen auf einer 10 cm Schale ausgelegt. 24 Stunden später wurden die Zellen gewaschen und neues Medium aufgebracht. Diese Prozedur wurde drei Stunden später wiederholt. In der Zwischenzeit wurden die verschiedenen Helferplasmide für die Ko-Transfektion vorbereitet. Hierzu wurden 6,6 µg des Helferplasmids pLP1 (gag und pol), 5 µg des Helferplasmids pLP2 (Transport der transfizierten DNA in den Kern) und 3 µg des Helferplasmids pLVSVG (env-Gene) in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1,5 ml Opti-MEM Medium (ViraPower™ lentiviralen Expressionssystem, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zusammengeführt. Anschließend wurden 10 µg des entsprechenden shRNA-kodierenden Transferplasmids (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Deutschland) zugefügt. In einem weiteren

Reaktionsgefäß wurden 36 µl Lipofektamin 2000™ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit weiteren 1,5 ml Opti-MEM vermischt, für 5 Minuten bei RT inkubiert und nachfolgend mit der Plasmidlösung zusammengeführt. Die daraus resultierende Transfektionslösung wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die 293T Zellen gewaschen und 5 ml frisches Opti-MEM Medium aufgebracht. Anschließend wurde die Transfektionslösung vorsichtig auf die 293T Zellen aufgetropft. Das Transfektionsmedium wurde nach ca. 6 Stunden von den 293T Zellen abgenommen und durch frisches Medium mit 10 % FKS ersetzt. Das Virus konnte 36 Stunden später geerntet werden. Hierzu wurde das Medium vorsichtig von den 293T Zellen abgenommen und anschließend durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Um die Lipidhülle der Lentiviren nicht zu verletzen, wurde der Sterilfilter an der Innenwand des Reaktionsgefäßes angelegt. Die Lentivirussuspension wurde entweder bei -80°C gelagert oder sofort für die Infektion von Zielzellen verwendet.

Für die Infektion von adhärennten Zellen wurden die Zellen am Vortag im normalen Split-Verhältnis auf eine 6 cm Kulturschale ausgelegt. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der Zielzellen, wenn die Konfluenz der Zellen nicht größer als 50 % war. Pro 6 cm Kulturschale wurde 1 ml der Lentivirussuspension verwendet. Das Medium der Zellen wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend die Viruslösung aufgebracht. Für eine effiziente Transduktion wurden dem Medium 8 µg / ml Polybrene® (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zugesetzt. Die Zellen wurden für 2 Stunden mit dem Virusüberstand im Brutschrank inkubiert, wobei die Schale alle 30 Minuten geschwenkt wurde. Abschließend wurde die 6 cm Kulturschale mit 4 ml frischem Medium (entsprechend der infizierten Zelllinie) aufgefüllt. Nach ca. 48 Stunden wurden die Zellen gewaschen und mit der Selektion begonnen. Da die Transferplasmide eine Puromycin-Resistenz tragen, wurden die infizierten Zellen mit Puromycin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) selektiert. Als Kontrolle wurde eine nicht-transduzierte Zelllinie eingesetzt. Sobald die Schale der Kontroll-Zelllinie keine lebenden Zellen mehr zeigte, wurde die Selektion beendet. Die infizierten Zellen wurden auf 10 cm Schalen hochgesetzt und Aliquots der *Knockdown*-Zelllinien bei -80°C eingefroren.

#### **4.2.6 Bestimmung der Zellproliferation**

Die Proliferation der Tumorzellen wurde mittels AlamarBlue® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) untersucht. Hierzu wurden die Zellen in 96 Well Platten ausgelegt.

Pro Well wurden 1000 SKOV3ipL Zellen bzw. 2500 B16F10L Zellen eingesetzt und über Nacht in 90 µl frischem Medium (mit 10 % FKS) kultiviert. Am nächsten Tag wurden pro Well 10 µl AlamarBlue® zugegeben und die Zellen bei 37°C im Brutschrank für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der einzelnen Wells bei 570 nm für 0,1 Sekunden gemessen (Wallac Victor, PerkinElmer, Weiterstadt, Deutschland). Pro Zelllinie wurden  $\geq 5$  Wells ausgewertet. Die Zugabe von AlamarBlue® in frische Wells wurde 24, 48 und 72 Stunden später wiederholt. Die Absorption der einzelnen Wells wurde 1,5 Stunden später ausgewertet und die Ergebnisse auf die Absorption von zell-freiem Medium normiert.

#### **4.2.7 Viabilitätsassay**

Zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit der Tumorzellen wurde AlamarBlue® eingesetzt. Im Gegensatz zum Proliferationsassay wurden die Tumorzellen in diesem Versuch in 90 µl Medium in Anwesenheit von nur 0,5 % FKS kultiviert. Am nächsten Tag wurden pro Well 10 µl AlamarBlue® zugegeben und die Zellen bei 37°C im Brutschrank für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der einzelnen Wells bei 570 nm für 0,1 Sekunden gemessen (Wallac Victor, PerkinElmer, Weiterstadt, Deutschland). Pro Zelllinie wurden  $\geq 5$  Wells ausgewertet. Die Zugabe von AlamarBlue® in neue Wells wurde 72 Stunden später wiederholt. Die Absorption der einzelnen Wells wurde 1,5 Stunden später ausgewertet und auf die Absorption von zell-freiem Medium normiert.

#### **4.2.8 Analyse der Tumorzellmigration**

Die Migration der Tumorzellen wurde mittels Boyden Chambers untersucht. Hierzu wurden die verschiedenen Tumorzellen in die obere Kammer von Transwell®-Inserts (Corning, Kaiserslautern, Deutschland) in Medium ohne FKS ausgelegt. Für die GTL-16L, SKOV3ipL, OV-MZ-6L, und B16F10L Zellen wurden Inserts mit einer Porengröße von 8 µm, für die Eb288L Zellen Inserts mit einer Porengröße von 3 µm verwendet. Pro Inserts wurden  $2,5 \cdot 10^4$  SKOV3ipL Zellen,  $1,0 \cdot 10^4$  B16F10L Zellen,  $5,0 \cdot 10^4$  OV-MZ-6L Zellen oder  $5,0 \cdot 10^4$  GTL16L Zellen ausgesät. In die Vertiefungen einer 24 Well Platte wurde Medium mit 10 % FKS vorgelegt und die Inserts anschließend eingesetzt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden (GTL16L, SKOV3ipL, OV-MZ-6L) bzw. 16 Stunden (B16F10L) bei 37°C im Brutschrank wurden die Inserts entnommen. Nachfolgend wurde das überschüssige Medium entfernt und die Zellen von der Oberseite der Membran mittels

Wattestäbchen entfernt. Die Zellen, die an der unteren Seite der Membran adhärirten, wurden kurz mit Methanol fixiert und anschließend mit DAPI gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop. Die Anzahl der migrierten Tumorzellen wurde in 7 mikroskopischen Sichtfeldern ausgezählt. Für die Vorinkubationsexperimente mit AMD3100 wurden Eb288L Zellen für 2 Stunden mit 100 ng / ml AMD3100 inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann in die obere Kammer ausgelegt. In die untere Kammer wurde Medium mit 10 % FKS und SDF-1 (100 ng / ml, Peprotech, Hamburg) vorgelegt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Wells wie oben beschrieben analysiert.

#### **4.2.9 Analyse der Invasivität der Tumorzellen**

Die Invasion der Tumorzellen wurde durch die Verwendung von Boyden Chambers, auf die eine künstliche EZM aufgebracht war, untersucht. Hierzu werden die Inserts mit 78  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$  Matrigel<sup>®</sup> (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), einer künstlichen EZM, beschichtet. Anschließend wurden die entsprechenden Zelllinien in FKS-freiem Medium in die obere Kammer ausgelegt. Für die GTL-16L, SKOV3ipL, OV-MZ-6L und B16F10L Zellen wurden Inserts mit einer Porengröße von 8  $\mu\text{m}$ , für die Eb288L Zellen Inserts mit einer Porengröße von 3  $\mu\text{m}$  verwendet. Pro Inserts wurden  $5 \cdot 10^4$  SKOV3ipL Zellen,  $2,0 \cdot 10^4$  B16F10L Zellen oder  $1,0 \cdot 10^5$  OV-MZ-6L Zellen ausgesät. In die Vertiefungen einer 24 Well Platte wurde Medium mit 10 % FKS vorgelegt und die Inserts anschließend eingesetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden (SKOV3ipL, OV-MZ-6L, B16F10L) bei 37°C im Brutschrank wurden die Inserts entnommen. Nachfolgend wurde das überschüssige Medium entfernt und die Zellen bzw. Matrigel<sup>®</sup> an der Oberseite der Membran mittels Wattestäbchen entfernt. Die Zellen, die an der unteren Seite der Membran adhärirten, wurden kurz fixiert und anschließend mit DAPI gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop und die Anzahl der invadierten Zellen wurde in 7 mikroskopischen Sichtfeldern ausgezählt.

#### **4.2.10 Analyse des Tumorzellscatterings**

Zur Untersuchung des Scatterings der Tumorzellen wurden diese sehr dünn auf eine 6 Well Platte ausgelegt (500 Zellen pro Well). Anschließend wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Eine erste Analyse der Morphologie der Tumorzellen wurde nach ca.

6 Stunden durchgeführt. Hierzu wurden die einzelnen Tumorzellen unter dem Lichtmikroskop analysiert und zwischen kompakten und spindelförmigen Zellen unterschieden. Anschließend wurden die Zellen so lange im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis sich Kolonien ausgebildet hatten. Die Morphologie der Kolonien wurde unter dem Lichtmikroskop untersucht. Dabei wurde zwischen epithelialen (die Kolonien wiesen eine kompakte Struktur auf) und mesenchymalen Kolonien (die Kolonien bestehen aus einem losen Zellverband, aus dem sich einzelne Zellen lösen) unterschieden. Zusätzlich wurden die Auswirkungen verschiedener Inhibitoren auf das Scattering der Tumorzellen untersucht. So wurden die Tumorzell-Kolonien zwischen 24 und 48 Stunden mit dem  $\beta$ -Catenin Inhibitor Quercetin (20  $\mu$ M in DMSO; SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) oder mit DMSO als Kontrolle inkubiert und die Auswirkungen auf die Morphologie der Kolonien ausgewertet. Zusätzlich wurden die GSK-3 $\beta$  Inhibitoren SB-216763 (25  $\mu$ M in DMSO) und SB-415286 (25  $\mu$ M in DMSO; beide Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden für 24 bis 48 Stunden mit den Inhibitoren inkubiert, wobei 0,1 % (v/v) DMSO als Kontrolle verwendet wurde. Anschließend wurden die Auswirkungen der Inhibitoren auf die Morphologie der Kolonien unter dem Lichtmikroskop analysiert. Weiter wurde TGF- $\beta$ 1 (Peprotech, Hamburg, Deutschland) verwendet, das dem Kulturmedium in einer Konzentration von 2 ng / ml zugesetzt wurde. Als Kontrolle wurde PBS verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Morphologie der Tumorzellen unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

#### **4.2.11 Klonogener Assay**

Für die Bestimmung der klonogenen Aktivität der verschiedenen Tumorzelllinien wurden die Zellen sehr dünn auf eine 6 Well Platte ausgelegt (1000 Zellen pro Well). Die Zellen wurden anschließend so lange im entsprechenden Medium mit 10 % FKS bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich Kolonien gebildet hatten. Nach einer Kristallviolettffärbung wurde die Anzahl der Kolonien unter dem Binokular ausgezählt. Es wurden nur Kolonien mit einer Gesamtzellzahl  $\geq 20$  berücksichtigt. Aufgrund der Anzahl der Kolonien können Rückschlüsse auf die Stammzeleigenschaften der Tumorzellen gezogen werden. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Zellen mit Cisplatin behandelt. Hierzu wurde dem Medium 2  $\mu$ M Cisplatin (Apotheke, Klinikum rechts der Isar der TUM, Deutschland) zugesetzt und die Zellen anschließend bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis sich Kolonien



gebildet hatten. Die Anzahl der Kolonien wurde nach einer Kristallviolett-Färbung unter dem Binokular ausgewertet.

## **4.3 Adenovirale Methoden**

### **4.3.1 Adenovirale Konstrukte**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten bzw. hergestellten adenoviralen Vektoren basieren auf dem System von Bett u. a. (Bett et al., 1994). Dieses System verwendet humane Adenoviren des Serotyp 5, die aufgrund einer Deletion der E1- und E3-Region replikationsdefizient sind. Die Vermehrung dieser Viren ist damit nur in Zellen möglich, die die E1-Region *in trans* zur Verfügung stellen. Die HEK-293 Zellen tragen die E1-Region und sind somit zur Produktion der Adenoviren geeignet (Amalfitano et al., 1998).

#### **4.3.1.1 Addl70-3**

Dieses Viruskonstrukt enthält kein Transgen und wurde aus diesem Grund in allen Versuchen als Kontrolle verwendet (Bett et al., 1994). Dieses Virus wurde freundlicherweise von Dr. Marina Anton (IEOT, Klinikum rechts der Isar der TUM, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

#### **4.3.1.2 AdTIMP-1**

Dieses Virus kodiert die cDNA-Sequenz von humanem TIMP-1, die an die Stelle der viralen E1-Region kloniert wurde. Die Expression des Transgens wird durch den Promotor des humanen Cytomegalievirus (CMV) kontrolliert. Dieses Virus wurde von Dr. Charlotte Kopitz im Rahmen ihrer Doktorarbeit generiert und charakterisiert (Kopitz et al., 2007).

#### **4.3.1.3 AdNTIMP-1**

Dieses Virus kodiert die cDNA-Sequenz von humanem NTIMP-1, die an die Stelle der viralen E1-Region kloniert wurde. Die Expression des Transgens wird durch den Promotor des humanen Cytomegalievirus (CMV) kontrolliert. Dieses Virus wurde von Dr. Charlotte Kopitz im Rahmen ihrer Doktorarbeit generiert und charakterisiert (Kopitz et al., 2007).

#### **4.3.1.4 AdTIMP-1/T2G**

Dieses Virus wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit kloniert (in Zusammenarbeit mit K. Honert und Can Gülersönmez, beide IEOT, Klinikum rechts der Isar der TUM). Dieses Virus kodiert die cDNA-Sequenz von humanem TIMP-1/T2G (Brew et al., 2000; Meng et al., 1999), die an die Stelle der viralen E1-Region kloniert wurde. Die cDNA-Sequenz wurde freundlicherweise von Prof. Murphy (Cambridge, England) zur Verfügung gestellt.

#### **4.3.1.5 AdNTIMP-1/T2G**

Dieses Virus wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit kloniert (in Zusammenarbeit mit K. Honert und Can Gülersönmez, beide IEOT, Klinikum rechts der Isar der TUM, Deutschland). Dieses Virus kodiert die cDNA-Sequenz von humanem NTIMP-1/T2G (Brew et al., 2000; Meng et al., 1999), die an die Stelle der viralen E1-Region kloniert wurde. Die cDNA-Sequenz wurde freundlicherweise von Prof. Murphy (Cambridge, England) zur Verfügung gestellt.

#### **4.3.1.6 AdshNT**

Dieses Adenovirus kodiert für eine shRNA-Sequenz die gegen keine mRNA gerichtet ist und dient somit als Kontrolle für andere shRNA-kodierende Adenoviren. Die Expression der shNT-Sequenz wird vom humanen U6-Promotor reguliert. Das Virus wurde von Sirion (Sirion Biotech, Martinsried, Deutschland) käuflich erworben. Die Viren wurden amplifiziert und anschließend *in vitro* getestet (keine Veränderung der CD63-Expression, Daten nicht gezeigt).

#### **4.3.1.7 AdshCD63**

Dieses Adenovirus kodiert für eine shRNA-Sequenz, die gegen murines CD63 gerichtet ist. Die Expression wird dabei vom humanen U6-Promotor reguliert. Das Virus wurde von Sirion (Sirion Biotech, Martinsried) käuflich erworben. Die Viren wurden amplifiziert und anschließend die *Knockdown*-Effizienz *in vitro* getestet (*Knockdown* ca. 90 %, Daten nicht gezeigt).

### 4.3.2 Amplifikation von Adenoviren

Die Amplifikation der Adenoviren wurde nach Hitt u. a. durchgeführt (Graham and Prevec, 1995). Für die Amplifikation der adenoviralen Vektoren wurden HEK-293 Zellen verwendet. Die Zellen wurden auf 15 cm Zellkulturschalen (zwischen 30 und 50) ausgelegt und bei einer Konfluenz von ca. 60 % bis 70 % mit einer MOI (engl. *multiplicity of infection*) infiziert. Hierzu wurden die Zellen einer 15 cm Schale abgelöst und ausgezählt. Die passende Anzahl der viralen Partikel wurde in PBS<sup>2+</sup> resuspendiert und pro Schale 2 ml der Virussuspension zugegeben. Die Schalen wurden anschließend für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, wobei die Schalen nach 15 Minuten geschwenkt wurden. Weiter wurden die Schalen mit 20 ml Medium (2 % FKS (v/v)) aufgefüllt. Die Amplifikation der Viren wurde unter dem Binokular verfolgt und sobald alle Zellen den zytopathischen Effekt (CPE, engl. *cytopathic effect*) zeigten, wurden die Viren geerntet. Hierzu wurde der Zellüberstand abgenommen und in Reaktionsgefäßen gesammelt. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in die Reaktionsgefäße gefüllt. Nach einer Zentrifugation bei 20°C und 1000 x g für 20 Minuten wurde der Überstand verworfen und die Pellets in 0,1 M Tris / HCl (pH = 8,0) aufgenommen (0,5 ml pro eingesetzter 15 cm Zellkulturschale). Dieser "crude-Stock" wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

### 4.3.3 Aufreinigung von Adenoviren

Für die Aufreinigung der Adenoviren aus dem "crude-Stock" wurde zuerst das Volumen bestimmt, die Virussuspension mit der entsprechenden Menge (10 % (v/v)) einer 5 %-igen Natriumdeoxycholatlösung vermischt und für 45 Minuten bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden der Suspension sowohl MgCl<sub>2</sub> (44,5 µl pro 4,5 ml "crude-Stock") als auch DNase I-Lösung (22,5 µl pro 4,5 ml "crude-Stock"; DNase I-Lösung = 100 mg bovine Pankreas-DNase in 10 ml 20 mM Tris pH 7,4, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 50% Glycerin) zugesetzt und bei 37°C für 60 Minuten im Wasserbad inkubiert. Während der Inkubation wurde die Viskosität der Lösung mehrmals überprüft. Falls die Viskosität schon vor Ablauf der 60 Minuten ähnlich wie Wasser war, wurde mit dem nächsten Schritt begonnen. Hierzu wurde die Virussuspension für 15 Minuten bei 5°C und 2000 x g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden Cäsiumchloridlösungen mit unterschiedlicher Dichte (1,5 g/ml = 90,8 g CsCl (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 109,2 g 10 mM-Tris pH 8,0; 1,35 g/ml = 70,4 g CsCl, 129,6 g 10 mM-Tris pH 8,0; 1,25 g/ml = 54,0 g CsCl,

146,0 g 10 mM-Tris pH 8,0) hergestellt und aus diesen CsCl-Lösungen ein Gradient gegossen. Hierzu wurden 3 ml der 1,5 g / ml Lösung in ein Röhrchen vorgelegt und zuerst mit 10 ml der 1,35 g / ml Lösung und dann mit 10 ml der 1,25 g / ml-Lösung überschichtet. Nach der Zentrifugation wurde der Virusüberstand abgenommen und auf den fertigen Dichtegradienten gegeben. Anschließend wurden die Röhrchen austariert und für 2 Stunden bei 10°C und 68198 x g zentrifugiert (langsame Beschleunigung und keine Bremse). Die Röhrchen wurden aus den Buckets entnommen und die Bande, die sich am Übergang der 1,25 g / ml und der 1,35 g / ml Schicht gebildet hatte, wurde durch Punktion des Röhrchens entnommen. Im nächsten Schritt wurde die Virussuspension in ein Zentrifugationsröhrchen vorgelegt, das Röhrchen mit der 1,35 g / ml CsCl-Lösung aufgefüllt und für ca. 20 Stunden bei 10°C und 68198 x g zentrifugiert (langsame Beschleunigung und keine Bremse). Nach der Zentrifugation wurde das Röhrchen erneut mit einer Kanüle punktiert und die Virusbande abgenommen. Um die Viren in der Zellkultur bzw. *in vivo* verwenden zu können, erfolgte anschließend eine Dialyse. Hierzu wurde die Virussuspension mit Hilfe einer Kanüle in eine Dialysekammer (Cutoff 10 kDa; Slide-A-Lyzer, Pierce, Rockford, USA) gefüllt und gegen 10 mM Tris/HCl (pH = 8,0) dialysiert. Der Puffer wurde während der Dialyse (gesamt ca. 20 Stunden) mindestens 5 x ausgetauscht. Abschließend wurde die Virussuspension aus der Dialysekammer entnommen, mit 5 % Glycerin (AppliChem, Darmstadt) versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **4.3.4 Titration der verschiedenen Adenoviren**

Die Titration der aufgereinigten Adenoviren wurde auf einer 96 Well-Platte durchgeführt. Hierzu wurden in die einzelnen Kavitäten  $2,0 \cdot 10^4$  HEK-293 Zellen ausgelegt. Am nächsten Morgen wurden zwei unabhängige Verdünnungsreihen der Virensuspension hergestellt (von  $10^{-1}$  bis  $10^{-14}$ ) und 100 µl der Lösung pro Kavität ausgebracht. Pro Verdünnungsschritt wurden 10 Wells infiziert. Die Ausbildung von Plaques (Lyse der Zellen, verursacht durch die Infektion eines Viruspartikels) wurde über 14 Tage beobachtet. Abschließend wurden die Plaques ausgezählt und die pfu (engl. *plaque forming units*) der verschiedenen Adenoviren berechnet.

## 4.4 Molekularbiologische Methoden

### 4.4.1 Der Bakterienstamm TOP10

Genotyp: *mcrA*,  $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ ,  $\Phi 80lacZ(\text{del})M15$ ,  $\Delta lacX74$ , *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta(ara\text{-}leu)7697$ , *galU*, *galK*, *rpsL(SmR)*, *endA1*, *nupG*

Dieser Bakterienstamm wurde von Invitrogen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) käuflich erworben, da er sich besonders für die Transformation unmethylierter DNA eignet. Dieser Bakterienstamm wurde in der vorliegenden Arbeit für die Amplifikation aller Plasmide verwendet.

### 4.4.2 Verwendete Plasmide

Die cDNA Sequenz von CD63 wurde aus SKOV3ipL Zellen isoliert. Der erste DNA-Strang wurde hierbei durch eine PCR mit Oligo(d)T Primern generiert. Nachfolgend wurde die RNA mittels Zugabe von RNase verdaut. Die Synthese des zweiten DNA-Strangs erfolgte durch die Verwendung von spezifischen Primern (Left: CTGTTACCGCGTCACATGAG; Right: CAAACTCAGACCATCTCTTTTCG). Weiter wurde die cDNA in den Vektor pBSKSII (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Martina Anton, IEOT, Klinikum Rechts der Isar der TUM) kloniert (Abbildung 4.6). Die cDNA-Sequenz von CD63 wurde abschließend mittels einer Sequenzierung validiert (Daten nicht gezeigt).

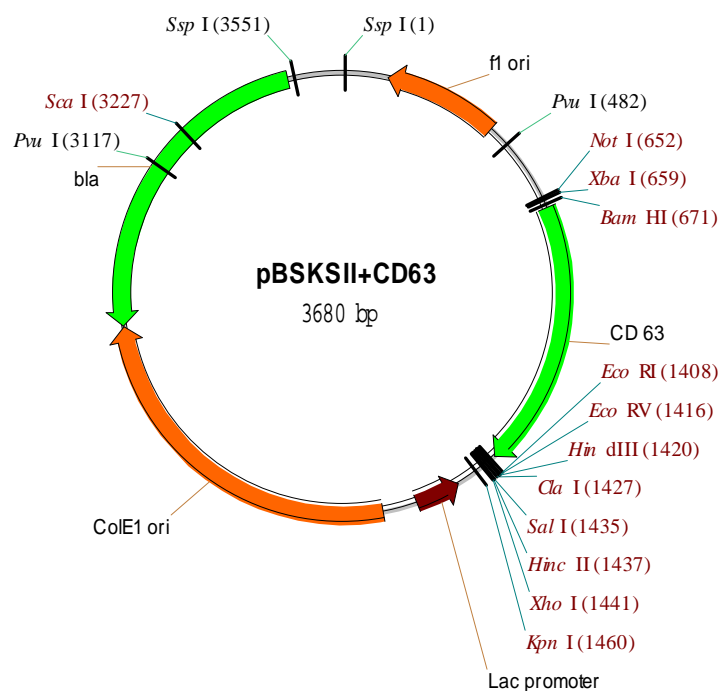


Abbildung 4.7: cDNA von CD63 in Vektor pBSKSII

Nachfolgend wurde die CD63 cDNA in die beiden Vektoren pHIV-7\_SSFF oder pHIV-7\_PGK (Abbildung 4.7 beide freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Martina Anton, IEOT, Klinikum rechts der Isar der TUM; (Schambach et al., 2006)) kloniert. Bei diesen Vektoren handelt es sich um Transferplasmide, die bei der Herstellung lentiviraler Vektoren verwendet werden können (s. 4.2.5).

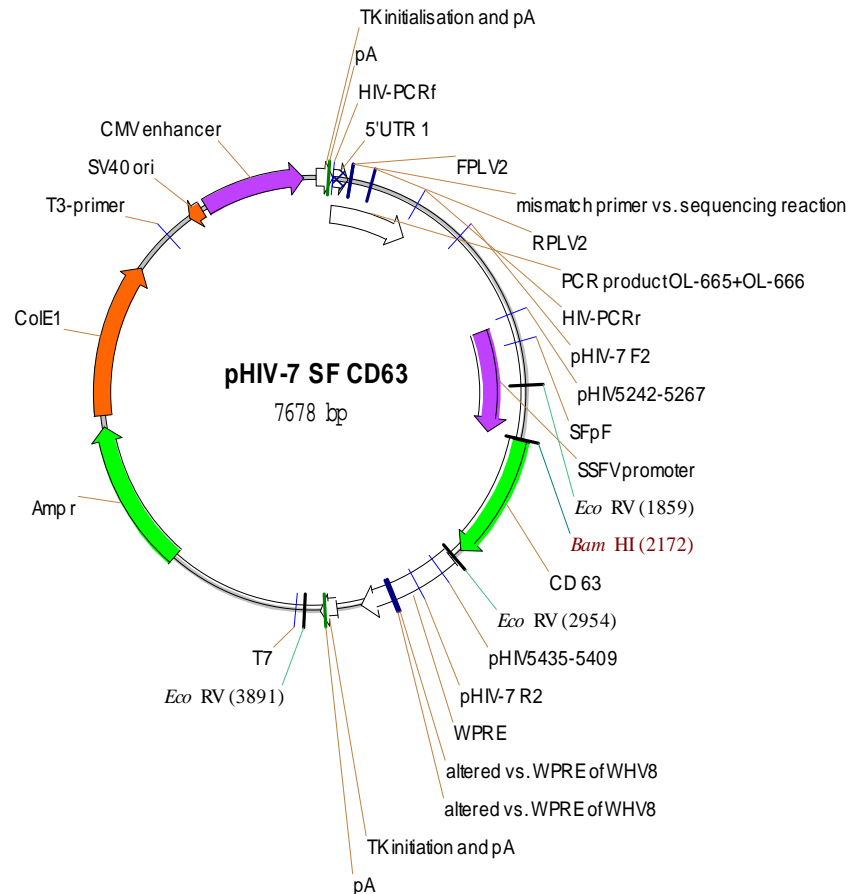


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung des pHIV-7\_SSFF\_CD63 Plasmids

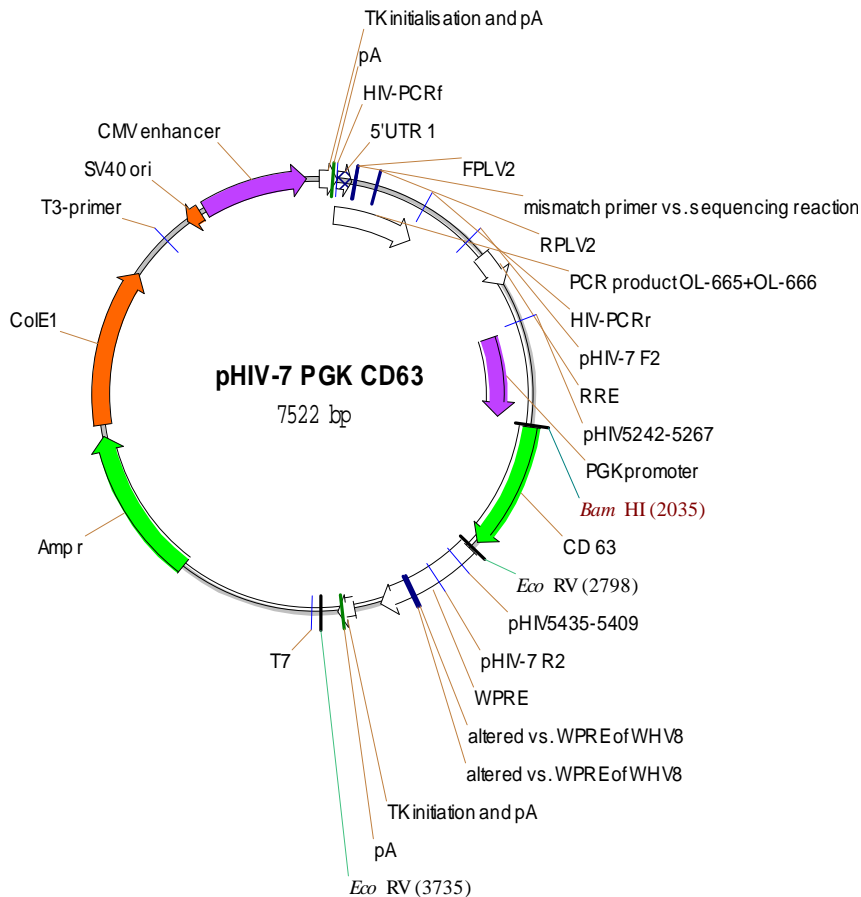


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung des pHIV-7\_PGK\_CD63 Plasmids

#### 4.4.3 Transformation von Bakterien

Für eine Transformation wurden 100 ng des entsprechenden Plasmids in 50 µl Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 50 µl kompetente TOP10 auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid-DNA vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Weiter wurden die Transformationsansätze in einem Heatblock für 90 Sekunden bei 42°C erhitzt und im Anschluss für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden dem Transformationsansatz 900 µl frisches LB-Medium (Bacto Tryptone 10 g / l, Bacto Yeast Extract 5 g / l, NaCl 5 g / l (Bacto Agar 15 g/l (nur für Kulturplatten) mit 5 M NaOH auf pH 7,5 einstellen)) zugesetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Weiter wurden zwischen 50 und 200 µl der Flüssigkultur auf LB-Platten ausplattiert. Die LB-Platten waren mit 100 µg / ml Ampicillin (Sigma GmbH, Deisenhofen) versetzt. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### 4.4.4 Selektion und Kultivierung *E. coli* TOP10

Die Selektion der Bakterien erfolgte durch Ampicillin. Entweder wurde das Antibiotikum frisch zum Flüssigmedium zugegeben oder vor dem Gießen der LB-Platten zugegeben. Die Endkonzentration lag bei beiden Methoden bei 100 µg / ml.

Die Bakterien wurden amplifiziert, indem eine 200 µl Pipettenspitze kurz in eine Einzelkolonie getaucht und anschließend in ein Kulturröhrchen mit 4 ml frischen LB-Medium gegeben wurde. Die Bakterien wurden für ca. 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend wurde mit der Vorkultur ein Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium angeimpft. Die Bakterien wurden über Nacht in einem Schüttel-Inkubator (*Series25 Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific Inc., New Jersey, USA) inkubiert.

#### 4.4.5 DNA-Maxipräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Plasmid Purification Kit der Firma Qiagen (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Hierzu wurden zwischen 250 bis 500 ml der entsprechenden Bakterienkultur eingesetzt und streng nach Protokoll des Herstellers vorgegangen. Das DNA-Pellet wurde in 100 bis 250 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 4.4.6 RNA-Präparation

Die RNA von Zellen wurde durch die Verwendung von TRIZOL isoliert. Hierzu wurde die entsprechende adhärente Zelllinie auf 10 cm Schalen ausgesät ( $5,0 \cdot 10^5$  SKOV3ipL und OV-MZ-6L,  $1,0 \cdot 10^6$  B16F10L und GTL-16L). Nach einer Inkubation der Zellen für ca. 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen 2 x mit kaltem PBS gewaschen. Nachfolgend wurde den Zellkulturschalen 1 ml TRIZOL zugefügt, kurz geschwenkt und die Zellen für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Schaber abgekratzt und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C in einem neuen Reaktionsgefäß gelagert. Der Trizol-Suspension wurden 200 µl Chloroform (Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland) zugesetzt, invertiert, für 15 Sekunden gevortext und anschließend für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde die Suspension bei 4°C und 15900 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl Isopropanol (Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) in neue Reaktionsgefäße vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde die obere, farblose Phase vorsichtig abgenommen und in die Reaktionsgefäße mit Isopropanol gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden invertiert, kurz



gevoertext und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Suspension wurde bei 4°C und 15900 x g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Dem Pellet wurde 1 ml 80 % (V/V) Ethanol (zur Analyse, > 99,9 %, Merck GmbH Schwalbach) zugesetzt und erneut bei 4°C und 5400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet für 10 Minuten getrocknet und je nach Pelletgröße zwischen 10 bis 50 µl RNase-freies Wasser zugefügt. Die RNA-Menge wurde per Spektralphotometer bestimmt und die Qualität der RNA-Aufreinigung durch eine Agarosegelelektrophorese bestimmt. Die RNA aus Gewebestücken wurde mittels des *PureYield RNA Midiprep System*<sup>TM</sup> (Promega, Mannheim, Deutschland; Leber) oder des *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland; Lunge) extrahiert. Bei beiden Systemen erfolgte die RNA-Aufreinigung folgend auf eine Homogenisierung des Gewebes durch einen Ultraturrax T25 (Janke & Kunkel; IKA Labortechnik, Deutschland). Die RNA-Aufreinigung mittels des *PureYield RNA Midiprep System*<sup>TM</sup> erfolgte nach Vakuumprotokoll, während die Aufreinigung mittels des *RNeasy Plus Mini Kit* nach Standardprotokoll durchgeführt wurde. Die RNA-Menge wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt (s. 4.4.7) und die Qualität der RNA mittels einer Agarosegelelektrophorese (s. 4.4.8) validiert.

#### 4.4.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der verschiedenen RNA- und DNA-Lösungen wurde mittels einer spektralphotometrischen Messung bestimmt. Hierzu wurden die einzelnen Proben 1:100 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Nachfolgend wurden die Proben in eine 100 µl Quarzglas-Küvette gefüllt und die Absorption der Proben bei 260 und 280 nm bestimmt. Über folgende Formeln kann aus diesen Werten die Konzentration der Proben abgeleitet werden:

RNA/DNA Konzentration:

$$c[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = OD_{260} \cdot 40 \text{ (RNA) oder } 50 \text{ (DNA)} \cdot 100 \text{ (Verdünnungsfaktor)} / 1000$$

Die Reinheit der Proben kann über den Quotienten aus OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> abgeleitet werden. Der Quotient sollte nicht unterhalb von 1,5 und nicht oberhalb von 2,5 liegen.

#### 4.4.8 Agarosegelelektrophorese

Die Qualität der RNA wurde über eine Agarosegelelektrophorese untersucht, um mögliche Verunreinigungen durch DNA oder eine Degradation der Proben auszuschließen. Hierzu wurden die RNA-Proben für 10 Minuten bei 65°C erhitzt (Zerstörung der Sekundärstruktur

der RNA) und anschließend über zwei Verdünnungsschritte auf 0,1 µg / µl eingestellt. In der Zwischenzeit wurde ein 1 %iges Agarosegel (Peq Gold Universal Agarose PeqLab, Erlangen, Deutschland) in TAE (Tris-Acetat-EDTA) -Puffer gegossen. Unmittelbar vor dem Gießen der Gele wurde der Agaroselösung 2 µl Ethidiumbromid (Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland) pro 80 ml Agaroselösung zugesetzt. 10µl der RNA-Lösung wurden mit 2 µl 6 x RNA-Ladepuffer versetzt und anschließend in die Tasche des Gels geladen. Die Auswertung der Gelelektrophorese erfolgte an einer UV-Imagestation. Konnte das typische 3 Bandenmuster (verursacht durch die ribosomale RNA) beobachtet werden, so wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 4.4.9 Reverse Transkription

Nur RNA-Proben die in der Agarosegelelektrophorese keine Verunreinigungen und keine Degradation zeigten, wurden für die Reverse Transkription verwendet. Für die Reverse Transkription wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Das Kit wurde wie folgt eingesetzt:

<i>Reagenz</i>	<i>Menge pro Reaktion</i>
<i>10 x RT-Puffer</i>	<i>2,0 µl</i>
<i>24 x dNTP-Mix (Konz. 100 mM)</i>	<i>0,8 µl</i>
<i>RNase Inhibitor</i>	<i>1,0 µl</i>
<i>10 x RT-random primers</i>	<i>2,0 µl</i>
<i>Multiscribe Reverse Transkriptase</i>	<i>1,0 µl</i>
<i>Nukleasefreies Wasser</i>	<i>3,2 µl</i>

Um während der Reaktion die gleichen Bedingungen für alle Proben zu gewährleisten, wurde ein Mastermix hergestellt. Die reverse Transkription wurde in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde folgendes Programm verwendet:

<i>Schritt 1:</i>	<i>25°C, 10 Minuten</i>
<i>Schritt 2:</i>	<i>37°C, 120 Minuten</i>
<i>Schritt 3:</i>	<i>85°C, 5 Sekunden</i>
<i>Schritt 4:</i>	<i>4°C, bis zur Entnahme der Proben</i>

#### 4.4.10 Quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion (TaqMan®-Analyse)

Die Expression verschiedener Gene wurde durch Verwendung der Real-time PCR analysiert. Diese Methode basiert auf einer Sonde, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM oder VIC) und einem Quencher (TAMRA) markiert ist und spezifisch an die cDNA eines bestimmten Gens bindet. In diesem Zustand unterdrückt der Quencher das Fluoreszenzsignal der Sonde. Im Verlauf der Reaktion wird die Sonde durch die DNA-Polymerase abgebaut und somit der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt. Dies führt zu einem spezifischen Fluoreszenzsignal, das proportional zur cDNA-Menge ist und somit nachfolgend die Quantifizierung der Expression des untersuchten Gens ermöglicht.

Für die Primer und die Sonden, die von Applied Biosystems bezogen (lacZ, MMP-2, MMP-9, 18S rRNA) wurden, wurde die RNA vor Versuchsbeginn 1:100 (zu untersuchendes Gen) und 1:500 (18S rRNA) in nukleasefreiem ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wurden in die Vertiefungen einer 96-Opti-Well-Platt (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) 10 µl der entsprechenden Verdünnung pipettiert. Sowohl die 18S rRNA als auch die Messung des entsprechenden Gens wurde in Triplets durchgeführt. Als Negativkontrolle (NTC = engl. *non template controls*) wurden 10 µl nukleasefreies Wasser eingesetzt. Sollte in diesen Kavitäten ein Signal gemessen werden, wurde die Messung verworfen, da das Signal wahrscheinlich durch eine Verunreinigung der Proben verursacht wurde. Die cDNA wurde in die einzelnen Wells vorgelegt und folgende Reagenzien zugefügt:

<i>Reagenzien</i>	<i>Menge pro Well</i>
<i>Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt)</i>	<i>12,5 µl</i>
<i>Primer-Sonde-Mix (Applied Biosystems, Darmstadt)</i>	<i>1,25 µl</i>
<i>Nukleasefreies ddH<sub>2</sub>O (Gibco GmbH, Karlsruhe)</i>	<i>1,25 µl</i>

Aus diesen drei Komponenten wurde ein Mastermix hergestellt. Mit Hilfe einer Multipette wurden pro Kavität 15 µl zu den 10 µl RNA-Lösung zugefügt. Die 96-Opti-Well-Platte wurde mit einer Folie (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) versiegelt. Zur Entfernung von Luftblasen bzw. um zu gewährleisten, dass sich die Lösung im unteren Teil des Wells befindet, wurde die 96-Opti-Well-Platte kurz zentrifugiert. Die Messung der Platten erfolgte an ABI PRISM 7900HT TaqMan™-Gerät (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und die Ergebnisse wurden mit Hilfe der SDS 2.2 Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) ausgewertet. Bei der Auswertung wurde die Expression des entsprechenden Gens auf 18S rRNA normiert.

Neben den Primern bzw. Sonden von Applied Biosystems wurde auch die ProbeLibrary (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) verwendet. In diesem Kit werden die Primer, die die Sonde flankieren, mit Hilfe der ProbeFinder Software der Universal ProbeLibrary (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) designt. Die Primer wurden anschließend bei Metabion (Metabion GmbH, Martinsried, Deutschland) käuflich erworben. 10 µl der RNA-Lösung wurden in die Kavitäten einer 96-Opzi-Well-Platte pipettiert und folgende Komponenten zugesetzt:

<i>Reagenz</i>	<i>Menge pro Well</i>
<i>Primer 1 (Konz. 100 µM)</i>	<i>0,25 µl</i>
<i>Primer 2 (Konz. 100 µM)</i>	<i>0,25 µl</i>
<i>Sonde</i>	<i>0,25 µl</i>
<i>Mastermix (Roche Applied Science, Penzberg)</i>	<i>12,5 µl</i>
<i>Nukleasefreies ddH<sub>2</sub>O</i>	<i>1,75 µl</i>

Aus diesen Reagenzien wurde ein Mastermix hergestellt, der mit Hilfe einer Multipette (15 µl pro Well) in die entsprechenden Kavitäten, zu den vorgelegten 10 µl RNA pipettiert wurde. Die 18S rRNA Messung erfolgte wie oben beschrieben.

Für die Quantifizierung der miR-144 und U6 snRNP Expression wurde das Applied Biosystems *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet und nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

## 4.5 Proteinbiochemische Methoden

### 4.5.1 Proteinisolation

Für die Isolation von Protein aus Zellen wurde der *Cell Lysis Buffer* (Cell Signaling, Danvers, USA) verwendet. Dazu wurde die entsprechende Zelllinie auf eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät und für 24 bis 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden dem *Cell Lysis Buffer* 1 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zugesetzt und pro Schale wurden 400 µl des *Cell Lysis Buffers* zugegeben. Die Zellen wurden 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit einem Schaber von der Platte gekratzt und für 10 bis 30 Sekunden im Ultraschallbad bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden die Zelllysate bei 15800 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde nach der BCA-Methode bestimmt. Dazu wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce, Schwerte, Deutschland) verwendet und nach den Herstellerangaben durchgeführt. Je nach Proteinkonzentration wurden die Proben zwischen 1:10 und 1:50 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde eine Eichgerade erstellt. Hierzu wurden verschiedenen Verdünnungen von bovinem Serumalbumin (BSA, Applichem, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt (von 2 µg / ml bis 0,0625 µg / ml). Die Messungen der Proben erfolgte in Triplets.

### 4.5.3 Westernblot

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurden pro Tasche zwischen 10 und 75 µg Protein aufgetragen. Hierzu wurde die entsprechende Proteinmenge in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und je nach Volumen die entsprechende Menge Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) zugefügt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert und auf Eis gelagert. Die Proteinproben wurden in 10 %igen SDS (Natriumdodecylsulfat; Sigma-Aldrich, Deutschland) -Gelen aufgetrennt. Hierzu wurden folgende Komponenten gemischt und anschließend in Gelkassetten (Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning, Deutschland) mit einem Abstand von 1,5 mm gegossen, um das Trenngel zu bilden.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge pro Gel</i>
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	<i>5 ml</i>
<i>Polyacrylamid (40 %m 29:1, Applichem, Darmstadt)</i>	<i>5 ml</i>
<i>1,5 M Tris (pH = 8,6; 0,4 % SDS)</i>	<i>5 ml</i>
<i>APS (Ammoniumpersulfat, 10 % (w/v), Sigma, Deisenhofen)</i>	<i>115 µl</i>
<i>TEMED (Sigma, Deisenhofen)</i>	<i>30 µl</i>

Nachfolgend wurde das Sammelgel gegossen, Dazu wurden die folgenden Reagenzien vermischt und mit der Suspension die Trenngele überschichtet.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge pro Gel</i>
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	<i>3,05 ml</i>
<i>Polyacrylamid (40 %m 29:1, Applichem, Darmstadt)</i>	<i>0,6125 ml</i>
<i>1,5 M Tris (pH = 6,8; 0,4 % SDS)</i>	<i>1,25 ml</i>
<i>APS (Ammoniumpersulfat, 10 % (w/v), Sigma, Deisenhofen)</i>	<i>50 µl</i>
<i>TEMED (Sigma, Deisenhofen)</i>	<i>10 µl</i>

Nach dem Befüllen der Glaskassetten wurden die Kämme eingesetzt. Dies führt zur Ausbildung der Taschen die das anschließende Beladen der Gele ermöglichen. Nach dem Auspolymerisieren wurden die Gele entweder sofort verwendet oder maximal für zwei Wochen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

In die Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning, Deutschland) wurden zwei SDS-Gele eingesetzt und die Kammer mit 1 x Gelelektrophoresepuffer (10 x Gelelektrophoresepuffer: 30,3 g Tris-Base, 144,2 g Glycin, 10 g, add a 1 l ddH<sub>2</sub>O) befüllt. Neben den Proteinproben wurde pro Gel auch in eine Tasche 5 µl eines Markers (PageRuler™, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen. Die Proteine wurde bei 40 bis 80 mA / pro Gelelektrophoresekammer aufgetrennt, wobei die Elektrophorese gestoppt wurde, sobald die Lauffront aus dem SDS-Gel gelaufen war. In der Zwischenzeit wurden alle Komponenten für das Blotten des SDS-Gels vorbereitet. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran (Amersham, Braunschweig, Deutschland) auf die entsprechende Größe zugeschnitten und in Blottingpuffer (Tris-Base 3 g, Glycin 11,25 g, Methanol 10 % (v/v), Mit ddH<sub>2</sub>O auf einen Liter auffüllen) inkubiert. Zusätzlich wurde *Bio-Rad extra thick blot absorbent filter paper* (Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning, Deutschland) auf die entsprechende Größe zugeschnitten und in Blottingpuffer inkubiert. Die jeweilige Inkubationszeit war > 10 Minuten. Anschließend wurde auf die Anode des Blottinggeräts (*Trans-Blot SD cell*, Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning, Deutschland) ein *Bio-Rad extra thick blot absorbent filter paper* aufgelegt und nachfolgend die Nitrozellulosemembran. Auf die Membran wurde das SDS-Gel platziert und das Gel mit einem weiteren *Bio-Rad extra thick blot absorbent filter paper* bedeckt. Nachdem die Kathode auf das *Bio-Rad extra thick blot absorbent filter paper* gesetzt wurde, erfolgte der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran bei 15 V für ca. 75 Minuten pro Gel. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde durch eine Ponceau S Färbung validiert. Waren keine Luftblasen bzw. Stellen an denen kein Transfer der Proteine stattgefunden hatte zu sehen, so wurde die Membran 4 x mit 1 x TBS-T gewaschen. Anschließend wurden die freien Proteinbindestellen der Membran durch eine Inkubation mit einer 5 %igen BSA-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in TBS-T für 60 Minuten bei RT blockiert. Die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden Antikörper erfolgte in 5 % BSA über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurde die Membran 4 x mit 1 x TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, an den eine Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) gekoppelt war, in 5 % BSA für 120 Minuten bei RT inkubiert und nachfolgend

wurden die nicht gebundenen Sekundärantikörper durch 4 maliges Waschen der Membran mit 1 x TBS-T entfernt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch die Inkubation der Membran mit dem *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning, Deutschland). Die Zugabe des ECL Substrats führt zu einer Chemilumineszenz, die mit Hilfe des *ChemiDoc™ MP Imaging System* (Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning, Deutschland) detektiert wurde. Folgende Primärantikörper wurden zur Detektion verwendet: E-cadherin, N-cadherin, Snail, Slug, GSK3 $\alpha\beta$ , und PI3K110 $\alpha$  wurden von Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland) käuflich erworben. Die Antikörper gegen GSK3 $\beta$ , p-GSK3 $\beta$ , AKT, p-AKT und CD63 wurden von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland). Der Primärantikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin wurde von Calbiochem Immunochemicals (Darmstadt, Deutschland) käuflich erworben.

#### **4.5.4 Humaner phospho-Kinase Array**

Das Phosphorylierungsprofil von verschiedenen Kinasen wurde durch die Verwendung des Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) untersucht. Dabei wurde streng nach Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die Detektion wurde an einer Kodak Imagestation (440 CF) durchgeführt. Die entsprechenden Zelllysate wurden wie unter 4.5.1 beschrieben hergestellt. Die Membranen wurden über Nacht mit den entsprechenden Proteinlysaten inkubiert. Anschließend wurden die Membranen gewaschen und mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) inkubiert. Die Detektion wurde durch die Zugabe von Lumi-light (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) durchgeführt.

#### **4.5.5 Panorama® Antibody Microarray**

Für die Analyse des intrazellulären Signalings wurde ein *Panorama® Antibody Microarray - Cell Signaling Kit* (Sigma Aldrich, München, Deutschland) verwendet. Es wurde nach Anweisungen des Herstellers vorgegangen. Die Markierung der entsprechenden Zelllysate wurde durch eine Inkubation mit Cy3 or Cy5 (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) erreicht. Nur bei einem Farbstoff-zu-Protein-Verhältnis von  $\geq 6$  wurden die Zelllysate für die Analyse verwendet. Die Daten wurden auf  $\beta$ -Aktin normalisiert.

### 4.5.6 Immunzytochemische Färbungen

Für den immunzytochemischen Nachweis von Proteinen wurden 13 mm Coverslips (Thomas Scientific, Swedesboro, USA) für 5 Minuten in 80 % Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Coverslips in die Vertiefungen einer 24-Well Platte gelegt (unter der Zellkulturhood), wobei der Deckel offen war, um das überschüssige Ethanol verdampfen zu lassen. Anschließend wurde die entsprechende Zelllinie auf die Coverslips ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in 4 % Paraformaldehyd (in PBS, pH = 7,4) für eine Stunde bei RT fixiert, 2 x mit PBS und anschließend 1 x mit IFF (PBS mit 1 % BSA und 2 % FKS) gewaschen. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten bei RT in 0,5 % Triton-X-100 (in PBS, pH = 7,4) permeabilisiert und anschließend erneut 2 x mit PBS und 1 x mit IFF gewaschen. Die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper (in IFF verdünnt) erfolgte für 60 Minuten bei RT. Anschließend wurden die Zellen 3 x für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (verdünnt in IFF), der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war (Alexa-488 oder Alexa-594, beide Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), für 45 Minuten bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde der überschüssige Sekundärantikörper durch 3 maliges Waschen mit PBS entfernt. Danach wurden die Zellen mit Phalloidin (Rhodamin oder Alexa-488, Invitrogen/ Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) markiert und mit DAPI (verdünnt in PBS) für 10 Minuten bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die Coverslips kurz in ddH<sub>2</sub>O eingetaucht, 10 µl *Vectashield* aufgetragen, auf einen SuperFrost™ Objektträger gelegt und mit Nagellack eingedeckelt. Die gefärbten Zellen wurden entweder direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop (AxioVert 135, Carl Zeiss, Jena Deutschland; Software AxioVision LE 4.2, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bzw. konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Modell: TCS-SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland oder Model: LSM 700, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet oder bei -20°C gelagert. Für die Bildbearbeitung wurde die Zen 2011 Software (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet.

