

Technische Universität München

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde
der Technischen Universität München
Klinische Forschergruppe

Tumorbiologische Effekte des Metastasierungssuppressors KAI1 und seiner Splice-Variante in humanen kultivierten MDA-MB-231- und MDA-MB- 435-Zellen

Julia Anna Miller

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Ute Reuning
2. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 10.12.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät der Medizin am 04.11.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Abstract.....	1
2 Einleitung: Der Metastasierungssuppressor KAI1 und seine Interaktionspartner in ihrer Rolle beim Mammakarzinom und malignen Melanom.....	3
2.1 Das Mammakarzinom als häufigster maligner Tumor der Frau.....	3
2.2 Für die Tumorprogression bedeutende Veränderung zellulärer Eigenschaften in Tumorzellen.....	4
2.3 Die Rolle der Tumorsuppressoren in der Tumorentstehung und Tumorprogression.....	5
2.4 Die Proteinfamilie der Tetraspanine.....	6
2.4.1 Struktureller Aufbau der Tetraspanine und ihre funktionellen Domänen.....	7
2.4.2 Biologische Funktionen der Tetraspanine.....	9
2.5 Das Tetraspanin und der Metastasierungssuppressor KAI1.....	11
2.5.1 Die Rolle des Metastasierungssuppressors KAI1 in der Tumorbiologie.....	11
2.5.2 Regulierung der KAI1-Aktivität im Prozess der Tumorprogression.....	13
2.5.3 Alternatives Splicing von KAI1.....	14
2.6 Interaktionspartner von KAI1.....	15
2.6.1 Adhäsions- und Signaltransduktionsrezeptoren der Integrin-Superfamilie.....	15
2.6.2 Integrine und ihre Funktionen.....	17
2.6.3 Bidirektionale zelluläre Signalübertragung der Integrine.....	18
2.6.4 Die Rolle des Integrins $\alpha\beta 3$ für die Tumorbiologie.....	21
2.6.5 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGF-R.....	23
2.6.6 Die EGF-R-medierte Signaltransduktion und deren Regulierung.....	24
2.6.7 Die Rolle des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors für die Tumorbiologie.....	26

2.6.8	Weitere Interaktionspartner von KAI1.....	27
2.7	Die Zelllinie MDA-MB-435 und das maligne Melanom	30
2.7.1	Die Kontroverse um die Zelllinie MDA-MB-435	30
2.7.2	KAI1-abhängige, tumorbiologisch relevante Aspekte des malignen Melanoms	32
3	Material.....	33
3.1	Zelllinien	33
3.2	Antikörper	33
3.3	Chemikalien.....	34
3.4	Expressionsplasmide und -vektoren	35
3.5	Sonstige Materialien	35
3.6	Verbrauchsmaterialien	35
3.7	Technische Geräte und Software.....	36
4	Methoden	37
4.1	Zellkultur.....	37
4.1.1	Kultivierung und Passagieren der Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB- 435	37
4.1.2	Zellzählungen	38
4.1.3	Kryokonservierung der Zellen	38
4.1.4	Nachweis einer potenziellen Mykoplasmenkontamination.....	38
4.1.5	Herstellung stabil transfizierter KAI1-WT und KAI1-SP exprimierender MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen	39
4.2	Proliferationsassays.....	41
4.3	Immunzytochemischer Nachweis von zellulärem KAI1-WT bzw. KAI1-SP, Integrin $\alpha\beta 3$ und des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors.....	42
4.3.1	Immunzytochemischer Nachweis von zellulärem KAI1-WT bzw. KAI1-SP	42
4.3.2	Immunzytochemischer Nachweis des Integrins $\alpha\beta 3$	43
4.3.3	Immunzytochemischer Nachweis des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors	43

4.3.4	Immunzytochemischer Nachweis von phosphorylierter <i>Focal Adhesion Kinase</i> (Y397)	43
4.3.5	Ermittlung einer möglichen Kolokalisierung der KAI1-Proteine mit der Integrin-Untereinheit α_v und dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ mittels immunzytochemischer Doppelfärbung	44
4.4	Durchflusszytofluorometrischer Nachweis von zellulärem KAI1-WT bzw. KAI1-SP, Integrin $\alpha_v\beta_3$ und des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors	45
4.4.1	Nachweis von zellulärem KAI1-WT bzw. KAI1-SP mittels FACS-Analyse	45
4.4.2	Nachweis des Integrins $\alpha_v\beta_3$ mittels FACS-Analyse	45
4.4.3	Nachweis des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors mittels FACS-Analyse	46
4.5	Bestimmung der zellulären Adhäsionskapazität an extrazellulären Matrixproteinen	47
4.6	Bestimmung der EGF-R-Promotoraktivität mittels Luziferase-Reportergen-Tests	49
4.7	Statistische Auswertung	50
5	Ergebnisse: Tumorbilologische Effekte des Metastasierungssuppressors KAI1 und seiner Splice-Variante in humanen kultivierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen	51
5.1	Etablierung eines vermeintlichen Mammakarzinomzellmodells durch Generierung stabiler Transfektanten, welche KAI1-WT oder KAI1-SP exprimierten	52
5.2	Immunzytochemischer und durchflusszytofluorometrischer Nachweis der KAI1-WT- und KAI1-SP-Expression	53
5.3	Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Expression des Integrins $\alpha_v\beta_3$	56
5.4	Untersuchung zur Kolokalisierung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$	60
5.5	Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die $\alpha_v\beta_3$ /Vitronektin-vermittelte zelluläre Adhäsionskapazität	63
5.6	Adhäsionsprofil auf verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen	65
5.7	Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Expression der aktivierten <i>Focal Adhesion Kinase</i>	67

5.8	Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Proliferationsaktivität	69
5.9	Expression und zelluläre Distribution des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors als Funktion der Expression der beiden KAI1-Varianten	71
5.10	Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die transkriptionelle Regulation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors	75
5.11	Effekt einer EGF-Stimulation auf die Zellproliferation von KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Transfektanten	76
6	Diskussion	77
6.1	Die Bedeutung der funktionellen Verbindung des Integrins $\alpha\beta 3$ mit KAI1-WT bzw. KAI1-SP für die zelluläre Adhäsion und Migration	79
6.1.1	Die Expression von KAI1-SP führt im Vergleich zu KAI1-WT zu einer erhöhten $\alpha\beta 3$ -Expression	79
6.1.2	KAI1-SP führt im Gegensatz zu KAI1-WT zu einer gesteigerten $\alpha\beta 3$ -VN-vermittelten zelladhäsiven Kapazität humaner Tumorzellen	81
6.1.3	KAI1-SP bewirkt im Vergleich zu KAI1-WT eine verstärkte Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe	86
6.2	KAI1-SP bewirkt im Gegensatz zu KAI1-WT eine erhöhte Tumorzellproliferation	89
6.3	KAI1-SP führt im Gegensatz zu KAI1-WT zu einer erhöhten EGF-R-Expression	92
6.4	Potenzielle zukünftige Therapieansätze einer KAI1-WT-Wiedereinführung in humane Tumorzellen	95
6.5	Kontroverse Diskussion um den Ursprung der Zelllinie MDA-MB-435	100
7	Abbildungsverzeichnis	103
8	Literaturverzeichnis	104
9	Danksagung	124

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMF-R	<i>Autocrine Motility Factor Receptor</i>
Bcl-2	<i>B-cell Leukemia-2</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cystein
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
Col I	Kollagen Typ I
Col IV	Kollagen Typ IV
c-Src	<i>Cellular Homologue Rous Sarcoma Oncogene</i>
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	extrazelluläre Schleife (<i>Extracellular Loop</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(-R)	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>) (-Rezeptor)
erk	<i>Extracellular Signal Related Kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Durchflusszytofluorometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum
FN	Fibronektin
g	Erdbeschleunigung/Ortsfaktor $\sim 9,81 \text{ m/s}^2$
G	Glycin
GAM	Aminosäuren- und FCS-freies Medium (<i>Growth Arrest Medium</i>)
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
ICC	Immun(o)zytochemie

ICL	intrazelluläre Schleife (<i>Intracellular Loop</i>)
KAI1 (-SP/-WT)	CD82, Kangai 1, 4F9, C33, GR15, IA4, SAR2, ST6, TSPAN27; (Splice-/Wildtyp-Variante)
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Meter
M	Molare Masse
m/ μ / n	Milli/ Mikro/ Nano
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	MAP-Kinase
MDA-MB-231	Humane Mammakarzinomzelllinie
MDA-MB-435	Humane Mammakarzinomzelllinie bzw. Melanomzelllinie
min	Minute
N	Asparagin
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>Non-small-cell-lung-cancer</i>)
OV-MZ-6	Humane Ovariakarzinomzelllinie
pAK	polyklonaler Antikörper
PFA	Paraformaldehyd
(p)-FAK	(phosphorylierte) <i>Focal Adhesion Kinase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
R	Arginin
RCF	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat Tripeptid
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Sodium-/Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
sog.	sogenannt(e/er/es/en/em)
TAE	Tris, Essigsäure, EDTA
TEM	tetraspaninreiche Mikrodomäne (<i>Tetraspanin-enriched Microdomain</i>)
TM4SF	Transmembran-4-Superfamilie
TMD	Transmembrandomäne

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VEC	Vektor
VN	Vitronektin
vs.	versus
vWF	von Willebrand Faktor
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Zellwildtyp

1 Abstract

In vielen Arten von Karzinomen findet sich ein Funktions- oder Expressionsverlust des putativen Metastasierungssuppressors, des Tetraspanins KAI1, was mit einer schlechten Prognose bezüglich des Patientenüberlebens korreliert, wohingegen bei hoher KAI1-Expression eine gute Krankheitsprognose bestehen bleibt. In metastasierten Mammakarzinomzellen konnte zudem eine Splice-Variante des KAI1-Proteins (KAI1-SP) nachgewiesen werden. In der vorliegenden Dissertation wurden die tumorbiologischen Effekte der beiden KAI1-Proteine auf die zelluläre Proliferation, Adhäsion sowie deren Wechselwirkungen mit dem Integrin $\alpha\beta3$ und dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R) untersucht. Hierfür wurde ein vermeintliches Mammakarzinommodell der Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 kreiert und stabile Transfektanten generiert, die eine erhöhte Expression von entweder KAI1-WT oder KAI1-SP zeigten.

Die KAI1-SP-Expression bewirkte in MDA-MB-435-Zellen eine im Vergleich zu KAI1-WT deutlich gesteigerte Expression von $\alpha\beta3$, in geringem Maße fand sich dies auch in MDA-MB-231-Zellen. In beiden Zelllinien zeigte sich eine Kolo-kalisation von KAI1-WT mit $\alpha\beta3$ auf der Tumorzelloberfläche, wohingegen KAI1-SP diesen Effekt nicht ausübte. Die Expression von KAI1-SP bewirkte vor allem in MDA-MB-231-Zellen eine erhöhte zelluläre Adhäsion auf VN, dem Hauptliganden von $\alpha\beta3$, und wurde in beiden Zelllinien von einer gesteigerten FAK-Aktivierung begleitet, was auf aktivierte Integrin-Signalwege zurückzuführen war. Eine erhöhte KAI1-SP-Expression korrelierte mit einer gesteigerten Proliferationsrate beider Zelllinien und ging mit einer erhöhten Expression und Promotoraktivität des EGF-R einher. Dahingegen senkte KAI1-WT das zelluläre Wachstum, zeigte eine verminderte EGF-R-Expression und schien den EGF-R in MDA-MB-231-Zellen zu internalisieren. Diese Daten unterstreichen die differentiellen molekularen Wechselwirkungen und die damit einhergehenden funktionellen Effekte der beiden KAI1-Varianten und deuten darauf hin, dass durch die Expression von KAI1-SP die metastasierungssuppressiven Funktionen von KAI1-WT nicht nur außer Kraft gesetzt werden, sondern dessen Splicen sogar tumorbiologische Effekte auslöst, welche die Tumorprogression und Metastasierung stimulieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sind bereits in folgende Publikationen eingegangen:

Miller, J., Dreyer, T. F., Bacher, A. S., Sinner, E. K., Heinrich, C., Benge, A., Reuning, U. (2018). Differential tumor biological role of the tumor suppressor KAI1 and its splice variant in human breast cancer cells. *Oncotarget*, 9(5), 6369-6390. doi:10.18632/oncotarget.23968

Upheber, S., Karle, A., Miller, J., Schlaugk, S., Gross, E., & Reuning, U. (2015). Alternative splicing of KAI1 abrogates its tumor-suppressive effects on integrin alphavbeta3-mediated ovarian cancer biology. *Cell Signal*, 27(3), 652-662. doi:10.1016/j.cellsig.2014.11.028

2 Einleitung: Der Metastasierungssuppressor KAI1 und seine Interaktionspartner in ihrer Rolle beim Mammakarzinom und malignen Melanom

2.1 Das Mammakarzinom als häufigster maligner Tumor der Frau

Das Mammakarzinom ist mit rund 71.000 Neuerkrankungen im Jahr das häufigste Malignom der Frau in Deutschland. Es macht rund 28% aller weiblichen Karzinomerkrankungen aus. Die Inzidenz des Mammakarzinoms ist seit den 1980er Jahren um 65% angestiegen, während die Mortalität (pro Jahr etwa 18.000) recht konstant geblieben ist. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren (Barnes, 2016; DStatis, 2014; GeKID, 2015).

Die vorwiegende Art der malignen Neubildungen der Mammae bilden Adenokarzinome, darunter fallen etwa 80% auf das duktales Adenokarzinom, NST. Etwa 90% der Mammakarzinome treten sporadisch auf (GeKID, 2015), bei etwa 20-25% aller Patientinnen besteht eine familiäre Häufung (Houlston & Peto, 2004). Etwa 5-10% der Mammakarzinome weisen eine genetische Disposition bei autosomal dominantem Erbgang auf (Goldberg & Borgen, 2006). Eine große Bedeutung fällt dabei auf die beiden Hochrisikogene BRCA1 und BRCA2, deren Trägerinnen bei deutlich erhöhtem Lebenszeitrisiko rund 20 Jahre früher erkranken als Frauen ohne familiäres Risiko (Antoniou et al., 2003; Goldberg & Borgen, 2006). Goldstandard in der Therapie des Mammakarzinoms ist die primär operative Resektion des Tumors und des Wächterlymphknotens, zur (neo-)adjuvanten Therapie stehen die Radio-, Chemo-, Antikörper- sowie die endokrine systemische Therapie zur Verfügung (Blichert-Toft et al., 1998; Darby et al., 2011; Davies et al., 2011; Dewis & Gribbin, 2009; Gradishar et al., 2016; Veronesi et al., 2002). Die 5-Jahres-Überlebensrate des Mammakarzinoms liegt durchschnittlich bei 81%, da aufgrund des Mammographie-Screenings und der steigenden Aufklärung der Frauen zur monatlichen Selbstuntersuchung der Brust ein Großteil der Mammakarzinome in frühen Stadien entdeckt werden kann (AWMF, 2012; GeKID, 2015). Das Mammakarzinom metastasiert primär lymphogen in die axillären und klavikulären Lymphknoten und hämatogen in Lunge, Knochen und Leber. Prognostisch bedeutend sind Tumorgöße, Lymphknotenstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus, Resektionsstatus, Fokalität sowie die Fernmetastasierung (AWMF, 2012; Houssami et al., 2010).

2.2 Für die Tumorprogression bedeutende Veränderung zellulärer Eigenschaften in Tumorzellen

Der Entstehung maligner Tumorerkrankungen sowie deren Progression und Metastasierung liegen Veränderungen zahlreicher physiologisch bedeutender zellulärer Funktionen zugrunde (Berger et al., 2005; Woodhouse et al., 1997). Durch Umgehen der Kontrollmechanismen innerhalb des Zellzyklus, welche normalerweise unkontrolliert wachsende Zellen in den Zellarrest drängen und zur Apoptose dieser Zellen führen, erlangen Tumorzellen die Fähigkeit unkontrolliert zu proliferieren. Sie inhibieren durch verschiedenste Mechanismen die Apoptose und können ihr Überleben drastisch verlängern. Durch Aktivierung proliferationsfördernder Signalwege wird das Tumorzellwachstum zusätzlich gesteigert. Des Weiteren produzieren sie pro-angiogenetische Faktoren, welche zur Neovaskularisierung von Tumoren führen, wodurch die Tumorzellen ihre Versorgung sicherstellen (Hanahan & Weinberg, 2000). Im Prozess der Metastasierung erlangen weitere zelluläre Eigenschaften eine bedeutende Rolle. Tumorzellen verändern ihre Adhäsionseigenschaften, wodurch sie die Fähigkeit erlangen sich vom Primärtumor abzulösen, in die Blut- oder Lymphbahn eintreten und sich über jene disseminieren bis sie sich - nach Extravasation - am Metastasenort anheften, in benachbartes Gewebe eindringen und dort zur Metastase auswachsen (Fidler & Poste, 2008; Smith & Theodorescu, 2009).

Durch Veränderungen der Adhäsionsstärke steigern Tumorzellen zusätzlich ihre Motilitäts- und Invasionsfähigkeit (Hirohashi, 1998; Okegawa et al., 2004). Eine bedeutende Rolle trägt hierbei die Ausbildung zellulärer Kontakte mit anderen Zellen, aber auch zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix (EZM) (Felding-Habermann, 2003). Die EZM besteht hauptsächlich aus Polysacchariden und hochmolekularen Proteinen, welche die Zellen als komplexes Gerüst umgeben. Bestandteil der EZM sind u.a. Vitronektin (VN), Fibronektin (FN) und Kollagene (Col I und Col IV) (Roberts et al., 2008). Die Ausbildung der zellulären Kontakte wird durch bestimmte, auf der Zelloberfläche befindliche Adhäsionsrezeptoren ermöglicht und moduliert. Diese transmembranen Adhäsionsproteine, zu welchen auch die in dieser Arbeit untersuchten Integrine gehören, sind in multimolekularen Netzwerken organisiert und werden durch andere Transmembranproteine wie die Tetraspanine in ihren funktionellen Eigenschaften moduliert (Okegawa et al., 2004).

2.3 Die Rolle der Tumorsuppressoren in der Tumorentstehung und Tumorprogression

In unterschiedlichen Stadien der Tumorprogression konnten durch molekulare Untersuchungen von Tumorzellen zwei Arten von Genen identifiziert werden, die zu tumorzellulären Veränderungen beitragen: Onkogene und Tumorsuppressoren. Tumorsuppressoren regeln bedeutende tumorbiologische Prozesse, darunter die zelluläre Proliferation, Adhäsion, Migration und Invasion, Tumorzell-Disseminierung und das Zellüberleben in einer Weise, die der Entstehung und Progression von Tumoren entgegenwirkt. Eine herabgesetzte Aktivität der Tumorsuppressoren, welche oftmals durch Inaktivierung beider Allele des Tumorsuppressorgens hervorgerufen wird (sog. *Two-Hit-Hypothese*), erleichtert die Malignomentstehung (Ichikawa, 1991). Ist nur ein Allel inaktiviert, kann der Tumorsuppressor seine hemmende Funktion auf die Tumorentstehung und Tumorprogression weiter ausüben (Hanahan & Weinberg, 2000). Bekannte Vertreter der Gruppe der Tumorsuppressoren sind p53 oder PTEN (Smith & Theodorescu, 2009).

Entsprechend der Tumorprogression wird auch der Prozess der Metastasierung durch Metastasierungssuppressoren und -promotoren reguliert. Diese aktivieren oder hemmen bedeutende Schritte in der Metastasenentstehung (Gupta & Massague, 2006). Eine Vielzahl an Metastasierungssuppressoren ist bisher bekannt. Sie haben die Fähigkeit protektiv auf oben genannte zellbiologische Eigenschaften einzuwirken. Während der Tumorprogression geht diese Fähigkeit - bei herabgesetzter Aktivität der Metastasierungssuppressoren - verloren und begünstigt das Anwachsen der Tumorzellen an einer sekundären Lokalisation (Smith & Theodorescu, 2009). Die Bildung klinisch apparenter Makrometastasen aus einzelnen oder kleinen Clustern ektooper Tumorzellen ist der wohl entscheidendste Schritt in der Entstehung von Metastasen, der durch eine Vielzahl an Metastasierungssuppressoren begrenzt wird. Im Gegensatz zu Tumorsuppressoren wirken sie jedoch nicht auf den Primärtumor selbst (Berger et al., 2005; Smith & Theodorescu, 2009; Weiss, 1990; Wong et al., 2001).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der tumorzellbiologischen Rolle des Tetraspanins und putativen Metastasierungssuppressors KAI1 und seiner Splice-Variante, welche im Prozess der Tumorprogression und Metastasierung bedeutende Funktionen inne haben.

2.4 Die Proteinfamilie der Tetraspanine

Mitglieder der Proteinfamilie der Tetraspanine oder der Transmembran-4-Superfamilie (TM4SF) üben vielfältige Funktionen in einer Reihe biologischer Prozesse aus. Einige davon spielen eine bedeutende Rolle in der Tumorprogression. Tetraspanine kommen in nahezu allen humanen Zellen vor und werden in fast allen Organismen exprimiert (Garcia-Espana et al., 2008; Hemler, 2001, 2003; Levy & Shoham, 2005). Jeder dieser Organismen weist eine Vielzahl verschiedener Tetraspanine auf, die mittels phylogenetischer Methoden in vier große Gruppen unterteilt werden können. Hierzu gehören die CD-, CD63-, Uroplakin- und die RDS-Familie (Garcia-Espana et al., 2008). Tetraspanine wurden erstmals 1990 identifiziert (Oren et al., 1990). Inzwischen sind 33 Transmembranproteine bekannt, welche den humanen Tetraspaninen zugeordnet werden können. Einige Familienmitglieder der Tetraspanine wurden bisher sowohl als Metastasierungssuppressoren als auch als Metastasierungspromotoren beschrieben (Zoller, 2009).

2.4.1 Struktureller Aufbau der Tetraspanine und ihre funktionellen Domänen

Tetraspanine stellen transmembrane Proteine dar, welche die Zellmembran vier Mal durchspannen (TM4SF). Sie weisen jeweils ein kurzes amino- und carboxyterminales zytoplasmatisches Ende, eine kleine intrazelluläre Schleife zwischen den Transmembrandomänen 2 (TMD2) und 3 (TMD3) sowie eine kleine und große extrazelluläre Schleife (*Extracellular Loop*, ECL1 bzw. ECL2) zwischen TMD1 und TMD2 (13-31 Aminosäuren) bzw. TMD3 und TMD4 (69-132 Aminosäuren) auf (Hemler, 2005; Levy & Shoham, 2005; Maecker et al., 1997; Stipp et al., 2003) (Abb. 1).

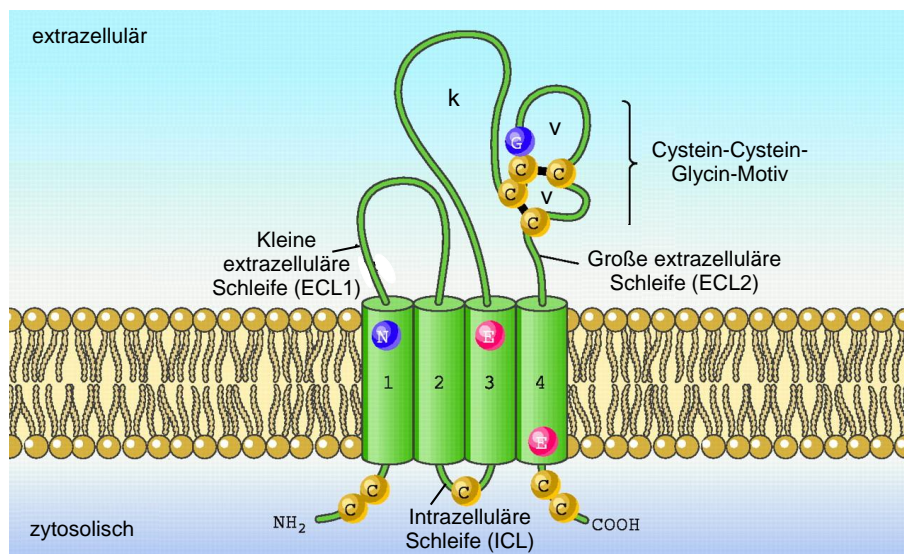


Abbildung 1: Struktureller Aufbau der Tetraspanine

Tetraspanine bestehen aus vier Transmembrandomänen (1-4), einer kleinen und großen extrazellulären (ECL1 und ECL2) sowie einer intrazellulären Schleife (ICL). Sowohl das amino- als auch das carboxyterminale Ende liegen zytosolisch. Die ECL2 besteht aus einer konstanten (k) und einer variablen (v) Region, welche das Cystein-Cystein-Glycin-Motiv (CCG) enthält. Zwischen diesen Cysteinen sowie zwei bis vier weiteren, für Tetraspanine typischen Cysteinen bilden sich innerhalb der ECL2 Disulfid-Brücken aus. Die vier Transmembrandomänen enthalten polare Aminosäuren (Asparagin, Glutamin und Glutamat), welche die Tertiärstruktur der Tetraspanine stabilisieren. Die zytosolischen, juxtamembranen Cysteine stellen Palmitoylierungs-Stellen dar. Modifiziert nach Levy & Shoham, 2005.

Die ECL2 besteht aus einer variablen Region, aufgebaut durch zwei α -Helices, welche die einzelnen Tetraspanine voneinander unterscheidet, und einer vorwiegend konstanten Region aus drei α -Helices (Kitadokoro et al., 2001). Die ECL2 enthält 4-6 Cystein-Reste, die ein Cystein-Cystein-Glycin-Motiv bilden und charakteristisch für Tetraspanine sind (Levy & Shoham, 2005). Zwischen diesen bilden sich zwei bis vier Disulfid-Brücken aus, welche für die Stabilität des Proteins und die korrekte Faltung entscheidend sind (Bienstock & Barrett, 2001). Es wird vermutet, dass die konstante Region zur Dimerisierung zweier Tetraspanine und die variable Region zu Interaktionen mit anderen Partnerproteinen beiträgt (Kitadokoro et al., 2001; Seigneuret et al., 2001). Die meisten Tetraspanine besitzen mindestens eine Glykosylierung der ECL2. Sie wird unter anderem für die Assoziation mit Interaktionspartnern

benötigt (Ono et al., 2000). Die Bedeutung der ECL1 ist noch weitgehend ungeklärt, vermutlich spielt sie bei der Faltung der ECL2 eine Rolle (Masciopinto et al., 2001).

Die Tertiärstruktur der Tetraspanine wird durch polare Aminosäurereste (Asparagin, Glutamin und Glutamat) in den hochkonservierten TMD stabilisiert. Die 4 TMD sind vermutlich für intra- sowie interzelluläre molekulare Interaktionen verantwortlich, welche die Tetraspanine einerseits stabilisieren und andererseits zu Assoziationen und Interaktionen mit anderen Tetraspaninen und Membranproteinen führen (Bari et al., 2009; Bienstock & Barrett, 2001; Stipp et al., 2003).

Auch zytosolisch enthalten Tetraspanine juxtamembranös hoch kompakte Cystein-Reste, welche palmitoyliert vorliegen. Sie tragen zu Interaktionen mit anderen Tetraspaninen und anderen Transmembranproteinen in Tetraspanin-reichen Mikrodomänen (*Tetraspanin-enriched Microdomains*, TEM) sowie zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten bei (Berditchevski et al., 2002; Charrin et al., 2002; Hemler, 2005; Stipp et al., 2003; Yang et al., 2002). Durch Palmitoylierung werden Tetraspanine vor lysosomalem Abbau geschützt. Sie ermöglicht zudem Kontakte zu Cholesterol und Gangliosiden, wodurch sich höher organisierte Tetraspanin-Komplexe in den TEM bilden (Hemler, 2005; Zoller, 2009). Die zytoplasmatischen Enden des Proteins enthalten Erkennungssequenzen, welche das Protein in das jeweils richtige Kompartiment einordnen. Sie interagieren funktionell mit Proteinen des Zytoskeletts sowie mit intrazellulären Signalproteinen (Charrin et al., 2009; Stipp et al., 2003).

2.4.2 Biologische Funktionen der Tetraspanine

Bislang konnte den Tetraspaninen keinerlei intrinsische Aktivität zugewiesen werden. Sie üben ihre Funktionen hauptsächlich über die Regulation der Membranorganisation aus, indem sie sich als transmembrane Proteine lateral zueinander an der Zellmembran ansammeln und mit einer Vielzahl von transmembranen und zytoplasmatischen Partnerproteinen in TEM multimolekulare Netzwerke (sog. *Tetraspanin Webs*) bilden. Diese Netzwerke, ähnlich einer Signalplattform, sind dynamisch aufgebaut und können innerhalb kurzer Zeit ihren Aufbau verändern, um inter- und intrazelluläre Prozesse zu koordinieren (Andre et al., 2006; Levy & Shoham, 2005). Tetraspanine regulieren sowohl die laterale Signalweiterleitung innerhalb der Zellmembran als auch die funktionelle Verbindung zu extra- und intrazellulären Proteinen. Hierbei fungieren sie als sog. *Transmembran-Linker* (Stipp et al., 2003).

Die TEM können ein Molekulargewicht von über 20 Mio Da erreichen (Skubitz et al., 2000) und weisen ein hohes Lipid/Protein-Verhältnis auf (Claas et al., 2001). Trotz der Ähnlichkeiten zu *Lipid Rafts*, sind TEM davon unabhängige Multiproteinkomplexe. Die Stabilität der TEM ist unabhängig von Cholesterol und sie sind im Gegensatz zu *Lipid Rafts* nicht sehr eng mit dem Zytoskelett verankert. Des Weiteren sind die klassischen Moleküle der *Lipid Rafts*, wie Caveolin oder Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol- (GPI) verankerte Proteine, keine Bestandteile der TEM (Claas et al., 2001; Hemler, 2005; Le Naour et al., 2006).

Tetraspanine fungieren als Meister-Organisatoren der TEM und vermitteln ihre Funktionen über die Ausübung von Protein-Protein-Interaktionen (Charrin et al., 2009; Hemler, 2005). Diese Interaktionen beinhalten die Modulation, Stabilisierung und Supprimierung der Funktionen der assoziierten Partnerproteine. Sie wirken entweder direkt oder indirekt über diese Proteine. Seltener üben Tetraspanine ihre Funktionen über die Bindung von Liganden aus (Hemler, 2001; Levy & Shoham, 2005).

Ein Tetraspanin kann in verschiedenen Zellarten mit unterschiedlichen Partnermolekülen und mit deren intra- oder extrazellulärer Domäne interagieren und so zu spezifischen zellbiologischen Prozessen führen und diese regulieren (Levy & Shoham, 2005). Die bekanntesten Interaktionspartner der Tetraspanine, welche nicht zur Gruppe der Tetraspanine gehören, sind die Integrine (Berditchevski, 2001). Sie beeinflussen die zelluläre Adhäsion und Migration, indem sie die Integrine selbst oder deren Signalwege regulieren (Berditchevski, 2001; Berditchevski & Odintsova, 1999; Hemler, 2005; Hemler et al., 1996; Ruseva et al., 2009; Stipp et al., 2003). Tetraspanine regulieren auch die Differenzierung und Proliferation von Zellen sowie deren Transkription (Hemler, 2005; Malik et al., 2009; Mela & Goldman, 2009; Ruseva et al., 2009). Sie assoziieren mit Wachstumsfaktorrezeptoren wie

dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R) (Murayama et al., 2008; Sridhar & Miranti, 2006), G-Protein-vermittelten Rezeptoren mit ihren intrazellulären heterotrimeren G-Proteinen (Little et al., 2004), mit Immunglobulinen (Andre et al., 2006; Le Naour et al., 2004; Stipp et al., 2001), epithelialen Zelladhäsionsmolekülen (EPCAM), mit Peptidasen sowie mit Transmembranproteinen wie CD44 (*Cluster of Differentiation*), welche die Tumorprogression beeinflussen (Le Naour et al., 2006). Intrazellulär interagieren Tetraspanine mit einigen bekannten Signaltransduktionsmolekülen wie Proteinkinase C (PKC), Phospholipase C γ oder Phosphatidyl-Inositol-4-Kinase Typ II (Andre et al., 2006; Claas et al., 2001; Hemler, 2005; Zhang et al., 2001).

Da einige Tetraspanine eine bedeutende Membrankomponente von intrazellulären Vesikeln sowie von Endo- und Exosomen darstellen, sind sie auch an der Kommunikation und Interaktion zwischen Zellen sowie an Zellfusionsvorgängen beteiligt (Hemler, 2003; Levy & Shoham, 2005; Schorey & Bhatnagar, 2008). Hierfür assoziieren sie z.B. mit Peptidasen, ADAMs (Arduise et al., 2008), Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (Yanez-Mo et al., 2008) und dem Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPA-R) (Bass et al., 2005).

Tetraspanine können mithilfe der genannten Eigenschaften mit Wachstumsprozessen wie der Formation von Synapsen (Kopczynski et al., 1996; Schmidt et al., 1996; Stipp & Hemler, 2000), mit Lernen und Gedächtnis (Zemni et al., 2000) oder der Myoblasten-Fusion (Tachibana & Hemler, 1999) sowie mit vaskulären Vorgängen (Zhang et al., 2009) in Verbindung gebracht werden. Sie unterstützen die Immunabwehr (Levy & Shoham, 2005; Levy et al., 1998) und greifen in die Ausbreitung von Infektionen wie Hepatitis C (Higginbottom et al., 2000; Pileri et al., 1998) oder Diphtherie (Cha et al., 2000) ein. Auch in Kinderwunschprozessen wirken einige Tetraspanine in der Fusion der Spermie mit der Eizelle (Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000) und der Fertilisation (Takahashi et al., 2001) mit.

Die vermutlich bedeutendste pathophysiologische Rolle spielen Tetraspanine bei der Entstehung und Progression von Tumoren, indem sie sich die Regulation der zellulären Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung zunutze machen und die zelluläre Invasionsfähigkeit beeinflussen (Andre et al., 2002; Schorey & Bhatnagar, 2008; Zoller, 2006). Tetraspanine können dabei sowohl als Metastasierungspromotoren als auch als Metastasierungssuppressoren wirken (Boucheix et al., 2001; Zoller, 2009).

2.5 Das Tetraspanin und der Metastasierungssuppressor KAI1

2.5.1 Die Rolle des Metastasierungssuppressors KAI1 in der Tumorbilogie

Im Jahr 1995 wurde KAI1, auch bekannt als Leukozyten-Membranprotein CD82, kangai oder als C33 (Bienstock & Barrett, 2001), als zweiter Metastasierungssuppressor im Rahmen eines genetischen Screenings der metastasierenden Prostatakarzinomzellen *Rat AT6.1* identifiziert (Dong et al., 1995). Seither konnte seine metastasierungssupprimierende Wirkung in einer Vielzahl maligner Tumoren, unter anderem in Malignomen des Ovars und der Brust (Houle et al., 2002; Huang et al., 1997; Liu et al., 2000; Phillips et al., 1998; Yang et al., 1997) sowie von Magen, Dickdarm, Pankreas, Leber, Harnblase, Lunge, Schilddrüse, Gebärmutterhals und der Haut (Dong et al., 1995; Hemler, 2001; Maecker et al., 1997; Stipp et al., 2003) nachgewiesen werden.

Die Expression des KAI1-Proteins korreliert mit einer besseren Prognose für Karzinompatienten. Fortgeschrittene Stadien einer malignen Tumorerkrankung sind dagegen mit einer Erniedrigung oder einem Verlust der Expression und Aktivität von KAI1 assoziiert, was mit einer schlechten Krankheitsprognose einhergeht (Adachi et al., 1996; Guo et al., 1996; Hinoda et al., 1998; Houle et al., 2002; Huang et al., 1998; Ichikawa et al., 1992; Jackson et al., 2000a; Liu et al., 2001; Liu et al., 2000; Liu et al., 2003a; Liu et al., 2003b; Maurer et al., 1999; Sho et al., 1998; Takaoka et al., 1998b; Wu et al., 2004). Ebenso wies eine Vielzahl von Tumorzelllinien, welche aus Metastasengewebe isoliert worden waren, eine Erniedrigung oder einen Verlust der KAI1-Expression auf (Hemler, 2003; Jackson et al., 2000a; Jee et al., 2007; Shinohara et al., 2001b; Sridhar & Miranti, 2006; Takaoka et al., 1998a; Takeda et al., 2007; Xu et al., 2008; Yang et al., 2001; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2003b). Hohe mRNA-Spiegel von KAI1 konnten in Mammakarzinomen mit niedriger Metastasierungstendenz nachgewiesen werden, niedrigere mRNA-Spiegel dagegen in aggressiven und metastasierenden Tumorarten (Adachi et al., 1996; Stipp et al., 2003; Yang et al., 2000). Die experimentelle Wiederherstellung der KAI1-Proteinexpression in Tumorzellen hemmte die zelluläre *in-vitro*-Migration und -Invasion. In experimentellen Tumor-Tiermodellen konnte durch KAI1-Reexpression eine Supprimierung der Metastasierung beobachtet werden (Hemler, 2003; Jackson et al., 2000a; Jee et al., 2007; Shinohara et al., 2001b; Sridhar & Miranti, 2006; Takaoka et al., 1998a; Takeda et al., 2007; Xu et al., 2008; Yang et al., 2001; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2003b).

KAI1 gehört zur Familie der Tetraspanine. Das KAI1-Gen ist auf Chromosom 11p11.2 lokalisiert (Dong et al., 1995). Das KAI1-Protein besteht aus 267 Aminosäuren und besitzt insgesamt 6 Cysteine in der ECL2 (C149, C150, C174, C176, C193, C216), welche in drei

für Tetraspanine typischen Motiven angeordnet sind (CCG, CSC, EGC). In der ECL2 enthält es drei N-Glykosylierungsstellen (N129, N157, N198). Entsprechend der Glykosylierungsstärke kann KAI1 höhere oder niedrigere Molekulargewichte annehmen (Fukudome et al., 1992). Die ECL1 besteht aus 17 Aminosäuren, das aminoternale Ende aus 10 und das carboxyterminale Ende aus 14 Aminosäuren (Bienstock & Barrett, 2001). Die juxtamembranen Cysteine der intrazellulären Schleife (C74, C83), welche aus 4 Aminosäuren besteht, sind wie die juxtamembranen Cysteine der amino- und carboxyterminalen Enden (C5, C74, C83, C251, C253) palmitoyliert (Zhou et al., 2004). Die Palmitoylierung von KAI1 scheint für dessen inhibierenden Effekt auf die zelluläre Migration und Invasion bedeutend zu sein (Zhou et al., 2004).

2.5.2 Regulierung der KAI1-Aktivität im Prozess der Tumorprogression

Obwohl in verschiedensten Modellen gezeigt wurde, dass die Funktion von KAI1 in einer Vielzahl fortgeschrittener Tumorerkrankungen und metastasierender Tumorzellen inaktiviert oder herabgesetzt ist, sind die Mechanismen, welche dazu führen, bisher noch weitgehend unklar. Es gibt keine Hinweise auf das Entstehen einer Mutation in KAI1-Allelen oder den Verlust der Heterozygotie am Genlocus (Liu et al., 2000; Miyazaki et al., 2000; Tagawa et al., 1999). Allein bei Patienten mit Multiplem Myelom gibt es Hinweise, dass eine Hypermethylierung der CpG-Inseln im KAI1-Promotor die Funktion von KAI1 herabsetzt (Drucker et al., 2006; Jackson et al., 2000b).

Durch posttranslationale Modifikationen wie Palmitoylierung und Glykosylierung des KAI1-Proteins kann dessen Aktivität beeinflusst werden (Ono et al., 1999, 2000; Zhou et al., 2004). Auf transkriptioneller Ebene konnte gezeigt werden, dass der KAI1-Promotor Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren p53, junB und AP2 enthält. Durch die Bindung dieser drei Transkriptionsfaktoren wurde die Transkription von KAI1 verstärkt, folglich verminderte deren Abwesenheit den mRNA-Spiegel von KAI1 (Marreiros et al., 2005). Diskutiert wird zudem, ob der Transkriptionsfaktor NF- κ B, dessen Untereinheit p50 eine Bindungsstelle am KAI1-Promotor besitzt, Einfluss auf den Funktionsverlust von KAI1 ausübt. Stimuliert wird die NF- κ B-Bindung durch Kofaktoren. In nicht-metastasierenden Zellen stimuliert NF- κ B die Transkription von KAI1. In metastasierenden Tumorzellen dagegen wird die Transkription von KAI1 durch reduzierte NF- κ B-Aktivität vermindert (Kim et al., 2005; Shinohara et al., 2001a; Telese et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass KAI1 durch Ubiquitinierung inaktiviert wurde (Tsai et al., 2007).

2.5.3 Alternatives Splicing von KAI1

Eine weitere Möglichkeit der Inaktivierung der KAI1-Funktion beruht auf dem Prozess des alternativen *Splicings*. Alternatives *Splicing* bedeutet, dass verschiedene Exons vor der Ligierung ausgewählt, umorientiert und neu zusammengefügt werden können, wodurch strukturell und funktionell unterschiedliche Proteine aus einem identischen Gen entstehen können (Rassow, 2016).

Im Rahmen einer Studie zur Expression verschiedener, für den Prozess der Invasion und Metastasierung relevanter Gene, konnte gezeigt werden, dass im Gewebe metastasierter Magenkarzinome eine Splice-Variante von KAI1 (KAI1-SP) existiert. Durch RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*) konnte ein KAI1-SP-Protein identifiziert werden, welchem das Exon 7 fehlt. Dieses Exon kodiert für 28 Aminosäuren (215-242) und erstreckt sich vom distalen Teil der ECL2 bis zum proximalen Teil der vierten TMD. Es wird angenommen, dass es durch das Fehlen eines kompletten Exons in diesem Bereich des KAI1-Moleküls zu strukturellen Veränderungen kommt, die sich auch auf die Funktion des KAI1-Proteins auswirken. Die Expression von KAI1-SP war ebenso wie der oben beschriebene Expressionsverlust von KAI1 mit der Entstehung von Metastasen und einer schlechten Krankheitsprognose assoziiert (Lee et al., 2003).

Die differentiellen tumorbiologisch relevanten Effekte der beiden KAI1-Proteine, die seine Interaktionspartner das Integrin $\alpha\beta 3$ und den EGF-R betreffen, wurden in der vorliegenden Dissertation in humanen kultivierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen untersucht.

2.6 Interaktionspartner von KAI1

Seine zellbiologischen, metastasierungssuppressiven Funktionen bewirkt KAI1, indem es mit verschiedensten Proteinen innerhalb des *Tetraspanin Webs* interagiert und deren Funktionen reguliert. Die im Rahmen der Untersuchungen zu dieser Dissertation charakterisierten Interaktionspartner sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

2.6.1 Adhäsions- und Signaltransduktionsrezeptoren der Integrin-Superfamilie

Zu den bedeutendsten molekularen Interaktionspartnern von Tetraspaninen und so auch des KAI1 zählen Adhäsions- und Signaltransduktionsrezeptoren der Integrin-Superfamilie. KAI1 reguliert deren Expressionshöhe, Biosynthese, Wiederherstellung, Kompartimentalisierung und Internalisierung sowie die Integrin-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion (Berditchevski & Odintsova, 1999; Ruseva et al., 2009; Stipp et al., 2003; Sugiura & Berditchevski, 1999). Es konnten bisher die β 1-Integrine α 3 β 1, α 4 β 1, α 5 β 1 und α 6 β 1 sowie das Integrin α L β 2 identifiziert werden, die mit KAI1 interagieren (Berditchevski & Odintsova, 1999; Bienstock & Barrett, 2001; Hemler et al., 1996). Außerdem wurde in der Forschergruppe von Frau Prof. Dr. Reuning in Ovarialkarzinomzellen auch das für die Tumorbologie bedeutende Integrin α v β 3 als Interaktionspartner von KAI1 identifiziert (Ruseva et al., 2009).

Der Begriff *Integrin* wurde von deren Lokalisation in der Zellmembran (vgl. *Integral Membrane Nature*) und deren Eigenschaft die EZM und das zelluläre Zytoskelett zu einer funktionellen Einheit mit dem Ziel der Gewebeintegrität zu verbinden, geprägt (Tamkun et al., 1986). Bisher sind 24 verschiedene Integrine bekannt, welche beim Menschen nahezu ubiquitär exprimiert werden (Humphries, 2000; Hynes, 1992, 2002).

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, die sich aus jeweils einer nicht kovalent verbundenen α - (120-160 kDa) und einer β - (90-119 kDa) Untereinheit zusammensetzen. Durch Kombination von jeweils einer der 18 unterschiedlichen α - und der 8 β -Untereinheiten entstehen die unterschiedlichen Integrine (Hynes, 1987, 1992). Beide Untereinheiten gehören zur Gruppe der Typ I Transmembranproteine, welche die Membran einmal durchqueren. Sie bestehen aus jeweils einer großen extrazellulären aminoterminalen Domäne, einer TMD und einer relativ kurzen zytoplasmatischen carboxyterminalen Region von etwa 40-70 Aminosäuren. Die extrazellulären Kopfgruppen beider Untereinheiten bilden zusammen die Liganden-Bindungsstelle, die zytoplasmatischen Enden verbinden das Integrin über spezifische Adaptorproteine mit dem Zytoskelett (Abb. 2) (Hynes, 1987, 1992; Xiong et al., 2001). Seit der Enthüllung der kristallinen Struktur der Ektodomäne von α v β 3

konnten wesentliche bisher noch unklare Erkenntnisse zu den Konformationsänderungen (siehe 2.6.3) während der Integrin-Aktivierung gewonnen werden (Xiong et al., 2001; Xiong et al., 2002). Es zeigte sich, dass die Integrin-Kopfregion im inaktiven Ruhezustand in Richtung Zellmembran geneigt ist, wodurch sich eine v-förmige Struktur ergibt. In diesem Zustand wäre eine Liganden-Bindung mit einer sehr niedrigen Affinität verbunden (Xiong et al., 2001).