## 4.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung von Zwei-Gruppen-Experimenten erfolgte für normalverteilte Werte mit Hilfe des *Student's t*-Test. Folgten die Werte nicht einer Normalverteilung, wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test angewendet. Bei Experimenten mit drei oder mehr

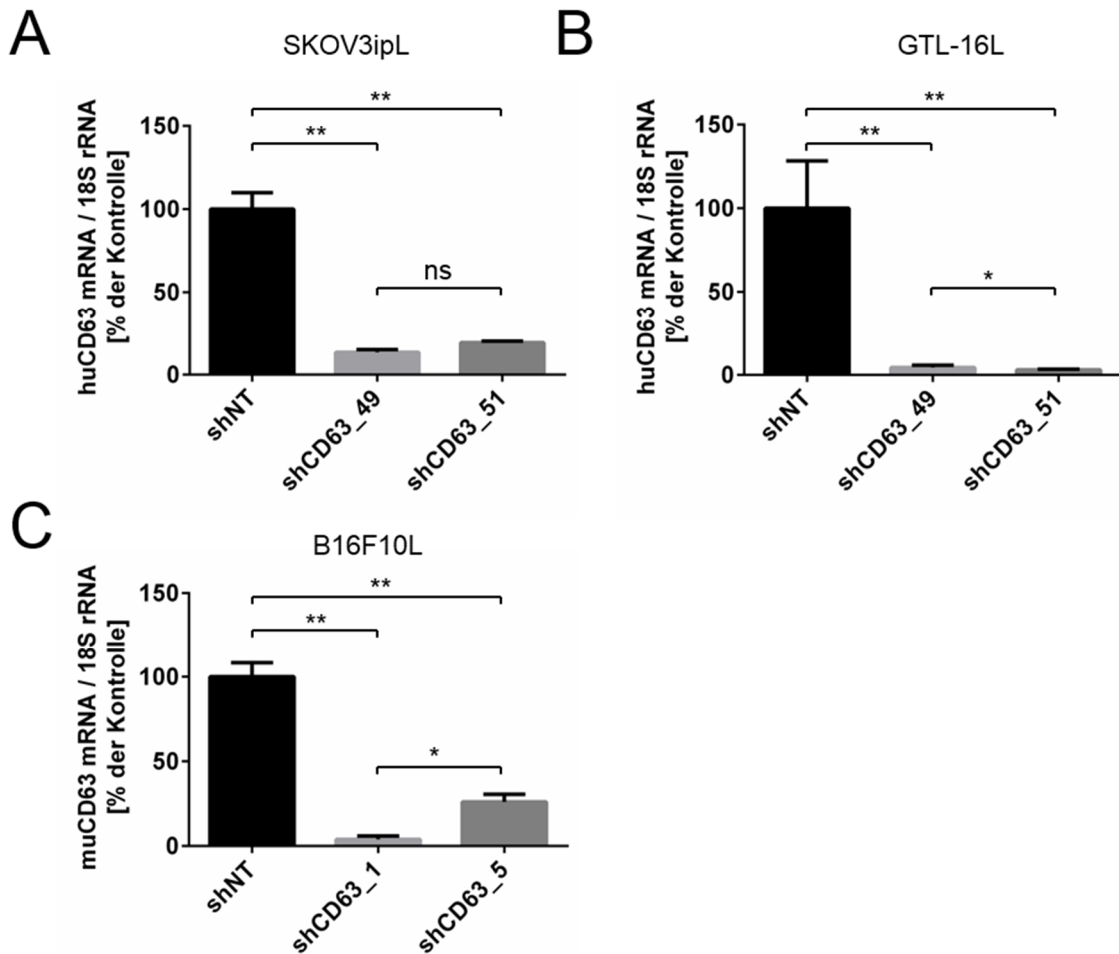


Gruppen wurde auf statistische Signifikanz mittels *One-Way ANOVA* getestet, der Vergleich der Einzelgruppen erfolgte mittels *Student's t-Test*. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Die Auswertung wurde mit *GraphPad Prism* (Graphpad Software Inc., La Jolla, USA) durchgeführt.

## 5. Ergebnisse

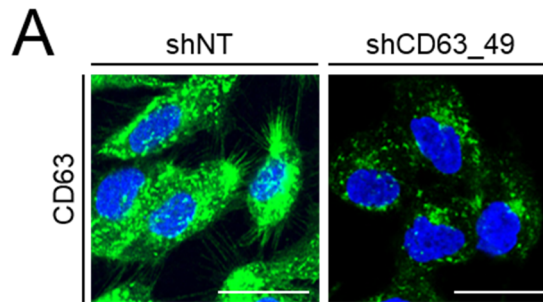
### 5.1 *Knockdown* von CD63 in humanen und murinen Tumorzelllinien

Die Rolle des Tetraspanins CD63 während der Tumorprogression ist bisher nur unzureichend untersucht. Verschiedene Studien konnten sowohl eine anti-metastatische als auch eine pro-metastatische Funktion von CD63 bei der Ausbildung von Tochtergeschwülsten im Zielorgan nachweisen. Um die Rolle von CD63 für das zell-intrinsische metastatische Potential der Tumorzellen genauer zu beleuchten, wurde die Expression von CD63 in verschiedenen humanen und murinen Zellsystemen herunterreguliert. Hierzu wurden fünf verschiedene shRNA-Konstrukte getestet, und für die weitere Analyse die beiden Zellvarianten mit dem effizientesten *Knockdown* verwendet. Um mögliche off-target-Effekte ausschließen zu können, wurde als Kontrolle eine non-target-shRNA (shNT) eingesetzt. Für die Herstellung von stabilen Zelllinien wurden die verschiedenen shRNAs mittels lentiviraler Partikel, die sich stabil in das Genom der infizierten Zellen integrieren, in die Zielzellen eingebracht (Root et al., 2006). Die verschiedenen *Knockdown*-Varianten der verwendeten Tumorzelllinien wurden anschließend durch quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) evaluiert (Abbildung 5.1). Die beiden shRNA Konstrukte shCD63\_49 (TRCN0000007849) und shCD63\_51 (TRCN0000007851) reduzierten die Expression von CD63 in humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzellen um ca. 85 % (Abbildung 5.1A) und wurden aus diesem Grund für alle humanen Zellsysteme verwendet. Neben den SKOV3ipL Zellen wurde die CD63 Expression in der humanen GTL-16L Magenkarzinomzelllinie (Abbildung 5.1B) und der humanen OV-MZ-6L Ovarialkarzinomzelllinie (Cui, 2011) herunterreguliert. In murinen B16F10L Melanomzellen zeigten die beiden shRNAs shCD63\_1 (TRCN0000326237) und shCD63\_5 (TRCN0000065685) den effizientesten *Knockdown* (Abbildung 5.1C).



**Abbildung 5.1: Knockdown von CD63 in verschiedenen Tumorzelllinien.** (A, B und C) Quantifizierung der CD63 mRNA-Expression in der humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie (A), der humanen GTL-16L Magenkarzinomzelllinie (B) und der murinen B16F10L Melanomzelllinie (C). Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Zelllinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51; murin: shCD63\_1 und shCD63\_5) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Die mRNA-Expression von CD63 wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  $n = 3$  (A: shNT = 100 %  $\pm$  9,85 %, shCD63\_49 = 13,44 %  $\pm$  1,67 %, shCD63\_51 = 19,21 %  $\pm$  0,88 %; B: shNT = 100 %  $\pm$  28,31 %, shCD63\_49 = 4,38 %  $\pm$  1,37 %, shCD63\_51 = 3,08 %  $\pm$  0,41 %; C: shNT = 100 %  $\pm$  8,29 %, shCD63\_1 = 3,95 %  $\pm$  1,98 %, shCD63\_5 = 26,01 %  $\pm$  4,43 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; ns: nicht signifikant.

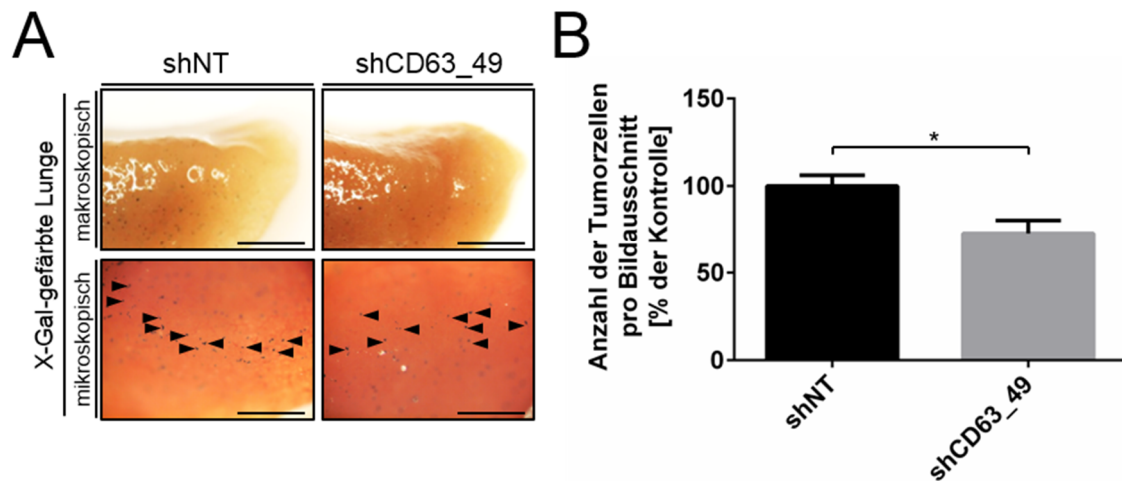
Die Ergebnisse der Expressionsanalyse wurden auf Proteinebene mittels FACS (engl. *fluorescence-activated cell sorting*, Daten nicht gezeigt), Western Blot (nicht gezeigt) und immunzytochemischer Färbung validiert. Abbildung 5.2 zeigt die immunzytologische Färbung von CD63 in SKOV3ipL Zellen. Der *Knockdown* von CD63 konnte für alle verwendeten Zelllinien auf Proteinebene bestätigt werden.



**Abbildung 5.2: Immunzytochemische Färbung von CD63 in SKOV3ipL Zellen.** (A) Repräsentative CD63-Immunfluoreszenzfärbung (Alexa-488, grünes Signal). Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Zelllinien hergestellt, die entweder eine CD63-spezifische (shCD63\_49) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Gegenfärbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blaues Signal). Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

## 5.2 Notwendigkeit von CD63 für den Arrest von SKOV3ipL Ovarialkarzinomzellen in der Lunge

Der Arrest der Tumorzellen im Kapillarbett des Zielorgans stellt den ersten wichtigen Schritt für die Ausbildung von Metastasen dar. Um die Relevanz von CD63 für diesen Schritt der metastatischen Kaskade zu untersuchen, wurden  $5,0 \cdot 10^5$  SKOV3ipL Zellen intravenös in die linke Schwanzvene von NMRi<sup>nu/nu</sup> Mäusen inokuliert (n = 4). Diese Zelllinie führt in experimentellen Metastasierungsassays mit einer hohen Reproduzierbarkeit zu Lungenmetastasen (Clinchy et al., 2000). Die Mäuse wurden 24 Stunden nach Inokulation der Tumorzellen getötet und die Lunge zur Analyse entnommen. Für eine schnelle und einfache Detektion der Tumorzellen im Sekundärorgan wurden die Zellen mittels retroviraler Transduktion stabil mit dem Reportergen lacZ aus *E. coli* markiert (durchgeführt von Frau K. Honert, Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforchung, Klinikum rechts der Isar, TUM). Diese genetische Markierung erlaubt die Untersuchung des Metastasierungsmusters innerhalb eines bestimmten Organs bis auf Einzelzellebene (Krüger 1994). Da nur in der Lunge Tumorzellen nachgewiesen werden konnten, war der Organotropismus der SKOV3ipL Tumorzellen nach *Knockdown* von CD63 unverändert (Daten nicht gezeigt). Jedoch reduzierte die verminderte CD63 Expression die Anzahl der Tumorzellen auf der Lungenoberfläche um ca. 27 % (shCD63\_49, Abbildung 5.3A und B) und ca. 22 % (shCD63\_51, Daten nicht gezeigt) im Vergleich zur shNT Kontrolle. Diese Ergebnisse legen eine pro-metastatische Funktion von CD63 nahe.

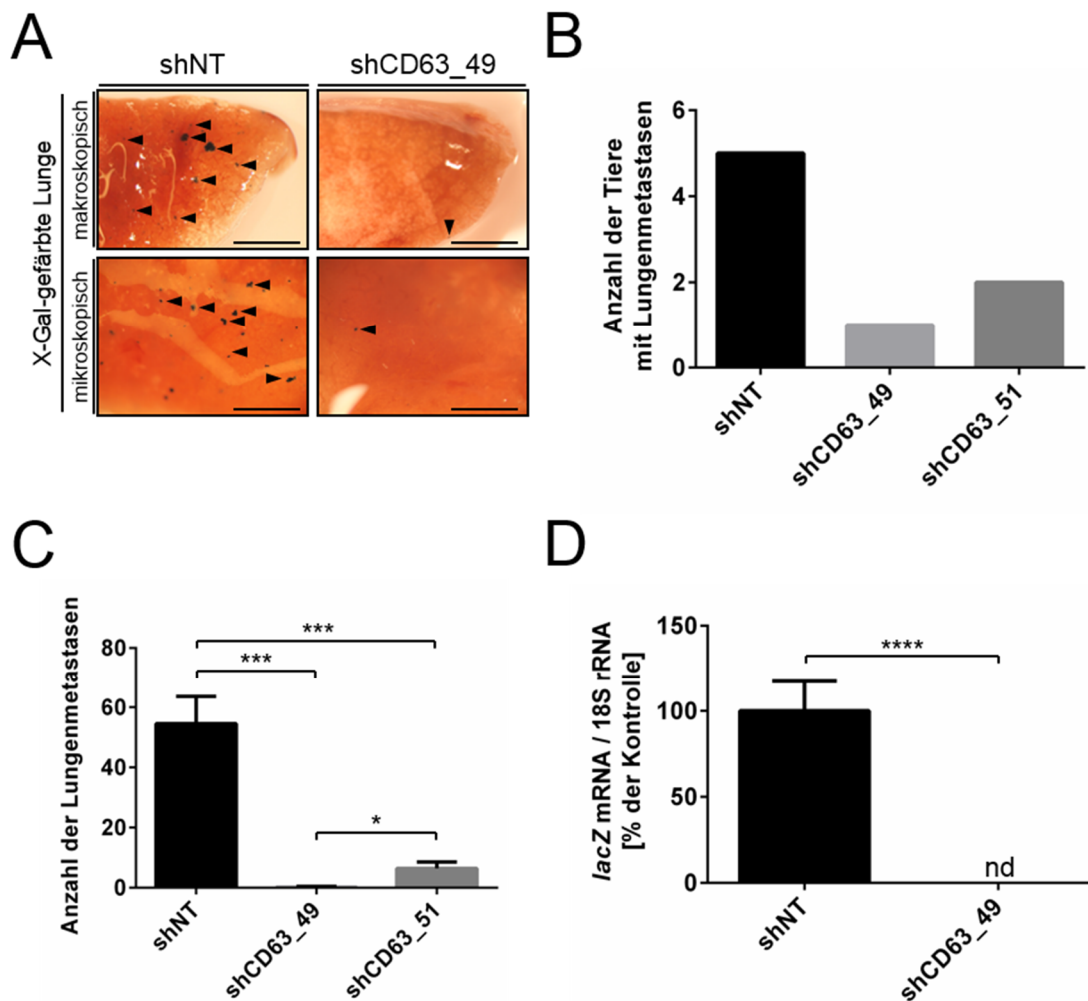


**Abbildung 5.3: Der Knockdown von CD63 in SKOV3ipL Zellen reduziert den Arrest von Tumorzellen in der Lunge.** (A) Repräsentative Aufnahmen (Übersicht und Nahaufnahme) der Lunge 24 Stunden nach intravenöser Inokulation von  $5 \cdot 10^5$  Tumorzellen in die Schwanzvene von NMRI<sup>nu/nu</sup> Mäusen (n = 4). Die Lungen wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken: 2mm (makroskopisch) bzw. 0,4 mm (mikroskopisch). Die Pfeile markieren einzelne Tumorzellen auf der Oberfläche der Lunge. (B) Anzahl der Tumorzellen, die nach X-Gal-Färbung auf der Lungenoberfläche pro Bildausschnitt sichtbar waren. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler. n = 4 (shNT = 100 % ± 6,23 %, shCD63\_49 = 72,93 % ± 7,40 %).

### 5.3 Notwendigkeit von CD63 für das Auswachsen von SKOV3ipL Ovarialkarzinomzellen in der Lunge

Während der Arrest im Kapillarbett von ca. 98 % der Tumorzellen vollzogen wird, ist das Auswachsen von Tumorzellen im Zielorgan der limitierende Schritt der Metastasierung (Chambers et al., 2002). Um die Auswirkungen des CD63 *Knockdowns* auf diesen Prozess zu untersuchen, wurden in einem weiteren Versuch die NMRI<sup>nu/nu</sup> Mäuse erst 35 Tage nach Inokulation von  $5,0 \cdot 10^5$  SKOV3ipL Zellen getötet und anschließend die Lungen zur Analyse entnommen. Während in der Kontrollgruppe 100 % der Tiere eine Vielzahl von großen Lungenmetastasen aufwiesen, konnten in den beiden *Knockdown*-Gruppen nur in einem Teil der Tiere vereinzelte kleine Metastasen detektiert werden (Abbildung 5.4A und B). Tatsächlich zeigten nur 20 % (1/5; shCD63\_49) bzw. 40 % (2/5; shCD63\_51) der Tiere in den beiden *Knockdown*-Gruppen sichtbare Mikrometastasen auf der Lungenoberfläche (Abbildung 5.4A und B). Die Anzahl von Metastasen pro Tier war in der *Knockdown*-Gruppe um 99,96 % (shCD63\_49) bzw. 88 % (shCD63\_51) reduziert (Abbildung 5.4C). Eine Analyse der Gesamttumorlast mittels qRT-PCR bestätigte die auffallend starke Auswirkung des CD63 *Knockdowns* auf das Auswachsen der Tumorzellen in der Lunge. Die

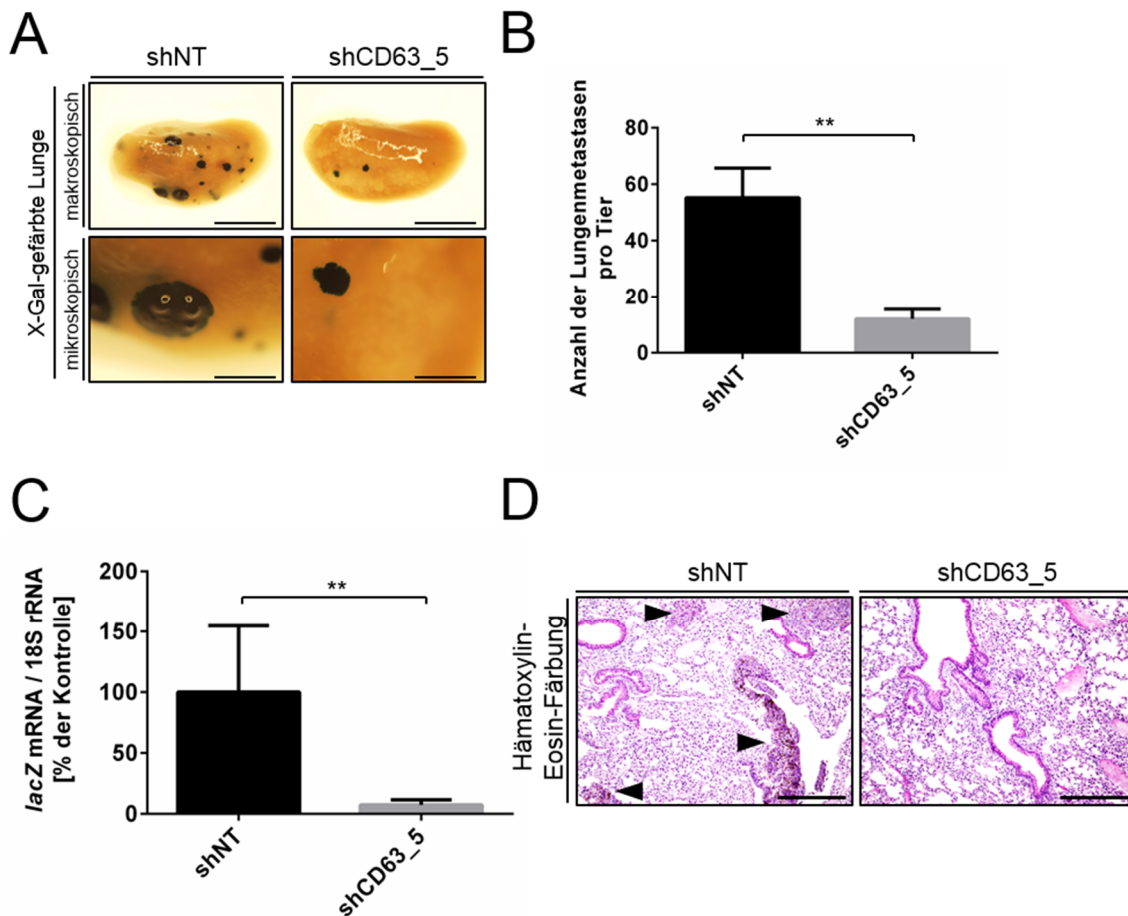
Gesamtumorlast der Lungen lag in beiden *Knockdown*-Gruppen unterhalb der Detektionsgrenze des TaqMan Assays (Abbildung 5.4D). Ein geschlechtsspezifischer Effekt des Wirts konnte ausgeschlossen werden, da sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die endogene CD63 Expression für das Auswachsen von Tumorzellen im Zielorgan eine entscheidende Rolle spielt.



**Abbildung 5.4: Der *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL Zellen inhibiert die Lungenmetastasierung fast vollständig.** (A) Repräsentative Aufnahmen (makroskopisch und mikroskopisch) der Lunge 35 Tage nach intravenöser Inokulation von  $5 \cdot 10^5$  Tumorzellen in die Schwanzvene von NMRI<sup>nu/nu</sup> Mäusen (n = 4). Die Lungen wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken: 2mm (makroskopisch) bzw. 0,4 mm (mikroskopisch). Die Pfeile markieren einzelne Metastasen auf der Oberfläche der Lungen. (B) Anzahl der Tiere, die positiv für Lungenmetastasen waren (n = 5). Dargestellt ist die Anzahl der positiven Tiere in Prozent (shNT = 100 %, shCD63\_49 = 20 %, shCD63\_51 = 40 %). (C) Anzahl der Metastasen, die nach X-Gal-Färbung auf der Lungenoberfläche sichtbar waren. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler. n = 5. (shNT = 54,60 ± 9,01, shCD63\_49 = 0,20 ± 0,45, shCD63\_51 = 6,40 ± 4,78). (D) Quantifizierung der Gesamtumorlast durch Bestimmung der lacZ mRNA-Expression mittels TaqMan Analyse (shNT = 100 % ± 17,49 %, shCD63\_49 = 0,00 % ± 0,00 %). nd: nicht detektierbar. \*, p ≤ 0,05; \*\*\*, p ≤ 0,001; \*\*\*\*, p ≤ 0,0001. Student's *t* test

## 5.4 Notwendigkeit von CD63 für das Auswachsen von B16F10L Melanomzellen in der Lunge

Die bisherigen *in vivo* Experimente wurden auf Grund der Verwendung von humanen Zelllinien in *xenograft* Modellen durchgeführt. Dieses Modellsystem hat den Nachteil, dass in Nacktmäusen die Entwicklung des Thymus gestört und damit die T-Zell-vermittelte Immunantwort auf ein Minimum reduziert ist (Wortis et al., 1971). Da die T-zell-vermittelte Immunantwort für die Tumorprogression eine wichtige Rolle spielt (DeNardo et al., 2009; Koh und Kang, 2012), wurde der metastasierungs-hemmende Effekt von CD63 auf das Auswachsen von Metastasen im nächsten Schritt in einem *syngen* Mausmodell untersucht. Hierzu wurden  $1,0 \cdot 10^5$  Zellen der murinen B16F10L Melanomzelllinie in die Schwanzvene von *syngen* C57/B16J Mäuse inokuliert, da CD63 als wichtiger Faktor für die Progression von Hautkrebs beschrieben ist (Hotta et al., 1988; Lewis et al., 2005). Dieses Zellsystem führt mit hoher Reproduzierbarkeit zu Lungenmetastasen (Brown et al., 2002; Gautam et al., 2002). Die Tiere wurden 14 Tage nach Inokulation der Tumorzellen getötet und die Lungen zur Analyse des Metastasierungsmusters entnommen. Der *Knockdown* von CD63 führte zu einer deutlichen Reduktion der Lungenmetastasierung (Abbildung 5.5A). So war die Anzahl der Metastasen auf der Oberfläche der Lunge um 78,26 % gegenüber der shNT Kontrolle reduziert (Abbildung 5.5B). Darüber hinaus war die Gesamttumorlast der Lunge nach *Knockdown* von CD63 um 92,62 % reduziert (Abbildung 5.5C). Eine Analyse von Paraffinschnitten der Lungen bestätigte die verminderte Anzahl von Lungenmetastasen nach *Knockdown* von CD63 (Abbildung 5.5D). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den *in vivo* Daten der SKOV3ipL Ovarialkarzinomzellvarianten und deuten darauf hin, dass CD63 für die Kolonisierung des Zielorgans eine maßgebliche Rolle spielt.



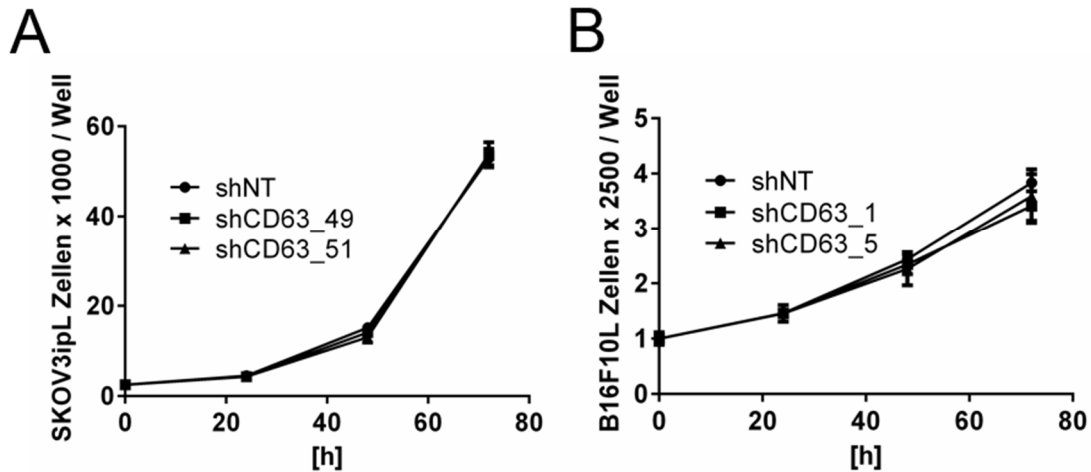
**Abbildung 5.5: Der Knockdown von CD63 in B16F10L Zellen verminderte das zell-intrinsische metastatische Potential.** (A) Repräsentative Aufnahmen (makroskopisch und mikroskopisch) der Lunge 14 Tage nach intravenöser Inokulation von  $2,0 \cdot 10^5$  Tumorzellen in die Schwanzvene von C57Bl6J Mäusen ( $n = 5$ ). Die Lungen wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken: 2 mm (makroskopisch) bzw. 0,4 mm (mikroskopisch). (B) Anzahl der Metastasen, die nach X-Gal-Färbung auf der Lungenoberfläche sichtbar waren. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  $n = 5$ . (shNT =  $55,20 \pm 10,48$ , shCD63\_5 =  $12,00 \pm 3,50$ ). (C) Quantifizierung der Gesamttumorzelllast durch Bestimmung der lacZ mRNA-Expression mittels TaqMan Analyse (shNT = 100 %  $\pm$  24,49 %, shCD63\_5 = 7,38 %  $\pm$  1,90 %). \*\*,  $p \leq 0,01$ . Student's  $t$  test. (D) Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten der Lunge. Pfeile markieren Metastasen. Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m.

## 5.5 Der Knockdown von CD63 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen *in vitro*

Die bisherigen *in vivo* Ergebnisse deuten auf eine wichtige Funktion von CD63 bei der Induktion der Proliferation von Tumorzellen im Zielorgan der Metastasierung hin. In der Tat bestimmt das Verhältnis von Proliferation zu Apoptose in Mikrometastasen das Potential der Tumorzellen zum Auswachsen (Varghese et al., 2002). Da aufgrund der geringen Zahl der Lungenmetastasen in den jeweiligen *Knockdown*-Gruppen keine immunhistochemische



Färbung des Proliferationsmarkers PCNA (Proliferating Cellular Nuclear Antigen) auf Gewebeschnitten durchgeführt werden konnte, wurde die Auswirkung des CD63 *Knockdowns* auf die Proliferation der Tumorzellen *in vitro* untersucht.



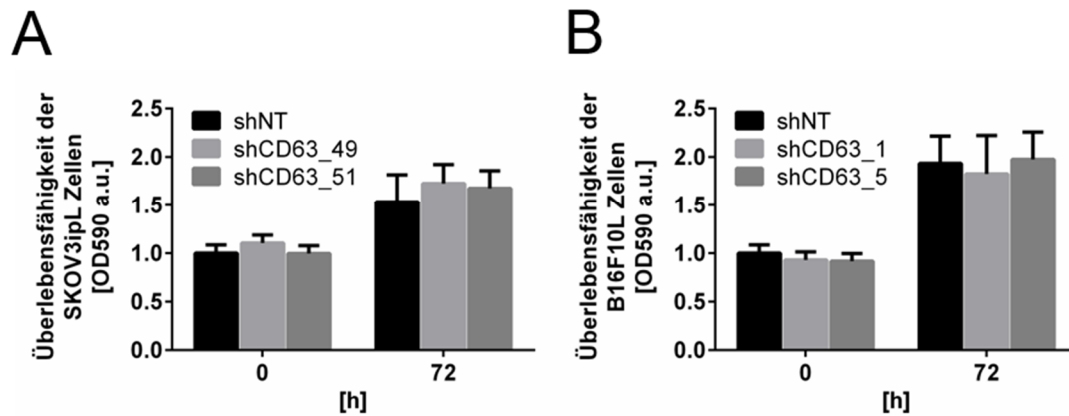
**Abbildung 5.6: Der *Knockdown* von CD63 hat keinen Einfluss auf die Tumorzellproliferation.** (A und B) Analyse der Nettotumorzellproliferation der SKOV3ipL Ovarialkarzinomzellvarianten (A) oder B16F10L Melanomzellvarianten (B) mittels AlamarBlue® Assay unter normoxischen Bedingungen. Die Tumorzellen exprimieren entweder eine non-targeting Kontrolle (shNT) oder CD63-spezifische shRNAs (human: shCD63\_49 und shCD63\_51; murin: shCD63\_1 und shCD63\_5). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n = 3.

Überraschenderweise führte der *Knockdown* von CD63 zu keiner Veränderung der Proliferation von SKOV3ipL nach 24, 48 oder 72 Stunden (Abbildung 5.6A). Es konnten lediglich leichte, nicht signifikante Änderungen der Wachstumskurven festgestellt werden. Diese Unabhängigkeit der Tumorzellproliferation von CD63 *in vitro* konnte in B16F10L Zellen bestätigt werden (Abbildung 5.6B). Diese Ergebnisse zeigen, dass der *Knockdown* von CD63 unter normoxischen Bedingungen keinen Einfluss auf die *in vitro* Proliferation der Tumorzellen hat.

## 5.6 Der *Knockdown* von CD63 hat keinen Einfluss auf das Tumorzellüberleben

Für das Auswachsen von Tumorzellen im Sekundärorgan ist neben der Proliferation auch das Überleben der Zellen nach Arrest von besonderer Bedeutung (Varghese et al., 2002). Die Überlebensfähigkeit der Tumorzellen stellt die Grundlage für das spätere Auswachsen von Metastasen dar (Chambers et al., 2002). Basierend auf der Hypothese, dass CD63 das

Überleben der Tumorzellen beeinflusst, wurden im nächsten Schritt die Auswirkungen des CD63 *Knockdown* auf das Zellüberleben untersucht. Hierfür wurde die Proliferation von Tumorzellen für 72 h in Anwesenheit von lediglich 0.5 % FKS analysiert.



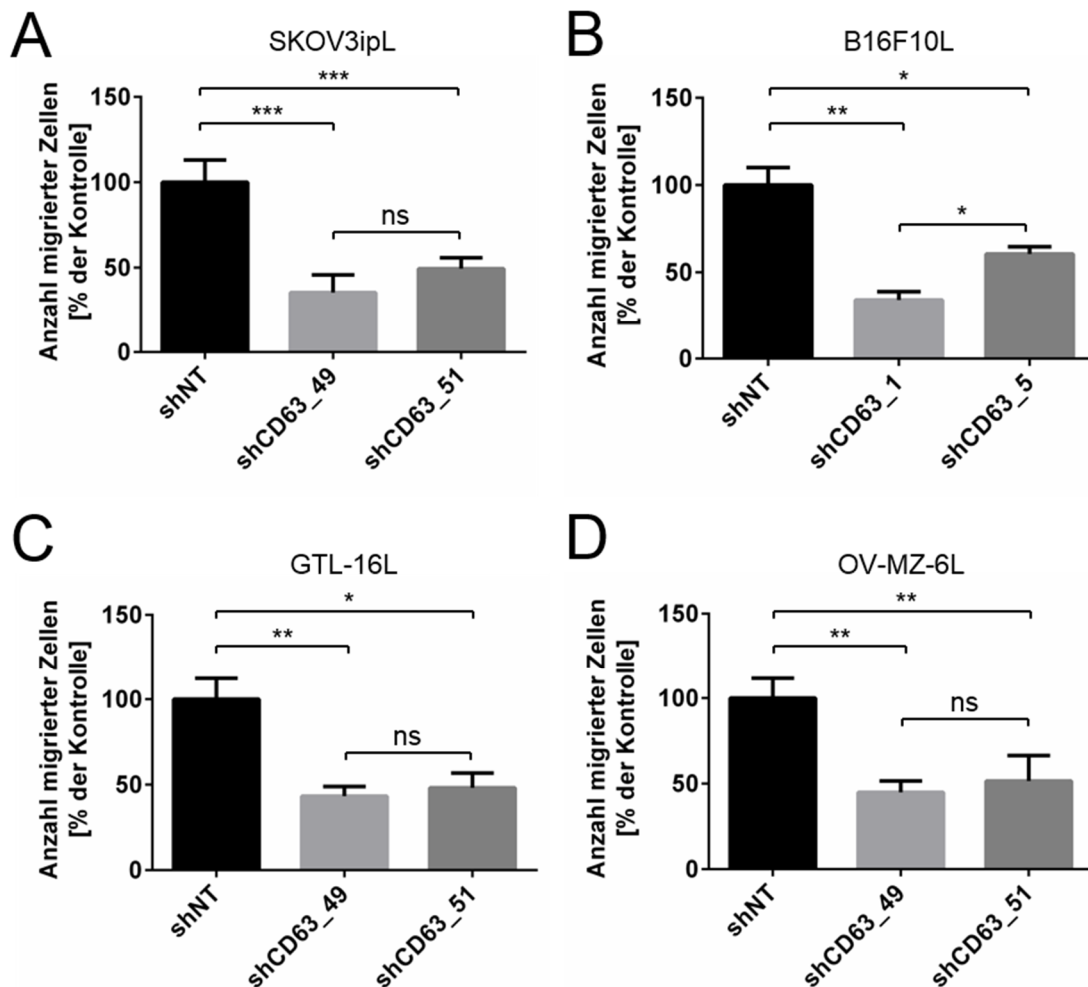
**Abbildung 5.7: Der *Knockdown* von CD63 hat keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Tumorzellen.** (A und B) Analyse der Überlebensfähigkeit von SKOV3ipL Ovarialkarzinomzellen (A) oder B16F10L Melanomzellen (B) mittels AlamarBlue® Assay unter 0,5 % FKS. Die Tumorzellen exprimieren entweder eine non-targeting shRNA (shNT) oder CD63-spezifische shRNAs (human: shCD63\_49 und shCD63\_51; murin: shCD63\_1 und shCD63\_5). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n = 3.

Weder in den humanen SKOV3ipL Zellen noch in den murinen B16F10L Zellen wirkte sich der *Knockdown* von CD63 auf die Überlebensfähigkeit der Zellen aus (Abbildung 5.7A und B). Daraus lässt sich schließen, dass CD63 für das Zellüberleben *in vitro* keine entscheidende Rolle spielt.

## 5.7 Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Migration von Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs

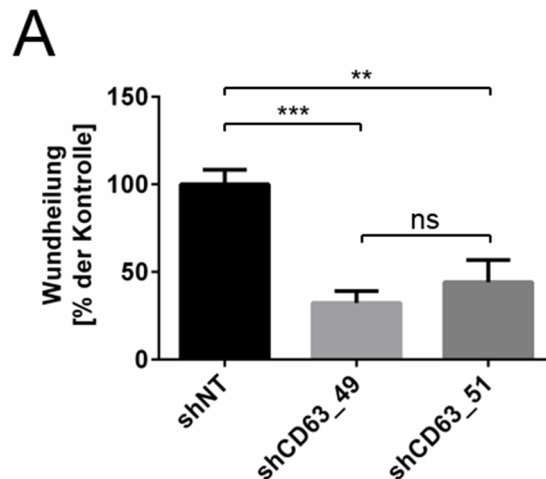
Da der pro-metastatische Effekt von CD63 weder auf die Proliferation der Tumorzellen noch auf Veränderungen des Zellüberlebens zurückgeführt werden konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD63 die Motilität der Tumorzellen beeinflusst. Eine erhöhte Migration und Invasion von Tumorzellen ist eine Grundvoraussetzung für die Kolonisierung des Sekundärorgans. In einem ersten Versuchsansatz wurde die Migration der Tumorzellen mit Hilfe des Boyden Chamber-Migrationsassays untersucht. Der *Knockdown* von CD63 reduzierte die Migration von SKOV3ipL Zellen (Abbildung 5.8A) und die Migration von B16F10L Zellen (Abbildung 5.8B) um jeweils ca. 50 %. Diese pro-migratorische Funktion von CD63 konnte in anderen Zellsystemen bestätigt werden. So führte der *Knockdown* von

CD63 zu einer Reduktion der Migration von GTL-16L Magenkarzinomzellen (Abbildung 5.8C) und OV-MZ-6L Ovarialkarzinomzellen (Abbildung 5.8D, in Zusammenarbeit mit H. Cui (Cui, 2011)), die vergleichbar mit den Effekten des CD63 *Knockdowns* in SKOV3ipL und B16F10L Zellen war. Da der *Knockdown* von CD63 zu keiner Veränderung der Proliferation der Tumorzellen führte, kann der Effekt von CD63 direkt auf die Migration zurückgeführt werden. Somit deuten diese Ergebnisse auf eine pro-migratorische Funktion von CD63 hin.



**Abbildung 5.8: Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Migration von verschiedenen Tumorzelllinien.** (A, B, C und D) Quantifizierung der Migration der humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie (A), der murinen B16F10L Melanomzelllinie (B), der humanen GTL-16L Magenkarzinomzelllinie (C) und der humanen OV-MZ-6L Ovarialkarzinomzelllinie (D). Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 bzw. shCD63\_51; murin: shCD63\_1 bzw. shCD63\_5) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Die Migration der verschiedenen Tumorzellvarianten wurde mittels Boyden Chamber-Migrationsassays analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert der migrierten Tumorzellen pro Well  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (A: shNT = 100 %  $\pm$  6,52 %, shCD63\_49 = 35,48 %  $\pm$  5,17 %, shCD63\_51 = 49,48 %  $\pm$  3,17 %; B: shNT = 100 %  $\pm$  10,09 %, shCD63\_1 = 34,25 %  $\pm$  4,70 %, shCD63\_5 = 50,52 %  $\pm$  4,18 %; C: shNT = 100 %  $\pm$  12,25 %, shCD63\_49 = 43,26 %  $\pm$  5,65 %, shCD63\_51 = 48,23 %  $\pm$  8,58 %, D: shNT = 100 %  $\pm$  11,72 %, shCD63\_49 = 44,88 %  $\pm$  6,62 %, shCD63\_51 = 51,61 %  $\pm$  14,85 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ . ns: nicht signifikant.

Die pro-migratorische Funktion von CD63 sollte in einem weiteren Versuchsansatz bestätigt werden. Hierzu wurden SKOV3ipL CD63 *Knockdown*-Zellen und die entsprechende shNT Kontrolle in einem *Scratch Wound Healing*-Assay untersucht. Es zeigte sich, dass eine verminderte Expression von CD63 in den Tumorzellen zu einer deutlich verminderten Migration der Tumorzellen führte (Abbildung 5.9A).

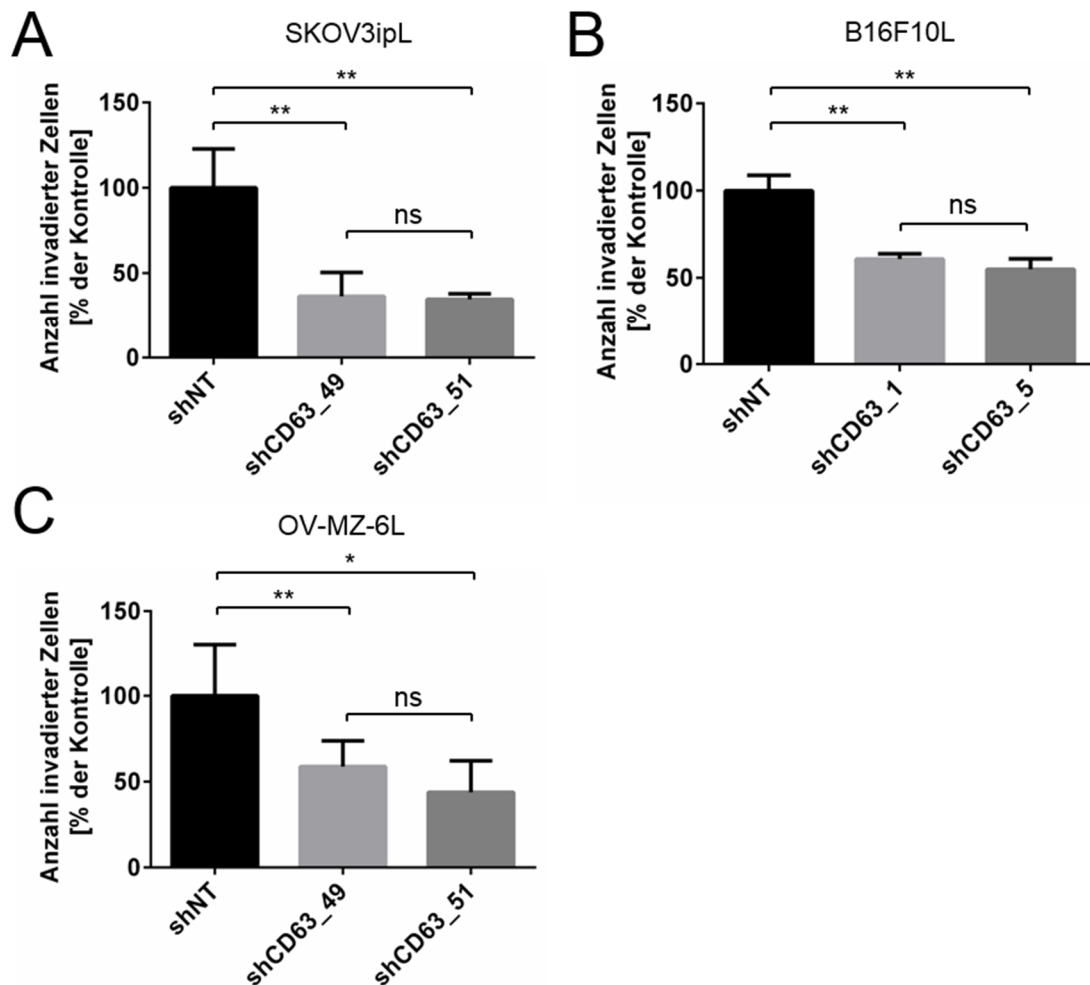


**Abbildung 5.9: Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Motilität von SKOV3ipL Tumorzellen.** (A) Quantifizierung der Wundheilung der humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinie hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting Kontrolle (shNT) exprimieren. Die Migration der verschiedenen Tumorzellvarianten wurde mittels eines Scratch Assays analysiert. Dargestellt sind die Durchschnittswerte der Wundheilung  $\pm$  Standardfehler.  $n = 3$  (A: shNT = 100 %  $\pm$  4,81 %, shCD63\_49 = 32,28 %  $\pm$  3,88 %, shCD63\_51 = 44,24 %  $\pm$  7,27 %). \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ . ns: nicht signifikant.

## 5.8 Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Invasion von Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs

Für die Metastasierung sind neben der Migration auch die invasiven Eigenschaften der Tumorzellen von großer Bedeutung. Um zu untersuchen, inwiefern sich der *Knockdown* von CD63 auf die invasiven Eigenschaften der Tumorzellen auswirkt, wurde die Invasion der Tumorzellen mittels Boyden Chamber-Invasionsassays untersucht. Hierbei wird die Invasion der Tumorzellen durch die Verwendung einer künstliche ECM (Matrigel®) analysiert (Albini et al., 1987). Tumorzellen mit einer verringerten CD63 Expression zeigten eine klare Reduktion der Invasion. Effektiv war die Invasion nach *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL Zellen um ca. 65 % reduziert (Abbildung 5.10A), während die Depletion von CD63 die Invasion von B16F10L Zellen um ca. 40 % reduzierte (Abbildung 5.10B). Diese pro-invasive Funktion von CD63 konnte in OV-MZ-6L Zellen bestätigt werden (Abbildung

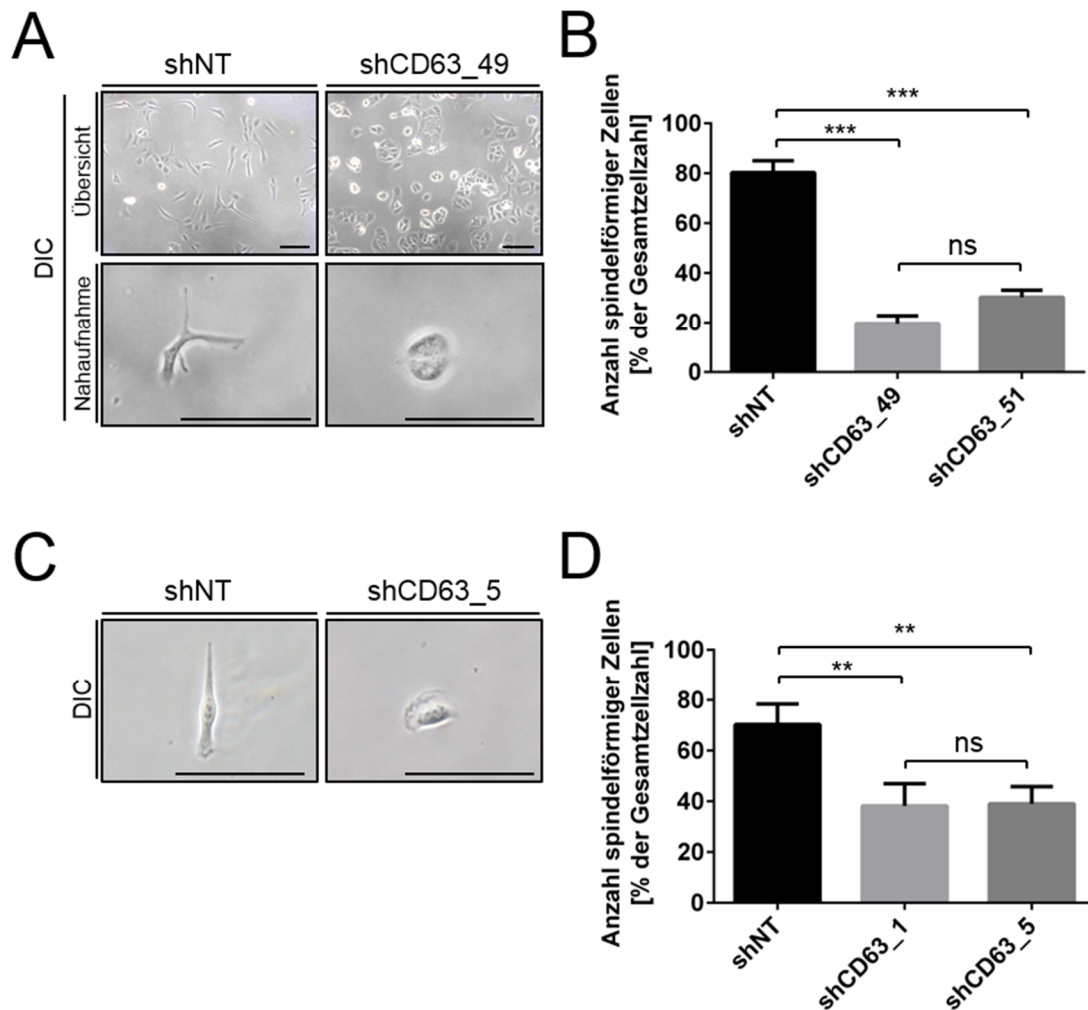
5.10C; in Zusammenarbeit mit H. Cui (Cui, 2011)). Da, wie oben gezeigt, weder die Proliferation noch das Zellüberleben durch den *Knockdown* von CD63 beeinflusst werden, kann eine Verfälschung der Ergebnisse durch diese beiden Prozesse ausgeschlossen werden. Somit lassen sich diese Effekte direkt auf eine invasionsfördernde Funktion von CD63 zurückführen. Diese Ergebnisse stellen eine erste Erklärungsmöglichkeit für die pro-metastatische Funktion von CD63 dar.



**Abbildung 5.10: Der *Knockdown* von CD63 reduziert die invasiven Eigenschaften von verschiedenen Tumorzelllinien.** (A, B und C) Quantifizierung der Invasion der humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie (A), der murinen B16F10L Melanomzelllinie (B) und der humanen OV-MZ-6L Ovarialkarzinomzelllinie (C). Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51; murin: shCD63\_1 und shCD63\_5) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Die Invasion der verschiedenen Tumorzellvarianten wurde mittels Boyden Chamber-Invasionsassays analysiert. Dargestellt sind die Durchschnittswerte invadierter Tumorzellen pro Well  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (A: shNT = 100 %  $\pm$  11,42 %, shCD63\_49 = 36,44 %  $\pm$  7,01 %, shCD63\_51 = 34,67 %  $\pm$  2,62 %; B: shNT = 100 %  $\pm$  8,67 %, shCD63\_1 = 60,80 %  $\pm$  3,04 %, shCD63\_5 = 54,94 %  $\pm$  6,00 %; C: shNT = 100 %  $\pm$  13,62 %, shCD63\_49 = 58,77 %  $\pm$  6,74 %, shCD63\_51 = 43,86 %  $\pm$  8,20 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ . ns: nicht signifikant.

## 5.9 CD63 stabilisiert die spindelförmige Morphologie von Tumorzellen

Tumorzellen epithelialen Ursprungs durchlaufen während der Tumorprogression eine EMT. Dieser Prozess führt zu einer Veränderung der Morphologie der Tumorzellen von einem epithelialen Phänotyp hin zu einer fibroblastenähnlichen Morphologie und erhöht gleichzeitig die Motilität der Tumorzellen (Polyak und Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Bei den bisher verwendeten Tumorzelllinien handelt es sich um Tumorarten epithelialen Ursprungs. Basierend auf diesen Informationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD63 den mesenchymalen Phänotyp von Tumorzellen stabilisiert und so das zell-intrinsische metastatische Potential der Tumorzellen beeinflusst. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Morphologie von SKOV3ipL und B16F10L Zellen nach *Knockdown* von CD63 untersucht und mit den entsprechenden shNT Kontrollzellen verglichen. Erstaunlicherweise hatte der *Knockdown* von CD63 einen stark veränderten Tumorzellphänotyp zu Folge (Abbildung 5.11A und C). Während die Kontrollzellen die für maligne Tumorzellen typische spindelförmige mesenchymale Morphologie zeigten (Abbildung 5.11A und C), war die Anzahl der fibroblastenähnlichen Zellen nach *Knockdown* von CD63 stark reduziert. Diese Veränderung der Morphologie konnte sowohl in humanen SKOV3ipL (Abbildung 5.11A und B) als auch in murinen B16F10L Zellen (Abbildung 5.11C und D) beobachtet werden. Der *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL Zellen verminderte die Anzahl der spindelförmigen Zellen um 75 % (Abbildung 5.11B), während die B16F10L Tumorzellen nach *Knockdown* von CD63 eine um 45 % verminderte mesenchymale Morphologie zeigten (Abbildung 5.11D). Diese Transition des Tumorzellphänotyps nach *Knockdown* von CD63 bestätigt die Hypothese, dass CD63 bei der Stabilisierung der spindelförmigen Morphologie von Tumorzellen eine wichtige Funktion einnimmt.

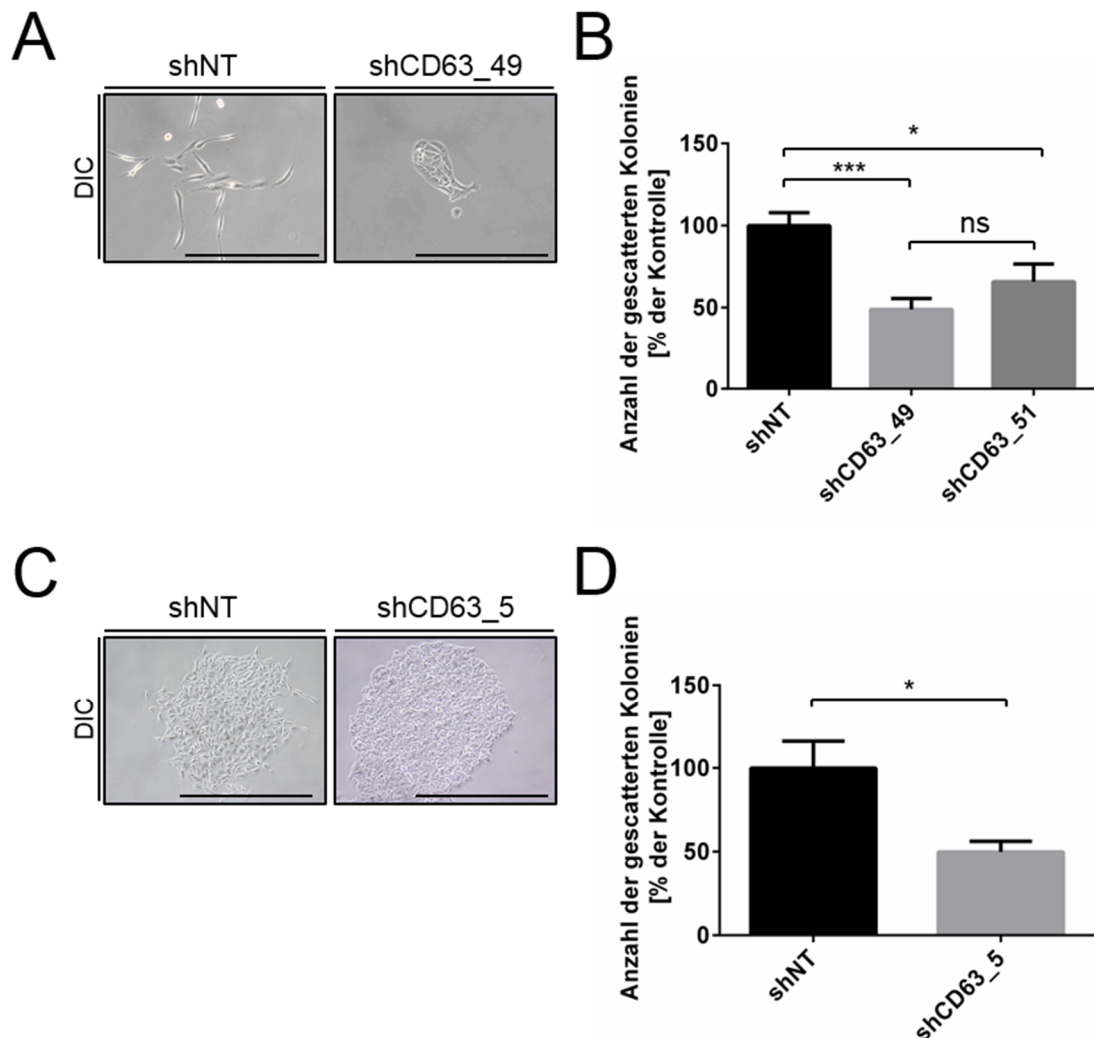


**Abbildung 5.11: Analyse der Tumorzellmorphologie nach Knockdown von CD63.** (A und C) Repräsentative differentielle Interferenzkontrast-(DIC) Bilder von SKOV3ipL (A) oder B16F10L (C) Zellen. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51; murin: shCD63\_1 und shCD63\_5) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Maßstabsbalken: 25  $\mu$ M. (B und D) Anzahl der spindelförmigen Tumorzellen in % der Gesamtzellzahl. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (B: shNT = 80,24 %  $\pm$  4,74 %, shCD63\_49 = 19,74 %  $\pm$  3,02 %, shCD63\_51 = 30,29 %  $\pm$  2,86 %; D: shNT = 70,28 %  $\pm$  4,06 %, shCD63\_1 = 38,20 %  $\pm$  4,35 %, shCD63\_5 = 39,00 %  $\pm$  3,42 %). \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ . ns: nicht signifikant.

## 5.10 Notwendigkeit von CD63 für das Scattering von Tumorzellen

Die unterschiedlichen Funktionen und Eigenschaften von Epithelzellen und fibroblastenähnlichen Zellen spiegeln sich in der Zellkultur durch die unterschiedliche Morphologie der Kolonien wider. Während Epithelzellen kompakte Kolonien mit einer kopfsteinpflasterähnlichen (engl. *cobblestone-like*) Morphologie aufweisen, bilden

mesenchymale Zellen nur einen losen Zellverbund. Zusätzlich kann bei Kolonien von spindelförmigen Tumorzellen das sogenannte Scattering, also das Loslösen einzelner Zellen aus der Kolonie, beobachtet werden. Falls CD63 die mesenchymale Morphologie von Tumorzellen stabilisiert, sollte in der Folge das Scattering der Tumorzellen reduziert sein.



**Abbildung 5.12: Der Knockdown von CD63 reduziert das Scattering von SKOV3ipL und B16F10L Tumorzellen.** (A und C) Repräsentative differentielle Interferenzkontrast (DIC) Bilder von SKOV3ipL (A) oder B16F10L (C) Zellen. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51; murin: shCD63\_1 und shCD63\_5) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m. (B und D) Das Scattering der Tumorzellen wurde in einem Scatterassay analysiert. Dargestellt sind die Durchschnittswerte gescatterter Kolonien  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (B: shNT = 100 %  $\pm$  4,84 %, shCD63\_49 = 48,91 %  $\pm$  3,80 %, shCD63\_51 = 65,77 %  $\pm$  6,21 %; D: shNT = 100 %  $\pm$  16,08 %, shCD63\_5 = 49,76 %  $\pm$  6,44 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ . ns: nicht signifikant.

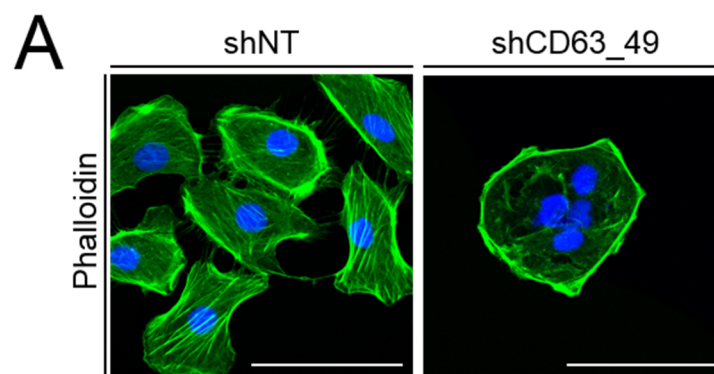
Die Kolonien der SKOV3ipL shNT Kontrollgruppe zeigten einen für mesenchymale Zellen typischen losen Zellverbund. Zudem konnte bei ca. 70 % der Kolonien das Scattering von einzelnen Tumorzellen beobachtet werden (Abbildung 5.12A und B). Demgegenüber führte der Knockdown von CD63 zu einer Transition der Morphologie der Kolonien und das



Scattering der Tumorzellen war um 45 % reduziert (Abbildung 5.12A und B). Die erhöhte Anzahl an Kolonien mit einer kopfsteinpflasterähnlichen Morphologie und die Reduktion des Tumorzell-Scattering nach *Knockdown* von CD63 konnte in B16F10L Zellen bestätigt werden (Abbildung 5.12C und D). Diese Ergebnisse bestärken eine mögliche Funktion von CD63 bei der Stabilisierung des mesenchymalen Phänotyps von Tumorzellen.

### 5.11 Der *Knockdown* von CD63 führt zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts

Veränderungen der Zellmorphologie werden häufig von einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts begleitet. Während der EMT verändert sich die Struktur der Aktinfilamente von dünnen kortikalen Filamenten in Epithelzellen hin zu dicken kontraktile Filamenten, den sogenannten Stressfilamenten (Yilmaz und Christofori, 2009). Um die Rolle von CD63 bei der Erhaltung des mesenchymalen Phänotyps zu beurteilen, wurden im nächsten Schritt die Auswirkungen des CD63 *Knockdowns* auf die Organisation des Aktinzytoskeletts untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit Phalloidin, das spezifisch an F-Aktin bindet (Cooper, 1987), gefärbt und die Färbung anschließend unter einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.



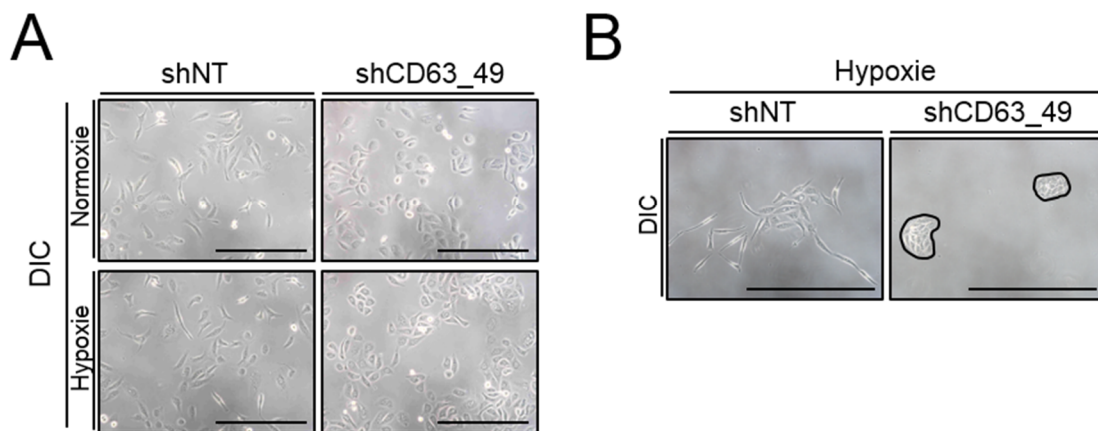
**Abbildung 5.13: Immunzytochemische Färbung des Aktinzytoskeletts in SKOV3ipL Tumorzellen.** (A) Repräsentative Phalloidin-Immunfluoreszenzfärbung (Phalloidin-488, grünes Signal) zeigt eine deutliche Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Zellen, die eine CD63-spezifische shRNA (shCD63\_49) exprimieren im Vergleich zur non-target Kontrolle (shNT). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstabsbalken: 50 µm.

Das Aktinzytoskelett der SKOV3ipL shNT Kontrollzellen zeigte die für spindelförmige Tumorzellen typische Organisation (Abbildung 5.13A, linkes Bild). Innerhalb der Zelle sind neben dünnen kortikalen Filamenten auch Stressfilamente sichtbar. Der *Knockdown* von

CD63 führte zu einer Re-Organisation des Aktinzytoskeletts. So konnten nach *Knockdown* von CD63 keine Stressfilamente mehr identifiziert werden und das Gesamtsignal für Aktin nahm deutlich ab (Abbildung 5.13, linkes Bild). Diese Re-Strukturierung der Aktinfilamente nach CD63 *Knockdown* konnte in B16F10L Zellen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

## 5.12 Unabhängigkeit der CD63-regulierten Tumorzellmorphologie von Hypoxie

Hypoxie, also ein Mangel an Sauerstoff, führt in Epithelzellen zu einer Transition hin zu einem fibroblastenähnlichen Phänotyp. Dieser Prozess spielt bei der Tumorprogression eine wichtige Rolle (Yang et al., 2008). Um zu untersuchen, ob der Effekt von CD63 auf die Tumorzellmorphologie eine Hypoxie-Abhängigkeit aufweist, wurden die *Knockdown* Zellen und die entsprechenden Kontrollzellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert und anschließend ihre Morphologie analysiert.



**Abbildung 5.14: Hypoxie hat keinen Einfluss auf den Phänotyp von SKOV3ipL Zellen mit verminderter CD63 Expression.** (A und B) Repräsentative differentielle Interferenzkontrast (DIC) Bilder von SKOV3ipL Zellen. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. (A) Der Einfluss von Hypoxie auf den Phänotyp der Tumorzellen wurde nach 24 Stunden ausgewertet. Maßstabsbalken: 400  $\mu\text{m}$ . (B) Der Einfluss von Hypoxie auf das Scattering der SKOV3ipL Tumorzellvarianten wurde nach 24 Stunden ausgewertet. Maßstabsbalken: 200  $\mu\text{m}$ .

Die Inkubation der verschiedenen Zellvarianten unter hypoxischen Bedingungen hatte keinen Einfluss auf die Morphologie der Tumorzellen. Weder war Hypoxie in der Lage, den CD63 *Knockdown* zu retten, noch verstärkte sich der spindelförmige Phänotyp der Kontrollzellen merklich (Abbildung 5.14A). Diese Ergebnisse deuten auf eine Hypoxie-

unabhängige Funktion von CD63 hin. Allerdings kann auf Grund dieser Ergebnisse eine Beteiligung auch nicht ausgeschlossen werden. Hypoxie spielt eine wichtige Rolle bei der Biogenese von Exosomen. Diese Vesikel sind außerdem im Zusammenhang mit CD63 mit schlechter Prognose assoziiert (Logozzi et al., 2009). In Zusammenarbeit mit S. Oswald (betreute Masterarbeit) konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von CD63 Einfluss auf die Freisetzung von Exosomen in den Zellkulturüberstand hat (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass CD63 bei der Biogenese von Exosomen eine Rolle spielt und könnten für die Erklärung der anti-metastatischen Auswirkungen des CD63 *Knockdowns* wichtig sein.

### 5.13 CD63 reguliert die mRNA-Expression von metastasierungs-assoziierten Genen

Die Expression von CD63 spielt für die Aufrechterhaltung des zell-intrinsischen metastatischen Potentials eine bestimmende Rolle. Diese pro-metastatische Funktion von CD63 scheint über die Stabilisierung des spindelförmigen Tumorzellphänotyps vermittelt zu sein. Um erste Einblicke in die Funktionsweise von CD63 zu erhalten, wurde im nächsten Schritt das Genexpressionsprofil der SKOV3ipL CD63 *Knockdown* Zelllinien bestimmt. Die Low Density Array (LDA) Analyse basiert auf der quantitativen RT-PCR (TaqMan®) und erlaubt eine quantitative, simultane Analyse der mRNA-Expression von ausgewählten Genen. Für den Vergleich der *Knockdown* Zelllinien mit der shNT Kontrolle wurde die mRNA-Expression von 95 metastasierungs-assoziierten Genen untersucht. Die LDA Analyse der Genexpression zeigte eine weitreichende Veränderung der Genexpression von metastasierungs-assoziierten Genen nach *Knockdown* von CD63. In der Tat war die Expression von 45 Genen verändert (Abbildung 5.15). Für die weitere Auswertung wurden allerdings nur Gene mit einer mehr als 100 %igen Induktion bzw. einer Reduktion um 50 % herangezogen. Basierend auf diesen beiden Grenzwerten war die mRNA-Expression von 28 Genen induziert und die mRNA-Expression von 23 Genen reduziert. Interessanterweise sind 8 der Faktoren, die durch den *Knockdown* von CD63 moduliert wurden, mit der EMT assoziiert. Dieses Ergebnis deutet auf eine wichtige Funktion von CD63 für die Regulation der Zellplastizität hin und steht in Einklang mit den Auswirkungen des CD63-*Knockdowns* auf die Morphologie der Tumorzellen.

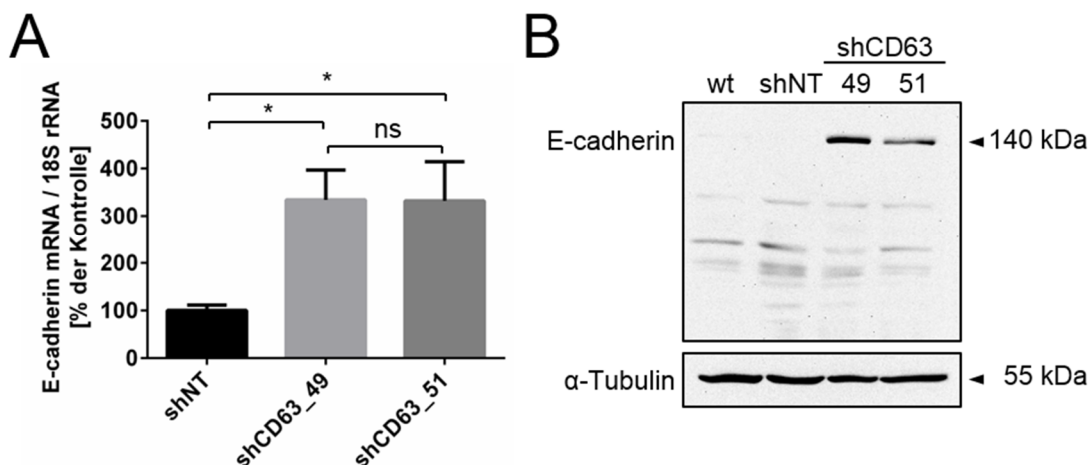


**Abbildung 5.15: Der Knockdown von CD63 verändert das Genexpressionsprofil metastasierungs-assoziiierter Gene in SKOV3ipL Tumorzellen.** (A) Analyse des Genexpressionsprofils von 95 metastasierungs-assoziierten Genen mittels Low Density Array (LDA) von Varianten der humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Dargestellt ist die mRNA-Expression des jeweiligen Zielgens normalisiert auf die Expression der 18S rRNA. Die Farben stellen die Erhöhung oder die Herunterregulation der Expression dar (hellrot: Erhöhung der Expression um mehr als 100 %; dunkelrot: Erhöhung der Expression um mehr als 500 %; hellgrün: Herunterregulation der Expression um mehr als 50 %; dunkelgrün: Herunterregulation der Expression um mehr als 80 %; Schwarz: Erhöhung der Expression um weniger als 100 % und Herunterregulation der Expression um weniger als 50 %).

## 5.14 CD63 unterdrückt die Expression von E-Cadherin

Die Analyse des Genexpressionsprofils der SKOV3ipL Zellen nach CD63 *Knockdown* zeigte eine Induktion von epithelialen Markern bei gleichzeitiger Reduktion von mesenchymalen Markern auf mRNA Ebene. In Übereinstimmung mit der pro-metastatischen Funktion von CD63 *in vivo* konnten klinische Studien zeigen, dass die Expression von epithelialen Markern mit einer guten Prognose und die Expression von mesenchymalen Markern mit einer schlechten Prognose von Krebspatienten assoziiert ist (Chan et al., 2001; Domagala et al., 1990; Luo et al., 2012). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD63 die Aggressivität von Tumorzellen

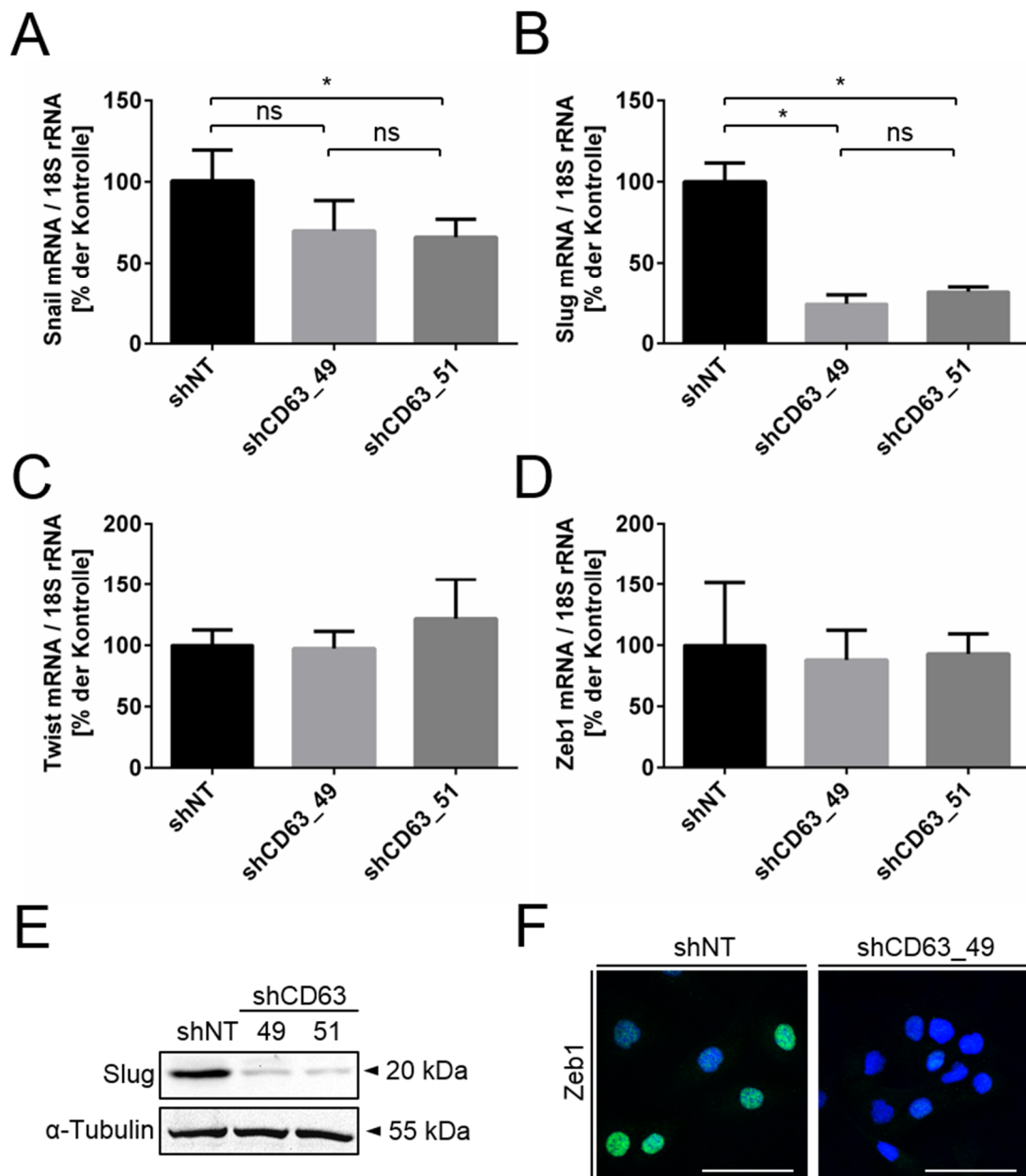
reguliert, indem die Expression von Schlüsselproteinen der EMT moduliert wird. Diese CD63-abhängige Modulation könnte nachfolgend den aggressiven Phänotyp der Tumorzellen stabilisieren. Das Genexpressionsprofil zeigte, dass mit E-Cadherin einer der am besten etablierten epithelialen Marker (Zeisberg und Neilson, 2009) nach *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL Zellen induziert war. Da die LDA Daten auf der Analyse von cDNA-Pools (zusammengesetzt aus cDNAs von fünf verschiedenen RNA-Extraktionen) beruhen, sollten im nächsten Versuch die LDA Ergebnisse an Hand von Einzelmessungen validiert und anschließend auf Proteinebene bestätigt werden. Die Expressionslevel von E-Cadherin in den shNT Kontrollzellen war sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nur leicht über dem Detektionslimit von TaqMan und Western Blot (Abbildung 5.16A und B). Im Gegensatz dazu lieferte die Analyse der E-Cadherin Expression nach *Knockdown* von CD63 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein deutliches Signal (Abbildung 5.16A und B). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die endogene Expression von CD63 die E-Cadherin Expression inhibiert.



**Abbildung 5.16: Der *Knockdown* von CD63 induziert die Expression von E-Cadherin auf mRNA- und Proteinebene.** (A und B) Quantifizierung der E-Cadherin mRNA-Expression in verschiedenen Varianten der humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. (A) Die mRNA-Expression von E-Cadherin wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  $n = 3$  (shNT = 100 %  $\pm$  11,55 %, shCD63\_49 = 334,20 %  $\pm$  62,78 %, shCD63\_51 = 332,00 %  $\pm$  82,11 %). \*,  $p \leq 0,05$ . ns: nicht signifikant. (B) Repräsentatives Bild eines Western Blots zur Analyse der E-Cadherin Expression in den verschiedenen Varianten der SKOV3ipL Tumorzelllinie.

## 5.15 Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Expression der E-Cadherin-Repressoren Slug und Zeb1

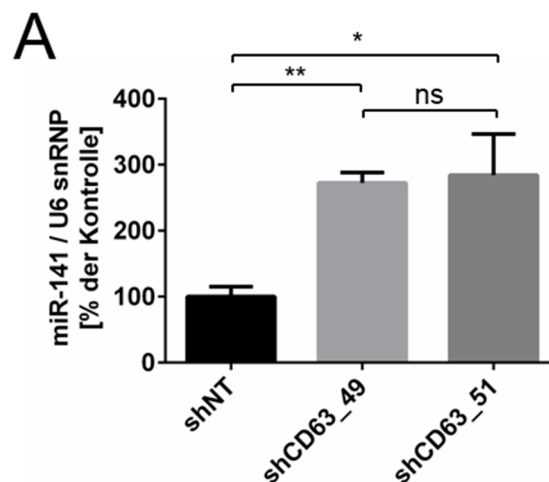
Aus der Fachliteratur ist bekannt, dass die Expression von E-Cadherin vor allem durch das Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren (TF), die die Expression von E-Cadherin herunterregulieren, moduliert wird (Peinado et al., 2007). Hierbei spielen Mitglieder der Snail- und der Zeb-Familie eine bedeutsame Rolle. Basierend auf diesen Informationen und den bisherigen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD63 die Expression von E-Cadherin in den Tumorzellen reduziert, indem die TFs stabilisiert werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die mRNA-Expression der verschiedenen TFs per TaqMan Analyse untersucht und mögliche Veränderungen auf Proteinebene validiert. Der *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL Zellen reduzierte die mRNA-Expression von Snail und Slug (Abbildung 5.17A und B), wobei die mRNA-Expression von Twist und Zeb1 nicht signifikant verändert war (Abbildung 5.17C und D). In Übereinstimmung mit der reduzierten mRNA-Expression nach *Knockdown* von CD63 war auch die Proteinmenge von Slug (Abbildung 5.17E) deutlich reduziert. Während der *Knockdown* von CD63 keinen Einfluss auf die mRNA Level von Zeb1 hatte, konnte eine deutlich verminderte Proteinmenge in der immunzytochemischen Färbung detektiert werden (Abbildung 5.17F). Diese Ergebnisse legen nahe, dass CD63 die Expression von E-Cadherin über die Transkriptionsfaktoren Slug, Snail und Zeb1 reguliert.



**Abbildung 5.17: Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Expression von Snail, Slug, Twist und Zeb1.** (A bis D) Quantifizierung der Snail (A), Slug (B), Twist (C) und Zeb1 (D) mRNA-Expression in verschiedenen Varianten der humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. (A bis D) Die mRNA-Expression des Zielgens wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 2$  (A: shNT = 100 %  $\pm$  18,90 %, shCD63\_49 = 69,92 %  $\pm$  18,69 %, shCD63\_51 = 66,07 %  $\pm$  11,03 %; B: shNT = 100 %  $\pm$  11,55 %, shCD63\_49 = 24,43 %  $\pm$  5,49 %, shCD63\_51 = 31,98 %  $\pm$  2,84 %; C: shNT = 100 %  $\pm$  12,40 %, shCD63\_49 = 97,35 %  $\pm$  14,09 %, shCD63\_51 = 121,80 %  $\pm$  32,22 %; D: shNT = 100 %  $\pm$  51,24 %, shCD63\_49 = 87,00 %  $\pm$  24,41 %, shCD63\_51 = 92,89 %  $\pm$  16,34 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; ns: nicht signifikant. (E) Repräsentative Western Blot-Bilder der Analyse der E-Cadherin Expression in SKOV3ipL Zellen auf Proteinebene. (F) Repräsentative Zeb1-Immunfluoreszenzfärbung (Alexa-488, grünes Signal) zeigt ein deutliches Signal im Zellkern von shNT Kontrollzellen. Nach *Knockdown* von CD63 (shCD63\_49) vermindert sich das Zeb1 Signal deutlich. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

## 5.16 Abhängigkeit der miR-141-Expression von CD63

Die Mitglieder der miR-200 Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellplastizität (Korpal et al., 2008) und regulieren hochspezifisch die Genexpression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die für die Induktion einer EMT unerlässlich sind. Unter anderem ist bekannt, dass miR-141 spezifisch die Expression von Zeb1 reguliert (Burk et al., 2008; Park et al., 2008). Da der *Knockdown* von CD63 keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Zeb1 hatte, die Proteinlevel jedoch deutlich reduziert waren, wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD63 die Expression von Zeb1 über miRNA-141 reguliert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die miR-141-Expression vor und nach *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL Zellen analysiert.



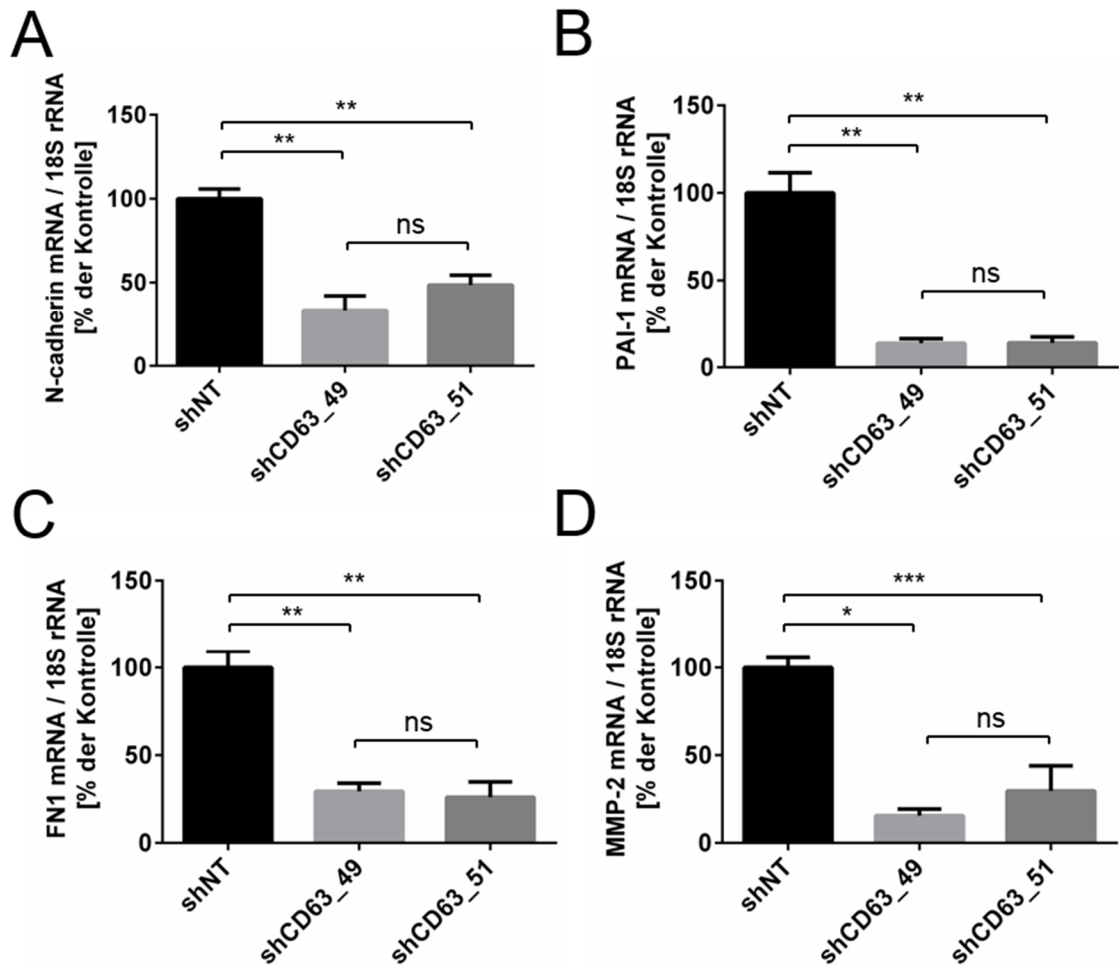
**Abbildung 5.18: Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Expression von miR-141 in SKOV3ipL Tumorzellen.** (A) Quantifizierung der miR-141-Expression in verschiedenen Varianten der humanen SKOV3ipL Ovariakarzinomzelllinie. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Die miR-141-Expression wurde auf die Expression von U6 snRNP normiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  $n = 3$  (shNT = 100 %  $\pm$  15,28 %, shCD63\_49 = 272,40 %  $\pm$  15,74 %, shCD63\_51 = 284,10 %  $\pm$  62,44 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; ns: nicht signifikant.

Die TaqMan Analyse von miR-141 zeigte eine deutlich Induktion der miR-141-Expression (Abb 5.18A) nach *Knockdown* von CD63. Dieser Effekt war unabhängig von der Konfluenz der Zellen (Daten nicht gezeigt). Die durch den *Knockdown* von CD63 induzierte miR-141-Expression könnte die verminderten Slug und Zeb1 Proteinlevel erklären, da miR-141 die Expression dieser TF reduziert. Zusammen genommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass CD63 die E-Cadherin Expression über TFs und miR-141 moduliert und auf diese Weise den spindelförmigen Phänotyp der Tumorzellen stabilisiert.



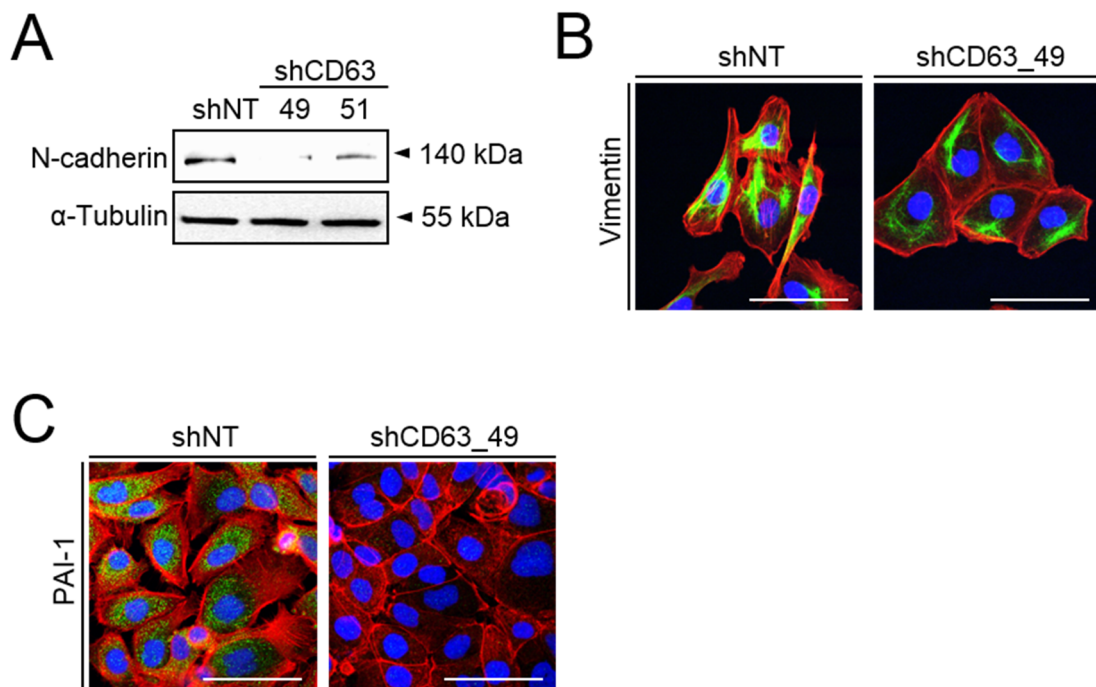
## 5.17 CD63 stabilisiert die Expression von mesenchymalen Markerproteinen

Da der *Knockdown* von CD63 die Expression von E-Cadherin sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene induzierte, stellte sich die Frage, inwiefern sich der *Knockdown* von CD63 auf die Expression von mesenchymalen Markern auswirkt. Erste Hinweise auf eine verminderte Expression von mesenchymalen Markerproteinen konnten an Hand der Analyse des Genexpressionsprofils gewonnen werden. Um diese Ergebnisse zu validieren, wurde die Expression verschiedener, in der Fachliteratur etablierter mesenchymaler Marker (Zeisberg und Neilson, 2009) untersucht. Erstaunlicherweise hatte der *Knockdown* von CD63 zur Folge, dass die mRNA-Expression von allen untersuchten mesenchymalen Markern reduziert war. So war die Expression von N-Cadherin um ca. 60 % (Abbildung 5.19A), von PAI-1 um ca. 85 % (Abbildung 5.19B), von Fibronektin um ca. 70 % (Abbildung 5.19C), von MMP-2 um ca. 85 % (Abbildung 5.19D) und von Vimentin um ca. 40 % (Daten nicht gezeigt) reduziert. Die verminderte mRNA-Expression dieser mesenchymalen Markerproteinen nach *Knockdown* von CD63 konnte in B16F10L Zellen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5.19: Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Expression von mesenchymalen Markerproteinen auf mRNA Ebene.** (A bis D) Quantifizierung der N-Cadherin (A), PAI-1 (B), FN1 (C) und MMP-2 (D) mRNA-Expression in verschiedenen Varianten der humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. (A bis D) Die mRNA-Expression des Zielgens wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (A: shNT = 100 %  $\pm$  5,77 %, shCD63\_49 = 33,47 %  $\pm$  8,56 %, shCD63\_51 = 48,59 %  $\pm$  3,82 %; B: shNT = 100 %  $\pm$  11,55 %, shCD63\_49 = 13,63 %  $\pm$  2,45 %, shCD63\_51 = 13,89 %  $\pm$  3,42 %; C: shNT = 100 %  $\pm$  9,37 %, shCD63\_49 = 29,39 %  $\pm$  4,61 %, shCD63\_51 = 26,07 %  $\pm$  8,79 %; D: shNT = 100 %  $\pm$  5,77 %, shCD63\_49 = 15,55 %  $\pm$  3,80 %, shCD63\_51 = 21,73 %  $\pm$  4,21 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ ; ns: nicht signifikant.

Die verminderte mRNA-Expression dieser Faktoren nach *Knockdown* von CD63 wurde auf Proteinebene per Western Blot oder immunzytochemischer Färbung validiert. Die verminderte Expression der mesenchymalen Markerproteinen konnte für N-Cadherin (Abbildung 5.20A), Vimentin (Abbildung 5.20B), PAI-1 (Abbildung 5.20C) und FN1 (Daten nicht gezeigt) bestätigt werden. Zusammen mit der induzierten E-Cadherin-Expression legen diese Ergebnisse die Induktion einer MET durch den *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL und B16F10L Zellen nahe.

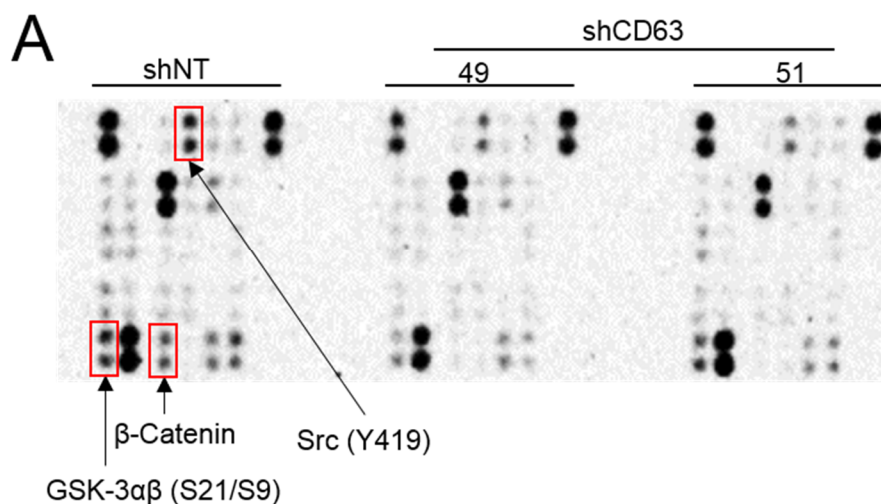


**Abbildung 5.20: Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Expression von mesenchymalen Markern auf Proteinebene.** (A) Repräsentative Western Blot-Bilder der Analyse der N-Cadherin Expression in SKOV3ipL Zellen auf Proteinebene. Der *Knockdown* von CD63 führt zu einer verminderten N-Cadherin Proteinmenge in SKOV3ipL Zellen. (B und C) Repräsentative Vimentin (B) oder PAI-1 (C) Immunfluoreszenzfärbung (Alexa-488, grünes Signal) zeigt ein vermindertes Signal nach *Knockdown* von CD63 (shCD63\_49) im Vergleich zur shNT Kontrolle. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blaues Signal) und des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin (rotes Signal). Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

## 5.18 CD63 reguliert die Kinaseaktivität in SKOV3ipL Tumorzellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass CD63 für die Aufrechterhaltung eines spindelförmigen, aggressiven Tumorzellphänotyps essentiell ist und der *Knockdown* von CD63 eine MET induziert. Um einen ersten Einblick in die durch den *Knockdown* von CD63 modulierten Signalwege in SKOV3ipL zu erhalten, wurde im nächsten Experiment das Phosphorylierungsprofil von 43 verschiedenen Kinasen untersucht. Hierzu wurde der *human Phospho-Kinase Antibody Array* verwendet (in Zusammenarbeit mit H. Cui, IEOT, Klinikum rechts der Isar der TUM) und das Phosphorylierungsprofil der Kontrollzellen mit den *Knockdown*-Zellen verglichen. Der *Knockdown* von CD63 führt zu einer weitreichenden Veränderung des Phosphorylierungsprofils der untersuchten Kinasen in SKOV3ipL Zellen (Abbildung 4.21A). Die einzelnen Spots wurden per Densitometrie

analysiert und als Schwellenwert eine Induktion von 100% oder einer Reduktion von 50 % festgelegt. Spots, deren Signal im Hintergrundrauschen nicht detektiert werden konnte, wurden bei der Auswertung ausgenommen. Der *Knockdown* von CD63 verminderte die  $\beta$ -Catenin Proteinmenge fast vollständig. Zusätzlich war die Phosphorylierung von GSK-3 $\alpha\beta$  (-55 %) und Src (-60 %) deutlich reduziert (Abbildung 5.21A). Sowohl  $\beta$ -Catenin (Eger et al., 2004; Sánchez-Tilló et al., 2011) als auch GSK-3 $\alpha\beta$  (Bachelder et al., 2005; Zheng et al., 2013) und Src (Nagathihalli und Merchant, 2012) spielen bei der EMT von Tumorzellen eine wichtige Rolle. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD63 Signalwege reguliert, die bei der EMT eine wichtige Rolle spielen.

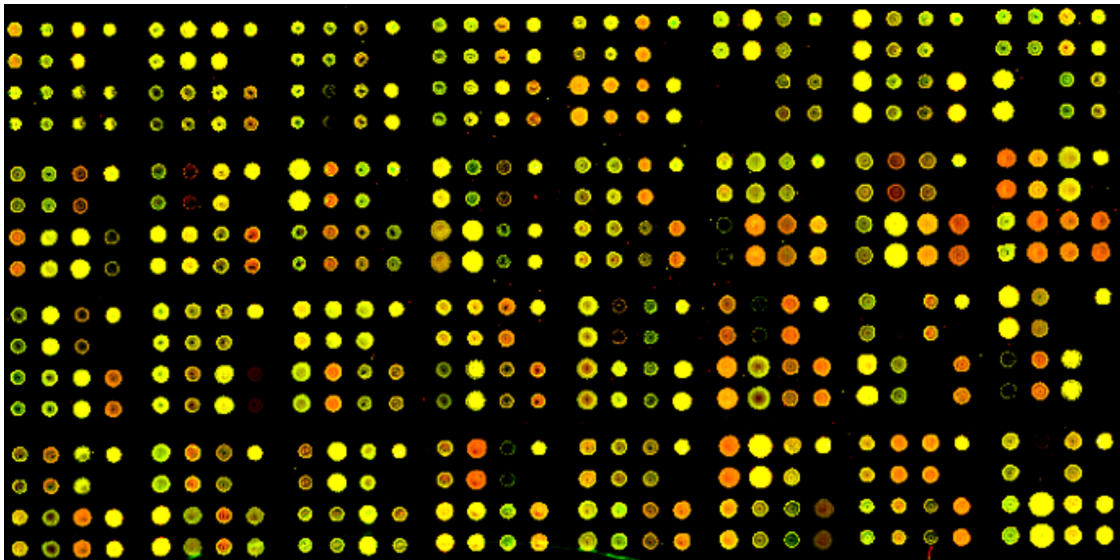


**Abbildung 5.21: Der *Knockdown* von CD63 moduliert die Phosphorylierung verschiedener Kinasen.** (A) Repräsentative Western Blot-Bilder des humanen Phospho-Kinase Array von Zelllysaten der jeweiligen SKOV3ipL Zellvariante. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren.

### 5.19 Panorama Protein Microarray® der SKOV3ipL CD63 *Knockdown* Zellen

Basierend auf der CD63-abhängigen Modulation der Kinaseaktivität sollte der Einfluss von CD63 auf weitere intrazelluläre Signalwege untersucht werden. Hierzu wurde ein *Panorama Protein Microarray* verwendet, der die Erstellung eines Proteinexpressionsprofils von 224 verschiedenen Genen, die eine Schlüsselrolle in verschiedenen intrazellulären Signalwegen einnehmen, ermöglicht (Kopf et al., 2005). Im Vergleich zur shNT Kontrollzelllinie führte der *Knockdown* von CD63 zu einer weitreichenden Veränderung des

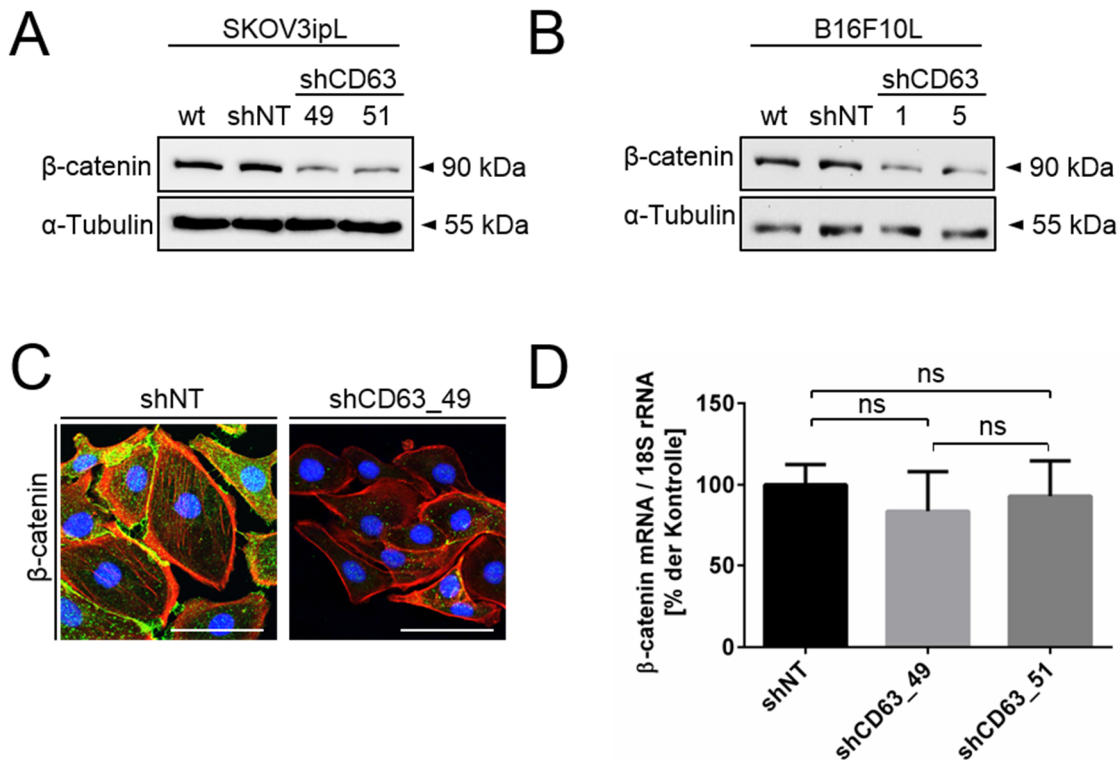
Proteinexpressionsprofil von intrazellulären Signalwegen (Abbildung 5.22A). Als Schwellenwert wurde eine Induktion von 100 % oder eine Reduktion um 50 % verwendet und nur Veränderungen im Proteinexpressionsprofil, die in beiden *Knockdown*-Zelllinien bestätigt werden konnten, ausgewertet. Es zeigte sich, dass die Cytokeratin Expression nach *Knockdown* von CD63 erhöht war, während die Expression von  $\beta$ -Catenin und Grb2 erniedrigt war (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5.22: Der *Knockdown* von CD63 moduliert die Aktivität von verschiedenen intrazellulären Signalwegen.** (A) Repräsentativer Scan des Panorama Microarrays von Zelllysaten der jeweiligen SKOV3ipL Zellvariante. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Proteine der shNT Kontrollzellen wurden Cy3 markiert, Proteine der shCD63\_49 SKOV3ipL Zellen wurden Cy5 markiert.

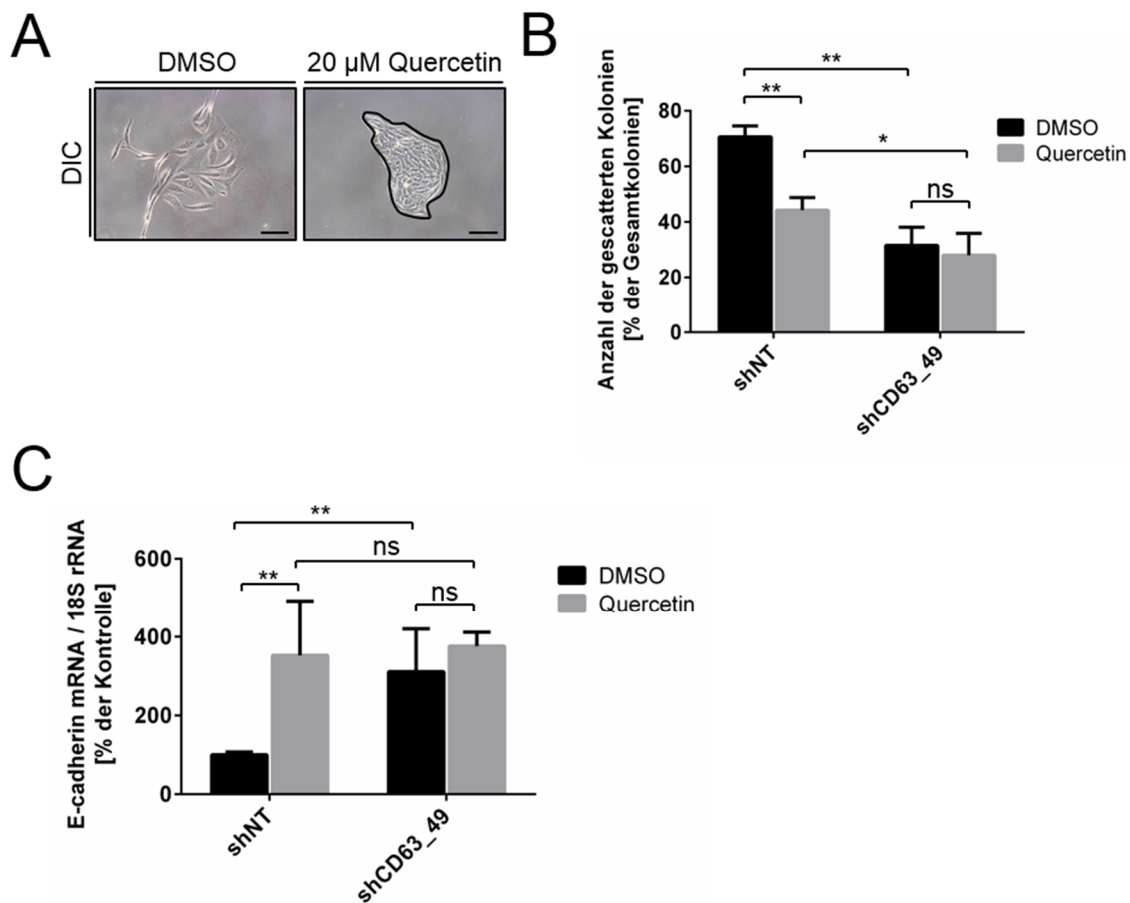
## 5.20 CD63 stabilisiert $\beta$ -Catenin auf Proteinebene

Die LDA Analyse zeigte, dass der CD63 *Knockdown* die Expression der beiden  $\beta$ -Catenin Zielgene, PAI-1 und MMP-2 sowohl in SKOV3ipL als auch in B16F10L Zellen reduziert. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde sowohl im *Phospho-Kinase Antibody Array* als auch im *Panorama Protein Microarray* eine reduzierte Gesamtproteinmenge von  $\beta$ -Catenin nach *Knockdown* von CD63 detektiert. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass  $\beta$ -Catenin für die CD63-abhängige Aggressivität von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden im ersten Schritt die Ergebnisse der beiden Protein Arrays validiert (Abbildung 5.23).