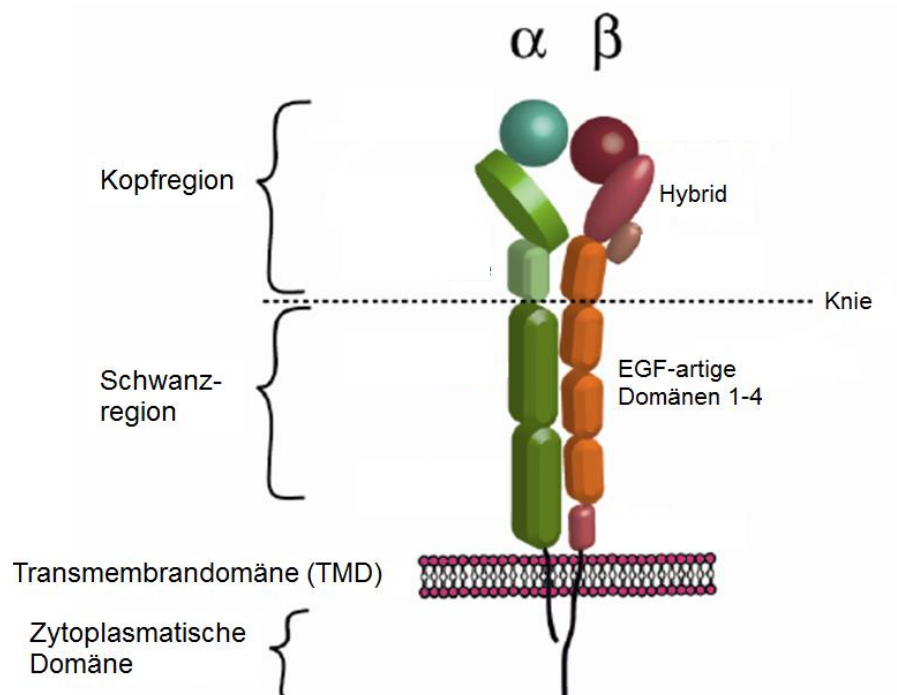


Abbildung 2: Struktureller Aufbau der Integrine

Integrine bestehen aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit, welche wiederum aus einer großen extrazellulären, einer transmembranen und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne aufgebaut sind. Die extrazelluläre Domäne kann weiterhin in eine Kopfregion und eine Schwanzregion unterteilt werden, welche jeweils aus verschiedenen kleineren Domänen bestehen. Die β -Untereinheit enthält beispielsweise eine Hybrid-Domäne in ihrer Kopfregion und mehrere EGF-artige Domänen in ihrer Schwanzregion. Dargestellt ist ein Integrin in gestrecktem Zustand. Modifiziert nach Gahmberg et al., 2009.

2.6.2 Integrine und ihre Funktionen

Die bedeutendste Funktion der Integrine stellen Interaktionen zwischen Zellen untereinander sowie zwischen der Zelle und der EZM dar. Diese Eigenschaft ist Grundlage für die Regulation der zellulären Adhäsion, Migration und Invasivität sowie der korrekten Lokalisation von Zellen im Gewebe. Integrine binden EZM-Proteine wie VN, FN, Col oder Laminin, aber auch Fibrinogen, den von Willebrand Faktor (vWF) und den inaktivierten Komplementfaktor C3bi. Ebenso können Integrine Rezeptoren wie ICAM (*Intercellular Adhesion Molecules*) auf anderen Zellen binden (de Bruijn & Fey, 1985; Hynes, 1987, 2002). Die Kombination der verschiedenen Integrin-Untereinheiten determiniert die jeweilige Spezifität für die entsprechenden Liganden. Die meisten Integrine besitzen jedoch mehrere Bindungspartner. Einige Integrine, darunter auch $\alpha\beta_3$, erkennen in den EZM-Proteinen VN, FN, Col, Fibrinogen und Laminin die Tripeptid-Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) (Hynes, 1987; Ruoslahti & Pierschbacher, 1986; van der Flier & Sonnenberg, 2001). Die Interaktion mit der EZM ist zudem abhängig von der Bindung divalenter Kationen in der extrazellulären Domäne der Integrine, wodurch die Heterodimerisierung der beiden Integrin-Untereinheiten sowie deren Affinität und Spezifität zu bestimmten Liganden stimuliert wird (Gailit & Ruoslahti, 1988; Kirchhofer et al., 1990; Zhang & Chen, 2012). Aufgrund dieser Interaktionen im Gewebeverband spielen Integrine eine bedeutende Rolle in der Zellmigration, Morphogenese und zellulären Differenzierung in Embryos (Bronner-Fraser, 1985), in der Wundheilung und Phagozytose sowie in der Zytoskelett-Organisation, Hämostase und Thrombosierung. Darüber hinaus beeinflussen sie die T-Lymphozyten-Funktion und die Leukozyten-Adhäsion (Hynes, 1987).

Eine bedeutende Rolle spielen Integrine in der Tumorbilogie, indem sie die Adhäsion, Migration, das Zellüberleben sowie die zelluläre Differenzierung und Proliferation von Tumorzellen beeinflussen (Anthis & Campbell, 2011; Desgrosellier & Cheresh, 2010; Felding-Habermann, 2003; Humphries, 2000; Hynes, 1987, 1992, 2002; Legate et al., 2009; Ruseva et al., 2009). Des Weiteren können Integrine durch Kontrolle von Proteasen das *Remodelling* der EZM beeinflussen, wodurch der Tumor Raum für invasives Wachstum erlangt. Es gibt Hinweise darauf, dass Integrine während der Tumorprogression von einer Onkogen-kodierten Tyrosinkinase an einer der zytoplasmatischen, EGF-artigen Domänen der β -Untereinheit phosphoryliert werden, wodurch pro-tumorigene Vorgänge stimuliert werden (Tamkun et al., 1986).

2.6.3 Bidirektionale zelluläre Signalübertragung der Integrine

Integrine sind in der Lage bidirektional Signale über die Zellmembran hinweg zu vermitteln, sowohl aus dem Zellinneren nach außen (*Inside-out Signalling*), als auch von extrazellulär in die Zelle hinein (*Outside-in Signalling*). Diese Funktionen beruhen unter anderem auf der molekularen und funktionellen Verbindung des Zytoskeletts mit der EZM und mit anderen Zellen und werden durch die kurzen zytoplasmatischen Enden der β -Untereinheit und die TMD vermittelt.

Durch intrazelluläre Signaltransduktion wird die Affinität der Integrine gegenüber ihren EZM-Liganden stimuliert. Diese kann durch Kolokalisierung von Integrinen mit anderen Membranproteinen in Multiproteinkomplexen auf der Zellmembran verstärkt werden. Durch die Bindung intrazellulärer Moleküle des Zytoskeletts wie Talin oder Kindlin, kommt es durch Konformationsänderungen in den Integrin-Untereinheiten zur Streckung der extrazellulären Integrin-Domänen. Dies entspricht einer Teilaktivierung der Integrine mit mittlerer Affinität zu EZM-Molekülen. Durch Trennung und Auseinanderweichen der beiden TMD und der zytoplasmatischen Domänen sowie das Öffnen der Liganden-Bindungsstelle zwischen den Kopfgruppen der beiden Integrin-Untereinheiten wird die volle Integrin-Aktivierung erreicht (Abb. 3). Diese aktivierte Konformation weist eine erhöhte Rezeptoraffinität auf (Adair & Yeager, 2002; Anthis & Campbell, 2011; Arnaout et al., 2005; Hantgan et al., 1999; Humphries, 1996; Hynes, 2002; Legate et al., 2009; Luo et al., 2007; Shattil et al., 2010; Takagi et al., 2002; Takagi & Springer, 2002). Vor allem die Hybrid-Domäne der β -Untereinheit scheint für das Auseinanderweichen der beiden Kopfgruppen und damit die volle Aktivierung der Integrine essentiell zu sein (Puklin-Faucher et al., 2006).

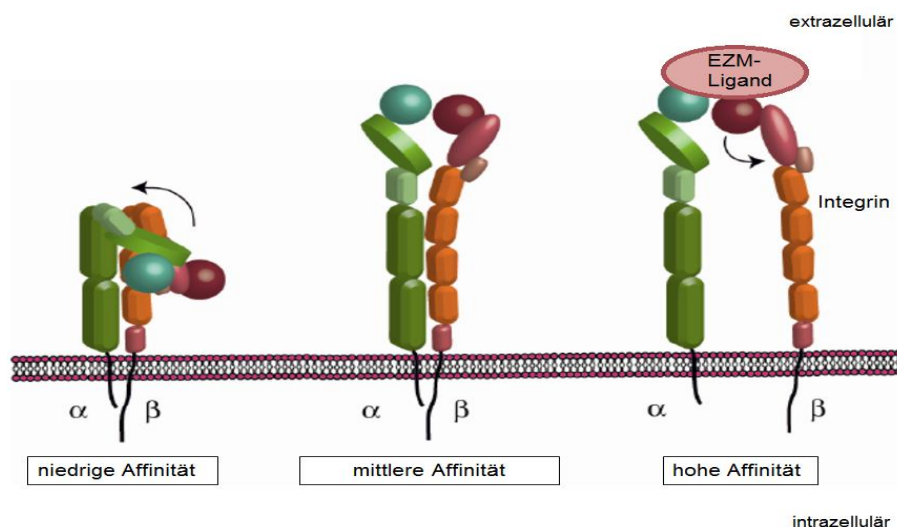


Abbildung 3: Konformationsänderung der Integrine entsprechend ihres Aktivierungszustands

Im inaktiven Zustand liegen die α - und β -Untereinheit der Integrine aneinandergelagert und gebeugt vor, so dass die Kopfregionen in Richtung Zellmembran zeigen und sich eine v-förmige Struktur ergibt. Durch die Bindung zytoplasmatischer Aktivatoren wie Talin an die zytoplasmatische β -Domäne der Integrine kommt es durch Konformationsänderungen in den

Integrin-Untereinheiten zur Streckung der extrazellulären Integrin-Domänen. Hierdurch werden die Integrine teilaktiviert und es entsteht eine mittlere Affinität zu EZM-Molekülen. Durch Trennung und Auseinanderweichen der beiden TMD und der zytoplasmatischen Domänen sowie durch das Öffnen der Liganden-Bindungsstelle zwischen den Kopfgruppen der beiden Integrin-Untereinheiten wird die volle Integrin-Aktivierung erreicht. Diese aktivierte Konformation weist eine erhöhte Rezeptoraffinität auf. Modifiziert nach Gahmberg et al., 2009.

Durch die Bindung von EZM-Liganden werden intrazelluläre Signalmoleküle an die β -Integrin-Untereinheit rekrutiert, wodurch ein großer intrazellulärer Adhäsionskomplex gebildet wird. In diesen Adhäsionskomplexen sind über 150 Proteine enthalten, die miteinander interagieren. Bedeutende Bestandteile sind unter anderem Adaptorproteine und Kinasen (Anthis & Campbell, 2011; Legate et al., 2009). Integrinen selbst fehlt die Fähigkeit andere Moleküle zu phosphorylieren, sie können jedoch Kinasen aktivieren (Desgrosellier & Cheresh, 2010), wodurch sich deren Enzymaktivität und Assoziationsfähigkeit mit anderen Proteinen verändert und intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden können. Veränderungen dieser Signalkaskaden können vielfältige zelluläre Auswirkungen zur Folge haben. Sie beeinflussen das Zellüberleben, die zelluläre Adhäsion, Motilität und Invasivität, die Differenzierung und Proliferation. Dazuhin kann die Genexpression verändert werden (Adair & Yeager, 2002; Anthis & Campbell, 2011; Arnaout et al., 2005; Hantgan et al., 1999; Humphries, 1996; Hynes, 2002; Legate et al., 2009; Luo et al., 2007; Shattil et al., 2010; Takagi et al., 2002; Takagi & Springer, 2002). Darüber hinaus binden Strukturproteine wie Talin, aber indirekt auch Proteine wie Paxillin, α -Aktinin, Tensin oder Vinculin an die β -Untereinheit (Desgrosellier & Cheresh, 2010) und tragen durch Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zur zellulären Motilität bei (Cabodi et al., 2010).

Die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) – die Schlüsselkinase im Integrin-Signalweg - gehört zur Gruppe der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen und wird in den meisten Geweben und Zelltypen von Säugetieren exprimiert (Devor et al., 1993). Durch Bindung der Integrine an EZM-Liganden wird FAK auto-phosphoryliert und aktiviert. Die zytoplasmatische Domäne der β -Integrin-Untereinheit bindet an die aminoterminalen FERM-Domäne (*Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin*) des FAK-Moleküls, wodurch diese die Auto-Phosphorylierungsstelle Y397 exponiert und FAK seine katalytische Aktivität entfalten kann. Hierdurch erlangen weitere intrazelluläre Kinasen wie c-Src (*Cellular Homologue Rous Sarcoma Oncogene*), Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen (PI3K) und Grb7 (*Growth Factor Receptor-bound Protein 7*) die Möglichkeit an FAK zu binden. Eine Phosphorylierungskaskade wird ausgelöst und die Bildung neuer Protein-Protein-Interaktionen stimuliert, wodurch wiederum zahlreiche weitere Signalkaskaden aktiviert werden (Zhao & Guan, 2009). Die Bindung von c-Src an phosphoryliertes FAK (Y397; p-FAK) ist für die Src/FAK/p130^{Cas}-Signalkaskade, welche die zelluläre Motilität und Migration sowie die Proliferation verankerungsunabhängiger Zellen stimuliert, bedeutend (Cary et al., 1998; Desgrosellier et al., 2009). Durch die Bindung von Src an p-FAK kann diese Kinase FAK erneut phosphorylieren (Y925), wodurch Grb2 (*Growth*

Factor Receptor-bound Protein 2) an FAK bindet und die RAS (Rat-Sarcoma) - Raf - MAPK (MAPK) / -erk (Extracellular Signal Regulated Kinase) -Signalkaskade ausgelöst wird. Diese Signalkaskade hat u.a. über eine transkriptionelle Regulation Auswirkungen auf die Zellzyklusprogression und dadurch auf die zelluläre Proliferation und Motilität (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Howe et al., 2002; Schlaepfer et al., 1994; Short et al., 1998; Zhao & Guan, 2009). Über eine stimulierte Expression von Bcl-2 (B-cell Leukemia-2), über die Aktivierung der PI3K-Akt-Signalkaskade oder des NF- κ B-Signalwegs bewirkt die Integrin-übermittelte FAK-Aktivierung Effekte auf das Zellüberleben und die zelluläre Proliferation (Desgrosellier & Cheresch, 2010).

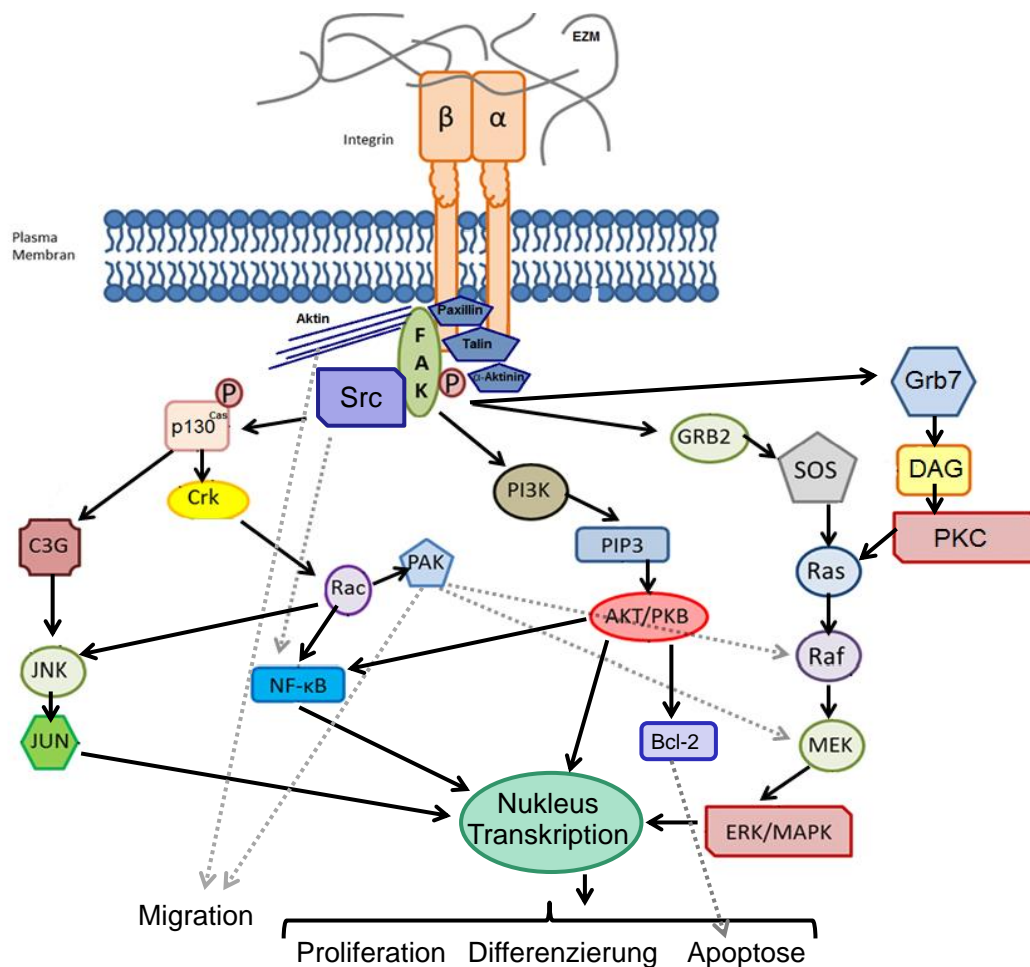


Abbildung 4: Intrazelluläre Integrin-abhängige Signalkaskaden

Abgebildet sind in einer schematischen Darstellung die wichtigsten Integrin-abhängigen Signalkaskaden, welche an der Tumorprogression beteiligt sind. Das Schlüsselement all dieser Signalkaskaden stellt FAK dar, welches durch Auto-Phosphorylierung an Y397 aktiviert wird (p-FAK). Durch Bindung von Src wird p-FAK vollständig phosphoryliert, wodurch durch Interaktionen mit anderen intrazellulären Proteinen wie PI3K, p130^{Cas}, Grb2 oder Grb7 vielfältige Signalkaskaden aktiviert werden können. Zu diesen Signalkaskaden zählen beispielsweise der RAS-Raf-MAPK-, PI3K-Akt- oder NF- κ B-Signalweg, welche Auswirkungen auf die zelluläre Migration, Proliferation, Differenzierung, das Zellüberleben/die Apoptose und die zelluläre Transkription haben können. Modifiziert nach Shishido et al., 2014.

2.6.4 Die Rolle des Integrins $\alpha\beta3$ für die Tumorbilogie

Das Integrin $\alpha\beta3$ war ursprünglich aufgrund seines bevorzugten Liganden als VN-Rezeptor bekannt geworden (Hapke et al., 2003; Pytela et al., 1985). Dieser Name erwies sich jedoch als zu restriktiv, da in der Folge gezeigt werden konnte, dass $\alpha\beta3$, wenn auch in geringerem Maße, ebenso eine Vielzahl anderer Liganden zu binden vermag - darunter FN, Col, Fibrinogen, Laminin, vWF und Osteopontin (Humphries et al., 2006; Hynes, 1992). Die Interaktion von $\alpha\beta3$ mit VN, FN und vielen anderen dieser EZM-Proteine wird bevorzugt durch das RGD-Tripeptid vermittelt, wobei auch sekundäre Bindungsstellen, wie beispielsweise eine Glycosaminoglycan-Bindungsstelle, eine Rolle spielen. Dieses Tripeptidmotiv wurde ursprünglich als Sequenz des FN-Moleküls entdeckt und vermittelt die zelluläre Integrin-abhängige Anheftung der Zelle (D'Souza et al., 1991).

Der bevorzugte Ligand des $\alpha\beta3$ ist VN. Vitronektin ist ein 75 kDa großes Glykoprotein, welches als Multimer in der EZM und als Monomer in humanem Blut vorkommt. Niedrige VN-Spiegel können in fast jedem Gewebe gefunden werden, eine erhöhte VN-Expression vor allem in malignem Tumor- und in Wundgewebe (Aaboe et al., 2003; Carreiras et al., 1996; Liapis et al., 1997). Als Ligand der α -Integrine spielt es in deren Wirkungsbereich, aber auch in der Modulation der Hämostase, Fibrinolyse, Koagulation und Komplementaktivierung eine Rolle (Preissner & Seiffert, 1998). Der Gehalt an $\alpha\beta3$ korrelierte in humanen Ovarialkarzinomzellen direkt mit dem des VN (Reuning, 2011).

Das Integrin $\alpha\beta3$ wird von verschiedensten Zelltypen wie Endothel-, glatten Gefäßmuskelzellen, Thrombo-, Leuko- und Monozyten sowie von Tumorzellen exprimiert (Hapke et al., 2003; Murphy et al., 1994). Es ist in einer Vielzahl maligner Tumoren überexprimiert, darunter das Ovarial- und Mammakarzinom, das Melanom und Glioblastom (Brooks et al., 1995; Liapis et al., 1997; Platten et al., 2000; Seftor et al., 1992). Zellen invasiver Ovarialkarzinome zeigten höhere $\alpha\beta3$ -Spiegel als Zellen niedrig maligner Ovarialtumoren (Liapis et al., 1997). In Mammakarzinomzelllinien steigerte eine hohe $\alpha\beta3$ - und VN-Expression deren metastatisches Potential (Desgrosellier & Cheresch, 2010; Wong et al., 1998). Entsprechend zeigten Zellen metastasierter Mammakarzinome deutlich höhere Spiegel an $\alpha\beta3$ als Zellen nicht metastasierter Mammakarzinome (Gasparini et al., 1998).

Die Hauptfunktion von $\alpha\beta3$ liegt aufgrund seiner Bindung von EZM-Molekülen in der Regulation der zellulären Adhäsion, Migration und Proliferation. Diese Prozesse spielen eine grundlegende Rolle in der Angiogenese - durch Invasion von Endothelzellen in umliegendes Gewebe - sowie in der Invasion von Tumorzellen (Felding-Habermann, 2003; Goel & Languino, 2004). Die Tumorzellproliferation wird durch Interaktionen des Integrins mit Wachstumsfaktorrezeptoren stimuliert. So liegen $\alpha\beta3$ und der EGF-R in

zellmembranständigen Proteinkomplexen assoziiert vor, wodurch Liganden-unabhängig intrazelluläre EGF-R-Signalkaskaden aktiviert werden (Cabodi et al., 2004; Desgrosellier & Cheresh, 2010). Die EGF-R-Expression kann durch $\alpha\beta 3$ -abhängige Signalübermittlung erhöht werden (Lössner et al., 2008). Das Integrin $\alpha\beta 3$ kann die Invasivität des Tumors erhöhen, indem es mit proteolytischen Enzymen wie uPA oder ADAM15 interagiert und deren Bindung zu bestimmten EZM-Molekülen moduliert (Beck et al., 2005; Reuning et al., 2003). Sowohl $\alpha\beta 3$ als auch uPA-R binden VN. Integrine fungieren darüber hinaus als Korezeptoren in der Signalübertragung von uPA-R (Smith & Marshall, 2010). Durch die Interaktion mit uPA-R können die Adhäsionsfunktion von $\alpha\beta 3$ sowie dessen intrazelluläre Signalkaskaden moduliert werden (Reuning et al., 2003). Zudem beeinflusst $\alpha\beta 3$ das Zellüberleben und die Apoptose. An EZM-Proteine gebundene Integrine vermitteln Überlebenssignale, da Zellen epithelialen Ursprungs verankerungsabhängig sind. Verliert die Zelle ihre Adhäsion zur EZM, werden durch Integrine pro-apoptotische Signalkaskaden in Gang gesetzt, wodurch es zu einer Unterart des programmierten Zelltods, der Anoikis, kommt (Desgrosellier & Cheresh, 2010). Die zelluläre Proliferation wird unabhängig von der Verankerung der Zellen zudem von der Aktivierung von c-Src durch $\alpha\beta 3$ beeinflusst. Diese Aktivierung ist in manchen Fällen unabhängig von FAK und führt zu verlängertem Zellüberleben (Desgrosellier et al., 2009).

Somit moduliert $\alpha\beta 3$ bedeutende Prozesse, welche die Tumorprogression beeinflussen. Etliche Funktionen, die $\alpha\beta 3$ reguliert, werden auch von KAI1 moduliert.

2.6.5 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGF-R

Neben den Integrinen zählen auch Wachstumsfaktorrezeptoren zu den tumorbiologisch bedeutenden KAI1-Interaktionspartnern. Hierzu gehört u.a. das Proto-Onkogen EGF-R (auch bekannt als ErbB1 oder HER). KAI1 beeinflusst dessen Aktivierung und Lokalisierung in der Zelle durch Regulation seiner Biosynthese, Dimerisierung, Desensibilisierung, Kompartimentalisierung und Endozytose, seines Recyclings und Abbaus (Danglot et al., 2010; Liu & Zhang, 2006; Miranti, 2009; Odintsova et al., 2000; Odintsova et al., 2013; Odintsova et al., 2003; Upheber et al., 2015). In humanen kultivierten Ovarial- und Mammakarzinomzellen zeigte sich eine direkte Assoziation zwischen der Expression von KAI1 und der Expression, Lokalisation und Aktivität von EGF-R (Odintsova et al., 2000; Upheber et al., 2015).

Der EGF-R ist ein Mitglied der Gruppe der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen und wird basolateral, transmembranös in Epithelien mesodermalen und ektodermalen Ursprungs exprimiert (Yarden & Sliwkowski, 2001). Die vier bekannten ErbB-Rezeptoren (ErbB1/EGF-R, ErbB2/HER2/neu, ErbB3, ErbB4) bilden untereinander Homo- oder Heterodimere und enthalten in jedem Monomer eine Ektodomäne mit zwei Cystein-reichen Domänen, eine Transmembrandomäne und einen carboxyterminalen zytoplasmatischen Anteil. Dieser besteht aus einer Tyrosin-Autophosphorylierungsstelle, umrahmt von nicht-katalytischen regulatorischen Domänen (Burden & Yarden, 1997). Den Hauptliganden des EGF-R stellt der epidermale Wachstumsfaktor EGF dar. Zellen, welche EGF synthetisieren und Zielzellen, an welchen EGF an EGF-R bindet, liegen juxtapositioniert oder in unmittelbarer Umgebung. Die Expression des EGF wird stark reguliert. Zu anderen Liganden des EGF-R zählen z.B. TGF- α oder Amphiregulin (Dickson & Lippman, 1987; Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002).

2.6.6 Die EGF-R-medierte Signaltransduktion und deren Regulierung

Durch Bindung eines der Liganden an ein EGF-R-Monomer wird dessen zytoplasmatische, katalytische Domäne aktiviert und die Konformation der Ektodomäne des EGF-R verändert (Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002). Hierdurch kommt es zur Rezeptor-Dimerisierung. Dieses Dimer kann homo- oder heterodimer sein (Graus-Porta et al., 1997; Olayioye et al., 2000; Waterman & Yarden, 2001; Yarden & Sliwkowski, 2001). Die Dimerisierung führt zur Auto- und Trans-Phosphorylierung des Rezeptors an den spezifischen intrazellulären Tyrosin-Resten. Dabei werden Bindungsstellen für zytoplasmatische Signalproteine frei, welche intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Zu diesen Signalproteinen zählen Src, Grb2, Shc, die Ubiquitin-Ligase c-Cbl, PI3K und die Phosphatidyl-Inositol-spezifische Phospholipase (PLC γ). Hierdurch werden unter anderem der RAS-Raf-MAPK- und der PI3K-Akt-Signalweg aktiviert (Burden & Yarden, 1997; Yarden & Sliwkowski, 2001). ErbB-Rezeptoren sind Bestandteil multipler Lipid-Mikrodomänen innerhalb der Zellmembran. Die Verteilung zwischen diesen Membrankompartimenten wird durch den Gehalt der Zellmembran an Cholesterol und Gangliosiden kontrolliert und kann frühe Schritte in der Signalvermittlung der ErbB-Rezeptoren beeinflussen (Chen & Resh, 2002; Miljan & Bremer, 2002; Ringerike et al., 2002; Roepstorff et al., 2002).

Nach Bindung bestimmter Liganden oder Interaktionen mit anderen Oberflächenproteinen wie KAI1, kolokalisiert der EGF-R in Multiproteinkomplexen auf Clathrin-reichen Arealen der Zellmembran. Diese können durch Invagination endozytotische Vesikel bilden, wodurch Rezeptormoleküle internalisiert werden können (Burden & Yarden, 1997; Yarden & Sliwkowski, 2001). Die Rezeptor-Internalisierung wird zusätzlich durch Motive in deren zytoplasmatischer Domäne bestimmt (Sorkin et al., 1993). In frühen Endosomen kommt es entweder - nach Dissoziation der Komplexe - zu einem Recycling der Rezeptoren zurück an die Zelloberfläche, oder - bei anhaltender Aktivierung der Tyrosin-Phosphorylierung - zur Ubiquitinierung und zum Abbau des Rezeptors in Proteasomen (Levkowitz et al., 1998; Muthuswamy et al., 1999).

Die Signalvermittlung des EGF-R kann somit also sowohl auf der Ebene der Liganden-induzierten Rezeptor-Dimerisierung als auch über Kompartimentalisierung der Rezeptoren in Lipid-Mikrodomänen der Zellmembran und Rezeptor-Endozytose beeinflusst werden.

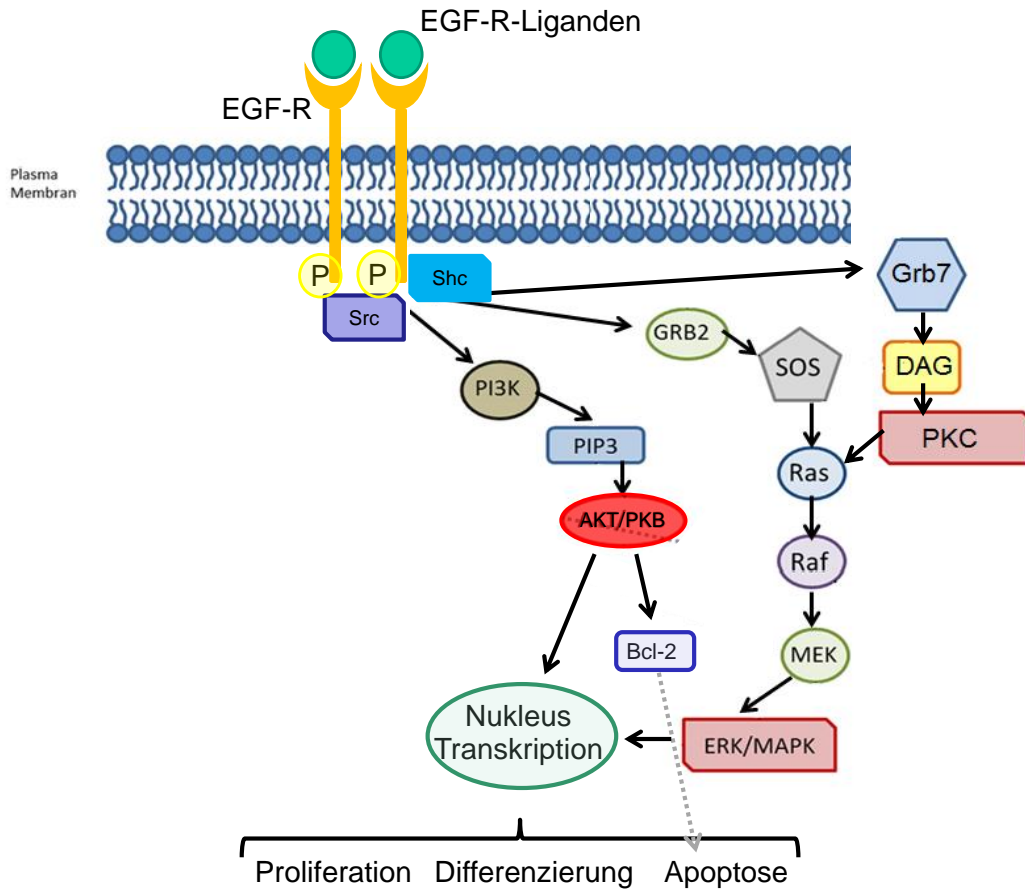


Abbildung 5: Intrazelluläre EGF-R-abhängige Signalkaskaden

Abgebildet sind in einer schematischen Darstellung die wichtigsten EGF-R-abhängigen Signalkaskaden, welche an der Tumorprogression beteiligt sind. Durch Bindung eines EGF-R-Liganden kommt es durch Konformationsänderungen zur Rezeptor-Dimerisierung und zur Auto- oder Trans-Phosphorylierung des Rezeptors an spezifischen intrazellulären Tyrosin-Resten. Hierdurch werden Bindungsstellen für zytoplasmatische Signalmoleküle frei, die intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Zu den für die Tumorbologie wichtigsten Signalkaskaden zählen wiederum beispielsweise der RAS-Raf-MAPK-, oder PI3K-Akt-Signalweg, welche Auswirkungen auf die zelluläre Proliferation, Differenzierung und das Zellüberleben/die Apoptose haben können. Modifiziert nach Shishido et al., 2014.

2.6.7 Die Rolle des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors für die Tumorbologie

Der EGF-R reguliert wie die anderen ErbB-Mitglieder Zell-Zell-Interaktionen zwischen Mesenchym und Epithelien und spielt damit eine bedeutende Rolle in der zellulären Proliferation, Differenzierung, Zellteilung und dem Zellüberleben, aber auch in der zellulären Migration und Adhäsion (Burden & Yarden, 1997; Yarden & Sliwkowski, 2001). Diese EGF-R-Funktionen benötigt der Organismus physiologisch in verschiedensten Schritten der Organogenese (Miettinen et al., 1995; Sibilio et al., 1998; Threadgill et al., 1995). Zu weiteren physiologischen Funktionen des EGF-R zählen Gewebedifferenzierung und -erhalt, Wundheilungsprozesse und Prozesse der neuronalen Regeneration.

Pathophysiologisch bedeutend wird der EGF-R in der Tumorentstehung und -progression (Burden & Yarden, 1997; Yarden & Sliwkowski, 2001). Erstmals mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht wurde der EGF-R in den frühen 1980er Jahren, als entdeckt wurde, dass das aviäre Erythroblastosis-Tumor-Virus für eine abgewandelte Form des EGF-R kodiert (Burden & Yarden, 1997; Yarden & Sliwkowski, 2001). Seither konnte eine Vielzahl an Tumoren mit dem EGF-R in Verbindung gebracht werden. In Kopf-Hals-, Harnblasen-, Prostata-, Nierenzellkarzinomen, NSCLC, Gliomen sowie Mammakarzinomen konnte eine Überexpression des EGF-R nachgewiesen werden. Dies ging mit einer erhöhten Tumorprogressionsrate, einer schlechteren Prognose und einer kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit der Patienten einher (Gorgoulis et al., 1992; Irish & Bernstein, 1993; Wong et al., 1992). In Gliomen, Lungen-, Ovarial- und Mammakarzinomen fand sich eine Deletion in der extrazellulären Domäne des EGF-R, wodurch der Rezeptor durch Hyperphosphorylierung konstitutiv aktiviert wird und dysregulierte Wachstumssignale in die Zelle weitergeleitet werden (Moscatello et al., 1995; Wong et al., 1992).

Somit spielt der EGF-R eine bedeutende Rolle für tumorbiologische Prozesse und moduliert zelluläre Eigenschaften, die auch von KAI1 und $\alpha\beta 3$ beeinflusst werden.

2.6.8 Weitere Interaktionspartner von KAI1

Weitere Interaktionen, welche die zelluläre Migration und Invasion inhibieren, übt KAI1 über EWI-2, uPA-R und Signalkaskaden des *Hepatocyte Growth Factor Receptors* (HGF-R) aus. Über EWI-2 kann KAI1 die Aktin-Organisation der Zelle stören (Zhang et al., 2003b; Zoller, 2009). In Anwesenheit von KAI1 kolokalisiert uPA-R mit $\alpha 5\beta 1$, wodurch die Bindung von uPA an seinen Rezeptor und somit die perizelluläre Proteolyse behindert wird (Zoller, 2009). KAI1 hemmt Signalkaskaden des HGF-R. Dazu gehören die Signalkaskaden über Src-FAK, PI3K-Akt und über die RAS-Raf-MAPK. Dies führt zu einer gestörten Aktin-Organisation, einer reduzierten Apoptoseresistenz und einer reduzierten Gentranskription von MMP. Dadurch wird die zelluläre Migration und Invasion gehemmt und die Apoptoserate der Zellen erhöht (Abb. 6) (Zoller, 2009).

Zudem haben Interaktionen von KAI1 mit KITENIN (*KAI1 Carboxyterminal Interacting Tetraspanin*) und gefäßendotheliale DARC (*Duffy Antigen/Chemokine*) -Rezeptor inhibierende Effekte auf die Tumorprogression. KAI1 hemmt das pro-metastasierende Protein KITENIN (Lee et al., 2004; Rowe & Jackson, 2006; Zoller, 2009). Durch Assoziation von KAI1 mit gefäßendotheliale DARC wird TBX2 gehemmt, wodurch p21 stimuliert und die Tumorzell-Seneszenz eingeleitet wird (Abb. 6) (Bandyopadhyay et al., 2006; Zoller, 2009).

Zu weiteren transmembranen Partnermolekülen von KAI1 gehören andere Tetraspanine wie CD9, CD81 (Imai & Yoshie, 1993) sowie weitere Adhäsionsrezeptoren wie die Cadherine (Abe et al., 2008), die Oberflächenproteine CD4 und CD8 (Imai et al., 1995; Imai & Yoshie, 1993), CD19 und CD46 (Horvath et al., 1998; Lozahic et al., 2000) und Moleküle des *Major Histocompatibility Complex* (MHC) I und II (Angelisova et al., 1994; Lagaudriere-Gesbert et al., 1997; Szollosi et al., 1996).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass KAI1 die pathologische Angiogenese in Tumorzellen hemmt, indem es die Migration der Endothelzellen durch Modulation von Adhäsionsmolekülen, Gangliosiden, *Lipid Rafts* und CD44-Interaktionen inhibiert (Wei et al., 2014).

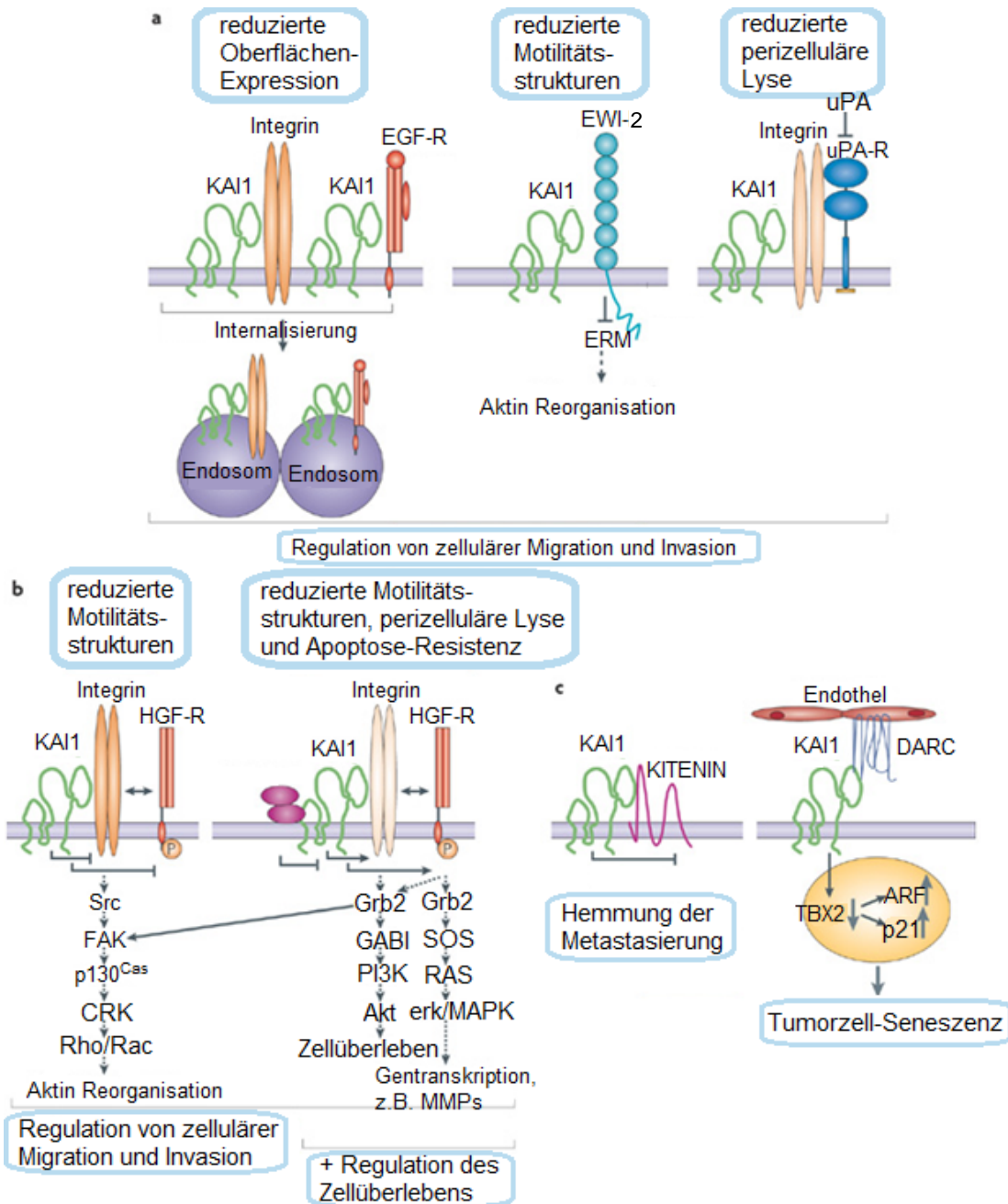


Abbildung 6: Metastasierungssupprimierende Wirkmechanismen von KAI1

- Die KAI1-regulierte Internalisierung von Integrinen und des EGF-R führt zu einer reduzierten Oberflächenexpression und damit verminderten zellulären Proliferation, Migration und Invasion. Die Interaktion von KAI1 mit EWI-2 inhibiert die ERM- (*Ezrin-Radixin-Moesin*) Aktivierung, wodurch die Aktin-Reorganisation gehemmt wird. uPA-R interagiert mit dem $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin, welches an KAI1 assoziiert ist, wodurch die Bindung von uPA verhindert und folglich die perizelluläre Lyse reduziert wird. Diese Mechanismen führen zu einer Reduktion der zellulären Migration und Invasion, wodurch der Metastasierungsprozess supprimiert wird.
- Durch Interaktion des HGF-R mit einem mit KAI1 assoziierten Integrin werden die intrazellulären Integrin- und HGF-R-abhängigen Signalkaskaden über Src/FAK, PI3K/Akt und RAS/MAPK inhibiert. Daraus resultiert ein negativer Effekt auf die Aktin-Reorganisation, die Gentranskription von beispielsweise MMP und auf das Zellüberleben, wodurch die zelluläre Migration und Invasion gehemmt werden.
- Durch Interaktion von KAI1 mit KITENIN kann dessen pro-metastasierender Effekt gehemmt werden. Interagiert KAI1 mit endothel-gebundenem DARC, wird die Expression von TBX2 vermindert, p21 und ARF stimuliert und die Tumorzellen zur Seneszenz gebracht.

Stimulierung ist dargestellt durch durchgezogene Pfeile, Inhibition durch senkrecht abgeschlossene Linien, eine Reduktion in der Signaltransduktionskaskade durch gestrichelte Pfeile. Modifiziert nach Zoller, 2009.

Vor diesem Hintergrund wird ersichtlich, dass KAI1 seine Rolle als Metastasierungssuppressor innerhalb des *Tetraspanin Webs* vor allem über eine Modulation der zellulären Adhäsion, eine Reduktion der Migration und Invasion maligner Zellen, über das Einleiten von Apoptose und über eine Supprimierung der Proliferation bewirkt (Bandyopadhyay et al., 2006; Guo et al., 2005; Jee et al., 2007; Lu et al., 2007; Ono et al., 1999; Ruseva et al., 2009; Sridhar & Miranti, 2006; Takaoka et al., 1998b; Yang et al., 2001; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2003b; Zoller, 2009).

In dieser Arbeit wurden die differentiellen zellbiologischen Funktionen von KAI1 und dessen Splice-Variante in humanen kultivierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen untersucht. Spezielles Augenmerk wurde auf die Modulation der zellulären Adhäsion und Proliferation und in diesem Zusammenhang auf die funktionelle Wechselwirkung mit seinen Interaktionspartnern $\alpha\beta 3$ und dem EGF-R gelegt.

2.7 Die Zelllinie MDA-MB-435 und das maligne Melanom

2.7.1 Die Kontroverse um die Zelllinie MDA-MB-435

Seit dem Jahr 2000 wurde die Zelllinie MDA-MB-435 immer wieder Grund für kontroverse Diskussionen, ob es sich bei dieser nicht in Wirklichkeit um eine Melanomzelllinie handle. Sie exprimiere etliche Melanom-assoziierte Gene und sei, durch verschiedenartige genetische Analysen bekräftigt, missidentifiziert und in ihrem Ursprung melanomatös und keine Mammakarzinomzelllinie (Christgen & Lehmann, 2007; Ellison et al., 2002; Garraway et al., 2005; Gaur et al., 2007; Lacroix, 2008; Paz et al., 2003; Prasad & Gopalan, 2015; Rae et al., 2007; Ross et al., 2000). Genauso gab es verschiedenste Arbeiten, die die MDA-MB-435-Zelllinie weiterhin als Mammakarzinomzelllinie ansahen. Die Zellen exprimierten brust- und epithelspezifische Proteine und konnten Milchlipide sezernieren wie dies bei anderen etablierten Mammakarzinomzelllinien beobachtet werden konnte (Sellappan et al., 2004). Die Koexpression epithelialer brust- und melanomspezifischer Marker konnte in vielen Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden und wurde mit niedrig differenziertem oder metaplastischem Tumorgewebe in Verbindung gebracht (Bachmeier et al., 2008; Bignold, 2005; Nobukawa et al., 1999; Padmore et al., 1996; Ruffolo et al., 1997; Yen et al., 2000). Es sei nicht ungewöhnlich, dass Tumorzellen Marker und Proteine exprimieren, die normalerweise mit einem anderen Tumortyp assoziiert sind (sog. *lineage infidelity*, „Linienuntreue“) (Montel et al., 2009; Sellappan et al., 2004; Zhang et al., 2010).

Vor Beginn meiner Arbeiten wurde dann ein vertrauenswürdiges Paper publiziert, das besagte, dass die Melanomzelllinie M14 und die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 die gleiche Zelllinie seien und beide in Wirklichkeit eine Mammakarzinomzelllinie darstellten (Chambers, 2009). Auf diese Publikation beriefen sich in der nachfolgenden Zeit etliche Publikationen renommierter Magazine. Deshalb fühlten wir – die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Reuning, Klinische Forschergruppe der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde der TU München - uns darin bestätigt, dass die MDA-MB-435-Zelllinie ihren Ursprung tatsächlich im Brustepithel findet und die wichtigsten Aspekte von Brustkrebszellen bedient, auch wenn sie melanomspezifische Proteine exprimiert. Sie bildete ein ausgezeichnetes Modell eines hochaggressiven, dedifferenzierten Mammakarzinoms, das während der Dedifferenzierung aufgrund von genetischer Instabilität morphologisch einen melanozytären Phänotyp angenommen hatte. Deshalb schufen wir ein vermeintliches Mammakarzinomzellmodell, bestehend aus MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen und bauten auf dieser Grundlage die gesamte Studie auf.

Die momentane allgemeine Expertenmeinung im Jahr 2019 sieht die Zelllinie MDA-MB-435 jedoch tatsächlich als Melanomzelllinie an. Korch et al. untersuchten frühe Proben der M14-Zelllinie und des Spenderserums, die vor der Etablierung der MDA-MB-435-Zelllinie eingelagert worden waren und konnten tatsächlich eine Übereinstimmung der M14-Zellen mit den Spendercharakteristika nachweisen (Korch et al., 2018). Deshalb wird im Folgenden kurz auf die tumorbiologisch relevanten Aspekte des malignen Melanoms, die in Bezug zu dieser Arbeit stehen, eingegangen. Die Kontroverse um die MDA-MB-435-Zelllinie wird im Rahmen der Diskussion unter 6.5. eingehender betrachtet.

2.7.2 KAI1-abhängige, tumorbiologisch relevante Aspekte des malignen Melanoms

In Zellen des malignen Melanoms fanden sich widersprüchliche Daten bezüglich der KAI1-WT-Expression. Eine Studie zeigte eine deutliche Erhöhung der KAI1-WT-Expression (Cho, 2013), während etliche andere Analysen eine reduzierte Protein-Expression von KAI1-WT und verminderte mRNA-Spiegel in Melanomzellen beobachten konnten (Kim et al., 2009; Tang et al., 2014; Zhang et al., 2015). Im Laufe der Tumorprogression vom dysplastischen Nävi über das primäre Melanom bis hin zur metastasierten Melanomerkrankung nahm die KAI1-Expression der Tumorzellen jeweils ab und korrelierte negativ mit dem Stadium des Melanomleidens, der Tumortiefe und dem Auftreten von Ulzerationen und Metastasen. Zudem stand eine reduzierte KAI1-Expression mit einem schlechten 10-Jahres-Überleben in Verbindung (Maloney et al., 2013; Tang et al., 2014; Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2016). Die Wiedereinführung von KAI1-WT in humane Melanomzellen zeigte eine Reduktion des invasiven Potentials und der zellulären Migration, jedoch keine Effekte auf die *in-vitro*- oder *in-vivo*-Proliferation (Takaoka et al., 1998a; Tang et al., 2014; Zhang et al., 2016). Die verminderte zelluläre Migration durch eine KAI1-WT-Expression schien mit einer FAK/Src-Inaktivierung in Verbindung zu stehen (Zhang et al., 2016). Die Expression von KAI1-WT schien zudem die Angiogenese des Melanoms im Mausmodell zu hemmen (Tang et al., 2015). Die Bildung pulmonaler Metastasen war bei iv-Injektion von KAI1-WT-transfizierten Zellen in Nacktmäuse verglichen mit Injektion von wt-Zellen signifikant vermindert (Takaoka et al., 1998a). Daten über die Expression von KAI1-SP in humanen Melanomzellen und davon abhängige tumorbiologische Effekte wurden bislang unseres Wissens nach nicht publiziert.

Die $\alpha\beta 3$ -Expression humaner Melanomzellen ist sehr heterogen. Vor allem in nodulären Melanomzellen fand sich eine Expression von $\alpha\beta 3$ in 80% der Fälle, wohingegen das uveale Melanom $\alpha\beta 3$ nicht exprimiert. In metastatischen Melanomläsionen exprimierten nur etwa 50% der Zellen $\alpha\beta 3$ (Danen et al., 1995; Kageshita et al., 2000; Natali et al., 1997; Si & Hersey, 1994; ten Berge et al., 1993), wobei dies signifikant mit einer schlechten 7-Jahres-Prognose korrelierte (Natali et al., 1997). Auch der EGF-R wurde in humanen Melanomzellen exprimiert. Es konnten bislang keine klaren Auswirkungen auf das Überleben in Abhängigkeit von der EGF-R-Expression beobachtet werden. Durch Stimulation mit EGF konnte ein erhöhtes invasives Potential der Zellen nachgewiesen werden, dies korrelierte jedoch nicht mit der EGF-R-Expression (Makowiecka et al., 2016). KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-abhängige Effekte auf die $\alpha\beta 3$ - und EGF-R-Expression in Melanomzelllinien wurden bislang unseres Wissens nach nicht publiziert.

3 Material

3.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der *basal B-like* invasiv-duktalem, triple-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 (Chavez et al., 2010) und der triple-negativen, *basal B-like* Mammakarzinom- bzw. Melanomzelllinie MDA-MB-435 gearbeitet (Korch et al., 2018; Neve et al., 2006). Die aneuploiden, epithelialen MDA-MB-231-Zellen wurden aus einer Metastase der Brust einer europäischen 51-jährigen Frau (ATCC; Satya-Prakash et al., 1981), die MDA-MB-435-Zellen aus dem Pleuraerguss einer 31-jährigen kaukasischen Patientin mit metastasiertem Brustkrebs isoliert (Cailleau et al., 1978; Chavez et al., 2010). Beide humanen Mammakarzinomzelllinien waren von ATCC (Manassas, USA) käuflich erwerblich. Mittels *short tandem repeat*- (STR) Analyse wurde die Authentizität der verwendeten Zelllinien entsprechend der veröffentlichten Empfehlungen bestätigt (Capes-Davis et al., 2010). Bezüglich der Kontroverse um die Zelllinie MDA-MB-435 siehe 2.7.1 und 6.5.

3.2 Antikörper

Primärantikörper:

Name	Antigen	Hersteller	Konzentration µg/ml
AB1930	αv	Millipore/Chemicon, Schwalbach, Deutschland	keine Angabe
#23C6	αvβ3	Millipore/Chemicon	100
#528	EGF-R	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	200
#Ts82b	KAI1	Diaclone, Stamford, CT, USA	1
#F182	KAI1	Santa Cruz	keine Angabe
pY397	p-FAK	Becton-Dickinson	250

Sekundärantikörper:

Alexa-568-konjugiertes Ziege-anti-Maus Immunglobulin G (IgG)	Gibco-Invitrogen	1 µg/ml
Alexa-568-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG	Gibco-Invitrogen	
Alexa-488-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG	Gibco-Invitrogen	
Alexa-488-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG	Gibco-Invitrogen	

3.3 Chemikalien

Verwendete Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge:

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Collagen Typ I und IV	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat	CarlRoth, Karlsruhe, Deutschland
<i>DNA High Pure PCR Template Preparation Kit</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DNA-Molekulargewicht Marker	Gibco/Invitrogen
<i>Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit</i>	Promega Corporation, Madison, WI, USA
<i>Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) mit Glutamax™</i>	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS), pH= 7,4</i>	Gibco/Invitrogen
EDTA, pH=8,0	CarlRoth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Versen) 1% in PBS w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺	Gibco/Invitrogen
<i>FACS Flow Sheath Fluid</i>	Becton-Dickinson
fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Invitrogen
Fibronektin (FN)	Collaborative Research, Bedford, Massachusetts, USA
Glycerol	CarlRoth
Glycin	CarlRoth
Hygromycin B	Gibco/Invitrogen
L-Arginin	Sigma-Aldrich
L-Asparagin	Sigma-Aldrich
Lipofektin™ Reagenz	Gibco/Invitrogen
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES) Buffer Solution 1M, pH=7,4	Gibco/Invitrogen
NaOH	Merck/Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	CarlRoth
Natriumzitat	Merck/Millipore
Paraformaldehyd	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Plasmid pcDNA3.1/Hygro	Gibco/Invitrogen
p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid	Sigma-Aldrich
Protein-G-Agarose	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Rekombinanter humaner <i>Epidermal Growth Factor (EGF)</i>	Gibco/Invitrogen
Rekombinanter humaner EGF	Peptotech, Rocky Hill, NY, USA
<i>Renilla Luziferase Reporter-gen-Plasmid pRL-SV40</i>	Becton-Dickinson
Saponin	Merck/Millipore
Sodiumdodecylsulfat (SDS) Pellets	CarlRoth
Taq-Polymerase	Gibco/Invitrogen
Tris-Acetat	Merck/Millipore
Tris-Ultra Pure	CarlRoth
Triton-X-100	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutsch-

	land
Trypanblau Lösung 0,4% (w/v)	Sigma-Aldrich
Vitronektin (VN)	Becton-Dickinson

3.4 Expressionsplasmide und -vektoren

Entsprechende KAI1-WT- und KAI1-SP-kodierende Expressionsplasmide wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Reuning, Klinische Forschergruppe der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde der TU München, sowie der Arbeitsgruppe von Dr. Eva Gross, Tumorgenetische Arbeitsgruppe der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde der TU München, Deutschland, entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Ruseva et al., 2009).

3.5 Sonstige Materialien

Die Peptide c(-RGDfV)- und c(-RADfV-) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Horst Kessler, Fakultät für Chemie, TUM, München, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

Das *Firefly EGF-R Promotor Luziferase Reportergen-Plasmid* erhielten wir von Prof. Dr. Ester Gonzalez, Saint Louis University, Division of Nephrology, Saint Louis, USA.

3.6 Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen 4,5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Lab-Tek™ Mikrochamber-Slides	Nunc Lab-Tek, Naperville, IL, USA
Minisart® Sterilfilter 0,1/0,2 µm	Sartorius, Aubagne, Frankreich
sterile Spritzen und Injektionsnadeln	Braun, Melsungen, Deutschland

Sämtliche anderen Verbrauchsmaterialien wurden von Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA oder Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, bezogen.

3.7 Technische Geräte und Software

Gerät	Software	Hersteller
Durchflusszytometer BD FACSCalibur™	Cell Quest Pro™	Becton-Dickinson
ELISA Reader SLT Spectra		SLT, Crailsheim, Deutschland
Gelelektrophoresekammer mit Zubehör		Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Gellesegerät Chemidoc™		Bio-Rad Laboratories
Konfokales <i>Laser Scanning</i> Mikroskop CLSM Axiovert ³⁵ mit <i>Laserscan</i> -Detektions- einheit	LSM Image Browser Version 3.2.0.70™ „ZEN“	Zeiss, Jena, Deutschland (Lasereinheit von Leica, Wetzlar, Deutschland)
LUMAT ³ LB9508	ICE-Software™ (Instrument Control und Evaluation) in der Research-Version	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop Axiovert ²⁵		Zeiss
PCR-Thermocycler GeneAmp 2400		Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
pH-Meter		Schott, Mainz, Deutschland
Sicherheitswerkbank Hera Safe		Heraeus, Hanau, Deutsch- land
Zellinkubator Hera Cell		Heraeus
Zentrifuge 5417R		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400R		Heraeus

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung und Passagieren der Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435

Die Kultivierung der Zellen fand bei 37°C, in 5% CO₂ (v/v), in wasserdampfgesättigter Atmosphäre statt. Die Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 wurden laut Herstellerempfehlungen mit DMEM-Medium versorgt. Zur selektiven Kultivierung der KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-cDNA transfizierten Zellen, welche ein Hygromycin-Resistenz-Gen (Plasmid pcDNA3.1/Hygro) enthielten (siehe 4.1.5), wurde ein Hygromycin B-haltiges Nährmedium in einer Konzentration von 200 µg/ml verwendet. Alle drei bis vier Tage wurden die Tumorzellen in neue Zellkulturschalen überführt, indem adhärente Zellen durch Inkubation mit Splitting-Lösung bei 37°C für 3 bis 5 Minuten (min) abgelöst wurden. Abgelöste Zellen konnten mittels 5 ml PBS von der Zellkulturschalenoberfläche abgewaschen und in einem 10 ml Röhrchen bei 246 x g (1.300 RCF [relative Zentrifugalbeschleunigung]) für 3 min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in Nährmedium resuspendiert und ein angemessener Anteil der resuspendierten Zellen in eine neue Zellkulturschale eingebracht.

Für einige Methoden wurden Objektträger mit EZM-Proteinen beschichtet. Hierfür wurden die Objektträger für 30 min bei Raumtemperatur (RT) mit VN oder FN bzw. für 3 h bei 37°C mit Col I oder IV, 5 µg/ml PBS, benetzt und anschließend wurden für 30 min mit PBS, 2% (w/v) BSA unspezifische Bindungsstellen blockiert, bevor die Zellen darauf kultiviert wurden. Zwischen jeweiligen Schritten wurde mit PBS gewaschen.

Zusammensetzung der Lösungen:

Zellkulturnährmedium	DMEM FCS HEPES L-Arginin L-Asparagin	10% (v/v) 10 mM 550 mM 272 mM
Splitting-Lösung	PBS, pH=7,4 EDTA	0,02% (v/v)

4.1.2 Zellzählungen

Zellzählungen fanden mithilfe der Neubauer-Zählkammer statt. Die Zellsuspension wurde mit 10% (w/v) Trypanblau versetzt, um vitale von toten Zellen, welche durch die defekte Membran blau angefärbt wurden, unterscheiden zu können. 10 µl dieser Zell-Trypanblau-Suspension wurden seitlich des Deckplättchens aufpipettiert und durch Kapillarkräfte in die Zählkammer gezogen. Nach Auszählung der vitalen Zellen wurde deren Anzahl pro Volumeneinheit wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl /ml} = \sum \text{Zellzahl der 4 Eckquadrate} /4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ (Kammervolumen)}$$

4.1.3 Kryokonservierung der Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden adhärente Zellen wie oben beschrieben von den Zellkulturschalen abgelöst, abgewaschen und herunterzentrifugiert. Nach Absaugen des PBS wurden etwa 5×10^6 Zellen mit 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Einfrierröhrchen überführt und umgehend auf Eis inkubiert. Die vorübergehende Einlagerung fand bei -80°C statt, die dauerhafte Einlagerung bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Zur Reaktivierung wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut, in 4°C kaltem Nährmedium resuspendiert, bei $246 \times g$ für 3 min zentrifugiert, anschließend in Nährmedium resuspendiert und in frische Zellkulturschalen gegeben.

Zusammensetzung des Einfriermediums zur Kryokonservierung von Zellen:

Einfriermedium	DMSO	10% (v/v)
	FCS	90% (v/v)

4.1.4 Nachweis einer potenziellen Mykoplasmenkontamination

Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen mittels PCR auf Mykoplasmen untersucht, um Mykoplasmenkontaminationen rechtzeitig zu erkennen, da Mykoplasmen die physiologischen Zelleigenschaften und den zellulären Stoffwechsel beeinträchtigen können (Rottem & Barile, 1993). Mittels des *DNA High Pure PCR Template Preparation Kit* von Roche Diagnostics wurde den Anweisungen des Herstellers folgend vollständige zelluläre DNA gewonnen. Die PCR wurde mit 50 µl Reaktionsvolumen in wässriger Lösung durchgeführt. Zur Kontrolle dienten je eine Positivkontrolle (Mykoplasmen-kontaminierte Probe früherer Analysen aus der klinischen Forschergruppe der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde der TU München in der Arbeitsgemeinschaft von Prof. Dr. Ute Reuning)

und eine Negativkontrolle ohne DNA (Aqua dest.). Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem Laufpuffer aus Tris-Essigsäure-EDTA (TAE) aufgetrennt, ein Marker zeigte das DNA-Molekulargewicht an. Durch Anfärben mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurde die Sequenzierung der PCR-Produkte fotografisch dokumentiert. Das PCR-Produkt potenziell angereicherter Mykoplasmen-DNA zeigte sich bei 500 bp.

PCR-Protokoll: ad 50 µl Reaktionsvolumen in wässriger Lösung, final:

		Volumen	Konzentration
10x PCR Reaktionspuffer		5 µl	
dNTPs		5 µl	2,5 mM
3' Primer	5'- GCG GTG TGT ACA AGA CCC GA- 3'	3 µl	20 pmol/µl
5' Primer	5'- CGC CTG AGT AGT ACG TTC GC- 3'	3 µl	20 pmol/µl
<i>DNA Template</i>		1 µl	
Taq-Polymerase		1 µl	1 U/µl

PCR-Zyklen nach Temperatur und Zeit:

Initiation	94°C	5 min	1x
Amplifikation	94°C Denaturierung	30 Sekunden (sek)	30x
	60°C Anlagerung	1 min	
	72°C Verlängerung	30 sek	
	72°C	5 min	1x

Agarose-Gel-Elektrophorese: 90 V, 40 min

Agarose-Gel	TAE Agarose Ethidiumbromid	10 mg/ml 0,25 µg/ml
<i>DNA Loading Puffer</i>	1x TAE Glycerol Bromphenolblau	50% 0,05%
Gelelektrophorese-Puffer	Glycin Tris SDS	1,6 M 250 mM 1% (w/v)
Laufpuffer, TAE	Tris-Acetat EDTA, pH=8,0	40 mM 1 mM

4.1.5 Herstellung stabil transfizierter KAI1-WT und KAI1-SP exprimierender MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen

MDA-MB-231-Zellen wurden für 24 Stunden (h) auf Petrischalen kultiviert. Die einschichtigen Zellrasen (sog. *Monolayer*) von einer Zelldichte von etwa 50% wurden einmalig mit PBS gewaschen und auf FCS- und Aminosäure-freies Nährmedium gesetzt (GAM = *growth arrest*

medium). Zur Durchführung der stabilen Transfektion wurde Lipofektin™ verwendet. Die Transfektion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt. 15 µl Lipofektin™ wurde für 45 min bei RT in 100 µl GAM gelöst. Ebenso wurden 5 µg der jeweiligen Expressionsplasmide (Miller et al., 2018; Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015) für 45 min bei RT in 100 µl GAM inkubiert und anschließend mit den Lipofektin™-Ansätzen zusammenpipettiert. Nach 15 min weiterer Inkubationszeit bei RT wurde dieser Lipofektin™/DNA-Ansatz 10 µl-weise auf die Zellen titriert (Arnaout et al., 2005), welche zuvor mit frischem Medium versetzt worden waren. Nach 6 h Inkubationszeit bei 37°C wurde das Transfektionsmedium vorsichtig durch Komplett-Medium ersetzt.

Nachdem die Zellen das zweite Mal in eine neue Zellkulturflasche überführt worden waren, wurde die Selektion stabil transfizierter MDA-MB-231-Zellen mit Hygromycin-haltigem Medium in einer Konzentration von 200 µg/ml begonnen. Eine erfolgreiche Transfektion zeigte sich dadurch, dass Zellen, welche die Expressionsplasmide mit dem enthaltenen Hygromycin-Resistenz-Gen aufgenommen hatten, die Selektion überlebten. Zellen, welche die Expressionsvektoren nicht aufgenommen hatten, starben nach etwa 10 Tagen ab (Miller et al., 2018; Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015).

Um die Vergleichbarkeit der Effekte zwischen den KAI1-WT- und KAI1-SP-Transfektanten zu gewährleisten, wurden die Transfektanten subkloniert, um solche Klone zu erhalten, welche die gleichen Expressionshöhen für diese beiden Antigene aufwiesen. Dazu wurde eine hoch verdünnte Zellsuspension auf Petrischalen ausgesät. Einzelne Zellen konnten zu kleinen Kolonien heranwachsen, welche darauffolgend einzeln in 96-Well-Platten überführt wurden. Deren Gehalt an KAI1-SP bzw. KAI1-WT wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) und Immunzytochemie (ICC) bestimmt (siehe 4.3 und 4.4). Transfektanten mit hoher KAI1-SP- bzw. KAI1-WT-Expression wurden in mehreren Runden erneut selektiert, bis sich MDA-MB-231-Zellklone fanden, welche sich in ihrer KAI1-SP- und KAI1-WT-Expressionshöhe entsprachen (Grenzwertverdünnung) (Abb. 8) (Hapke et al., 2001; Miller et al., 2018; Ruseva et al., 2009). Diese KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Transfektanten-Klone wurden für sämtliche Experimente der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die in dieser Arbeit verwendeten MDA-MB-435 KAI1-SP- und KAI1-WT-Transfektanten sowie sämtliche Vektor-transfizierten Zellen (VEC) waren bereits von der klinischen Forschergruppe der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde der TU München in der Arbeitsgemeinschaft von Prof. Dr. Ute Reuning generiert worden (Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015) und standen für die vorliegenden Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung.

4.2 Proliferationsassays

Zur Bestimmung der Wachstumsaktivität wurden MDA-MB-231- und -435-Zelltransfektanten in Triplikaten à 22.000 bzw. 25.000 Zellen/Well auf unbeschichteten 24-Well-Platten kultiviert. Nach 3, 24, 48, 72, 96 und 120 h wurden die Zellen mit Splitting-Lösung unter lichtmikroskopischer Kontrolle von der Zellkulturschalenoberfläche abgelöst, mit jeweils 50 µl Trypanblau vermischt und mithilfe der Neubauer Zählkammer ausgezählt (Miller et al., 2018; Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015).

Im Falle der EGF-stimulierten Proliferation wurden die Zellen ebenso in Triplikaten auf 24-Well-Platten ausgesät und nach erfolgter Adhäsion für 24 h in GAM kultiviert. Nach diesen 24 h wurde die Start-Zellzahl vor Stimulation ermittelt. Die Zellen wurden mit 20 ng/ml EGF in GAM stimuliert und nach 72 h erneut ausgezählt. Zur Kontrolle dienten Zellen, die in Abwesenheit von EGF in GAM kultiviert wurden (Miller et al., 2018).

4.3 Immunzytochemischer Nachweis von zellulärem KAI1-WT bzw. KAI1-SP, Integrin $\alpha\beta 3$ und des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors

4.3.1 Immunzytochemischer Nachweis von zellulärem KAI1-WT bzw. KAI1-SP

Die MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen wurden für 24 h auf FN-beschichteten Objektträgern kultiviert. Die Zellen wurden bei RT in PBS, 4% (w/v) PFA für 15 min fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden in PBS, 2% (w/v) BSA für 1 h bei RT geblockt. Ein monoklonaler Antikörper (mAK), der KAI1-WT und KAI1-SP gleichermaßen erkennt (#Ts82b) wurde für 2 h bei RT in PBS, 1% (w/v) BSA mit den Zellen inkubiert. Darauffolgend wurden die Zellen für 45 min bei RT mit einem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus Immunglobulin (IgG) (Blichert-Toft et al., 1998) in PBS, 1% (w/v) BSA versetzt. Zwischen jeweiligen Schritten wurden die Zellen mit PBS gewaschen (Miller et al., 2018; Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015).

Die gefärbten Zellen wurden mit PBS beschichtet und unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) und der Zeiss „ZEN“ die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda=488$ nm bestimmt. Der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper (AK), gebunden an den Primär-AK, emittiert im Laserlicht bei bestimmter Wellenlänge Photonen. Die Konzentration der Photonenemission, welche als Fluoreszenzsignal dargestellt wird, verhält sich direkt proportional zur Menge des gebundenen Sekundär-AK. Somit lassen sich Rückschlüsse auf die Expressionshöhe des entsprechenden Antigens treffen. Die Intensität der Fluoreszenz wurde mithilfe der *glowOv/Un LUT*-Skala der CLSM Scanning Software farblich dargestellt: niedrige Fluoreszenzintensität wurde in *orange*, mittlere in *gelb* und hohe Fluoreszenzintensität in *weiß* dargestellt (Beck et al., 2005; Lössner et al., 2008). Unbehandelte Zellen dienten als Maß der Autofluoreszenz der Zellen. Nur mit sekundärem Alexa-488-konjugiertem IgG versetzte Zellen dienten zur Detektion unspezifischer AK-Bindung und ergaben keine nennenswerten Fluoreszenzsignale (Miller et al., 2018; Müller et al., 2014; Müller et al., 2013; Ruseva et al., 2009).

Herstellung der PFA-Lösung zur Zellfixation:

PFA-Lösung, pH=7,4	PFA,	4% (w/v)
	thermisch gelöst in	
	Natriumhydrogenphosphat	0,1 M
	und	
	di-Natriumhydrogenphosphat,	0,1 M
	pH=7,4	

4.3.2 Immunzytochemischer Nachweis des Integrins $\alpha\beta3$

Nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen auf FN-beschichteten Objektträgern wurden sie in PBS, 4% (w/v) PFA für 15 min bei RT fixiert. Danach wurden unspezifische AK-Bindungsstellen in PBS, 2% (w/v) BSA für 1 h bei RT blockiert. Die fixierten und geblockten Zellen wurden für 1 h bei RT mit einem das Integrin $\alpha\beta3$ erkennenden mAK (#23C6) und anschließend für 45 min bei RT mit einem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG inkubiert (Müller et al., 2014; Müller et al., 2013). Die Darstellung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels CLSM mithilfe der *glowOv/Un LUT*-Skala der CLSM Scanning Software (siehe 4.3.1) (Miller et al., 2018).

4.3.3 Immunzytochemischer Nachweis des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors

MDA-MB-231- und -435-Zellen wurden für 24 h auf FN-beschichteten Objektträgern kultiviert. Zur Fixierung wurden die Zellen in PBS, 4% (w/v) PFA für 15 min bei RT und zusätzlich in PBS, 0,05% (w/v) Saponin für 10 min bei RT inkubiert. Die Blockierung unspezifischer AK-Bindungsstellen erfolgte mittels Inkubation in PBS, 2% (w/v) BSA für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Zellen für 2 h bei RT mit einem gegen den EGF-R gerichteten mAK (#528) und für 45 min bei RT mit einem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG inkubiert. Mittels CLSM mithilfe der *glowOv/Un LUT*-Skala der CLSM Scanning Software wurde die Fluoreszenzintensität dargestellt (siehe 4.3.1) (Miller et al., 2018).

4.3.4 Immunzytochemischer Nachweis von phosphorylierter *Focal Adhesion Kinase* (Y397)

MDA-MB-231- und -435-Zellen wurden für 24 h auf VN-beschichteten Objektträgern kultiviert. Die Zellen wurden in PBS, 4% (w/v) PFA für 15 min bei RT fixiert und unspezifische AK-Bindungsstellen in PBS, 2% (w/v) BSA für 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurden sie für 2 h bei RT mit einem gegen phosphoryliertes FAK gerichteten mAK (pY397) und für 45 min bei RT mit einem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG inkubiert (Müller et al., 2014; Müller et al., 2013). Die Darstellung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels CLSM mithilfe der *glowOv/Un LUT*-Skala der CLSM Scanning Software (siehe 4.3.1) (Miller et al., 2018).

4.3.5 Ermittlung einer möglichen Kolo­kalisierung der KAI1-Proteine mit der Integrin-Untereinheit α_v und dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ mittels immunzytochemischer Doppelfärbung

Humane MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen wurden auf VN-beschichteten Objektträgern für 24 h kultiviert, in PBS, 4% (w/v) PFA für 15 min fixiert, in PBS gewaschen und in PBS, 2% (w/v) BSA für 1 h zur Absättigung unspezifischer AK-Bindungsstellen inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen für die Ermittlung einer möglichen Kolo­kalisierung von KAI1 und der Integrin-Untereinheit α_v simultan für 2 h mit einem gegen KAI1 gerichteten mAK (#Ts82b) und einem gegen α_v gerichteten polyklonalen Antikörper (pAK) (AB1930) inkubiert. #Ts82b wurde mit einem sekundären Alexa-568-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG, AB1930 mit einem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen IgG detektiert (45 min, RT).

Zur Detektion einer möglichen Kolo­kalisierung von KAI1 mit $\alpha_v\beta_3$ wurden die Zellen ebenso simultan für 2 h mit einem gegen KAI1 gerichteten pAK (#F182) und einem gegen $\alpha_v\beta_3$ gerichteten mAK (#23C6) inkubiert. #F182 wurde mit einem sekundären Alexa-568-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen IgG, #23C6 mit einem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG detektiert (45 min, RT).

Mittels CLSM wurde anschließend mithilfe der *glowOv/Un LUT*-Skala der CLSM Scanning Software die Fluoreszenzintensität bestimmt. Der sekundäre Alexa-568-fluoreszenz-konjugierte Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Kaninchen IgG, welcher das KAI1-Antigen markierte, wurde im Laserlicht bei einer Wellenlänge von $\lambda=568$ nm angeregt. Entsprechend verhielt sich der sekundäre Alexa-488-fluoreszenz-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen bzw. Ziege-anti-Maus IgG bei einer Wellenlänge von $\lambda=488$ nm, welcher das α_v - bzw. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antigen markierte. Die Fluoreszenzsignale, die bei einer Wellenlänge von $\lambda=568$ nm detektiert wurden, zeigten somit die Expression des KAI1-Proteins und wurden in *rot* dargestellt. Die bei einer Wellenlänge von $\lambda=488$ nm detektierten Fluoreszenzsignale zeigten die Expression von α_v bzw. $\alpha_v\beta_3$ und wurden in *grün* dargestellt. Nach dem Überlagern der beiden Bilder in *rot* und *grün* (*Merge*) zeigten sich kolo­kalisierte Expressionsstellen der beiden Antigene in *gelb*. Unbehandelte Zellen dienten als Maß der Autofluoreszenz. Zellen, die nur mit einem sekundären Alexa-488- bzw. Alexa-568-konjugierten IgG versetzt waren, dienten zur Detektion unspezifischer AK-Bindung und ergaben keine nennenswerten Fluoreszenzsignale (Miller et al., 2018; Müller et al., 2014; Müller et al., 2013; Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015).

4.4 Durchflusszytometrischer Nachweis von zellulärem KAI1-WT bzw. KAI1-SP, Integrin $\alpha\beta 3$ und des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors

4.4.1 Nachweis von zellulärem KAI1-WT bzw. KAI1-SP mittels FACS-Analyse

MDA-MB-231- und -435-Zellen wurden für 48 h auf 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert, mit Splitting-Lösung von den Oberflächen gelöst und gründlich in PBS gewaschen. Die abgelösten, vitalen Zellen wurden in Triplikaten für 2 h bei RT in PBS, 1% (w/v) BSA mit einem mAK, der beide KAI1-Proteine gleichermaßen erkennt (#Ts82b) und anschließend für 45 min bei RT mit einem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG in PBS, 1% (w/v) BSA inkubiert. Zwischen jeweiligen Schritten wurden die Zellen mit PBS gewaschen (Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015).

Die Detektion der Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen erfolgte an einem *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) -Gerät, dem BD FACSCaliburTM mithilfe der Software CellQuest ProTM. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden in einer Einzelzellsuspension, in PBS, 1% (w/v) BSA in einem dünnen Flüssigkeitsstrom in das FACS eingeleitet und dort von einem Laserstrahl einer bestimmten Anregungswellenlänge von $\lambda=488$ nm fokussiert. Dabei emittiert der fluoreszenzmarkierte sekundäre AK, der an den Primär-AK gebunden hat Photonen. Die Photonenemission wurde mittels Photovervielfältigungsröhren in ein elektronisches Signal umgewandelt und als FACS-Mean-Wert dargestellt. Dieser verhält sich direkt proportional zur Menge des gebundenen Sekundär-AK und diente somit als Maß der Expressionshöhe des entsprechenden Antigens (Loken & Herzenber, 1975; Müller et al., 2014; Müller et al., 2013; Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015). Unbehandelte Zellen dienten als Maß der Autofluoreszenz der Zellen. Nur mit sekundärem Alexa-488-konjugierten IgG inkubierte Zellen dienten zur Detektion unspezifischer AK-Bindung und ergaben keine nennenswerten Fluoreszenzintensitäten.

4.4.2 Nachweis des Integrins $\alpha\beta 3$ mittels FACS-Analyse

Nach 48-stündiger Kultivierung der Zellen auf 6-Well-Zellkulturplatten wurden die Zellen mit Splitting-Lösung von den Oberflächen gelöst und in PBS gewaschen. Die Zellen wurden in Triplikaten für 2 h bei RT mit einem $\alpha\beta 3$ erkennenden mAK (#23C6) und nachfolgend für 45 min bei RT mit einem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG inkubiert (Müller et al., 2014; Müller et al., 2013). Die Bestimmung der Expressionshöhen erfolgte am BD FACSCaliburTM mithilfe der Software CellQuest ProTM (Miller et al., 2018).

4.4.3 Nachweis des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors mittels FACS-Analyse

Die Zellen wurden für 48 h auf 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert, mit Splitting-Lösung von den Oberflächen abgelöst und in PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen für 15 min in PBS, 4% (w/v) PFA inkubiert, für 5 min in PBS, 0,025% (w/v) Saponin permeabilisiert und anschließend für 2 h in PBS, 2% (w/v) BSA geblockt. Vitale Zellen wurden währenddessen in PBS, 1% (w/v) BSA inkubiert. Triplikate fixierter und vitaler Zellen wurden anschließend gleichermaßen für 2 h bei RT mit einem gegen den EGF-R gerichteten mAK (#528), und für 45 min bei RT mit einem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG inkubiert. Die Bestimmung der Expressionshöhen erfolgte am BD FACSCalibur™ mithilfe der Software CellQuest Pro™.

4.5 Bestimmung der zellulären Adhäsionskapazität an extrazellulären Matrixproteinen

Zur Detektion der zellulären Adhäsionskapazität wurde der chromogene Adhäsionsassay, modifiziert nach Landegren 1984, verwendet. Im Prozess der Zelladhäsion verhält sich die Aktivität des ubiquitär vorkommenden, lysosomalen Enzyms 2-Acetamido-2-Deoxy- β -D-Glukosidacetamido-Deoxygluko-Hydrolase (Hexosaminidase) direkt proportional zur Menge adhärenter Zellen. Hexosaminidase ist zudem in der Lage glykosylierte zelluläre Bestandteile abzubauen und setzt das zugegebene Hexosaminidase-Substrat (p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosaminid) zu 4-Nitrophenol um. Dieses chromogene Produkt ist photometrisch messbar (Hapke et al., 2001; Hapke et al., 2003; Landegren, 1984; Müller et al., 2013; Ruseva et al., 2009; Sigma-Aldrich).

Die MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen wurden für 48 h auf 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert und anschließend in Triplikaten in Adhäsionsmedium für 90 min bei 37°C auf VN-, FN-, Coll I- oder Coll IV-beschichteten 96-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Um nicht adhärente Zellen zu entfernen, wurde mit PBS gewaschen. Die adhärenen Zellen wurden für 90 min bei 37°C in 100 μ l PBS, 50% (v/v) Hexosaminidase-Substrat inkubiert. Die Umsetzung des Substrats wurde anschließend mit 100 μ l Stop-Puffer (HEPES-NaOH) beendet und der Farbumschlag ins Gelbe mittels ELISA-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=405$ nm bestimmt. Das Maß des Farbumschlags, entsprechend seiner optischen Dichte, lässt Rückschlüsse auf die Menge adhärenter Zellen ziehen (Hapke et al., 2001; Hapke et al., 2003; Miller et al., 2018; Müller et al., 2013; Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015).

Die Linearität zwischen Zellzahl und gemessener Absorption wurde im Vorfeld durch eine Eichkurve überprüft. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurden hierfür jeweils 50.000, 25.000, 12.500, 6.250 und 3.125 Zellen in Triplikaten für 90 min auf 96-Well-Platten kultiviert, mit PBS gewaschen und für 90 min bei 37°C in 100 μ l PBS, 50% (v/v) Hexosaminidase-Substrat inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 μ l Stop-Puffer beendet und der Farbumschlag mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=405$ nm bestimmt.

Um die Rolle des Integrins $\alpha\beta3$ bei der Adhäsion der Zellen an die verschiedenen getesteten EZM-Proteine zu bestimmen, wurde dem Adhäsionsmedium bei ansonsten identischem Vorgehen das an $\alpha\beta3$ bindende zyklische Peptid cRGDfV (250 μ g/ml) zugegeben, um eine Konkurrenz der Integrinbindung an das entsprechende EZM-Protein zu erreichen (Aumailley et al., 1991; Pfaff et al., 1994). Zur Kontrolle verwendeten wir das zyklische, nicht an Integrine bindende Peptid cRADfV (250 μ g/ml), das dem Adhäsionsmedium zugegeben wurde, sowie Zellen, welche ohne Peptid-Zugabe inkubiert

wurden. Der Farbumschlag wurde mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=405$ nm bestimmt (Miller et al., 2018).

Zusammensetzung der Lösungen:

Adhäsionsmedium	BSA in DMEM HEPES, pH=7,4	0,5% (w/v) 20 mM
Hexosaminidase-Substrat	Natrium-Citrat-Puffer, pH=5,0 Triton-X-100 p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosaminid	100 mM 0,5% (v/v) 10 mM
Stop-Puffer	NaOH EDTA	0,2 M 5 mM

4.6 Bestimmung der EGF-R-Promotoraktivität mittels Luziferase-Reporter-Gen-Tests

MDA-MB-231- und -435-Zellen wurden für 24 h auf VN-beschichteten 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Die *Monolayer* wurden bei einer Zelldichte von etwa 50% mit PBS gewaschen und auf GAM-Medium gesetzt. Die transiente Transfektion wurde mit Lipofektin™ wie folgt durchgeführt. Für 45 min bei RT wurden 5 µl Lipofektin™ in 100 µl GAM und 0,5 µg des *Firefly EGF-R Promotor Luziferase Reporter-Gen-Plasmids* (Vektor pUV102) in 100 µl GAM inkubiert und anschließend zusammenpipettiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffektivität wurden die Zellen mit dem *Renilla Luziferase Reporter-Gen-Plasmid* pRL-SV40 (50 ng/Well) kotransfiziert. Nach 15 min Inkubationszeit bei RT wurde der Lipofektin™/DNA-Ansatz 10 µl-weise auf die Zellen pipettiert (Arnaout et al., 2005). Zuvor war das GAM der Zellen auf den 12-Well-Zellkulturplatten erneuert worden. Nach 6 h Inkubationszeit bei 37°C wurde das Transfektionsmedium vorsichtig durch Komplett-Medium ersetzt. Nach weiteren 24 h Inkubation und Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen jeweils für 15-30 min mit 120 µl 20% (v/v) *Passive Lysis Buffer* (enthalten im *Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit*) auf Eis inkubiert. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die lysierten Zellen mit dem Zellschaber abgelöst und für 3 min, bei 16.000 RCF und 4°C zentrifugiert. Das Lysat wurde von den Zellpellets abgetrennt und konnte bei -20°C gelagert werden (Lössner et al., 2008; Miller et al., 2018; Upheber et al., 2015).

Die Messung der relativen Lichteinheiten fand am Lumat³ LB9508 (Berthold) mithilfe der ICE-Software statt. Die relative EGF-R-Promotoraktivität wurde als Quotient der relativen Lichteinheiten nach Spaltung von Luziferin durch die unter der Kontrolle des EGF-R-Promotors entstandene Luziferase und der durch das Kontrollplasmid konstitutiv gebildeten Renilla-Luziferase-Aktivität ermittelt (Lössner et al., 2008; Miller et al., 2018; Upheber et al., 2015).

Zusammensetzung *Passive Lysis Buffer*, pH=8, im *Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit* (Promega, 2015):

Luziferase Lyse Reagenz 1x	Tris-Phosphat, pH=7,8 DTT Trans-1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-Tetraacetatid Glycerin Triton-X-100	25 mM 2 mM 2 mM 10% (v/v) 1% (v/v)
<i>Passive Lysis Buffer</i>	Luziferase Lyse Reagenz 1x Lysozym BSA ad. Aqua dest.	1,25 mg/ml 2,5 mg/ml

4.7 Statistische Auswertung

Signifikanzniveaus und p-Werte wurden mithilfe des unparametrischen Mann-Whitney-U-Tests in SPSS 22.0 ermittelt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ betrachtet. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Asterisk markiert und in den Abbildungen der vorliegenden Arbeit vermerkt.

5 Ergebnisse: Tumorbiologische Effekte des Metastasierungssuppressors KAI1 und seiner Splice-Variante in humanen kultivierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen

In der vorliegenden Dissertation wurden die tumorzellbiologischen Effekte der beiden KAI1-Proteine KAI1-WT und KAI1-SP auf die zelluläre Proliferation, Adhäsion sowie deren Wechselwirkungen mit dem Integrin $\alpha\beta3$ und dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGF-R untersucht. Hierfür wurde ein vermeintliches Mammakarzinomzellmodell der Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 gewählt und entsprechende stabile Transfektanten generiert, die eine erhöhte Expression von entweder KAI1-WT oder KAI1-SP zeigten. Als Kontrolle dienten VEC-transfizierte sowie Wildtypzellen (wt).

5.1 Etablierung eines vermeintlichen Mammakarzinomzellmodells durch Generierung stabiler Transfektanten, welche KAI1-WT oder KAI1-SP exprimierten

Um tumorbiologische *in-vitro*-Effekte, als Funktion der zellulären Expression von KAI1-WT und KAI1-SP zu untersuchen, wurden die humanen Tumorzelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 mit entsprechender cDNA für die beiden KAI1-Proteine, die in Expressionsvektoren enthalten war, stabil transfiziert, so dass entweder KAI1-WT oder KAI1-SP - verglichen mit wt-Zellen oder Kontrolltransfektanten, die nur mit dem leeren Expressionsplasmid transfiziert worden waren (VEC) - in erhöhtem Maße exprimiert wurde. Um die Auswirkungen der Expression beider KAI1-Proteine auf das zelluläre funktionelle Verhalten vergleichbar zu machen, wurden einzelne Zelltransfektanten mit vergleichbar erhöhter Konzentration der beiden KAI1-Proteine isoliert (Abb. 7) (Miller et al., 2018).

Die Transfektionsarbeiten dieser Dissertation hatten ihren Schwerpunkt in der Optimierung der KAI1-SP-Transfektanten der Zelllinie MDA-MB-231 (Miller et al., 2018). Die VEC-Kontrollzellen sowie die KAI1-WT-Transfektanten sowie alle MDA-MB-435-Transfektanten wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015).

In vorliegender Arbeit ist das etablierte Tumorzellmodell mit folgender Nomenklatur aufgeführt:

Humane Tumorzelllinie	MDA-MB-231	MDA-MB-435
<i>Zellwildtyp</i>	wt	wt
<i>Kontrolltransfektante</i>	VEC	VEC
<i>KAI1-WT-Transfektante</i>	KAI1-WT	KAI1-WT
<i>KAI1-SP-Transfektante</i>	KAI1-SP	KAI1-SP

5.2 Immunzytochemischer und durchflusszytometrischer Nachweis der KAI1-WT- und KAI1-SP-Expression

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und der korrekten Translation wurde die KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expressionshöhe der stabil transfizierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen mittels ICC und FACS analysiert. VEC-Zellen korrespondierten in ihrer KAI1-Expression mit der endogenen KAI1-Expression der wt-Zellen und dienten als Kontrolle. Färbungen in Abwesenheit des Erst-AK waren negativ und dienten als Kontrolle für mögliche unspezifische Wechselwirkungen des Zweit-AK. Die Zellen wurden mit einem KAI1-erkennenden mAK, der sowohl KAI1-WT als auch KAI1-SP detektiert, gefärbt und dessen Bindung durch ein sekundäres Alexa-488-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG mittels CLSM visualisiert.

Die subklonierten KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Transfektanten beider Zelllinien zeigten vergleichbar erhöhte Expressionsspiegel für die jeweilige KAI1-Variante im Vergleich zu wt- und VEC-Zellen (Abb. 7A) (Miller et al., 2018). Zudem war ersichtlich, dass KAI1 als Membranprotein auch korrekt auf der Zelloberfläche nachweisbar war.

Parallel wurde die Fluoreszenzintensität mittels FACS detektiert. Die Expressionshöhe der wt-Zellen wurde jeweils auf „1“ und die Werte der Transfektanten dazu ins Verhältnis gesetzt. Die KAI1-WT- und KAI1-SP-Transfektanten der MDA-MB-231-Zellen zeigten eine vergleichbare, ca. 5-fach höhere KAI1-Expression als wt-Zellen. Bei MDA-MB-435 KAI1-WT- und KAI1-SP-Transfektanten ergab sich eine vergleichbare, ca. 6-fach erhöhte KAI1-Expression im Vergleich zu wt-Zellen (Abb. 7B).

In diesem Kontext wurde auch der Gehalt der MDA-MB-231-wt- und der MDA-MB-435-wt-Zellen verglichen. Beide Zelllinien wiesen in bisherigen Studien niedrige endogene KAI1-Expressionsspiegel auf (Yang et al., 1997), was wir bestätigen konnten. Es schien jedoch, dass MDA-MB-231-wt-Zellen in immunzytochemischen Analysen eine minimal höhere KAI1-Expression als MDA-MB-435-wt-Zellen aufwiesen (Abb. 8).