**Abbildung 5.23: Der Knockdown von CD63 reduziert die intrazelluläre Gesamtproteinmenge von β-Catenin.** (A und B) Repräsentative Bilder eines Western Blots der β-Catenin Expression in Varianten der SKOV3ipL (A) und B16F10L (B) Tumorzelllinien. (C) Repräsentative β-Catenin-Immunfluoreszenzfärbung (Alexa-488, grünes Signal) zeigt ein deutliches Signal in SKOV3ipL shNT Kontrollzellen. Nach *Knockdown* von CD63 (shCD63\_49) ist das β-Catenin Signal deutlich vermindert. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blaues Signal) und des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin (Rhodamin, rotes Signal). Maßstabsbalken: 50 μm. (D) Quantifizierung der β-Catenin mRNA-Expression in verschiedenen Varianten der humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Die β-Catenin mRNA-Expression wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler. n = 3 (A: shNT = 100 % ± 12,45 %, shCD63\_49 = 83,87 % ± 24,14 %, shCD63\_51 = 93,02 % ± 21,66 %). ns: nicht signifikant.

Der *Knockdown* von CD63 führte zu einer starken Reduktion der zellulären β-Catenin Gesamtproteinmenge in SKOV3ipL (Abbildung 5.23A) und B16F10L Zellen (Abbildung 5.23B). Für die Regulation der Transkription seiner Zielgene muss β-Catenin allerdings im Nukleus lokalisiert sein. Aus diesem Grund wurden SKOV3ipL Zellen fraktioniert und anschließend die Proteinmenge von β-Catenin im Zellkern und im Zytoplasma analysiert (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde eine immunzytochemische Färbung gegen β-Catenin durchgeführt (Abbildung 5.23C). Der *Knockdown* von CD63 verminderte die β-Catenin Proteinlevel sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus (Abbildung 5.23C). Gleichzeitig blieb die mRNA-Expression von β-Catenin nach *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL Tumorzellen jedoch unverändert (Abbildung 5.23D). Diese Ergebnisse deuten auf eine CD63-abhängige Regulation der β-Catenin Aktivität auf Proteinebene hin.



**Abbildung 5.24: Der  $\beta$ -Catenin Inhibitor Quercetin führt zu einer MET der SKOV3ipL Tumorzelllinie.** (A) Repräsentative differentielle Interferenzkontrast-(DIC) Bilder von SKOV3ipL shNT Zellen, die mit 20  $\mu$ M Quercetin oder DMSO für 24 Stunden inkubiert wurden. Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m. (B) Das Scattering der Varianten der SKOV3ipL Tumorzelllinie wurde in einem Scatterassay analysiert. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Dargestellt sind die Durchschnittswerte gescatterter Kolonien  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (B: shNT\_DMSO = 70,63 %  $\pm$  3,97 %, shNT\_Quercetin = 44,24 %  $\pm$  4,55 %, shCD63\_49\_DMSO = 31,55 %  $\pm$  6,55 %, shCD63\_49\_Quercetin = 28,05 %  $\pm$  7,87 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ . ns: nicht signifikant. (C) Analyse der E-Cadherin Expression in den SKOV3ipL Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Die E-Cadherin mRNA-Expression wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  $n = 3$  (A: shNT\_DMSO = 100 %  $\pm$  7,28 %, shNT\_Quercetin = 311,47  $\pm$  108,67 %, shCD63\_49\_DMSO = 352,52 %  $\pm$  139,37 %, shCD63\_49\_Quercetin = 376,14 %  $\pm$  35,46 %). \*\*,  $p \leq 0,01$ . ns: nicht signifikant.

Um die Relevanz von  $\beta$ -Catenin für den CD63 *Knockdown* Phänotyp zu evaluieren, wurde im nächsten Versuch der  $\beta$ -Catenin Inhibitor Quercetin (Park et al., 2005; Shan et al., 2009) eingesetzt. Die Inkubation der SKOV3ipL Zellen mit Quercetin induzierte eine Transition des spindelförmigen SKOV3ipL Tumorzellphänotyps. Die Behandlung der shNT Kontrollzellen mit Quercetin hatte eine epitheliale Morphologie (Abbildung 5.24A), reduziertes Tumorzell-Scattering (Abbildung 5.24B) und eine erhöhte mRNA-Expression von E-Cadherin (Abbildung 5.24C) zur Folge. Interessanterweise sind diese durch den  $\beta$ -Catenin Inhibitor Quercetin induzierten Veränderungen vergleichbar mit dem Effekt des

CD63 *Knockdowns*. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD63 seine pro-metastatische Funktion über  $\beta$ -Catenin vermittelt.

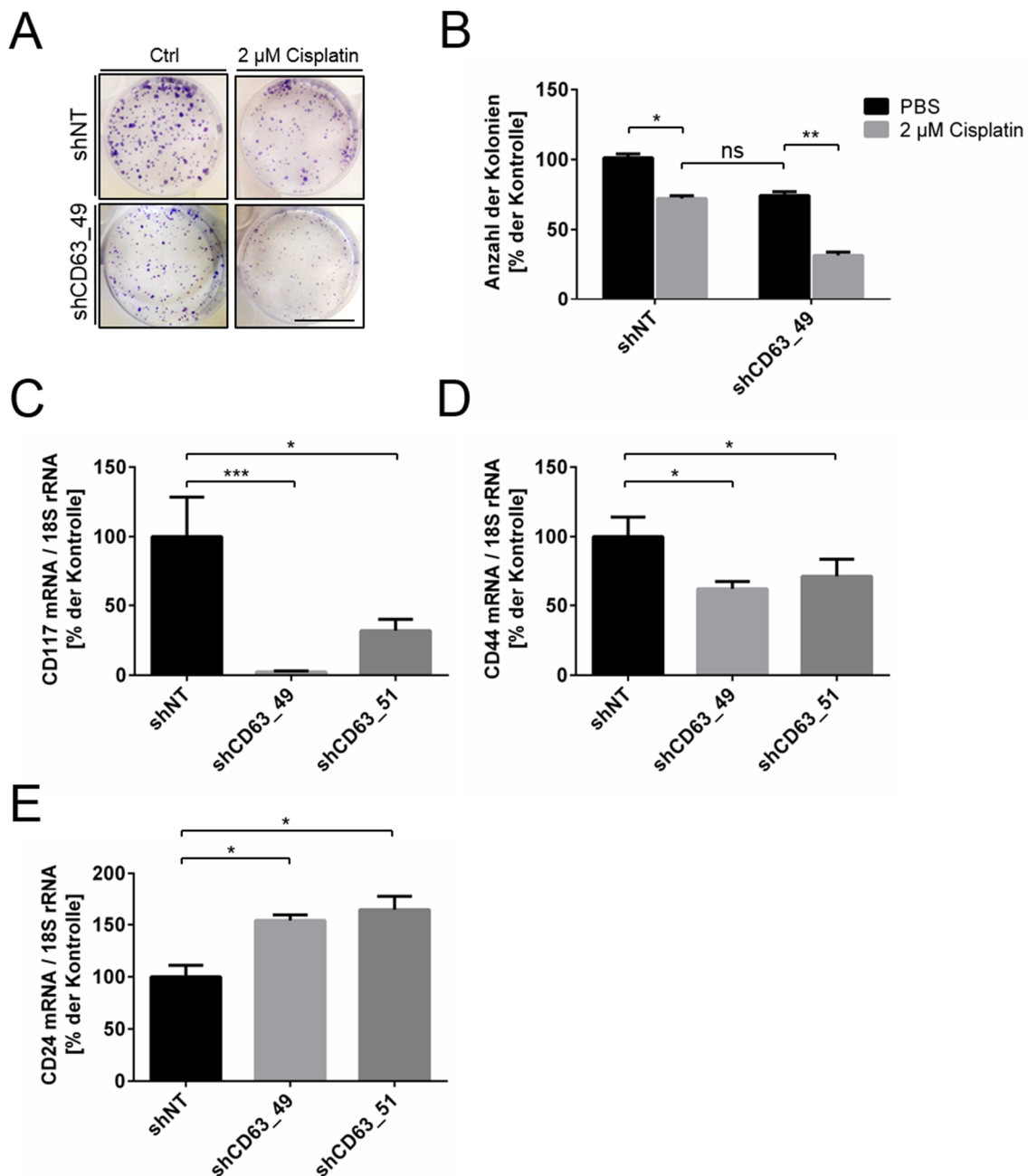
## 5.21 Notwendigkeit von CD63 für die Aufrechterhaltung der Stammzelleigenschaften von Tumorzellen

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass  $\beta$ -Catenin ein wichtiger Faktor für die EMT ist (Kim et al., 2002; Li und Zhou, 2011; Sánchez-Tilló et al., 2011) und darüber hinaus die Stammzelleigenschaften von Tumorzellen moduliert (Yeung et al., 2010; Cai und Zhu, 2012). Diese Stammzelleigenschaften spielen in der Therapie von Krebspatienten eine besondere Rolle. Man geht davon aus, dass die Chemoresistenz sowie die Rezidivrate durch die Stammzelleigenschaften von Tumorzellen bestimmt wird (Liu et al., 2007; Lobo et al., 2007) und nur die sogenannten Krebsstammzellen (CSCs, engl. *cancer stem cells*) in der Lage sind, Metastasen im Sekundärorgan zu bilden (Zhang et al., 2008; Creighton et al., 2010). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der EMT und den Stammzelleigenschaften von Tumorzellen gibt (Mani et al., 2008). Basierend auf diesen Informationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD63 über die Regulation der EMT die Stammzelleigenschaften von Tumorzellen moduliert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Fähigkeit der Tumorzellvarianten zur Koloniebildung und die Resistenz der Tumorzellvarianten gegenüber Cisplatin, das häufig bei der Behandlung von Ovarialkarzinomerkkrankungen verwendet wird (Helm und States, 2009; Haslehurst et al., 2012), analysiert. Im Vergleich zur shNT Kontrolle führte der *Knockdown* von CD63 zu einer Reduktion der Koloniebildung um ca. 50 % (Abbildung 5.25A und B). Dieser Effekt konnte in B16F10L Zellen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Weiter war die Chemoresistenz der SKOV3ipL Zellen gegenüber Cisplatin nach *Knockdown* von CD63 deutlich reduziert (Abbildung 5.25A und B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD63 die Stammzelleigenschaften von Tumorzellen beeinflusst.

Um die Rolle von CD63 bei der Aufrechterhaltung der Stammzelleigenschaften von Tumorzellen genauer zu untersuchen, wurde die Expression von CD133, CD117, CD44 und CD24 bestimmt. Diese Gene spielen für die Identifikation von Krebsstammzellen eine wichtige Rolle (Medema, 2013). Übereinstimmend mit den reduzierten Stammzelleigenschaften der Tumorzellen nach *Knockdown* von CD63, zeigten die Zellen mit verminderter CD63 Expression eine reduzierte mRNA-Expression von CD117 und



CD44, während die Expression von CD24, einem Marker, der bei Stammzellen reduziert ist, induziert war (Abbildung 5.25 C bis E). Diese Ergebnisse weisen auf eine wichtige Funktion von CD63 für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften von Tumorzellen hin.

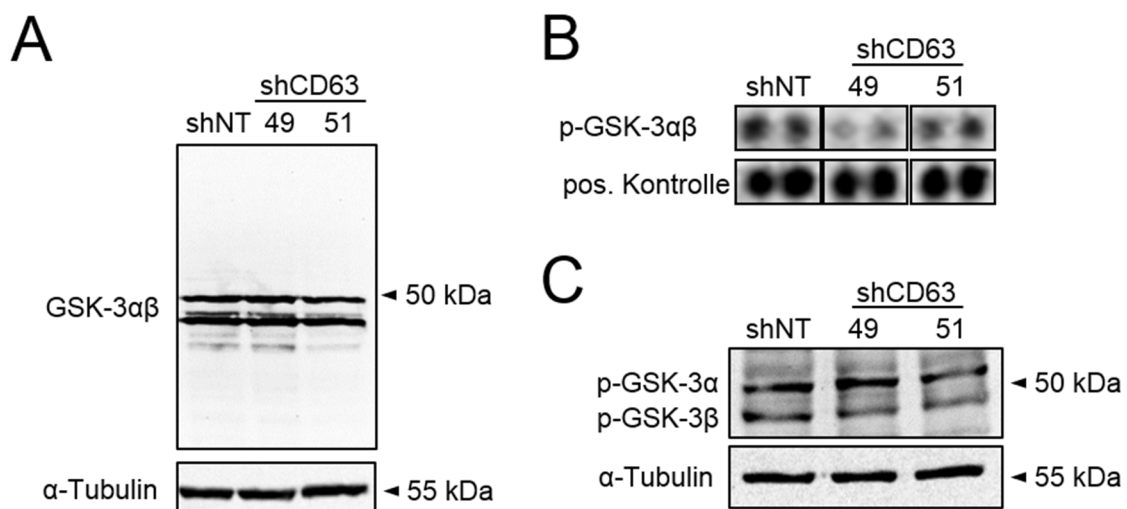


**Abbildung 5.25: Der Knockdown von CD63 reduziert die Koloniebildung und Chemoresistenz der SKOV3ipL Tumorzelllinie.** (A und B) Die SKOV3ipL Zellen wurden auf 6 Well-Platten ausgelegt und mit 2  $\mu$ M Cisplatin behandelt. Nach einer Inkubation der Zellen für 7 bis 10 Tage wurden die Kolonien mit Kristallviolett gefärbt. (A) Repräsentative Bilder des klonogenen Assays. Maßstabsbalken: 1 cm. (B) Die Kolonien wurden ausgezählt. Dargestellt sind die Durchschnittswerte der Anzahl der Kolonien pro Well  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (B: shNT\_Ctrl = 70,63 %  $\pm$  3,97 %, shNT\_Cisplatin = 44,24 %  $\pm$  4,55 %, shCD63\_49\_Ctrl = 31,55 %  $\pm$  6,55 %, shCD63\_49\_Cisplatin = 28,05 %  $\pm$  7,87 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ . ns: nicht signifikant. (C bis E) Analyse der E-Cadherin (C), CD44 (D) und CD24 (E) Expression in den SKOV3ipL Zellen. Die mRNA-Expression wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  $n = 3$  (C: shNT = 100 %  $\pm$  37,28 %, shCD63\_49 = 11,47  $\pm$  4,63 %, shCD63\_51 = 42,42 %  $\pm$  13,72 %; D: shNT = 100 %  $\pm$  22,18 %, shCD63\_49 = 65,23  $\pm$  7,21 %, shCD63\_51 = 71,34 %  $\pm$  14,92 %; E: shNT = 100 %  $\pm$  17,54 %, shCD63\_49 = 153,11  $\pm$  8,67 %, shCD63\_51 = 161,46 %  $\pm$  18,12 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ . ns: nicht signifikant.

## 5.22 CD63 stabilisiert die Aktivität von GSK-3 $\beta$

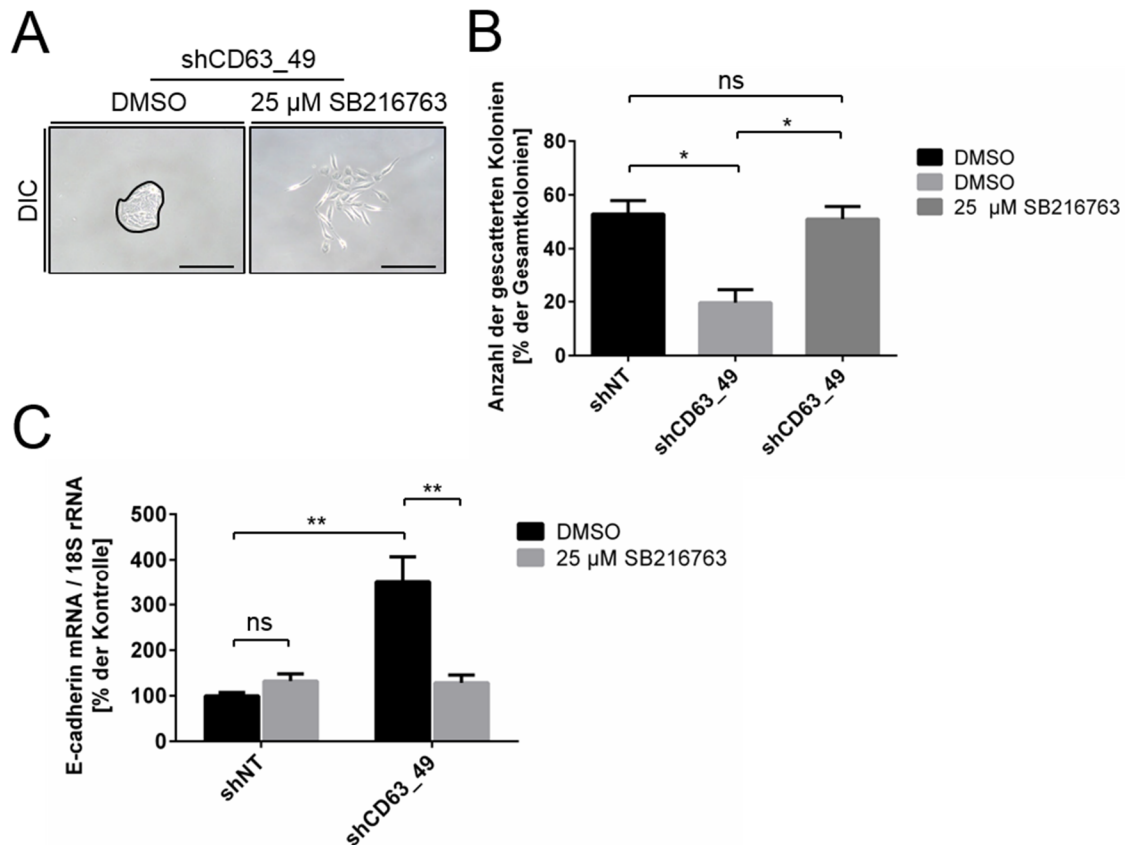
Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass CD63  $\beta$ -Catenin auf Proteinebene reguliert. Die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK-3)  $\beta$  spielt eine Schlüsselrolle in der negativen Regulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs (Ikeda et al., 1998; Kikuchi, 1999; Liu et al., 2002). Hierbei ist eine GSK-3 $\beta$ -abhängige Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin auf Proteinebene in der Fachliteratur beschrieben (Ikeda et al., 1998). Die GSK-3 $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin führt zur Ubiquitinierung und nachfolgend zur Degradation durch die Proteasomen (Chen et al., 2014). Die Aktivität von GSK-3 $\beta$  ist über eine Phosphorylierung des Serin 9 reguliert (Cross et al., 1994; Stambolic und Woodgett, 1994; Sutherland et al., 1993). Aufgrund dieser Informationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD63  $\beta$ -Catenin auf Proteinebene über die Inhibition von GSK-3 $\beta$  stabilisiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Phosphorylierungsstatus von GSK-3 $\beta$  analysiert.

Der Western Blot zeigte eine deutliche Reduktion von p-GSK-3 $\beta$  nach *Knockdown* von CD63, während die Gesamtproteinmenge von GSK-3 $\alpha\beta$  unverändert war (Abbildung 4.26A, B und C). Die Reduktion der GSK-3 $\beta$  Phosphorylierung bei gleichbleibender Gesamtproteinmenge erhöht die Aktivität von GSK-3 $\beta$ . Die Aktivierung von GSK-3 $\beta$  führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und fördert somit die Degradation von  $\beta$ -Catenin durch die Proteasomen. Die erhöhte Aktivität von GSK-3 $\beta$  könnte die verminderte  $\beta$ -Catenin Proteinmenge nach CD63 *Knockdown* erklären.



**Abbildung 5.26: Knockdown von CD63 reduziert die Phosphorylierung von GSK3- $\beta$ .** (A und C) Repräsentative Bilder des Western Blots zur GSK-3 $\alpha\beta$  Expression (A) und des Phosphorylierungsstatus von GSK-3 $\alpha$  und  $\beta$  (B) in SKOV3ipL Tumorzellen, die entweder eine CD63-spezifische shRNA (shCD63\_49 und shCD63\_51) oder die entsprechende non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. (B) Repräsentative Bilder des *human Phospho-Kinase Arrays* von RD zeigen den Phosphorylierungsstatus von GSK-3 $\alpha\beta$ .

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD63 den mesenchymalen Tumorzellphänotyp über die Inhibition von GSK-3 $\beta$  stabilisiert. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden im nächsten Versuchsansatz GSK-3 $\beta$  Inhibitoren verwendet. Die Inhibitoren sollten in der Lage sein, vorausgesetzt CD63 stabilisiert  $\beta$ -Catenin über die Inhibition von GSK-3 $\beta$ , die Auswirkungen des CD63 *Knockdowns* umzukehren.



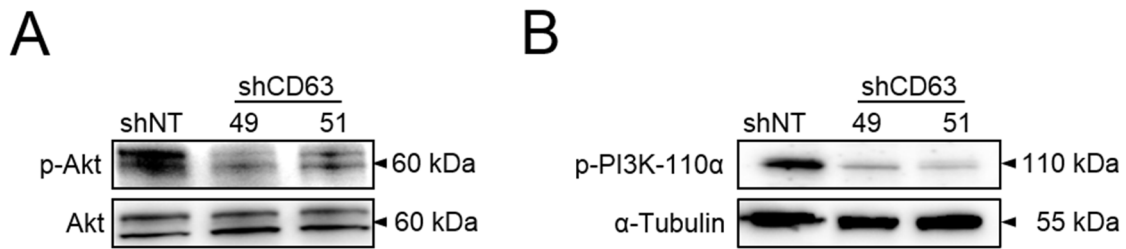
**Abbildung 5.27: Der GSK-3 $\alpha$  Inhibitor SB 216763 führt zu einer EMT der CD63 *Knockdown* Tumorzellen.** (A) Repräsentative differentielle Interferenzkontrast (engl. *differential interference contrast*) Bilder von SKOV3ipL mit verminderter CD63 Expression (shCD63\_49), die für 24 Stunden mit 25  $\mu$ M SB216763 oder DMSO inkubiert wurden. Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m. (B) Das Scattering der Varianten der SKOV3ipL Tumorzelllinie wurde in einem Scatterassay analysiert. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Zelllinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Dargestellt sind die Durchschnittswerte gescatterter Kolonien  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (B: shNT\_DMSO = 52,88 %  $\pm$  5,05 %, shCD63\_49\_DMSO = 19,66 %  $\pm$  4,80 %, shCD63\_49\_SB216763 = 51,01 %  $\pm$  4,70 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ . ns: nicht signifikant. (C) Analyse der E-Cadherin Expression in den SKOV3ipL Zellen nach Behandlung mit 25  $\mu$ M SB216763. Die E-Cadherin mRNA-Expression wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  $n = 3$  (shNT\_DMSO = 100 %  $\pm$  7,19 %, shNT\_SB216763 = 132,44  $\pm$  15,51 %, shCD63\_49\_DMSO = 350,30 %  $\pm$  56,28 %, shCD63\_49\_SB216763 = 128,6 %  $\pm$  16,82 %). \*\*,  $p \leq 0,01$ . ns: nicht signifikant.

In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der CD63 *Knockdown* Zellen mit den beiden GSK-3 $\beta$  Inhibitoren SB 216763 (Abbildung 5.27) und SB 415289 (Daten nicht

gezeigt) zu einer Umkehr des *Knockdown*-Phänotyps führte. Tatsächlich waren sowohl die Morphologie (Abbildung 5.27A), als auch das Scattering (Abbildung 5.27B) und die Expression von E-Cadherin (Abbildung 5.27C) in den CD63 *Knockdown* Zellen nach Inkubation mit den Inhibitoren vergleichbar zu der shNT Kontrolle. Gleichzeitig hatte die Inkubation der shNT Kontrollzellen keine Veränderungen der Tumorzellmorphologie, des Scattering oder der Expression von E-Cadherin zur Folge (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass CD63 den Phänotyp der Tumorzellen über eine GSK-3 $\beta$ -abhängige Regulation stabilisiert.

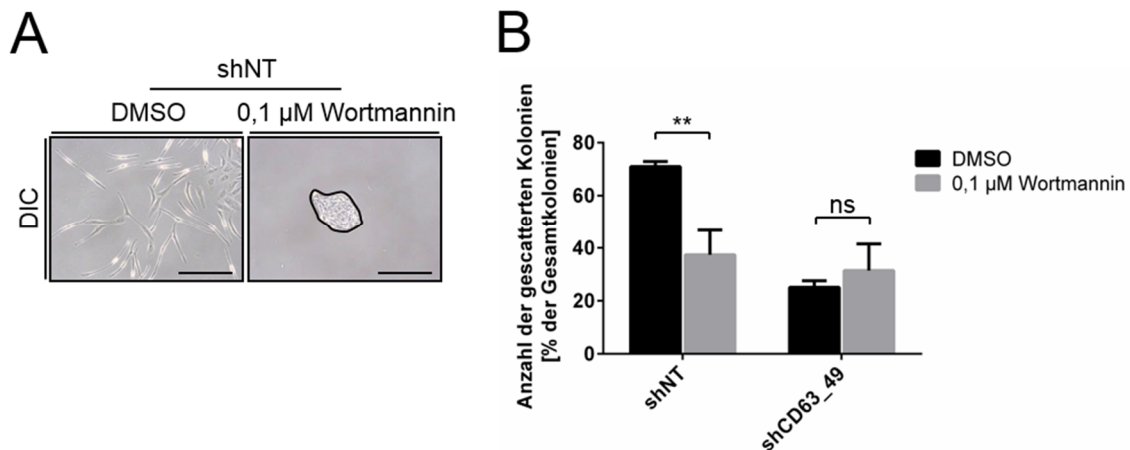
### **5.23 CD63 stabilisiert die Aktivität von PI3K/Akt**

Die Aktivität von GSK-3 $\beta$  wird über die Phosphorylierung von verschiedenen Aminosäureresten reguliert. Nach *Knockdown* von CD63 konnte eine verminderte Phosphorylierung von Serin 9 detektiert werden, die eine erhöhte GSK-3 $\beta$  Aktivität zur Folge hat. Diese Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  wird über den PI3K/Akt Signalweg reguliert. Tatsächlich lieferte der *Panorama Protein Antibody Microarray* erste Hinweise auf eine veränderte Akt Aktivität nach *Knockdown* von CD63. Die reduzierte Aktivität von Akt nach *Knockdown* von CD63 sollte im nächsten Schritt mit Hilfe eines Western Blots validiert werden. Im Vergleich zu den shNT Kontrollzellen war die Gesamtproteinmenge von Akt nach *Knockdown* von CD63 unverändert. Es zeigte sich jedoch, dass der *Knockdown* von CD63 eine deutliche Reduktion der p-Akt Level zur Folge hatte (Abbildung 5.28A). Zusätzlich waren die p-110PI3K Level reduziert (Abbildung 5.28B). Diese Ergebnisse legen nahe, dass CD63 die Aktivität des PI3K/Akt Signalwegs reguliert. Diese Regulation stellt eine mögliche Erklärung für die erhöhte GSK-3 $\beta$  Aktivität nach *Knockdown* von CD63 dar.



**Abbildung 5.28: CD63 moduliert die Aktivität des PI3K/Akt Signalweges.** (A und B) Repräsentative Western Blot-Bilder der Analyse des Akt (A) und des PI3K (B) Phosphorylierungsstatus in Varianten der SKOV3ipL Tumorzelllinie.

Um die Relevanz des veränderten PI3K/Akt Signalwegs für die CD63-abhängige Stabilisierung des spindelförmigen Phänotyps zu untersuchen, wurden im nächsten Experiment verschiedene PI3K/Akt Inhibitoren eingesetzt. Die Behandlung der shNT Kontrollzellen mit den PI3K/Akt Inhibitoren Wortmannin (Abbildung 5.29A und B) oder LY 294002 (Daten nicht gezeigt) führte zu einem epithelialen Tumorzellphänotyp. Diese Veränderungen waren vergleichbar mit den durch den *Knockdown* von CD63 induzierten Veränderungen des Tumorzellphänotyps. Dem gegenüber hatten beide Inhibitoren keine Auswirkungen auf die CD63 *Knockdown* Zellen (Abbildung 5.29B). Diese Ergebnisse zeigen, dass CD63 die Aktivität des PI3K/Akt Signalwegs stabilisiert.

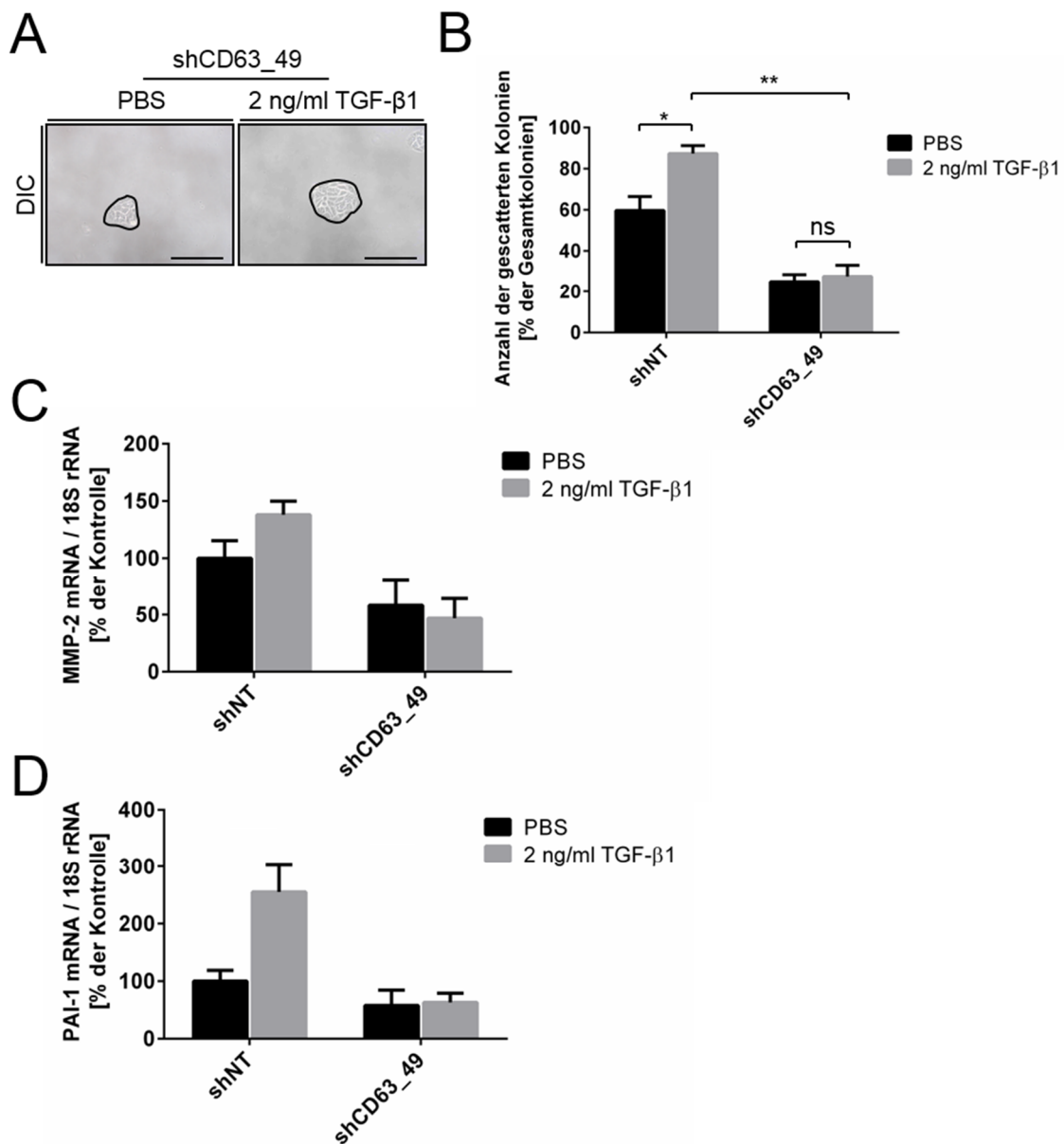


**Abbildung 5.29: CD63 moduliert die Aktivität des PI3K/Akt Signalweges.** (A) Repräsentative differentielle Interferenzkontrast (DIC) Bilder von SKOV3ipL shNT Zellen, die für 24 Stunden mit 0,1 μM Wortmannin oder DMSO inkubiert wurden. Maßstabsbalken: 200 μm. (B) Das Scattering der Varianten der SKOV3ipL Tumorzelllinie wurde in einem Scatterassay analysiert. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder CD63-spezifische (human: shCD63\_49 und shCD63\_51) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Dargestellt sind die Durchschnittswerte gescatterter Kolonien ± Standardfehler. n ≥ 3 (shNT\_DMSO = 70,95 % ± 1,95 %, shNT\_Wortmannin = 37,36 ± 5,43, shCD63\_49\_DMSO = 25,09 % ± 2,45 %, shCD63\_49\_Wortmannin = 31,45 % ± 5,81 %). \*\*, p ≤ 0,01. ns: nicht signifikant

## 5.24 Notwendigkeit von CD63 für die TGF- $\beta$ 1-induzierte EMT

Die EMT ist ein reversibler Prozess, der durch eine MET umgekehrt werden kann. In der Tat müssen Tumorzellen ihren Phänotyp während der malignen Progression mehrmals ändern, um sich an verschiedene physiologische Situationen anzupassen (Brabletz, 2012; Thompson und Haviv, 2011). Im nächsten Versuch sollte überprüft werden, ob die durch den *Knockdown* von CD63 induzierte MET der SKOV3ipL Tumorzellen durch die Inkubation mit einem EMT-Induktor umgekehrt werden kann. Hierzu wurde der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 eingesetzt. Dieser Wachstumsfaktor ist einer der am besten beschriebenen Induktoren der EMT (Massagué, 2008; Zeisberg und Neilson, 2009). Interessanterweise ist bekannt, dass TGF- $\beta$ 1 die EMT unter anderem über den PI3K/Akt Signalweg induzieren kann (Katsuno et al., 2013). Um die Effekte der TGF- $\beta$ 1 Inkubation zu untersuchen, wurden zuerst die Auswirkungen auf das Scattering der verschiedenen SKOV3ipL Tumorzellvarianten analysiert.

Die shNT Kontrollzellen zeigten eine deutliche Induktion des Scatterings nach Inkubation mit TGF- $\beta$ 1. Im Gegensatz dazu war das Scattering der SKOV3ipL Tumorzellen mit verminderter CD63 Expression nach der Inkubation unverändert (Abbildung 5.30A und B). Weiter wurde die mRNA-Expression von PAI-1 und MMP-2 per TaqMan analysiert. Die mRNA-Expression dieser beiden  $\beta$ -Catenin Zielgene war in den shNT Kontrollzellen nach Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 induziert (Abbildung 5.30C, D). Demgegenüber führte die TGF- $\beta$ 1 Inkubation zu keinem signifikanten Anstieg der Faktoren nach *Knockdown* von CD63 (Abbildung 5.30C, D). Diese Ergebnisse zeigen, dass der *Knockdown* von CD63 die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber TGF- $\beta$ 1 blockiert und bestärken die Rolle von CD63 als wichtiger Modulator der zellulären Plastizität von Tumorzellen.



**Abbildung 5.30: Die TGF-β1-induzierte Aggressivität ist abhängig von der CD63 Expression der SKOV3ipL Tumorzellen.** (A) Repräsentative differentielle Interferenzkontrast (DIC) Bilder von SKOV3ipL Zellen, die für 24 Stunden mit 2 ng/ml rekombinanten TGF-β1 oder PBS inkubiert wurden. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder eine CD63-spezifische (human: shCD63\_49) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Maßstabsbalken: 200 μm. (B) Das Scattering der Varianten der SKOV3ipL Tumorzelllinie wurde in einem Scatterassay analysiert. Dargestellt sind die Durchschnittswerte gescatterter Kolonien ± Standardfehler.  $n \geq 3$  (B: shNT\_PBS = 51,87 % ± 6,11 %, shNT\_TGFβ1 = 73,91 ± 3,32, shCD63\_49\_PBS = 24,87 % ± 2,95 %, shCD63\_49\_TGFβ1 = 25,00 % ± 5,12 %). \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ . ns: nicht signifikant. (C und D) Analyse der MMP-2 (C) und PAI-1 (D) mRNA-Expression in SKOV3ipL Zellen nach Inkubation mit TGF-β1. Die Zielgen-mRNA-Expression wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler.  $n = 2$  (D: shNT\_PBS = 100 % ± 23,28 %, shNT\_TGFβ1 = 146,97 ± 15,37 %, shCD63\_49\_PBS = 56,22 % ± 23,65 %, shCD63\_49\_TGFβ1 = 51,29 % ± 11,87 %; D: shNT\_PBS = 100 % ± 15,42 %, shNT\_TGFβ1 = 255,01 ± 47,55 %, shCD63\_49\_PBS = 57,76 % ± 26,82 %, shCD63\_49\_TGFβ1 = 63,04 % ± 6,20 %)

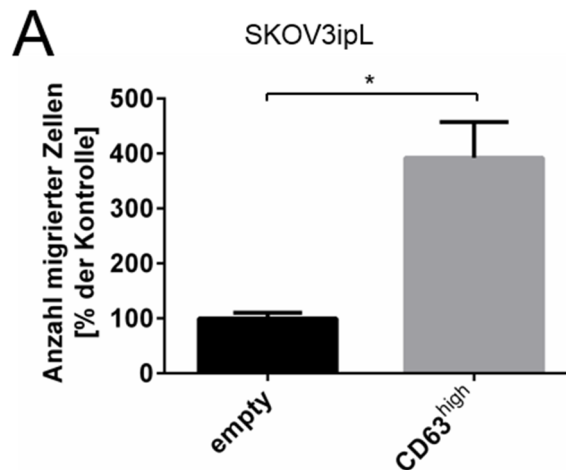
## 5.25 Herstellung von SKOV3ipL Tumorzellvarianten mit einer stabilen Überexpression von CD63

Die bisherigen Ergebnisse zur Funktion von CD63 während der Metastasierung basieren auf Experimenten, die mit Tumorzellen durchgeführt wurden, die eine verminderte Expression von CD63 aufweisen. Die durch diesen Versuchsansatz generierten Ergebnisse deuten auf eine pro-metastatische Funktion von CD63 hin. Basierend auf diesen Informationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Überexpression von CD63 das zell-intrinsische metastatische Potential erhöht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden lentivirale Partikel kloniert und produziert, die die cDNA-Sequenz von humanem CD63 in die Zielzellen einbringen. Die Expression von CD63 wurde hierbei durch zwei verschiedenen starke Promotoren kontrolliert. Anschließend wurden SKOV3ipL Zellen mit den lentiviralen Partikeln infiziert und nachfolgend die CD63 Expression analysiert. Die Transduktion der SKOV3ipL Tumorzellen mit den lentiviralen Partikeln führte zu einer starken Überexpression von CD63. Für die Zelllinie SKOV3ipL konnte eine Überexpression von ca. 250 % (PGK-Promotor) und ca. 630 % (SSFF-Promotor; CD63<sup>high</sup>) erzielt werden (Daten nicht gezeigt, in Zusammenarbeit mit H. Cui (Cui, 2011)).

## 5.26 Die Überexpression von CD63 erhöht die Migration von SKOV3ipL Tumorzellen

Um einen ersten Einblick in die Auswirkungen der CD63 Überexpression auf die Motilität der Tumorzellen zu erhalten, wurde die Migration der verschiedenen Tumorzellvarianten in Boyden Chamber-Migrationsassays untersucht. Es zeigte sich, dass die Überexpression von CD63 in SKOV3ipL Zellen zu einer erhöhten Migration der Tumorzellen führte (in Zusammenarbeit mit H. Cui (Cui, 2011)). In der Tat war die Migration der SKOV3ipL Zellen mit einer erhöhten CD63 Expression im Vergleich zur Kontrolle um ca. 400 % erhöht (Abbildung 5.31A).

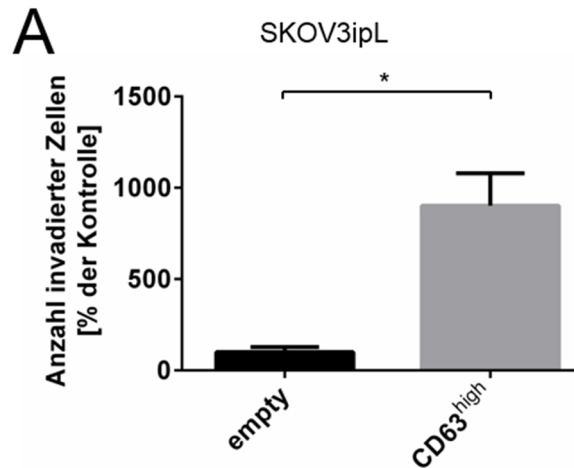




**Abbildung 5.31: Die Überexpression von CD63 erhöht die Motilität von SKOV3ipL Tumorzellen.** (A) Quantifizierung der Migration der humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder den leeren Vektor (empty) oder einen Vektor mit der cDNA von CD63 (CD63<sup>high</sup>) exprimieren. Die Migration der verschiedenen Tumorzellvarianten wurde mittels Boyden Chamber Migrationsassays analysiert. Dargestellt sind der Mittelwert der migrierten Tumorzellen pro Well  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (A: empty = 100 %  $\pm$  10,01 %, CD63<sup>high</sup> = 392,10 %  $\pm$  65,29 %). \*,  $p \leq 0,05$ .

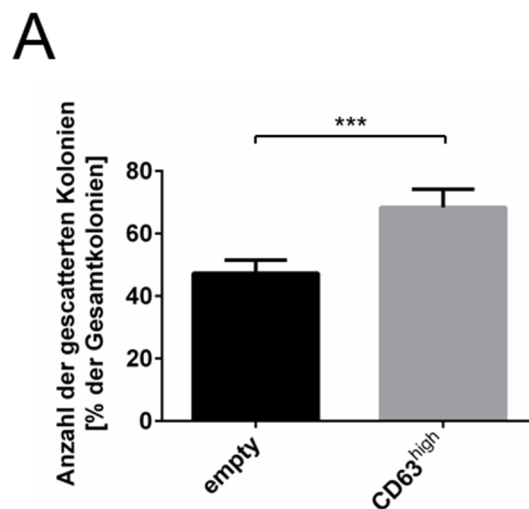
## 5.27 Die Überexpression von CD63 erhöht die Invasion von SKOV3ipL Tumorzellen

Die gesteigerte Migration der SKOV3ipL Zellen mit erhöhten CD63 Leveln ist in Übereinstimmung mit der pro-migratorischen Funktion von CD63, die mit Hilfe des CD63 *Knockdowns* identifiziert wurde. Gleichzeitig konnte in der *Knockdown* Studie eine pro-invasive Funktion von CD63 identifiziert werden. Um diese pro-invasive Rolle von CD63 zu bestätigen, wurde die Invasion der Tumorzellen in Boyden Chamber-Invasionsassays untersucht. Die Überexpression von CD63 erhöhte der Invasion der SKOV3ipL Zellen um ca. 900 % (Abbildung 5.32A). Diese Ergebnisse bestätigen die pro-invasiven Eigenschaften von CD63. Die Versuche mit den CD63 *Knockdown*-Zellen deuten auf eine Verbindung zwischen CD63 und dem Scatteringpotential der Tumorzellen hin. Um diese Assoziation zu überprüfen, wurde das Scattering-Verhalten der Tumorzellen nach CD63 Überexpression untersucht.



**Abbildung 5.32: Die Überexpression von CD63 erhöht die Invasion von SKOV3ipL Tumorzellen.** (A) Quantifizierung der Invasion der humanen SKOV3ipL Ovariakarzinomzelllinie. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt die entweder den leeren Vektor (empty) oder einen Vektor mit der cDNA von CD63 (CD63<sup>high</sup>) exprimieren. Die Invasion der verschiedenen Tumorzellvarianten wurde mittels Boyden Chamber Migrationsassays analysiert. Dargestellt sind der Mittelwert der migrierten Tumorzellen pro Well  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (A: empty = 100 %  $\pm$  28,75 %, CD63<sup>high</sup> = 902,40 %  $\pm$  177,50 %;). \*,  $p \leq 0,05$ .

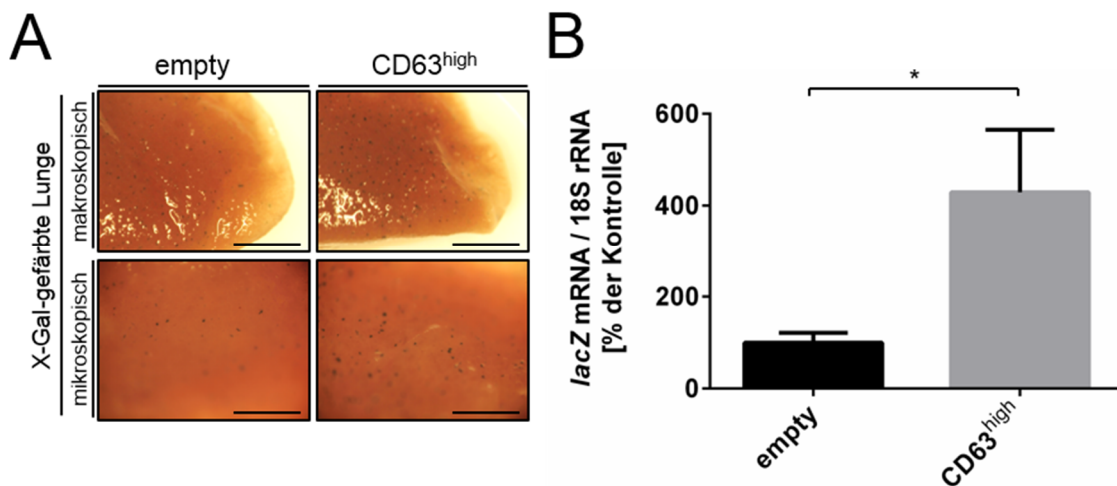
Die Zellen mit einer erhöhten Expression von CD63 zeigten verstärktes Scattering der Tumorzellen (Abbildung 5.33A). Diese Ergebnisse unterstützen die *Knockdown* Versuche und bestärken die pro-metastatische Funktion von CD63.



**Abbildung 5.33: Die Überexpression von CD63 erhöht das Tumorzellschattering von SKOV3ipL Tumorzellen.** (A) Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder den Leervektor (empty) oder die cDNA von CD63 (CD63<sup>high</sup>) exprimieren. Das Scattering der Tumorzellen wurde in einem Scatterassay analysiert. Dargestellt sind die Durchschnittswerte gescatterter Kolonien  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (empty = 53,97  $\pm$  5,10 , CD63<sup>high</sup> = 68,35  $\pm$  5,80 ). \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

## 5.28 Die Überexpression von CD63 erhöht das zell-intrinsische metastatische Potential der SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie

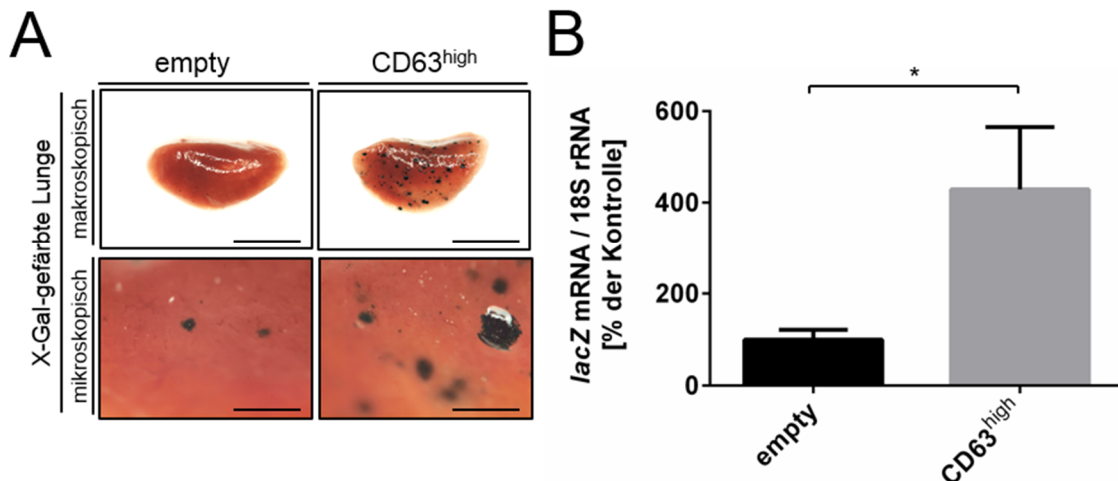
Die verstärkte Migration und Invasion der SKOV3ipL Tumorzellvarianten mit einer erhöhten Expression von CD63 deuten auf ein erhöhtes zell-intrinsisches metastatisches Potential hin. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde ein experimenteller Metastasierungsassay durchgeführt. Hierzu wurden  $5,0 \cdot 10^5$  SKOV3ipL Tumorzellen (empty oder CD63<sup>high</sup>) in die Schwanzvene von NMRI<sup>nu/nu</sup> Mäusen inokuliert. Die Mäuse wurden 24 Stunden oder 35 Tage nach Inokulation der Tumorzellen getötet und die Lungen für eine Analyse des Metastasierungsmusters entnommen. Die Überexpression von CD63 erhöhte die Anzahl der Tumorzellen auf der Oberfläche der Lungen 24 Stunden nach Inokulation der Tumorzellen um ca. 430 % (Abbildung 5.34A und B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass CD63 den Arrest von Tumorzellen in der Lunge fördert.



**Abbildung 5.34: Die Überexpression von CD63 in SKOV3ipL Zellen erhöht den Arrest von Tumorzellen in der Lunge.** (A) Repräsentative Aufnahmen (Übersicht und Nahaufnahme) der Lunge 24 Stunden nach intravenöser Inokulation von  $5 \cdot 10^5$  SKOV3ipL Tumorzellen (CD63<sup>high</sup> oder empty) in die Schwanzvene von NMRI<sup>nu/nu</sup> Mäusen ( $n = 5$ ). Die Lungen wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken: 2 mm (makroskopisch); 0,4 mm (mikroskopisch). (B) Quantifizierung der Gesamttumorzelllast durch Bestimmung der lacZ mRNA-Expression mittels TaqMan Analyse (empty = 100 %  $\pm$  21,21 %, CD63<sup>high</sup> = 429,30 %  $\pm$  136,00 %). \*,  $p \leq 0,05$ . Student's *t* test

35 Tage nach Inokulation der Tumorzellen war die Anzahl der Lungenmetastasen auf der Oberfläche des Organs durch die Überexpression von CD63 um ca. 2000 % erhöht (Abbildung 5.35A, Daten nicht gezeigt). Übereinstimmend war die Gesamttumorlast der Lungen in der CD63<sup>high</sup> Überexpressionsgruppe um 2806 % im Vergleich zur entsprechenden empty Kontrolle erhöht (Abbildung 5.35B). Diese Ergebnisse unterstützen

die *Knockdown* Studie, in der gezeigt werden konnte, dass CD63 eine Schlüsselrolle für das zell-intrinsische Potential der Tumorzellen einnimmt. Hierbei scheint neben dem Tumorzellarrest besonders die Kolonisierung des Sekundärorgans entscheidend beeinflusst zu sein.