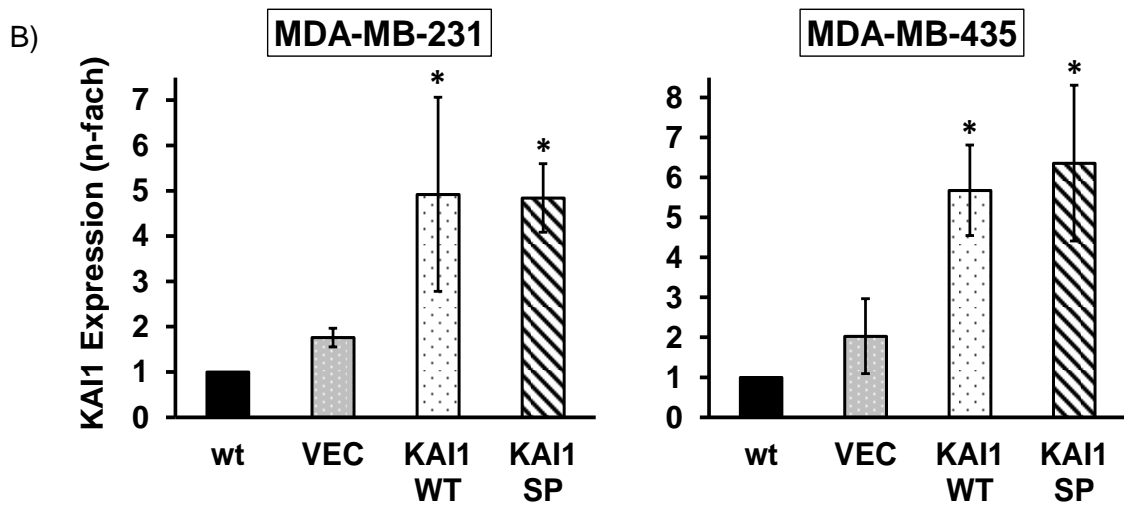
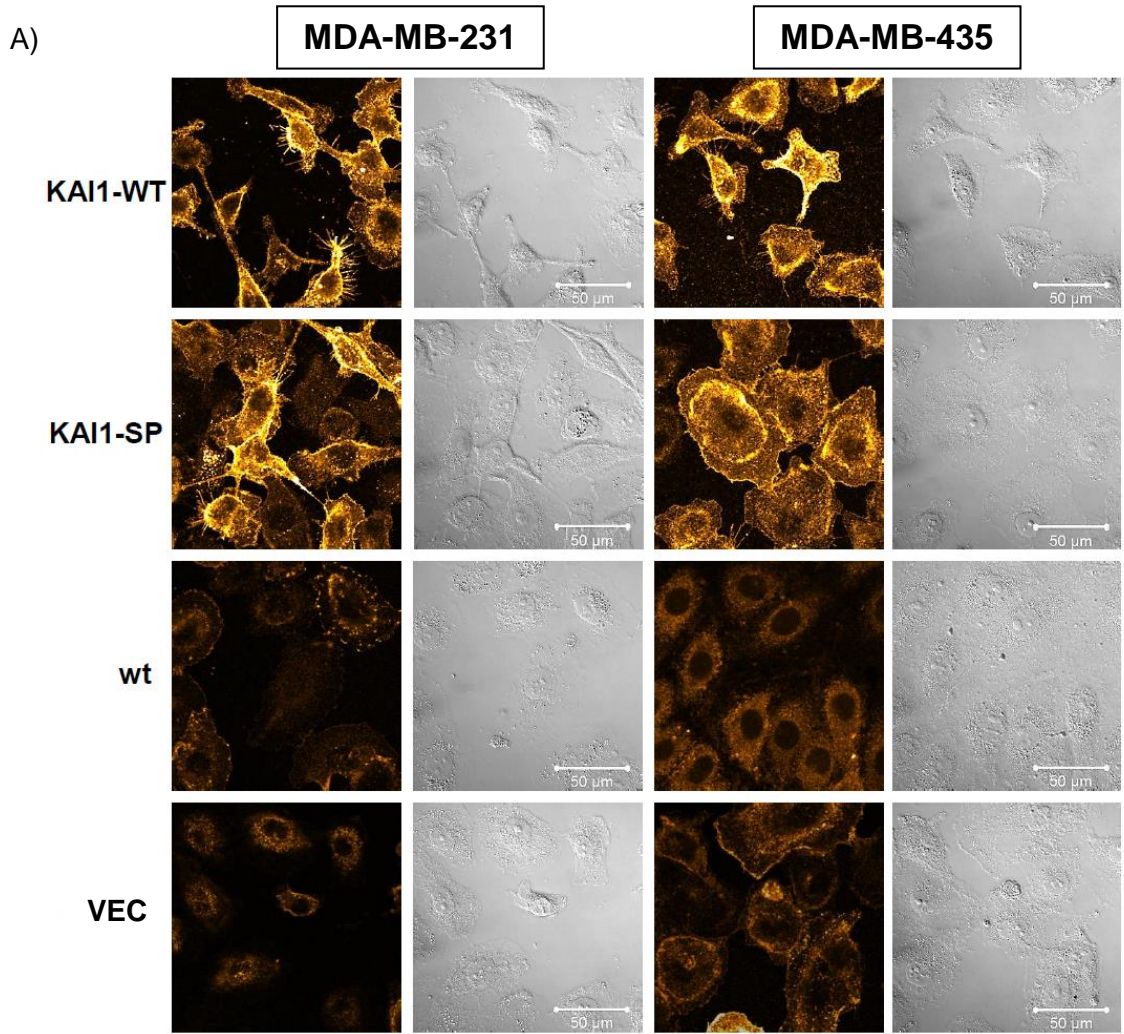


Abbildung 7: Nachweis der KAI1-Expressionshöhe nach stabiler Transfektion von MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen

Die Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 wurden stabil transfiziert und der Erfolg der KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expression mittels immunzytochemischer Färbung und FACS-Analyse überprüft.

- A) ICC: Die Fluoreszenzintensität wurde am CLSM ermittelt und farblich dargestellt: niedrige Intensität in *orange*, mittlere Intensität in *gelb*, hohe Intensität in *weiß*. Ein repräsentatives Fluoreszenzbild ist jeweils neben dem zugehörigen Interferenzkontrastbild abgebildet (Miller et al., 2018).
- B) FACS: Die endogene Expressionshöhe der wt-Zellen wurde jeweils auf „1“ und die Werte der Transfektanten dazu ins Verhältnis gesetzt. Abgebildet sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 unabhängigen, repräsentativen FACS-Analysen. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der KAI1-Expression verglichen mit wt-Zellen sind mittels Asterisk gekennzeichnet.

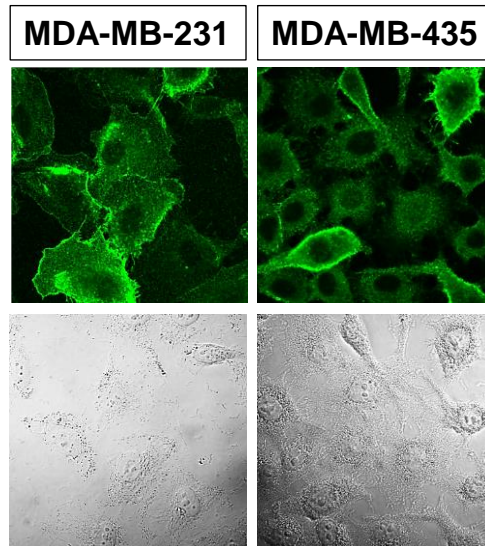


Abbildung 8: Endogene KAI1-Expression in MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen

Dargestellt sind die mittels ICC detektierten endogenen KAI1-Expressionspegel der beiden Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435. Die Fluoreszenzintensität wurde am CLSM ermittelt und farblich – hier in unterschiedlichen *grün*-Intensitäten - dargestellt. Ein repräsentatives Fluoreszenzbild ist jeweils über dem zugehörigen Interferenzkontrastbild abgebildet.

5.3 Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Expression des Integrins $\alpha\beta 3$

Mittels immunzytochemischer und FACS-Analysen wurden die Auswirkungen einer KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expression auf die $\alpha\beta 3$ -Expression in MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen untersucht. Zur Kontrolle der endogenen Expression des $\alpha\beta 3$ dienten wt-Zellen. Zellen, welche ohne Anwesenheit des Primär-AK inkubiert wurden, dienten zur Kontrolle unspezifischer AK-Bindung und waren negativ. Das Integrin $\alpha\beta 3$ wurde mit einem mAK und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG detektiert. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte am CLSM und am FACS-Gerät.

Sowohl die immunzytochemische als auch die FACS-Analyse zeigte eine relativ hohe endogene $\alpha\beta 3$ -Expression der MDA-MB-231 wt-Zellen. Wurde diese auf „1“ und der $\alpha\beta 3$ -Gehalt der MDA-MB-435 wt-Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt, ergab sich eine ca. 0,66-fache Expression für MDA-MB-435 wt-Zellen (Abb. 9). Immunzytochemisch konnte die Membrangebundenheit des Integrins nachgewiesen werden.

Die $\alpha\beta 3$ -Expression der wt-Zellen wurde jeweils auf „1“ und die anderen Ergebnisse dazu ins Verhältnis gesetzt. MDA-MB-435-Zellen wiesen im Vergleich zu den wt- und VEC-Zellen bei Expression von KAI1-SP eine Erhöhung der $\alpha\beta 3$ -Spiegel auf das 6,5-fache auf. Bei KAI1-WT-Transfektanten zeigte sich eine 2,5-fache Erhöhung. Betrachtete man wiederum die Ergebnisse der MDA-MB-231-Transfektanten, sah man verglichen mit den wt- und VEC-Zellen bei Wiedereinführung von KAI1-WT eine nur etwa halb so hohe Expression von $\alpha\beta 3$ und in KAI1-SP-Zellen eine ca. 0,7-fache $\alpha\beta 3$ -Expression (Abb. 10) (Miller et al., 2018).

Dies bedeutet, dass in Abhängigkeit von KAI1-SP die Expression von $\alpha\beta 3$ in MDA-MB-435-Zellen im Vergleich zu VEC-transfizierten und wt-Zellen sowie im Vergleich zu KAI1-WT-Zellen signifikant erhöht wurde, während in MDA-MB-231-Zellen die Expression von $\alpha\beta 3$ durch Wiedereinführung von KAI1-WT im Vergleich zu VEC-transfizierten und wt-Zellen signifikant erniedrigt wurde. Auch hierbei konnte bei KAI1-SP-Transfektanten eine höhere $\alpha\beta 3$ -Expression beobachtet werden als in KAI1-WT-transfizierten Zellen.

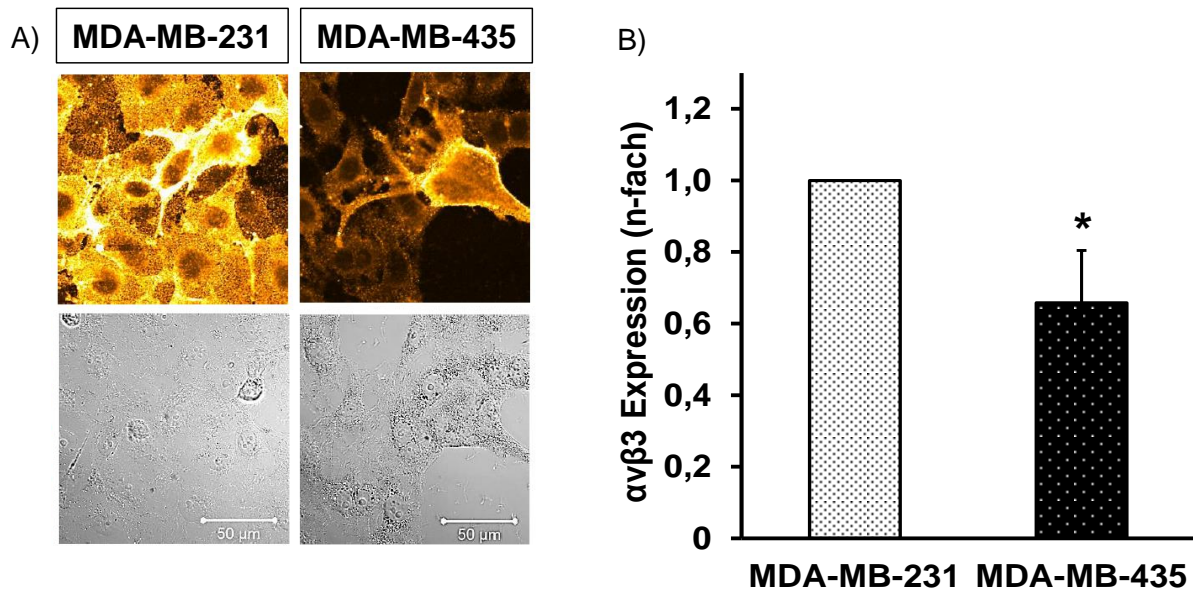


Abbildung 9: Nachweis der zellulären Expression des Integrins $\alpha\beta 3$ in MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen

Wildtypzellen der Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 wurden mittels ICC und FACS-Analyse auf ihre endogene Expression des Integrins $\alpha\beta 3$ untersucht.

- A) **ICC:** Die Fluoreszenzintensität wurde am CLSM ermittelt und farblich dargestellt: niedrige Intensität in *orange*, mittlere Intensität in *gelb*, hohe Intensität in *weiß*. Ein repräsentatives Fluoreszenzbild ist jeweils über dem zugehörigen Interferenzkontrastbild abgebildet.
- B) **FACS:** Abgebildet sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 unabhängigen, repräsentativen FACS-Analysen. Die MDA-MB-231-Expressionshöhe wurde auf „1“ gesetzt und die Expression in MDA-MB-435 dazu ins Verhältnis gesetzt.

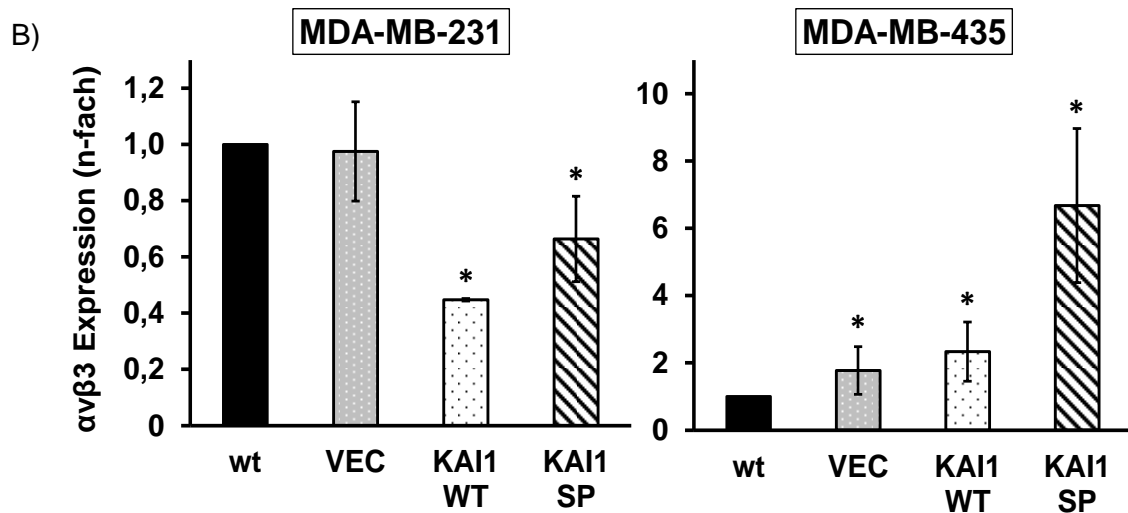
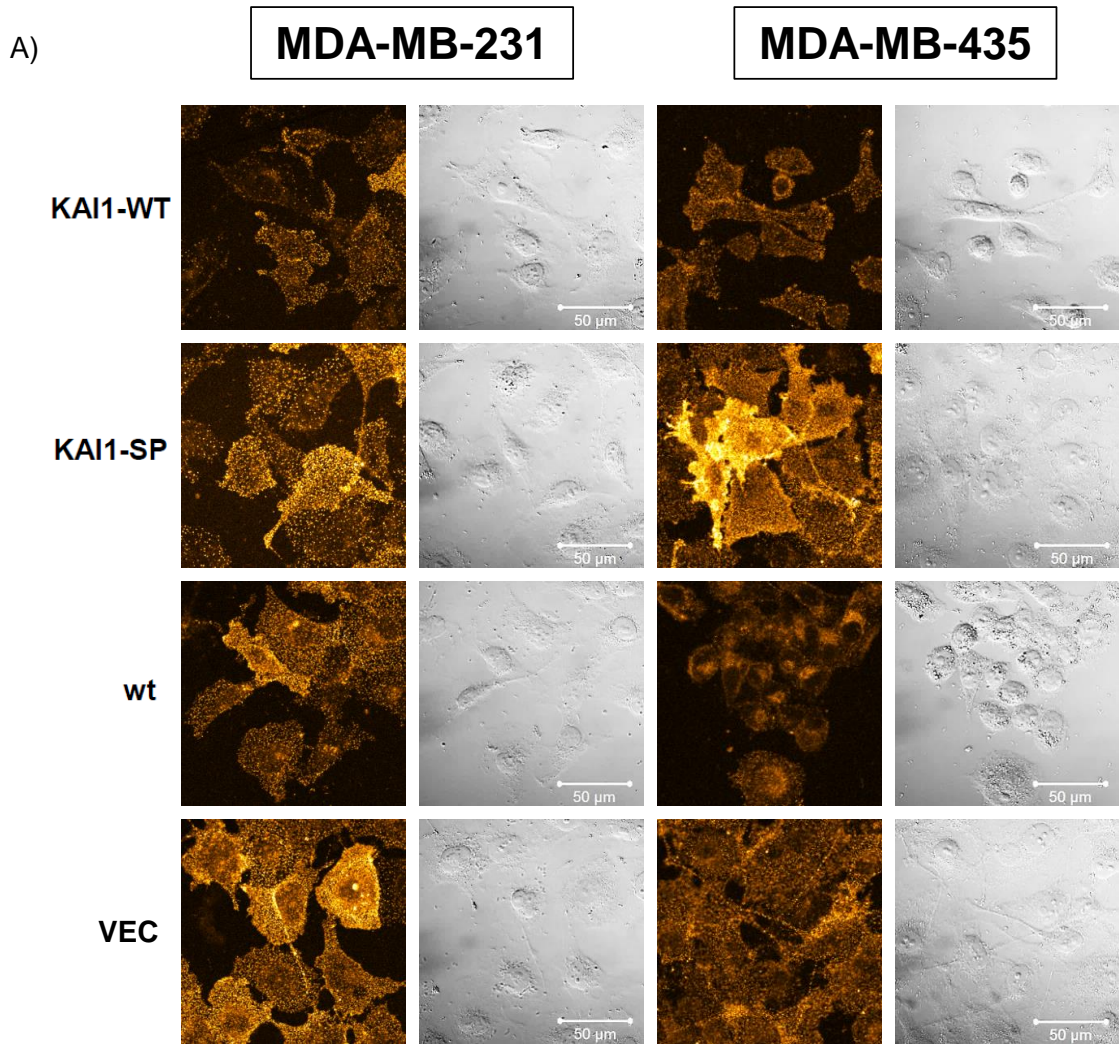


Abbildung 10: Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Expression des Integrins $\alpha v\beta 3$

Die Expressionshöhen des Integrins $\alpha v\beta 3$ als Funktion von KAI1-WT bzw. KAI1-SP in stabil transfizierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen wurden mittels ICC und FACS-Analyse bestimmt.

A) **ICC**: Abgebildet sind repräsentative Fluoreszenz- und entsprechende Interferenzkontrastbilder. Die Fluoreszenzintensität wurde am CLSM detektiert und farblich dargestellt: niedrige Intensität in orange, mittlere Intensität in gelb, hohe Intensität in weiß (Miller et al., 2018).

B) **FACS**: Abgebildet sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 bzw. 4 unabhängigen, repräsentativen FACS-Untersuchungen, wobei jeweils die $\alpha v\beta 3$ -Expression der wt-Zellen auf „1“ und die anderen Ergebnisse dazu ins

Verhältnis gesetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) verglichen mit der $\alpha\beta3$ -Expression der wt-Zellen sind mittels Asterisk gekennzeichnet (Miller et al., 2018).

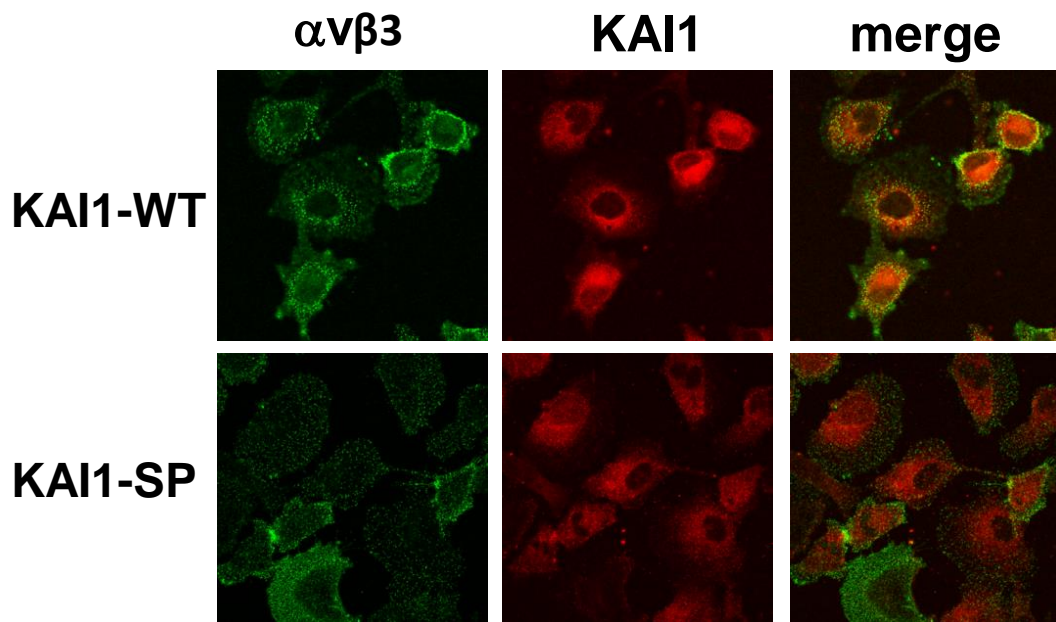
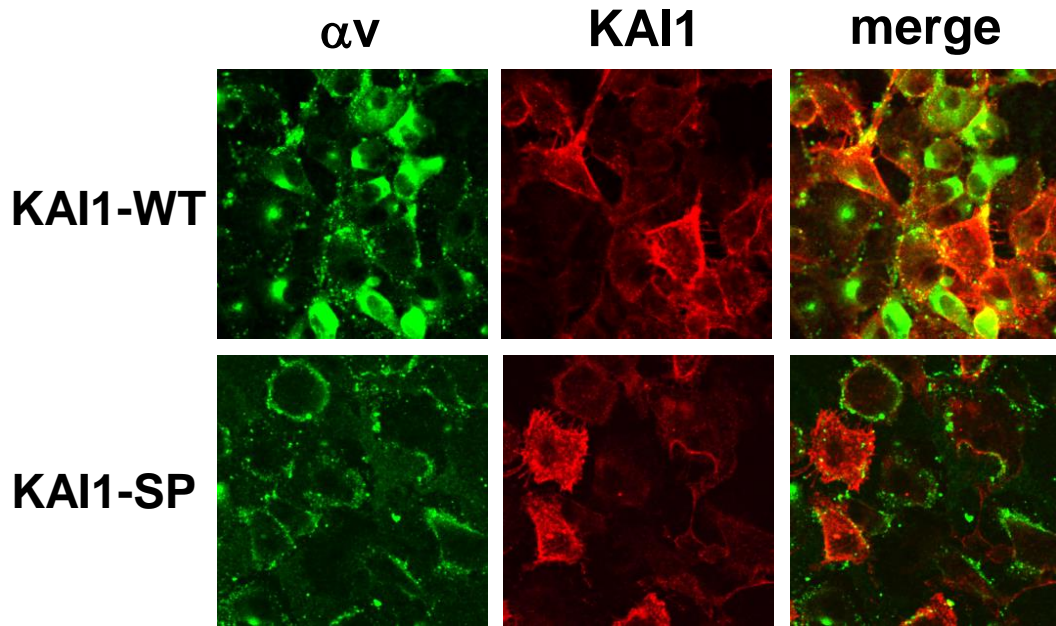
5.4 Untersuchung zur Kollokalisierung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit dem Integrin $\alpha\beta 3$

Oftmals gehen funktionelle Wechselwirkungen zwischen zwei Protein-Partnern mit deren zellulärer Kollokalisierung einher. Deshalb wurde in vorliegender Dissertation untersucht, ob das KAI1-Protein mit der α -Integrin-Untereinheit und dem $\alpha\beta 3$ -Integrin auf der Membran kollokalisierte. Hierfür wurden immunzytochemische Doppelfärbungen an KAI1-WT- und KAI1-SP-Transfektanten der Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 durchgeführt.

Die Zellen wurden simultan mit einem KAI1- und einem α - bzw. $\alpha\beta 3$ -spezifischen AK inkubiert. Die Primär-AK wurden entweder mit Alexa 488- (*grün*) oder mit Alexa 568- (*rot*) konjugierten Sekundär-AK detektiert und am CLSM visualisiert. In der *Merge*-Darstellung (*gelb*) zeigten sich kollokalisierte Expressionsstellen der beiden Antigene. Unbehandelte Zellen dienten als Maß der Autofluoreszenz. Zum Ausschluss unspezifischer Bindung des Sekundär-AK wurden Zellen in Abwesenheit des Primär-AK nur mit dem Sekundär-AK inkubiert.

MDA-MB-231-Zellen zeigten auf ihrer Zelloberfläche eine signifikante Kollokalisierung von KAI1-WT mit sowohl $\alpha\beta 3$ als auch dessen α -Untereinheit. KAI1-SP dagegen zeigte in beiden Fällen keine Kollokalisierung. In MDA-MB-435-Zellen war dieser Effekt weniger ausgeprägt, aber ebenso erkennbar (Abb. 11) (Miller et al., 2018). Dies bedeutet, dass das KAI1-WT-Protein in beiden Zelllinien mit $\alpha\beta 3$ kollokalisierte, während dies für Zellen, die KAI1-SP überexprimierten, nicht der Fall war.

MDA-MB-231



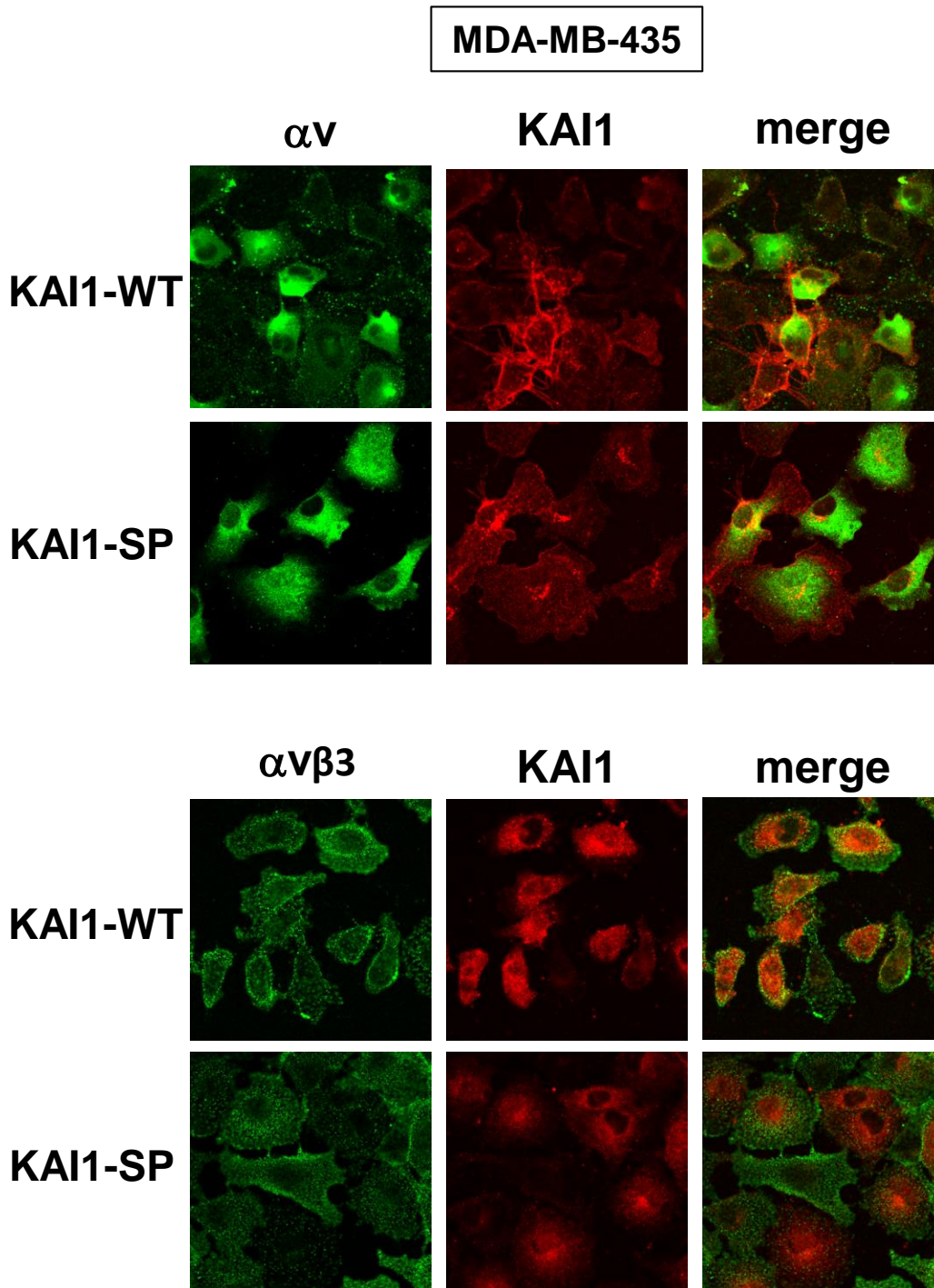


Abbildung 11: Untersuchung der Kolo-kalisierung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit der Integrin-Untereinheit αV und dem Integrin $\alpha V\beta 3$

Die Beurteilung der Kolo-kalisierung von $\alpha V\beta 3$ mit KAI1-WT bzw. KAI1-SP in stabil transfizierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen fand durch immunzytochemische Doppelfärbung statt. Die Auswertung entstand am CLSM. Dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzbilder. Die αV - bzw. $\alpha V\beta 3$ -Expression wurde in *grün* (488 nm), die KAI1-Expression in *rot* (568 nm) dargestellt. In der *Merge*-Darstellung zeigten sich übereinstimmende Verteilungsmuster der beiden Oberflächenproteine in *gelb* (Miller et al., 2018).

5.5 Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die $\alpha\beta 3$ /Vitronektin-vermittelte zelluläre Adhäsionskapazität

Des Weiteren untersuchten wir die Auswirkungen einer Wiedereinführung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Adhäsion der MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen. Hierfür wurden die Zellen für 90 Min auf unbeschichteten bzw. mit VN beschichteten 96-Well-Zellkulturplatten zur Adhäsion gebracht. Die zelluläre Adhäsionsstärke wurde mittels chromogenem Hexosaminidase-Assay am Spektralphotometer bestimmt. Die Adhäsionsstärke der wt-Zellen auf unbeschichteter Oberfläche wurde jeweils auf „1“ gesetzt und die anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

In beiden Zelllinien zeigte sich im Vergleich zur Adhäsion auf unbeschichteten Wachstumsflächen in Anwesenheit von VN eine deutliche Erhöhung der zellulären Adhäsion. Einzige Ausnahme davon waren KAI1-WT-Transfektanten der Zelllinie MDA-MB-435, bei welchen kein signifikanter Unterschied zwischen An- und Abwesenheit von VN bestand (Miller et al., 2018).

In beiden Zelllinien rief KAI1-SP eine signifikante Verstärkung der zellulären Adhäsion insbesondere auf VN hervor. In MDA-MB-231-Zellen zeigte sich verglichen mit wt-Zellen auf unbeschichteter Wachstumsfläche eine ca. 8,3-fach erhöhte Adhäsionskapazität in Anwesenheit und eine ca. 4,8-fach erhöhte Adhäsionskapazität in Abwesenheit von VN. In MDA-MB-435-Zellen fand sich durch die Expression von KAI1-SP eine ca. 3-fache Erhöhung adhärenter Zellen auf VN-beschichteten Zellkulturplatten und eine ca. 2,7-fache Erhöhung auf unbeschichteter Wachstumsfläche. Auch KAI1-WT-transfizierte Zellen zeigten verglichen mit den wt-Zellen in beiden Zelllinien eine verstärkte Adhäsion in An- bzw. Abwesenheit von VN. Nur bei KAI1-WT-transfizierten MDA-MB-435-Zellen konnte in Anwesenheit von VN kaum ein Unterschied zu wt-Zellen beobachtet werden (Abb. 12) (Miller et al., 2018).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in MDA-MB-435-Zellen, welche endogen einen signifikant geringeren Gehalt an $\alpha\beta 3$ in der wt-Form aufwiesen, die Unterschiede in der Auswirkung auf die zelluläre Adhäsionskapazität weniger ausgeprägt waren als in MDA-MB-231-Zellen mit höherer endogener $\alpha\beta 3$ -Expression. Des Weiteren geht die Beobachtung, dass KAI1-SP im Vergleich zu KAI1-WT eine erhöhte $\alpha\beta 3$ -Expression induzierte, mit der jeweils höchsten Adhäsion in Anwesenheit von VN einher.

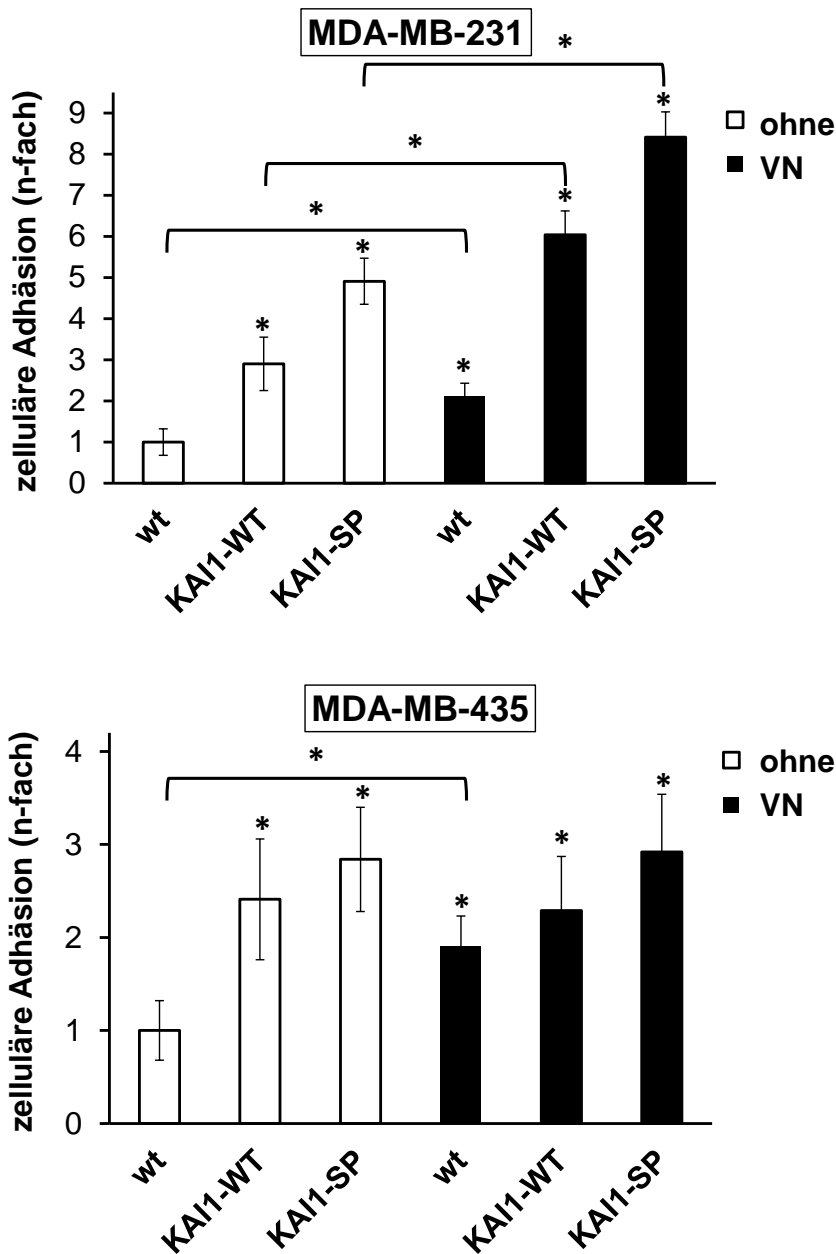


Abbildung 12: Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre $\alpha\beta 3$ -VN-vermittelte Zelladhäsionskapazität

Untersucht wurden KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Zelltransfektanten der beiden Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 auf ihre Adhäsionskapazität in Abwesenheit (ohne) und in Anwesenheit von VN als Adhäsionssubstrat. Die Adhäsionsstärke von wt-Zellen auf unbeschichteten Zellkulturplatten wurde auf „1“ gesetzt und alle anderen Daten jeweils dazu ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 unabhängigen, repräsentativen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) verglichen mit entsprechenden wt-Zellen auf unbeschichteten Wachstumsflächen sind mittels Asterisk gekennzeichnet. Ebenso sind statistisch signifikante Ergebnisse beim Vergleich einer Zelltransfektante in An- oder Abwesenheit von VN mit einem Asterisk versehen (Miller et al., 2018).

5.6 Adhäsionsprofil auf verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen

Im Folgenden untersuchten wir das Adhäsionsprofil der MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen, die auf verschiedenen EZM-Proteinen (VN, FN, Coll I und IV) zur Adhäsion gebracht wurden. Die wt-Zellen wurden für 90 Min auf unbeschichteten bzw. auf mit den zu untersuchenden EZM-Proteinen beschichteten 96-Well-Zellkulturplatten kultiviert und die Anzahl adhärenter Zellen mittels chromogener Adhäsionsversuchen quantifiziert. Um die Rolle des Integrins $\alpha\beta3$ in der Adhäsion an die verschiedenen EZM-Proteine zu bestimmen, wurde in einem weiteren Versuchsansatz das $\alpha\beta3$ -bindende zyklische Peptid cRGDfV als Bindungskompetitor zugegeben. Zur Kontrolle verwendeten wir das zyklische Peptid cRADfV, welches nicht an $\alpha\beta3$ oder irgendein anderes Integrin zu binden vermochte. Die Anzahl adhärenter Zellen auf unbeschichteten Wachstumsflächen, ohne Zugabe eines der beiden Peptide, wurde auf „1“ gesetzt und alle weiteren Daten dazu ins Verhältnis gesetzt.

Auf allen vier EZM-Proteinen zeigte sich verglichen mit Zellen, die auf unbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert wurden, eine signifikante Verdoppelung der zellulären Adhäsionskapazität. Die Zugabe des kompetitiven Peptids cRGDfV führte zu einer deutlichen Hemmung der zellulären Adhäsionsstärke von MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen auf VN. Auf allen anderen EZM-Proteinen konnte keine hemmende Wirkung durch Zugabe von cRGDfV nachgewiesen werden. Die Zugabe des Kontrollpeptids cRADfV zeigte auf keinem der getesteten EZM-Proteine eine Veränderung der Adhäsionskapazität (Abb. 13) (Miller et al., 2018). Dies lässt vermuten, dass das Integrin $\alpha\beta3$ eine entscheidende Rolle im Prozess der VN-vermittelten zellulären Adhäsion der beiden Zelllinien spielt.

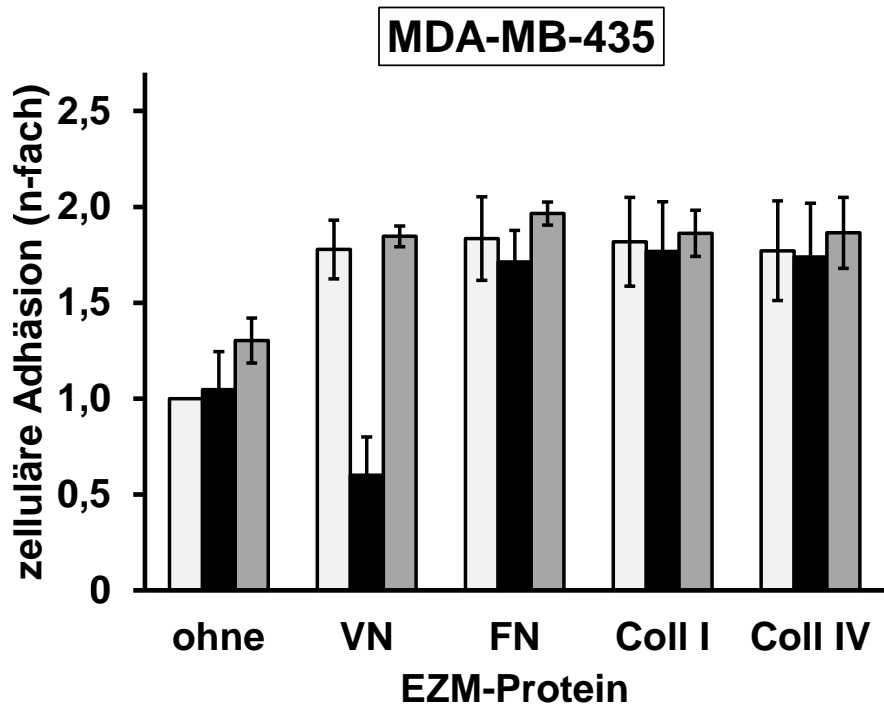
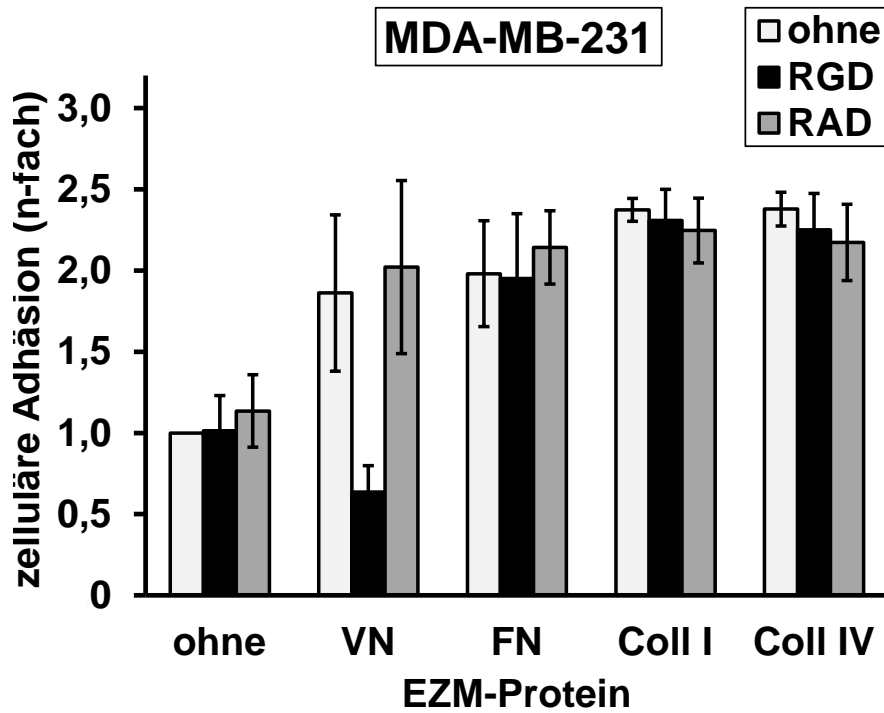


Abbildung 13: Adhäsionsprofil nach Kultivierung auf verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen

Es wurden Adhäsionsuntersuchungen in Abwesenheit (ohne) und in Anwesenheit verschiedener EZM-Proteine (VN, FN, Coll I und Coll IV) durchgeführt. In weiteren Versuchen wurde das spezifische $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -bindende cRGDfV-Peptid als Bindungskompetitor zugegeben und der $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -abhängige Effekt der zellulären Adhäsion der Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 untersucht. Zur Kontrolle diente die Zugabe des cRADfV-Peptids, welches Integrine nicht zu binden vermochte. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 bzw. 4 unabhängigen, repräsentativen Experimenten. Die Adhäsionsstärke auf unbeschichteter Wachstumsfläche und ohne Zugabe eines der beiden Peptide wurde jeweils auf „1“ gesetzt und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt (Miller et al., 2018).

5.7 Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Expression der aktivierten *Focal Adhesion Kinase*

In der Signalkaskade von Integrinen, so auch des $\alpha\beta3$, spielt die Kinase FAK eine essentielle Rolle als Signalmolekül. Um die zelluläre Phosphorylierung als Maß der Aktivierung von FAK als Funktion der beiden KAI1-Proteine in MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen zu bestimmen, führten wir immunzytochemische Untersuchungen durch. Die Zellen wurden mit einem gegen phosphoryliertes FAK (p-FAK) gerichteten mAK gefärbt und dessen Bindung mit dem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG detektiert. Die Auswertung der erhaltenen Fluoreszenzsignale erfolgte mittels CLSM. Als Kontrolle dienten VEC-transfizierte Zellen. Zellen, die nur mit Sekundär-AK inkubiert wurden dienten als Kontrolle unspezifischer AK-Bindung und waren negativ.

In MDA-MB-231-Zellen bewirkte KAI1-SP signifikant erhöhte p-FAK-Spiegel auf das etwa 2,5-fache sowie eine deutliche Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe. Dagegen zeigte sich in KAI1-WT-, VEC-transfizierten und wt-Zellen eine niedrige Expression von p-FAK mit diffusem Färbemuster, ohne Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe. Alle MDA-MB-435-Zellen zeigten eine untereinander vergleichbare p-FAK-Expression. In Zellen, welche KAI1-SP exprimierten, konnte jedoch die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe beobachtet werden. KAI1-WT-, VEC-transfizierte und wt-Zellen zeigten ein diffuses immunzytochemisches Färbemuster (Abb. 14) (Miller et al., 2018). Dies bedeutet, dass die Expression von KAI1-SP zur Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe führte. In MDA-MB-231-Zellen, die endogen signifikant mehr $\alpha\beta3$ in ihrer wt-Form enthielten, kam es dazuhin unter KAI1-SP-Expression zu einem signifikant erhöhten p-FAK-Spiegel im Vergleich zu KAI1-WT-, VEC-transfizierten und wt-Zellen.

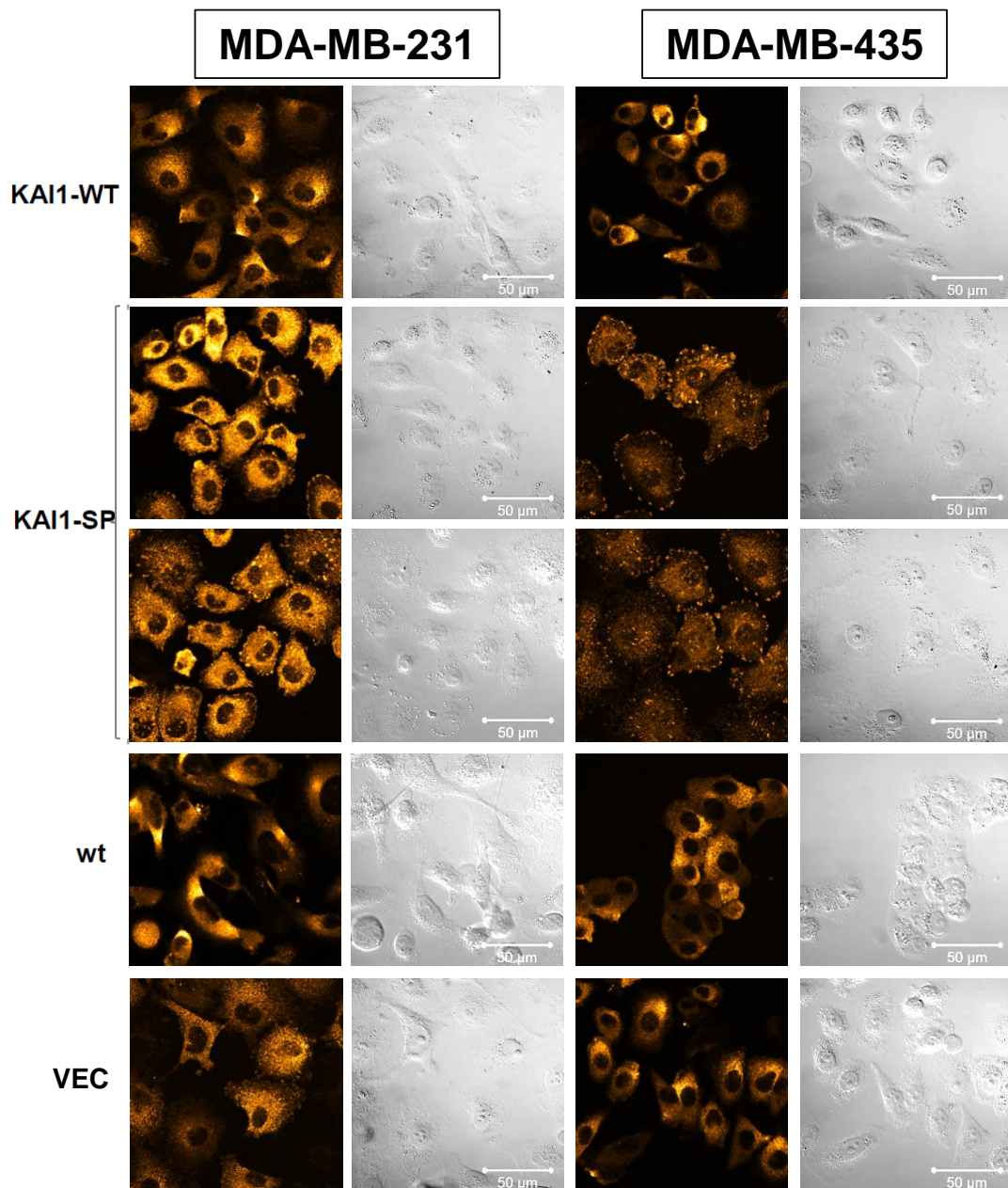


Abbildung 14: Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Expression von p-FAK

Zur Darstellung der Expression und zellulären Verteilung von p-FAK wurden immunzytochemische Untersuchungen von stabil transfizierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen, die an VN zur Adhärenz gebracht wurden, durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität wurde am CLSM detektiert und farblich dargestellt: niedrige Intensität in *orange*, mittlere Intensität in *gelb*, hohe Intensität in *weiß*. Ein repräsentatives Fluoreszenzbild ist jeweils neben dem zugehörigen Interferenzkontrastbild abgebildet (Miller et al., 2018).

5.8 Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Proliferationsaktivität

Das ungehemmte Wachstum ist eine der bedeutendsten Eigenschaften von Tumorzellen. Zur Untersuchung des Effekts einer Wiedereinführung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Proliferationsaktivität humaner Mammakarzinomzellen wurde die Methode der Zellzählung angewandt. Hierfür wurden die Zellen auf unbeschichteten 24-Well-Zellkulturplatten kultiviert und zeitabhängig die Menge vitaler Zellen ermittelt. Die Zellzahl nach 3h, wenn die zelluläre Adhäsion voll ausgeprägt war, wurde jeweils auf „1“ gesetzt und die Erhöhung der Zellzahl nach 24, 48, 72, 96 und 120 h dazu ins Verhältnis gesetzt.

MDA-MB-231-Zellen zeigten in Abhängigkeit von der Expression von KAI1-SP eine bis zu 8,1-fach erhöhte Zellzahl. Als Funktion von KAI1-WT war die Zellzahl nach 120 h bis zu 3-fach erhöht. VEC-Transfektanten sowie wt-Zellen wiesen eine bis zu ca. 4,5-fache Erhöhung der Zellzahl auf. Auch MDA-MB-435-Zellen zeigten in Abhängigkeit einer KAI1-SP-Expression eine bis zu 5,9-fach, in Abhängigkeit einer KAI1-WT-Expression eine bis zu 2,9-fach erhöhte Zellzahl. VEC- und wt-Zellzahlen stiegen auf das ca. 4-fache an (Abb. 15) (Miller et al., 2018).

Dies deutete darauf hin, dass die untersuchten Zellen durch die Expression von KAI1-SP eine signifikant höhere Wachstumstendenz aufwiesen als wt- und VEC-Zellen. Durch Wiedereinführung von KAI1-WT zeigte sich eine signifikant erniedrigte Proliferationsaktivität verglichen mit wt- und VEC-Zellen.

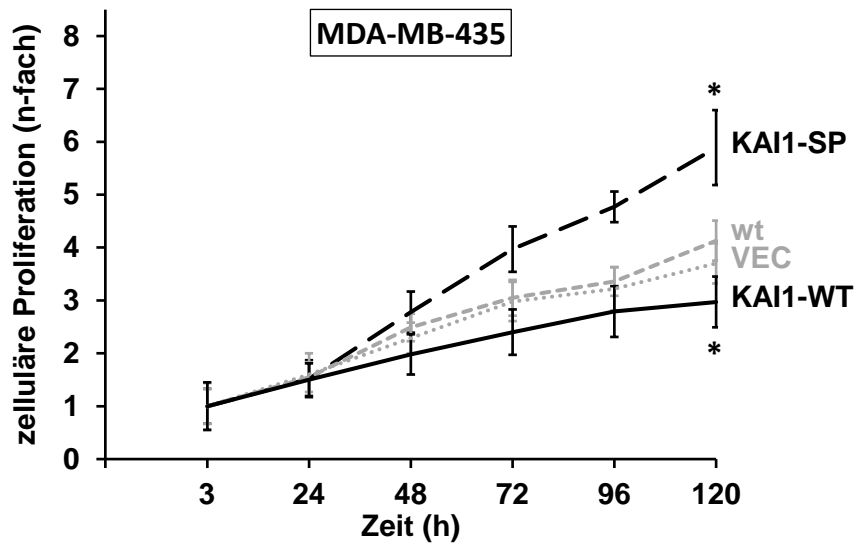
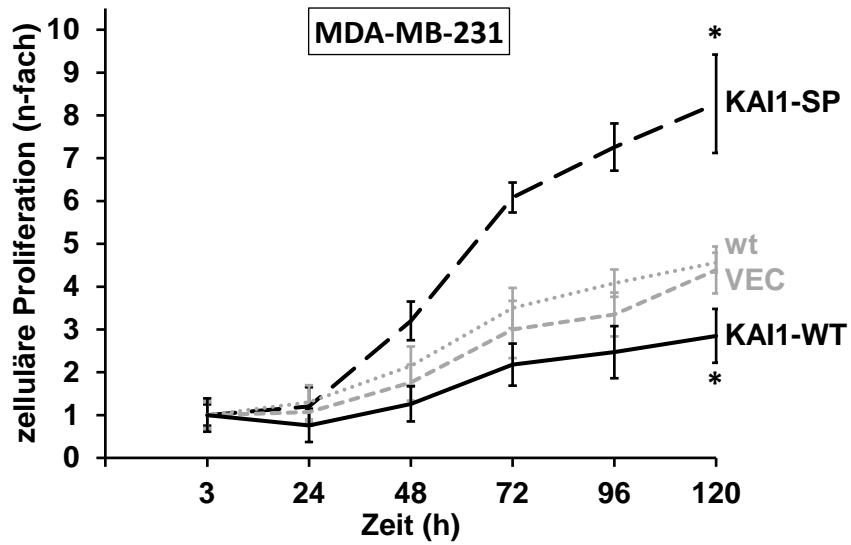


Abbildung 15: Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Proliferationsaktivität

Die Auswirkungen der KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expression auf die Proliferation der stabil transfizierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen wurde mittels Zellzählung über eine Kultivierungszeit von 120 h ermittelt. Die mittlere Zellzahl nach 3 h, zum Zeitpunkt der voll ausgeprägten zellulären Adhäsion, wurde jeweils auf „1“ gesetzt. Alle weiteren Daten wurden darauf normalisiert. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichung 3σ unabhängiger, repräsentativer Versuchsdurchführungen. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellzahlen nach 120 h verglichen mit den entsprechenden wt-Zellen sind mittels Asterisk gekennzeichnet (Miller et al., 2018).

5.9 Expression und zelluläre Distribution des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors als Funktion der Expression der beiden KAI1-Varianten

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGF-R ist maßgeblich an der Proliferation von Karzinomzellen und somit am Prozess der Tumorentstehung, Tumorprogression und Metastasierung beteiligt. Ebenso ist bekannt, dass der EGF-R und seine Signalwege von Integrinen reguliert werden können (Cabodi et al., 2004). Deshalb untersuchten wir, ob die Effekte der KAI1-Protein-Expression auf die zelluläre Proliferation in Verbindung mit Veränderungen der EGF-R-Expression standen. Hierfür wurden die Zellen mit einem gegen EGF-R gerichteten mAK und anschließend mit einem sekundären Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG inkubiert. Die Auswertung der Fluoreszenzsignalintensität fand am CLSM und am FACS-Gerät statt. VEC-transfizierte und wt-Zellen dienten als Kontrollen für endogene Expressionsspiegel des EGF-R. Als Kontrolle unspezifischer AK-Bindung dienten Zellen, die nur in Anwesenheit eines Zweit-AK inkubiert wurden und negativ waren.

MDA-MB-435-Zellen zeigten in ihrer wt-Form einen ca. 3-fach höheren endogenen EGF-R-Gehalt als MDA-MB-231-Zellen (Miller et al., 2018). Die Expression von KAI1-SP führte verglichen mit VEC-transfizierten Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der EGF-R-Expression. Immunzytochemische Analysen ergaben für KAI1-SP-Transfektanten der MDA-MB-231-Zelllinie eine signifikante Erhöhung auf das ca. 4- bis 5-fache und der MDA-MB-435-Zelllinie auf das ca. 1- bis 2-fache. KAI1-WT- und VEC-transfizierte Zellen zeigten in beiden Zelllinien vergleichbare EGF-R-Spiegel (Abb. 16A) (Miller et al., 2018). FACS-Studien zeigten in beiden Zelllinien bei Expression von KAI1-SP eine Erhöhung der EGF-R-Expression auf das ca. 1,5-fache (Abb. 16B).

Da bekannt ist, dass der EGF-R unter bestimmten Umständen auch internalisiert wird, ermittelten wir den Anteil von zelloberflächenständigem EGF-R am Gesamtgehalt der Zellen als Funktion der Expression von KAI1-WT und KAI1-SP. Hierfür wurde die EGF-R-Expression mittels FACS-Analyse parallel an vitalen vs. fixierten Zellen bestimmt. Fixierte und somit permeabilisierte Zellen lieferten eine Aussage über den repräsentativen intra- und extrazellulären Gesamtgehalt an EGF-R. Färbungen auf vitalen Zellen repräsentierten das zelloberflächenständige EGF-R. Dies erlaubte es uns, den Anteil des internalisierten EGF-R als Funktion der KAI1-Expression zu berechnen.

In MDA-MB-231-Zellen fand sich der größte Anteil des zellulär exprimierten EGF-R auf der Zelloberfläche (Abb. 17). Vitale MDA-MB-231-Zellen zeigten bei Wiedereinführung von KAI1-WT eine leicht reduzierte Menge an EGF-R auf der Zelloberfläche (ca. 80%), wohingegen

KAI1-SP- und wt-Zellen 92, bzw. 97% des Gesamt-EGF-R extrazellulär exprimierten (Miller et al., 2018). MDA-MB-435-Zellen wiesen einen geringeren Anteil an EGF-R auf der Zelloberfläche auf (62-65%). Deren Transfektanten verhielten sich untereinander vergleichbar (Abb. 17).

Dies zeigt, dass die Expression des EGF-R durch die Ausprägung von KAI1-SP signifikant erhöht wurde. In MDA-MB-231-Zellen ließ sich durch die Expression von KAI1-WT verglichen mit KAI1-SP-transfizierten oder wt-Zellen ein EGF-R internalisierender Effekt vermuten. Dies bestärkte die Theorie, dass KAI1 eine bedeutende Rolle in der Membranorganisation spielt.

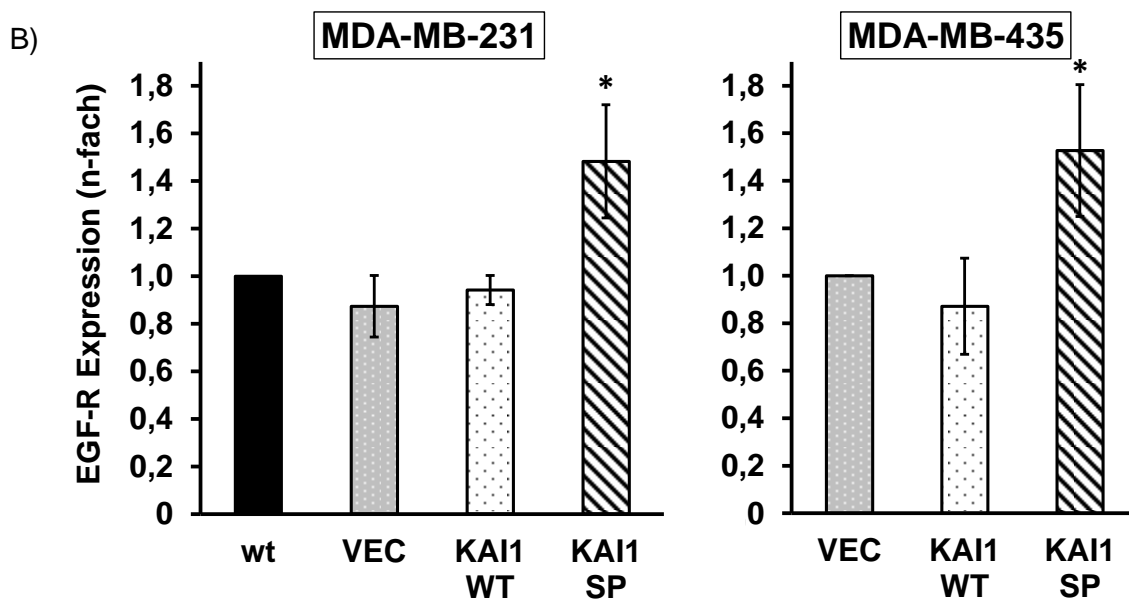
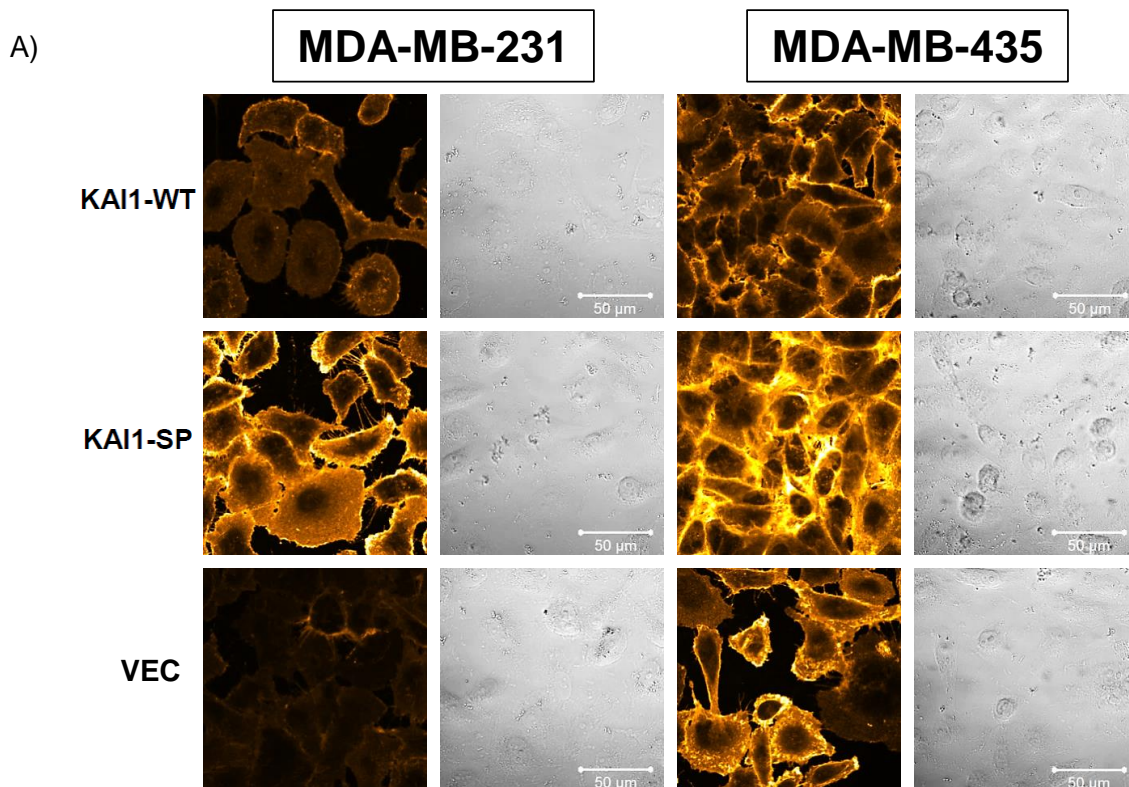


Abbildung 16: Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Expression von EGF-R

Die zellulären Expressionshöhen des EGF-R in stabil transfizierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen wurden mittels ICC und FACS-Analyse als Funktion der KAI1-Expression bestimmt.

- A) ICC: Abgebildet sind repräsentative Fluoreszenz- und entsprechende Interferenzkontrastbilder. Die Fluoreszenzintensität wurde am CLSM ermittelt und farblich dargestellt: niedrige Intensität in *orange*, mittlere Intensität in *gelb*, hohe Intensität in *weiß* (Miller et al., 2018).
- B) FACS: Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 6 bzw. 3 unabhängigen, repräsentativen FACS-Analysen. Die Expressionshöhe der wt- bzw. VEC-transfizierten Zellen wurde auf „1“ gesetzt und alle übrigen Daten dazu ins Verhältnis gesetzt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) verglichen mit wt- bzw. VEC-transfizierten Zellen sind mittels Asterisk gekennzeichnet.

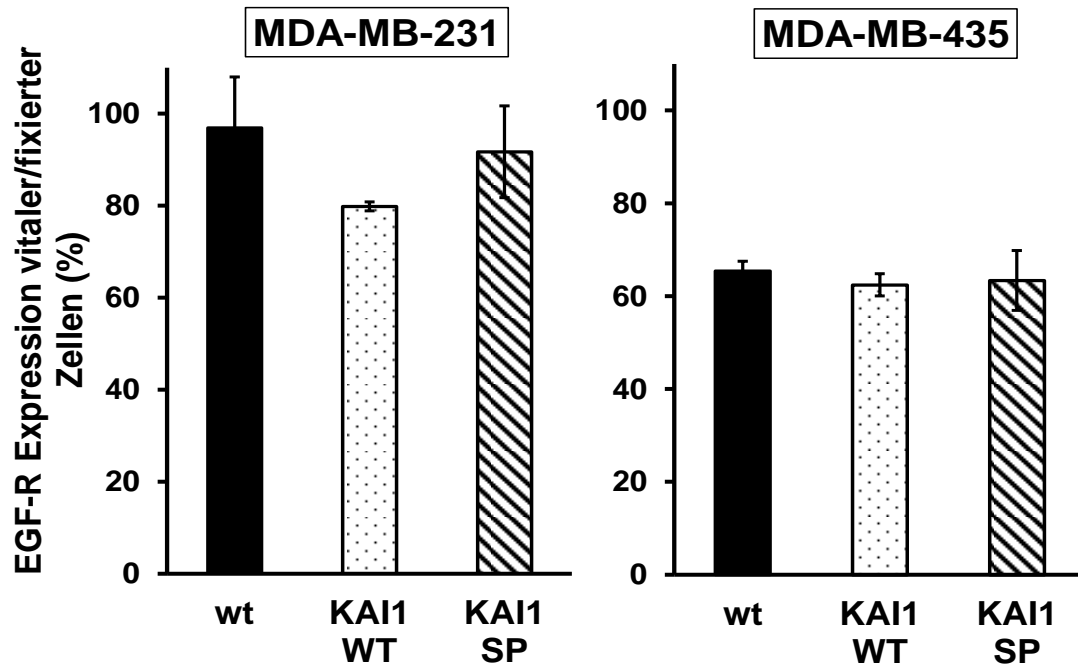


Abbildung 17: Beeinflussung der zellulären Distribution des EGF-R als Funktion der Expression von KAI1-WT und KAI1-SP

Der membranständige Anteil des EGF-R im Verhältnis zur zellulären Gesamtexpression als Funktion der beiden KAI1-Proteine der stabil transfizierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Fixierte Zellen gaben Aussage über die repräsentative zelluläre Gesamtexpression des EGF-R, vitale Zellen über den oberflächenständigen Anteil. Abgebildet sind Mittelwerte +/- Standardabweichung des membranständigen EGF-R von 2 unabhängigen, repräsentativen Experimenten, in Prozent der Gesamtexpression.

5.10 Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die transkriptionelle Regulation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors

Im Folgenden ermittelten wir die EGF-R-Promotoraktivität, um zu untersuchen ob die Effekte von KAI1-WT und KAI1-SP auf die EGF-R-Proteinexpression auch unter transkriptioneller Kontrolle standen. Dafür transfizierten wir Zellen mit einem Firefly-Luziferase-Reporterplasmid, in welches der EGF-R-Promotor einkloniert war. Zur Kontrolle der Transfektionseffektivität wurden die Zellen mit einem Renilla-Luziferase-Plasmid kotransfiziert. Die Messung der relativen Lichteinheiten fand am Lumat³ LB9508 statt. Die relative EGF-R-Promotoraktivität wurde als Quotient der relativen Lichteinheiten nach Spaltung von Luziferin durch die unter der Kontrolle des EGF-R-Promotors entstandene Luziferase und der durch das Kontrollplasmid konstitutiv gebildeten Renilla-Luziferase-Aktivität ermittelt (Lössner et al., 2008).

In MDA-MB-231-Zellen zeigte sich durch die Expression von KAI1-SP im Vergleich zu VEC-transfizierten oder wt-Zellen eine signifikante Erhöhung der EGF-R-Promotoraktivität um 70%, während in MDA-MB-435-Zellen nur ein kleiner, nicht signifikanter Anstieg in Abhängigkeit von KAI1-SP zu verzeichnen war. Im Gegensatz dazu führte eine Erhöhung der KAI1-WT-Expression zu keiner relevanten Veränderung (Abb. 18) (Miller et al., 2018).

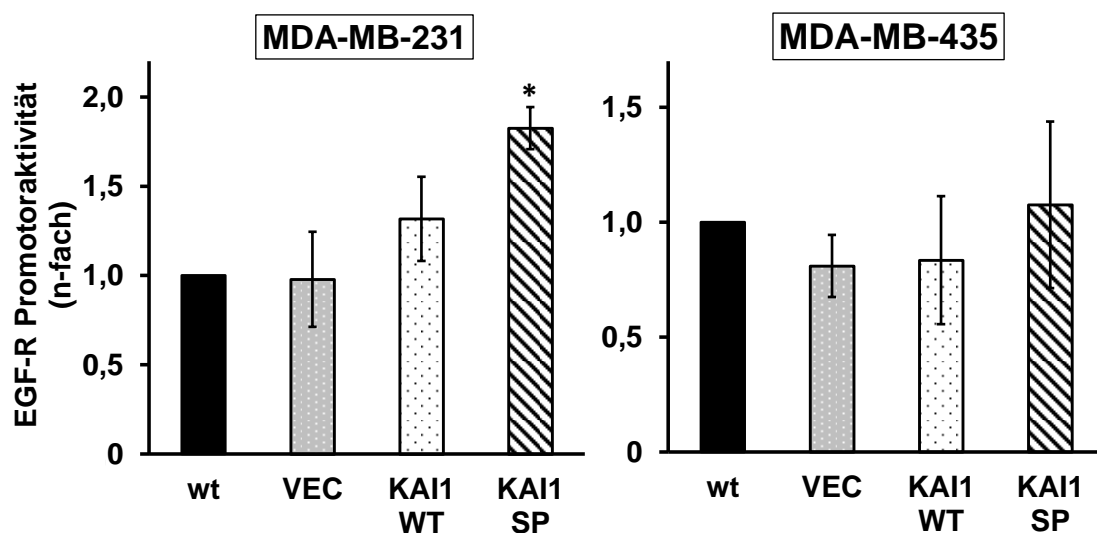


Abbildung 18: Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die transkriptionelle Regulation des EGF-R

Bestimmung der EGF-R-Promotoraktivität als Funktion der beiden KAI1-Proteine nach transienter Transfektion der MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zelllinie mittels dualem Luziferase-Reporterplasmid-System. Bestimmung der relativen Promotoraktivität als Quotient der relativen Lichteinheiten nach Spaltung von Luziferin durch die unter der Kontrolle des EGF-R-Promotors entstandene Luziferase und der durch das Kontrollplasmid konstitutiv gebildeten Renilla-Luziferase-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 bzw. 4 unabhängigen, repräsentativen Untersuchungen. Die relative Promotoraktivität der wt-Zellen wurde jeweils auf „1“ gesetzt und die entsprechenden Ergebnisse dazu ins Verhältnis gesetzt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) verglichen mit der relativen Promotoraktivität der wt-Zellen sind mittels Asterisk gekennzeichnet (Miller et al., 2018).

5.11 Effekt einer EGF-Stimulation auf die Zellproliferation von KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Transfektanten

Da die Expression von KAI1-SP die zelluläre Proliferationsaktivität und die Expression des EGF-R in den Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 verstärkte, untersuchten wir mittels Zellzählung, ob die zelluläre Proliferation durch die Zugabe von EGF sogar weiter erhöht werden könnte. Hierfür wurden die Zellen auf unbeschichteten 24-Well-Zellkulturplatten in Abwesenheit von FCS kultiviert, anschließend mit EGF stimuliert und nach 72 h die Zahl vitaler Zellen ermittelt. Die Zellzahl vor Stimulation mit EGF wurde auf „1“ gesetzt und alle weiteren Daten dazu ins Verhältnis gesetzt. Zur Kontrolle dienten Zellen ohne EGF-Zugabe, welche nach 72 h keine wesentlich erhöhte Zellzahl zeigten.

Tatsächlich zeigte sich durch KAI1-SP-Expression eine verstärkte Proliferationsaktivität in Anwesenheit von EGF (1,8- bzw. 2,9-fache Erhöhung der Zellzahl in Anwesenheit, 1,2- bzw. 1,9-fache Erhöhung in Abwesenheit von EGF in MDA-MB-231- bzw. MDA-MB-435-Zellen). Bei KAI1-WT-überexprimierenden Zellen konnte keine Proliferationssteigerung durch EGF beobachtet werden. In MDA-MB-435-Zellen zeigten auch VEC-transfizierte Zellen eine zusätzliche proliferative Antwort in Anwesenheit von EGF (Abb. 19) (Miller et al., 2018).

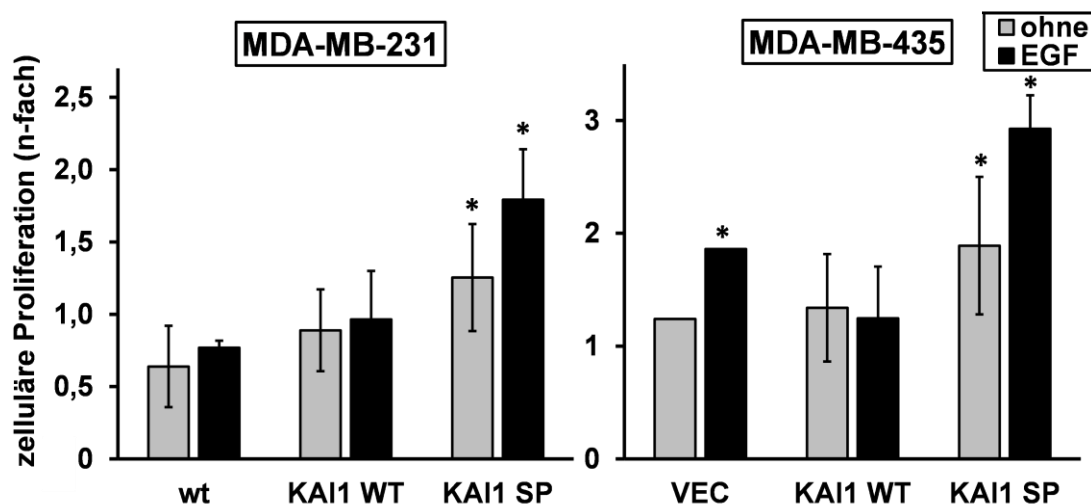


Abbildung 19: Effekt einer EGF-Stimulation auf die Zellproliferation von KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Zelltransfektanten

Um eine EGF-Abhängigkeit der zellulären Proliferation der stabil transfizierten MDA-MB-231- und -435-Zellen als Funktion der beiden KAI1-Proteine zu untersuchen, wurden EGF-stimulierte Zellzählungen durchgeführt. Die Zellzahl vor EGF-Stimulation wurde jeweils auf „1“ gesetzt und die entsprechenden Zellzahlen nach 72 h der Kultivierung dazu ins Verhältnis gesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Zugabe von EGF. Abgebildet sind Mittelwerte +/- Standardabweichung 3er unabhängiger, repräsentativer Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mittels Asterisk gekennzeichnet (Miller et al., 2018).

6 Diskussion

Der Entstehung maligner Tumorerkrankungen sowie deren Metastasierung liegen Veränderungen zahlreicher physiologisch bedeutender zellulärer Funktionen zugrunde (Berger et al., 2005; Woodhouse et al., 1997). Diese können mitunter von Tumor- oder Metastasierungssuppressoren anti-tumorigen beeinflusst werden. Dementsprechend begünstigt eine herabgesetzte Aktivität oder ein Verlust der Suppressoren in der Tumorzelle die Tumorprogression und die Entstehung von Metastasen (Ichikawa, 1991; Smith & Theodorescu, 2009).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der putative Metastasierungssuppressor, das Tetraspanin KAI1, in seiner zellbiologischen Funktion bezüglich tumorzellbiologisch relevanten Prozessen, die das Integrin $\alpha\beta 3$ und den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R) betreffen, untersucht. Die exakten Mechanismen und zugrundeliegenden Signalwege, welcher sich KAI1 bedient, um seine metastasierungssuppressiven Funktionen zu erlangen, sind bislang noch nicht endgültig geklärt. Als Transmembranprotein verfügt es erstaunlicherweise über keinerlei intrinsische Aktivität. Es interagiert jedoch mit einer Vielzahl unterschiedlicher Zelloberflächen- und Zytoplasmaproteinen, wodurch einerseits die Interaktionen verschiedener Proteine untereinander und deren Funktionen sowie andererseits die Organisation und Verteilung multimolekularer Proteinkomplexe innerhalb der Zellmembran beeinflusst werden (Charrin et al., 2009; Hemler, 2005; Tonoli & Barrett, 2005). Sowohl die Signalweiterleitung über die Zellmembran hinweg, als auch die funktionelle Verbindung zu extra- und intrazellulären Proteinen, bei welcher KAI1 als sog. *Transmembran-Linker* fungiert, gehören zu den koordinativen Aufgaben von KAI1 (Stipp et al., 2003).

Zu den bedeutendsten Interaktionspartnern dieses Tetraspanins zählen die Adhäsions- und Signaltransduktionsrezeptoren der Integrin-Familie, darunter $\alpha\beta 3$ (Ruseva et al., 2009), sowie der EGF-R (Odintsova et al., 2000). Sowohl Integrine als auch der EGF-R beeinflussen ebenso bedeutende tumorzellbiologische Prozesse und deren Expression, Verteilung und Aktivität kann durch KAI1 moduliert werden (Berditchevski & Odintsova, 1999; Danglot et al., 2010; Liu & Zhang, 2006; Miranti, 2009; Odintsova et al., 2000; Odintsova et al., 2013; Ruseva et al., 2009; Sugiura & Berditchevski, 1999; Upheber et al., 2015).

In vielen Arten von Karzinomen, wie des Mammakarzinoms, findet sich ein Funktionsverlust von KAI1 (Phillips et al., 1998; Yang et al., 1997). Dies geht mit einer schlechten Prognose bezüglich des rezidivfreien Patientenüberlebens und der Progressionstendenz des Tumors einher, wohingegen eine hohe KAI1-Expression mit einer guten Krankheitsprognose

vergesellschaftet ist (Adachi et al., 1996; Guo et al., 1996; Hinoda et al., 1998; Houle et al., 2002; Huang et al., 1998; Ichikawa et al., 1992; Jackson et al., 2000a; Liu et al., 2001; Liu et al., 2000; Liu et al., 2003a; Liu et al., 2003b; Maurer et al., 1999; Sho et al., 1998; Takaoka et al., 1998b; Wu et al., 2004). Die experimentelle Wiedereinführung von KAI1 in Tumorzellen führte *in-vitro* und *in-vivo* zu einer Suppression pro-metastatischer zellulärer Funktionen sowie der Metastasierung selbst (Hemler, 2003; Jackson et al., 2000a; Jee et al., 2007; Shinohara et al., 2001b; Sridhar & Miranti, 2006; Takaoka et al., 1998a; Xu et al., 2008; Yang et al., 2001; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2003b). Bei metastasierter Karzinomkrankung konnte eine Splice-Variante des KAI1-Proteins (KAI1-SP) als mögliche Ursache des Funktionsverlusts von KAI1 nachgewiesen werden. KAI1-SP fehlt das gesamte Exon 7 und damit der distale Teil der großen extrazellulären Schleife (ECL2) sowie der proximale Teil der vierten Transmembrandomäne (TMD). KAI1-SP ist assoziiert mit einem gesteigerten proinvasiven tumorzellulären Potential, mit einem stimulierenden Effekt auf die Metastasierung sowie mit einer schlechten Prognose der betroffenen Tumorpatienten (Lee et al., 2003).

In vorliegender Arbeit untersuchten wir, ob differentielle zellbiologische Funktionen von KAI1 versus seiner Splice-Variante bezüglich tumorzellbiologisch relevanter Ereignisse zu verzeichnen sind. Der Fokus lag auf der Modulierung der zellulären Adhäsion und Proliferation und in diesem Zusammenhang auf der funktionellen Wechselwirkung mit seinen Interaktionspartnern $\alpha\beta 3$ und dem EGF-R. Hierfür etablierten wir ein vermeintliches Mammakarzinomzellmodell der Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435, welche nach stabiler Transfektion eine erhöhte Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP aufwiesen.

6.1 Die Bedeutung der funktionellen Verbindung des Integrins $\alpha\beta 3$ mit KAI1-WT bzw. KAI1-SP für die zelluläre Adhäsion und Migration

6.1.1 Die Expression von KAI1-SP führt im Vergleich zu KAI1-WT zu einer erhöhten $\alpha\beta 3$ -Expression

Integrine, unter anderem $\beta 1$ -Integrine zählen zu den bedeutendsten Interaktionspartnern des Tetraspanins KAI1. Das Integrin $\alpha\beta 3$ wurde vor 10 Jahren als neuer Interaktionspartner von KAI1 in humanen Ovarialkarzinomzellen identifiziert (Ruseva et al., 2009). Durch $\alpha\beta 3$ übt KAI1 etliche tumorbiologisch bedeutende Effekte aus.

Wir untersuchten die differentiellen Effekte von KAI1-WT vs. KAI1-SP auf die Expression des Integrins $\alpha\beta 3$. In humanen MDA-MB-435-Zellen steigerte die Expression von KAI1-SP die $\alpha\beta 3$ -Expression deutlich, wohingegen sie verglichen mit VEC-transfizierten Zellen und durch die Expression von KAI1-WT nur unwesentlich erhöht wurde. In humanen MDA-MB-231-Zellen zeigte sich dagegen, dass sowohl KAI1-WT als auch KAI1-SP zu einer erniedrigten Expression von $\alpha\beta 3$ führten, wobei diese trotzdem in KAI1-SP-Transfektanten deutlich höher lag als in KAI1-WT-Transfektanten (Miller et al., 2018). Die Erhöhung der $\alpha\beta 3$ -Expression in Abhängigkeit von KAI1-SP verglichen mit KAI1-WT stimmte mit Ergebnissen an humanen Ovarialkarzinomzellen überein (Upheber et al., 2015). Die Auswirkungen von KAI1-WT auf die $\alpha\beta 3$ -Expression widersprachen sich dagegen. In humanen Ovarialkarzinomzellen führte die Wiedereinführung von KAI1-WT keine Veränderung des $\alpha\beta 3$ -Gehaltes herbei (Upheber et al., 2015). In humanen Prostatakarzinomzellen wiederum konnte weder durch KAI1-WT noch durch KAI1-SP ein Effekt auf die $\alpha\beta 3$ -Expression beobachtet werden (Zhou et al., 2004). Auch Effekte auf andere Integrine wurden im Zusammenhang mit der KAI1-Expression beobachtet. So wurde in einer anderen Prostatakarzinomzelllinie die Integrin-Untereinheit $\alpha 6$ durch Wiedereinführung von KAI1-WT internalisiert, dessen Gesamtgehalt veränderte sich jedoch nicht (He et al., 2005). Abhängig von der Zelllinie und vom Tumortyp wurde somit über unterschiedliche Effekte der KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-abhängigen $\alpha\beta 3$ -Expression berichtet. Ein Grund hierfür könnte in der Diversität der spezifischen Rezeptor- und Signalmolekülausstattung der unterschiedlichen Tumorzellarten liegen. Jedes Gewebe verfügt über einen spezifischen Kontext zu Nachbargewebe, zur EZM, zu Blut- und Lymphgefäßen. Um zellspezifische Funktionen auszuüben, benötigt jede Zelle ein exakt abgestimmtes Gleichgewicht unterschiedlicher Rezeptoren und Signalmoleküle. In Tumorzellen ist dieses Repertoire oftmals so adaptiert, dass sie die Fähigkeit erlangen, lokal invasiv zu wachsen und sich über Körperhöhlen, Blut- oder Lymphbahnen auszubreiten. Es erscheint verständlich, dass dieser Prozess sehr zellspezifisch abläuft und verschiedene

Tumorzellen unterschiedliche Effekte auf die Expression eines Adhäsionsrezeptormoleküls wie $\alpha\beta 3$ auswirken.

Da KAI1 seine zellbiologischen Funktionen über Interaktionen mit verschiedensten Partnermolekülen ausübt (Charrin et al., 2009; Hemler, 2005; Tonoli & Barrett, 2005), untersuchten wir die Kolokalisierungstendenz der beiden KAI1-Proteine mit dem Integrin $\alpha\beta 3$ bzw. dessen Untereinheit α mittels immunzytochemischer Doppelfärbung. Interessanterweise zeigte sich hierbei eine signifikante Kolokalisierung von KAI1-WT mit $\alpha\beta 3$ bzw. α auf der Oberfläche beider Zelllinien. In KAI1-SP-Zelltransfektanten konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Miller et al., 2018). Ähnliche Ergebnisse waren zuvor in humanen Ovarialkarzinomzellen erarbeitet worden (Upheber et al., 2015). Für Kolonkarzinomzellen wurde beschrieben, dass verglichen mit KAI1-WT eine verminderte Kolokalisierung von KAI1-SP mit $\alpha\beta 3$ stattfand (Lee et al., 2003). Die Kolokalisierung von KAI1-WT und $\alpha\beta 3$ stützt die These der funktionellen zellulären Verbindung zwischen den beiden Transmembranproteinen. Als ursächlich für die fehlende Kolokalisierung des KAI1-SP-Proteins mit $\alpha\beta 3$ lassen sich mutmaßlich die strukturellen Unterschiede der beiden KAI1-Proteine aufführen. Durch den Verlust des gesamten Exon 7 fehlt dem KAI1-SP-Protein der distale Teil der ECL2 und ein proximaler Anteil der vierten TMD, was den Schluss nahelegt, dass dadurch die Struktur der ECL2, die maßgeblich an Protein-Protein-Wechselwirkungen des KAI1 beteiligt ist, stark verändert wird (Kitadokoro et al., 2001; Lee et al., 2003; Seigneuret et al., 2001). Zudem sollen glykosylierte N-Glykosylierungs-Stellen in der ECL2 bedeutend für die Assoziation mit Integrinen sein (Ono et al., 2000). Des Weiteren liegt ein Drittel der Aminosäurereste von KAI1 innerhalb der vier TMD, die polare Aminosäurereste enthalten. Mutationen der TMD können sich auf die Stabilität einer funktionell aktiven KAI1-Konformation auswirken und Interaktionen zwischen den TMD beeinflussen. Dies führte in Studien beispielsweise zu verminderten Assoziationen zu anderen Tetraspaninen, nicht jedoch zu Integrinen (Bari et al., 2009). Wir vermuten, dass das KAI1-SP-Molekül durch die strukturellen Abweichungen in der TMD und in der ECL2 in seiner physikalischen Interaktion mit dem Integrin $\alpha\beta 3$ behindert wird, da die Stabilität seiner funktionell aktiven Konformation verändert vorliegt. Dies sehen wir u.a. als mögliche Ursache der differentiellen Effekte der beiden KAI1-Proteine. Zudem erscheint es als möglich, dass für die Assoziation mit Integrinen bedeutende glykosylierte N-Glykosylierungs-Stellen in der ECL2 durch das Fehlen des Exon 7 wegfallen. Bislang konnte nicht genau geklärt werden, welche Epitope innerhalb der ECL2 für die Assoziation von KAI1 mit Integrinen verantwortlich sind. Durch die exakte Identifizierung der KAI1-Struktur könnten jedoch in Zukunft sicherlich genauere Informationen zu den Interaktionsweisen von KAI1 mit Partnermolekülen herausgearbeitet werden (Bienstock & Barrett, 2001).

6.1.2 KAI1-SP führt im Gegensatz zu KAI1-WT zu einer gesteigerten $\alpha\beta3$ -/VN-vermittelten zelladhäsiven Kapazität humaner Tumorzellen

Das Integrin $\alpha\beta3$ reguliert in Abhängigkeit seines Hauptliganden VN mitunter die tumorzelluläre Adhäsion und Migration in einer Vielzahl von Tumoren (Felding-Habermann, 2003; Goel & Languino, 2004). Deshalb untersuchten wir die Adhäsionskapazität der beiden KAI1-Zelltransfektanten in Abhängigkeit von VN. Alle Transfektanten, bis auf MDA-MB-435-KAI1-WT-Zellen, zeigten in Anwesenheit von VN eine verstärkte zelluläre Adhäsion. Am höchsten war diese in MDA-MB-231-Zellen, welche mit KAI1-SP transfiziert worden waren. Diese wiesen verglichen mit den VEC-transfizierten und wt-Zellen eine leicht reduzierte $\alpha\beta3$ -Expression auf. In Abhängigkeit von KAI1-WT konnte bei deutlich erniedrigter $\alpha\beta3$ -Expression trotzdem eine leicht erhöhte Adhäsionskapazität verglichen mit wt-Zellen beobachtet werden (Miller et al., 2018). Die wt-Zellen der MDA-MB-231-Zelllinie exprimierten bereits endogen einen hohen Gehalt an $\alpha\beta3$. Diese Daten sprechen dafür, dass hier auch andere Adhäsionsrezeptoren, die als KAI1-Interaktionspartner fungieren, eine Rolle spielen. Beispielsweise wurden auch verschiedene andere Integrin-Subtypen identifiziert, darunter vor allem die $\beta1$ -Integrine, mit denen das KAI1-Protein interagiert (Berditchevski & Odintsova, 1999). Dies könnte ursächlich dafür sein, dass die Adhäsionskapazität nicht nur mit der $\alpha\beta3$ -Expression korrelierte. Ein weiterer Grund hierfür mag im Vorliegen unterschiedlicher Aktivierungszustände des Integrins liegen. Eine verstärkte Expression inaktiver oder nur mäßig aktivierter Integrine hätte bei geringer Liganden-Affinität weniger die Möglichkeit intrazelluläre Signalwege zu aktivieren und adhäsionsstimulierende Vorgänge zu induzieren. Eine verminderte Expression vollständig aktivierter Integrine dagegen könnte trotzdem, wegen deren erhöhter Bindungsaffinität an EZM-Proteine, zelluläre Adhäsionsvorgänge aktivieren. Eine Möglichkeit Rückschlüsse auf das Ausmaß der Aktivierung intrazellulärer Integrin-Signalwege zu ziehen, ist es, die Aktivierung von FAK, der Schlüssel-Kinase der $\alpha\beta3$ -Signalweiterleitung, zu untersuchen (Müller et al., 2013). Wir untersuchten deshalb in 6.1.3, inwieweit die Aktivierung von FAK von KAI1-WT bzw. KAI1-SP beeinflusst wird und mit der Adhäsionskapazität korrelierte. Ebenso zu erwähnen ist die Möglichkeit, dass sich Moleküle in verschiedenen Kompartimenten der Zelle aufhalten könnten und Oberflächenrezeptoren beispielsweise internalisiert werden. Für diese These spräche beispielsweise, dass die Integrin-Untereinheit $\alpha6$ in einer Prostatakarzinomzelllinie durch Wiedereinführung von KAI1-WT internalisiert wurde, dessen Gesamtgehalt sich jedoch nicht veränderte (He et al., 2005). Nach Kompartimentalisierung ins Zellinnere sind Oberflächenrezeptoren nicht in der Lage ihre Funktionen wie üblich auszuüben. Sie vermögen dann ihre EZM-Liganden nicht zu binden und intrazelluläre Signalwege nicht zu aktivieren. Ebenso sind sie dann nicht fähig Signale aus dem Zellinnern, die die zelluläre Adhäsion induzieren würden, nach außen zu vermitteln. Interessant zu wissen wäre in

diesem Zuge, ob KAI1-WT $\alpha\beta 3$ im Vergleich zu KAI1-SP in MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen zu internalisieren vermag.

Die MDA-MB-435-Zelllinie wies verglichen mit MDA-MB-231-Zellen in ihren wt-Zellen eine geringere $\alpha\beta 3$ -Expression auf. Obwohl KAI1-SP-transfizierte MDA-MB-435-Zellen verglichen mit VEC-transfizierten und wt-Zellen deutlich erhöhte $\alpha\beta 3$ -Spiegel zeigten, fand sich verglichen mit wt-Zellen nur ein vergleichsweise moderater Anstieg der zellulären Adhäsion auf VN. KAI1-WT-Transfektanten verhielten sich in ihrer $\alpha\beta 3$ -Expression und Adhäsionskapazität auf VN wie VEC-transfizierte und wt-Zellen (Miller et al., 2018).