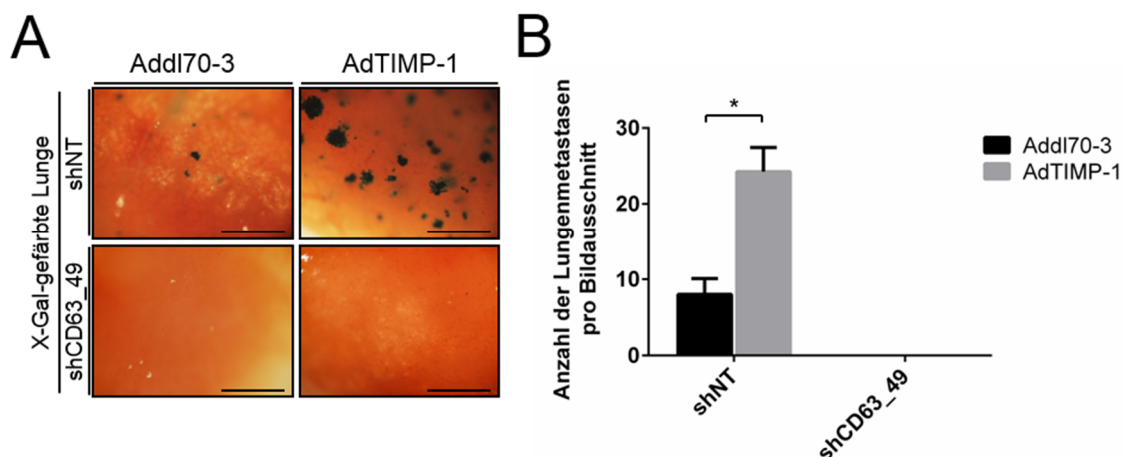


**Abbildung 5.35: Die Überexpression von CD63 in SKOV3ipL Zellen erhöht die Anzahl der Lungenmetastasen.** (A) Repräsentative Aufnahmen (Übersicht und Nahaufnahme) der Lunge 35 Tage nach intravenöser Inokulation von  $5 \cdot 10^5$  SKOV3ipL Tumorzellen (CD63<sup>high</sup> oder empty) in die Schwanzvene von NMRI<sup>nu/nu</sup> Mäusen (n = 5). Die Lungen wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken: 1 cm (mikroskopisch); 0,2 mm (makroskopisch). (B) Quantifizierung der Gesamtumorzelllast durch Bestimmung der lacZ mRNA-Expression mittels TaqMan Analyse (empty = 100 % ± 11,91 %, CD63<sup>high</sup> = 2806,00 % ± 1097,00 %). \*, p ≤ 0,05. Student's t test

## 5.29 Die TIMP-1-induzierte Lungenmetastasierung ist abhängig vom CD63-Status der Tumorzellen

Die pro-metastatische Funktion von CD63 wird oft in Zusammenhang mit einer Interaktion mit TIMP-1 gebracht. So führt die CD63/TIMP-1 Interaktion zu einer erhöhten Apoptoseresistenz von Brustepithelzellen, aktiviert den pro-metastatischen Akt Signalweg in Brustkrebszellen (Ridnour et al., 2012) und fördert die Resistenz gegen Anoikis in Melanomzellen (Toricelli et al., 2013). Hohe systemische TIMP-1 Level korrelieren in beiden Krebsarten mit einer schlechten Prognose (Würtz et al., 2008; Tarhini et al., 2014) und deuten somit auf eine wichtige Funktion von TIMP-1 während der Metastasierung hin. Basierend auf diesen Informationen sollte im nächsten Schritt untersucht werden, inwieweit sich erhöhte systemische TIMP-1 Level auf die CD63-abhängige Lungenmetastasierung auswirken. Die systemischen TIMP-1 Level in NMRI<sup>nu/nu</sup> Mäusen wurden durch

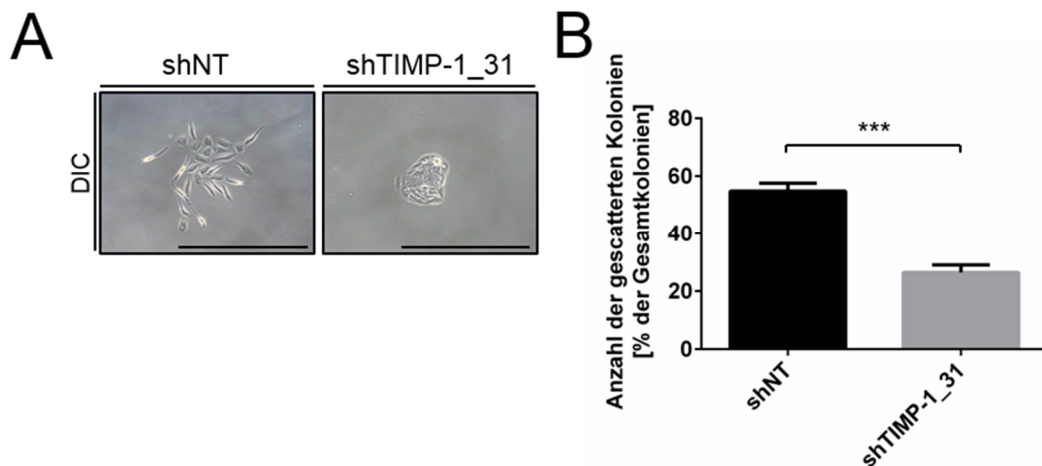
adenoviralen Gentransfer erhöht. Dazu wurden den Mäusen  $5,0 \cdot 10^8$  adenovirale Viruspartikel, die entweder für TIMP-1 kodieren, oder die entsprechende Kontrolle, intravenös appliziert. Die Inokulation der entsprechenden SKOV3ipL Zellvariante ( $1,0 \cdot 10^5$  Zellen) in die Schwanzvene erfolgte drei Tage nach Gentransfer. 35 Tage nach Inokulation der Tumorzellen wurden die Mäuse schließlich getötet und die Lungen zur Analyse der Metastasierung entnommen. Die systemisch erhöhten TIMP-1 Level führten zu einer verstärkten Lungenmetastasierung der SKOV3ipL shNT Kontrollzellen (Abbildung 5.36A). Die Größe der Lungenmetastasen war in Mäusen mit systemisch erhöhten TIMP-1 Leveln deutlich vergrößert (Abbildung 5.36A) und die Anzahl der Lungenmetastasen um ca. 300 % gesteigert (Abbildung 5.36B). Diese pro-metastatische Funktion von TIMP-1 während der Lungenmetastasierung konnte in weiteren Tiermodellen bestätigt werden (unveröffentlichte Daten AG Krüger). Interessanterweise war diese pro-metastatische Funktion von TIMP-1 vom CD63-Status der Tumorzellen abhängig. In der Tat führte der *Knockdown* der CD63 Expression in den Tumorzellen zu einer vollständigen Inhibition der TIMP-1-induzierten Lungenmetastasierung (Abbildung 5.36A und B). Diese Ergebnisse deuten auf eine pro-metastatische Funktion von TIMP-1 bei der Lungenmetastasierung hin und zeigen, dass TIMP-1 diese Funktion nur in Anwesenheit von CD63 auf Seite der Tumorzellen ausüben kann.



**Abbildung 5.36: Der *Knockdown* von CD63 verhindert die Induktion der Lungenmetastasierung durch systemisch erhöhte TIMP-1 Level.** (A) Repräsentative Aufnahmen (Übersicht und Nahaufnahme) der Lunge 35 Tage nach intravenöser Inokulation von  $5 \cdot 10^5$  SKOV3ipL shCD63\_49 oder shNT Tumorzellen in die Schwanzvene von NMRI<sup>nu/nu</sup> Mäusen (n = 5). Drei Tage vor Inokulation der Tumorzellen wurde den Mäusen i.v.  $5,0 \cdot 10^8$  adenovirale Partikel inokuliert. Dabei wurde ein TIMP-1 kodierendes Viruspartikel und die entsprechende Leervektorkontrolle verwendet. Die Lungen wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken: 0,2 mm. (B) Quantifizierung der Lungenmetastasen auf der Oberfläche der Lunge pro Bildausschnitt. (shNT\_Addl =  $8,00 \pm 2,08$ , shNT\_AdT1 =  $24,25 \pm 3,20$ , shCD63\_49\_Addl =  $0,00 \pm 0,00$ , shCD63\_49\_AdT1 =  $0,00 \pm 0,00$ ). \*, p  $\leq 0,05$ .

### 5.30 Der Tumorzellphänotyp nach *Knockdown* von TIMP-1 ähnelt dem Phänotyp nach *Knockdown* von CD63

Die *in vivo* Ergebnisse zeigen, dass die Präsenz von CD63 auf Seite der Tumorzellen für den pro-metastatischen Effekt von TIMP-1 essentiell ist, lassen gleichzeitig aber keine Rückschlüsse auf die Funktion von TIMP-1 zu. Allerdings deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass TIMP-1 seine pro-metastatische Funktion über die Interaktion mit CD63 vermittelt. Um diese Vermutung zu überprüfen, sollte in einem ersten Schritt die Relevanz von TIMP-1 für das zell-intrinsische metastatische Potential der SKOV3ipL Zellen untersucht werden. Hierfür wurde die TIMP-1 Expression von SKOV3ipL Zellen mittels shRNAs vermindert und anschließend die Auswirkungen des *Knockdowns* auf die Morphologie und das Scattering der Tumorzellen *in vitro* analysiert. Die verschiedenen shRNAs führten zu einem effizienten *Knockdown* von TIMP-1 (in Zusammenarbeit mit H. Cui, Daten nicht gezeigt), und die Zellvariante mit dem effizientesten TIMP-1 *Knockdown* wurde für die *in vitro* Analysen weiterverwendet (TRCN0000052431). Interessanterweise führte der *Knockdown* von TIMP-1 zu einer MET der SKOV3ipL Zellen (Abbildung 5.37A) und reduzierte das Tumorzellscattering um etwa 50 % (Abbildung 5.37B). Die Auswirkungen des TIMP-1 *Knockdowns* in SKOV3ipL Zellen weisen eine hohe Ähnlichkeit zu den Effekten des CD63 *Knockdowns* auf. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass TIMP-1 den mesenchymalen Phänotyp von SKOV3ipL Zellen über CD63 stabilisiert. Diese Interaktion von TIMP-1 und CD63 bei der Stabilisierung des Tumorzellphänotyps auf Seite der Tumorzellen könnte erklären, dass die TIMP-1-induzierte Lungenmetastasierung durch einen *Knockdown* von CD63 vollständig blockiert wurde.

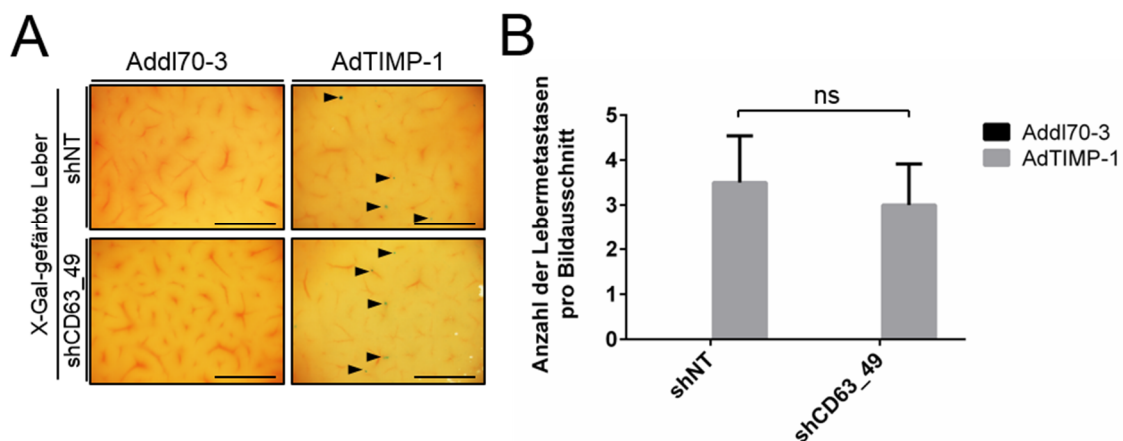


**Abbildung 5.37: Der Knockdown von TIMP-1 reduziert das Tumorzellscattering der SKOV3ipL Zellen.** (A) Repräsentative differentielle Interferenzkontrast (DIC) Bilder von SKOV3ipL Zellen. Mittels lentiviraler Transduktion wurden stabile Varianten der Ziellinien hergestellt, die entweder eine TIMP-1-spezifische (shTIMP-1\_31) oder eine non-targeting (shNT) shRNA exprimieren. Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m. (B) Das Scattering der Tumorzellen wurde in einem Scatterassay analysiert. Dargestellt sind die Durchschnittswerte gescatterter Kolonien  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (shNT = 47,3%  $\pm$  4,19% , shTIMP-1\_31 = 26,45%  $\pm$  2,60% ). \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

### 5.31 Die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung ist unabhängig vom CD63-Status der Tumorzellen

Aus der Klinik ist bekannt, dass erhöhte systemische TIMP-1 Level mit der Lebermetastasierung bei Patienten mit Kolorektalkarzinom korrelieren (Min et al., 2012). Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang liefert die Studie von Kopitz u. a. (Kopitz et al., 2007), die zeigt, dass systemisch erhöhte TIMP-1 Level die Mikroumgebung der Leber verändern und diese Veränderungen zu einer erhöhten Gesamttumorlast der Leber führen. In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass der TIMP-1 Interaktionspartner CD63 für das zell-intrinsische metastatische Potential von Tumorzellen eine bestimmende Rolle spielt. Ausgehend von diesen Informationen sollte im nächsten Schritt die Relevanz der CD63 Expression auf Seite der Tumorzellen für die pro-metastatische Funktion von TIMP-1 bei der Lebermetastasierung untersucht werden. Die systemischen TIMP-1 Level von NMRI<sup>nu/nu</sup> Mäusen wurden durch adenoviralen Gentransfer erhöht, indem  $5,0 \cdot 10^8$  adenovirale Viruspartikel, die entweder für TIMP-1 oder die entsprechenden Kontrolle kodieren, intravenös appliziert wurden. Die Inokulation der entsprechenden SKOV3ipL Zellvariante ( $1,0 \cdot 10^5$  Zellen) in die Schwanzvene erfolgte drei

Tage nach Gentransfer. 35 Tage nach Inokulation der Tumorzellen wurden die Mäuse schließlich getötet und die Organe zur Analyse der Metastasierung entnommen. Unter physiologischen Umständen bilden SKOV3ipL Zellen nach intravenöser Inokulation keine Lebermetastasen. In Übereinstimmung zeigten die Tiere der Kontrollgruppe keine metastatischen Foci in der Leber (Abbildung 5.38A und B). Erstaunlicherweise führten die erhöhten systemischen TIMP-1 Level zu einem veränderten Organtropismus der SKOV3ipL Tumorzellen. So induzierte die systemische Erhöhung von TIMP-1 die Lebermetastasierung (Abbildung 5.38A und B). Dieser veränderte Organtropismus der SKOV3ipL Zellen war unabhängig vom CD63-Status der Tumorzellen (Abbildung 5.38A und B). Zusammen genommen deuten diese Daten darauf hin, dass TIMP-1 die Lebermetastasierung unabhängig vom CD63-Status der Tumorzellen induziert.

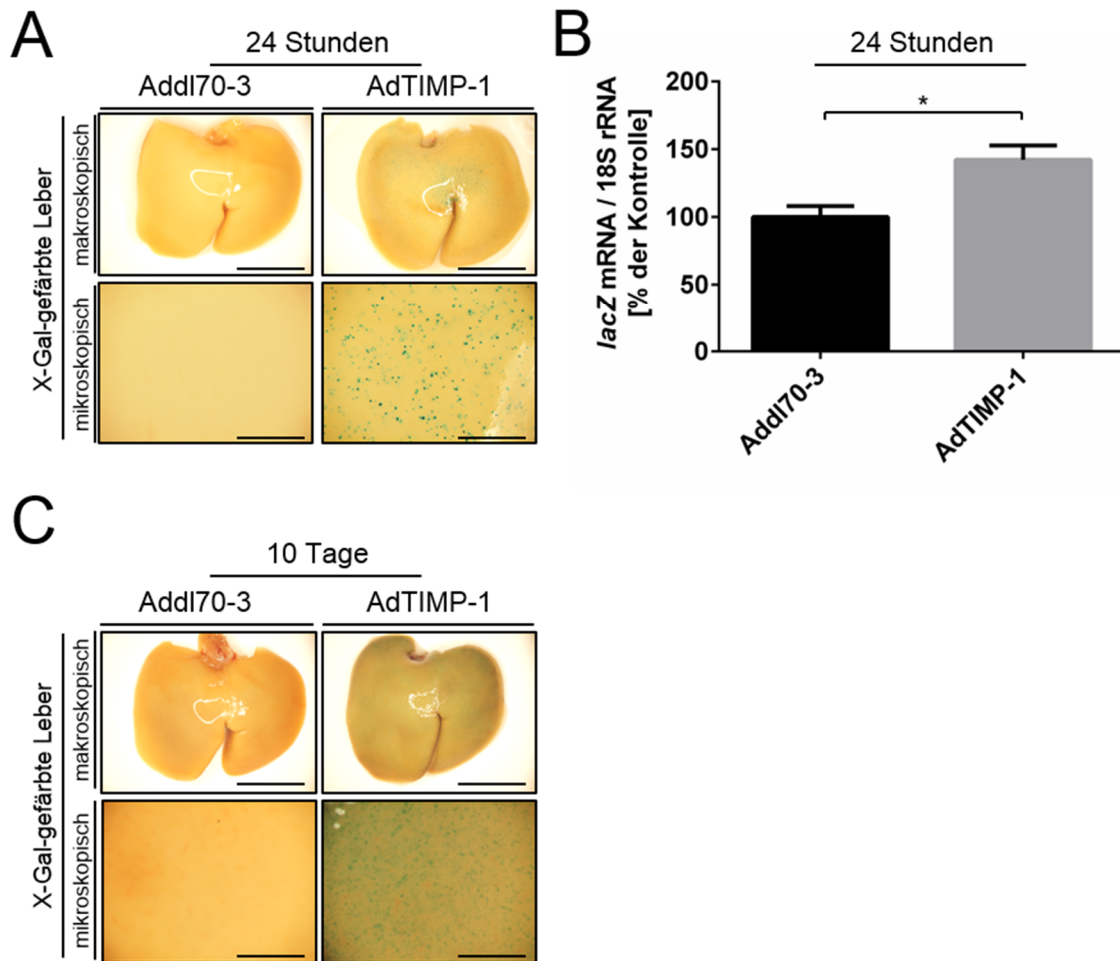


**Abbildung 5.38: Der Knockdown von CD63 in SKOV3ipL Zellen hat keinen Einfluss auf die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung.** (A) Repräsentative Aufnahmen (Übersicht und Nahaufnahme) der Leber 35 Tage nach intravenöser Inokulation von  $5 \cdot 10^5$  SKOV3ipL shCD63\_49 oder shNT Tumorzellen in die Schwanzvene von NMRI<sup>mu/nu</sup> Mäusen (n = 5). Drei Tage vor Inokulation der Tumorzellen wurden den Mäusen i.v.  $5,0 \cdot 10^8$  adenovirale Partikel inokuliert. Dabei wurde ein TIMP-1 kodierendes Viruspartikel und die entsprechende Leervektorkontrolle verwendet. Die Lungen wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken: 0,2 mm. (B) Quantifizierung der Lungenmetastasen auf der Oberfläche der Lunge pro Bildausschnitt. (shNT\_Addl =  $0,00 \pm 0,00$ , shNT\_AdT1 =  $3,50 \pm 1,04$ , shCD63\_49\_Addl =  $0,00 \pm 0,00$ , shCD63\_49\_AdT1 =  $3,00 \pm 0,91$ ). ns = nicht signifikant.



### **5.32 Die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung ist unabhängig vom zell-intrinsischen metastatischen Potential der Tumorzellen**

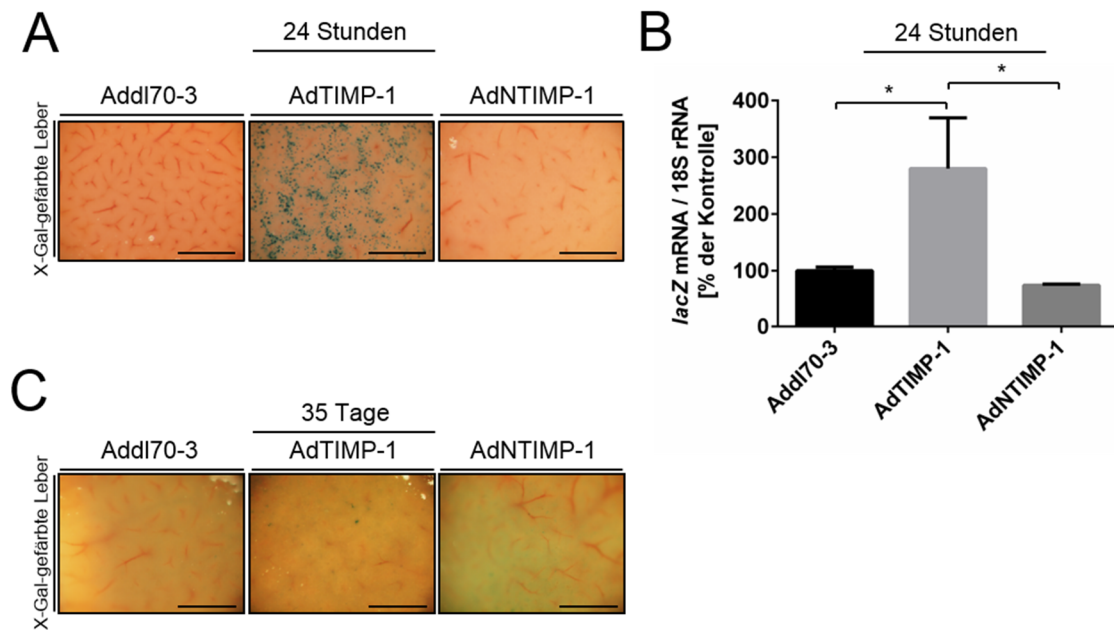
Der *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL und B16F10L Zellen führte zu einer deutlichen Reduktion des zell-intrinsischen metastatischen Potentials der Tumorzellen. Auf die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung hatte der *Knockdown* von CD63 jedoch keine Auswirkungen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung unabhängig vom zell-intrinsischen metastatischen Potential der Tumorzellen ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte untersucht werden, ob systemisch erhöhte TIMP-1 Level in der Lage sind, die Metastasierung einer nicht-metastatischen Zelllinie (Eb288L) zu induzieren. Dazu wurden die TIMP-1 Level in DBA/2 Mäusen mittels adenoviralem Gentransfer erhöht. Drei Tage danach wurden  $1,0 \cdot 10^6$  Zellen der syngenen nicht-metastatischen Zelllinie (Eb288L) in die Schwanzvene inokuliert. Die Auswirkungen der systemisch erhöhten TIMP-1 Level auf die Metastasierung dieser Zelllinie wurden 24 Stunden bzw. zehn Tage nach Inokulation der Tumorzellen analysiert. In der Kontrollgruppe (Add170-3), konnten weder 24 Stunden (Abbildung 5.39A und B) noch zehn Tage (Abbildung 5.39C) nach Inokulation Eb288L Tumorzellen in der Leber detektiert werden. Im Gegensatz dazu induzierten hohe systemische TIMP-1 Level einen *de novo* Tumorzellarrest 24 Stunden nach Inokulation der Tumorzellen (Abbildung 5.39A (angeleitete Masterarbeit, B. Grünwald) und B). Die Tumorzellen waren in der Lage, 10 Tage in der Lebermikroumgebung zu überleben und konnten vereinzelt Mikrometastasen ausbilden (Abbildung 5.39C (angeleitete Masterarbeit, B. Grünwald)). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass TIMP-1 die Metastasierung der Leber unabhängig vom zell-intrinsischen metastatischen Potential der Tumorzellen induziert.



**Abbildung 5.39: Die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung ist unabhängig vom zell-intrinsischen metastatischen Potential der Tumorzellen.** (A) Repräsentative Aufnahmen (makroskopisch und mikroskopisch) der Leber 24 Stunden nach intravenöser Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  Eb288L Tumorzellen in die Schwanzvene von DBA/2 Mäusen ( $n = 4$ ). Drei Tage vor Tumorzellinokulation wurden die systemischen TIMP-1 Level durch adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 erhöht (TIMP-1) oder das entsprechende Kontrollvirus (Add170-3) inokuliert. Die Lebern wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken = 1 cm (makroskopisch), 0,5 mm (mikroskopisch). (B) Quantifizierung der Gesamttumorzelllast der Leber 24 Stunden nach Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  Eb288L Tumorzellen in Mäuse mit erhöhten TIMP-1 Leveln (AdTIMP-1) oder der entsprechenden Leervektorkontrolle (Add170-3) durch Bestimmung der lacZ mRNA-Expression mittels TaqMan Analyse. Dargestellt sind die Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 4$  (Add170-3 = 100 %  $\pm$  8,12 %, AdTIMP-1 = 142,2 %  $\pm$  10,59 %). nd: nicht detektierbar. \*,  $p \leq 0,05$ . *Student's t* test. (C) Repräsentative Aufnahmen (makroskopisch und mikroskopisch) der Leber 10 Tage nach intravenöser Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  Eb288L Tumorzellen in die Schwanzvene von DBA/2 Mäusen ( $n = 4$ ). Drei Tage vor Tumorzellinokulation wurden die systemischen TIMP-1 Level durch adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 erhöht (TIMP-1) oder das entsprechende Kontrollvirus (Add170-3) inokuliert. Die Lebern wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Makroskopisch: Maßstabsbalken = 1 cm (makroskopisch), 0,5 mm (mikroskopisch).

### 5.33 Notwendigkeit der C-terminalen Domäne von TIMP-1 für die Induktion der Lebermetastasierung

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass weder das zell-intrinsische metastatische Potential noch der CD63-Status der Tumorzellen einen Einfluss auf die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung hat. Allerdings könnte CD63 auf Seite des Wirts bei den TIMP-1-induzierten Veränderungen in der Lebermikroumgebung eine wichtige Rolle spielen. Da für die Interaktion zwischen CD63 und TIMP-1 die C-terminale Domäne von TIMP-1 essentiell ist, sollten im nächsten Versuchsansatz die Effekte einer TIMP-1 Variante untersucht werden, der die C-terminale Domäne fehlt (NTIMP-1). Hierzu wurden neue adenovirale Vektoren hergestellt (in Zusammenarbeit mit Can und K. Honert, beide IEOT, Klinikum rechts der Isar der TUM). Um ein möglichst vollständiges Bild der TIMP-1-induzierten Lebermetastasierung zu erhalten, sollte in den nächsten Versuchen ein syngenes Lungenmetastasierungsmodell verwendet werden. Vergleichbar mit der humanen SKOV3ipL Ovarialkarzinomzelllinie führt die murine PyMTL Brustkrebszelllinie (Vasiljeva et al., 2006) nach Inokulation in die Schwanzvene mit hoher Reproduzierbarkeit zur Ausbildung von Lungenmetastasen (Qian et al., 2009; Werbeck et al., 2013). Drei Tage nach adenoviralem Gentransfer (Add170-3, AdTIMP-1, AdNTIMP-1) wurden den Mäusen  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Zellen in die Schwanzvene inokuliert. 24 Stunden bzw. 35 Tage nach Inokulation der Tumorzellen wurden die Mäuse getötet und das Metastasierungsmuster untersucht. Vergleichbar mit der TIMP-1-induzierten Lebermetastasierung der SKOV3ipL Zellen, führte die Erhöhung der systemischen TIMP-1 Level auch zur Induktion des Tumorzellarrests von PyMTL Zellen in der Leber (Abbildung 5.40A und B). Diese Induktion des Tumorzellarrests durch erhöhte systemische TIMP-1 Level konnte in weiteren *syngen*en und *xenograft* Metastasierungsmodellen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). 35 Tage nach Inokulation der Tumorzellen hatten sich in den Lebern von Tieren mit erhöhten TIMP-1 Leveln vereinzelt Mikrometastasen gebildet (Abbildung 5.40C). Interessanterweise führten hohe systemische NTIMP-1 Level nicht zur Induktion der Metastasierung. Weder 24 Stunden noch 35 Tage nach Inokulation konnten Tumorzellen in der Leber detektiert werden (Abbildung 5.40A bis C). Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Funktion der C-terminalen Domäne von TIMP-1 hin. Da dieser Teil von TIMP-1 für die Interaktion mit CD63 essentiell ist, weisen diese Ergebnisse auf eine mögliche Funktion der TIMP-1/CD63-Interaktion bei der TIMP-1-induzierten Lebermetastasierung hin.

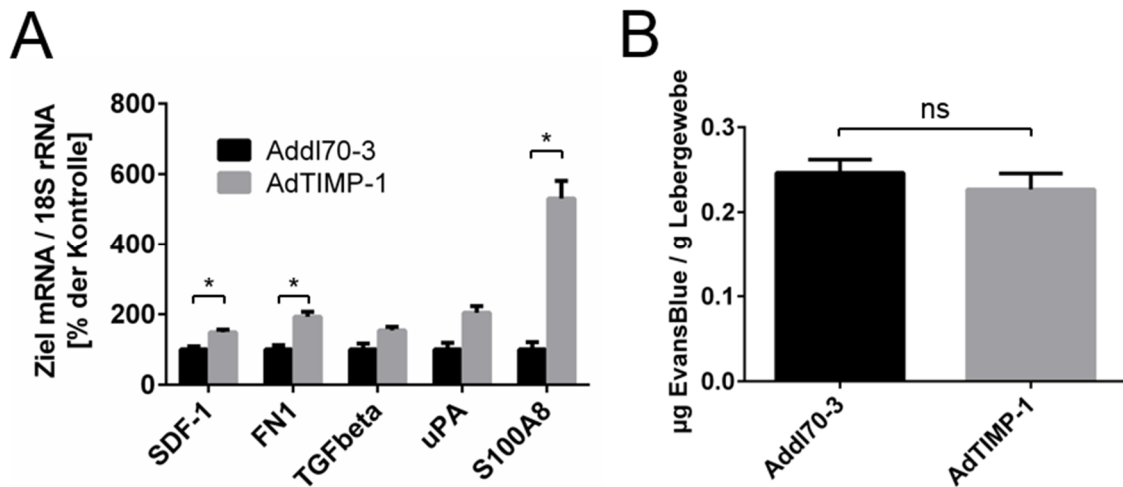


**Abbildung 5.40: Die N-terminale TIMP-1 Domäne allein ist nicht in der Lage die Lebermetastasierung zu induzieren.** (A) Repräsentative Aufnahmen (makroskopisch und mikroskopisch) der Leber 24 Stunden nach intravenöser Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Brustkrebszellen in die Schwanzvene von NMRI<sup>nu/nu</sup> Mäusen ( $n = 4$ ). Drei Tage vor Tumorzellinokulation wurden die systemischen TIMP-1 Level durch adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 (TIMP-1) oder NTIMP-1 (NTIMP-1) erhöht, oder das entsprechende Kontrollvirus (Add170-3) inokuliert. Die Lebern wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken: 0,5 mm. (B) Quantifizierung der Gesamttumorzelllast der Leber 24 Stunden nach Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Tumorzellen in Mäuse mit erhöhten TIMP-1 Leveln (AdTIMP-1) oder der entsprechenden Leervektorkontrolle (Add170-3) durch Bestimmung der lacZ mRNA-Expression mittels TaqMan Analyse. Dargestellt sind die Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler.  $n = 3$  (Add170-3 = 100 %  $\pm$  6,61 %, AdTIMP-1 = 280 %  $\pm$  89,43 %, AdNTIMP-1 = 74,45 %  $\pm$  2,10 %). \*,  $p \leq 0,05$ . Student's *t* test. (C) Repräsentative Aufnahmen (makroskopisch und mikroskopisch) der Leber 10 Tage nach intravenöser Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  Eb288L Tumorzellen in die Schwanzvene von DBA/2 Mäusen ( $n = 4$ ). Drei Tage vor Tumorzellinokulation wurden die systemischen TIMP-1 Level durch adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 (TIMP-1) oder NTIMP-1 (NTIMP-1) erhöht oder das entsprechende Kontrollvirus (Add170-3) inokuliert. Die Lebern wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken = 0,5 mm.

### 5.34 Charakterisierung der TIMP-1-induzierten pro-metastatischen Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber

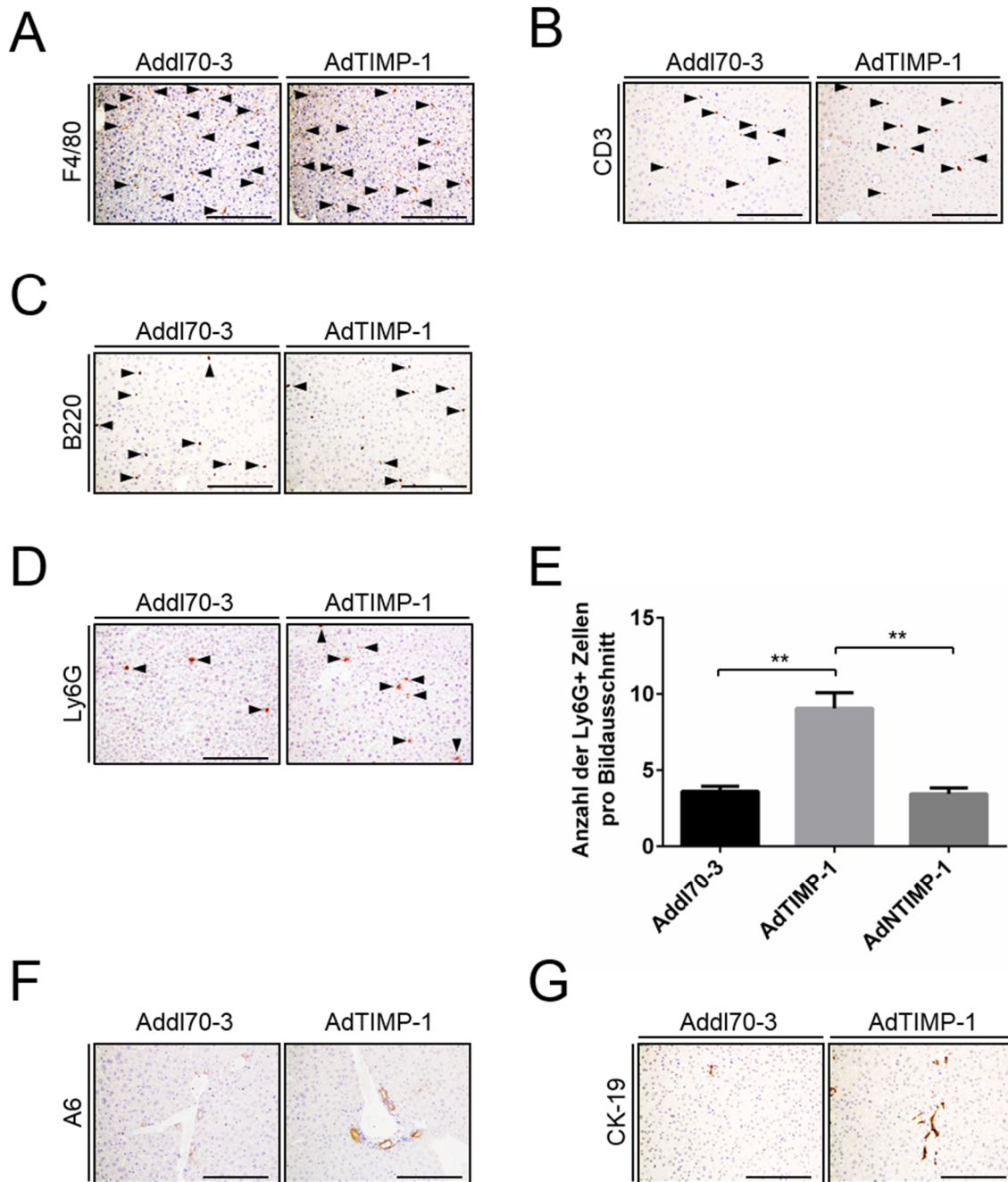
Der von Kopitz et al. identifizierte pro-metastatische Effekt von TIMP-1 auf die Lebermetastasierung kann auf Veränderungen in der Lebermikroumgebung zurückgeführt werden (Kopitz et al., 2007). Der cMet/HGF Signalweg spielt dabei eine entscheidende Rolle und wird durch die inhibitorische Funktion von TIMP-1 moduliert. Im Gegensatz dazu ist der in der vorliegenden Studie identifizierte pro-metastatische Effekt von TIMP-1 von

der nicht-inhibitorischen C-terminalen Domäne, die für die Interaktion mit CD63 notwendig ist (Jung et al., 2006), abhängig. Basierend auf diesen Informationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass hohe systemische TIMP-1 Level pro-metastatische Veränderungen in der Leber induzieren, für die die nicht-inhibitorische Funktion von TIMP-1 entscheidend ist. Für einen ersten Einblick in die TIMP-1-induzierten Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber, wurde ein Genexpressionsprofil der Leber mittels LDA Analyse erstellt und anschließend in Einzelmessungen validiert. Die Analyse der LDA Daten zeigte eine Induktion von verschiedenen pro-metastatischen Faktoren in der Leber von Mäusen mit erhöhten TIMP-1 Leveln (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise ist eine Beteiligung dieser Faktoren bei der Ausbildung einer prä-metastatischen Nische in der Lunge beschrieben (Peinado et al., 2011). Die erhöhte mRNA-Expression dieser Faktoren konnte in Einzelmessungen validiert und eine TIMP-1-induzierte Erhöhung der mRNA-Expression von SDF-1, FN1, TGF- $\beta$ 1, uPA und S100A8 bestätigt werden (Abbildung 5.41A). Neben den Nischenfaktoren war die mRNA-Expression von PAI-1 um das 10-fache induziert (Daten nicht gezeigt). Für die Ausbildung einer prä-metastatischen Nische spielt außerdem die vaskuläre Permeabilität eine bedeutende Rolle. So ist die Permeabilität des Gefäßsystems am Ort der Nische erhöht (Peinado et al., 2012; Hiratsuka et al., 2013). Bei der Untersuchung der vaskulären Permeabilität der Leber zeigte sich, dass hohe systemische TIMP-1 Level die vaskuläre Permeabilität der Leber nicht verändern (Ausbildung 5.41B). Zusammen mit der Induktion der Nischenfaktoren deuten diese Ergebnisse auf eine TIMP-1-induzierte prä-metastatische Nische hin.



**Abbildung 5.41: Systemisch erhöhte TIMP-1 Level führen zu Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber.** (A) Analyse der SDF-1, FN1, TGF- $\beta$ 1, uPA und S100A8 mRNA-Expression in der Leber von Mäusen mit systemisch erhöhten TIMP-1 Leveln (AdTIMP-1) oder der entsprechenden Kontrolle (Addl70-3). Die Zielgen mRNA-Expression wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  $n = 3$  (SDF-1: Addl70-3 = 100 %  $\pm$  9,03 %, AdTIMP-1 = 149,00 %  $\pm$  7,62 %; FN1: Addl70-3 = 100 %  $\pm$  12,22 %, AdTIMP-1 = 193,67  $\pm$  14,01 %; TGF- $\beta$ 1: Addl70-3 = 100 %  $\pm$  17,53 %, AdTIMP-1 = 154,90  $\pm$  10,53 %; uPA: Addl70-3 = 100 %  $\pm$  19,78 %, AdTIMP-1 = 204,40  $\pm$  19,28 %; S100A8: Addl70-3 = 100 %  $\pm$  21,71 %, AdTIMP-1 = 531,70  $\pm$  50,49 %). \*,  $p \leq 0,05$ . (B) Die vaskuläre Permeabilität der Leber wurde durch Injektion von EvansBlue analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert in  $\mu\text{g}$  Evansblue / Gramm Lebergewebe  $\pm$  Standardfehler.  $n = 4$  (Addl70-3 = 0,25  $\pm$  0,02, AdTIMP-1 = 0,23  $\pm$  0,02). ns = nicht signifikant.

Die Immunzellpopulation im Zielorgan der Metastasierung spielt eine entscheidende Rolle für die Ausbildung einer prä-metastatischen Nische (Hiratsuka et al., 2006; Kaplan et al., 2005). Ausgehend von diesen Informationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass TIMP-1 die Suszeptibilität der Leber über die Modulation des hepatischen Immunzellkompartiments induziert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die verschiedenen Immunzellpopulationen in der Leber mittels der Immunhistochemie analysiert und die Lebern von Mäusen mit erhöhten TIMP-1 Leveln mit der entsprechenden Kontrolle verglichen.



**Abbildung 5.42: Systemisch erhöhte TIMP-1 Level induzieren die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Leber und die Aktivierung von hepatischen Ovalzellen.** (A,B,C,D,F,G) Repräsentative Bilder von Leberschnitten, die mit anti-F4/80 (A), CD3 (B), B220 (C), Ly6G (D), A6 (F) oder CK-19 (G) Antikörpern gefärbt wurden. Als Gegenfärbung wurden die Schnitte Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Pfeile markieren die positiven Zellen im Leberparenchym. Maßstabsbalken 200  $\mu$ m. (E) Analyse der Ly6G-positiven Zellen im Leberparenchym von Mäusen, die mit einem Kontrollvirus (Addl70-3), einem TIMP-1-kodierenden (AdTIMP-1) oder einem NTIMP-1-kodierenden (NTIMP-1) Adenovirus transduziert wurden. Den Mäusen wurden  $5,0 \cdot 10^8$  Viruspartikel in die Schwanzvene inokuliert und die Tiere drei Tage später getötet und die Organe zu Analyse entnommen. Dargestellt sind die Durchschnittswerte der Ly6G-positiven Zellen im Leberparenchym pro Bildausschnitt  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (Addl70-3 =  $3,61 \pm 0,34$ , AdTIMP-1 =  $9,06 \pm 1,03$ , AdNTIMP1 =  $3,44 \pm 0,39$ ). \*\*,  $p \leq 0,01$ .

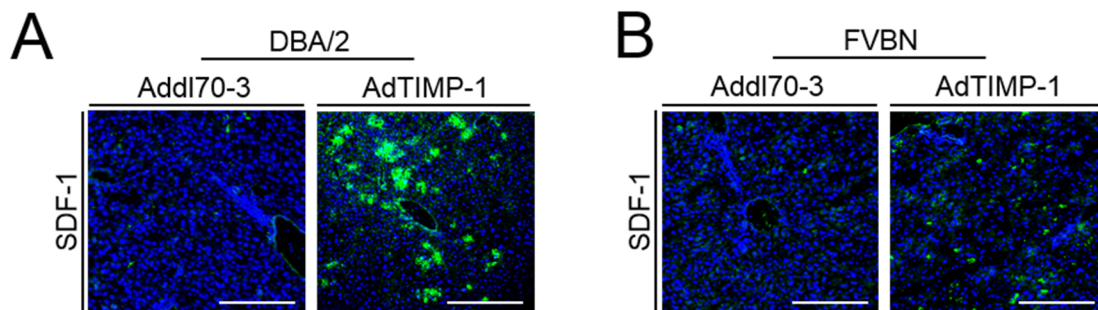
Die erhöhten systemischen TIMP-1 Level hatten keinen Einfluss auf die Anzahl von Makrophagen (Abbildung 5.42A, F4/80), T-Zellen (Abbildung 5.42B, CD3) oder B-Zellen (Abbildung 5.42C, B220) im Leberparenchym. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Leberparenchym von Tieren mit erhöhten systemischen TIMP-1 Level erhöht (Abbildung 5.42D). Für diese TIMP-1-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten war die Präsenz der C-terminalen Domäne des Proteins notwendig, da NTIMP-1 zu keiner Erhöhung der Anzahl der Neutrophilen im Leberparenchym führte (Abbildung 5.42E). Zusätzlich zur erhöhten Anzahl von Ly6G-positiven Immunzellen verstärkten systemisch erhöhte TIMP-1 Level das Signal für den hepatischen Progenitormarker A6 (Abbildung 5.42F) und Cytokeration 19 (CK19, Abbildung 5.42G). Dieses Ergebnis impliziert eine verstärkte Proliferation der hepatischen Progenitorzellen (Ovalzellen; (Tanaka et al., 2011)) in Tieren mit erhöhten TIMP-1 Leveln. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte eine Färbung des Ki67 Proliferationsmarkers eine erhöhte proliferative Aktivität im Leberparenchym von Mäusen mit systemisch erhöhten TIMP-1 Leveln (Daten nicht gezeigt). Eine Analyse der Lungenmikroumgebung offenbarte, dass erhöhte systemische TIMP-1 Level keinen Effekt auf dieses Organ haben. Weder die Expression der in der Leber identifizierten prä-metastatischen Nischenfaktoren noch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten war signifikant verändert (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen auf eine Leber-spezifische Induktion einer prä-metastatischen Nische durch TIMP-1 hin.

### **5.35 Notwendigkeit der SDF-1/CXCR4-Achse für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung**

SDF-1 ist ein wichtiger Faktor für die Induktion einer prä-metastatischen Nische in der Lunge (Hiratsuka et al., 2011) und dafür bekannt, den Organtropismus von Brustkrebszellen entscheidend zu beeinflussen (Müller et al., 2001). Basierend auf diesen Informationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass TIMP-1 den Organtropismus der Tumorzellen durch eine erhöhte SDF-1 Expression in der Leber verändert. Um diese Hypothese zu testen, sollte in einem ersten Versuch analysiert werden, inwiefern die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung auf eine SDF-1/CXCR4-Interaktion auf der Oberfläche der Tumorzellen zurückgeführt werden kann. Zunächst wurde die TIMP-1-induzierte mRNA-Expression von SDF-1 auf Proteinebene mittels einer immunhistochemischen Färbung

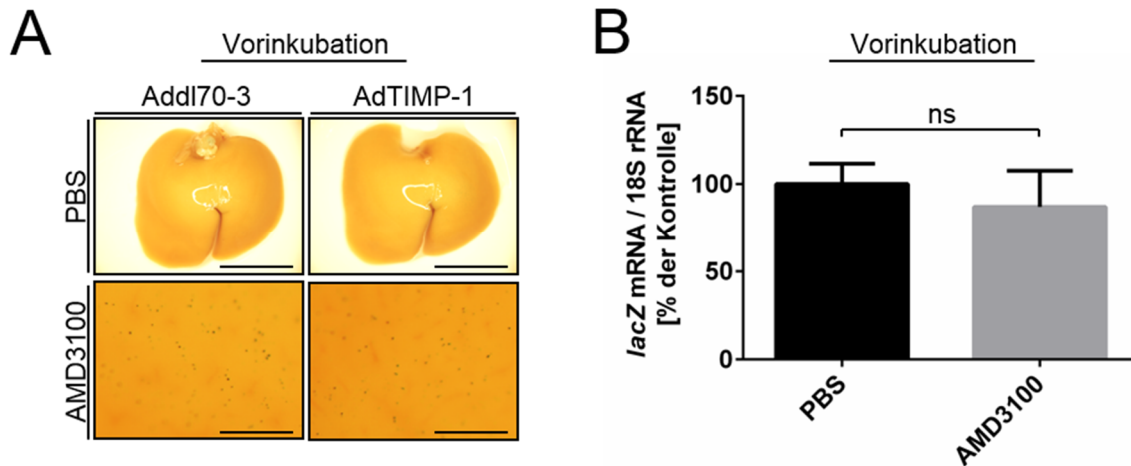


untersucht. Es zeigte sich, dass hohe systemische TIMP-1 Level in der Leber zu einer Induktion von SDF-1 auf Proteinebene führen (Abbildung 5.43A und B). Eine Analyse der CXCR4 mRNA-Expression mittel TaqMan zeigte zudem, dass die PyMTL Brustkarzinomzelllinie CXCR4 nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt).



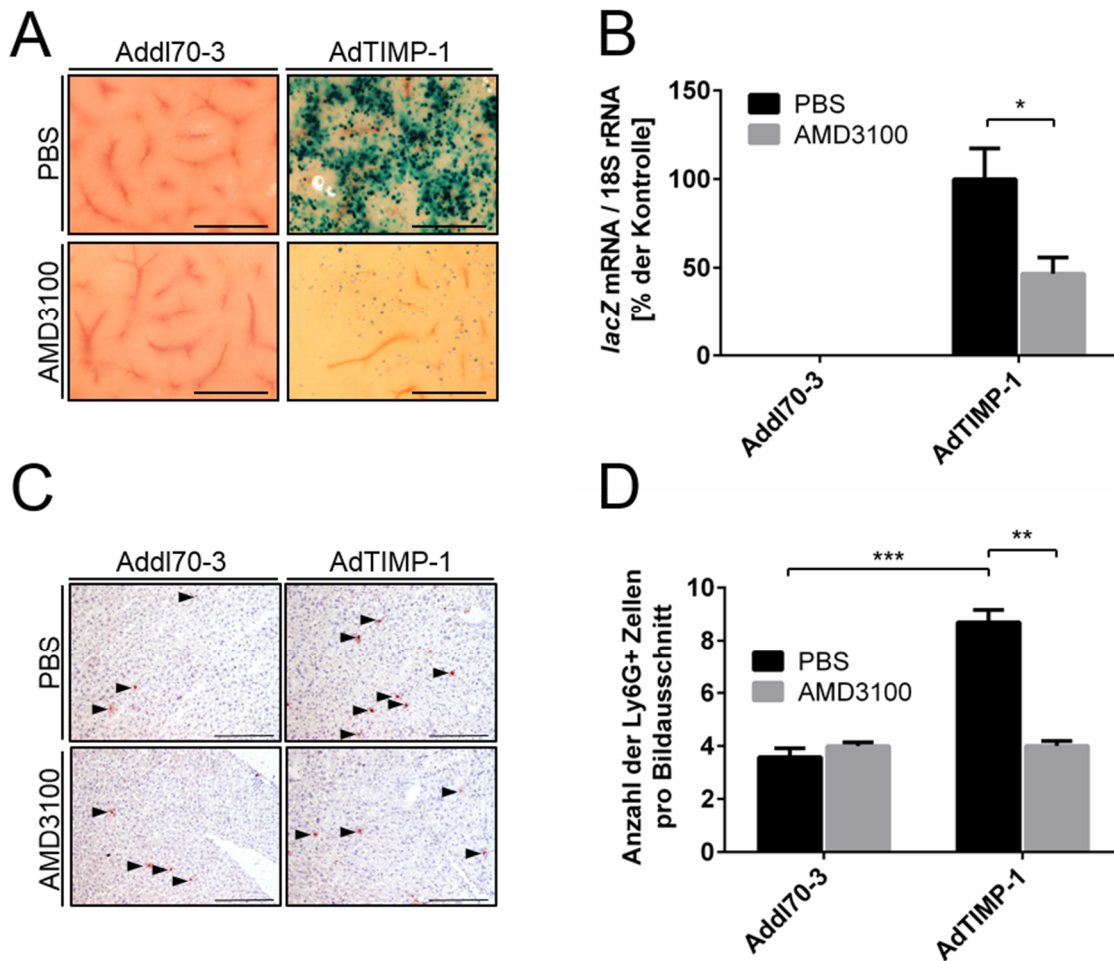
**Abbildung 5.43: Systemisch erhöhte TIMP-1 Level induzieren die SDF-1 Expression in der Leber.** (A und B) Repräsentative SDF-1-Immunfluoreszenzfärbung (Alexa-488, grünes Signal) zeigt ein deutliches Signal in Leberschnitten von DBA/2 (A) und FVBN (B) Mäusen mit erhöhten systemischen TIMP-1 Leveln. In Leberschnitten von Kontrolltieren (Add170-3) wurde kein SDF-1 Signal nachgewiesen. Gegenfärbung der Paraffinschnitte mit DAPI (blaues Signal). Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CXCR4/SDF-1-Interaktion auf Tumorzellseite keine Rolle für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung spielt. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde im nächsten Versuch der SDF-1 Inhibitor AMD3100 (Plerixafor®) verwendet. Dieser Inhibitor bindet an CXCR4, den einzigen beschriebenen SDF-1 Rezeptor (Teicher und Fricker, 2010) und blockiert die CXCR4/SDF-1 Interaktion. Die CXCR4-positiven Eb288L Zellen wurden für 60 Minuten mit AMD3100 vorinkubiert und anschließend in die Schwanzvene von syngenen DBA/2 Mäusen ( $1,0 \cdot 10^6$  Eb288L Zellen pro Tier) inokuliert. Für die Untersuchung des Metastasierungsmusters wurden die Tiere 24 Stunden nach Inokulation der Tumorzellen getötet. Die Vorinkubation der Tumorzellen mit AMD3100 hatte keinen Einfluss auf die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung (Abbildung 5.44A und B). Zusammen genommen zeigen diese Ergebnisse, dass SDF-1 den Organtropismus der Tumorzellen nicht direkt über eine Interaktion mit CXCR4 auf der Oberfläche der Tumorzellen verändert.