Vorausgehende Studien an Zelllinien unterschiedlicher Tumorarten hatten auch schon zuvor für kontroverse Ergebnisse gesorgt. In humanen Ovarialkarzinomzellen führte die Expression von KAI1-SP zu einer deutlichen Reduzierung und die Expression von KAI1-WT zu einer deutlichen Steigerung der zellulären Adhäsionskapazität auf VN (Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015). In humanen Harnblasenkarzinomzellen fand sich eine verminderte zelluläre Adhäsionskapazität auf Fibronectin (FN) in Anwesenheit niedriger KAI1 mRNA und Proteinspiegel (Jackson et al., 2000a). Ebenso konnte in Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie eine Herunterregulierung der KAI1-Expression mit einer Hemmung der zellulären Adhäsion in Verbindung gebracht werden (Nishioka et al., 2013). In humanen Kolon- und Leberkarzinomzelllinien dagegen löste die Expression von KAI1-SP eine Steigerung, die Expression von KAI1-WT eine Reduzierung der zellulären Adhäsion auf FN aus (Lee et al., 2003; Liu et al., 2003b; Yang et al., 2008). In Prostatakarzinomzellen kam es durch die Expression von KAI1-WT ebenso zu einer verminderten zellulären Adhäsionskapazität (He et al., 2005). Den kontroversen Ergebnissen könnte auch hier die zellspezifische Ausstattung an verschiedenen Adhäsionsmolekülen zugrunde liegen. Von Zelllinie zu Zelllinie unterscheiden sich das Repertoire, die Dichte, die Verteilung, der Aktivierungsstatus und damit die möglichen Wechselwirkungen der Adhäsions- und Signalmoleküle. Zu diskutieren wäre ebenso, ob unterschiedliche Zelllinien unterschiedliche Adhäsionskapazitäten benötigen um ihre Funktionen effektiv auszuüben. Womöglich proliferieren und migrieren beispielsweise die MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen und die von Lee, Liu und Yang untersuchten Kolon- und Leberkarzinomzellen unter erhöhter zellulärer Adhäsion verstärkt, während die von Ruseva und Upheber untersuchten Ovarialkarzinomzellen dies unter verminderter Adhäsion verstärkt tun. Dann würde KAI1-SP die zelluläre Adhäsion jeweils insoweit modulieren, dass die Zellen – entsprechend ihrer individuellen Bedürfnisse – bestmöglich pro-tumorigen agieren und proliferieren können. Offen bleibt hierbei die Frage, ob es Zellen im Laufe der Tumorprogression möglich ist, ihre zellulären Eigenschaften insoweit in ihrem Sinne zu verändern, dass diese die optimalen Bedingungen für ein

unkontrolliertes Wachstum ermöglichen und sie damit die zelluläre Adhäsionskapazität in die für sie vorteilhafteste Richtung zu lenken vermögen.

Der Prozess der zellulären Migration ist eng mit einer fein abgestimmten Regulierung der zellspezifischen Adhäsionskapazität verbunden. MDA-MB-231 KAI1-SP-Transfektanten zeigten in weiteren Studien der Forschergruppe der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde der TU München unter Prof. Dr. Reuning verglichen mit KAI1-WT-Transfektanten eine erhöhte und beschleunigte Migration im Rahmen von *wound-scratch-Assays*. Besonders deutlich war dieser Effekt in Anwesenheit von VN. Durch Expression von KAI1-SP konnte des Weiteren beobachtet werden, dass die Migrationsgeschwindigkeiten der Zellen, welche direkt an der Grenze zum gesetzten *scratch* lagen, die Migrationsgeschwindigkeiten der Zellen in dichteren oder weiter entfernten Bereichen des *Monolayers* übertrafen. Die Migrationsgeschwindigkeit der KAI1-WT-Zellen lag deutlich darunter. Auch die gemittelte Migrationsgeschwindigkeit sowie der prozentuale Anteil migrierender Zellen stellte sich unter KAI1-SP-Expression verglichen mit KAI1-WT-Transfektanten deutlich erhöht dar (Miller et al., 2018). Ebenso wurde in anderen Studien an Mamma- und Prostatakarzinom- sowie Melanomzelllinien eine verminderte zelluläre Migration nach Wiedereinführung von KAI1-WT im Vergleich zur KAI1-SP-Expression beobachtet (Jee et al., 2006; Malik et al., 2009; Sridhar & Miranti, 2006; Takaoka et al., 1998a; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2003b). Eine erhöhte Migration in Anwesenheit von KAI1-SP wurde auch zuvor in Kolonkarzinomzellen festgestellt (Lee et al., 2003). Eine erniedrigte zelluläre Migration durch die Expression von KAI1-WT trägt somit auch zu den metastasierungssuppressiven Eigenschaften von KAI1-WT bei, wohingegen KAI1-SP nicht mehr nur die metastasierungssuppressiven Eigenschaften verloren zu haben scheint, sondern pro-metastasierende Funktionen ausübt, indem es auch die zelluläre $\alpha\beta3$ -VN-abhängige Adhäsion in MDA-MB-231-Zellen insoweit verstärkt, dass sich die Zellen besser fortbewegen können. Durch die verstärkte Adhäsion erhalten die Tumorzellen möglicherweise erst die nötige Haftung an die EZM, um Integrine zu aktivieren sowie Moleküle des Zytoskeletts durch Kontrolle von Proteasen im Sinne des *Remodellings* zu beeinflussen. Hierdurch gewannen sie Raum zur Invasion und könnten sich besser fortbewegen.

Konträre Beobachtungen wurden zuvor an humanen Ovarialkarzinomzellen beschrieben. Durch die Wiedereinführung von KAI1-WT kam es verglichen mit wt-Zellen zwar auch zu einer verminderten Migration, jedoch bei deutlich erhöhter zellulärer Adhäsionskapazität. Durch die Expression von KAI1-SP zeigte sich ebenso eine verstärkte Migration, aber deutlich erniedrigte zelluläre Adhäsionsdaten (Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015). Ursächlich hierfür sahen wir zellspezifische Voraussetzungen, die eine Tumorzelle für den Vorgang der Migration benötigt. Die zelluläre Migration beruht auf einem fein justierten

Gleichgewicht zwischen zellulärer Adhäsion an die EZM und Lösung von dieser. Jede Tumorzelle verfügt über eine spezifische Adhäsionsstärke zur EZM, bei welcher die zellulären Migrationsbedingungen optimal sind, wodurch Voraussetzungen für strukturelle Veränderungen des zellulären Zytoskeletts und das Fortbewegen der Zelle erfüllt werden. In der Vergangenheit konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Expression von KAI1-WT die tumorzelluläre Migration hemmt, indem es die Zellmembran-abhängige Aktin-Organisation stört und die Zellen verlängerte Zellausläufer und reduzierte Lamellipodien sowie Zellmembranausbuchtungen und Einziehungen zeigen (Liu et al., 2012). Auch konnte bereits dargestellt werden, dass die Anwesenheit von KAI1-WT die Aktivierung des Urokinase-Rezeptors (uPA-R) und damit die perizelluläre Proteolyse behindert (Zoller, 2009). Für den hemmenden Effekt von KAI1-WT auf die tumorzelluläre Migration schien auch die Palmitoylierung des KAI1-WT-Proteins entscheidend zu sein (Zhou et al., 2004). Es wäre zu spekulieren, ob das KAI1-SP-Protein durch seine strukturelle Modifikation diese Palmitoylierungs-bedingte inhibierende Wirkung auf die zelluläre Migration nicht ausüben kann. Somit erschien es möglich, dass durch die Expression von KAI1-SP die zellspezifisch optimale Adhäsionskapazität eingenommen wurde, um die Interaktion zur EZM, deren *Remodelling* sowie die Organisation des Zytoskeletts zu stimulieren, so dass optimale Voraussetzungen zur zellulären Migration erfüllt waren. Hierbei verhielten sich verschiedene Tumorzellarten unterschiedlich. MDA-MB-231-Zellen und die von Lee, Liu und Yang untersuchten Kolon- und Leberkarzinomzellen benötigten für optimale zelluläre Migrationsbedingungen möglicherweise eine erhöhte zelluläre Adhäsion, während die von Ruseva und Upheber untersuchten Ovarialkarzinomzellen bei verminderter Adhäsion verstärkt migrierten. Die Wiedereinführung von KAI1-WT beeinflusste dagegen womöglich die zelluläre Adhäsion zelltypspezifisch in diejenige Richtung, die sich negativ auf die zelluläre Migration auswirkte.

MDA-MB-435-Zellen, welche insgesamt höhere mittlere Migrationsgeschwindigkeiten zeigten als MDA-MB-231-Zellen, zeigten überraschenderweise keine deutlichen Unterschiede der zellulären Migration zwischen KAI1-WT- und KAI1-SP-Transfektanten in den ersten 11 h des Migrationsexperiments. Auch wurde diese nicht durch die An- bzw. Abwesenheit von VN oder FN beeinflusst (Miller et al., 2018). Die moderaten Unterschiede bezüglich der zellulären Adhäsionskapazität in Abhängigkeit einer KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expression scheinen in MDA-MB-435-Zellen zu geringfügig, um signifikante Unterschiede in der zellulären Migration zu bewirken.

Inwiefern genau die beiden KAI1-Proteine ihre Auswirkungen auf die zelluläre Migration ausüben ist bislang nicht umfassend geklärt. Ein höchst bedeutender Bestandteil ist wohl die Interaktion von KAI1 mit Integrinen, darunter $\alpha\beta3$, und deren Signalkaskaden. Sowohl die

zelluläre Adhäsion als auch Migration waren in Anwesenheit des $\alpha\beta3$ -Hauptliganden VN deutlich gesteigert und KAI1-SP-vermittelte Effekte auf VN besonders deutlich (Miller et al., 2018). Durch Zugabe des $\alpha\beta3$ -bindenden zyklischen Peptids cRGDfV als Bindungskompetitor, wurde die zelluläre Adhäsionskapazität auf VN deutlich reduziert. Auf FN, Col I und Col IV veränderte sich diese dagegen nicht (Miller et al., 2018). Durch die kompetitive Hemmung von $\alpha\beta3$ durch cRGDfV konnte das Integrin auf VN nicht zur zellulären Adhäsion beitragen, woraufhin diese deutlich vermindert war. Dies lässt vermuten, dass $\alpha\beta3$ eine entscheidende Rolle im Prozess der VN-vermittelten zellulären Adhäsion der beiden Zelllinien spielt. Es bleibt jedoch zu beachten, dass cRGDfV auch eine geringe Affinität für das Integrin $\alpha\beta5$ aufweist.

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Integrin $\alpha\beta3$ auch direkt in die Synthese von VN in humanen Ovarialkarzinomzellen involviert ist, denn eine Erhöhung der $\alpha\beta3$ -Expression führte zu einer gesteigerten Expression von VN und einem *Remodelling* der Tumorzellumgebung zugunsten der Tumorprogression (Reuning, 2011). Interessant wäre, ob auch in MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen die Expression von VN durch die Expression von $\alpha\beta3$ induziert werden kann und sich dadurch Effekte auf das *Remodelling* ergäben. Dies könnte sich dann auch auf die zelluläre Motilität auswirken und würde mit der KAI1-SP-induzierten Erhöhung der $\alpha\beta3$ -Expression und Verstärkung der zellulären Mobilität der MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zu KAI1-WT in Einklang stehen. In humanen Ovarialkarzinomzellen konnte bereits in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe eine erhöhte Expression von $\alpha\beta3$ mit einer gesteigerten $\alpha\beta3$ /VN-vermittelten Migrationsstärke, zellulären Adhäsion und Proliferation in Zusammenhang gebracht werden (Hapke et al., 2003). Durch Erhöhung der $\alpha\beta3$ -Expression zeigten sowohl KAI1-WT- als auch KAI1-SP-transfizierte Ovarialkarzinomzellen verglichen mit Transfektanten niedriger $\alpha\beta3$ -Expression eine verstärkte zelluläre Migration (Upheber et al., 2015).

Die Expression von $\alpha\beta3$ spielt somit eine bedeutende Rolle im Prozess der KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-vermittelten tumorzellulären Migration. Interessanterweise wurde in diesem Zusammenhang von uns beobachtet, dass KAI1-WT in Brust- und Ovarialkarzinomzellen mit $\alpha\beta3$ kolokalisiert vorliegt, jedoch nicht mit KAI1-SP (Miller et al., 2018; Upheber et al., 2015). Möglicherweise wird $\alpha\beta3$ durch die Kolokalisierung mit KAI1-WT von diesem in seiner Funktion und Expression gehemmt, wodurch es zu einer verminderten $\alpha\beta3$ -Expression und $\alpha\beta3$ -vermittelten zellulären Adhäsion und Migration kommt. Durch die fehlende Kolokalisierung von $\alpha\beta3$ mit KAI1-SP aufgrund von Veränderungen in der ECL2 könnte möglicherweise $\alpha\beta3$ nicht durch dieses KAI1-Protein gehemmt werden, wodurch es verglichen mit KAI1-WT-Transfektanten eine verstärkte $\alpha\beta3$ -Expression und eine erhöhte zelluläre Adhäsion und Migration vermitteln kann.

6.1.3 KAI1-SP bewirkt im Vergleich zu KAI1-WT eine verstärkte Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe

Einige Mechanismen, durch die KAI1 die Funktion des Integrins $\alpha\beta3$ reguliert, wurden bislang diskutiert. Dazu zählt auch die Kontrolle der Integrin-abhängigen intrazellulären Signalwege und deren biologische Auswirkungen (Stipp et al., 2003). Eine Möglichkeit Rückschlüsse auf das Ausmaß der Aktivierung intrazellulärer Integrin-Signalwege zu ziehen, ist es, die Aktivierung von FAK, der Schlüssel-Kinase der $\alpha\beta3$ -Signalweiterleitung, zu hinterleuchten (Müller et al., 2013). Wir untersuchten deshalb, inwieweit die Aktivierung von FAK durch KAI1-WT bzw. KAI1-SP beeinflusst wird und mit den bisher gewonnenen Ergebnissen korreliert. Tatsächlich konnten wir in MDA-MB-231-Zellen durch die Expression von KAI1-SP eine Erhöhung der FAK-Aktivierung sowie die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe auf der Zellmembran nachweisen. KAI1-WT-, VEC-transfizierte und wt-Zellen zeigten diesen Effekt nicht und wiesen eine untereinander vergleichbare p-FAK-Expression auf (Miller et al., 2018). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Expression von KAI1-SP zwar nicht unbedingt die höchsten $\alpha\beta3$ -Spiegel bewirkte, jedoch das vorhandene $\alpha\beta3$ in der vollständig aktivierten Konformation vorlag. Deshalb würde KAI1-SP trotzdem zu einer verstärkten FAK-Aktivierung und induzierten Signalwegen führen und u.a. die zellulären Vorgänge der Adhäsion, Migration und Proliferation im Sinne der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse stimulieren. Obwohl KAI1-SP-transfizierte MDA-MB-435-Zellen im Vergleich zu KAI1-WT-Zelltransfektanten deutlich erhöhte $\alpha\beta3$ -Spiegel zeigten, fand sich nur ein vergleichsweise moderater Anstieg der zellulären Adhäsion auf VN und kein deutlicher Unterschied in der zellulären Migration. Trotzdem konnte auch hier die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe auf der Zellmembran durch KAI1-SP beobachtet werden, wobei die Expressionshöhe von p-FAK im Vergleich zu VEC- und KAI1-WT-transfizierten sowie wt-Zellen nicht erhöht war (Miller et al., 2018). Die durch die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe bei vergleichbarer p-FAK-Expression bedingte niedrige Stimulierung $\alpha\beta3$ -abhängiger Signalwege durch KAI1-SP könnte im Vergleich zu KAI1-WT ursächlich für die nur moderat erhöhte Adhäsions- und vergleichbare Migrationskapazität der MDA-MB-435 KAI1-SP-Zelltransfektanten sein.

Dies steht in guter Übereinstimmung mit Beobachtungen an humanen Ovarialkarzinomzellen. Hier konnte wie in MDA-MB-231-Zellen eine verstärkte FAK-Aktivierung und die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe durch die Expression von KAI1-SP beobachtet werden (Upheber et al., 2015). Auch unabhängig von KAI1 konnte in einer Vielzahl weiterer humaner Malignomzellen eine Überexpression des FAK-Moleküls und des FAK-Gens nachgewiesen und mit erhöhter Invasivität der Tumoren in Verbindung gebracht werden (Agochiya et al., 1999; Kornberg, 1998; Owens et al., 1995). In humanen

Prostatakarzinomzellen führte die Expression von KAI1-WT zu einer verminderten FAK-Aktivierung und in malignen Melanomzellen zu einer FAK-Inaktivierung (Zhang et al., 2016). Des Weiteren wurden auch andere Signalmoleküle der p-FAK-Signalkaskade, darunter Src, p130^{Cas} und c-Met inhibiert (Lee et al., 2017; Park et al., 2012; Sridhar & Miranti, 2006; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2016). Src gehört zu den wichtigsten Signalmolekülen in der Tumorbilogie, indem es mit vielzähligen anderen Signalmolekülen, darunter Integrinen und Wachstumsfaktorrezeptoren, interagiert. Hierdurch kann es über unterschiedliche Signalwege Effekte auf die zelluläre Adhäsion, Migration und Proliferation, aber auch auf die Transkription, Differenzierung und das Zellüberleben ausüben (Gallagher & Schiemann, 2006; Kornberg, 1998; Sieg et al., 2000). FAK und Src bilden in vielen Tumorzellarten einen aktivierten Kinase-Komplex, welcher eine verringerte zelluläre Adhäsion und erhöhte Migration verursachte (Berditchevski & Odintsova, 1999; He et al., 2005; Mitra & Schlaepfer, 2006). Die Hemmung von Src wirkte sich folglich auch auf die FAK-Phosphorylierung und damit seine Aktivierung aus. In MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen konnten wir eine deutlich verstärkte Src-Aktivierung durch die Expression von KAI1-SP beobachten. Die Wiedereinführung von KAI1-WT zeigte dagegen eine Reduzierung der Src-Aktivität (Miller et al., 2018). KAI1-SP induzierte in MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen also sowohl eine verstärkte Src als auch FAK-Aktivierung, welche auch zu einer gesteigerten zellulären Proliferation und Migration beitragen kann. Die deutlich verstärkte Bildung fokaler Adhäsionskomplexe in Anwesenheit von KAI1-SP wies darauf hin, dass es hierbei – durch die Aktivierung von FAK und dessen Signalwegen - zu einer modifizierten zellulären Adhäsion kommen konnte, die sich auch auf die Migration auswirkte. Durch die Src-/FAK-vermittelten Signalwege könnten auch Effekte auf die zelluläre Transkription entstanden sein, wodurch die Expression von KAI1-SP auch in die Stimulierung einer erhöhten Expression von $\alpha\beta3$ im Vergleich zu KAI1-WT involviert sein könnte. Ebenso könnte durch diese Signalwege das Zellüberleben beeinflusst worden sein. Dies erschien eine Möglichkeit zu sein, wie Tumorzellen die Fähigkeit erlangen den programmierten Zelltod zu umgehen und unkontrolliert weiter zu proliferieren. Die Wiedereinführung von KAI1-WT löste keine Aktivierung der Src-/FAK-Signalwege aus, wodurch die aktivierenden Effekte auf die genannten zellulären Eigenschaften ausblieben. Der Verlust von KAI1-WT würde die Metastasierung somit dahingehend fördern, als dass er als negativer Regulator von mitunter Src/FAK wegfiel (Sridhar & Miranti, 2006; Zhang et al., 2003a).

Wir beobachteten, dass in KAI1-WT-transfizierten MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen die Phosphorylierung und Aktivierung von Src und FAK gehemmt war. Es wäre eventuell vorstellbar, dass das KAI1-WT-Protein Assoziationen mit $\alpha\beta3$ auf der Zellmembran bildet und durch diese Kolokalisierung die FAK-Bindungsstelle an der zytoplasmatischen β -Integrin-Untereinheit sterisch blockiert wird, so dass es zu keiner Anbindung des FAK-

Moleküls kommen kann. Ohne die Bindung der aminoterminalen FERM-Domäne des FAK-Moleküls an die Bindungsstelle des Integrins, könnte die Auto-Phosphorylierungsstelle nicht exponiert und FAK nicht aktiviert werden. Dadurch könnte Src nicht den aktivierten Kinase-Komplex mit FAK bilden, so dass die Src-/FAK-Signalwege nicht aktiviert werden. Die Wiedereinführung von KAI1-WT führte somit zu einer Hemmung der $\alpha\beta3$ -vermittelten Src-/FAK-abhängigen Signalwege. Die Expression von KAI1-SP zeigte dagegen keine Kollokalisierung mit $\alpha\beta3$. Es wäre deshalb denkbar, dass die FAK-Bindungsstelle in $\alpha\beta3$ frei lag, FAK aktiviert, den aktivierten Kinase-Komplex mit Src bilden konnte und die KAI1-SP-Expression somit nicht hemmend sondern sogar aktivierend auf die $\alpha\beta3$ -abhängigen Src-/FAK-Signalwege einwirkte. Dies bekräftigte erneut die Rolle von KAI1-SP als funktionellen Gegenspieler zum metastasierungssuppressiven KAI1-WT-Protein.

6.2 KAI1-SP bewirkt im Gegensatz zu KAI1-WT eine erhöhte Tumorzellproliferation

Eine der bedeutendsten Eigenschaften von Tumorzellen ist deren ungehemmte Proliferation. Proliferationsfördernde Signalwege werden durch unterschiedliche zugrunde liegende Ereignisse aktiviert sowie Kontrollprozesse während des Zellzyklus, welche die Tumorzellen in den Zellarrest führen oder die Apoptose herbeiführen, inaktiviert. Sowohl spezifische Integrine, darunter $\alpha\beta3$, als auch der EGF-R können die Proliferation über intrazelluläre Signalwege positiv beeinflussen (Burden & Yarden, 1997; Cabodi et al., 2004; Desgrosellier et al., 2009; Desgrosellier & Cheresh, 2010; Felding-Habermann, 2003; Goel & Languino, 2004; Yarden & Sliwkowski, 2001).

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir die differentiellen Effekte der beiden KAI1-Proteine auf die zelluläre Proliferation. Beide Zelllinien zeigten eine deutliche Steigerung der zellulären Proliferation durch die Expression von KAI1-SP. Durch Wiedereinführung von KAI1-WT fand sich eine geringere Proliferationsaktivität, welche sogar geringer war als die der VEC-transfizierten oder wt-Zellen (Miller et al., 2018).

Dass unter Expression von KAI1-WT eine geringere Proliferationsaktivität als in VEC-transfizierten oder wt-Zellen zu beobachten war, konnte bislang auch in humanen Ovarial-, Pankreas- und anderen Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden (Guo et al., 2005; Lu et al., 2007; Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015). In Ovarialkarzinomzellen erhöhte KAI1-SP die Proliferationsaktivität konkordant mit unseren Arbeiten deutlich (Guo et al., 2005; Lu et al., 2007; Ruseva et al., 2009; Upheber et al., 2015). In Kolonkarzinomen konnte – obwohl sich hierbei KAI1-SP-Transfektanten wie wt-Zellen verhielten - ebenso eine verminderte zelluläre Proliferation durch die Expression von KAI1-WT beobachtet werden (Lee et al., 2003). In Tumorzellen wiederum anderer Organe, wie der Lunge oder der Prostata, wies die Wiedereinführung von KAI1-WT keine Veränderung der zellulären Proliferation auf (Lee et al., 2017; Shinohara et al., 2001b). Diese Unterschiede zwischen Zellen verschiedener Tumorentitäten könnten spezifischen Wachstumsmustern, Verdopplungszeiten oder der grundlegenden Proliferationsaktivität eines Gewebes geschuldet sein. Möglicherweise wirkte sich eine vorhandene Veränderung der Proliferationsaktivität durch KAI1-WT bzw. KAI1-SP in manchen Zelllinien erst deutlich später aus als es im *in-vitro*-Zellmodell verfolgbar gewesen wäre. Ein anderer Grund für die unterschiedlichen Verhaltensweisen der Zelllinien bezüglich der KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-abhängigen Proliferationsaktivität mögen die spezifische Ausstattung der jeweiligen Zellen an Wachstumsfaktor(-rezeptoren) und Signalmolekülen sowie deren spezifische Signalwege sein. Diese diversen Molekülrepertoires mögen in unterschiedlicher Weise und Ausprägung

mit KAI1-Proteinen interagieren. Dass die Expression von KAI1-WT eine Kolo­kalisierung des KAI1-Proteins mit $\alpha\beta 3$ bei im Vergleich zu KAI1-SP verminderter $\alpha\beta 3$ -Expression hervorruft und damit $\alpha\beta 3$ -induzierte, FAK-abhängige Signalwege gehemmt werden, erscheint unser Ergebnis einer reduzierten proliferativen Antwort von KAI1-WT-Zelltransfektanten zu bestätigen. KAI1-SP dagegen kolo­kalisierte bei vergleichsweise erhöhter $\alpha\beta 3$ -Expression nicht mit dem Integrin, wodurch $\alpha\beta 3$ -induzierte, FAK-abhängige Signalwege aktiviert wurden, die in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen die zelluläre Proliferationsaktivität der KAI1-SP-Zelltransfektanten stimulierten. Möglicherweise fehlte manchen Zelllinien auch der dreidimensionale Kontext oder Umgebungsstrukturen und -faktoren, die *in-vivo* bestünden, um ihre Wechselwirkungen zu anderen Zellen, zur EZM oder mit den KAI1-Proteinen, die durch ihre Rezeptoren und Signalmoleküle moduliert werden, vollständig ausschöpfen zu können. Dies könnte auch eine Ursache für das unterschiedliche Verhalten der MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zelllinie *in-vitro* und *in-vivo* sein. Denn in vorausgehenden Studien am Mausmodell zeigten sich MDA-MB-231-Zellen weniger tumorigen als MDA-MB-435-Zellen (Price et al., 1990). Unsere Ergebnisse hingegen ließen bei MDA-MB-231-Zellen *in-vitro* stärkere Proliferationsraten als bei MDA-MB-435-Zellen beobachten.

Eine weitere Rolle in der im Vergleich zu KAI1-SP durch KAI1-WT induzierten Proliferationshemmung könnte einerseits die Hemmung der Angiogenese in den Tumorzellen spielen, zu der es durch eine verminderte Migration der Endothelzellen kommt (Wei et al., 2014). Andererseits könnte mitunter die HGF-R- und DARC-vermittelte Reduktion der zellulären Apoptoseresistenz sowie eine Aktivierung der Tumorzell-Seneszenz durch KAI1-WT hier mitwirken (Bandyopadhyay et al., 2006; Zoller, 2009). Des Weiteren kann bei Adhäsionsverlust zur EZM auch durch $\alpha\beta 3$ die Apoptose ausgelöst werden (Desgrosellier & Cheresh, 2010) und KAI1-WT-Zellen zeigten sich in unseren Studien weniger adhäsiv als KAI1-SP-Zellen. Hierdurch würden mehr Zellen den programmierten Zelltod durchlaufen und absterben oder in inaktivem Zustand vorliegen. Eine geringere Blutversorgung würde die tumorzelluläre Proliferation zusätzlich schwächen.

Unsere *in-vitro*-Daten stehen in guter Übereinstimmung mit bereits zuvor publizierten *in-vivo*-Ergebnissen zu Tumorwachstum. In diesen Studien zeigte sich bei Injektion von KAI1-WT-transfizierten Mammakarzinomzellen in das Brustfettgewebe und in Schwanzvenen athymischer Nacktmäuse eine signifikante Hemmung des metastatischen Potentials der Zellen und der Tumorlast, einhergehend mit einem reduzierten Tumorwachstum (Yang et al., 2001). Wurden KAI1-WT oder für KAI1-WT-kodierende Expressionsvektoren in heterotope Pankreaskarzinome von Nacktmäusen injiziert, beobachtete man eine erniedrigte Wachstumsrate der Tumorzellen, ein verringertes Tumolvolumen sowie eine verminderte

Ausbildung von Metastasen in Lunge und Leber (Xu et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse wurden bei *in-vivo*-Experimenten des Melanoms und des hepatozellulären Karzinoms erzielt (Takaoka et al., 1998a; Yang et al., 2008). Wurde dagegen KAI1-SP injiziert, zeigte sich ein deutlich aggressiveres Wachstumsmuster des hepatozellulären Karzinoms sowie eine stärkere Ausbildung mikrometastatischer Lungenherde (Yang et al., 2008). Auch Kolonkarzinomzellen, welche KAI1-SP exprimierten, führten nach subkutaner Injektion bei Mäusen zu einer erhöhten Tumorigenität. Sie bildeten in allen Mäusen Kolonkarzinome vergleichbaren Volumens, wohingegen bei Injektion von KAI1-WT-transfizierten Zellen nur in 70% ein Kolonkarzinom auftrat (Lee et al., 2003).

Die Ergebnisse bekräftigten die Rolle des Tetraspanins KAI1-WT als Metastasierungssuppressor, indem es u.a. die Tumorzellproliferation *in-vitro* als auch in metastatischen Absiedelungen *in-vivo* hemmt. Die Bildung klinisch apparenter Makrometastasen aus einzelnen oder kleinen Clustern ektopter Tumorzellen wird als wohl ineffektivster Prozess in der Entstehung von Metastasen angesehen. Es wird vermutet, dass KAI1-WT wie auch eine Vielzahl anderer Metastasierungssuppressoren an diesem heiklen Schwellenprozess – u.a. proliferationshemmend - eingreift und in Folge dessen negativ auf die Ausbildung von Metastasen einwirkt (Berger et al., 2005; Smith & Theodorescu, 2009; Weiss, 1990; Wong et al., 2001). In welchem Ausmaß KAI1-WT auch den Primärtumor selbst beeinflusst, bleibt bisher offen.

Die Expression von KAI1-SP schien in einer Vielzahl von Tumoren sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* dem Effekt von KAI1-WT entgegenzuwirken. Es wirkte sich als eher proliferationsfördernd und damit stimulierend auf die Ausbildung klinisch apparenter Metastasen aus. Somit schien KAI1-SP nicht mehr nur die metastasierungssuppressiven Eigenschaften seines Partnerproteins KAI1-WT verloren zu haben, sondern erstaunlicherweise durch die strukturelle Modifikation des Moleküls pro-metastasierende Funktionen auszuüben.

6.3 KAI1-SP führt im Gegensatz zu KAI1-WT zu einer erhöhten EGF-R-Expression

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGF-R zählt zu den bedeutendsten Vermittlern der tumorzellulären Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Migration und fungiert als einer der wichtigsten Interaktionspartner des Tetraspanins KAI1. Der EGF-R induziert einige seiner Funktionen durch die Interaktion mit Integrinen. Sie sind durch gemeinsame Signalwege miteinander verbunden und können sogar in Abwesenheit ihrer Liganden synergistisch wirken sowie ihre Expression und Aktivität gegenseitig verändern (Lössner et al., 2008; Streuli & Akhtar, 2009).

Die in vorliegender Arbeit untersuchten Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 weisen trotz ihrer triple-Negativität eine endogene EGF-R-Expression auf. Deshalb untersuchten wir, ob die differentiellen Effekte einer KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expression auf die tumorzelluläre Proliferation von einer Veränderung der EGF-R-Expressionshöhe begleitet wurde und diese mit der dysregulierten $\alpha\beta 3$ -Expression korrelierte. In beiden Tumorzelllinien führte die Expression von KAI1-SP im Vergleich zu VEC-transfizierten Zellen mit niedriger KAI1-Expression zu einer deutlichen Erhöhung der EGF-R-Expression. KAI1-WT-Zelltransfektanten zeigten keine wesentlichen Veränderungen in der Expression des EGF-R und wiesen vergleichbare Ergebnisse wie VEC-transfizierte Zellen auf. Die verstärkte EGF-R-Expression durch KAI1-SP korrelierte zudem tatsächlich mit einer zusätzlichen Steigerung der proliferativen Aktivität bei exogener Zugabe von EGF. KAI1-WT-, VEC-transfizierte bzw. wt-Zellen zeigten keine maßgebliche Beeinflussung ihrer Proliferationsaktivität in Anwesenheit von EGF. Die KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-abhängigen Effekte auf die EGF-R-Expressionshöhe spiegelten sich in MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen auch auf transkriptioneller Ebene wieder. KAI1-SP-transfizierte Zellen zeigten im Vergleich zu VEC-transfizierten Zellen eine erhöhte Aktivität des EGF-R-Promotors, während bei KAI1-WT-Transfektanten keine signifikante Veränderung der EGF-R-Promotoraktivität zu beobachten war (Miller et al., 2018). In diesem Zusammenhang konnte ferner in Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (NSCLC) eine Korrelation zwischen einer Überexpression von mutiertem EGF-R und einer Reduzierung der KAI1-WT-Expression beobachtet werden. Ferner zeigte eine Wiedereinführung von KAI1-WT inhibierende Effekte auf mutierte EGF-R (Yang et al., 2015).

KAI1 ist als Tetraspanin dafür bekannt, dass es durch seine unzähligen Interaktionen die Proteinverteilung in Multiproteinkomplexen auf der Zellmembran organisiert und Oberflächenproteine zwischen verschiedenen zellulären Kompartimenten verteilen kann (Charrin et al., 2009; Hemler, 2005; Levy & Shoham, 2005; Stipp et al., 2003). Odintsova et

al. beobachteten an HB2-Mammakarzinomzellen, dass KAI1-WT eine erhöhte Rate an EGF-R-Endozytose bewirkte (Odintsova et al., 2000). Deshalb untersuchten wir den Anteil des zelloberflächenständigen EGF-R an der Gesamt-EGF-R-Expression in Abhängigkeit von der KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expression. In MDA-MB-231-Zellen verminderte die Wiedereinführung von KAI1-WT im Vergleich zu KAI1-SP-Zelltransfektanten und wt-Zellen die Zelloberflächenexpression des EGF-R (Miller et al., 2018). In humanen Ovarialkarzinomzellen war ein vergleichbarer Effekt beobachtet worden (Upheber et al., 2015). Damit konnten wir die Daten von Odintsova und Mitarbeitern bestätigen, da es auch in MDA-MB-231-Zellen zu einer Reduzierung des zelloberflächenständigen EGF-R durch eine KAI1-WT-vermittelte EGF-R-Internalisierung kam. In früheren Arbeiten wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass KAI1-WT zur Rekrutierung des EGF-R in clathrin- und cholesterinreiche Zellmembranareale beiträgt und durch Invagination mit den KAI1-Molekülen in endozytotischen Vesikeln internalisiert wird (Burden & Yarden, 1997; Wang et al., 2007; Yarden & Sliwkowski, 2001). In Anwesenheit von EGF kam es dann zur Ubiquitinierung des EGF-R, wodurch er in Proteasomen abgebaut wurde (Odintsova et al., 2013; Odintsova et al., 2003).

Zusammenfassend führte die Expression von KAI1-SP im Vergleich zu KAI1-WT zu einer signifikant erhöhten EGF-R-Expression, die in MDA-MB-231-Zellen mit einer erhöhten EGF-R-Promotoraktivität einherging. Andere Studien hatten bereits zuvor gezeigt, dass $\alpha\beta 3$ mit dem EGF-R Komplexe bildet, wodurch auch Liganden-unabhängig intrazelluläre EGF-R-Signalkaskaden aktiviert werden und durch die $\alpha\beta 3$ -abhängige Signalübermittlung die Expression, Aktivität und Promotoraktivität des EGF-R erhöht wird (Cabodi et al., 2004; Desgrosellier & Cheresch, 2010; Lössner et al., 2008). Unsere Ergebnisse, dass KAI1-SP im Vergleich zu KAI1-WT sowohl eine erhöhte $\alpha\beta 3$ -, als auch EGF-R-Expression induzierte, stehen mit diesen Daten in Einklang. Dies ließ vermuten, dass die verstärkte EGF-R-Expression in KAI1-SP-Zelltransfektanten, in Verbindung mit der erhöhten $\alpha\beta 3$ -Expression, die Aktivität der EGF-R- und $\alpha\beta 3$ -vermittelten Signalwege stimulierte und hierdurch mitunter eine vermehrte Transkription des EGF-R induziert wurde. Durch die fehlende Kollokalisierung von $\alpha\beta 3$ und KAI1-SP blieb möglicherweise ebenso die Hemmung auf die $\alpha\beta 3$ -vermittelten Signalwege aus. Als gemeinsame Signaltransduktionsmoleküle des EGF-R und von $\alpha\beta 3$ waren u.a. FAK und Src identifiziert worden (Lössner et al., 2008; Moro et al., 2002; Sieg et al., 2000). Über den Src/FAK-Signalweg konnten $\alpha\beta 3$ und EGF-R synergistisch die zelluläre Migration und Proliferation aktivieren und die zelluläre Adhäsion modifizieren. Der EGF-R ist einer der bedeutendsten Vermittler der zellulären Proliferation. Deshalb überraschte es nicht, dass die erhöhte EGF-R-Expression der KAI1-SP-Zelltransfektanten zudem in Korrelation mit der beobachteten verstärkten Proliferationskapazität stand. Da bei fehlender Internalisierung zusätzlich eine erhöhte oberflächenständige EGF-R-Dichte

bestand, konnte die Anwesenheit von EGF eine zusätzlich verstärkte proliferative Antwort auslösen (Miller et al., 2018).

Unter Wiedereinführung von KAI1-WT zeigten sich niedrigere EGF-R-Spiegel verglichen mit KAI1-SP-transfizierten Zellen und zudem ein EGF-R-internalisierender Effekt. Dies führte zu einer potenzierten Reduzierung funktionell aktiver EGF-R auf der Zelloberfläche, weshalb die Anwesenheit von EGF - bei grundlegend niedriger zellulärer Proliferation - vermutlich keine verstärkte proliferative Aktivität erzeugen konnte. Die Expression von KAI1-WT war im Vorfeld mit einer Hemmung der Liganden-induzierten EGF-R-Dimerisierung und der EGF-R-vermittelten intrazellulären Signalwege in Verbindung gebracht worden (Odintsova et al., 2003). Die im Vergleich zu KAI1-SP-Transfektanten verminderte $\alpha\beta 3$ -Expression und möglicherweise kolokalisierungsabhängige Hemmung der $\alpha\beta 3$ -vermittelten Signalwege sowie die Hemmung der EGF-R-vermittelten Signalwege sahen wir als mögliche Ursache für die fehlende Aktivierung der zellulären Migration und Transkription durch Expression von KAI1-WT an. Die direkte Assoziation von KAI1-WT und dem EGF-R hemmte des Weiteren die EGF-induzierte Bildung der Lamellipodien-Fortsätze und damit die zelluläre Migration (Odintsova et al., 2000).

Diese Daten unterstreichen die Rolle von KAI1-WT als Meister-Organisator in der Verteilung und Internalisierung von Membranproteinen, darunter des EGF-R. KAI1-WT beeinflusst $\alpha\beta 3$ - und EGF-R-vermittelte Signalwege, deren Expression und Interaktion und damit tumorbiologisch bedeutende Eigenschaften wie die zelluläre Proliferation, Adhäsion und Migration. Die gewonnenen Ergebnisse stützen die These, dass KAI1-SP nicht mehr nur die metastasierungssuppressiven Eigenschaften des KAI1-WT-Proteins verloren hat, sondern erstaunlicherweise durch die strukturelle Modifikation des Moleküls pro-metastasierende Funktionen ausübt.

6.4 Potenzielle zukünftige Therapieansätze einer KAI1-WT-Wiedereinführung in humane Tumorzellen

Durch Untersuchung der differentiellen zellbiologischen Effekte von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die tumorzelluläre Proliferation, Adhäsion, Migration und deren Interaktionen mit $\alpha\beta 3$ und dem EGF-R konnten neue Einblicke in die zellulären Mechanismen der Tumorprogression und Metastasierung gewonnen werden. Mithilfe dieser Erkenntnisse könnten in Zukunft prognostische Aussagen über die Tumorerkrankung getroffen und potenzielle therapeutische Ansätze etabliert werden.

In einer Vielzahl von Tumorerkrankungen ist die Aktivität von KAI1-WT verloren gegangen und/oder durch alternatives Splicing verändert, wobei dies mit einer schlechten Prognose für Tumorpatienten korreliert. Andererseits ist die Expression von KAI1-WT mit einer guten Prognose bezüglich des Patientenüberlebens vergesellschaftet. Die Wiedereinführung von KAI1-WT in u.a. Mamma-, Ovarial-, Magen-, Darm-, Pankreas- oder Prostatakarzinom- sowie Melanom- oder NSCLC-Zellen führte *in-vitro* und *in-vivo* zu einer Suppression pro-metastatischer zellulärer Funktionen sowie der Metastasierung selbst (Adachi et al., 1996; Guo et al., 1996; Hemler, 2003; Hinoda et al., 1998; Houle et al., 2002; Huang et al., 1998; Ichikawa et al., 1992; Jackson et al., 2000a; Jee et al., 2007; Liu et al., 2001; Liu et al., 2000; Liu et al., 2003a; Liu et al., 2003b; Maurer et al., 1999; Shinohara et al., 2001b; Sho et al., 1998; Sridhar & Miranti, 2006; Takaoka et al., 1998a; Takaoka et al., 1998b; Wu et al., 2004; Xu et al., 2008; Yang et al., 2001; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2003b). Die Protein- und mRNA-Spiegel von KAI1-WT bzw. KAI1-SP könnten in Zukunft als prognostische Biomarker in Tumorgewebe eingesetzt werden, um die Progressionstendenz der Tumorzellen zu bestimmen, damit eine Aussage zur Prognose der Patienten zu treffen und womöglich zur Entscheidungsfindung in der adjuvanten Therapie beitragen.

Des Weiteren könnten sie als Inspiration für tumortheraeutische Ansätze genutzt werden, in welchen die metastasierungssuppressive Aktivität von KAI1-WT funktionell wiederhergestellt wird. KAI1-WT hemmt in seiner Rolle als Metastasierungssuppressor vor allem die Invasion der Tumorzellen - ausgehend vom Primärherd - in die Blut- oder Lymphbahn und die metastatische Kolonisation an einer Sekundärlokalisierung. Die Bildung klinisch apparenter Metastasen aus disseminierten Einzelzellen oder Clustern von Tumorzellen an ektopen Lokalisationen ist der ineffektivste Prozess in der Metastasierung (Weiss, 1990; Wong et al., 2001). Metastasierungssuppressor-gezielte Therapiestrategien zielen meist exakt auf die Hemmung dieses Prozesses ab. Deshalb wirken sie spezifisch auf im Metastasierungsprozess befindliche Tumorzellen und nicht wie herkömmliche Chemotherapeutika, die auch gesunde Zellen attackieren. Die dadurch bedingte reduzierte

Nebenwirkungsrate ist stark mit einer erhöhten Compliance der Patientinnen verbunden, wodurch verbesserte Therapieerfolge erzielt werden könnten.

Etliche Mechanismen die Funktion von KAI1-WT wiederherzustellen wurden bislang diskutiert. Die Grundlagenforschung konzentrierte sich mitunter auf die Induktion des KAI1-Gens durch transkriptionelle Regulierungen. In humanen Prostatakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass der Tumorsuppressor p53 die Transkription von KAI1-WT steigerte (Mashimo et al., 1998). Etoposid, ein Induktor von p53, konnte auch als KAI1-Induktor identifiziert werden (Mashimo et al., 2000). Bei Anwendung in präklinischen Studien zeigte sich eine Induktion der KAI1-WT-Expression in Magenkarzinomzellen und ein reduziertes Auftreten hepatischer Metastasen. Allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, dass dieser Effekt spezifisch von KAI1-WT-Funktionen abhing (Wu et al., 2003). Durch die Möglichkeit der oralen Anwendung von Etoposid gilt dieser Therapieansatz als vielversprechende Variante der langzeitigen Metastasierungssuppression, jedoch müssten pleiotrope Effekte von Etoposid und einer p53-Induktion in Betracht gezogen werden. Auch das Phytoöstrogen Genistein rief *in-vitro* eine KAI1-WT-spezifische Reduktion der Invasivität der Tumorzellen und *in-vivo* eine Reexpression von KAI1-WT hervor (El Touny & Banerjee, 2007). Ein weiterer Fokus lag auf traditionell genterapeutischen Strategien. Die Applikation eines für KAI1-WT kodierenden Expressionsvektors, der mittels Liposomen in humane Pankreaskarzinomzellen eingeschleust wurde, minimierte in Nacktmäusen die Entstehung pulmonaler Metastasen (Xu et al., 2008). Auch durch die intratracheale Gabe replikationsdefizienter Adenoviren, welche KAI1-WT zur Expression brachten, wurde im NSCLC-Mausmodell ein signifikant vermindertes Gewicht mediastinaler Metastasen erreicht, während das Volumen des Primärtumors sich nicht veränderte (Takeda et al., 2007). Genterapeutische Ansätze waren jedoch bislang nicht reproduzierbar erfolgreich. Deshalb zielten etliche präklinische Studien darauf ab, KAI1-WT in die Tumorzellen direkt wiedereinzuführen. So konnte in experimentellen Tiermodellen durch eine Reexpression von KAI1-WT ein metastasierungssupprimierender Effekt - ohne Beeinflussung des Primärtumorswachstums - beobachtet werden (Hemler, 2003; Jackson et al., 2000a; Jee et al., 2007; Shinohara et al., 2001b; Sridhar & Miranti, 2006; Takaoka et al., 1998a; Takeda et al., 2007; Xu et al., 2008; Yang et al., 2001; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2003b).

Ein weiterer potenzieller Therapieansatz wird in der Beeinflussung wichtiger Signaltransduktionsmoleküle gesehen, die in die KAI1-WT-Funktion involviert sind. Besonderer Fokus liegt hierbei auf der FAK, die sowohl im Integrin- als auch im EGF-R-vermittelten Signalweg eine Rolle spielt. In einer Vielzahl von Tumorzelllinien sind die FAK mRNA-Spiegel, die FAK-Proteinexpression und deren Phosphorylierung erhöht (Golubovskaya et al., 2009; Lightfoot et al., 2004; McLean et al., 2005; Parsons et al., 2008;

Weiner et al., 1993; Zhao & Guan, 2009). Etliche *in-vitro*-Studien, in welchen FAK inaktiviert wurde, sowie *in-vivo*-Studien an FAK-knockdown Mäusen zeigten, dass diese Kinase einen bedeutenden Anteil an der Progression und Metastasierung des Mammakarzinoms hat (Benlimame et al., 2005; Lahlou et al., 2007; Luo et al., 2009; Mitra et al., 2006; Provenzano et al., 2008; Pylayeva et al., 2009; van Nimwegen et al., 2005; Wu et al., 2006). Deshalb wurden verschiedene Substanzen entwickelt, welche die Aktivität von FAK hemmen. Es konnten kleine ATP-kompetitive FAK-Inhibitoren (TAE-226, PF-573,228, PF-562,271) etabliert werden, die die aktive Domäne der Kinase binden können. Darunter vermochte der Inhibitor TAE-226 *in-vitro* und *in-vivo* das tumorzelluläre Wachstum und die Migration zu hemmen sowie die Apoptose zu induzieren, zeigte jedoch eine relativ breite Spezifität (Golubovskaya et al., 2008b; Halder et al., 2007; Hao et al., 2009; Liu et al., 2007; Shi et al., 2007). Die beiden Inhibitoren PF-573,228, PF-562,271, welche höchst selektiv für FAK waren, zeigten keinen Effekt auf die zelluläre Proliferation oder Apoptose *in-vitro*, es konnte jedoch eine Reduzierung der Angiogenese und eine Steigerung der tumorzellulären Apoptose *in-vivo* beobachtet werden (Lim et al., 2008; Roberts et al., 2008; Slack-Davis et al., 2007; Weis et al., 2008). Ein weiterer höchst spezifischer, reversibler Inhibitor des FAK-Moleküls (PND-1186/VS-4718) zeigte keine Hemmung der zweidimensionalen zellulären Proliferation und der nachgeschalteten Signalmoleküle Src oder p130^{Cas} in kultivierten adhärennten Mammakarzinomzellen. Es konnte jedoch eine Hemmung der zellulären Motilität nachgewiesen werden. In dreidimensionalen Kulturen induzierte PND-1186 die tumorzelluläre Apoptose sowie die p130^{Cas}-Aktivierung. In *in-vivo*-Studien wirkte sich dieses Substrat auf eine erhöhte Apoptoserate, ein reduziertes Tumorstadium und Aszites-assoziiertes Tumorstadium aus, ohne dass das Gewicht der Mäuse oder deren Morbidität beeinflusst wurde (Sulzmaier et al., 2014; Tanjoni et al., 2010). Neuere Präparate, die die Phosphorylierungs- und Src-Bindungsstelle des FAK-Moleküls blockierten (Y15), inhibierten die tumorzelluläre Proliferation und aktivierten die Apoptose (Golubovskaya et al., 2012; Golubovskaya et al., 2013; Golubovskaya et al., 2008a; Hochwald et al., 2009). Zusammenfassend zeigte sich eine Induzierung der Apoptose sowie eine Inhibierung der Angiogenese und Tumormetastasierung. Derzeit werden mehrere therapeutische FAK-Inhibitoren in klinischen Phase I Studien erforscht, die bereits vielversprechende Erfolge in *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen gezeigt hatten. Dabei wurden die Studien mit PF562,271 bei unzureichender Pharmakokinetik nicht fortgeführt, wohingegen PF-04554878/VS-6063 – ein Inhibitor späterer Generation – in einigen Tumorarten zu einer stabilen Tumorsituation führte und insgesamt gut vertragen wurde (Infante et al., 2012; Sulzmaier et al., 2014). Da für VS-6063 sogar eine Verstärkung der Taxan-Sensitivität in Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen worden war, wurde eine Phase I/Ib Studie etabliert, die die Effektivität und Sicherheit der kombinierten Therapie mit Paclitaxel untersucht (Kang et

al., 2013; Sulzmaier et al., 2014). Interessanterweise wurde auch für die kombinierte Therapie von Doxorubicin oder der Radiatio mit FAK-Inaktivatoren eine erhöhte Wirksamkeit beobachtet (Sulzmaier et al., 2014; Tavora et al., 2014). FAK-Inhibitoren stellen somit eine vielversprechende zukünftige Therapieoption in der Tumorthherapie dar und werden momentan in klinischen Phase II Studien erprobt (Sulzmaier et al., 2014).

Ein weiterer Fokus in der Erforschung potenzieller Tumorthérapien wurde auf die KAI1-Interaktionspartner $\alpha\beta 3$ und den EGF-R gelegt. Zur Inhibierung der EGF-R-Aktivität wurden Rezeptor-inhibitorische Immunglobuline verwendet (Yarden & Sliwkowski, 2001). Cetuximab beispielsweise, welches derzeit in späten klinischen Studien Einsatz findet, inhibiert die Ligandenbindung an den EGF-R und führt kultivierte Zellen in der Zellzyklusphase G1 in den Zellzyklusarrest (Lo Nigro et al., 2016; Wu et al., 1996). Intrazelluläre Antikörper gegen ErbB-Rezeptoren, welche den Rezeptortransfer vom endoplasmatischen Retikulum hin zur Zellmembran inhibieren, beeinflussten intrazelluläre ErbB-abhängige Signalkaskaden negativ (Beerli et al., 1994). Tyrosinkinase-Inhibitoren des EGF-R reduzierten sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* die tumorzelluläre Proliferation und finden derzeit ebenso Anwendung in späten klinischen Studien (Cameron et al., 2008; Crown et al., 2012; Fry et al., 1998; Maemondo et al., 2010; Venugopalan et al., 2016). Des Weiteren wurden Inhibitoren der EGF-R-abhängigen Signaltransduktionsmoleküle Src, RAS, MAPK und Akt etabliert (Brugge, 1993; Lin et al., 2016; Pang & Liu, 2016). Als gezielte tumortherapeutische Therapieoption, die auf $\alpha\beta 3$ aufbaut, konnte beispielsweise ein zyklisches RGD-enthaltendes Pentapeptid namens Cilengitide etabliert werden, welches selektiv die tumorprogressiven Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen der Integrine $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ in verschiedensten Tiermodellen inhibierte (Bauerle et al., 2011; Buerkle et al., 2002; Gvozdenovic et al., 2016; MacDonald et al., 2001; Mitjans et al., 2000; Monnier et al., 2008; Onishi et al., 2013; Yamada et al., 2006). Die Verwendung eines zytolytischen, pro-apoptotischen Peptids, das strukturell mit einem RGD-enthaltenden Peptid verbunden war, führte in kultivierten Tumorzellen zu einem raschen Auftreten von Apoptose. In Tiermodellen kam es zu einer Hemmung der Tumorpheriferation und einer signifikanten Reduzierung des Tumolvolumens und der Metastasierung (Qifan et al., 2016). Aufgrund des nebenwirkungsarmen Profils von Cilengitide ging es als Integrin-gezielte Therapiemöglichkeit in klinische Studien ein, wobei jedoch nur ein geringer anti-tumoraler Effekt beobachtet werden konnte (Reardon et al., 2008; Stupp et al., 2014; Qifan et al., 2016).

Tumorthérapeutische Optionen zielen bislang zusammenfassend vor allem auf die Hemmung von $\alpha\beta 3$ und des EGF-R und deren Signalwege, inklusive FAK, ab. Um erfolgreiche KAI1-basierte Therapieansätze zu erschaffen, die künftig auch in klinischen Studien eingesetzt werden könnten, erscheint es unvermeidbar, die exakten Mechanismen,

die den tumorbiologischen Funktionen von KAI1-WT und KAI1-SP zugrunde liegen und deren funktionelle Interaktionen mit Integrinen, Wachstumsfaktorrezeptoren und deren Signalwegen genauestens zu charakterisieren. Die Möglichkeit therapeutische Strategien zu etablieren, die gezielt Tumorzellen ansteuern, die im Verlauf der Tumorprogression die Aktivität eines bestimmten Proteins wie KAI-WT verloren haben, erscheint aufgrund der erhöhten Spezifität höchst zielführend, da physiologische Zellen das Protein weiter exprimieren. Hierbei könnten die toxischen Effekte herkömmlicher Chemotherapeutika auf physiologisch stark proliferierende Zellen wie Zellen des Gastrointestinaltrakts oder hämatopoetische Zellen entfallen und die Tumorthherapie somit nebenwirkungsärmer, besser verträglich – mit höherer Compliance der Patienten - und vor allem gezielter eingesetzt werden.

6.5 Kontroverse Diskussion um den Ursprung der Zelllinie MDA-MB-435

Seit dem Jahr 2000 wurde die MDA-MB-435-Zelllinie immer wieder Grund für kontroverse Diskussionen darüber, ob es sich bei dieser nicht – wie bisher angenommen - um Mammakarzinomzellen, sondern stattdessen um die Melanomzelllinie M14 handle. Zu Beginn meiner Arbeiten waren MDA-MB-435-Zellen als Bestandteil einer Mammakarzinomzelllinie akzeptiert und angesehen. Sie bildeten nach Injektion in das Brustfettgewebe von Mäusen Primärtumoren und mammakarzinomspezifische Metastasen aus (Price, 1996; Price et al., 1990; Price & Zhang, 1990). Außerdem exprimieren sie brust- und epithelspezifische Marker, unter anderem die brustspezifischen Differenzierungs- und Milchproteine, Lactalbumin, Keratin 19 und Pankeratin und sezernieren Milchlipide wie dies auch in anderen etablierten Mammakarzinomzelllinien beobachtet wird (Sellappan et al., 2004). Es konnten aber auch Melanom-typische Proteine wie die Tyrosinase, Melan A oder S100 nachgewiesen werden, nicht jedoch wie bei den meisten Melanomzelllinien der Transkriptionsfaktor MITF und das HMB45 Antigen (Ellison et al., 2002; Sellappan et al., 2004). Es ist nicht ungewöhnlich, dass verschiedenste Tumorzellarten Marker und Proteine exprimieren, die normalerweise mit einem anderen Tumortyp assoziiert sind (sog. *lineage infidelity*, „Linienuntreue“) und MDA-MB-435 als hochaggressive Mammakarzinomzelllinie reduzierte Mengen an brust- und epithelspezifischen Proteinen aufweist (Montel et al., 2009; Sellappan et al., 2004; Zhang et al., 2010). Die Koexpression epithelialer brustspezifischer und melanomspezifischer Marker konnte in vielen Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden und wurde mit niedrig differenziertem oder metaplastischem Tumorgewebe in Verbindung gebracht (Bachmeier et al., 2008; Bignold, 2005; Nobukawa et al., 1999; Padmore et al., 1996; Ruffolo et al., 1997; Yen et al., 2000). Wurden MDA-MB-435-Zellen mit dem Metastasierungssuppressor nm23 transfiziert, zeigten sie die morphologischen Kriterien normaler, epithelialer Brustdrüsenzellen und bildeten wie diese dreidimensionale Drüsenstrukturen und Milchbestandteile (Howlett et al., 1994). Des Weiteren ergaben Karyotypisierungen, dass die Zelllinien MDA-MB-435 und M14 beide kein Y-Chromosom enthielten und somit weiblichen Ursprungs seien (Chambers, 2009; Rae et al., 2007). Die ursprüngliche M14-Zelllinie wurde jedoch 1975 aus einer Melanom-Metastase eines 33-jährigen männlichen Patienten isoliert (Chee et al., 1976). Aufgrund dieser Daten wurde darüberhinaus die These aufgestellt, dass beide aktuellen Zelllinien in Wirklichkeit die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 darstellten (Chambers, 2009).

Allerdings gewannen Publikationen, dass es sich bei der aktuellen MDA-MB-435-Zelllinie nicht um Mammakarzinomzellen sondern stattdessen um Melanomzellen handle, im Laufe dieser Dissertation immer mehr an Bedeutung. Als Grund dafür wurde eine frühe Vertauschung oder Kontamination mit der Melanomzelllinie betrachtet. Dies sei kein seltener

Fehler in Zellkultursystemen (MacLeod et al., 1999; Thompson et al., 2004). Eine weitere mögliche Ursache könnte eine Transdifferenzierung zu einem Melanom-artigen Phänotyp darstellen (Rae et al., 2007). Verschiedene Genexpressionsstudien zeigten, dass MDA-MB-435-Zellen eine große Anzahl Melanom-assoziiertes Gene exprimieren und mit Melanomzellen *Cluster* bilden (Ellison et al., 2002; Rae et al., 2007; Ross et al., 2000). Erstaunlicherweise bilden aber auch die anderen Mammakarzinomzelllinien nicht wie andere Tumorzelltypen gemeinsame Cluster (Ross et al., 2000). Die These des melanomatösen Ursprungs der MDA-MB-435-Zellen wurde auch durch CpG-Promotor-Hypermethylierungen (Paz et al., 2003), SNP- (*single nucleotide polymorphism*-) Untersuchungen (Garraway et al., 2005; Rae et al., 2007) und miRNA-Expressionsstudien (Gaur et al., 2007) gestützt (Prasad & Gopalan, 2015). Weitere molekulare Techniken wie Karyotypisierung, Genom-Hybridisierung oder Mikrosatelliten-Analysen entfachten die Diskussion weiter (Rae et al., 2007; Rae et al., 2004). Die unerheblichen Unterschiede in beispielsweise einer von neun Mikrosatelliten-Stellen seien durch phänotypische und genotypische Genveränderungen (sog. *clonal drift*) zu erklären (Rae et al., 2007). Solche Unterschiede fänden sich ebenso in verschiedenen Subkulturen der MDA-MB-435-Zelllinie (Rae et al., 2004). Dies führte dazu, dass verschiedene Studien zu dem Ergebnis kamen, MDA-MB-435-Zellen seien misidentifiziert und wären tatsächlich Melanomzellen (Christgen & Lehmann, 2007; Lacroix, 2008; Prasad & Gopalan, 2015; Rae et al., 2007).

Neueste Studien bekräftigten diese Hypothese, indem frühe Proben der M14-Zelllinie und dessen Spenderserums untersucht wurden, die vor der Etablierung der MDA-MB-435-Zelllinie eingelagert worden waren (Korch et al., 2018). Mittels STR- und zytogenetischen Analysen wurde gezeigt, dass die M14-Zellen tatsächlich mit den Spendercharakteristika wie Geschlecht, Blutgruppe und zelltypspezifischen Eigenschaften übereinstimmten. Widersprüchlich zeigte sich jedoch, dass sowohl M14- als auch MDA-MB-435-Zellen keine Y-spezifischen, jedoch hemi- oder homozygote X-spezifische SNP-Stellen beinhalten. Der XX-Karyotyp wurde durch X-chromosomale uniparenterale Disomie erklärt. In FISH-Analysen beobachtete man in beiden Zelllinien eine Y/22-Chromosomentranslokation. Die Autoren begründeten diese Ergebnisse mit dem Verlust Y-spezifischer Stellen im Rahmen der Krankheitsprogression oder während der Etablierung der Zelllinie, was nicht ungewöhnlich für Zellkulturen sei (Korch et al., 2018).

Zusammenfassend wurde der Ursprung der MDA-MB-435-Zelllinie in den letzten beiden Jahrzehnten kontrovers diskutiert, wobei die allgemeine Expertenmeinung aktuell die MDA-MB-435-Zelllinie als Melanomzelllinie ansieht. Vor Beginn unserer Arbeiten fühlten wir uns jedoch bestätigt, dass die MDA-MB-435-Zelllinie ihren Ursprung tatsächlich im Brustepithel findet und die wichtigsten Aspekte von Mammakarzinomzellen bedient, auch wenn sie

melanomspezifische Proteine exprimiert. Sie bildete ein ausgezeichnetes Modell eines hochaggressiven, dedifferenzierten Mammakarzinoms, das während der Dedifferenzierung aufgrund von genetischer Instabilität morphologisch einen melanozytären Phänotyp angenommen hatte. Deshalb schufen wir 2009 ein vermeintliches Mammakarzinomzellmodell, bestehend aus MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen und bauten auf dieser Grundlage die gesamte Studie auf.

Den aktuellen Entwicklungen entsprechend sei anzumerken, dass jegliche publizierten Ergebnisse seit Beginn der MDA-MB-435-Studien zwar als Niederlage der Mammakarzinomforschung, jedoch als große Bereicherung der Melanomforschung angesehen werden können. Vorliegende Arbeit beispielsweise würde dann nicht zwei Mammakarzinomzelllinien untereinander, sondern Zelllinien zweier unterschiedlicher Tumorentitäten – der Brust und der Haut – miteinander vergleichen. Hierbei wäre ersichtlich, dass die beiden KAI1-Proteine künftig wohl auch in der Melanomforschung berücksichtigt werden müssen und sich KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-abhängige Effekte auf die zelluläre Proliferation, Adhäsion und die Wechselwirkung mit dem EGF-R oder mit dem $\alpha\beta 3$ -Integrin und auf die assoziierten Signalwege auch in Melanomzelllinien beobachten lassen. Damit ergäben sich auch beim malignen Melanom völlig neue zellbiologische Aspekte, auf denen potenziell künftig eine Aussage zur Prognose des Patienten getroffen und Therapiemöglichkeiten erschaffen werden könnten.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktureller Aufbau der Tetraspanine	7
Abbildung 2:	Struktureller Aufbau der Integrine	16
Abbildung 3:	Konformationsänderung der Integrine entsprechend ihres Aktivierungszustands	18
Abbildung 4:	Intrazelluläre Integrin-abhängige Signalkaskaden.....	20
Abbildung 5:	Intrazelluläre EGF-R-abhängige Signalkaskaden	25
Abbildung 6:	Metastasierungssupprimierende Wirkmechanismen von KAI1.....	28
Abbildung 7:	Nachweis der KAI1-Expressionshöhe nach stabiler Transfektion von MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen	54
Abbildung 8:	Endogene KAI1-Expression in MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen.....	55
Abbildung 9:	Nachweis der zellulären Expression des Integrins $\alpha\beta 3$ in MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen.....	57
Abbildung 10:	Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Expression des Integrins $\alpha\beta 3$	58
Abbildung 11:	Untersuchung der Kolokalisierung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit der Integrin-Untereinheit αv und dem Integrin $\alpha\beta 3$	62
Abbildung 12:	Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre $\alpha\beta 3$ -VN-vermittelte Zelladhäsionskapazität.....	64
Abbildung 13:	Adhäsionsprofil nach Kultivierung auf verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen	66
Abbildung 14:	Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Expression von p-FAK.....	68
Abbildung 15:	Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Proliferationsaktivität	70
Abbildung 16:	Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Expression von EGF-R.....	73
Abbildung 17:	Beeinflussung der zellulären Distribution des EGF-R als Funktion der Expression von KAI1-WT und KAI1-SP	74
Abbildung 18:	Effekt von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die transkriptionelle Regulation des EGF-R	75
Abbildung 19:	Effekt einer EGF-Stimulation auf die Zellproliferation von KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Zelltransfektanten.....	76

- Aaboe, M., Offersen, B. V., Christensen, A., & Andreasen, P. A. (2003). Vitronectin in human breast carcinomas. *Biochim Biophys Acta*, 1638(1), 72-82.
- Abe, M., Sugiura, T., Takahashi, M., Ishii, K., Shimoda, M., & Shirasuna, K. (2008). A novel function of CD82/KAI-1 on E-cadherin-mediated homophilic cellular adhesion of cancer cells. *Cancer Lett*, 266(2), 163-170. doi:10.1016/j.canlet.2008.02.058
- Adachi, M., Taki, T., Ieki, Y., Huang, C. L., Higashiyama, M., & Miyake, M. (1996). Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 56(8), 1751-1755.
- Adair, B. D., & Yeager, M. (2002). Three-dimensional model of the human platelet integrin alpha IIb beta 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22), 14059-14064. doi:10.1073/pnas.212498199
- Agochiya, M., Brunton, V. G., Owens, D. W., Parkinson, E. K., Paraskeva, C., Keith, W. N., & Frame, M. C. (1999). Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene*, 18(41), 5646-5653. doi:10.1038/sj.onc.1202957
- Andre, F., Scharz, N. E., Chaput, N., Flament, C., Raposo, G., Amigorena, S., Zitvogel, L. (2002). Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine*, 20 Suppl 4, A28-31.
- Andre, M., Le Caer, J. P., Greco, C., Planchon, S., El Nemer, W., Boucheix, C., Le Naour, F. (2006). Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. *Proteomics*, 6(5), 1437-1449. doi:10.1002/pmic.200500180
- Angelisova, P., Hilgert, I., & Horejsi, V. (1994). Association of four antigens of the tetraspanin family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics*, 39(4), 249-256.
- Anthis, N. J., & Campbell, I. D. (2011). The tail of integrin activation. *Trends Biochem Sci*, 36(4), 191-198. doi:10.1016/j.tibs.2010.11.002
- Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Easton, D. F. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, 72(5), 1117-1130. doi:10.1086/375033
- Arduise, C., Abache, T., Li, L., Billard, M., Chabanon, A., Ludwig, A., Le Naour, F. (2008). Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J Immunol*, 181(10), 7002-7013.
- Arnaout, M. A., Mahalingam, B., & Xiong, J. P. (2005). Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 381-410. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151217
- ATCC. *HTB-26*. Produktinformation.
- Aumailley, M., Gurrath, M., Muller, G., Calvete, J., Timpl, R., & Kessler, H. (1991). Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett*, 291(1), 50-54.
- AWMF, L. O. (2012). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.
- Bachmeier, B. E., Nerlich, A. G., Mirisola, V., Jochum, M., & Pfeffer, U. (2008). Lineage infidelity and expression of melanocytic markers in human breast cancer. *Int J Oncol*, 33(5), 1011-1015.
- Bandyopadhyay, S., Zhan, R., Chaudhuri, A., Watabe, M., Pai, S. K., Hirota, S., Watabe, K. (2006). Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat Med*, 12(8), 933-938. doi:10.1038/nm1444
- Bari, R., Zhang, Y. H., Zhang, F., Wang, N. X., Stipp, C. S., Zheng, J. J., & Zhang, X. A. (2009). Transmembrane interactions are needed for KAI1/CD82-mediated suppression of cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol*, 174(2), 647-660. doi:10.2353/ajpath.2009.080685

- Barnes, B. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland. *Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut*.
- Bass, R., Werner, F., Odintsova, E., Sugiura, T., Berditchevski, F., & Ellis, V. (2005). Regulation of urokinase receptor proteolytic function by the tetraspanin CD82. *J Biol Chem*, 280(15), 14811-14818. doi:10.1074/jbc.M414189200
- Bauerle, T., Komljenovic, D., Merz, M., Berger, M. R., Goodman, S. L., & Semmler, W. (2011). Cilengitide inhibits progression of experimental breast cancer bone metastases as imaged noninvasively using VCT, MRI and DCE-MRI in a longitudinal in vivo study. *Int J Cancer*, 128(10), 2453-2462. doi:10.1002/ijc.25563
- Beck, V., Herold, H., Benge, A., Luber, B., Hutzler, P., Tschesche, H., Reuning, U. (2005). ADAM15 decreases integrin alphavbeta3/vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RGD-dependent fashion. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(3), 590-603. doi:10.1016/j.biocel.2004.08.005
- Berli, R. R., Wels, W., & Hynes, N. E. (1994). Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation. *J Biol Chem*, 269(39), 23931-23936.
- Benlimame, N., He, Q., Jie, S., Xiao, D., Xu, Y. J., Loignon, M., Alaoui-Jamali, M. A. (2005). FAK signaling is critical for ErbB-2/ErbB-3 receptor cooperation for oncogenic transformation and invasion. *J Cell Biol*, 171(3), 505-516. doi:10.1083/jcb.200504124
- Berditchevski, F. (2001). Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci*, 114(Pt 23), 4143-4151.
- Berditchevski, F., & Odintsova, E. (1999). Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol*, 146(2), 477-492.
- Berditchevski, F., Odintsova, E., Sawada, S., & Gilbert, E. (2002). Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem*, 277(40), 36991-37000. doi:10.1074/jbc.M205265200
- Berger, J. C., Vander Griend, D. J., Robinson, V. L., Hickson, J. A., & Rinker-Schaeffer, C. W. (2005). Metastasis suppressor genes: from gene identification to protein function and regulation. *Cancer Biol Ther*, 4(8), 805-812.
- Bienstock, R. J., & Barrett, J. C. (2001). KAI1, a prostate metastasis suppressor: prediction of solvated structure and interactions with binding partners; integrins, cadherins, and cell-surface receptor proteins. *Mol Carcinog*, 32(3), 139-153.
- Bignold, L. P. (2005). Embryonic reversions and lineage infidelities in tumour cells: genome-based models and role of genetic instability. *Int J Exp Pathol*, 86(2), 67-79. doi:10.1111/j.0959-9673.2005.00421.x
- Blichert-Toft, M., Smola, M. G., Cataliotti, L., & O'Higgins, N. (1998). Principles and guidelines for surgeons--management of symptomatic breast cancer. On behalf of the European Society of Surgical Oncology. *Ann Chir Gynaecol*, 87(1), 101-109.
- Boucheix, C., Duc, G. H., Jasmin, C., & Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins and malignancy. *Expert Rev Mol Med*, 2001, 1-17. doi:doi:10.1017/S1462399401002381
- Bronner-Fraser, M. (1985). Alterations in neural crest migration by a monoclonal antibody that affects cell adhesion. *J Cell Biol*, 101(2), 610-617.
- Brooks, P. C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F. H., & Cheresh, D. A. (1995). Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest*, 96(4), 1815-1822. doi:10.1172/jci118227
- Brugge, J. S. (1993). New intracellular targets for therapeutic drug design. *Science*, 260(5110), 918-919.
- Buerkle, M. A., Pahernik, S. A., Sutter, A., Jonczyk, A., Messmer, K., & Dellian, M. (2002). Inhibition of the alpha-nu integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *Br J Cancer*, 86(5), 788-795. doi:10.1038/sj.bjc.6600141
- Burden, S., & Yarden, Y. (1997). Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*, 18(6), 847-855.
- Cabodi, S., Di Stefano, P., Leal Mdel, P., Tinnirello, A., Bisaro, B., Morello, V., Defilippi, P. (2010). Integrins and signal transduction. *Adv Exp Med Biol*, 674, 43-54.

- Cabodi, S., Moro, L., Bergatto, E., Boeri Erba, E., Di Stefano, P., Turco, E., Defilippi, P. (2004). Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt3), 438-442. doi:10.1042/bst0320438
- Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, 14(11), 911-915.
- Cameron, D., Casey, M., Press, M., Lindquist, D., Pienkowski, T., Romieu, C. G., Geyer, C. E. (2008). A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. *Breast Cancer Res Treat*, 112(3), 533-543. doi:10.1007/s10549-007-9885-0
- Capes-Davis, A., Theodosopoulos, G., Atkin, I., Drexler, H. G., Kohara, A., MacLeod, R. A., Freshney, R. I. (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer*, 127(1), 1-8. doi:10.1002/ijc.25242
- Carreiras, F., Denoux, Y., Staedel, C., Lehmann, M., Sichel, F., & Gauduchon, P. (1996). Expression and localization of alpha v integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 62(2), 260-267. doi:10.1006/gyno.1996.0225
- Cary, L. A., Han, D. C., Polte, T. R., Hanks, S. K., & Guan, J. L. (1998). Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol*, 140(1), 211-221.
- Cha, J. H., Brooke, J. S., Ivey, K. N., & Eidels, L. (2000). Cell surface monkey CD9 antigen is a coreceptor that increases diphtheria toxin sensitivity and diphtheria toxin receptor affinity. *J Biol Chem*, 275(10), 6901-6907.
- Chambers, A. F. (2009). MDA-MB-435 and M14 cell lines: identical but not M14 melanoma? *Cancer Res*, 69(13), 5292-5293. doi:10.1158/0008-5472.can-09-1528
- Charrin, S., le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P. E., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2009). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J*, 420(2), 133-154. doi:10.1042/bj20082422
- Charrin, S., Manie, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2002). Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett*, 516(1-3), 139-144.
- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis*, 32(1-2), 35-48. doi:10.3233/bd-2010-0307
- Chee, D. O., Boddie, A. W., Roth, J. A., Holmes, E. C., & Morton, D. L. (1976). Production of melanoma-associated antigen(s) by a defined malignant melanoma cell strain grown in chemically defined medium. *Cancer Res*, 36(4), 1503-1509.
- Chen, X., & Resh, M. D. (2002). Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 277(51), 49631-49637. doi:10.1074/jbc.M208327200
- Cho, M. K. (2013). Elevated KAI1 Protein Expression Identified in Malignant Melanoma. *Ann Dermatol*, 25(4), 498-500. doi:10.5021/ad.2013.25.4.498
- Christgen, M., & Lehmann, U. (2007). MDA-MB-435: the questionable use of a melanoma cell line as a model for human breast cancer is ongoing. *Cancer Biol Ther*, 6(9), 1355-1357.
- Claas, C., Stipp, C. S., & Hemler, M. E. (2001). Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem*, 276(11), 7974-7984. doi:10.1074/jbc.M008650200
- Crown, J., O'Shaughnessy, J., & Gullo, G. (2012). Emerging targeted therapies in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*, 23 Suppl 6, vi56-65. doi:10.1093/annonc/mds196
- D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H., & Plow, E. F. (1991). Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci*, 16(7), 246-250.
- Danen, E. H., Jansen, K. F., Van Kraats, A. A., Cornelissen, I. M., Ruiters, D. J., & Van Muijen, G. N. (1995). Alpha v-integrins in human melanoma: gain of alpha v beta 3

- and loss of alpha v beta 5 are related to tumor progression in situ but not to metastatic capacity of cell lines in nude mice. *Int J Cancer*, 61(4), 491-496.
- Danglot, L., Chaineau, M., Dahan, M., Gendron, M. C., Boggetto, N., Perez, F., & Galli, T. (2010). Role of TI-VAMP and CD82 in EGFR cell-surface dynamics and signaling. *J Cell Sci*, 123(Pt 5), 723-735. doi:10.1242/jcs.062497
- Darby, S., McGale, P., Correa, C., Taylor, C., Arriagada, R., Clarke, M., Peto, R. (2011). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*, 378(9804), 1707-1716. doi:10.1016/s0140-6736(11)61629-2
- Davies, C., Godwin, J., Gray, R., Clarke, M., Cutter, D., Darby, S., Peto, R. (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 378(9793), 771-784. doi:10.1016/s0140-6736(11)60993-8
- de Bruijn, M. H., & Fey, G. H. (1985). Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(3), 708-712.
- Desgrosellier, J. S., Barnes, L. A., Shields, D. J., Huang, M., Lau, S. K., Prevost, N., Cheresh, D. A. (2009). An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med*, 15(10), 1163-1169. doi:10.1038/nm.2009
- Desgrosellier, J. S., & Cheresh, D. A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 10(1), 9-22. doi:10.1038/nrc2748
- Devor, B. B., Zhang, X., Patel, S. K., Polte, T. R., & Hanks, S. K. (1993). Chicken and mouse focal adhesion kinases are similar in structure at their amino termini. *Biochem Biophys Res Commun*, 190(3), 1084-1089. doi:10.1006/bbrc.1993.1160
- Dewis, R., & Gribbin, J. (2009). National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance *Breast Cancer: Diagnosis and Treatment: An Assessment of Need*. Cardiff (UK): National Collaborating Centre for Cancer (UK)
- Dickson, R. B., & Lippman, M. E. (1987). Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocr Rev*, 8(1), 29-43. doi:10.1210/edrv-8-1-29
- Dong, J. T., Lamb, P. W., Rinker-Schaeffer, C. W., Vukanovic, J., Ichikawa, T., Isaacs, J. T., & Barrett, J. C. (1995). KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*, 268(5212), 884-886.
- Drucker, L., Tohami, T., Tartakover-Matalon, S., Zismanov, V., Shapiro, H., Radnay, J., & Lishner, M. (2006). Promoter hypermethylation of tetraspanin members contributes to their silencing in myeloma cell lines. *Carcinogenesis*, 27(2), 197-204. doi:10.1093/carcin/bgi209
- DStatis, S. B. (2014). Sterbefälle insgesamt 2014 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10).
- El Touny, L. H., & Banerjee, P. P. (2007). Genistein induces the metastasis suppressor kangai-1 which mediates its anti-invasive effects in TRAMP cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 361(1), 169-175. doi:10.1016/j.bbrc.2007.07.010
- Ellison, G., Klinowska, T., Westwood, R. F., Docter, E., French, T., & Fox, J. C. (2002). Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol Pathol*, 55(5), 294-299.
- Felding-Habermann, B. (2003). Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 20(3), 203-213.
- Fidler, I. J., & Poste, G. (2008). The "seed and soil" hypothesis revisited. *Lancet Oncol*, 9(8), 808. doi:10.1016/s1470-2045(08)70201-8
- Fry, D. W., Bridges, A. J., Denny, W. A., Doherty, A., Greis, K. D., Hicks, J. L., Dobrusin, E. M. (1998). Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20), 12022-12027.

- Fukudome, K., Furuse, M., Imai, T., Nishimura, M., Takagi, S., Hinuma, Y., & Yoshie, O. (1992). Identification of membrane antigen C33 recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation: altered glycosylation of C33 antigen in HTLV-1-positive T cells. *J Virol*, 66(3), 1394-1401.
- Gahmberg, C. G., Fagerholm, S. C., Nurmi, S. M., Chavakis, T., Marchesan, S., & Gronholm, M. (2009). Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta*, 1790(6), 431-444. doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.007
- Gailit, J., & Ruoslahti, E. (1988). Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *J Biol Chem*, 263(26), 12927-12932.
- Galliher, A. J., & Schiemann, W. P. (2006). Beta3 integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res*, 8(4), R42. doi:10.1186/bcr1524
- Garcia-Espana, A., Chung, P. J., Sarkar, I. N., Stiner, E., Sun, T. T., & Desalle, R. (2008). Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. *Genomics*, 91(4), 326-334. doi:10.1016/j.ygeno.2007.12.005
- Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., Sellers, W. R. (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, 436(7047), 117-122. doi:10.1038/nature03664
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Ward, C. W. (2002). Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*, 110(6), 763-773.
- Gasparini, G., Brooks, P. C., Biganzoli, E., Vermeulen, P. B., Bonoldi, E., Dirix, L. Y., Cheresch, D. A. (1998). Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 4(11), 2625-2634.
- Gaur, A., Jewell, D. A., Liang, Y., Ridzon, D., Moore, J. H., Chen, C., Israel, M. A. (2007). Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 67(6), 2456-2468. doi:10.1158/0008-5472.can-06-2698
- GeKID, G. d. e. K. i. D. (2015). Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut.
- Giancotti, F. G., & Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science*, 285(5430), 1028-1032.
- Goel, H. L., & Languino, L. R. (2004). Integrin signaling in cancer. *Cancer Treat Res*, 119, 15-31.
- Goldberg, J. I., & Borgen, P. I. (2006). Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther*, 6(8), 1205-1214. doi:10.1586/14737140.6.8.1205
- Golubovskaya, V. M., Figel, S., Ho, B. T., Johnson, C. P., Yemma, M., Huang, G., Cance, W. G. (2012). A small molecule focal adhesion kinase (FAK) inhibitor, targeting Y397 site: 1-(2-hydroxyethyl)-3, 5, 7-triaza-1-azoniatricyclo [3.3.1.1(3,7)]decane; bromide effectively inhibits FAK autophosphorylation activity and decreases cancer cell viability, clonogenicity and tumor growth in vivo. *Carcinogenesis*, 33(5), 1004-1013. doi:10.1093/carcin/bgs120
- Golubovskaya, V. M., Ho, B., Zheng, M., Magis, A., Ostrov, D., Morrison, C., & Cance, W. G. (2013). Disruption of focal adhesion kinase and p53 interaction with small molecule compound R2 reactivated p53 and blocked tumor growth. *BMC Cancer*, 13, 342. doi:10.1186/1471-2407-13-342
- Golubovskaya, V. M., Kweh, F. A., & Cance, W. G. (2009). Focal adhesion kinase and cancer. *Histol Histopathol*, 24(4), 503-510. doi:10.14670/hh-24.503
- Golubovskaya, V. M., Nyberg, C., Zheng, M., Kweh, F., Magis, A., Ostrov, D., & Cance, W. G. (2008a). A small molecule inhibitor, 1,2,4,5-benzenetetraamine tetrahydrochloride, targeting the y397 site of focal adhesion kinase decreases tumor growth. *J Med Chem*, 51(23), 7405-7416. doi:10.1021/jm800483v
- Golubovskaya, V. M., Virnig, C., & Cance, W. G. (2008b). TAE226-induced apoptosis in breast cancer cells with overexpressed Src or EGFR. *Mol Carcinog*, 47(3), 222-234. doi:10.1002/mc.20380

- Gorgoulis, V., Aninos, D., Mikou, P., Kanavaros, P., Karameris, A., Joordanoglou, J., Spandidos, D. A. (1992). Expression of EGF, TGF- α and EGFR in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res*, 12(4), 1183-1187.
- Gradishar, W. J., Anderson, B. O., Balassanian, R., Blair, S. L., Burstein, H. J., Cyr, A., Kumar, R. (2016). Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, 14(3), 324-354.
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., & Hynes, N. E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo j*, 16(7), 1647-1655. doi:10.1093/emboj/16.7.1647
- Guo, X., Friess, H., Graber, H. U., Kashiwagi, M., Zimmermann, A., Korc, M., & Buchler, M. W. (1996). KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases. *Cancer Res*, 56(21), 4876-4880.
- Guo, X. Z., Xu, J. H., Liu, M. P., Kleeff, J., Ho, C. K., Ren, L. N., Friess, H. (2005). KAI1 inhibits anchorage-dependent and -independent pancreatic cancer cell growth. *Oncol Rep*, 14(1), 59-63.
- Gupta, G. P., & Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695. doi:10.1016/j.cell.2006.11.001
- Gvozdenovic, A., Boro, A., Meier, D., Bode-Lesniewska, B., Born, W., Muff, R., & Fuchs, B. (2016). Targeting α v β 3 and α v β 5 integrins inhibits pulmonary metastasis in an intratibial xenograft osteosarcoma mouse model. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.10461
- Halder, J., Lin, Y. G., Merritt, W. M., Spannuth, W. A., Nick, A. M., Honda, T., Sood, A. K. (2007). Therapeutic efficacy of a novel focal adhesion kinase inhibitor TAE226 in ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 67(22), 10976-10983. doi:10.1158/0008-5472.can-07-2667
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hantgan, R. R., Paumi, C., Rocco, M., & Weisel, J. W. (1999). Effects of ligand-mimetic peptides Arg-Gly-Asp-X (X = Phe, Trp, Ser) on α 5 β 1 integrin conformation and oligomerization. *Biochemistry*, 38(44), 14461-14474.
- Hao, H., Naomoto, Y., Bao, X., Watanabe, N., Sakurama, K., Noma, K., Takaoka, M. (2009). Focal adhesion kinase as potential target for cancer therapy (Review). *Oncol Rep*, 22(5), 973-979.
- Hapke, S., Kessler, H., Arroyo de Prada, N., Bengel, A., Schmitt, M., Lengyel, E., & Reuning, U. (2001). Integrin α v β 3/vitronectin interaction affects expression of the urokinase system in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem*, 276(28), 26340-26348. doi:10.1074/jbc.M100181200
- Hapke, S., Kessler, H., Lubber, B., Bengel, A., Hutzler, P., Hofler, H., Reuning, U. (2003). Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin α v β 3/Vitronectin interaction. *Biol Chem*, 384(7), 1073-1083. doi:10.1515/bc.2003.120
- He, B., Liu, L., Cook, G. A., Grgurevich, S., Jennings, L. K., & Zhang, X. A. (2005). Tetraspanin CD82 attenuates cellular morphogenesis through down-regulating integrin α 6-mediated cell adhesion. *J Biol Chem*, 280(5), 3346-3354. doi:10.1074/jbc.M406680200
- Hemler, M. E. (2001). Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol*, 155(7), 1103-1107. doi:10.1083/jcb.200108061
- 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. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153609
- Hemler, M. E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(10), 801-811. doi:10.1038/nrm1736
- Hemler, M. E., Mannion, B. A., & Berditchevski, F. (1996). Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1287(2-3), 67-71.
- Higginbottom, A., Quinn, E. R., Kuo, C. C., Flint, M., Wilson, L. H., Bianchi, E., Levy, S. (2000). Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol*, 74(8), 3642-3649.