**Abbildung 5.44: Die Vorinkubation der Tumorzellen mit dem CXCR4 Inhibitor AMD3100 hat keinen Einfluss auf die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung.** (A) Repräsentative Aufnahmen (makroskopisch und mikroskopisch) der Leber 24 Stunden nach intravenöser Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  Eb288L Tumorzellen in die Schwanzvene von DBA/2 Mäusen ( $n = 4$ ). Die Tumorzellen wurden vor der Inokulation 60 Minuten mit 100 ng / ml AMD3100 vorinkubiert. Drei Tage vor Tumorzellinokulation wurden die systemischen TIMP-1 Level durch adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 erhöht (TIMP-1) oder das entsprechende Kontrollvirus (Addl70-3) inokuliert. Die Lebern wurden vor der Analyse mit X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken: 1 cm (makroskopisch); 0,5 mm (mikroskopisch). (B) Quantifizierung der Gesamttumorzelllast der Leber 24 Stunden nach Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Tumorzellen, die mit 100 ng / ml AMD3100 vorinkubiert wurden, in Mäuse mit erhöhten TIMP-1 Leveln (AdTIMP-1) oder der entsprechenden Leervektorkontrolle (Addl70-3) durch Bestimmung der lacZ mRNA-Expression mittels TaqMan Analyse. Dargestellt sind die Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 4$  (Addl70-3 = 100 %  $\pm$  11,61 %, AdTIMP-1 = 87,02 %  $\pm$  20,49 %). ns: nicht signifikant. Student's *t* test.

Zusätzlich zu der Rolle von SDF-1 für den Organtropismus der Tumorzellen ist SDF-1 ein wichtiger Faktor für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Grunewald et al., 2006). Dieser Zelltyp spielt wiederum eine wichtige Rolle für die Ausbildung der prä-metastatischen Nische in der Lunge (Kowanetz et al., 2010). Interessanterweise konnten bereits Schrötzlmair und Kollegen demonstrieren, dass die TIMP-1-induzierte Metastasierung der Leber (Kopitz et al., 2007) von der Präsenz von neutrophilen Granulozyten abhängig ist (Schrötzlmair et al., 2010). Basierend auf diesen Informationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass TIMP-1 die Lebermetastasierung über eine SDF-1-abhängige Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten induziert. Um die Relevanz der erhöhten hepatischen SDF-1 Expression für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung zu bewerten, wurde im nächsten Versuch die CXCR4/SDF-1 Interaktion im Wirt während der prä-metastatischen Phase durch die Applikation von AMD3100 blockiert. Zu diesem Zweck wurden die Tiere täglich mit AMD3100 behandelt, wobei einen Tag vor adenoviralem Gentransfer mit der Behandlung begonnen wurde. Diese Tiere wurden 24 Stunden nach Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Zellen getötet und die Lebern entnommen.



**Abbildung 5.45: Der CXCR4 Inhibitor AMD3100 reduziert die Ausbildung der TIMP-1-induzierten prä-metastatischen Nische in der Leber.** (A) Repräsentative Aufnahmen (mikroskopisch) der Leber 24 Stunden nach intravenöser Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Tumorzellen in die Schwanzvene von FVBN Mäusen ( $n = 4$ ). Drei Tage vor Tumorzellinokulation wurden die systemischen TIMP-1 Level durch adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 erhöht (TIMP-1) oder das entsprechende Kontrollvirus (Add170-3) inokuliert. Zusätzlich wurden die Tiere ab einem Tag vor adenoviralem Gentransfer täglich mit AMD3100 behandelt. Vor der Analyse wurden die Lebern X-Gal gefärbt, um die LacZ-markierten Tumorzellen sichtbar zu machen (indigoblaues Signal). Maßstabsbalken = 0,5 mm. (B) Quantifizierung der Gesamttumorzelllast der Leber 24 Stunden nach i.v. Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Tumorzellen in die Schwanzvene von Mäusen mit erhöhten TIMP-1 Leveln (AdTIMP-1) oder der entsprechenden Leervektorkontrolle (Add170-3). Zusätzlich wurden die Tiere ab einem Tag vor adenoviralem Gentransfer täglich mit AMD3100 behandelt. Bestimmung der lacZ mRNA-Expression mittels TaqMan Analyse. Dargestellt sind die Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 7$  (Add170-3\_PBS = 0,00 %  $\pm$  0,00 %, Add170-3\_AMD3100 = 0,00 %  $\pm$  0,00 %, AdTIMP-1\_PBS = 100 %  $\pm$  17,28 %, AdTIMP-1\_AMD3100 = 46,63 %  $\pm$  9,12 %). \*,  $p \leq 0,05$ . (C) Repräsentative Bilder von Leberschnitten, die mit einem anti-Ly6G-Antikörper gefärbt wurden. Als Gegenfärbung wurden die Schnitte Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Pfeile markieren die positiven Zellen im Leberparenchym. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m. (D) Analyse der Ly6G-positiven Zellen im Leberparenchym. Dargestellt sind die Durchschnittswerte der Ly6G-positiven Zellen im Leberparenchym pro Bildausschnitt  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 3$  (Add170-3\_PBS = 3,58  $\pm$  0,37; Add170-3\_AMD3100 = 3,99  $\pm$  0,15; AdTIMP-1\_PBS = 8,70  $\pm$  0,47; AdTIMP1\_AMD3100 = 4,00  $\pm$  0,19). \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

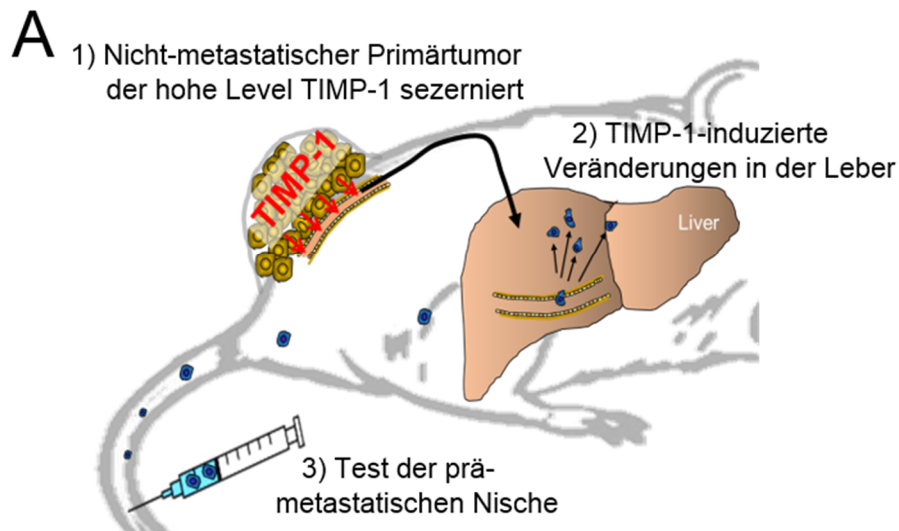
Die Behandlung der Mäuse mit AMD3100 hatte keinen Einfluss auf die Lebermetastasierung der PyMTL Brustkarzinomzellen in der Add170-3-Kontrollgruppe (Abbildung 5.45A und B). Die Anzahl der Tumorzellen auf der Leberoberfläche war

vergleichbar zwischen den PBS oder AMD3100 behandelten Tieren (Abbildung 5.45A und B). Demgegenüber führte die Behandlung der Tiere nach adenoviralem Gentransfer von TIMP-1 mit AMD3100 zu einer Reduktion der Anzahl der Tumorzellen auf der Leberoberfläche um ca. 55 % im Vergleich zur PBS-behandelten Gruppe (Abbildung 5.45A und B). Eine Analyse der Immunzellpopulation der Leber zeigte, dass AMD3100 die TIMP-1-induzierte Rekrutierung der Neutrophilen blockierte (Abbildung 5.45C und D). Zusammen genommen deuten diese Daten auf eine wichtige Funktion von SDF-1 für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung hin und legen nahe, dass SDF-1 diese Funktion durch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ausübt.

### **5.36 Primärtumor-sezerniertes TIMP-1 induziert die Lebermetastasierung**

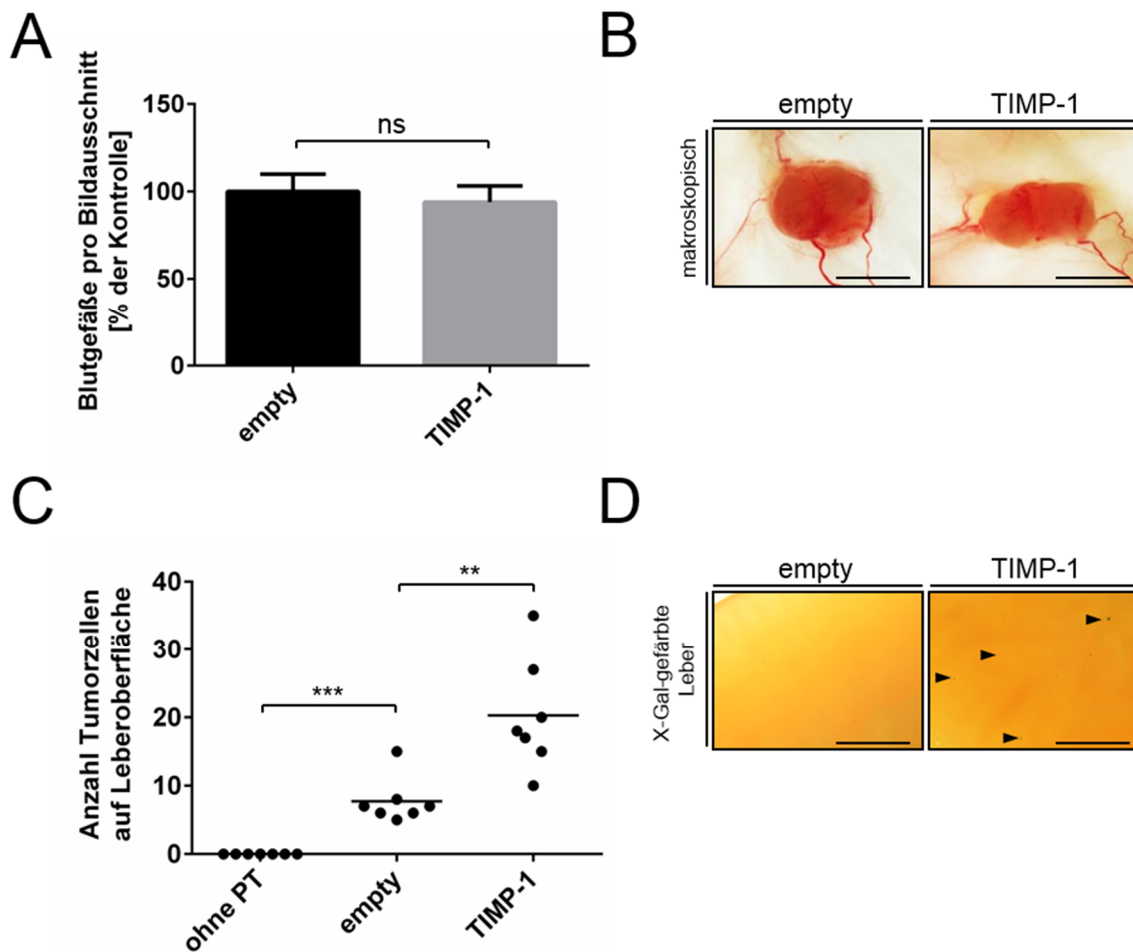
In den bisher verwendeten Modellen zur Analyse der TIMP-1-induzierten Lebermetastasierung wurden die systemischen TIMP-1 Level mittels adenoviralem Gentransfer erhöht. Dieses System hat den Nachteil, dass adenovirale Vektoren nach i.v. Inokulation besonders effizient die Leber infizieren (Duncan et al., 1978; Worgall et al., 1997; Shayakhmetov et al., 2004) und zur Ausbildung eines TIMP-1 Gradienten, ausgehend von der Leber, führen (Daten nicht gezeigt). Dieser Gradient könnte eine mögliche Erklärung für den Leber-spezifischen Effekt von TIMP-1 darstellen. Um dieses Problem zu umgehen, sollte im nächsten Schritt ein neues Metastasierungsmodell entwickelt werden, dass den Einfluss von TIMP-1 auf die Metastasierung unabhängig vom adenoviralen Gentransfer ermöglicht. In diesem Metastasierungsmodell werden die systemischen TIMP-1 Level durch eine Überexpression von TIMP-1 in einem nicht-metastatischen Primärtumor erhöht. Dieses Modell hat den Vorteil, dass TIMP-1 über eine Distanz auf die Lebermikroumgebung wirken muss und durch die Verwendung einer nicht-metastatischen Zelllinie eine klar definierte prä-metastatischen Phase eingehalten werden kann. Das Modell ist in Abbildung 5.46 dargestellt. Die nicht-metastatische Zelllinie Eb288, wurde mit lentiviralen Vektoren, die für TIMP-1 kodieren, transduziert und die mRNA-Expression von TIMP-1 anschließend mittels TaqMan validiert (Daten nicht gezeigt). Um einen nicht-metastatischen, TIMP-1-sezernierenden Primärtumor zu bilden, wurden diese Zellen bzw. die entsprechende Kontrolle intradermal in die Flanke von Mäuse injiziert (Abbildung 5.46A.1). Die TIMP-1 Expression im Primärtumor wurde mittels ELISA bestätigt (Daten

nicht gezeigt). Die Primärtumoren durften bis zu einer Größe von ca. 6 mm wachsen, um die Ausbildung einer prä-metastatischen Nische zu ermöglichen (Abbildung 5.46A.2). Anschließend wurden die Mäuse zur Analyse der Lebermikroumgebung getötet oder mit  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Tumorzellen, die in die Schwanzvene inokuliert wurden, gechallengt (Abbildung 5.46A3). 24 Stunden nach Inokulation der Tumorzellen wurden die Tiere getötet und die Organe zur Untersuchung des Metastasierungsmusters entnommen.



**Abbildung 5.46: Experimentelles Modell zur Analyse der TIMP-1-induzierten prä-metastatischen Nische im Primärtumormodell.** (A)  $2,0 \cdot 10^6$  Eb288 Zellen werden intradermal inokuliert um einen Primärtumor zu bilden. Die dabei verwendeten Eb288 Zellen wurden entweder mit einem Leervektor (empty) oder einem TIMP-1-kodierenden (TIMP-1) Lentivirus transduziert (1). Da es sich um nicht-metastatische Zellen handelt, entsteht in diesem Modell ein Primärtumor, der nur durch sezernierte Faktoren systemisch wirken kann (2). Um die Induktion einer prä-metastatischen Nische durch die vom Primärtumor sezernierten Faktoren zu ermöglichen, wurden die Tiere erst bei einem Primärtumordurchmesser von 6 mm mit einer aggressiven Tumorzelllinie ( $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Brustkrebszellen) gechallengt (3). Die Mäuse wurden 24 Stunden nach der intravenösen Inokulation der Tumorzellen getötet und das Metastasierungsmuster nach X-Gal-Färbung der Organe ausgewertet. Ein verändertes Metastasierungsmuster kann somit auf Veränderungen, die vom Primärtumor über eine Distanz induziert werden, zurückgeführt werden.

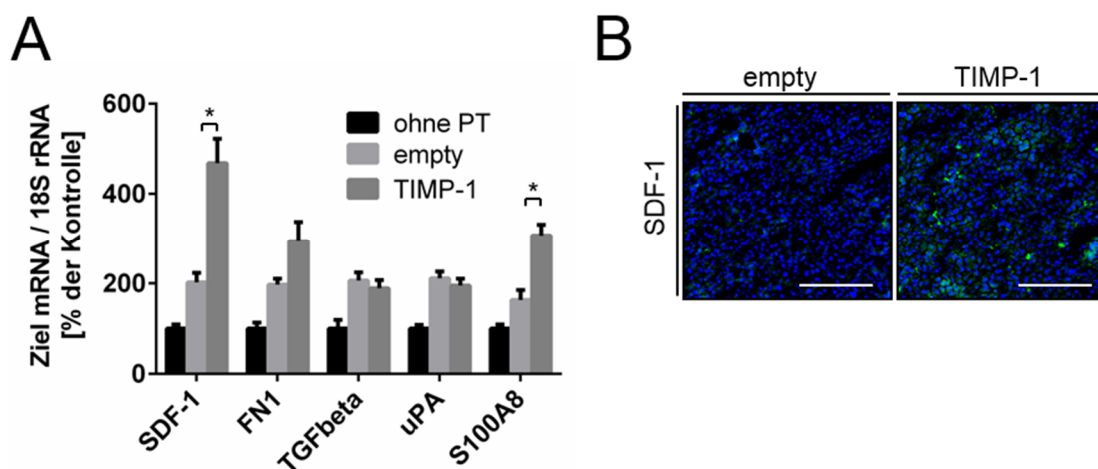
Die Transduktion der Eb288 Zellen mit dem Leervektor (empty) oder einem TIMP-1-kodierenden Vektor (TIMP-1) hatte keine Effekte auf das Primärtumorwachstum (Daten nicht gezeigt) und die Angiogenese (Abbildung 5.47A und B). Allerdings zeigte sich, dass sowohl der Kontrollprimärtumor als auch der TIMP-1-sezenierende Primärtumor (TIMP-1) eine deutliche Veränderung der Suszeptibilität der Lebermikroumgebung für Tumorzellen zur Folge hatten. Während in Lebern von Mäusen ohne Primärtumor keine Tumorzellen detektiert werden konnten, induzierte allein die Anwesenheit des Kontrollprimärtumors den Arrest der Tumorzellen in der Leber (Abbildung 5.47C und D). Im Vergleich zum Kontrollprimärtumor führte die Überexpression von TIMP-1 zur Induktion des Tumorzellarrest um 300 % (Abbildung 5.47C).



**Abbildung 5.47: Primärtumor-sezerniertes TIMP-1 erhöht die Suszeptibilität der Leber gegenüber Tumorzellen.** (A) Immunhistologische CD31-Färbung zur Auswertung der Angiogenese im Primärtumor. Dargestellt sind die Durchschnittswerte der Anzahl der Blutgefäße pro Bildausschnitt  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 4$  (empty = 100 %  $\pm$  9,89 %, TIMP-1 = 93,89  $\pm$  9,25). ns: nicht signifikant. (B) Repräsentative makroskopische Bilder von Primärtumoren, die mit einem TIMP-1-kodierenden (TIMP-1) oder dem entsprechenden Leervektor (empty) transduziert wurden. Maßstabsbalken, 0,5 cm. (C) Auswertung der Lebermetastasierung 24 Stunden nach i.v. Inokulation der PyMTL Brustkrebszellen. Die Lebern wurden X-Gal gefärbt und die Tumorzellen auf der Leberoberfläche ausgezählt. Als Kontrolle dienten Mäuse ohne Primärtumor (ohne PT). Dargestellt sind die Durchschnittswerte der Tumorzellen pro Bildausschnitt  $\pm$  Standardfehler.  $n \geq 4$  (ohne PT = 0,00  $\pm$  0,00, empty = 7,71  $\pm$  1,27, TIMP-1 = 20,29  $\pm$  3,13). \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ . (D) Repräsentative Aufnahmen (mikroskopisch) der Leber 24 Stunden nach intravenöser Inokulation von  $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Tumorzellen in die Schwanzvene von FVBN Mäusen ( $n = 4$ ). Vor der intravenösen Inokulation der PyMTL Tumorzellen wurde den FVBN Mäusen  $2,0 \cdot 10^6$  Eb288 Zellen intradermal inokuliert um einen Primärtumor zu bilden. Die dabei verwendeten Eb288 Zellen wurden entweder mit einem Leervektor (empty) oder einem TIMP-1-kodierenden (TIMP-1) Lentivirus transduziert. Bei einem Primärtumordurchmesser von 6 mm wurden die Tiere durch die Inokulation der aggressiven Tumorzelllinie ( $1,0 \cdot 10^6$  PyMTL Brustkrebszellen) gechallengt. Maßstabsbalken = 0,5 mm.

Eine Analyse des Genexpressionsprofils der Leber offenbarte, dass sowohl der Kontrollprimärtumor als auch der Primärtumor mit erhöhter TIMP-1 Expression die mRNA-Expression von prä-metastatischen Nischenfaktoren induzieren (Abbildung 5.48A). Interessanterweise war die hepatische mRNA-Expression von SDF-1 in der TIMP-1-

Überexpressionsgruppe im Vergleich zur Kontrollprimärtumorgruppe um etwa 250 % erhöht (Abbildung 5.48A). Dieser Anstieg der mRNA Level konnte in einer immunhistochemischen Färbung bestätigt werden (Abbildung 5.48B). Zusätzlich führte die Überexpression von TIMP-1 im Primärtumor zu einer erhöhten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Leberparenchym (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass Primärtumor-sezerniertes TIMP-1 die Suszeptibilität der Leber für Tumorzellen erhöht und deuten auf eine prä-metastatische Nische in der Leber hin. Interessanterweise sind die Veränderungen die Primärtumor-sezerniertes TIMP-1-induzierten, vergleichbar mit den Veränderungen nach adenoviralem Gentransfer von TIMP-1.



**Abbildung 5.48: Primärtumor-sezerniertes TIMP-1 induziert eine prä-metastatische Nische in der Leber.** (A) Analyse der SDF-1, FN1, TGF- $\beta$ 1, uPA und S100A8 mRNA-Expression in der Leber von Mäusen die keinen (ohne PT), einen Kontroll-Primärtumor (empty) oder einen TIMP-1 sezernierenden Primärtumor (TIMP-1) tragen. Die Zielgen mRNA-Expression wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n = 3 (SDF-1: ohne PT = 100 %  $\pm$  9,03 %, empty = 202,00  $\pm$  21,31 %, TIMP-1 = 468 %  $\pm$  54,85 %; FN1: ohne PT = 100 %  $\pm$  13,63 %, empty = 197,52  $\pm$  13,97 %, TIMP-1 = 294,00 %  $\pm$  43,49 %; TGF- $\beta$ 1: ohne PT = 100 %  $\pm$  19,72 %, empty = 206,00  $\pm$  18,91 %, TIMP-1 = 189,00 %  $\pm$  18,19 %; uPA: ohne PT = 100 %  $\pm$  8,40 %, empty = 211,00  $\pm$  21,76 %, TIMP-1 = 195,00 %  $\pm$  15,00 %; S100A8: ohne PT = 100 %  $\pm$  10,57 %, empty = 163,00  $\pm$  22,29 %, TIMP-1 = 307,00 %  $\pm$  24,33 %). \*, p  $\leq$  0,05. (B) Repräsentative SDF-1-Immunfluoreszenzfärbung (Alexa-488, grünes Signal) zeigt ein deutliches Signal in Leberschnitten von Mäusen, die einen Primärtumor, der erhöhte Level von TIMP-1 exprimiert, tragen (TIMP-1). In Leberschnitten von Tieren, die einen Kontrollprimärtumor tragen (empty), wurde kein SDF-1 Signal nachgewiesen. Gegenfärbung der Paraffinschnitte mit DAPI (blaues Signal). Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m.

## 6. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des Tetraspanins CD63 auf die Metastasierung genauer beleuchtet werden. Mithilfe von verschiedenen *in-vitro*- und *in-vivo*-Analysen konnte erstmals gezeigt werden, dass CD63 für das zell-intrinsische metastatische Potential von Tumorzellen eine bestimmende Rolle spielt. Der *Knockdown* von CD63 in humanen Ovarialkarzinomzellen und murinen Melanomzellen führte zu einem massiven Rückgang der Lungenmetastasierung, während eine Überexpression die Metastasierung verstärkte. Darüber hinaus konnte in dieser Studie erstmals ein pro-metastatischer Effekt von TIMP-1 auf die Lungenmetastasierung beschrieben werden, wobei die TIMP-1-induzierte Lungenmetastasierung abhängig war vom CD63-Status der Tumorzellen. Gleichzeitig konnte dargelegt werden, dass erhöhte systemische TIMP-1-Level zur Induktion einer prä-metastatischen Nische in der Leber führen, die – unabhängig vom metastatischen Potential und CD63-Status der Tumorzellen – die Lebermetastasierung fördert. Für die Induktion der prä-metastatischen Nische in der Leber war die C-terminale Domäne des Proteins, die die Bindung an CD63 vermittelt, notwendig. Als zugrunde liegender Mechanismus konnte die SDF-1-abhängige Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Leberparenchym identifiziert werden. Zusammengenommen verdeutlichen diese Ergebnisse eine bestimmende Rolle der CD63/TIMP-1-Achse während der Metastasierung, wobei zwischen Tumorzellseite, Wirtseite und organspezifischen Effekten unterschieden werden muss.

### 6.1 CD63 – Ein pro-metastatischer Faktor

In der Fachliteratur wird die Rolle von CD63 in der Metastasierung kontrovers beschrieben. Ursprünglich wurde CD63 als Melanom-assoziiertes Antigen identifiziert, das besonders während der frühen Stadien hochreguliert ist (Atkinson et al., 1984; Hotta et al., 1988). Weiterführende Studien, die die Rolle von CD63 für die Metastasierung von Melanomzellen untersuchten, identifizierten eine anti-metastatische Wirkung von CD63 *in vivo* (Radford et al., 1995) und *in vitro* (Radford et al., 1997). Die anti-metastatische Wirkung von CD63 wurde *in vivo* auf eine verminderte Anzahl von Metastasen im Bauchraum und der subkutanen Gewebeschicht sowie *in vitro* auf eine verminderte Migration der Tumorzellen nach CD63-Überexpression zurückgeführt (Radford et al., 1997). Allerdings induziert die



Überexpression von CD63 gleichzeitig die Migration der Tumorzellen in Präsenz von EZM-Molekülen, wie z. B. Fibronectin (Radford et al., 1997). Dieser Effekt deutet zunächst auf eine pro-metastatische Funktion von CD63 hin, da die Migration und Adhäsion von Tumorzellen an EZM-Moleküle, wie z. B. Fibronectin, eine pro-metastatische Wirkung erzeugen (Fernandez-Garcia et al., 2014; Malik et al., 2010). Zusätzlich beruhen diese Studien auf der Verwendung der KM3-Zelllinie. Diese Zelllinie wurde zunächst fälschlicherweise als humane Melanomzelllinie beschrieben. Kürzlich konnte indes nachgewiesen werden, dass es sich bei dieser Zelllinie um Rattenzellen handelte (Moseley et al., 2003), sodass die Ergebnisse, die durch eine Überexpression von humanem CD63 in der Rattenzelllinie KM3 generiert wurden, neu bewertet werden müssen. Nichtsdestoweniger wird die anti-metastatische Funktion von CD63 von weiteren Studien untermauert (Jang und Lee, 2003; Kwon et al., 2007; Sauer et al., 2003; Sordat et al., 2002; Zhijun et al., 2007), die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine anti-metastatische Funktion von CD63 beschreiben. Im Gegensatz zu diesen Studien wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine pro-metastatische Funktion von CD63 aufseiten der Tumorzellen identifiziert. Diese pro-metastatische Funktion von CD63 bestimmt die Fähigkeit der Tumorzellen, Lungenmetastasen zu bilden, maßgeblich. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigen aktuelle klinische Studien eine Korrelation der CD63-Expression und der Tumorprogression von Melanomen (Lewis et al., 2005; Logozzi et al., 2009), Astrozytomen (Rorive et al., 2010) und Brustkrebspatienten (Ridnour et al., 2012). Weitere *in-vitro*-Studien bestätigen diese pro-metastatische Funktion von CD63 (Jung et al., 2006; Kobayashi et al., 2014; Toricelli et al., 2013). Alles in allem konnte im Zuge der vorliegenden Studie eine pro-metastatische Funktion von CD63 für die Lungenmetastasierung identifiziert werden. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass CD63 unter bestimmten Umständen eine anti-metastatische Funktion ausüben kann. Vielmehr scheint es, als würde die Funktion von CD63 während der Metastasierung vom Kontext abhängen. Dies könnte den unterschiedlichen Einfluss von CD63 auf die Ausbildung von Metastasen im Bauchraum bzw. der subkutanen Gewebeschicht und der Lunge erklären. Für ein besseres Verständnis der Rolle von CD63 während der Metastasierung ist die Identifikation der zugrunde liegenden Mechanismen, die CD63 regulieren, unerlässlich. Im Folgenden sollen die in dieser Studie identifizierten CD63-Funktionen in Zusammenhang mit der möglichen Rolle von CD63 während der Metastasierung gebracht werden.

### 6.1.1 CD63 fördert das Auswachsen von Metastasen in der Lunge

Die vorliegende Studie identifiziert CD63 aufseiten der Tumorzellen als einen für das Auswachsen von Lungenmetastasen notwendigen Faktor. Die im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten experimentellen Metastasierungssassays bilden jedoch nicht die vollständige metastatische Kaskade ab. Somit ist es nicht möglich, Aussagen über CD63-abhängige Effekte im Primärtumor zu treffen, die sich nachfolgend auf die Metastasierung auswirken könnten. Allerdings spiegelt das experimentelle Metastasierungsmodell genau die Schritte der metastatischen Kaskade wider, die im Zielorgan für die Ausbildung von Metastasen entscheidend sind (Chambers et al., 2002). Verschiedene Tierstudien zeigen, dass die Inokulation von mehreren Millionen Tumorzellen in die Zirkulation von Mäusen nur zu einer geringen Anzahl von Metastasen führt (Luzzi et al., 1998; Weiss et al., 1982). Während in 83 % der Tumorzellen, die den Tieren i.v. gespritzt wurden, eine Extravasation vollzogen wird, sind nur 2 % der Tumorzellen in der Lage, Mikrometastasen zu bilden, und nur eine von 100 Mikrometastasen (0,02 % der inokulierten Tumorzellen) wächst anschließend zu einer Makrometastase aus (Luzzi et al., 1998). Das Anwachsen der Tumorzellen zu Mikrometastasen und das anschließende Auswachsen zu Makrometastasen stellen also die Effizienz-bestimmenden Schritte der Metastasierung dar. In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass CD63 aufseiten der Tumorzellen die Effizienz genau dieser Prozesse reguliert. In der Tat hatte der *Knockdown* von CD63 nur einen schwachen Effekt auf die Extravasation der Tumorzellen, während das Auswachsen der Tumorzellen zu Lungenmetastasen um mehr als 95 % reduziert war. Für das Auswachsen von Metastasen ist das Überleben der Zellen im Sekundärorgan und die Initiierung der Tumorzellproliferation essenziell (Geiger und Peeper, 2009; Nguyen, 2004). So konnte dargelegt werden, dass die Balance zwischen Proliferation und Apoptose für die Ausbildung von Metastasen entscheidend ist (Varghese et al., 2002). In der vorliegenden Studie hatte der CD63-Status der Tumorzellen allerdings keinen Einfluss auf die Proliferation oder das Überleben der Tumorzellen *in vitro*. Eine Analyse des Tumorzellüberlebens und der Proliferation *in vivo* war aufgrund der geringen Anzahl an Metastasen nach CD63-*Knockdown* nicht möglich. Da sich die Anforderungen an die Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* überdies dramatisch unterscheiden, kann abschließend nicht ausgeschlossen werden, dass die Proliferation bzw. das Tumorzellüberleben für die pro-metastatische Funktion von CD63 *in vivo* eine Rolle spielen. Es konnte jedoch dargelegt werden, dass sich die Auswirkungen von CD63 auf die Proliferation von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* unterscheiden (Radford et al., 1995). Des Weiteren konnte ein Effekt der adaptiven

Immunantwort des jeweiligen Wirts für die pro-metastatische Funktion von CD63 ausgeschlossen werden, da es unerheblich war, ob die experimentellen Metastasierungsassays in *syngen*en oder *xenograft*-Modellen durchgeführt wurden.

## 6.2 CD63 moduliert die zelluläre Plastizität von Tumorzellen

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass CD63 aufseiten der Tumorzellen für die Aufrechterhaltung eines spindelförmigen Tumorzellphänotyps essenziell ist und der *Knockdown* von CD63 zu einer MET der Tumorzellen führt, die mit einer verminderten Aggressivität einhergeht.

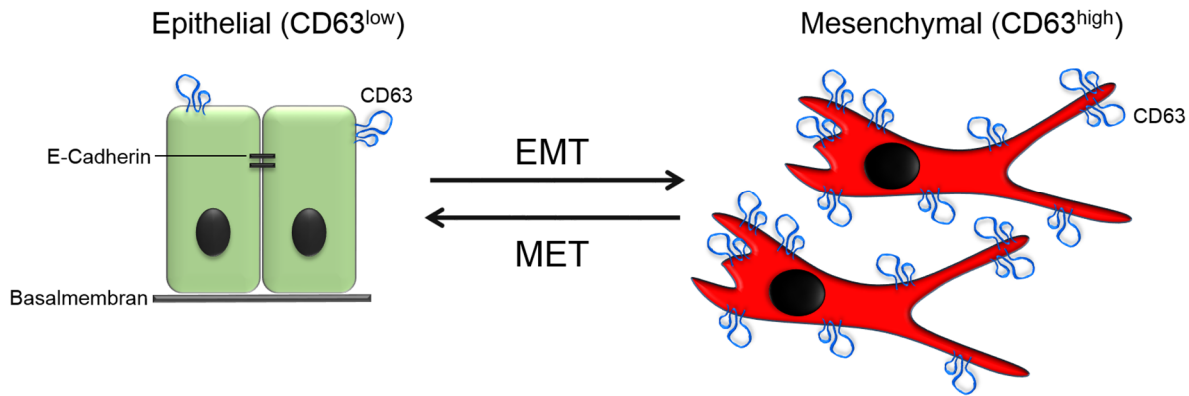
Die zelluläre Plastizität beschreibt die Eigenschaften von Zellen, ihre Struktur und Funktion zu ändern, und ermöglicht den Übergang in einen neuen Zelltyp (Marjanovic et al., 2013; Meacham und Morrison, 2013). Die Fähigkeit von Tumorzellen, ihren Phänotyp zu verändern, ermöglicht erst die Progression von einem benignen zu einem malignen Tumor (Kalluri und Weinberg, 2009). Dabei durchlaufen epitheliale Tumorzellen im Primärtumor eine EMT, die zu spindelförmigen Tumorzellen mit erhöhten invasiven Eigenschaften führt (Marjanovic et al., 2013; Polyak und Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Obwohl in der vorliegenden Arbeit kein Primärtumormodell verwendet wurde, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass CD63 für die Disseminierung von Tumorzellen vom Primärtumor eine wichtige Rolle spielt. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass CD63 die Invasivität der Tumorzellen erhöht und so möglicherweise die Disseminierung der Tumorzellen erleichtert. Eine erhöhte Invasivität bzw. Disseminierung von Tumorzellen könnte auch das verminderte Primärtumorwachstum von KM3-Zellen mit CD63-Überexpression erklären (Radford et al., 1997).

Die hohe zelluläre Plastizität von Tumorzellen, die durch die EMT und MET ermöglicht wird, ist für die Anpassung der Tumorzellen an unterschiedliche physiologische Situationen während der Metastasierung bedeutsam (Klymkowsky und Savagner, 2009). So ist die EMT z. B. für die Anoikis-Resistenz (Stockinger et al., 2001; Valdés et al., 2002) und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung der Tumorzellen (Martin und Cano, 2010) essenziell. Zudem ist eine erhöhte Anzahl von zirkulierenden Tumorzellen mit mesenchymalem Phänotyp mit der Progression von Brustkrebs assoziiert; der Phänotyp der zirkulierenden Brustkrebszellen passt sich hier dynamisch z. B. an die Chemotherapie an (Yu et al., 2013). Für die Initiierung der Tumorzellproliferation in der Mikroumgebung des Sekundärorgans ist wiederum ein

epithelialer Phänotyp notwendig (Tsai et al., 2012), und die Metastasen weisen im Vergleich zum Primärtumor häufig einen stärker differenzierten Phänotyp auf (Brabletz, 2012). In der vorliegenden Studie führte der *Knockdown* von CD63 zu einer MET der Tumorzellen. Diese Transition der Tumorzellen hin zu einem epithelialen Phänotyp konnte weder durch Hypoxie noch durch eine Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 – zwei etablierte EMT-Induktoren – umgekehrt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der *Knockdown* von CD63 die zelluläre Plastizität der Tumorzellen und somit die Anpassungsfähigkeit der Tumorzellen einschränkt. Diese verminderte Anpassungsfähigkeit stellt eine mögliche Erklärung für die massive Reduktion der Lungenmetastasierung dar. Dieses Resultat stimmt mit den Erkenntnissen von Tsai et al. überein, die zeigen konnten, dass eine Einschränkung der zellulären Plastizität der Tumorzellen das metastatische Potential entscheidend beeinflusst (Tsai et al., 2012). Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass CD63 die hohe zelluläre Plastizität von Tumorzellen aufrechterhält, die wiederum die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Ausbildung von Metastasen darstellt.

Die zelluläre Plastizität von Tumorzellen wird durch eine massive Reorganisation des Zytoskeletts ermöglicht. Dabei spielt das Aktinzytoskelett eine entscheidende Rolle (Yilmaz und Christofori, 2009). Während einer EMT kommt es zu einem Rearrangement der dünnen kortikalen Fibrillen und zur Ausbildung von kontraktiven Stressfibrillen (Miettinen et al., 1994; Piek et al., 1999; Ridley und Hall, 1992). Diese Neuordnung führt zu einem spindelförmigen Tumorzellphänotyp mit erhöhter Invasivität. In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass CD63 für die Aufrechterhaltung dieser pro-metastatischen Stressfibrillen unerlässlich ist. Die Stabilisierung eines pro-invasiven Aktinzytoskeletts unterstreicht die Funktion von CD63 als pro-metastatischer Faktor und stellt eine mögliche Erklärung für die CD63-abhängige Stabilisierung des mesenchymalen Phänotyps dar.

Abschließend kann festgehalten werden, dass CD63 die EMT von Tumorzellen stabilisiert und ein Verlust von CD63 zu einer MET führt (Abbildung 6.1). Diese Funktion von CD63 führt zu einer erhöhten zellulären Plastizität der Tumorzellen, die wiederum die Lungenmetastasierung ermöglicht. Wie CD63 diesen Prozess reguliert, konnte in der vorliegenden Studie nicht abschließend geklärt werden. Im Folgenden sollen mögliche Erklärungsansätze dargestellt werden.



**Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Auswirkungen einer Modulation der CD63 Expression auf die zelluläre Plastizität der Tumorzellen.** Hohe CD63 Level stabilisieren den spindelförmigen Phänotyp der Tumorzellen. Der *Knockdown* von CD63 induziert eine MET und führt zu einem kopfsteinpflasterähnlichem Phänotyp der Tumorzellen.

### 6.3 CD63 stabilisiert die Stammzeleigenschaften von Tumorzellen

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass CD63 die Stammzeleigenschaft von Tumorzellen moduliert. Das Konzept der Tumorstammzellen (*cancer stem cells*, CSC) besagt, dass nur ein kleiner Teil der Tumorzellen innerhalb eines Primärtumors die Eigenschaft besitzt, Metastasen zu bilden (Dalerba und Clarke, 2007). Diese Zellen werden auch als MIC (*metastasis-initiating cells*) bezeichnet (Baccelli et al., 2013). Weiter sind CSCs für die therapeutische Intervention von besonderer Bedeutung. So weisen Tumorstammzellen eine erhöhte Chemoresistenz auf, und man geht davon aus, dass CSCs die Rezidivrate bei Krebspatienten bestimmen (Yu et al., 2012). Bekanntermaßen induziert die EMT neben der Veränderung der Tumorzellmorphologie auch Eigenschaften, die den CSCs zugeschrieben werden (Mani et al., 2008; Polyak und Weinberg, 2009). Neben der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Polyak und Weinberg, 2009; Ren et al., 2013; Rosanò et al., 2011) gehört zu diesen Eigenschaften auch die Fähigkeit, Kolonien *in vitro* und Tumoren *in vivo* zu bilden (Mani et al., 2008). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass CD63 die Eigenschaft von Tumorzellen, Lungenmetastasen zu bilden, entscheidend beeinflusst. In der Tat reduzierte der *Knockdown* von CD63 die Anzahl der Tumorzellen, die in der Lage waren, Metastasen zu induzieren, fast vollständig. Weiterhin reduzierte der *Knockdown* von CD63 *in vitro* sowohl die Chemoresistenz als auch die

Fähigkeit der Tumorzellen, Kolonien zu bilden. CD63 spielt somit bei der Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften der Tumorzellen eine wichtige Rolle.

CSCs sind durch die Expression von verschiedenen Markerproteinen charakterisiert. Diese Zellen weisen eine erhöhte Expression der Stammzellmarker CD44 (Cho et al., 2012; Mani et al., 2008) und CD117 (Chen et al., 2013) auf, und die Expression von CD24 ist reduziert (Mani et al., 2008). In Übereinstimmung mit der Eigenschaft dieser Zellen, Metastasen zu bilden, korreliert die Expression dieser Marker in Ovariakarzinomzellen mit einer erhöhten Tumorigenität *in vivo* (Chen et al., 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals dargelegt werden, dass CD63 die mRNA-Expression der beiden Stammzellmarker CD44 und CD117 in Tumorzellen stabilisiert und gleichzeitig die Expression von CD24 reduziert. Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass CD63 bei der Induktion von Stammzeleigenschaften in Tumorzellen eine große Rolle spielt, und sie stellen gleichzeitig einen möglichen Erklärungsansatz für den pro-metastatischen Effekt von CD63 dar. Weiterführende Studien müssen jetzt klären, inwieweit sich der CD63-Status auf die Tumorigenität der Tumorzellen *in vivo* auswirkt und ob der hier identifizierte Zusammenhang zwischen CD63-Expression und Chemoresistenz in der Klinik bestätigen werden kann.

## 6.4 Die CD63-abhängige Regulation von $\beta$ -Catenin

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass CD63 die EMT von Tumorzellen durch die Regulation verschiedener pro-metastatischer Signalwege stabilisiert. Während der *Knockdown* zu einer verminderten Aktivität von  $\beta$ -Catenin und PI3K/Akt führte, war gleichzeitig die Aktivität von GSK-3 $\beta$  erhöht.

Egea u. a. konnten nachweisen, dass CD63 die Proteinlevel von  $\beta$ -Catenin in humanen mesenchymalen Stammzellen (MSZ) moduliert (Egea et al., 2012). So führt der *Knockdown* von CD63 in MSZ zu einer Induktion der  $\beta$ -Catenin-Aktivität, die auf einen miR-let7f/Axin-vermittelten Abbau zurückgeführt wird. Im Gegensatz zu letztgenannter Studie führte der *Knockdown* von CD63 in Tumorzellen in der vorliegenden Studie zu einer starken Reduktion der  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel und einer verminderten Expression der EMT-assoziierten  $\beta$ -Catenin-Zielgene PAI-1 (He et al., 2010) und MMP-2 (Doyle und Haas, 2009). Zusätzlich konnten die Effekte des CD63-*Knockdowns* durch die Inkubation der Zellen mit einem  $\beta$ -Catenin-Inhibitor (Quercetin) nachgestellt werden (Kim et al., 2013a; Park et al., 2005).

Darüber hinaus war die miR-let7f-Expression nach *Knockdown* von CD63 unverändert (Daten nicht gezeigt). Vielmehr induzierte der *Knockdown* von CD63 die Aktivität der GSK-3 $\beta$ . Diese Kinase reguliert die Stabilität von  $\beta$ -Catenin innerhalb der Zelle (Peifer et al., 1994; Yost et al., 1996), und die Inhibition von GSK-3 $\beta$  induziert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg (Chen et al., 2014). In der Tat führte in der vorliegenden Studie die Inhibition von GSK-3 $\beta$  mithilfe spezifischer Inhibitoren in Tumorzellen mit verminderter CD63-Expression zu einer Rettung des Phänotyps.

Die Aktivität von GSK-3 $\beta$  ist durch eine PI3K/Akt-vermittelte Phosphorylierung reguliert (Cross et al., 1994, 1995). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von CD63 zu einer verminderten Aktivität von PI3K/Akt führt bzw. CD63 die Aktivität von PI3K/Akt in Ovarialkarzinomzellen stabilisiert. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen ist bekannt, dass CD63 die Aktivität von Akt über eine Interaktion mit TIMP-1 in Brustkrebszellen induziert (Toricelli et al., 2013). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass CD63 die Aktivität von PI3K/Akt stabilisiert, dadurch die Aktivität von GSK-3 $\beta$  reduziert und somit den phosphorylierungsabhängigen Abbau von  $\beta$ -Catenin inhibiert. Die erhöhte Proteinmenge von  $\beta$ -Catenin stabilisiert in der Folge wiederum den spindelförmigen Phänotyp der Tumorzellen (Kim et al., 2002; Sánchez-Tilló et al., 2011). Abbildung 6.2 zeigt den schematischen Aufbau der CD63-abhängigen Regulation der Tumorzellmorphologie.

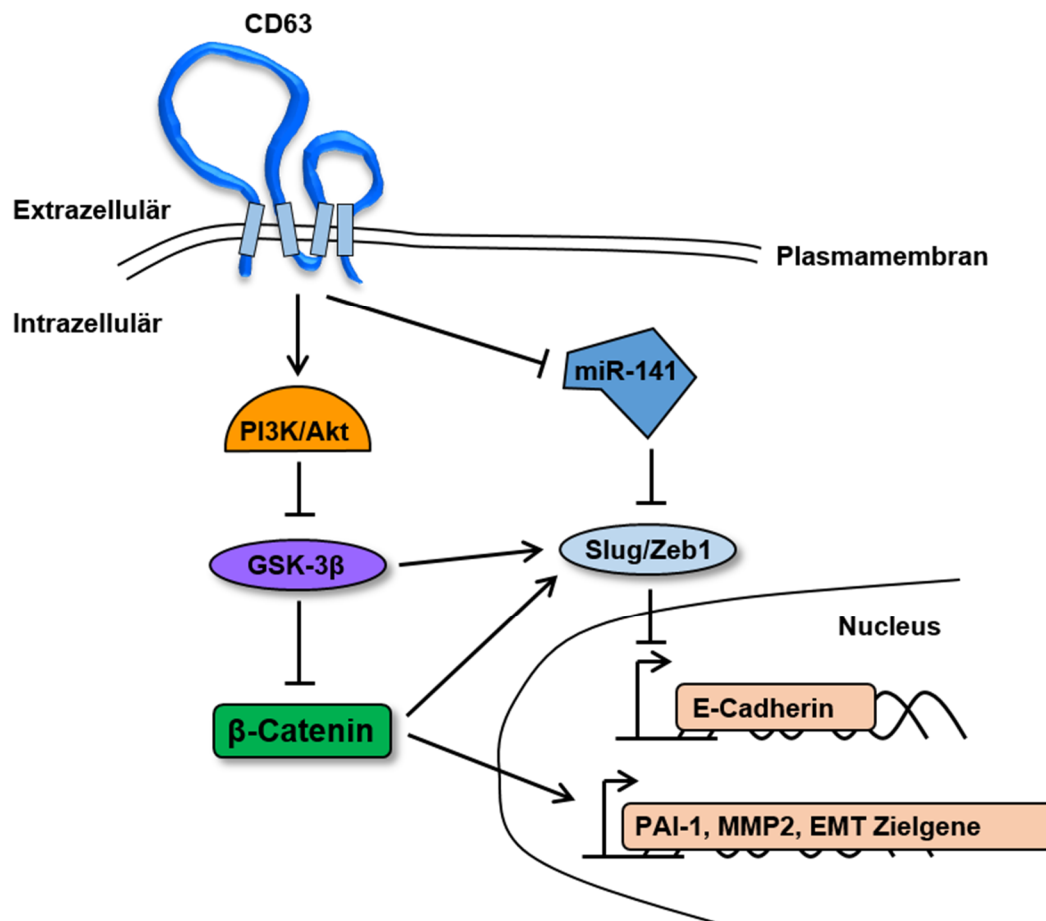


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung des CD63-abhängigen Signalwegs basierend auf den im Rahmen der vorliegenden Studie gewonnenen Erkenntnissen.

Überdies ist bekannt, dass GSK-3 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin die Slug-Expression stabilisieren (Kao et al., 2013; Wu et al., 2012). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass der *Knockdown* von CD63 die Slug-Expression reduziert. Für eine Validierung des Signalweges muss nun in weiterführenden Studien dargelegt werden, dass die Inhibition der verschiedenen Kinasen den Phosphorylierungsstatus der downstream liegenden Substrate tatsächlich verändert.

Ein Grund für den unterschiedlichen Einfluss von CD63 auf die Proteinstabilität von  $\beta$ -Catenin in der vorliegenden Studie und in der Studie von Egea u. a. könnte der Differenzierungsstatus der Zellen sein. Während es sich bei den humanen MSZ um multipotente Zellen aus dem Knochenmark handelte, waren die in dieser Studie verwendeten Tumorzellen epithelialen Ursprungs. MSZ behalten ihren Stammzellstatus bei Zellteilungen bei, während in Epithelzellen verschiedene Sicherheitsmechanismen greifen, die eine Dedifferenzierung der Zellen vermeiden sollen. Da CD63 für die EMT – einen Prozess, der Stammzeleigenschaften in Zellen induziert – eine entscheidende Rolle spielt, ist es somit



nicht verwunderlich, dass die Funktionsweisen von CD63 in MSZ und Tumorzellen sich unterscheiden, wobei  $\beta$ -Catenin in beiden Zelltypen als zentrales Molekül moduliert wird. In der vorliegenden Studie konnte nicht identifiziert werden, welcher CD63-abhängige Mechanismus an der Zelloberfläche die Stabilität von  $\beta$ -Catenin reguliert. Eine mögliche Erklärung stellt die Funktion der Tetraspanine dar. Diese Proteine werden als „molekulare Moderatoren“ beschrieben, die Mikrodomänen in der Plasmamembran ausbilden (Charrin et al., 2002; Yáñez-Mó et al., 2009). In diesen Mikrodomänen werden verschiedene Proteine in räumliche Nähe zueinander gebracht und somit Prozesse wie die Adhäsion oder die Kompartimentalisierung von enzymatischer Aktivität ermöglicht. Für den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist bekannt, dass der *Knockdown* von TSPAN12 die Assoziierung zwischen FZD4 und seinem Co-Rezeptor LRP5 vermindert (Knoblich et al., 2013). Diese Interaktion ist für die Stabilität der intrazellulären  $\beta$ -Catenin-Level in Brustkarzinomzellen essenziell und wird über GSK-3 $\beta$  reguliert. CD63 könnte die Ausbildung dieser Mikrodomänen oder ähnlicher Strukturen beeinflussen und somit die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion auf der Zelloberfläche stabilisieren. Außerdem ist bekannt, dass die Tetraspanine CD82 und CD9 durch die Freisetzung von Exosomen die zellulären  $\beta$ -Catenin-Level in dendritischen Zellen vermindern (Chairoungdua et al., 2010). Allerdings deuten erste Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Studie gewonnen wurden, darauf hin, dass CD63 in Tumorzellen die intrazellulären Proteinlevel von  $\beta$ -Catenin nicht über die Freisetzung von Exosomen reguliert (Daten nicht gezeigt). Indes reguliert CD63 die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen, wie z. B. CXCR4 (Yoshida et al., 2008). CD63 könnte also auch das Trafficking eines Signalmoleküls des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs regulieren und auf diesem Weg die Proteinstabilität von  $\beta$ -Catenin beeinflussen. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass CD63 bei der Regulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs entscheidend ist, und je nach Zelltyp unterschiedliche Regulationsmechanismen aktiv sind.