- Hinoda, Y., Adachi, Y., Takaoka, A., Mitsuuchi, H., Satoh, Y., Itoh, F., Imai, K. (1998). Decreased expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in gastric cancer. *Cancer Lett*, 129(2), 229-234.
- Hirohashi, S. (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*, 153(2), 333-339. doi:10.1016/s0002-9440(10)65575-7
- Hochwald, S. N., Nyberg, C., Zheng, M., Zheng, D., Wood, C., Massoll, N. A., Golubovskaya, V. M. (2009). A novel small molecule inhibitor of FAK decreases growth of human pancreatic cancer. *Cell Cycle*, 8(15), 2435-2443. doi:10.4161/cc.8.15.9145
- Horvath, G., Serru, V., Clay, D., Billard, M., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (1998). CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem*, 273(46), 30537-30543.
- Houle, C. D., Ding, X. Y., Foley, J. F., Afshari, C. A., Barrett, J. C., & Davis, B. J. (2002). Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol*, 86(1), 69-78.
- Houlston, R. S., & Peto, J. (2004). The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene*, 23(38), 6471-6476. doi:10.1038/sj.onc.1207951
- Houssami, N., Macaskill, P., Marinovich, M. L., Dixon, J. M., Irwig, L., Brennan, M. E., & Solin, L. J. (2010). Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur J Cancer*, 46(18), 3219-3232. doi:10.1016/j.ejca.2010.07.043
- Howe, A. K., Aplin, A. E., & Juliano, R. L. (2002). Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev*, 12(1), 30-35.
- Howlett, A. R., Petersen, O. W., Steeg, P. S., & Bissell, M. J. (1994). A novel function for the nm23-H1 gene: overexpression in human breast carcinoma cells leads to the formation of basement membrane and growth arrest. *J Natl Cancer Inst*, 86(24), 1838-1844.
- Huang, C., Taki, T., Adachi, M., Yagita, M., Sawada, S., Takabayashi, A., Miyake, M. (1997). MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression in normal and various cancer tissues. *Int J Oncol*, 11(5), 1045-1051.
- Huang, C. I., Kohno, N., Ogawa, E., Adachi, M., Taki, T., & Miyake, M. (1998). Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am J Pathol*, 153(3), 973-983.
- Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119(Pt 19), 3901-3903. doi:10.1242/jcs.03098
- Humphries, M. J. (1996). Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*, 8(5), 632-640.
- Humphries, M. J. (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans*, 28(4), 311-339.
- Hynes, R. O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48(4), 549-554.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1), 11-25.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673-687.
- Ichikawa, T., Ichikawa, Y., Dong, J., Hawkins, A. L., Griffin, C. A., Isaacs, W. B., Isaacs, J. T. (1992). Localization of metastasis suppressor gene(s) for prostatic cancer to the short arm of human chromosome 11. *Cancer Res*, 52(12), 3486-3490.
- Ichikawa, T. I., Y.; Isaacs, J. T. (1991). Genetic factors and suppression of metastatic ability of prostatic cancer. *Cancer Res*, 51, 3788-3792.
- Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., & Yoshie, O. (1995). Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J Immunol*, 155(3), 1229-1239.
- Imai, T., & Yoshie, O. (1993). C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells. *J Immunol*, 151(11), 6470-6481.
- Infante, J. R., Camidge, D. R., Mileskin, L. R., Chen, E. X., Hicks, R. J., Rischin, D., Siu, L. L. (2012). Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic phase I dose-escalation

- trial of PF-00562271, an inhibitor of focal adhesion kinase, in advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 30(13), 1527-1533. doi:10.1200/jco.2011.38.9346
- Irish, J. C., & Bernstein, A. (1993). Oncogenes in head and neck cancer. *Laryngoscope*, 103(1 Pt 1), 42-52. doi:10.1288/00005537-199301000-00009
- Jackson, P., Kingsley, E. A., & Russell, P. J. (2000a). Inverse correlation between KAI1 mRNA levels and invasive behaviour in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett*, 156(1), 9-17.
- Jackson, P., Millar, D., Kingsley, E., Yardley, G., Ow, K., Clark, S., & Russell, P. J. (2000b). Methylation of a CpG island within the promoter region of the KAI1 metastasis suppressor gene is not responsible for down-regulation of KAI1 expression in invasive cancers or cancer cell lines. *Cancer Lett*, 157(2), 169-176.
- Jee, B. K., Lee, J. Y., Lim, Y., Lee, K. H., & Jo, Y. H. (2007). Effect of KAI1/CD82 on the beta1 integrin maturation in highly migratory carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 359(3), 703-708. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.159
- Jee, B. K., Park, K. M., Surendran, S., Lee, W. K., Han, C. W., Kim, Y. S., & Lim, Y. (2006). KAI1/CD82 suppresses tumor invasion by MMP9 inactivation via TIMP1 up-regulation in the H1299 human lung carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 342(2), 655-661. doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.153
- Kageshita, T., Hamby, C. V., Hirai, S., Kimura, T., Ono, T., & Ferrone, S. (2000). Differential clinical significance of alpha(v)Beta(3) expression in primary lesions of acral lentiginous melanoma and of other melanoma histotypes. *Int J Cancer*, 89(2), 153-159.
- Kang, Y., Hu, W., Ivan, C., Dalton, H. J., Miyake, T., Pecot, C. V., Sood, A. K. (2013). Role of focal adhesion kinase in regulating YB-1-mediated paclitaxel resistance in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*, 105(19), 1485-1495. doi:10.1093/jnci/djt210
- Kim, J. H., Kim, B., Cai, L., Choi, H. J., Ohgi, K. A., Tran, C., Baek, S. H. (2005). Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature*, 434(7035), 921-926. doi:10.1038/nature03452
- Kim, Y. I., Shin, M. K., Lee, J. W., Chung, J. H., & Lee, M. H. (2009). Decreased expression of KAI1/CD82 metastasis suppressor gene is associated with loss of heterozygosity in melanoma cell lines. *Oncol Rep*, 21(1), 159-164.
- Kirchhofer, D., Gailit, J., Ruoslahti, E., Grzesiak, J., & Pierschbacher, M. D. (1990). Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa. *J Biol Chem*, 265(30), 18525-18530.
- Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., Bolognesi, M. (2001). CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *Embo j*, 20(1-2), 12-18. doi:10.1093/emboj/20.1.12
- Kopczynski, C. C., Davis, G. W., & Goodman, C. S. (1996). A neural tetraspanin, encoded by late bloomer, that facilitates synapse formation. *Science*, 271(5257), 1867-1870.
- Korch, C., Hall, E. M., Dirks, W. G., Ewing, M., Faries, M., Varella-Garcia, M., Capes-Davis, A. (2018). Authentication of M14 melanoma cell line proves misidentification of MDA-MB-435 breast cancer cell line. *Int J Cancer*, 142(3), 561-572. doi:10.1002/ijc.31067
- Kornberg, L. J. (1998). Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis. *Head Neck*, 20(8), 745-752.
- Lacroix, M. (2008). Persistent use of "false" cell lines. *Int J Cancer*, 122(1), 1-4. doi:10.1002/ijc.23233
- Lagaudriere-Gesbert, C., Le Naour, F., Lebel-Binay, S., Billard, M., Lemichez, E., Boquet, P., Rubinstein, E. (1997). Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cell Immunol*, 182(2), 105-112.
- Lahlou, H., Sanguin-Gendreau, V., Zuo, D., Cardiff, R. D., McLean, G. W., Frame, M. C., & Muller, W. J. (2007). Mammary epithelial-specific disruption of the focal adhesion kinase blocks mammary tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(51), 20302-20307. doi:10.1073/pnas.0710091104

- Landegren, U. (1984). Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods*, *67*(2), 379-388.
- Le Naour, F., Andre, M., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2006). Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics*, *6*(24), 6447-6454. doi:10.1002/pmic.200600282
- Le Naour, F., Charrin, S., Labas, V., Le Caer, J. P., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2004). Tetraspanins connect several types of Ig proteins: IgM is a novel component of the tetraspanin web on B-lymphoid cells. *Cancer Immunol Immunother*, *53*(3), 148-152. doi:10.1007/s00262-003-0477-5
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., & Boucheix, C. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, *287*(5451), 319-321.
- Lee, J., Byun, H. J., Lee, M. S., Jin, Y. J., Jeoung, D., Kim, Y. M., & Lee, H. (2017). The metastasis suppressor CD82/KAI1 inhibits fibronectin adhesion-induced epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells by repressing the associated integrin signaling. *Oncotarget*, *8*(1), 1641-1654. doi:10.18632/oncotarget.13767
- Lee, J. H., Park, S. R., Chay, K. O., Seo, Y. W., Kook, H., Ahn, K. Y., Kim, K. K. (2004). KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin (KITENIN), a member of the tetraspanin family, interacts with KAI1, a tumor metastasis suppressor, and enhances metastasis of cancer. *Cancer Res*, *64*(12), 4235-4243. doi:10.1158/0008-5472.can-04-0275
- Lee, J. H., Seo, Y. W., Park, S. R., Kim, Y. J., & Kim, K. K. (2003). Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res*, *63*(21), 7247-7255.
- Legate, K. R., Wickstrom, S. A., & Fassler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev*, *23*(4), 397-418. doi:10.1101/gad.1758709
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Yarden, Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev*, *12*(23), 3663-3674.
- Levy, S., & Shoham, T. (2005). Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)*, *20*, 218-224. doi:10.1152/physiol.00015.2005
- Levy, S., Todd, S. C., & Maecker, H. T. (1998). CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol*, *16*, 89-109. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.89
- Liapis, H., Adler, L. M., Wick, M. R., & Rader, J. S. (1997). Expression of alpha(v)beta3 integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Hum Pathol*, *28*(4), 443-449.
- Lightfoot, H. M., Jr., Lark, A., Livasy, C. A., Moore, D. T., Cowan, D., Dressler, L., Cance, W. G. (2004). Upregulation of focal adhesion kinase (FAK) expression in ductal carcinoma in situ (DCIS) is an early event in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat*, *88*(2), 109-116. doi:10.1007/s10549-004-1022-8
- Lim, S. T., Mikolon, D., Stupack, D. G., & Schlaepfer, D. D. (2008). FERM control of FAK function: implications for cancer therapy. *Cell Cycle*, *7*(15), 2306-2314. doi:10.4161/cc.6367
- Lin, C., Wang, S., Xie, W., Zheng, R., Gan, Y., & Chang, J. (2016). Apatinib inhibits cellular invasion and migration by fusion kinase KIF5B-RET via suppressing RET/Src signaling pathway. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.10985
- Little, K. D., Hemler, M. E., & Stipp, C. S. (2004). Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Galpha q/11 association. *Mol Biol Cell*, *15*(5), 2375-2387. doi:10.1091/mbc.E03-12-0886
- Liu, F. S., Chen, J. T., Dong, J. T., Hsieh, Y. T., Lin, A. J., Ho, E. S., Lu, C. H. (2001). KAI1 metastasis suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma. *Am J Pathol*, *159*(5), 1629-1634.
- Liu, F. S., Dong, J. T., Chen, J. T., Hsieh, Y. T., Ho, E. S., & Hung, M. J. (2000). Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, *78*(1), 10-15. doi:10.1006/gyno.2000.5801

- Liu, F. S., Dong, J. T., Chen, J. T., Hsieh, Y. T., Ho, E. S., Hung, M. J., Chiou, L. C. (2003a). KAI1 metastasis suppressor protein is down-regulated during the progression of human endometrial cancer. *Clin Cancer Res*, 9(4), 1393-1398.
- Liu, L., Wu, D. H., Li, Z. G., Yang, G. Z., & Ding, Y. Q. (2003b). Effects of KAI1/CD82 on biological behavior of human colorectal carcinoma cell line. *World J Gastroenterol*, 9(6), 1231-1236.
- Liu, T. J., LaFortune, T., Honda, T., Ohmori, O., Hatakeyama, S., Meyer, T., Yung, W. K. (2007). Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, 6(4), 1357-1367. doi:10.1158/1535-7163.mct-06-0476
- Liu, W. M., Zhang, F., Moshiach, S., Zhou, B., Huang, C., Srinivasan, K., Zhang, X. A. (2012). Tetraspanin CD82 inhibits protrusion and retraction in cell movement by attenuating the plasma membrane-dependent actin organization. *PLoS One*, 7(12), e51797. doi:10.1371/journal.pone.0051797
- Liu, W. M., & Zhang, X. A. (2006). KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett*, 240(2), 183-194. doi:10.1016/j.canlet.2005.08.018
- Lo Nigro, C., Ricci, V., Vivenza, D., Granetto, C., Fabozzi, T., Miraglio, E., & Merlano, M. C. (2016). Prognostic and predictive biomarkers in metastatic colorectal cancer anti-EGFR therapy. *World J Gastroenterol*, 22(30), 6944-6954. doi:10.3748/wjg.v22.i30.6944
- Loken, M. R., & Herzenber, L. A. (1975). Analysis of cell populations with a fluorescence-activated cell sorter. *Ann N Y Acad Sci*, 254, 163-171.
- Lössner, D., Abou-Ajram, C., Benge, A., Aumercier, M., Schmitt, M., & Reuning, U. (2009). Integrin alphavbeta3 upregulates integrin-linked kinase expression in human ovarian cancer cells via enhancement of ILK gene transcription. *J Cell Physiol*, 220(2), 367-375. doi:10.1002/jcp.21774
- Lössner, D., Abou-Ajram, C., Benge, A., & Reuning, U. (2008). Integrin alphavbeta3 mediates upregulation of epidermal growth-factor receptor expression and activity in human ovarian cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(12), 2746-2761. doi:10.1016/j.biocel.2008.05.014
- Lozahic, S., Christiansen, D., Manie, S., Gerlier, D., Billard, M., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2000). CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol*, 30(3), 900-907. doi:10.1002/1521-4141(200003)30:3<900::aid-immu900>3.0.co;2-x
- Lu, D., Wang, W. X., Xu, Y. Q., Jiang, Q. Y., & Yang, Y. (2007). [Inhibitory effect of KAI1 gene on breast cancer cell growth in vitro]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 29(8), 580-583.
- Luo, B. H., Carman, C. V., & Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*, 25, 619-647. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618
- Luo, M., Fan, H., Nagy, T., Wei, H., Wang, C., Liu, S., Guan, J. L. (2009). Mammary epithelial-specific ablation of the focal adhesion kinase suppresses mammary tumorigenesis by affecting mammary cancer stem/progenitor cells. *Cancer Res*, 69(2), 466-474. doi:10.1158/0008-5472.can-08-3078
- MacDonald, T. J., Taga, T., Shimada, H., Tabrizi, P., Zlokovic, B. V., Cheresch, D. A., & Laug, W. E. (2001). Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha(v) integrin antagonist. *Neurosurgery*, 48(1), 151-157.
- MacLeod, R. A., Dirks, W. G., Matsuo, Y., Kaufmann, M., Milch, H., & Drexler, H. G. (1999). Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer*, 83(4), 555-563.
- Maecker, H. T., Todd, S. C., & Levy, S. (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *Faseb j*, 11(6), 428-442.
- Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., Nukiwa, T. (2010). Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*, 362(25), 2380-2388. doi:10.1056/NEJMoa0909530

- Makowiecka, A., Simiczjzew, A., Nowak, D., & Mazur, A. J. (2016). Varying effects of EGF, HGF and TGFbeta on formation of invadopodia and invasiveness of melanoma cell lines of different origin. *Eur J Histochem*, *60*(4), 2728. doi:10.4081/ejh.2016.2728
- Malik, F. A., Sanders, A. J., Kayani, M. A., & Jiang, W. G. (2009). Effect of expressional alteration of KAI1 on breast cancer cell growth, adhesion, migration and invasion. *Cancer Genomics Proteomics*, *6*(4), 205-213.
- Maloney, S. C., Fernandes, B. F., Pentead, R. C., Anteck, E., Bravo-Filho, V., Sanft, D. M., & Burnier, M. N., Jr. (2013). Expression of the Metastasis Suppressor KAI1 in Uveal Melanoma. *J Ophthalmol*, *2013*, 683963. doi:10.1155/2013/683963
- Marreiros, A., Dudgeon, K., Dao, V., Grimm, M. O., Czolij, R., Crossley, M., & Jackson, P. (2005). KAI1 promoter activity is dependent on p53, junB and AP2: evidence for a possible mechanism underlying loss of KAI1 expression in cancer cells. *Oncogene*, *24*(4), 637-649. doi:10.1038/sj.onc.1208216
- Masciopinto, F., Campagnoli, S., Abrignani, S., Uematsu, Y., & Pileri, P. (2001). The small extracellular loop of CD81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative HCV receptor. *Virus Res*, *80*(1-2), 1-10.
- Mashimo, T., Bandyopadhyay, S., Goodarzi, G., Watabe, M., Pai, S. K., Gross, S. C., & Watabe, K. (2000). Activation of the tumor metastasis suppressor gene, KAI1, by etoposide is mediated by p53 and c-Jun genes. *Biochem Biophys Res Commun*, *274*(2), 370-376. doi:10.1006/bbrc.2000.3139
- Mashimo, T., Watabe, M., Hirota, S., Hosobe, S., Miura, K., Tegtmeyer, P. J., Watabe, K. (1998). The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(19), 11307-11311.
- Maurer, C. A., Graber, H. U., Friess, H., Beyersmann, B., Willi, D., Netzer, P., Buchler, M. W. (1999). Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases. *Surgery*, *126*(5), 869-880.
- McLean, G. W., Carragher, N. O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V. G., & Frame, M. C. (2005). The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer*, *5*(7), 505-515. doi:10.1038/nrc1647
- Mela, A., & Goldman, J. E. (2009). The tetraspanin KAI1/CD82 is expressed by late-lineage oligodendrocyte precursors and may function to restrict precursor migration and promote oligodendrocyte differentiation and myelination. *J Neurosci*, *29*(36), 11172-11181. doi:10.1523/jneurosci.3075-09.2009
- Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z., & Derynck, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*, *376*(6538), 337-341. doi:10.1038/376337a0
- Miljan, E. A., & Bremer, E. G. (2002). Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci STKE*, *2002*(160), re15. doi:10.1126/stke.2002.160.re15
- Miller, J., Dreyer, T. F., Bacher, A. S., Sinner, E. K., Heinrich, C., Bengel, A., Reuning, U. (2018). Differential tumor biological role of the tumor suppressor KAI1 and its splice variant in human breast cancer cells. *Oncotarget*, *9*(5), 6369-6390. doi:10.18632/oncotarget.23968
- Miranti, C. K. (2009). Controlling cell surface dynamics and signaling: how CD82/KAI1 suppresses metastasis. *Cell Signal*, *21*(2), 196-211. doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.023
- Mitjans, F., Meyer, T., Fittschen, C., Goodman, S., Jonczyk, A., Marshall, J. F., Piulats, J. (2000). In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alpha v integrins. *Int J Cancer*, *87*(5), 716-723.
- Mitra, S. K., Lim, S. T., Chi, A., & Schlaepfer, D. D. (2006). Intrinsic focal adhesion kinase activity controls orthotopic breast carcinoma metastasis via the regulation of urokinase plasminogen activator expression in a syngeneic tumor model. *Oncogene*, *25*(32), 4429-4440. doi:10.1038/sj.onc.1209482
- Mitra, S. K., & Schlaepfer, D. D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*, *18*(5), 516-523. doi:10.1016/j.ceb.2006.08.011
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Mekada, E. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, *287*(5451), 321-324.

- Miyazaki, T., Kato, H., Shitara, Y., Yoshikawa, M., Tajima, K., Masuda, N., Kuwano, H. (2000). Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 89(5), 955-962.
- Monnier, Y., Farmer, P., Bieler, G., Imaizumi, N., Sengstag, T., Alghisi, G. C., Rugg, C. (2008). CYR61 and alphaVbeta5 integrin cooperate to promote invasion and metastasis of tumors growing in preirradiated stroma. *Cancer Res*, 68(18), 7323-7331. doi:10.1158/0008-5472.can-08-0841
- Montel, V., Suzuki, M., Galloy, C., Mose, E. S., & Tarin, D. (2009). Expression of melanocyte-related genes in human breast cancer and its implications. *Differentiation*, 78(5), 283-291. doi:10.1016/j.diff.2009.07.007
- Moro, L., Dolce, L., Cabodi, S., Bergatto, E., Boeri Erba, E., Smeriglio, M., Defilippi, P. (2002). Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem*, 277(11), 9405-9414. doi:10.1074/jbc.M109101200
- Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Wong, A. J. (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res*, 55(23), 5536-5539.
- Müller, M. A., Brunie, L., Bacher, A. S., Kessler, H., Gottschalk, K. E., & Reuning, U. (2014). Cytoplasmic salt bridge formation in integrin alphavss3 stabilizes its inactive state affecting integrin-mediated cell biological effects. *Cell Signal*, 26(11), 2493-2503. doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.013
- Müller, M. A., Opfer, J., Brunie, L., Volkhardt, L. A., Sinner, E. K., Boettiger, D., Reuning, U. (2013). The glycophorin A transmembrane sequence within integrin alphavbeta3 creates a non-signaling integrin with low basal affinity that is strongly adhesive under force. *J Mol Biol*, 425(16), 2988-3006. doi:10.1016/j.jmb.2013.05.020
- Murayama, Y., Shinomura, Y., Oritani, K., Miyagawa, J., Yoshida, H., Nishida, M., Hayashi, N. (2008). The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. *J Cell Physiol*, 216(1), 135-143. doi:10.1002/jcp.21384
- Murphy, J. F., Bordet, J. C., Wyler, B., Rissoan, M. C., Chomarat, P., Defrance, T., McGregor, J. L. (1994). The vitronectin receptor (alpha v beta 3) is implicated, in cooperation with P-selectin and platelet-activating factor, in the adhesion of monocytes to activated endothelial cells. *Biochem J*, 304 (Pt 2), 537-542.
- Muthuswamy, S. K., Gilman, M., & Brugge, J. S. (1999). Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol*, 19(10), 6845-6857.
- Natali, P. G., Hamby, C. V., Felding-Habermann, B., Liang, B., Nicotra, M. R., Di Filippo, F., Ferrone, S. (1997). Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res*, 57(8), 1554-1560.
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10(6), 515-527. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008
- Nishioka, C., Ikezoe, T., Furihata, M., Yang, J., Serada, S., Naka, T., Yokoyama, A. (2013). CD34(+)/CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells. *Int J Cancer*, 132(9), 2006-2019. doi:10.1002/ijc.27904
- Nobukawa, B., Fujii, H., Hirai, S., Kumasaka, T., Shimizu, H., Matsumoto, T., Futagawa, S. (1999). Breast carcinoma diverging to aberrant melanocytic differentiation: a case report with histopathologic and loss of heterozygosity analyses. *Am J Surg Pathol*, 23(10), 1280-1287.
- Odintsova, E., Sugiura, T., & Berdichevski, F. (2000). Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol*, 10(16), 1009-1012.
- Odintsova, E., van Niel, G., Conjeaud, H., Raposo, G., Iwamoto, R., Mekada, E., & Berdichevski, F. (2013). Metastasis suppressor tetraspanin CD82/KAI1 regulates

- ubiquitylation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 288(36), 26323-26334. doi:10.1074/jbc.M112.439380
- Odintsova, E., Voortman, J., Gilbert, E., & Berditchevski, F. (2003). Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *J Cell Sci*, 116(Pt 22), 4557-4566. doi:10.1242/jcs.00793
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 110(6), 775-787.
- Okegawa, T., Pong, R. C., Li, Y., & Hsieh, J. T. (2004). The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol*, 51(2), 445-457. doi:035001445
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., & Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo j*, 19(13), 3159-3167. doi:10.1093/emboj/19.13.3159
- Onishi, M., Ichikawa, T., Kurozumi, K., Fujii, K., Yoshida, K., Inoue, S., Date, I. (2013). Bimodal anti-glioma mechanisms of cilengitide demonstrated by novel invasive glioma models. *Neuropathology*, 33(2), 162-174. doi:10.1111/j.1440-1789.2012.01344.x
- Ono, M., Handa, K., Withers, D. A., & Hakomori, S. (1999). Motility inhibition and apoptosis are induced by metastasis-suppressing gene product CD82 and its analogue CD9, with concurrent glycosylation. *Cancer Res*, 59(10), 2335-2339.
- Ono, M., Handa, K., Withers, D. A., & Hakomori, S. (2000). Glycosylation effect on membrane domain (GEM) involved in cell adhesion and motility: a preliminary note on functional alpha3, alpha5-CD82 glycosylation complex in IdD 14 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 279(3), 744-750. doi:10.1006/bbrc.2000.4030
- Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R., & Levy, S. (1990). TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol*, 10(8), 4007-4015.
- Owens, L. V., Xu, L., Craven, R. J., Dent, G. A., Weiner, T. M., Kornberg, L., Cance, W. G. (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res*, 55(13), 2752-2755.
- Padmore, R. F., Lara, J. F., Ackerman, D. J., Gales, T., Sigurdson, E. R., Ehya, H., Patchefsky, A. S. (1996). Primary combined malignant melanoma and ductal carcinoma of the breast. A report of two cases. *Cancer*, 78(12), 2515-2525.
- Pang, X., & Liu, M. (2016). Defeat Mutant KRAS with Synthetic Lethality. *Small GTPases*, 0. doi:10.1080/21541248.2016.1213783
- Park, J. J., Jin, Y. B., Lee, Y. J., Lee, J. S., Lee, Y. S., Ko, Y. G., & Lee, M. (2012). KAI1 suppresses HIF-1alpha and VEGF expression by blocking CDCP1-enhanced Src activation in prostate cancer. *BMC Cancer*, 12, 81. doi:10.1186/1471-2407-12-81
- Parsons, J. T., Slack-Davis, J., Tilghman, R., & Roberts, W. G. (2008). Focal adhesion kinase: targeting adhesion signaling pathways for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, 14(3), 627-632. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-2220
- Paz, M. F., Fraga, M. F., Avila, S., Guo, M., Pollan, M., Herman, J. G., & Esteller, M. (2003). A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 63(5), 1114-1121.
- Pfaff, M., Tangemann, K., Muller, B., Gurrath, M., Muller, G., Kessler, H., Engel, J. (1994). Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. *J Biol Chem*, 269(32), 20233-20238.
- Phillips, K. K., White, A. E., Hicks, D. J., Welch, D. R., Barrett, J. C., Wei, L. L., & Weissman, B. E. (1998). Correlation between reduction of metastasis in the MDA-MB-435 model system and increased expression of the Kai-1 protein. *Mol Carcinog*, 21(2), 111-120.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 282(5390), 938-941.
- Platten, M., Wick, W., Wild-Bode, C., Aulwurm, S., Dichgans, J., & Weller, M. (2000). Transforming growth factors beta(1) (TGF-beta(1)) and TGF-beta(2) promote glioma

- cell migration via Up-regulation of alpha(V)beta(3) integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 268(2), 607-611. doi:10.1006/bbrc.2000.2176
- Prasad, V. V., & Gopalan, R. O. (2015). Continued use of MDA-MB-435, a melanoma cell line, as a model for human breast cancer, even in year, 2014. *NPJ Breast Cancer*, 1, 15002. doi:10.1038/npjbcancer.2015.2
- Preissner, K. T., & Seiffert, D. (1998). Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. *Thromb Res*, 89(1), 1-21.
- Price, J. E. (1996). Metastasis from human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*, 39(1), 93-102.
- Price, J. E., Polyzos, A., Zhang, R. D., & Daniels, L. M. (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res*, 50(3), 717-721.
- Price, J. E., & Zhang, R. D. (1990). Studies of human breast cancer metastasis using nude mice. *Cancer Metastasis Rev*, 8(4), 285-297.
- Promega. (2015). Technical Bulletin Luciferase Assay System. In P. Corporation (Ed.), (pp. 11).
- Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W., Beggs, H. E., & Keely, P. J. (2008). Mammary epithelial-specific disruption of focal adhesion kinase retards tumor formation and metastasis in a transgenic mouse model of human breast cancer. *Am J Pathol*, 173(5), 1551-1565. doi:10.2353/ajpath.2008.080308
- Puklin-Faucher, E., Gao, M., Schulten, K., & Vogel, V. (2006). How the headpiece hinge angle is opened: New insights into the dynamics of integrin activation. *J Cell Biol*, 175(2), 349-360. doi:10.1083/jcb.200602071
- Pylayeva, Y., Gillen, K. M., Gerald, W., Beggs, H. E., Reichardt, L. F., & Giancotti, F. G. (2009). Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest*, 119(2), 252-266. doi:10.1172/jci37160
- Pytela, R., Pierschbacher, M. D., & Ruoslahti, E. (1985). A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(17), 5766-5770.
- Qifan, W., Fen, N., Ying, X., Xinwei, F., Jun, D., & Ge, Z. (2016). iRGD-targeted delivery of a pro-apoptotic peptide activated by cathepsin B inhibits tumor growth and metastasis in mice. *Tumour Biol*, 37(8), 10643-10652. doi:10.1007/s13277-016-4961-x
- Rae, J. M., Creighton, C. J., Meck, J. M., Haddad, B. R., & Johnson, M. D. (2007). MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Res Treat*, 104(1), 13-19. doi:10.1007/s10549-006-9392-8
- Rae, J. M., Ramus, S. J., Waltham, M., Armes, J. E., Campbell, I. G., Clarke, R., Thompson, E. W. (2004). Common origins of MDA-MB-435 cells from various sources with those shown to have melanoma properties. *Clin Exp Metastasis*, 21(6), 543-552.
- Rassow, J. D., R.; Hauser, K.; Netzker, R. . (2016). *Duale Reihe Biochemie* (4 ed.): Thieme Verlag.
- Reardon, D. A., Fink, K. L., Mikkelsen, T., Cloughesy, T. F., O'Neill, A., Plotkin, S., Nabors, L. B. (2008). Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*, 26(34), 5610-5617. doi:10.1200/jco.2008.16.7510
- Reuning, U. (2011). Integrin alphavbeta3 promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells by implicating rel transcription factors. *J Cell Biochem*, 112(7), 1909-1919. doi:10.1002/jcb.23111
- Reuning, U., Magdolen, V., Hapke, S., & Schmitt, M. (2003). Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins. *Biol Chem*, 384(8), 1119-1131. doi:10.1515/bc.2003.125
- Ringerike, T., Blystad, F. D., Levy, F. O., Madhus, I. H., & Stang, E. (2002). Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *J Cell Sci*, 115(Pt 6), 1331-1340.

- Roberts, W. G., Ung, E., Whalen, P., Cooper, B., Hulford, C., Autry, C., Vajdos, F. (2008). Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271. *Cancer Res*, 68(6), 1935-1944. doi:10.1158/0008-5472.can-07-5155
- Roepstorff, K., Thomsen, P., Sandvig, K., & van Deurs, B. (2002). Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J Biol Chem*, 277(21), 18954-18960. doi:10.1074/jbc.M201422200
- Ross, D. T., Scherf, U., Eisen, M. B., Perou, C. M., Rees, C., Spellman, P., Brown, P. O. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*, 24(3), 227-235. doi:10.1038/73432
- Rottem, S., & Barile, M. F. (1993). Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol*, 11(4), 143-151. doi:10.1016/0167-7799(93)90089-r
- Rowe, A., & Jackson, P. (2006). Expression of KITENIN, a KAI1/CD82 binding protein and metastasis enhancer, in bladder cancer cell lines: relationship to KAI1/CD82 levels and invasive behaviour. *Oncol Rep*, 16(6), 1267-1272.
- Ruffolo, E. F., Koerner, F. C., & Maluf, H. M. (1997). Metaplastic carcinoma of the breast with melanocytic differentiation. *Mod Pathol*, 10(6), 592-596.
- Ruoslahti, E., & Pierschbacher, M. D. (1986). Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell*, 44(4), 517-518.
- Ruseva, Z., Geiger, P. X., Hutzler, P., Kotsch, M., Lubber, B., Schmitt, M., Reuning, U. (2009). Tumor suppressor KAI1 affects integrin alphavbeta3-mediated ovarian cancer cell adhesion, motility, and proliferation. *Exp Cell Res*, 315(10), 1759-1771. doi:10.1016/j.yexcr.2009.01.007
- Satya-Prakash, K. L., Pathak, S., Hsu, T. C., Olive, M., & Cailleau, R. (1981). Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: high frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet*, 3(1), 61-73.
- Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T., & van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 372(6508), 786-791.
- Schmidt, C., Kunemund, V., Wintergerst, E. S., Schmitz, B., & Schachner, M. (1996). CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J Neurosci Res*, 43(1), 12-31. doi:10.1002/jnr.490430103
- Schorey, J. S., & Bhatnagar, S. (2008). Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, 9(6), 871-881. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x
- Seftor, R. E., Seftor, E. A., Gehlsen, K. R., Stetler-Stevenson, W. G., Brown, P. D., Ruoslahti, E., & Hendrix, M. J. (1992). Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(5), 1557-1561.
- Seigneuret, M., Delaguillamie, A., Lagaudriere-Gesbert, C., & Conjeaud, H. (2001). Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem*, 276(43), 40055-40064. doi:10.1074/jbc.M105557200
- Sekita, N., Suzuki, H., Ichikawa, T., Kito, H., Akakura, K., Igarashi, T., Ito, H. (2001). Epigenetic regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene in human prostate cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res*, 92(9), 947-951.
- Sellappan, S., Grijalva, R., Zhou, X., Yang, W., Eli, M. B., Mills, G. B., & Yu, D. (2004). Lineage infidelity of MDA-MB-435 cells: expression of melanocyte proteins in a breast cancer cell line. *Cancer Res*, 64(10), 3479-3485. doi:10.1158/0008-5472.can-3299-2
- Shattil, S. J., Kim, C., & Ginsberg, M. H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(4), 288-300. doi:10.1038/nrm2871
- Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Keir, S. T., Song, L., Wickman, S., Jackson, D., Rich, J. N. (2007). A novel low-molecular weight inhibitor of focal adhesion kinase, TAE226, inhibits glioma growth. *Mol Carcinog*, 46(6), 488-496. doi:10.1002/mc.20297
- Shinohara, T., Miki, T., Nishimura, N., Nokihara, H., Hamada, H., Mukaida, N., & Sone, S. (2001a). Nuclear factor-kappaB-dependent expression of metastasis suppressor KAI1/CD82 gene in lung cancer cell lines expressing mutant p53. *Cancer Res*, 61(2), 673-678.

- Shinohara, T., Nishimura, N., Hanibuchi, M., Nokihara, H., Miki, T., Hamada, H., & Sone, S. (2001b). Transduction of KAI1/CD82 cDNA promotes hematogenous spread of human lung-cancer cells in natural killer cell-depleted SCID mice. *Int J Cancer*, *94*(1), 16-23. doi:10.1002/ijc.1445
- Shishido, S., Bonig, H., & Kim, Y. M. (2014). Role of integrin alpha4 in drug resistance of leukemia. *Front Oncol*, *4*, 99. doi:10.3389/fonc.2014.00099
- Sho, M., Adachi, M., Taki, T., Hashida, H., Konishi, T., Huang, C. L., Miyake, M. (1998). Transmembrane 4 superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, *79*(5), 509-516.
- Short, S. M., Talbott, G. A., & Juliano, R. L. (1998). Integrin-mediated signaling events in human endothelial cells. *Mol Biol Cell*, *9*(8), 1969-1980.
- Si, Z., & Hersey, P. (1994). Immunohistological examination of the relationship between metastatic potential and expression of adhesion molecules and 'selectins' on melanoma cells. *Pathology*, *26*(1), 6-15.
- Sibilia, M., Steinbach, J. P., Stingl, L., Aguzzi, A., & Wagner, E. F. (1998). A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *Embo j*, *17*(3), 719-731. doi:10.1093/emboj/17.3.719
- Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H., & Schlaepfer, D. D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*, *2*(5), 249-256. doi:10.1038/35010517
- Sigma-Aldrich. 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide. Produktinformation.
- Skubitz, K. M., Campbell, K. D., & Skubitz, A. P. (2000). CD63 associates with CD11/CD18 in large detergent-resistant complexes after translocation to the cell surface in human neutrophils. *FEBS Lett*, *469*(1), 52-56.
- Slack-Davis, J. K., Martin, K. H., Tilghman, R. W., Iwanicki, M., Ung, E. J., Autry, C., Parsons, J. T. (2007). Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. *J Biol Chem*, *282*(20), 14845-14852. doi:10.1074/jbc.M606695200
- Smith, H. W., & Marshall, C. J. (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(1), 23-36. doi:10.1038/nrm2821
- Smith, S. C., & Theodorescu, D. (2009). Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins. *Nat Rev Cancer*, *9*(4), 253-264. doi:10.1038/nrc2594
- Sorkin, A., Di Fiore, P. P., & Carpenter, G. (1993). The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired. *Oncogene*, *8*(11), 3021-3028.
- Sridhar, S. C., & Miranti, C. K. (2006). Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. *Oncogene*, *25*(16), 2367-2378. doi:10.1038/sj.onc.1209269
- Stipp, C. S., & Hemler, M. E. (2000). Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with alpha 3 beta 1 integrin, and selectively contribute to alpha 3 beta 1-dependent neurite outgrowth. *J Cell Sci*, *113* (Pt 11), 1871-1882.
- Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V., & Hemler, M. E. (2001). EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem*, *276*(44), 40545-40554. doi:10.1074/jbc.M107338200
- Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V., & Hemler, M. E. (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci*, *28*(2), 106-112. doi:10.1016/s0968-0004(02)00014-2
- Streuli, C. H., & Akhtar, N. (2009). Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J*, *418*(3), 491-506. doi:10.1042/bj20081948
- Stupp, R., Hegi, M. E., Gorlia, T., Erridge, S. C., Perry, J., Hong, Y. K., Weller, M. (2014). Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, *15*(10), 1100-1108. doi:10.1016/s1470-2045(14)70379-1
- Sugiura, T., & Berditchevski, F. (1999). Function of alpha3beta1-tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *J Cell Biol*, *146*(6), 1375-1389.

- Sulzmaier, F. J., Jean, C., & Schlaepfer, D. D. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer*, *14*(9), 598-610. doi:10.1038/nrc3792
- Szollosi, J., Horejsi, V., Bene, L., Angelisova, P., & Damjanovich, S. (1996). Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J Immunol*, *157*(7), 2939-2946.
- Tachibana, I., & Hemler, M. E. (1999). Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J Cell Biol*, *146*(4), 893-904.
- Tagawa, K., Arihiro, K., Takeshima, Y., Hiyama, E., Yamasaki, M., & Inai, K. (1999). Down-regulation of KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res*, *90*(9), 970-976.
- Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T., & Springer, T. A. (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, *110*(5), 599-511.
- Takagi, J., & Springer, T. A. (2002). Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev*, *186*, 141-163.
- Takahashi, Y., Bigler, D., Ito, Y., & White, J. M. (2001). Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol Biol Cell*, *12*(4), 809-820.
- Takaoka, A., Hinoda, Y., Sato, S., Itoh, F., Adachi, M., Hareyama, M., & Imai, K. (1998a). Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. *Jpn J Cancer Res*, *89*(4), 397-404.
- Takaoka, A., Hinoda, Y., Satoh, S., Adachi, Y., Itoh, F., Adachi, M., & Imai, K. (1998b). Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene*, *16*(11), 1443-1453. doi:10.1038/sj.onc.1201648
- Takeda, T., Hattori, N., Tokuhara, T., Nishimura, Y., Yokoyama, M., & Miyake, M. (2007). Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model. *Cancer Res*, *67*(4), 1744-1749. doi:10.1158/0008-5472.can-06-3090
- Tamkun, J. W., DeSimone, D. W., Fonda, D., Patel, R. S., Buck, C., Horwitz, A. F., & Hynes, R. O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*, *46*(2), 271-282.
- Tang, Y., Bhandaru, M., Cheng, Y., Lu, J., Li, G., & Ong, C. J. (2015). The role of the metastasis suppressor gene KAI1 in melanoma angiogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res*, *28*(6), 696-706. doi:10.1111/pcmr.12399
- Tang, Y., Cheng, Y., Martinka, M., Ong, C. J., & Li, G. (2014). Prognostic significance of KAI1/CD82 in human melanoma and its role in cell migration and invasion through the regulation of ING4. *Carcinogenesis*, *35*(1), 86-95. doi:10.1093/carcin/bgt346
- Tanjoni, I., Walsh, C., Uryu, S., Tomar, A., Nam, J. O., Mielgo, A., Schlaepfer, D. D. (2010). PND-1186 FAK inhibitor selectively promotes tumor cell apoptosis in three-dimensional environments. *Cancer Biol Ther*, *9*(10), 764-777.
- Tavora, B., Reynolds, L. E., Batista, S., Demircioglu, F., Fernandez, I., Lechertier, T., Hodivala-Dilke, K. M. (2014). Endothelial-cell FAK targeting sensitizes tumours to DNA-damaging therapy. *Nature*, *514*(7520), 112-116. doi:10.1038/nature13541
- Telese, F., Bruni, P., Donizetti, A., Gianni, D., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Russo, T. (2005). Transcription regulation by the adaptor protein Fe65 and the nucleosome assembly factor SET. *EMBO Rep*, *6*(1), 77-82. doi:10.1038/sj.embor.7400309
- ten Berge, P. J., Danen, E. H., van Muijen, G. N., Jager, M. J., & Ruiters, D. J. (1993). Integrin expression in uveal melanoma differs from cutaneous melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *34*(13), 3635-3640.
- Thompson, E. W., Waltham, M., Ramus, S. J., Hutchins, A. M., Armes, J. E., Campbell, I. G., Clarke, R. (2004). LCC15-MB cells are MDA-MB-435: a review of misidentified breast and prostate cell lines. *Clin Exp Metastasis*, *21*(6), 535-541.

- Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., et al. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, 269(5221), 230-234.
- Tonoli, H., & Barrett, J. C. (2005). CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? *Trends Mol Med*, 11(12), 563-570. doi:10.1016/j.molmed.2005.10.002
- Tsai, Y. C., Mendoza, A., Mariano, J. M., Zhou, M., Kostova, Z., Chen, B., Weissman, A. M. (2007). The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation. *Nat Med*, 13(12), 1504-1509. doi:10.1038/nm1686
- Upheber, S., Karle, A., Miller, J., Schlaugk, S., Gross, E., & Reuning, U. (2015). Alternative splicing of KAI1 abrogates its tumor-suppressive effects on integrin alphavbeta3-mediated ovarian cancer biology. *Cell Signal*, 27(3), 652-662. doi:10.1016/j.cellsig.2014.11.028
- van der Flier, A., & Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 305(3), 285-298.
- van Nimwegen, M. J., Verkoeijen, S., van Buren, L., Burg, D., & van de Water, B. (2005). Requirement for focal adhesion kinase in the early phase of mammary adenocarcinoma lung metastasis formation. *Cancer Res*, 65(11), 4698-4706. doi:10.1158/0008-5472.can-04-4126
- Venugopalan, A., Lee, M. J., Niu, G., Medina-Echeverz, J., Tomita, Y., Lizak, M. J., Guha, U. (2016). EGFR-targeted therapy results in dramatic early lung tumor regression accompanied by imaging response and immune infiltration in EGFR mutant transgenic mouse models. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.11021
- Veronesi, U., Cascinelli, N., Mariani, L., Greco, M., Saccozzi, R., Luini, A., Marubini, E. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med*, 347(16), 1227-1232. doi:10.1056/NEJMoa020989
- Wang, X. Q., Yan, Q., Sun, P., Liu, J. W., Go, L., McDaniel, S. M., & Paller, A. S. (2007). Suppression of epidermal growth factor receptor signaling by protein kinase C-alpha activation requires CD82, caveolin-1, and ganglioside. *Cancer Res*, 67(20), 9986-9995. doi:10.1158/0008-5472.can-07-1300
- Waterman, H., & Yarden, Y. (2001). Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett*, 490(3), 142-152.
- Wei, Q., Zhang, F., Richardson, M. M., Roy, N. H., Rodgers, W., Liu, Y., Zhang, X. A. (2014). CD82 restrains pathological angiogenesis by altering lipid raft clustering and CD44 trafficking in endothelial cells. *Circulation*, 130(17), 1493-1504. doi:10.1161/circulationaha.114.011096
- Weiner, T. M., Liu, E. T., Craven, R. J., & Cance, W. G. (1993). Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet*, 342(8878), 1024-1025.
- Weis, S. M., Lim, S. T., Lutu-Fuga, K. M., Barnes, L. A., Chen, X. L., Gothert, J. R., Cheresh, D. A. (2008). Compensatory role for Pyk2 during angiogenesis in adult mice lacking endothelial cell FAK. *J Cell Biol*, 181(1), 43-50. doi:10.1083/jcb.200710038
- Weiss, L. (1990). Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res*, 54, 159-211.
- Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., & Vogelstein, B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(7), 2965-2969.
- Wong, C. W., Lee, A., Shientag, L., Yu, J., Dong, Y., Kao, G., Muschel, R. J. (2001). Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res*, 61(1), 333-338.
- Wong, N. C., Mueller, B. M., Barbas, C. F., Ruminiski, P., Quaranta, V., Lin, E. C., & Smith, J. W. (1998). Alphav integrins mediate adhesion and migration of breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis*, 16(1), 50-61.
- Woodhouse, E. C., Chuaqui, R. F., & Liotta, L. A. (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer*, 80(8 Suppl), 1529-1537.
- Wu, D. H., Liu, L., Chen, L. H., & Ding, Y. Q. (2004). KAI1 gene expression in colonic carcinoma and its clinical significances. *World J Gastroenterol*, 10(15), 2245-2249.

- Wu, Q., Ji, Y., Zhang, M. Q., Chen, Y. Q., Chen, F., Shi, D. L., Su, W. J. (2003). Role of tumor metastasis suppressor gene KAI1 in digestive tract carcinomas and cancer cells. *Cell Tissue Res*, 314(2), 237-249. doi:10.1007/s00441-003-0781-6
- Wu, X., Rubin, M., Fan, Z., DeBlasio, T., Soos, T., Koff, A., & Mendelsohn, J. (1996). Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene*, 12(7), 1397-1403.
- Wu, Z. M., Yuan, X. H., Jiang, P. C., Li, Z. Q., & Wu, T. (2006). Antisense oligonucleotides targeting the focal adhesion kinase inhibit proliferation, induce apoptosis and cooperate with cytotoxic drugs in human glioma cells. *J Neurooncol*, 77(2), 117-123. doi:10.1007/s11060-005-9025-9
- Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Arnaout, M. A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science*, 294(5541), 339-345. doi:10.1126/science.1064535
- Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L., & Arnaout, M. A. (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*, 296(5565), 151-155. doi:10.1126/science.1069040
- Xu, J. H., Guo, X. Z., Ren, L. N., Shao, L. C., & Liu, M. P. (2008). KAI1 is a potential target for anti-metastasis in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*, 14(7), 1126-1132.
- Yamada, S., Bu, X. Y., Khankaldyyan, V., Gonzales-Gomez, I., McComb, J. G., & Laug, W. E. (2006). Effect of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) on glioblastoma growth in nude mice. *Neurosurgery*, 59(6), 1304-1312; discussion 1312. doi:10.1227/01.neu.0000245622.70344.be
- Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Gonzalo, P., Batista, A., Megias, D., Genis, L., Sanchez-Madrid, F. (2008). MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. *Blood*, 112(8), 3217-3226. doi:10.1182/blood-2008-02-139394
- Yang, C. H., Chou, H. C., Fu, Y. N., Yeh, C. L., Cheng, H. W., Chang, I. C., Chen, Y. R. (2015). EGFR over-expression in non-small cell lung cancers harboring EGFR mutations is associated with marked down-regulation of CD82. *Biochim Biophys Acta*, 1852(7), 1540-1549. doi:10.1016/j.bbadis.2015.04.020
- Yang, J. L., Jackson, P., Yu, Y., Russell, P. J., Markovic, B., & Crowe, P. J. (2002). Expression of the KAI1 metastasis suppressor gene in non-metastatic versus metastatic human colorectal cancer. *Anticancer Res*, 22(6a), 3337-3342.
- Yang, J. M., Peng, Z. H., Si, S. H., Liu, W. W., Luo, Y. H., & Ye, Z. Y. (2008). KAI1 gene suppresses invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells in vitro and in animal models. *Liver Int*, 28(1), 132-139. doi:10.1111/j.1478-3231.2007.01620.x
- Yang, X., Wei, L., Tang, C., Slack, R., Montgomery, E., & Lippman, M. (2000). KAI1 protein is down-regulated during the progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res*, 6(9), 3424-3429.
- Yang, X., Wei, L. L., Tang, C., Slack, R., Mueller, S., & Lippman, M. E. (2001). Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res*, 61(13), 5284-5288.
- Yang, X., Welch, D. R., Phillips, K. K., Weissman, B. E., & Wei, L. L. (1997). KAI1, a putative marker for metastatic potential in human breast cancer. *Cancer Lett*, 119(2), 149-155.
- Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 127-137. doi:10.1038/35052073
- Yen, H., Florentine, B., Kelly, L. K., Bu, X., Crawford, J., & Martin, S. E. (2000). Fine-needle aspiration of a metaplastic breast carcinoma with extensive melanocytic differentiation: a case report. *Diagn Cytopathol*, 23(1), 46-50.
- Zemni, R., Bienvenu, T., Vinet, M. C., Sefiani, A., Carrie, A., Billuart, P., Chelly, J. (2000). A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet*, 24(2), 167-170. doi:10.1038/72829

- Zhang, F., Kotha, J., Jennings, L. K., & Zhang, X. A. (2009). Tetraspanins and vascular functions. *Cardiovasc Res*, 83(1), 7-15. doi:10.1093/cvr/cvp080
- Zhang, G., Cheng, Y., Chen, G., Tang, Y., Ardekani, G., Rotte, A., Zhou, Y. (2015). Loss of tumor suppressors KAI1 and p27 identifies a unique subgroup of primary melanoma patients with poor prognosis. *Oncotarget*, 6(26), 23026-23035. doi:10.18632/oncotarget.4854
- Zhang, K., & Chen, J. (2012). The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr*, 6(1), 20-29. doi:10.4161/cam.18702
- Zhang, P., Feng, S., Liu, G., Wang, H., Fu, A., Zhu, H., Dong, C. (2016). CD82 suppresses CD44 alternative splicing-dependent melanoma metastasis by mediating U2AF2 ubiquitination and degradation. *Oncogene*, 35(38), 5056-5069. doi:10.1038/onc.2016.67
- Zhang, Q., Fan, H., Shen, J., Hoffman, R. M., & Xing, H. R. (2010). Human breast cancer cell lines co-express neuronal, epithelial, and melanocytic differentiation markers in vitro and in vivo. *PLoS One*, 5(3), e9712. doi:10.1371/journal.pone.0009712
- Zhang, X. A., Bontrager, A. L., & Hemler, M. E. (2001). Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem*, 276(27), 25005-25013. doi:10.1074/jbc.M102156200
- Zhang, X. A., He, B., Zhou, B., & Liu, L. (2003a). Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration. *J Biol Chem*, 278(29), 27319-27328. doi:10.1074/jbc.M303039200
- Zhang, X. A., Lane, W. S., Charrin, S., Rubinstein, E., & Liu, L. (2003b). EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 63(10), 2665-2674.
- Zhao, J., & Guan, J. L. (2009). Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 28(1-2), 35-49. doi:10.1007/s10555-008-9165-4
- Zhou, B., Liu, L., Reddivari, M., & Zhang, X. A. (2004). The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity. *Cancer Res*, 64(20), 7455-7463. doi:10.1158/0008-5472.can-04-1574
- Zoller, M. (2006). Gastrointestinal tumors: metastasis and tetraspanins. *Z Gastroenterol*, 44(7), 573-586. doi:10.1055/s-2006-926795
- Zoller, M. (2009). Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9(1), 40-55. doi:10.1038/nrc2543

9 Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei:

Frau Prof. Dr. Ute Reuning, die mich und meine Arbeit über den gesamten Zeitraum immer intensiv betreute und unterstützte, mit ihren fachkundigen Ratschlägen immer beiseite stand und immer zu einem Gespräch bereit war, für die gute Zusammenarbeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen, für die vielen gemeinsamen Sitzungen am CLSM sowie die Korrektur meiner Dissertation. Sie trug maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt für die Ermöglichung meiner Arbeit in der Klinischen Forschergruppe der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde der TU München und der konstruktiven Kritik im Rahmen der Progress-Reports.

Frau Anke Bengel für die gute praktische Einarbeitung in die Methodik der Zellkultur und alle weiteren praktischen Laborarbeiten, für alle Hilfe und Unterstützung sowohl im Labor als auch menschlich, für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die Motivation und Kraft sowie das viele Lachen und dafür, dass sie immer für mich da war, unabhängig welcher Belange.

Herrn Prof. Dr. Viktor Magdolen, Herrn Dr. Holger Bronger und Herrn Dr. Rudolf Napieralski für die konstruktive Kritik im Rahmen der Progress-Reports.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Klinischen Forschergruppe der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde der TU München für die angenehme, motivierende Arbeitsatmosphäre und die immer entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Besonderen Dank an Julia Hingerl, Dr. Susanne Sölch, Dr. Claudia Windmüller, Dominik Alterauge, Tom Schulze und Anne Karge für die Pflege meiner Zellen in meiner Abwesenheit und vor allem für die Motivation, Kraft und das Durchhaltevermögen sowie die nötige Portion Spaß im Laboralltag, welche mich in meiner Arbeit immer voranbrachten.

Meiner Familie und meinem Verlobten für die stetige motivierende Unterstützung, das Verständnis, die Bereicherung meiner Freizeit und die Ermöglichung meiner gesamten Ausbildung.