## **6.5 CD63 fördert die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber TGF- $\beta$ 1**

Um die Funktionsfähigkeit eines mehrzelligen Organismus zu gewährleisten, muss die Plastizität der einzelnen Zellen beschränkt werden (Weinberg, 2007). Aus diesem Grund ist die EMT durch eine Vielzahl von Signalwegen streng reguliert (Craene und Berx, 2013; Kalluri und Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Einer der am besten charakterisierten

EMT-Induktoren ist TGF- $\beta$ 1 (Xu et al., 2009; Zavadil und Böttinger, 2005). Interessanterweise ist mit CD151 bereits ein Mitglied der Tetraspanin-Familie als positiver Regulator des TGF- $\beta$ 1-Signalwegs in Brustkrebszellen beschrieben. CD151 reguliert dabei die Kompartimentalisierung des TGF $\beta$ 1-Rezeptors an der Zelloberfläche (Sadej et al., 2010). Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass auch CD63 den TGF- $\beta$ 1-Signalweg reguliert. So inhibierte der *Knockdown* von CD63 die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber TGF- $\beta$ 1, und erste Daten weisen darauf hin, dass eine Überexpression von CD63 zu einer erhöhten Sensitivität der Tumorzellen gegenüber TGF- $\beta$ 1 führt. Die Identifizierung des hier zugrunde liegenden Mechanismus war nicht Gegenstand der aktuellen Studie; es ist jedoch denkbar, dass CD63 für die Rekrutierung des TGF- $\beta$ 1-Rezeptors in TEMs auf der Zelloberfläche wichtig ist und/oder die Internalisierung von TGF- $\beta$ 1 reguliert. Darüber hinaus können Tetraspanine die Aktivität von Sheddases regulieren (Arduise et al., 2008; Haining et al., 2012), und es ist überdies bekannt, dass der TGF- $\beta$ 1-Rezeptor durch Shedding reguliert wird (Liu et al., 2009). CD63 könnte also auch das Shedding des TGF- $\beta$ 1-Rezeptors auf der Zelloberfläche beeinflussen und auf diese Art die Sensitivität der Zellen gegenüber TGF- $\beta$ 1 regulieren. Tatsächlich war die Expression von ADAM10 nach *Knockdown* von CD63 induziert (Daten nicht gezeigt).

## **6.6 Bedeutung der CD63/TIMP-1-Interaktion für die Metastasierung**

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die CD63/TIMP-1-Achse sowohl die Metastasierung der Lunge als auch der Leber fördert. Die pro-metastatischen Effekte konnten auf Veränderungen des zell-intrinsischen Potentials der Tumorzellen und der Suszeptibilität des Wirtsgewebes zurückgeführt werden.

### **6.6.1 Die Bedeutung der CD63/TIMP-1-Interaktion für die Lungenmetastasierung**

Die Bedeutung von TIMP-1 für die Ausbildung von Lungenmetastasen wurde bereits in mehreren Studien untersucht. So konnte anhand von Metastasierungsmodellen gezeigt werden, dass systemisch erhöhte TIMP-1-Level die Lungenmetastasierung von Brustkrebs-, Melanom- und Fibrosarkomzellen reduzieren (Kopitz et al., 2007; de Lorenzo et al., 2003;

Ripoll et al., 2006; Shi et al., 2002; Yamazaki et al., 2004). Im Gegensatz dazu zeigen Soloway u. a., dass der TIMP-1-Status des Wirts keinen Einfluss auf die Metastasierung hat (Soloway et al., 1996). In der Klinik wiederum korrelieren erhöhte TIMP-1-Level mit einer schlechten Prognose von Krebspatienten. Diese Korrelation deutet auf eine pro-metastatische Funktion von TIMP-1 hin, da etwa 80 % der Krebspatienten aufgrund der Metastasierung versterben. In Übereinstimmung mit den klinischen Daten konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals in verschiedenen Tumormodellen eine pro-metastatische Funktion von systemisch erhöhten TIMP-1-Levels identifiziert werden, die im Gegensatz zu bisherigen Studien die Lungenmetastasierung fördert. Der pro-metastatische Effekt von TIMP-1 auf die Lungenmetastasierung konnte durch einen *Knockdown* von CD63 in den Tumorzellen vollständig blockiert werden. Die Notwendigkeit von CD63 aufseiten der Tumorzellen ist nicht verwunderlich, da bekannt ist, dass TIMP-1 einige seiner pro-metastatischen Funktionen über die Interaktion mit CD63 vermittelt (Jung et al., 2006; Ridnour et al., 2012; Toricelli et al., 2013; Xia et al., 2012). Die Relevanz der Interaktion mit CD63 für den pro-metastatischen Effekt von TIMP-1 wird jedoch durch die Tatsache verstärkt, dass der *Knockdown* von TIMP-1 oder CD63 *in vitro* zu einem vergleichbaren Tumorzellphänotyp mit verminderter Aggressivität führt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass TIMP-1 und CD63 den gleichen pro-metastatischen Signalweg beeinflussen. Somit könnte TIMP-1 durch die Bindung an CD63 die pro-metastatische Funktion des Tetraspanins verstärken und auf diesem Weg die Lungenmetastasierung fördern. Diese Vermutung impliziert, dass für die TIMP-1-induzierte Lungenmetastasierung die C-terminale Domäne des Inhibitors essenziell sein dürfte, da dieser Teil des Proteins die Interaktion mit CD63 vermittelt (Jung et al., 2006). Allerdings könnte die Bindung von TIMP-1 an CD63 neben der Modulation von CD63-abhängigen Signalwegen auch zu einer Lokalisation der inhibitorischen Funktion von TIMP-1 an die Plasmamembran führen. Diese Rekrutierung der inhibitorischen Funktion von TIMP-1 könnte nachfolgend pro-metastatische Auswirkungen haben. In der Tat wurde bereits gezeigt, dass TIMP-1 durch einen Glycosylphosphatidylinositol- (GPI) Anker effizient an die Plasmamembran lokalisiert werden kann und diese veränderte Lokalisation Auswirkungen auf die Funktion von TIMP-1 hat (Bao et al., 2013; Djafarzadeh et al., 2005, 2012). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch CD63-unabhängige Funktionen von TIMP-1 eine Rolle in der pro-metastatischen Wirksamkeit von TIMP-1 spielen. So könnten systemisch erhöhte TIMP-1-Level zu Veränderungen in der Mikroumgebung der Lunge führen, die nachfolgend die Metastasierung ermöglichen. Jedoch zeigte eine erste Analyse der Mikroumgebung der

Lunge auf den ersten Blick keine TIMP-1-induzierten Veränderungen, die eine erhöhte Metastasierung erklären würden.

### **6.6.2 Die Bedeutung der CD63/TIMP-1-Interaktion für die Lebermetastasierung**

Im Gegensatz zur anti-metastatischen Funktion von TIMP-1 während der Lungenmetastasierung wird hinsichtlich der Lebermetastasierung in der Fachliteratur ein pro-metastatischer Einfluss von TIMP-1 beschrieben (Kopitz et al., 2007; Min et al., 2012; Schelter et al., 2010). Diese pro-metastatische Funktion wurde auf Veränderungen in der Lebermikroumgebung, die durch hohe systemische Level von TIMP-1 induziert werden, zurückgeführt (Kopitz et al., 2007). So konnten Kopitz u. a. zeigen, dass TIMP-1 den HGF/cMet-Signalweg stabilisiert und nachfolgend zu einer erhöhten Gesamtumorlast der Leber führt (Kopitz et al., 2007; Schelter et al., 2011). Als Mechanismus wurde eine TIMP-1-vermittelte Inhibition von ADAM10 diskutiert, die zu einer Stabilisierung des Met-Rezeptors auf Proteinebene führt. Allerdings führten in der zuvor genannten Studie auch hohe NTIMP-1-Level zu einer Induktion der Lebermetastasierung. Da diese TIMP-1-Variante nicht in der Lage ist, ADAM10 zu inhibieren (Rapti et al., 2008), muss die Rolle von ADAM10 für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung neu bewertet werden. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte die pro-metastatische Funktion von TIMP-1 bei der Lebermetastasierung bestätigt werden. Allerdings war für die metastasierungsfördernde Rolle von TIMP-1 – im Gegensatz zur Studie von Kopitz u. a. – die inhibitorische Funktion des Proteins nicht ausreichend. Indes konnte dargelegt werden, dass die Präsenz der C-terminalen Domäne entscheidend für die Induktion der Lebermetastasierung ist. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die in der vorliegenden Studie identifizierte pro-metastatische Funktion von TIMP-1 fundamental von der bisher bekannten metastasierungsfördernden Funktion von TIMP-1 unterscheidet (Kopitz et al., 2007).

Im Gegensatz zur TIMP-1-induzierten Lungenmetastasierung hatte der *Knockdown* von CD63 aufseiten der Tumorzellen keinen Effekt auf die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass das zell-intrinsische Potential der Tumorzellen für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung keine Rolle spielt. So induzieren hohe systemische TIMP-1-Level auch die Lebermetastasierung einer nicht-metastatischen Zelllinie. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass TIMP-1 die Metastasierung über Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber induziert. Das Konzept der prä-metastatischen Nische besagt, dass der Primärtumor lösliche Faktoren

sezerniert, die die Suszeptibilität des Sekundärorgans gegenüber Tumorzellen erhöhen. Experimentell konnte die prä-metastatische Nische erstmals von Kaplan u. a. in der Lunge identifiziert werden (Kaplan et al., 2005). Mittlerweile stützt eine Vielzahl von Studien dieses Konzept (Erlor et al., 2009; Hiratsuka et al., 2006, 2013; Kowanetz et al., 2010; Sceneay et al., 2013). Während die Charakterisierung der prä-metastatischen Nische vor allem auf der Verwendung von Lungenmetastasierungsmodellen basiert, ist die Ausbildung einer prä-metastatischen Nische in anderen Organen bislang nur unzureichend untersucht (Yamamoto et al., 2008; Zhang et al., 2013). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass TIMP-1 in der Lage ist, die Ausbildung einer prä-metastatischen Nische in der Leber zu induzieren und dass Primärtumor-sezerniertes TIMP-1 die Suszeptibilität der Leber selbst über eine Distanz hinweg zu erhöhen vermag. Die von TIMP-1 induzierten Veränderungen der hepatischen Mikroumgebung beinhalten neben Veränderungen des Genexpressionsprofils auch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. Schrözlmaier u. a. konnten bereits 2010 zeigen, dass die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung spielt (Schrözlmaier et al., 2010). Wie die Rekrutierung dieser Immunzellpopulation allerdings vermittelt wird, war bislang unklar. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 die Rekrutierung der Granulozyten über die CXCR4/SDF-1-Achse vermittelt. Bekannt ist überdies, dass CD63 die Lokalisation und die Expression des SDF-1-Rezeptors CXCR4 reguliert (Yoshida et al., 2008, 2009, 2011). Diese Modulation der CXCR4-Level führt zu Veränderungen in der Sensitivität der Zellen gegenüber SDF-1. Es ist also denkbar, dass TIMP-1 über die Interaktion mit CD63 die Expression und die Lokalisation von CXCR4 auf neutrophile Granulozyten reguliert. Diese Regulation könnte nachfolgend die Rekrutierung entsprechender Zellen in die Leber ermöglichen. Zusätzlich war die TIMP-1-induzierte Expression von SDF-1 in der Leber abhängig von der C-terminalen Domäne von TIMP-1 (Daten nicht gezeigt). CD63 könnte somit nicht nur für die Regulation der CXCR4-Level der neutrophilen Granulozyten, sondern auch für die Induktion der SDF-1-Expression in der Leber eine wichtige Rolle spielen. Diese Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Funktion von CD63 bei der TIMP-1-induzierten Lebermetastasierung hin, die im Gegensatz zur Rolle von CD63 bei der Metastasierung der Lunge nicht aufseiten der Tumorzellen liegt, sondern auf die Modulation der Wirtszellen zurückgeführt werden könnte.

Auch bei der Entstehung von Fibrosen spielt TIMP-1 eine wichtige Rolle. U. a. ist bekannt, dass eine massive Induktion der TIMP-1-Expression in fibrotischem Lebergewebe zu einer

Deregulation des proteolytischen Gleichgewichts führt (Popov et al., 2005). Darüber hinaus spielt die SDF-1-abhängige Aktivierung von hepatischen Ovalzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Leberfibrosen (Hatch et al., 2002; Pritchard und Nagy, 2010), und es gibt einen Zusammenhang zwischen fibrotischen Erkrankungen und der Metastasierung (Cox und Erler, 2011). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass systemisch erhöhte TIMP-1-Level die SDF-1-Expression in der Leber erhöhen und gleichzeitig zu einer verstärkten Aktivierung von hepatischen Ovalzellen führen. Somit ist denkbar, dass erhöhte systemische TIMP-1-Level einen fibroseähnlichen Zustand in der Leber hervorrufen, der einer prä-metastatischen Nische ähnelt und nachfolgend die Lebermetastasierung fördert. Die Inhibition der TIMP-1-induzierten Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten durch AMD3100 führte, im Gegensatz zur Depletion (Schrözlmaier et al., 2010), nicht zu einer vollständigen Hemmung der Ausbildung einer prä-metastatischen Nische in der Leber. Dieses Ergebnis legt nahe, dass diese Immunzellpopulation neben der TIMP-1-induzierten Rekrutierung noch weitere pro-metastatische Funktionen ausübt. Tatsächlich ist bekannt, dass sich neutrophile Granulozyten während der Metastasierung in N1- (anti-metastatisch) und N2- (pro-metastatisch) Zellen polarisieren können (Fridlender et al., 2009; Huh et al., 2010). Des Weiteren kann die Immunzellpopulation die Metastasierung über extrazelluläre DNA-Fallen begünstigen (Cools-Lartigue et al., 2013). Systemisch erhöhte TIMP-1-Level könnten diese pro-metastatischen Funktionen von lokalen hepatischen Neutrophilen induzieren und auf diesem Weg die Lebermetastasierung unabhängig von ihrer Rekrutierung fördern.

## **6.7 Die CD63/TIMP-1-Achse als vielversprechendes therapeutisches Ziel**

Der Einsatz von MMP-Breitspektrum-Inhibitoren in der Klinik führte nicht zu den erhofften Ergebnissen. Entweder hatten die Inhibitoren keinen oder gar einen negativen Effekt auf das Überleben der Krebspatienten (Coussens et al., 2002). Dieses Resultat ist dem mangelnden Verständnis des Protease-Netzwerks geschuldet. So wirken Proteasen nicht strikt pro-metastatisch und Proteaseinhibitoren nicht strikt anti-metastatisch (Krüger et al., 2010). Die Studien von Bajou (PAI-1) und Kopitz (TIMP-1) lieferten erste mechanistische Erklärungen für die pro-metastatische Funktion von Proteaseinhibitoren (Bajou et al., 1998; Kopitz et al., 2007). Besonders TIMP-1 korreliert in der Klinik mit einer schlechten Prognose von

Krebspatienten. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten das Verständnis zur Rolle von TIMP-1 während der Metastasierung vertieft und neue TIMP-1-abhängige pro-metastatische Mechanismen identifiziert werden. Von einer gegen TIMP-1 gerichteten Therapie sollte jedoch angesichts des proteolytischen Netzwerks, das für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase von großer Bedeutung ist, abgesehen werden (Krüger et al., 2010; Overall und Kleinfeld, 2006). Eine auf Inhibition von MMPs basierte Therapie könnte nachfolgend die Metastasierung begünstigen (Gerg et al., 2008). Aus diesem Grund sollten vielmehr den Proteasen bzw. Proteaseinhibitoren nachgeschaltete Signalwege im Fokus stehen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern hierbei neue Impulse bzw. Möglichkeiten zur Entwicklung von anti-metastatischen Behandlungsstrategien, die darauf basieren, dass die CD63/TIMP-1-Achse die Metastasierung der Leber und der Lunge auf verschiedenen Ebenen entscheidend beeinflusst. Für eine Intervention der TIMP-1-induzierten prä-metastatischen Nische stellt die SDF-1/CXCR4-Achse ein mögliches Target dar. Weiter deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass CD63 aufseiten des Wirts eine wichtige Rolle während der Lebermetastasierung spielt. Eine Intervention mit CD63 erscheint besonders attraktiv, da der Knockout von CD63 in Mäusen nur zu einem sehr milden Phänotyp führt (Schröder u. a. 2009) und aus diesem Grund mögliche Nebenwirkungen bei einer gegen CD63 gerichteten Therapie (z. B. Antikörper) gering sein dürften. Die Blockade der CD63/TIMP-1-Interaktion könnte also die Ausbildung einer suszeptiblen Mikroumgebung in der Leber verhindern und somit die Metastasierung reduzieren. Zusätzlich zu dieser anti-metastatischen Wirkung in der Leber würde dieser Therapieansatz auch die Metastasierung der Lunge reduzieren. In der Tat führte der *Knockdown* von CD63 in den Tumorzellen dazu, dass die Lungenmetastasierung sowohl in An- als auch in Abwesenheit hoher systemischer TIMP-1-Level fast vollständig inhibiert wurde. Somit dürfte eine Therapie, die auf einer Blockierung von CD63 basiert, eine effiziente Strategie für die Prävention von Lungen- und Lebermetastasen darstellen. Da CD63 speziell das Auswachsen der Tumorzellen in der Lunge reguliert, könnte eine auf CD63 abzielende Therapie auch das Auswachsen von ruhenden Tumorzellen in der Lunge verhindern.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die in dieser Studie identifizierten Funktionen der CD63/TIMP-1-Achse während der Metastasierung zur Entwicklung einer Vielzahl von neuen Behandlungsstrategien und Medikamenten führen und eine effiziente anti-metastatische Therapie ermöglichen können.

## 7. Ausblick

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse identifizieren CD63 als einen Faktor, der das zell-intrinsische metastatische Potential von Tumorzellen fördert. Zusätzlich konnten verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle identifiziert werden, die wiederum die pro-metastatische Funktion von CD63 vermitteln. Wie CD63 als Transmembranprotein diese Signalmoleküle reguliert, ist bislang unklar. Weiterführende Studien müssen jetzt mögliche CD63-Interaktionspartner in der Plasmamembran bzw. extra- oder intrazelluläre Proteine identifizieren, die die pro-metastatische Funktion von CD63 ermöglichen. Hierbei sollte besonders die Rolle von TIMP-1 im Fokus stehen. In der Tat war der Phänotyp der Tumorzellen nach *Knockdown* von TIMP-1 vergleichbar zu den morphologischen Veränderungen, die durch einen *Knockdown* von CD63 induziert wurden. In weiterführenden Studien muss jetzt gezeigt werden, inwieweit die Funktion von CD63 auf TIMP-1 zurückgeführt werden kann. Hierzu könnten Inkubationsexperimente mit verschiedenen TIMP-1-Varianten durchgeführt werden, die entweder keine inhibitorische Funktion aufweisen oder nicht mehr in der Lage sind, mit CD63 zu interagieren. Gleichzeitig könnten verschiedene Varianten von CD63 hergestellt werden, die z. B. nicht mehr richtig glykosyliert werden, einen verkürzten N- oder C-Terminus aufweisen oder Mutationen tragen, die die Funktion von CD63 beeinflussen. Die Verwendung dieser CD63-Varianten könnte in zukünftigen Experimenten weitere Hinweise auf die Funktionsweise von CD63 liefern. Darüber hinaus sollte die Aktivität der CD63-abhängigen Signalmoleküle nach Einsatz der spezifischen Inhibitoren untersucht werden, da in der vorliegenden Studie nur die Auswirkung der Inhibitoren auf die Morphologie und Motilität der Tumorzellen untersucht wurde, wobei u. a. dargelegt werden konnte, dass CD63 die Biogenese von Exosomen moduliert. Aktuelle Studien zeigen, dass diese Vesikel bei der Metastasierung von großer Bedeutung sind (Atay und Godwin, 2014; Kahlert und Kalluri, 2013; Thuma und Zöller, 2014; Vader et al., 2014). CD63 könnte das zell-intrinsische metastatische Potential der Tumorzellen somit zumindest teilweise über die Biogenese von Exosomen modulieren. Der Zusammenhang zwischen der Expression von CD63 und einer veränderten Biogenese von Exosomen sollte in weiterführenden Studien näher untersucht werden.

Erstmals konnte im Rahmen der vorliegenden Studie dargelegt werden, dass systemisch erhöhte TIMP-1-Level neben der Lebermetastasierung auch die Metastasierung in die Lunge fördern. Wie TIMP-1 diesen pro-metastatischen Effekt ausübt, ist noch unklar. Allerdings unterband der *Knockdown* von CD63 aufseiten der Tumorzellen die TIMP-1-induzierte Lungenmetastasierung vollständig. Somit ist denkbar, dass TIMP-1 die



Lungenmetastasierung (nicht jedoch die Lebermetastasierung) über eine direkte Interaktion mit CD63 aufseiten der Tumorzellen fördert. Dieser Zusammenhang muss in weiterführenden Studien analysiert werden. Hierbei könnte die Verwendung der im Rahmen der vorliegenden Studie klonierten Adenoviren, die für verschiedenen TIMP-1-Varianten kodieren, von Bedeutung sein.

In der vorliegenden Studie konnte überdies erstmals nachgewiesen werden, dass TIMP-1 neben der Sekundärinvasion auch den Arrest und die Extravasation von Tumorzellen in die Leber fördert. Zusätzlich konnten mit der CXCR-4/SDF-1-Achse und der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zwei grundlegende Mechanismen identifiziert werden. Im Gegensatz hierzu war weder die Expression von SDF-1 noch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in der Lunge verändert. Die Grundlage dieses gewebespezifischen Effekts ist völlig unklar. Eine Erklärungsmöglichkeit stellt ein organspezifischer Zelltyp dar. In der Tat konnte in der Leber eine erhöhte Anzahl bzw. die Aktivierung von hepatischen Ovalzellen beobachtet werden, und erste Ergebnisse deuten auf eine wesentliche Rolle der Sternzellen hin (Daten nicht gezeigt). Diese Zelltypen, die nur in der Leber vorkommen, könnten die Organspezifität des TIMP-1-Effekts erklären und deuten gleichzeitig auf einen möglichen Zusammenhang zwischen fibrotischen Erkrankungen und der Metastasierung der Leber hin. Der Zusammenhang zwischen den TIMP-1-induzierten Veränderungen in der Leber und fibrotischen Erkrankungen kann mithilfe eines Fibrosemodells untersucht werden (Katzenellenbogen et al., 2007; Popov et al., 2005). Interessanterweise war die Präsenz des C-Terminus eine Voraussetzung für die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung. Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion von CD63 hin, die in weiterführenden Studien nunmehr untersucht werden muss.

Nachgewiesenermaßen spielen bei der Entstehung einer prä-metastatischen Nische auch Exosomen eine wichtige Rolle. TIMP-1 könnte die Freisetzung von Exosomen über die Interaktion mit CD63 steuern und somit nachfolgend die Ausbildung der prä-metastatischen Nische in der Leber ermöglichen. Diese Fragestellung dürfte unter Hinzuziehung von CD63-Knockout-Mäusen klärbar sein. Des Weiteren ist auch die Rekrutierung von Neutrophilen erst ansatzweise verstanden. Weiterführende Studien müssen jetzt klären, ob systemisch erhöhte TIMP-1-Level Auswirkungen auf die Homöostase im Knochenmark haben. So könnten hohe systemische TIMP-1 Level zur Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark führen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die in dieser Studie identifizierten pro-metastatischen Funktionen der CD63/TIMP-1-Achse in Zukunft zur Entwicklung von effizienten anti-metastatischen Therapien führen könnten.

## 8. Literaturverzeichnis

- Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Aaronson, S.A., Kozlowski, J.M. und McEwan, R.N. (1987). A Rapid in Vitro Assay for Quantitating the Invasive Potential of Tumor Cells. *Cancer Res.* *47*, 3239–3245.
- Amalfitano, A., Hauser, M.A., Hu, H., Serra, D., Begy, C.R. und Chamberlain, J.S. (1998). Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J. Virol.* *72*, 926–933.
- André, M., Le Caer, J.-P., Greco, C., Planchon, S., El Nemer, W., Boucheix, C., Rubinstein, E., Chamot-Rooke, J. und Le Naour, F. (2006). Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. *Proteomics* *6*, 1437–1449.
- Angst, B.D., Marcozzi, C. und Magee, A.I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* *114*, 629–641.
- Arduise, C., Abache, T., Li, L., Billard, M., Chabanon, A., Ludwig, A., Mauduit, P., Boucheix, C., Rubinstein, E. und Naour, F.L. (2008). Tetraspanins Regulate ADAM10-Mediated Cleavage of TNF- $\alpha$  and Epidermal Growth Factor. *J. Immunol.* *181*, 7002–7013.
- Atay, S. und Godwin, A.K. (2014). Tumor-derived exosomes: A message delivery system for tumor progression. *Commun. Integr. Biol.* *7*, e28231.
- Atkinson, B., Ernst, C.S., Ghrist, B.F., Herlyn, M., Blaszczyk, M., Ross, A.H., Herlyn, D., Steplewski, Z. und Koprowski, H. (1984). Identification of melanoma-associated antigens using fixed tissue screening of antibodies. *Cancer Res.* *44*, 2577–2581.
- Baccelli, I., Schneeweiss, A., Riethdorf, S., Stenzinger, A., Schillert, A., Vogel, V., Klein, C., Saini, M., Bäuerle, T., Wallwiener, M., et al. (2013). Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat. Biotechnol.* *31*, 539–544.
- Bachelder, R.E., Yoon, S.-O., Franci, C., de Herreros, A.G. und Mercurio, A.M. (2005). Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription. *J. Cell Biol.* *168*, 29–33.
- Bajou, K., Noël, A., Gerard, R.D., Masson, V., Brunner, N., Holst-Hansen, C., Skobe, M., Fusenig, N.E., Carmeliet, P., Collen, D., et al. (1998). Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat. Med.* *4*, 923–928.
- Baker, A.H., Edwards, D.R. und Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* *115*, 3719–3727.
- Bao, Q., Niess, H., Djafarzadeh, R., Zhao, Y., Schwarz, B., Angele, M.K., Jauch, K.-W., Nelson, P.J. und Bruns, C.J. (2013). Recombinant TIMP-1-GPI inhibits growth of fibrosarcoma and enhances tumor sensitivity to doxorubicin. *Target. Oncol.* 2014 Sep;9(3):251-61.
- Barrallo-Gimeno, A. und Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* *132*, 3151–3161.

- Beinert, T., Münzing, S., Possinger, K. und Krombach, F. (2000). Increased expression of the tetraspanins CD53 and CD63 on apoptotic human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 67, 369–373.
- Berditchevski, F. (2001). Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J. Cell Sci.* 114, 4143–4151.
- Berditchevski, F., Odintsova, E., Sawada, S. und 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, 36991–37000.
- Berx, G., Cleton-Jansen, A.M., Strumane, K., de Leeuw, W.J., Nollet, F., van Roy, F. und Cornelisse, C. (1996). E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* 13, 1919–1925.
- Bett, A.J., Haddara, W., Prevec, L. und Graham, F.L. (1994). An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 8802–8806.
- Bienz, M. (2005). beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr. Biol. CB* 15, R64–R67.
- Bindels, S., Mestdagt, M., Vandewalle, C., Jacobs, N., Volders, L., Noël, A., van Roy, F., Berx, G., Foidart, J.-M. und Gilles, C. (2006). Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* 25, 4975–4985.
- Birchmeier, W. und Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta* 1198, 11–26.
- Boyer, B., Vallés, A.M. und Edme, N. (2000). Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1091–1099.
- Brabletz, T. (2012). To differentiate or not — routes towards metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 12, 425–436.
- Brabletz, T., Jung, A., Hermann, K., Günther, K., Hohenberger, W. und Kirchner, T. (1998). Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol. Res. Pract.* 194, 701–704.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R. und Kirchner, T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10356–10361.
- Brabletz, T., Lyden, D., Steeg, P.S. und Werb, Z. (2013). Roadblocks to translational advances on metastasis research. *Nat. Med.* 19, 1104–1109.
- Brew, K. und Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 55–71.

- Brew, K., Dinakarpanian, D. und Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 267–283.
- Brown, L.M., Welch, D.R. und Rannels, S.R. (2002). B16F10 melanoma cell colonization of mouse lung is enhanced by partial pneumonectomy. *Clin. Exp. Metastasis* 19, 369–376.
- Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S. und Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 9, 582–589.
- Butler, T.P. und Gullino, P.M. (1975). Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 35, 512–516.
- Cai, C. und Zhu, X. (2012). The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway regulates self-renewal of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *Mol. Med. Rep.* 5, 1191–1196.
- Carmeliet, P. und Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249–257.
- Chaffer, C.L., Brennan, J.P., Slavin, J.L., Blick, T., Thompson, E.W. und Williams, E.D. (2006). Mesenchymal-to-Epithelial Transition Facilitates Bladder Cancer Metastasis: Role of Fibroblast Growth Factor Receptor-2. *Cancer Res.* 66, 11271–11278.
- Chairoungdua, A., Smith, D.L., Pochard, P., Hull, M. und Caplan, M.J. (2010). Exosome release of  $\beta$ -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J. Cell Biol.* 190, 1079–1091.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. und MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572.
- Chan, A.O.O., Lam, S.K., Chu, K.M., Lam, C.M., Kwok, E., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Law, S.Y.K., Hui, W.M., Lai, K.C., et al. (2001). Soluble E-cadherin is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. *Gut* 48, 808–811.
- Charrin, S., Manié, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C. und Rubinstein, E. (2002). Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett.* 516, 139–144.
- Chen, D., Zhang, Y., Wang, J., Chen, J., Yang, C., Cai, K., Wang, X., Shi, F. und Dou, J. (2013). MicroRNA-200c overexpression inhibits tumorigenicity and metastasis of CD117+CD44+ ovarian cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition. *J. Ovarian Res.* 6, 50.
- Chen, E.Y., DeRan, M.T., Ignatius, M.S., Grandinetti, K.B., Clagg, R., McCarthy, K.M., Lobbardi, R.M., Brockmann, J., Keller, C., Wu, X., et al. (2014). Glycogen synthase kinase 3 inhibitors induce the canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway to suppress growth and self-renewal in embryonal rhabdomyosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201317731.
- Chen, Z., Gu, S., Trojanowicz, B., Liu, N., Zhu, G., Dralle, H. und Hoang-Vu, C. (2011). Down-regulation of TM4SF is associated with the metastatic potential of gastric carcinoma TM4SF members in gastric carcinoma. *World J. Surg. Oncol.* 9, 43.

- Cho, S.H., Park, Y.S., Kim, H.J., Kim, C.H., Lim, S.W., Huh, J.W., Lee, J.H. und Kim, H.R. (2012). CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion. *Int. J. Oncol.* *41*, 211–218.
- Clinchy, B., Gazdar, A., Rabinovsky, R., Yefenof, E., Gordon, B. und Vitetta, E.S. (2000). The growth and metastasis of human, HER-2/neu-overexpressing tumor cell lines in male SCID mice. *Breast Cancer Res. Treat.* *61*, 217–228.
- Côme, C., Magnino, F., Bibeau, F., De Santa Barbara, P., Becker, K.F., Theillet, C. und Savagner, P. (2006). Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 5395–5402.
- Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., Bourdeau, F., Kubes, P. und Ferri, L. (2013). Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.* 2013 Jul 1. pii: 67484.
- Cooper, J.A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* *105*, 1473–1478.
- Coussens, L.M., Fingleton, B. und Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* *295*, 2387–2392.
- Cox, T.R. und Erler, J.T. (2011). Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model. Mech.* *4*, 165–178.
- Craene, B.D. und Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 97–110.
- Creighton, C.J., Li, X., Landis, M., Dixon, J.M., Neumeister, V.M., Sjolund, A., Rimm, D.L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J.I., et al. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 13820–13825.
- Creighton, C.J., Chang, J.C. und Rosen, J.M. (2010). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *15*, 253–260.
- Crnic, I., and Christofori, G. (2004). Novel technologies and recent advances in metastasis research. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 573–581.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Vandenheede, J.R., McDowell, H.E., Hundal, H.S. und Cohen, P. (1994). The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem. J.* *303* ( Pt 1), 21–26.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. und Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* *378*, 785–789.
- Cui, H. (2011). Molecular and Immuno-Histological Investigations of the Role of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 and its Receptor CD63 during Metastatic Progression. Betreute Masterarbeit.

- Dalerba, P. und Clarke, M.F. (2007). Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory. *Cell Stem Cell* 1, 241–242.
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N. und Coussens, L.M. (2009). CD4<sup>+</sup> T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. *Cancer Cell* 16, 91–102.
- Derynck, R. und Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–584.
- Deryugina, E.I. und Quigley, J.P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 9–34.
- Devbhandari, R.P., Shi, G.-M., Ke, A.-W., Wu, F.-Z., Huang, X.-Y., Wang, X.-Y., Shi, Y.-H., Ding, Z.-B., Xu, Y., Dai, Z., et al. (2011). Profiling of the tetraspanin CD151 web and conspiracy of CD151/integrin  $\beta$ 1 complex in the progression of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(9):e24901.
- Djafarzadeh, R., Noessner, E., Engelmann, H., Schendel, D.J., Notohamiprodjo, M., von Luetlichau, I. und Nelson, P.J. (2005). GPI-anchored TIMP-1 treatment renders renal cell carcinoma sensitive to FAS-mediated killing. *Oncogene* 25, 1496–1508.
- Djafarzadeh, R., Sauter, M., Notohamiprodjo, S., Noessner, E., Goyal, P., Siess, W., Wörnle, M., Ribeiro, A., Himmelein, S., Sitter, T., et al. (2012). Recombinant GPI-Anchored TIMP-1 Stimulates Growth and Migration of Peritoneal Mesothelial Cells. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e33963.
- Domagala, W., Lasota, J., Dukowicz, A., Markiewski, M., Striker, G., Weber, K. und Osborn, M. (1990). Vimentin expression appears to be associated with poor prognosis in node-negative ductal NOS breast carcinomas. *Am. J. Pathol.* 137, 1299–1304.
- Doyle, J.L. und Haas, T.L. (2009). Differential role of beta-catenin in VEGF and histamine-induced MMP-2 production in microvascular endothelial cells. *J. Cell. Biochem.* 107, 272–283.
- Duband, J.L., Monier, F., Delannet, M. und Newgreen, D. (1995). Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. *Acta Anat. (Basel)* 154, 63–78.
- Duivenvoorden, W.C., Hirte, H.W. und Singh, G. (1999). Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* 17, 27–34.
- Dumont, N., Wilson, M.B., Crawford, Y.G., Reynolds, P.A., Sigaroudinia, M. und Tlsty, T.D. (2008). Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14867–14872.
- Duncan, S.J., Gordon, F.C.A., Gregory, D.W., McPhie, J.L., Postlethwaite, R., White, R. und Willcox, H.N.A. (1978). Infection of Mouse Liver by Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* 40, 45–61.

- Eberlein-König, B., Rakoski, J., Behrendt, H. und Ring, J. (2004). Use of CD63 expression as marker of in vitro basophil activation in identifying the culprit in insect venom allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 14, 10–16.
- Edwards, Hoyer-Hansen, G, Blasi, F und Sloane, B.F., B.F. (2009). *The Cancer Degradome - Proteases and Cancer Biology*. Springer-Verlag New York.
- Egea, V., Zahler, S., Rieth, N., Neth, P., Popp, T., Kehe, K., Jochum, M. und Ries, C. (2012). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E309–E316.
- Egeblad, M. und Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 161–174.
- Eger, A., Stockinger, A., Park, J., Langkopf, E., Mikula, M., Gotzmann, J., Mikulits, W., Beug, H. und Foisner, R. (2004). beta-Catenin and TGFbeta signalling cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FosER-induced epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* 23, 2672–2680.
- Elezkurtaj, S., Kopitz, C., Baker, A.H., Perez-Cantó, A., Arlt, M.J.E., Khokha, R., Gansbacher, B., Anton, M., Brand, K. und Krüger, A. (2004). Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the liver: efficient protection against T-cell lymphoma and colon carcinoma metastasis. *J. Gene Med.* 6, 1228–1237.
- Elloul, S., Elstrand, M.B., Nesland, J.M., Tropé, C.G., Kvalheim, G., Goldberg, I., Reich, R. und Davidson, B. (2005). Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 103, 1631–1643.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.-T. und Giaccia, A.J. (2009). Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 15, 35–44.
- Fearon, E.R. und Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. und Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127, 2893–2917.
- Fernandez-Garcia, B., Eiró, N., Marín, L., González-Reyes, S., González, L.O., Lamelas, M.L. und Vizoso, F.J. (2014). Expression and prognostic significance of fibronectin and matrix metalloproteases in breast cancer metastasis. *Histopathology* 64, 512–522.
- Fidler, I.J. (1970). Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With 125I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.* 45, 773–782.
- Fidler, I.J. (2002). The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differ. Res. Biol. Divers.* 70, 498–505.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458.



- Folkman, J. (1986). How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res.* 46, 467–473.
- Franke, W.W., Grund, C., Kuhn, C., Jackson, B.W. und Illmensee, K. (1982). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differ. Res. Biol. Divers.* 23, 43–59.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S. und Albelda, S.M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194.
- Frisch, S.M. und Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124, 619–626.
- Fristrom, D. (1988). The cellular basis of epithelial morphogenesis. A review. *Tissue Cell* 20, 645–690.
- Fu, Y., Zheng, S., An, N., Athanasopoulos, T., Popplewell, L., Liang, A., Li, K., Hu, C. und Zhu, Y. (2011).  $\beta$ -catenin as a potential key target for tumor suppression. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 129, 1541–1551.
- Garcia-España, A., Chung, P.-J., Sarkar, I.N., Stiner, E., Sun, T.-T. und Desalle, R. (2008). Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. *Genomics* 91, 326–334.
- Gautam, A., Waldrep, J.C., Densmore, C.L., Koshkina, N., Melton, S., Roberts, L., Gilbert, B. und Knight, V. (2002). Growth inhibition of established B16-F10 lung metastases by sequential aerosol delivery of p53 gene and 9-nitrocamptothecin. *Gene Ther.* 9, 353–357.
- Gay, L.J. und Felding-Habermann, B. (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 11, 123–134.
- Geiger, T.R. und Peeper, D.S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1796, 293–308.
- Gerg, M., Kopitz, C., Schaten, S., Tschukes, A., Kahlert, C., Stangl, M., von Weyhern, C.W.H., Brücher, B.L.D.M., Edwards, D.R., Brand, K., et al. (2008). Distinct functionality of tumor cell-derived gelatinases during formation of liver metastases. *Mol. Cancer Res. MCR* 6, 341–351.
- Gilles, C., Polette, M., Mestdagt, M., Nawrocki-Raby, B., Ruggeri, P., Birembaut, P. und Foidart, J.-M. (2003). Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 63, 2658–2664.
- Giordano, S., Di Renzo, M.F., Narsimhan, R.P., Tamagnone, L., Gerbaudo, E.V., Chiadò-Piat, L., und Comoglio, P.M. (1988). Evidence for autocrine activation of a tyrosine kinase in a human gastric carcinoma cell line. *J. Cell. Biochem.* 38, 229–236.
- Gottardi, C.J., Wong, E., und Gumbiner, B.M. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J. Cell Biol.* 153, 1049–1060.
- Gout, S., Tremblay, P.-L. und Huot, J. (2008). Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 335–344.

- Graff, J.R., Greenberg, V.E., Herman, J.G., Westra, W.H., Boghaert, E.R., Ain, K.B., Saji, M., Zeiger, M.A., Zimmer, S.G., und Baylin, S.B. (1998). Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 58, 2063–2066.
- Graham, F.L. und Prevec, L. (1995). Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol. Biotechnol.* 3, 207–220.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. und Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59–74.
- Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., Bachar-Lustig, E., Itin, A., Jung, S., Yung, S., Chimenti, S., Landsman, L., Abramovitch, R., et al. (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124, 175–189.
- Grünwald, B. (2011). Charakterisierung der durch Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) induzierten Prämetastatischen Nische in der Leber. Betreute Masterarbeit.
- Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., Taite, H., Scoular, R., Miller, A. und Reeve, A.E. (1998). E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 392, 402–405.
- Gupta, G.P. und Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679–695.
- Haining, E.J., Yang, J., Bailey, R.L., Khan, K., Collier, R., Tsai, S., Watson, S.P., Frampton, J., Garcia, P. und Tomlinson, M.G. (2012). The TspanC8 subgroup of tetraspanins interacts with A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulates its maturation and cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 287, 39753–39765.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Haslehurst, A.M., Koti, M., Dharsee, M., Nuin, P., Evans, K., Geraci, J., Childs, T., Chen, J., Li, J., Weberpals, J., et al. (2012). EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer* 12, 91.
- Hatch, H.M., Zheng, D., Jorgensen, M.L. und Petersen, B.E. (2002). SDF-1alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells* 4, 339–351.
- Hay E. (1968). In Epithelial-mesenchymal interactions. In *Organization and Fine Structure of Epithelium and Mesenchyme in the Developing Chick Embryo*, R. Fleischmajer and R.E. Billingham, ed. (Maryland, USA: Williams and Wikins), pp. 31–55.
- Haynes, J., Srivastava, J., Madson, N., Wittmann, T. und Barber, D.L. (2011). Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol. Biol. Cell* 22, 4750–4764.

- Hazan, R.B., Phillips, G.R., Qiao, R.F., Norton, L. und Aaronson, S.A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J. Cell Biol.* 148, 779–790.
- He, W., Tan, R., Dai, C., Li, Y., Wang, D., Hao, S., Kahn, M. und Liu, Y. (2010). Plasminogen activator inhibitor-1 is a transcriptional target of the canonical pathway of Wnt/beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 285, 24665–24675.
- Helm, C.W. und States, J.C. (2009). Enhancing the efficacy of cisplatin in ovarian cancer treatment - could arsenic have a role. *J. Ovarian Res.* 2009 Jan 14;2:2.
- Hemler, M.E. (2001). Specific tetraspanin functions. *J. Cell Biol.* 155, 1103–1107.
- Hemler, M.E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 397–422.
- Hemler, M.E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 801–811.
- Hemler, M.E. (2014). Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nat. Rev. Cancer* 14, 49–60.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J. und Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1, 313–323.
- Hess, K.R., Varadhachary, G.R., Taylor, S.H., Wei, W., Raber, M.N., Lenzi, R. und Abbruzzese, J.L. (2006). Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer* 106, 1624–1633.
- Hildreth, J.E., Derr, D. und Azorsa, D.O. (1991). Characterization of a novel self-associating Mr 40,000 platelet glycoprotein [see comments]. *Blood* 77, 121–132.
- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H. und Maru, Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat. Cell Biol.* 8, 1369–1375.
- Hiratsuka, S., Duda, D.G., Huang, Y., Goel, S., Sugiyama, T., Nagasawa, T., Fukumura, D. und Jain, R.K. (2011). C-X-C receptor type 4 promotes metastasis by activating p38 mitogen-activated protein kinase in myeloid differentiation antigen (Gr-1)-positive cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 302–307.
- Hiratsuka, S., Ishibashi, S., Tomita, T., Watanabe, A., Akashi-Takamura, S., Murakami, M., Kijima, H., Miyake, K., Aburatani, H. und Maru, Y. (2013). Primary tumours modulate innate immune signalling to create pre-metastatic vascular hyperpermeability foci. *Nat. Commun.* 4, 1853.
- Hood, J.D. und Cheresch, D.A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* 2, 91–100.
- Hotta, H., Ross, A.H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M.V., Ricciardi, R.P., Tsujimoto, Y., Croce, C.M. und Koprowski, H. (1988). Molecular cloning and

characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res.* 48, 2955–2962.

Hu, L., Lau, S.H., Tzang, C.-H., Wen, J.-M., Wang, W., Xie, D., Huang, M., Wang, Y., Wu, M.-C., Huang, J.-F., et al. (2004). Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene* 23, 298–302.

Huang, C.I., Kohno, N., Ogawa, E., Adachi, M., Taki, T. und Miyake, M. (1998). Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am. J. Pathol.* 153, 973–983.

Hughes, A.D. und King, M.R. (2012). Nanobiotechnology for the capture and manipulation of circulating tumor cells. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 4, 291–309.

Huh, S.J., Liang, S., Sharma, A., Dong, C. und Robertson, G.P. (2010). Transiently Entrapped Circulating Tumor Cells Interact with Neutrophils to Facilitate Lung Metastasis Development. *Cancer Res.* 70, 6071–6082.

Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S. und Kikuchi, A. (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin and promotes GSK-3 $\beta$ -dependent phosphorylation of  $\beta$ -catenin. *EMBO J.* 17, 1371–1384.

Inagawa, S., Itabashi, M., Adachi, S., Kawamoto, T., Hori, M., Shimazaki, J., Yoshimi, F. und Fukao, K. (2002). Expression and Prognostic Roles of  $\beta$ -Catenin in Hepatocellular Carcinoma Correlation with Tumor Progression and Postoperative Survival. *Clin. Cancer Res.* 8, 450–456.

Israels, S.J., McMillan-Ward, E.M., Easton, J., Robertson, C. und McNicol, A. (2001). CD63 associates with the  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets. *Thromb. Haemost.* 85, 134–141.

Jang, H.-I. und Lee, H. (2003). A decrease in the expression of CD63 tetraspanin protein elevates invasive potential of human melanoma cells. *Exp. Mol. Med.* 35, 317–323.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. und Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69–90.

Jiang, Y.-G., Luo, Y., He, D., Li, X., Zhang, L., Peng, T., Li, M.-C. und Lin, Y.-H. (2007). Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* 14, 1034–1039.

Jordà, M., Olmeda, D., Vinyals, A., Valero, E., Cubillo, E., Llorens, A., Cano, A. und Fabra, À. (2005). Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J. Cell Sci.* 118, 3371–3385.

Joyce, J.A. und Pollard, J.W. (2008). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9, 239–252.

Jung, K.-K., Liu, X.-W., Chirco, R., Fridman, R. und Kim, H.-R.C. (2006). Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J.* 25, 3934–3942.

- Jung, Y.S., Liu, X.-W., Chirco, R., Warner, R.B., Fridman, R. und Kim, H.-R.C. (2012). TIMP-1 Induces an EMT-Like Phenotypic Conversion in MDCK Cells Independent of Its MMP-Inhibitory Domain. *PloS One* 7, e38773.
- Kahlert, C. und Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 91, 431–437.
- Kalluri, R. und Neilson, E.G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112, 1776–1784.
- Kalluri, R. und Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428.
- Kang, Y. und Massagué, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118, 277–279.
- Kao, S.-H., Wang, W.-L., Chen, C.-Y., Chang, Y.-L., Wu, Y.-Y., Wang, Y.-T., Wang, S.-P., Nesvizhskii, A.I., Chen, Y.-J., Hong, T.-M., et al. (2013). GSK3 $\beta$  controls epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis by CHIP-mediated degradation of Slug. *Oncogene*. 2014 Jun 12;33(24):3172-82.
- Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820–827.
- Katow, H. und Solursh, M. (1980). Ultrastructure of primary mesenchyme cell ingression in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *J. Exp. Zool.* 213, 231–246.
- Katsuno, Y., Lamouille, S. und Derynck, R. (2013). TGF- $\beta$  signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr. Opin. Oncol.* 25, 76–84.
- Katzenellenbogen, M., Mizrahi, L., Pappo, O., Klopstock, N., Olam, D., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G., Domany, E., Galun, E., et al. (2007). Molecular Mechanisms of Liver Carcinogenesis in the *Mdr2*-Knockout Mice. *Mol. Cancer Res.* 5, 1159–1170.
- Kazem, A., Sayed, K.E. und Kerm, Y.E. (2013). Prognostic significance of COX-2 and  $\beta$ -catenin in colorectal carcinoma. *Alex. J. Med.* Volume 50, Issue 3, September 2014, Pages 211–220
- Khokha, R. (1994). Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells in vivo by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 299–304.
- Kikuchi, A. (1999). Roles of Axin in the Wnt signalling pathway. *Cell. Signal.* 11, 777–788.
- Kim, E.-S., Sohn, Y.-W. und Moon, A. (2007). TGF-beta-induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating transcription factor (ATF)2 in human breast epithelial cells. *Cancer Lett.* 252, 147–156.
- Kim, H., Seo, E.-M., Sharma, A.R., Ganbold, B., Park, J., Sharma, G., Kang, Y.-H., Song, D.-K., Lee, S.-S. und Nam, J.-S. (2013a). Regulation of Wnt signaling activity for growth

- suppression induced by quercetin in 4T1 murine mammary cancer cells. *Int. J. Oncol.* *43*, 1319–1325.
- Kim, K., Lu, Z. und Hay, E.D. (2002). Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol. Int.* *26*, 463–476.
- Kim, W., Kim, M. und Jho, E. (2013b). Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem. J.* *450*, 9–21.
- Kirchner, T. und Brabletz, T. (2000). Patterning and nuclear beta-catenin expression in the colonic adenoma-carcinoma sequence. Analogies with embryonic gastrulation. *Am. J. Pathol.* *157*, 1113–1121.
- Kitani, S., Berenstein, E., Mergenhagen, S., Tempst, P. und Siraganian, R.P. (1991). A cell surface glycoprotein of rat basophilic leukemia cells close to the high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI). Similarity to human melanoma differentiation antigen ME491. *J. Biol. Chem.* *266*, 1903–1909.
- Klein, C.A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 302–312.
- Klymkowsky, M.W. und Savagner, P. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transition. *Am. J. Pathol.* *174*, 1588–1593.
- Knoblich, K., Wang, H.-X., Sharma, C., Fletcher, A.L., Turley, S.J. und Hemler, M.E. (2013). Tetraspanin TSPAN12 regulates tumor growth and metastasis and inhibits  $\beta$ -catenin degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* 1–10.
- Knol, E.F., Mul, F.P., Jansen, H., Calafat, J. und Roos, D. (1991). Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J. Allergy Clin. Immunol.* *88*, 328–338.
- Kobayashi, M., Salomon, C., Tapia, J., Illanes, S.E., Mitchell, M.D. und Rice, G.E. (2014). Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200. *J. Transl. Med.* *12*, 4.
- Koh, B.I. und Kang, Y. (2012). The pro-metastatic role of bone marrow-derived cells: a focus on MSCs and regulatory T cells. *EMBO Rep.* *13*, 412–422.
- Kopf, E., Shnitzer, D. und Zharhary, D. (2005). Panorama Ab Microarray Cell Signaling kit: a unique tool for protein expression analysis. *Proteomics* *5*, 2412–2416.
- Kopitz, C., Gerg, M., Bandapalli, O.R., Ister, D., Pennington, C.J., Hauser, S., Flechsig, C., Krell, H.-W., Antolovic, D., Brew, K., et al. (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res.* *67*, 8615–8623.
- Korpal, M., Lee, E.S., Hu, G. und Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J. Biol. Chem.* *283*, 14910–14914.
- Korsching, E., Packeisen, J., Liedtke, C., Hungermann, D., Wülfing, P., van Diest, P.J., Brandt, B., Boecker, W. und Buerger, H. (2005). The origin of vimentin expression in

invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J. Pathol.* *206*, 451–457.

Kowanetz, M., Wu, X., Lee, J., Tan, M., Hagenbeek, T., Qu, X., Yu, L., Ross, J., Korsisaari, N., Cao, T., et al. (2010). Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 21248–21255.

Krüger, A., Schirmacher, V. und von Hoegen, P. (1994). Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of lacZ-labeled metastasized lymphoma cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *58*, 275–284.

Krüger, A., Fata, J.E. und Khokha, R. (1997). Altered tumor growth and metastasis of a T-cell lymphoma in Timp-1 transgenic mice. *Blood* *90*, 1993–2000.

Krüger, A., Schirmacher, V. und Khokha, R. (1998). The bacterial lacZ gene: an important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev.* *17*, 285–294.

Krüger, A., Soeltl, R., Sopov, I., Kopitz, C., Arlt, M., Magdolen, V., Harbeck, N., Gänsbacher, B. und Schmitt, M. (2001). Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res.* *61*, 1272–1275.

Krüger, A., Kates, R.E. und Edwards, D.R. (2010). Avoiding spam in the proteolytic internet: future strategies for anti-metastatic MMP inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 95–102.

Kwon, M.J., Park, S., Choi, J.Y., Oh, E., Kim, Y.J., Park, Y.-H., Cho, E.Y., Kwon, M.J., Nam, S.J., Im, Y.-H., et al. (2012). Clinical significance of CD151 overexpression in subtypes of invasive breast cancer. *Br. J. Cancer* *106*, 923–930.

Kwon, M.S., Shin, S.-H., Yim, S.-H., Lee, K.Y., Kang, H.-M., Kim, T.-M. und Chung, Y.-J. (2007). CD63 as a biomarker for predicting the clinical outcomes in adenocarcinoma of lung. *Lung Cancer Amst. Neth.* *57*, 46–53.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.

Laffin, B., Wellberg, E., Kwak, H.-I., Burghardt, R.C., Metz, R.P., Gustafson, T., Schedin, P. und Porter, W.W. (2008). Loss of single-minded-2s in the mouse mammary gland induces an epithelial-mesenchymal transition associated with up-regulation of slug and matrix metalloprotease 2. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 1936–1946.

Lamouille, S., Xu, J. und Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 178–196.

Lang, S.H., Hyde, C., Reid, I.N., Hitchcock, I.S., Hart, C.A., Bryden, A.A.G., Villette, J.-M., Stower, M.J. und Maitland, N.J. (2002). Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *The Prostate* *52*, 253–263.

- Larsson, A., Wilhelmsson, U., Pekna, M. und Pekny, M. (2004). Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP(-/-)Vim(-/-) mice. *Neurochem. Res.* *29*, 2069–2073.
- Larue, L. und Bellacosa, A. (2005). Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* *24*, 7443–7454.
- Lee, Lee, S.-Y., Cho, I.-H., Oh, M.-A., Kang, E.-S., Kim, Y.-B., Seo, W.D., Choi, S., Nam, J.-O., Tamamori-Adachi, M., et al. (2008a). Tetraspanin TM4SF5 mediates loss of contact inhibition through epithelial-mesenchymal transition in human hepatocarcinoma. *J. Clin. Invest.* *118*, 1354–1366.
- Lee, D., Suh, Y.-L., Park, T.-I., Do, I.-G., Seol, H.J., Nam, D.-H. und Kim, S.T. (2013). Prognostic significance of tetraspanin CD151 in newly diagnosed glioblastomas. *J. Surg. Oncol.* *107*, 646–652.
- Lee, G., Goretsky, T., Managlia, E., Dirisina, R., Singh, A.P., Brown, J.B., May, R., Yang, G.-Y., Ragheb, J.W., Evers, B.M., et al. (2010). Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates beta-catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis. *Gastroenterology* *139*, 869–881, 881.e1–e9.
- Lee, Y.-H., Albig, A.R., Regner, M., Schiemann, B.J. und Schiemann, W.P. (2008b). Fibulin-5 initiates epithelial–mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF- $\beta$  in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism. *Carcinogenesis* *29*, 2243–2251.
- Levy, S. und Shoham, T. (2005). The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 136–148.
- Lewis, T.B., Robison, J.E., Bastien, R., Milash, B., Boucher, K., Samlowski, W.E., Leachman, S.A., Dirk Noyes, R., Wittwer, C.T., Perreard, L., et al. (2005). Molecular classification of melanoma using real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* *104*, 1678–1686.
- Li, G. und Herlyn, M. (2000). Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol. Med. Today* *6*, 163–169.
- Li, J. und Zhou, B.P. (2011). Activation of  $\beta$ -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer* *11*, 49.
- Li, G., Satyamoorthy, K. und Herlyn, M. (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* *61*, 3819–3825.
- Li, X.-Q., Yang, X.-L., Zhang, G., Wu, S.-P., Deng, X.-B., Xiao, S.-J., Liu, Q.-Z., Yao, K.-T. und Xiao, G.-H. (2013). Nuclear  $\beta$ -catenin accumulation is associated with increased expression of Nanog protein and predicts poor prognosis of non-small cell lung cancer. *J. Transl. Med.* *11*, 114.
- Lillie, F.R. (1908). *The development of the chick; an introduction to embryology* (New York, H. Holt and Company).



- Lin, S.Y., Xia, W., Wang, J.C., Kwong, K.Y., Spohn, B., Wen, Y., Pestell, R.G. und Hung, M.C. (2000). Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4262–4266.
- Liotta, L.A. (1984). Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. Warner-Lambert Parke-Davis Award lecture. *Am. J. Pathol.* 117, 339–348.
- Liotta, L.A. und Stetler-Stevenson, W.G. (1991). Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* 51, 5054s – 5059s.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. und He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837–847.
- Liu, C., Xu, P., Lamouille, S., Xu, J. und Derynck, R. (2009). TACE-mediated ectodomain shedding of the type I TGF-beta receptor downregulates TGF-beta signaling. *Mol. Cell* 35, 26–36.
- Liu, R., Wang, X., Chen, G.Y., Dalerba, P., Gurney, A., Hoey, T., Sherlock, G., Lewicki, J., Shedden, K. und Clarke, M.F. (2007). The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N. Engl. J. Med.* 356, 217–226.
- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D. und Clarke, M.F. (2007). The Biology of Cancer Stem Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 675–699.
- Logan, C.Y. und Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810.
- Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabrò, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L., Federici, C., Iessi, E., et al. (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PloS One* 2009;4(4):e5219.
- De Lorenzo, M.S., Ripoll, G.V., Yoshiji, H., Yamazaki, M., Thorgerisson, U.P., Alonso, D.F. und Gomez, D.E. (2003). Altered tumor angiogenesis and metastasis of B16 melanoma in transgenic mice overexpressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Vivo Athens Greece* 17, 45–50.
- Louis, N., Eveleigh, C. und Graham, F.L. (1997). Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 233, 423–429.
- Luo, W.-R., Wu, A.-B., Fang, W.-Y., Li, S.-Y. und Yao, K.-T. (2012). Nuclear expression of N-cadherin correlates with poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology* 61, 237–246.
- Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F. und Groom, A.C. (1998). Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. *Am. J. Pathol.* 153, 865–873.
- Maecker, H.T., Todd, S.C. und Levy, S. (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 11, 428–442.

- Mahmudi-Azer, S., Downey, G.P. und Moqbel, R. (2002). Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release. *Blood* 99, 4039–4047.
- Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D., Hussenet, T., Metzger, D., Chambon, P., Huber, M., Hohl, D., Cano, A., Birchmeier, W., et al. (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* 452, 650–653.
- Malik, G., Knowles, L.M., Dhir, R., Xu, S., Yang, S., Ruoslahti, E. und Pilch, J. (2010). Plasma Fibronectin Promotes Lung Metastasis by Contributions to Fibrin Clots and Tumor Cell Invasion. *Cancer Res.* 70, 4327–4334.
- Mancilla, A. und Mayor, R. (1996). Neural crest formation in *Xenopus laevis*: mechanisms of Xslug induction. *Dev. Biol.* 177, 580–589.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715.
- Marjanovic, N.D., Weinberg, R.A. und Chaffer, C.L. (2013). Poised with purpose: Cell plasticity enhances tumorigenicity. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 2713–2714.
- Martin, A. und Cano, A. (2010). Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal. *Nat. Cell Biol.* 12, 924–925.
- Maschler, S., Wirl, G., Spring, H., Bredow, D.V., Sordat, I., Beug, H. und Reichmann, E. (2005). Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene* 24, 2032–2041.
- Massagué, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215–230.
- Meacham, C.E. und Morrison, S.J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501, 328–337.
- Medema, J.P. (2013). Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nat. Cell Biol.* 15, 338–344.
- Van Meijer, M. und Pannekoek, H. (1995). Structure of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update. *Fibrinolysis* 9, 263–276.
- Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y. und Yoshiki, A. (2009). Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp. Anim. Jpn. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 58, 141–149.
- Meng, Q., Malinovskii, V., Huang, W., Hu, Y., Chung, L., Nagase, H., Bode, W., Maskos, K. und Brew, K. (1999). Residue 2 of TIMP-1 is a major determinant of affinity and specificity for matrix metalloproteinases but effects of substitutions do not correlate with those of the corresponding P1' residue of substrate. *J. Biol. Chem.* 274, 10184–10189.
- Miettinen, P.J., Ebner, R., Lopez, A.R. und Derynck, R. (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.* 127, 2021–2036.

- Min, B.S., Kim, N.K., Jeong, H.C. und Chung, H.C. (2012). High levels of serum VEGF and TIMP-1 are correlated with colon cancer liver metastasis and intrahepatic recurrence after liver resection. *Oncol. Lett.* 4, 123–130.
- Minner, S., De Silva, C., Rink, M., Dahlem, R., Chun, F., Fisch, M., Höppner, W., Wagner, W., Bokemeyer, C., Terracciano, L., et al. (2012). Reduced CD151 expression is related to advanced tumour stage in urothelial bladder cancer. *Pathology (Phila.)* 44, 448–452.
- Mise, N., Savai, R., Yu, H., Schwarz, J., Kaminski, N. und Eickelberg, O. (2012). Zyxin is a transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Smad3 target gene that regulates lung cancer cell motility via integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *J. Biol. Chem.* 287, 31393–31405.
- Mitchell, M.J. und King, M.R. (2013). Computational and experimental models of cancer cell response to fluid shear stress. *Mol. Cell. Oncol.* 3, 44.
- Miyoshi, A., Kitajima, Y., Kido, S., Shimonishi, T., Matsuyama, S., Kitahara, K., und Miyazaki, K. (2005). Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 92, 252–258.
- Möbus, V., Gerharz, C.D., Press, U., Moll, R., Beck, T., Mellin, W., Pollow, K., Knapstein, P.G. und Kreienberg, R. (1992). Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 52, 76–84.
- Modderman, P. (1989). Cluster report: CD63. (Oxford: Oxford University Press).
- Moody, S.E., Perez, D., Pan, T., Sarkisian, C.J., Portocarrero, C.P., Sterner, C.J., Notorfrancesco, K.L., Cardiff, R.D. und Chodosh, L.A. (2005). The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* 8, 197–209.
- Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Sarrió, D., Peinado, H., Rodríguez-Pinilla, S.M., Villa, S., Bolós, V., Jordá, M., Fabra, A., Portillo, F., et al. (2006). Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 66, 9543–9556.
- Moseley, G.W., Elliott, J., Wright, M.D., Partridge, L.J. und Monk, P.N. (2003). Interspecies contamination of the KM3 cell line: implications for CD63 function in melanoma metastasis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 105, 613–616.
- Mosig, R.A., Lin, L., Senturk, E., Shah, H., Huang, F., Schlosshauer, P., Cohen, S., Fruscio, R., Marchini, S., D’Incalci, M., et al. (2012). Application of RNA-Seq transcriptome analysis: CD151 is an Invasion/Migration target in all stages of epithelial ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 2012 Jan 24;5:4.
- Mott, J.D. und Werb, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 558–564.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50–56.
- Nagathihalli, N.S. und Merchant, N.B. (2012). Src-mediated regulation of E-cadherin and EMT in pancreatic cancer. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 17, 2059–2069.

- Nguyen, D.X. (2011). Tracing the origins of metastasis. *J. Pathol.* 223, 195–204.
- Nguyen, T.H. (2004). Mechanisms of metastasis. *Clin. Dermatol.* 22, 209–216.
- Nieman, M.T., Prudoff, R.S., Johnson, K.R. und Wheelock, M.J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J. Cell Biol.* 147, 631–644.
- Nieto, M.A., Sargent, M.G., Wilkinson, D.G. und Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835–839.
- Olmeda, D., Jordá, M., Peinado, H., Fabra, A. und Cano, A. (2007). Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene* 26, 1862–1874.
- Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S. und Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Res.* 68, 3645–3654.
- Overall, C.M. und Kleinfeld, O. (2006). Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 6, 227–239.
- Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1, 571–573 (1889).
- Pantelouris, E.M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217, 370–371.
- Park, J. und Schwarzbauer, J.E. (2014). Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 33, 1649–1657.
- Park, C.H., Chang, J.Y., Hahm, E.R., Park, S., Kim, H.-K. und Yang, C.H. (2005). Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 227–234.
- Park, S.-M., Gaur, A.B., Lengyel, E. und Peter, M.E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 22, 894–907.
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. und Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8392–8396.
- Peifer, M., Pai, L.M. und Casey, M. (1994). Phosphorylation of the Drosophila adherens junction protein Armadillo: roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase. *Dev. Biol.* 166, 543–556.
- Peinado, H., Olmeda, D. und Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* 7, 415–428.
- Peinado, H., Lavotshkin, S. und Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin. Cancer Biol.* 21, 139–146.

- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* 18, 883–891.
- Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., Vázquez, J. und Yáñez-Mó, M. (2013). The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J. Biol. Chem.* 288, 11649–11661.
- Perry, J.M., He, X.C., Sugimura, R., Grindley, J.C., Haug, J.S., Ding, S. und Li, L. (2011). Cooperation between both Wnt/ $\beta$ -catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion. *Genes Dev.* 25, 1928–1942.
- Pfistershammer, K., Majdic, O., Stöckl, J., Zlabinger, G., Kirchberger, S., Steinberger, P. und Knapp, W. (2004). CD63 as an activation-linked T cell costimulatory element. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 6000–6008.
- Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C.H. und ten Dijke, P. (1999). TGF-( $\beta$ ) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 24), 4557–4568.
- Podsypanina, K., Du, Y.-C.N., Jechlinger, M., Beverly, L.J., Hambarzumyan, D. und Varmus, H. (2008). Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science* 321, 1841–1844.
- Pollard, T.D. und Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
- Pols, M.S. und Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* 315, 1584–1592.
- Polyak, K. und Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 9, 265–273.
- Popov, Y., Patsenker, E., Fickert, P., Trauner, M. und Schuppan, D. (2005). Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J. Hepatol.* 43, 1045–1054.
- Poste, G. und Fidler, I.J. (1980). The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283, 139–146.
- Prall, F. (2007). Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 50, 151–162.
- Pritchard, M.T. und Nagy, L.E. (2010). Hepatic fibrosis is enhanced and accompanied by robust oval cell activation after chronic carbon tetrachloride administration to Egr-1-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 176, 2743–2752.
- Psaila, B. und Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer* 9, 285–293.

- Qian, B., Deng, Y., Im, J.H., Muschel, R.J., Zou, Y., Li, J., Lang, R.A. und Pollard, J.W. (2009). A Distinct Macrophage Population Mediates Metastatic Breast Cancer Cell Extravasation, Establishment and Growth. *PLoS ONE* 2009 Aug 10;4(8):e6562.
- Radford, K.J., Mallesch, J. und Hersey, P. (1995). Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 62, 631–635.
- Radford, K.J., Thorne, R.F. und Hersey, P. (1997). Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 158, 3353–3358.
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D. und Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1574–1584.
- Rapti, M., Atkinson, S.J., Lee, M.-H., Trim, A., Moss, M. und Murphy, G. (2008). The isolated N-terminal domains of TIMP-1 and TIMP-3 are insufficient for ADAM10 inhibition. *Biochem. J.* 411, 433–439.
- Reinhold, W.C., Reimers, M.A., Lorenzi, P., Ho, J., Shankavaram, U.T., Ziegler, M.S., Bussey, K.J., Nishizuka, S., Ikediobi, O., Pommier, Y.G., et al. (2010). Multifactorial Regulation of E-Cadherin Expression: An Integrative Study. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1–16.
- Ren, J., Chen, Y., Song, H., Chen, L. und Wang, R. (2013). Inhibition of ZEB1 reverses EMT and chemoresistance in docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cell line. *J. Cell. Biochem.* 114, 1395–1403.
- Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., et al. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148, 349–361.
- Ridley, A.J. und Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389–399.
- Ridnour, L.A., Barasch, K.M., Windhausen, A.N., Dorsey, T.H., Lizardo, M.M., Yfantis, H.G., Lee, D.H., Switzer, C.H., Cheng, R.Y.S., Heinecke, J.L., et al. (2012). Nitric oxide synthase and breast cancer: role of TIMP-1 in NO-mediated Akt activation. *PloS One* 2012;7(9):e44081..
- Ripoll, G.V., Farina, H.G., Yoshiji, H., Gomez, D.E. und Alonso, D.F. (2006). Desmopressin reduces melanoma lung metastasis in transgenic mice overexpressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Vivo Athens Greece* 20, 881–885.
- Root, D.E., Hacohen, N., Hahn, W.C., Lander, E.S. und Sabatini, D.M. (2006). Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library. *Nat. Methods* 3, 715–719.
- Rorive, S., Lopez, X.M., Maris, C., Trepant, A.-L., Sauvage, S., Sadeghi, N., Roland, I., Decaestecker, C. und Salmon, I. (2010). TIMP-4 and CD63: new prognostic biomarkers in human astrocytomas. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 23, 1418–1428.
- Rosanò, L., Cianfrocca, R., Spinella, F., Castro, V.D., Nicotra, M.R., Lucidi, A., Ferrandina, G., Natali, P.G. und Bagnato, A. (2011). Acquisition of Chemoresistance and EMT

Phenotype Is Linked with Activation of the Endothelin A Receptor Pathway in Ovarian Carcinoma Cells. *Clin. Cancer Res.* 17, 2350–2360.

Rygaard, J. und Friis, C.W. (1974). The husbandry of mice with congenital absence of the thymus (nude mice). *Z. Für Vers.* 16, 1–10.

Sadej, R., Romanska, H., Kavanagh, D., Baldwin, G., Takahashi, T., Kalia, N., und Berditchevski, F. (2010). Tetraspanin CD151 regulates transforming growth factor beta signaling: implication in tumor metastasis. *Cancer Res.* 70, 6059–6070.

Sánchez-Tilló, E., de Barrios, O., Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A. und Postigo, A. (2011).  $\beta$ -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 19204–19209.

Satelli, A. und Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 3033–3046.

Sauer, G., Kurzeder, C., Grundmann, R., Kreienberg, R., Zeillinger, R. und Deissler, H. (2003). Expression of tetraspanin adaptor proteins below defined threshold values is associated with in vitro invasiveness of mammary carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 10, 405–410.

Sceneay, J., Smyth, M.J. und Möller, A. (2013). The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev.* 2013 Dec;32(3-4):449-64.

Schambach, A., Mueller, D., Galla, M., Versteegen, M.M.A., Wagemaker, G., Loew, R., Baum, C. und Bohne, J. (2006). Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors. *Gene Ther.* 13, 1524–1533.

Schelter, F., Halbgewachs, B., Bäumlner, P., Neu, C., Görlach, A., Schrötzlmair, F. und Krüger, A. (2011). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Clin. Exp. Metastasis.* 2011 Feb;28(2):91-9.

Schelter, F., Grandl, M., Seubert, B., Schaten, S., Hauser, S., Gerg, M., Boccaccio, C., Comoglio, P. und Krüger, A. (2011). Tumor cell-derived Timp-1 is necessary for maintaining metastasis-promoting Met-signaling via inhibition of Adam-10. *Clin. Exp. Metastasis* 28, 793–802.

Schröder, J., Lüllmann-Rauch, R., Himmerkus, N., Pleines, I., Nieswandt, B., Orinska, Z., Koch-Nolte, F., Schröder, B., Bleich, M. und Saftig, P. (2009). Deficiency of the tetraspanin CD63 associated with kidney pathology but normal lysosomal function. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1083–1094.

Schrötzlmair, F., Kopitz, C., Halbgewachs, B., Lu, F., Algül, H., Brünner, N., Gänsbacher, B. und Krüger, A. (2010). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by host-derived urokinase-type plasminogen activator. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 2760–2770.

Schwann, T. (1910). *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen* (Leipzig: Engelmann).

- Sekimoto, G., Matsuzaki, K., Yoshida, K., Mori, S., Murata, M., Seki, T., Matsui, H., Fujisawa, J. und Okazaki, K. (2007). Reversible Smad-dependent signaling between tumor suppression and oncogenesis. *Cancer Res.* 67, 5090–5096.
- Selleck, M.A. und Bronner-Fraser, M. (1995). Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Dev. Camb. Engl.* 121, 525–538.
- Shan, B.-E., Wang, M.-X. und Li, R. (2009). Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cancer Invest.* 27, 604–612.
- Sharma, C., Yang, X.H. und Hemler, M.E. (2008). DHHC2 affects palmitoylation, stability, and functions of tetraspanins CD9 and CD151. *Mol. Biol. Cell* 19, 3415–3425.
- Shayakhmetov, D.M., Li, Z.-Y., Ni, S. und Lieber, A. (2004). Analysis of Adenovirus Sequestration in the Liver, Transduction of Hepatic Cells, and Innate Toxicity after Injection of Fiber-Modified Vectors. *J. Virol.* 78, 5368–5381.
- Shi, Y., Parhar, R.S., Zou, M., Al-Mohanna, F.A. und Paterson, M.C. (2002). Gene therapy of melanoma pulmonary metastasis by intramuscular injection of plasmid DNA encoding tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Cancer Gene Ther.* 9, 126–132.
- Shioiri, M., Shida, T., Koda, K., Oda, K., Seike, K., Nishimura, M., Takano, S. und Miyazaki, M. (2006). Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br. J. Cancer* 94, 1816–1822.
- Sho, M., Adachi, M., Taki, T., Hashida, H., Konishi, T., Huang, C.L., Ikeda, N., Nakajima, Y., Kanehiro, H., Hisanaga, M., et al. (1998). Transmembrane 4 superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 79, 509–516.
- Skubitz, K.M., Campbell, K.D., Iida, J. und Skubitz, A.P. (1996). CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md* 157, 3617–3626.
- Sleman, J.P. (2012). The metastatic niche and stromal progression. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 429–440.
- Soloway, P.D., Alexander, C.M., Werb, Z. und Jaenisch, R. (1996). Targeted mutagenesis of Timp-1 reveals that lung tumor invasion is influenced by Timp-1 genotype of the tumor but not by that of the host. *Oncogene* 13, 2307–2314.
- Sordat, I., Decraene, C., Silvestre, T., Petermann, O., Auffray, C., Piétu, G. und Sordat, B. (2002). Complementary DNA arrays identify CD63 tetraspanin and alpha3 integrin chain as differentially expressed in low and high metastatic human colon carcinoma cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 82, 1715–1724.
- Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hlubek, F., Berx, G., Eger, A., Merkel, S., Jung, A., Kirchner, T. und Brabletz, T. (2006). A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 131, 830–840.
- Sporn, M.B. (1996). The war on cancer. *Lancet* 347, 1377–1381.



- Stambolic, V. und Woodgett, J.R. (1994). Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem. J.* 303 ( Pt 3), 701–704.
- Stetler-Stevenson, W.G. (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci. Signal.* 2008 Jul 8;1(27):re6.
- Stockinger, A., Eger, A., Wolf, J., Beug, H. und Foisner, R. (2001). E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J. Cell Biol.* 154, 1185–1196.
- Stoecklein, N.H., Hosch, S.B., Bezler, M., Stern, F., Hartmann, C.H., Vay, C., Siegmund, A., Scheunemann, P., Schurr, P., Knoefel, W.T., et al. (2008). Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell* 13, 441–453.
- Strutz, F., Zeisberg, M., Ziyadeh, F.N., Yang, C.-Q., Kalluri, R., Müller, G.A. und Neilson, E.G. (2002). Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 61, 1714–1728.
- Sugarbaker, P.H. (1993). Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastases from colorectal cancer. *J. Surg. Oncol. Suppl.* 3, 158–160.
- Sutherland, C., Leighton, I.A. und Cohen, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* 296 ( Pt 1), 15–19.
- Taketo, M., Schroeder, A.C., Mobraaten, L.E., Gunning, K.B., Hanten, G., Fox, R.R., Roderick, T.H., Stewart, C.L., Lilly, F. und Hansen, C.T. (1991). FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2065–2069.
- Takino, T., Miyamori, H., Kawaguchi, N., Uekita, T., Seiki, M. und Sato, H. (2003). Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 160–166.
- Tanaka, M., Itoh, T., Tanimizu, N. und Miyajima, A. (2011). Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *J. Biochem. (Tokyo)* 149, 231–239.
- Tarhini, A.A., Lin, Y., Yeku, O., LaFramboise, W.A., Ashraf, M., Sander, C., Lee, S. und Kirkwood, J.M. (2014). A four-marker signature of TNF-RII, TGF- $\alpha$ , TIMP-1 and CRP is prognostic of worse survival in high-risk surgically resected melanoma. *J. Transl. Med.* 12, 19.
- Tarin, D., Price, J.E., Kettlewell, M.G.W., Souter, R.G., Vass, A.C.R. und Crossley, B. (1984). Mechanisms of Human Tumor Metastasis Studied in Patients with Peritoneovenous Shunts. *Cancer Res.* 44, 3584–3592.
- Teicher, B.A. und Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 2927–2931.
- Tenbaum, S.P., Ordóñez-Morán, P., Puig, I., Chicote, I., Arqués, O., Landolfi, S., Fernández, Y., Herance, J.R., Gispert, J.D., Mendizabal, L., et al. (2012).  $\beta$ -catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nat. Med.* 18, 892–901.

- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454.
- Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 740–746.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J. und Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.
- Thompson, E.W. und Haviv, I. (2011). The social aspects of EMT-MET plasticity. *Nat. Med.* 17, 1048–1049.
- Thuma, F. und Zöller, M. (2014). Outsmart tumor exosomes to steal the cancer initiating cell its niche. *Semin. Cancer Biol.* 2014 Oct;28:39-50.
- Tomita, K., van Bokhoven, A., van Leenders, G.J., Ruijter, E.T., Jansen, C.F., Bussemakers, M.J. und Schalken, J.A. (2000). Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.* 60, 3650–3654.
- Tonoli, H. und Barrett, J.C. (2005). CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? *Trends Mol. Med.* 11, 563–570.
- Toricelli, M., Melo, F.H., Peres, G.B., Silva, D.C. und Jasiulionis, M.G. (2013). Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation. *Mol. Cancer* 12, 22.
- Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S. und Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 22, 725–736.
- Vader, P., Breakefield, X.O. und Wood, M.J.A. (2014). Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* 2014 Jul;20(7):385-93.
- Valdés, F., Alvarez, A.M., Locascio, A., Vega, S., Herrera, B., Fernández, M., Benito, M., Nieto, M.A. und Fabregat, I. (2002). The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes. *Mol. Cancer Res. MCR* 1, 68–78.
- Varghese, H.J., Davidson, M.T.M., MacDonald, I.C., Wilson, S.M., Nadkarni, K.V., Groom, A.C. und Chambers, A.F. (2002). Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases. *Cancer Res.* 62, 887–891.
- Vasiljeva, O., Papazoglou, A., Krüger, A., Brodoefel, H., Korovin, M., Deussing, J., Augustin, N., Nielsen, B.S., Almholt, K., Bogyo, M., et al. (2006). Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res.* 66, 5242–5250.
- Viebahn, C. (1995). Epithelio-mesenchymal transformation during formation of the mesoderm in the mammalian embryo. *Acta Anat. (Basel)* 154, 79–97.
- Virchow, R.L.K. (1860). Cellular pathology (John Churchill).

- Voss, M.A., Gordon, N., Maloney, S., Ganesan, R., Ludeman, L., McCarthy, K., Gornall, R., Schaller, G., Wei, W., Berditchevski, F., et al. (2011). Tetraspanin CD151 is a novel prognostic marker in poor outcome endometrial cancer. *Br. J. Cancer* *104*, 1611–1618.
- Vuoriluoto, K., Haugen, H., Kiviluoto, S., Mpindi, J.-P., Nevo, J., Gjerdrum, C., Tiron, C., Lorens, J.B. und Ivaska, J. (2011). Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene* *30*, 1436–1448.
- Wear, M.A., Schafer, D.A. und Cooper, J.A. (2000). Actin dynamics: assembly and disassembly of actin networks. *Curr. Biol. CB* *10*, R891–R895.
- Wei, K.-C., Huang, C.-Y., Chen, P.-Y., Feng, L.-Y., Wu, T.-W.E., Chen, S.-M., Tsai, H.-C., Lu, Y.-J., Tsang, N.-M., Tseng, C.-K., et al. (2010). Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme. *Anticancer Res.* *30*, 253–259.
- Weinberg, R.A. (2007). *The biology of Cancer* (Abingdon: Garland Science).
- Weinberg, R.A. (2008). Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis* *29*, 1092–1095.
- Weiss, L. (1990). Metastatic inefficiency. *Adv. Cancer Res.* *54*, 159–211.
- Weiss, L. (1992). Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin. Exp. Metastasis* *10*, 191–199.
- Weiss, L., Mayhew, E., Rapp, D.G. und Holmes, J.C. (1982). Metastatic inefficiency in mice bearing B16 melanomas. *Br. J. Cancer* *45*, 44–53.
- Werbeck, J.L., Thudi, N.K., Martin, C.K., Premanandan, C., Yu, L., Ostrowski, M.C. und Rosol, T.J. (2013). Tumor Microenvironment Regulates Metastasis and Metastasis Genes of Mouse MMTV-PyMT Mammary Cancer Cells In Vivo. *Vet Pathol.* 2014 Jul;51(4):868-81.
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K. und Searson, P.C. (2011). The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 512–522.
- Worgall, S., Wolff, G., Falck-Pedersen, E. und Crystal, R.G. (1997). Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum. Gene Ther.* *8*, 37–44.
- Wortis, H.H., Nehlsen, S. und Owen, J.J. (1971). Abnormal development of the thymus in “nude” mice. *J. Exp. Med.* *134*, 681–692.
- Wright, M.D., Moseley, G.W. und van Sriel, A.B. (2004). Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease. *Tissue Antigens* *64*, 533–542.
- Wu, Z.-Q., Li, X.-Y., Hu, C.Y., Ford, M., Kler, C.G. und Weiss, S.J. (2012). Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 16654–16659.
- Würtz, S.Ø., Møller, S., Mouridsen, H., Hertel, P.B., Friis, E. und Brüner, N. (2008). Plasma and serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are associated with

prognosis in node-negative breast cancer: a prospective study. *Mol. Cell. Proteomics* MCP 7, 424–430.

Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W. und Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 67, 2649–2656.

Wynn, T.A. und Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* 18, 1028–1040.

Xia, Y., Yeddula, N., Leblanc, M., Ke, E., Zhang, Y., Oldfield, E., Shaw, R.J. und Verma, I.M. (2012). Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung cancer model. *Nat. Cell Biol.* 14, 257–265.

Xu, J., Lamouille, S. und Derynck, R. (2009). TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19, 156–172.

Yamamoto, M., Kikuchi, H., Ohta, M., Kawabata, T., Hiramatsu, Y., Kondo, K., Baba, M., Kamiya, K., Tanaka, T., Kitagawa, M., et al. (2008). TSU68 prevents liver metastasis of colon cancer xenografts by modulating the premetastatic niche. *Cancer Res.* 68, 9754–9762.

Yamazaki, M., Akahane, T., Buck, T., Yoshiji, H., Gomez, D.E., Schoeffner, D.J., Okajima, E., Harris, S.R., Bunce, O.R., Thorgeirsson, S.S., et al. (2004). Long-term exposure to elevated levels of circulating TIMP-1 but not mammary TIMP-1 suppresses growth of mammary carcinomas in transgenic mice. *Carcinogenesis* 25, 1735–1746.

Yan, D., Avtanski, D., Saxena, N.K. und Sharma, D. (2012). Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires  $\beta$ -catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 287, 8598–8612.

Yáñez-Mó, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdés, M. und Sánchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* 19, 434–446.

Yang, J., Shultz, R.W., Mars, W.M., Wegner, R.E., Li, Y., Dai, C., Nejak, K. und Liu, Y. (2002). Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J. Clin. Invest.* 110, 1525–1538.

Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. und Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939.

Yang, M.-H., Wu, M.-Z., Chiou, S.-H., Chen, P.-M., Chang, S.-Y., Liu, C.-J., Teng, S.-C. und Wu, K.-J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis. *Nat. Cell Biol.* 10, 295–305.

Yeung, J., Esposito, M.T., Gandillet, A., Zeisig, B.B., Griessinger, E., Bonnet, D. und So, C.W.E. (2010).  $\beta$ -Catenin Mediates the Establishment and Drug Resistance of MLL Leukemic Stem Cells. *Cancer Cell* 18, 606–618.

Yilmaz, M. und Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 15–33.

- Yin, T. (2006). The stem cell niches in bone. *J. Clin. Invest.* *116*, 1195–1201.
- Yoshida, N., Kitayama, D., Arima, M., Sakamoto, A., Inamine, A., Watanabe-Takano, H., Hatano, M., Koike, T. und Tokuhisa, T. (2011). CXCR4 expression on activated B cells is downregulated by CD63 and IL-21. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 2800–2808.
- Yoshida, T., Kawano, Y., Sato, K., Ando, Y., Aoki, J., Miura, Y., Komano, J., Tanaka, Y. und Koyanagi, Y. (2008). A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic Cph. Den.* *9*, 540–558.
- Yoshida, T., Ebina, H. und Koyanagi, Y. (2009). N-linked glycan-dependent interaction of CD63 with CXCR4 at the Golgi apparatus induces downregulation of CXCR4. *Microbiol. Immunol.* *53*, 629–635.
- Yost, C., Torres, M., Miller, J.R., Huang, E., Kimelman, D. und Moon, R.T. (1996). The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* *10*, 1443–1454.
- Yu, M., Bardia, A., Wittner, B.S., Stott, S.L., Smas, M.E., Ting, D.T., Isakoff, S.J., Ciciliano, J.C., Wells, M.N., Shah, A.M., et al. (2013). Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science* *339*, 580–584.
- Yu, Y., Ramena, G. und Elble, R.C. (2012). The role of cancer stem cells in relapse of solid tumors. *Front. Biosci. Elite Ed.* *4*, 1528–1541.
- Yunta, M. und Lazo, P.A. (2003). Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell. Signal.* *15*, 559–564.
- Zavadil, J. und Böttinger, E.P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* *24*, 5764–5774.
- Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y.C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E. und Böttinger, E.P. (2001). Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 6686–6691.
- Zeisberg, M. und Neilson, E.G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* *119*, 1429–1437.
- Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res.* *19*, 128–139.
- Zhang, Q., Helfand, B.T., Jang, T.L., Zhu, L.J., Chen, L., Yang, X.J., Kozlowski, J., Smith, N., Kundu, S.D., Yang, G., et al. (2009). Nuclear factor-kappaB-mediated transforming growth factor-beta-induced expression of vimentin is an independent predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 3557–3567.
- Zhang, S., Balch, C., Chan, M.W., Lai, H.-C., Matei, D., Schilder, J.M., Yan, P.S., Huang, T.H.-M. und Nephew, K.P. (2008). Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors. *Cancer Res.* *68*, 4311–4320.

Zhang, Y., Davis, C., Ryan, J., Janney, C. und Peña, M.M.O. (2013). Development and characterization of a reliable mouse model of colorectal cancer metastasis to the liver. *Clin. Exp. Metastasis*. 2013 Oct;30(7):903-18.

Zheng, H., Li, W., Wang, Y., Liu, Z., Cai, Y., Xie, T., Shi, M., Wang, Z. und Jiang, B. (2013). Glycogen synthase kinase-3 beta regulates Snail and  $\beta$ -catenin expression during Fas-induced epithelial–mesenchymal transition in gastrointestinal cancer. *Eur. J. Cancer* 49, 2734–2746.

Zhijun, X., Shulan, Z. und Zhuo, Z. (2007). Expression and significance of the protein and mRNA of metastasis suppressor gene ME491/CD63 and integrin alpha5 in ovarian cancer tissues. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 28, 179–183.

Zöller, M. (2006). Gastrointestinal tumors: metastasis and tetraspanins. *Z. Für Gastroenterol.* 44, 573–586.

Zöller, M. (2009). Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9, 40–55.

## 9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2.1:** Die Hauptmerkmale von Krebs.
- Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der metastatischen Kaskade (verändert nach (Fidler, 2003)).
- Abbildung 2.3:** Metastasierungsmuster von verschiedenen Adenokarzinomen.
- Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung der Entstehung einer prä-metastatischen Nische.
- Abbildung 2.5:** Schematische Darstellung der zellulären Plastizität während der Tumorprogression (verändert nach (Craene und Berx, 2013)).
- Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung der typischen Struktur von Tetraspaninen.
- Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung des Aufbaus der SKOV3ipL Tierversuche.
- Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung des Aufbaus des B16F10L Tierversuchs.
- Abbildung 4.3:** Schematische Darstellung des Aufbaus des Eb288L Tierversuchs.
- Abbildung 4.4:** Schematische Darstellung des Aufbaus des PyMTL Tierversuchs.
- Abbildung 4.5:** Schematische Darstellung des Tierversuchs zur Analyse der TIMP-1-induzierten Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber.
- Abbildung 4.6:** Schematische Darstellung des Tierversuchsaufbaus zur Analyse der Auswirkungen einer TIMP-1 Überexpression im Primärtumor auf die Metastasierung von PyMTL Tumorzellen.
- Abbildung 4.7:** cDNA von CD63 in Vektor pBSKSII.
- Abbildung 4.8:** Schematische Darstellung des pHIV-7\_SSFF\_CD63 Plasmids.
- Abbildung 4.9:** Schematische Darstellung des pHIV-7\_PGK\_CD63 Plasmids.
- Abbildung 5.1:** *Knockdown* von CD63 in verschiedenen Tumorzelllinien.
- Abbildung 5.2:** Immunzytochemische Färbung von CD63 in SKOV3ipL Zellen.
- Abbildung 5.3:** Der *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL Zellen reduziert den Arrest von Tumorzellen in der Lunge.

- Abbildung 5.4:** Der *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL Zellen inhibiert die Lungenmetastasierung fast vollständig.
- Abbildung 5.5:** Der *Knockdown* von CD63 in B16F10L Zellen verminderte das zell-intrinsische metastatische Potential.
- Abbildung 5.6:** Der *Knockdown* von CD63 hat keinen Einfluss auf die Tumorzellproliferation.
- Abbildung 5.7:** Der *Knockdown* von CD63 hat keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Tumorzellen.
- Abbildung 5.8:** Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Migration von verschiedenen Tumorzelllinien.
- Abbildung 5.9:** Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Motilität von SKOV3ipL Tumorzellen.
- Abbildung 5.10:** Der *Knockdown* von CD63 reduziert die invasiven Eigenschaften von verschiedenen Tumorzelllinien.
- Abbildung 5.11:** Analyse der Tumorzellmorphologie nach *Knockdown* von CD63.
- Abbildung 5.12:** Der *Knockdown* von CD63 reduziert das Scattering von SKOV3ipL und B16F10L Tumorzellen.
- Abbildung 5.13:** Immunzytochemische Färbung des Aktinzytoskeletts in SKOV3ipL Tumorzellen.
- Abbildung 5.14:** Hypoxie hat keinen Einfluss auf den Phänotyp von SKOV3ipL Zellen mit verminderter CD63 Expression.
- Abbildung 5.15:** Der *Knockdown* von CD63 verändert das Genexpressionsprofil metastasierungs-assoziiierter Gene in SKOV3ipL Tumorzellen.
- Abbildung 5.16:** Der *Knockdown* von CD63 induziert die Expression von E-Cadherin auf mRNA- und Proteinebene.
- Abbildung 5.17:** Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Expression von Snail, Slug, Twist und Zeb1.
- Abbildung 5.18:** Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Expression von miR-141 in SKOV3ipL Tumorzellen.
- Abbildung 5.19:** Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Expression von mesenchymalen Markerproteinen auf mRNA Ebene.
- Abbildung 5.20:** Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Expression von mesenchymalen Markern auf Proteinebene.



- Abbildung 5.21:** Der *Knockdown* von CD63 moduliert die Phosphorylierung verschiedener Kinasen.
- Abbildung 5.22:** Der *Knockdown* von CD63 moduliert die Aktivität von verschiedenen intrazellulären Signalwegen.
- Abbildung 5.23:** Der *Knockdown* von CD63 reduziert die intrazelluläre Gesamtproteinmenge von  $\beta$ -Catenin.
- Abbildung 5.24:** Der  $\beta$ -Catenin Inhibitor Quercetin führt zu einer MET der SKOV3ipL Tumorzelllinie.
- Abbildung 5.25:** Der *Knockdown* von CD63 reduziert die Koloniebildung und Chemosensitivität der SKOV3ipL Tumorzelllinie.
- Abbildung 5.26:** *Knockdown* von CD63 reduziert die Phosphorylierung von GSK3- $\beta$
- Abbildung 5.27:** Der GSK-3 $\alpha/\beta$  Inhibitor SB 216763 führt zu einer EMT der CD63 *Knockdown* Tumorzellen.
- Abbildung 5.28:** CD63 moduliert die Aktivität des PI3K/Akt Signalweges.
- Abbildung 5.29:** CD63 moduliert die Aktivität des PI3K/Akt Signalweges.
- Abbildung 5.30:** Die TGF- $\beta$ 1-induzierte Aggressivität ist abhängig von der CD63 Expression der SKOV3ipL Tumorzellen.
- Abbildung 5.31:** Die Überexpression von CD63 erhöht die Motilität von SKOV3ipL Tumorzellen.
- Abbildung 5.32:** Die Überexpression von CD63 erhöht die Invasion von SKOV3ipL Tumorzellen.
- Abbildung 5.33:** Die Überexpression von CD63 erhöht das Tumorzellscattering von SKOV3ipL Tumorzellen.
- Abbildung 5.34:** Die Überexpression von CD63 in SKOV3ipL Zellen erhöht den Arrest von Tumorzellen in der Lunge.
- Abbildung 5.35:** Die Überexpression von CD63 in SKOV3ipL Zellen erhöht die Anzahl der Lungenmetastasen.
- Abbildung 5.36:** Der *Knockdown* von CD63 verhindert die Induktion der Lungenmetastasierung durch systemisch erhöhte TIMP-1 Level.
- Abbildung 5.37:** Der *Knockdown* von TIMP-1 reduziert das Tumorzellscattering der SKOV3ipL Zellen.
- Abbildung 5.38:** Der *Knockdown* von CD63 in SKOV3ipL Zellen hat keinen Einfluss auf die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung.

- Abbildung 5.39:** Die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung ist unabhängig vom zell-intrinsischen metastatischen Potential der Tumorzellen.
- Abbildung 5.40:** Die N-terminale TIMP-1 Domäne allein ist nicht in der Lage die Lebermetastasierung zu induzieren.
- Abbildung 5.41:** Systemisch erhöhte TIMP-1 Level führen zu Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber.
- Abbildung 5.42:** Systemisch erhöhte TIMP-1 Level induzieren die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Leber und die Aktivierung von hepatischen Ovalzellen.
- Abbildung 5.43:** Systemisch erhöhte TIMP-1 Level induzieren die SDF-1 Expression in der Leber.
- Abbildung 5.44:** Die Vorinkubation der Tumorzellen mit dem CXCR4 Inhibitor AMD3100 hat keinen Einfluss auf die TIMP-1-induzierte Lebermetastasierung.
- Abbildung 5.45:** Der CXCR4 Inhibitor AMD3100 reduziert die Ausbildung der TIMP-1-induzierten prä-metastatischen Nische in der Leber.
- Abbildung 5.46:** Experimentelles Modell zur Analyse der TIMP-1-induzierten prä-metastatischen Nische im Primärtumormodell.
- Abbildung 5.47:** Primärtumor-sezerniertes TIMP-1 erhöht die Suszeptibilität der Leber gegenüber Tumorzellen.
- Abbildung 5.48:** Primärtumor-sezerniertes TIMP-1 induziert eine prä-metastatische Nische in der Leber.
- Abbildung 6.1:** Schematische Darstellung der Auswirkungen einer Modulation der CD63 Expression auf die zelluläre Plastizität der Tumorzellen.
- Abbildung 6.2:** Schematische Darstellung des CD63-abhängigen Signalwegs basierend auf den im Rahmen der vorliegenden Studie gewonnenen Erkenntnissen.
- Tabelle 4.1:** Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien für die entsprechende Zelllinie.

## 10. Abkürzungsverzeichnis

<b>Arg</b>	Arginin
<b>Akt</b>	Proteinkinase B
<b>AMD3100</b>	CXCR-4 Antagonist
<b>Asp</b>	Asparaginsäure
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>BCA</b>	Bizinkoniniksäure
<b>bHLH</b>	engl. <i>basic helix-loop-helix</i>
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>CD</b>	engl. <i>cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	codogene DNA
<b>cMET</b>	engl. <i>hepatocyte growth factor receptor</i>
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CT</b>	engl. <i>threshold cycle</i>
<b>CXCR-4</b>	Chemokinrezeptor 4
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DAPI</b>	4'-6-Diamidin-2'-phenylindol
<b>ddH2O</b>	doppelt destilliertes H2O
<b>DMF</b>	Dimethylformamid
<b>DMEM</b>	Dulbeccos Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>E-Cadherin</b>	epitheliales Cadherin
<b>EDTA</b>	Ethyl diamintetraacetat
<b>ELISA</b>	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
<b>env</b>	<i>envelope</i> Proteine (virale Hüllproteine)
<b>EMT</b>	epitheliale-mesenchymale Transition
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>FAM</b>	Carboxylfluoreszein
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FITC</b>	Floureszein
<b>FN1</b>	Fibronectin

---

<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>gag</b>	gruppenspezifisches Antigene
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
<b>Glu</b>	Glutaminsäure
<b>HGF</b>	Hepatozyten Wachstumsfaktor
<b>HEK</b>	enl. <i>human embryonic kidney</i>
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<b>HRP</b>	engl. <i>horse radish peroxidase</i>
<b>hu</b>	human
<b>IL</b>	Interleukin
<b>i.v.</b>	intravenös
<b>i.d.</b>	intradermal
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>LOX</b>	Lysyloxidase
<b>LB-Medium</b>	Lysogeny broth-Medium
<b>M</b>	molar
<b>MAP-Kinase</b>	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MET</b>	mesenchymale-epitheliale Transition
<b>mg</b>	Milligramm
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MMP</b>	Matrix Metalloproteinase
<b>MT-MMP</b>	Membran Typ-Matrix Metalloproteinase
<b>MOI</b>	engl. <i>multiplicity of infection</i>
<b>mRNA</b>	engl. <i>messenger RNA</i>
<b>mm</b>	Millimeter
<b>miR</b>	microRNA
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>NT</b>	engl. <i>non target</i>
<b>NTC</b>	engl. <i>non template control</i>
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>PAI-1</b>	Plasminogenaktivatorinhibitor-1

<b>PBS</b>	engl. <i>phosphat buffered saline</i>
<b>pfu</b>	<i>plaque forming units</i>
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<b>PolyA</b>	Polyadenylierungssignal
<b>pol</b>	virale Polymerasen und weitere virale Proteine neben env und pol
<b>Rho</b>	<i>Ras homologue</i>
<b>RNAi</b>	RNA-Interferenz
<b>RT</b>	reverse Transkriptase
<b>RT-PCR</b>	real time Polymerasekettenreaktion
<b>s.c.</b>	Subkutan
<b>SDF-1</b>	engl. <i>stromal cell-derived factor 1</i>
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>shRNA</b>	short hairpin RNA
<b>smad</b>	zusammengesetzt aus <i>MAD</i> (engl. <i>mothers against decapentaplegic</i> ) und <i>Sma</i> (engl. <i>small body size</i> )
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA Puffer
<b>TF</b>	Transkriptionsfaktor
<b>TE-Puffer</b>	TRIS-EDTA-Puffer
<b>TBS</b>	engl. <i>Tris buffered saline</i>
<b>TBS-T</b>	TBS mit Tween
<b>TGF</b>	engl. <i>transforming growth factor</i>
<b>TIMP</b>	engl. <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
<b>Tris</b>	Trishydroxymethylaminomethan
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	engl. <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
<b>TZ</b>	Tumorzellen
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>v/w</b>	Masse pro Volumen
<b>VEGF</b>	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>VEGF-R</b>	engl. <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
<b>Wnt</b>	zusammengesetzt aus <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>
<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid

<b>U</b>	Umdrehungen
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>Zeb1</b>	engl. <i>zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>

## 11. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Achim Krüger* für das entgegengebrachte Vertrauen und den Freiraum, in dem ich unter seiner Leitung meine wissenschaftlichen Ideen umsetzen konnte. Seine Unterstützung und seine kritischen Ratschläge trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Sehr gut in Erinnerung bleiben werden mir die vielen produktiven Diskussionen während der Ausarbeitung der verschiedenen Manuskripte. Ebenso möchte ich ihm für die Hilfe bei verschiedenen Tierexperimenten danken.

Auch bei *Univ.-Prof. Dr. Percy Knolle* möchte ich mich bedanken, der durch seine wertvolle Unterstützung und hilfreichen Gespräche in der Endphase das Gelingen dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat.

Mein Dank gilt ebenso Frau *Prof. Dr. Hannelore Daniel* für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit auf Seiten des Wissenschaftszentrums Weihenstephan. Ohne ihre Hilfe wäre es nicht möglich gewesen, diese Arbeit am Klinikum rechts der Isar anzufertigen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn *Prof. Dr. Dirk Haller* für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Mein Dank gilt darüber hinaus Herrn *Univ.-Prof. Dr. Bernd Gänsbacher*, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung der Technischen Universität München, der mir die Durchführung meiner Arbeit an seinem Institut ermöglichte.

Bedanken möchte ich mich auch bei "meinen" Masterstudentinnen *Haissi Cui* und *Barbara Grünwald* und "meinem" Masterstudenten *Steve Oswald*, die während ihrer Masterarbeit an kleinen Teilprojekten meiner Dissertation mitgewirkt haben. Zusätzlich möchte ich mich für die angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre, die nicht nur beim Verfassen der Manuskripte sehr hilfreich war, bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei *Dr. Nicole Simonavicius* für die produktive Kooperation sowie die vielen fachlichen Diskussionen.

Mein Dank gilt insbesondere auch *Frau Katja Honert* für ihre fachlichen Ratschläge und ihre Unterstützung bei der Durchführung aller *in vitro* Experimente und bei der Vorbereitung der *in vivo* Experimente. Vielen lieben Dank!!! Auch Frau *Dr. Susanne Schaten* gilt mein Dank für die Einführung in die immunhistochemischen Färbemethoden.

Stellvertretend für alle Praktikanten, die einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben, möchte ich mich bei *Martina Rami* und *Elisabeth Wurzer* bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an Herrn *Dr. Anton Steger*, Herrn *Dr. Gerd Zimmermann* und Herrn *Josef „Sepp“ Strassmeier*. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Sekretärinnen des Instituts, insbesondere bei Frau *Brigitte Kätzel*, für ihre Hilfe bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Förderung durch das *Framework Programme 7 (Microenvironment und SaveMe)* der Europäischen Union (jeweils an *Prof. Dr. Achim Krüger*).

Meinen Eltern *Edith* und *Michael Seubert* und *Claudia Seubert* möchte ich für ihre grenzenlose Unterstützung und die Förderung auf meinem bisherigen Weg danken. Ein besonderer Dank gilt meinem Vater für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei meiner Frau *Doris Ettmeyer* möchte ich mich für ihre unendliche Rücksichtnahme, ihre grenzenlose Unterstützung, ihr Vertrauen in das Gelingen und das Korrekturlesen dieser Arbeit von ganzem Herzen bedanken.

Meiner Tochter *Maja Ettmeyer* möchte ich für die vielen schönen Momente danken, die es mir ermöglicht haben, immer wieder neue Kraft zu sammeln.



## 12. Anhang

### 12.1 Publikationsverzeichnis

**Seubert B\***, Cui H\*, Simonavicius N, Honert K, Schäfer S, Reuning U, Heikenwalder M, Mari B, Krüger A. (2014). Tetraspanin CD63 acts as a pro-metastatic factor via  $\beta$ -catenin stabilization. **Int J Cancer**. 2014 Oct 29. doi: 10.1002/ijc.29296. [Epub ahead of print]. \*, gleichberechtigte Erstautoren.

**Seubert B\***, Grünwald B\*, Kobuch J\*, Cui H\*, Schelter F, Siveke JT, Lim NH, Nagase H, Simonavicius N, Heikenwaelder M, Reinheckel T, Sleeman JP, Krüger A. (2014) TIMP-1 creates a pre-metastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice. **Hepatology**. 2014 Aug 18. doi: 10.1002/hep.27378. [Epub ahead of print]. \*, gleichberechtigte Erstautoren.

#### **Inhaltlich nicht aus der vorliegenden Arbeit entstanden:**

Cui H, **Seubert B**, Stahl E, Dietz H, Reuning U, Moreno-Leon L, Ilie M, Hofman P, Nagase H, Mari B, Krüger A. (2014). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 induces a pro-tumorigenic increase of miR-210 in lung adenocarcinoma cells and their exosomes. **Oncogene**. 2014 Sep 29. doi: 10.1038/onc.2014.300. [Epub ahead of print].

Kelwick R, Wagstaff L, Decock J, Roghi C, Cooley L, Robinson SD, Arnold H, Gavrilović J, Jaworski DM, Yamamoto K, Nagase H, **Seubert B**, Krüger A, Edwards DR. (2014). Metalloproteinase-dependent and -independent processes contribute to inhibition of breast cancer cell migration, angiogenesis and liver metastasis by A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs-15 (ADAMTS-15). **Int J Cancer**. 2014 Aug 6. doi: 10.1002/ijc.29129. [Epub ahead of print].

Weinspach D\*, **Seubert B\***, Schaten S, Honert K, Sebens S, Altevogt P, Krüger A. (2014). Role of L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in the metastatic cascade: promotion of dissemination, colonization, and metastatic growth. **Clin Exp Metastasis**. 2014 Jan;31(1):87-100. \*, gleichberechtigte Erstautoren.

Grismayer B, Sölch S, **Seubert B**, Kirchner T, Schäfer S, Baretton G, Schmitt M, Luther T, Krüger A, Kotzsch M, Magdolen V. (2012). Rab31 expression levels modulate tumor-relevant characteristics of breast cancer cells. **Mol Cancer**. 2012 Aug 24;11:62.

Schelter F, Grandl M, **Seubert B**, Schaten S, Hauser S, Gerg M, Boccaccio C, Comoglio P, Krüger A. (2011). Tumor cell-derived Timp-1 is necessary for maintaining metastasis-promoting Met-signaling via inhibition of Adam-10. **Clin Exp Metastasis**. 2011 Dec;28(8):793-802.

Simonavicius N, **Seubert B**, u.a.. (2014). LT $\beta$ R agonisation and metastasis. *in preparation*.