

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Frauenklinik der Technischen Universität München
Klinische Forschergruppe
(apl. Prof. Dr. U. Reuning)

**Einfluss des Metastasierungssuppressors KAI1 (CD 82) auf das
Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Migrations- und *spreading*-Verhalten
humaner Ovarialkarzinomzellen**

Pamina Xenia Charlotte Geiger

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

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

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

Die Dissertation wurde am 26.04.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2012 angenommen.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Fachzeitschrift

Ruseva, Z., Geiger, P.X.C., Hutzler, P., Kotzsch, M., Luber, B., Schmitt, M., Gross, E., Reuning, U. Tumor suppressor KAI1 affects integrin $\alpha_v\beta_3$ -mediated ovarian cancer cell adhesion, motility, and proliferation. *Exp Cell Res.* 315 (2009) 1759-1771

Poster

Ute Reuning, Zlatna Ruseva, Pamina X. C. Geiger, Eva C. Groß. Role of the tumor suppressor KAI1 in ovarian cancer biology. International Congress of the Japanese Society of Obstetrics and Gynecology. Kyoto, Japan (2007)

Ute Reuning, Zlatna Ruseva, Pamina Geiger, Anke Benge, and Eva Groß. Tumor suppressor KAI1 (CD82) crosstalks with integrin $\alpha_v\beta_3$ and alters ovarian cancer cell adhesion, motility, and proliferation. XIXth Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis in Wien, Österreich (2008)

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1 Tumorprogression des Ovarialkarzinoms	3
1.2 Zellen und die extrazelluläre Matrix – Strukturgerüst und funktionelle Kommunikation	4
1.3 Die Superfamilie der Tetraspanine	4
1.4 Das Tetraspanin KAI1/CD82	7
1.4.1 Die Interaktionspartner von KAI1/CD82	8
1.5 Die Superfamilie der Integrine	12
1.6 Die Rolle der Integrine in der Zellmigration	15
1.7 Das Integrin $\alpha_v\beta_3$	18
1.8 Die Interaktion zwischen KAI1 und Integrinen	21
1.9 Experimentelle Grundlagen der vorliegenden Dissertation	25
1.10 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation	26
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Zelllinien	27
2.2 Material	28
2.3 Methoden	30
2.3.1 Zellkultur	30
2.3.2 FACS-Analyse	31
2.3.3 Zellmotilitätsstudien mittels <i>time-lapse</i> -Videomikroskopie	32
2.3.4 Analyse der zellulären Motilität	37
2.3.5 Analyse des <i>spreading</i> -Verhaltens der Zellen	38
2.3.6 Statistische Auswertung der Daten	39

3. ERGEBNISSE	41
3.1 Bestimmung der KAI1-Expressionshöhe mittels FACS-Analyse	41
3.2 Migratorische Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen als Funktion der KAI1-Expressionshöhe	42
3.2.1 Kriterien für den Ein- und Ausschluss von Zellen in die Versuchsauswertung	43
3.2.2 Effekte der KAI1-Expressionshöhe auf die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte zelluläre Motilität von OV-MZ-6- und OVCAR-3-Zellen auf Vitronektin	46
3.2.3 Effekte der KAI1-Expressionshöhe auf die zelluläre Motilität von OV-MZ-6-Zellen auf Kollagen Typ I	47
3.2.4 Effekte der KAI1-Expressionshöhe auf die zelluläre Motilität von OV-MZ-6-Zellen auf Poly-D-Lysin	50
3.3 Analyse des <i>spreading</i> -Verhaltens humaner OV-MZ-6-Ovarialkarzinomzellen	50
3.3.1 Einfluss des Matrixproteins und der KAI1-Expressionshöhe auf das Zell- <i>spreading</i> humaner OV-MZ-6-Ovarialkarzinomzellen	51
4. DISKUSSION	55
4.1 Einfluss des Metastasierungssuppressors KAI1 auf die migratorische Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen	57
4.2 Einfluss des Metastasierungssuppressors KAI1 auf das <i>spreading</i> -Verhalten humaner Ovarialkarzinomzellen	61
4.3 Veränderung der Expression des Metastasierungssuppressors KAI1 als Therapieansatz	62
4.4 Zusammenfassung und Ausblick	64
5. LITERATURVERZEICHNIS	66
5.1 Zeitschriftenartikel	66
5.2 Monographien	80
5.3 Buchbeiträge	80
5.4 Internet-Quellen	81
DANKSAGUNG	82

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen, die sich nach biochemischen oder funktionellen Kriterien ordnen lassen)
cDNA	Komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy / microscope</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
g	Erdbeschleunigung / Fallbeschleunigung / Ortsfaktor $\approx 9,81 \text{ m/s}^2$
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
KAI1	Kangai 1, CD82: ein Tetraspanin
KITENIN	KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin
LMP	<i>(Ovarian tumors of) low malignant potential</i>
mAK	Monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	Boten- (<i>messenger</i>) RNA
OVCAR-3; OV-MZ-6	Humane Ovarialkarzinomzelllinien
pAK	Polyklonaler Antikörper
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C

PDL	Poly-D-Lysin
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
TM4SF	<i>Transmembrane 4 superfamily</i>
uPAR	Urokinaseartiger Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
VN	Vitronektin
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen (<i>weight / volume</i>)

1. EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss, den ein Metastasierungssuppressor, das Protein KAI1, auf die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Motilität und das *spreading*-Verhalten (engl. *(to) spread* = ausbreiten, ausdehnen) humaner Ovarialkarzinomzellen ausübt. In diesem Einleitungskapitel soll dabei zunächst die klinische Relevanz des Themas aufgezeigt werden bevor die Struktur, die Funktion und vor allem die Interaktion der für diese Studie relevanten Proteine erläutert wird.

1.1 Das Ovarialkarzinom

Jedes Jahr erkranken in Deutschland ca. 8.000 Frauen an einem malignen Tumor des Ovars. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 69 Jahren. Nach Brust, Darm, Lunge, Gebärmutterkörper und der Haut (malignes Melanom) ist das Ovar bei Frauen mit 3,5% die sechst-häufigste Lokalisation aller Krebsneuerkrankungen. Unter den Inzidenzen der gynäkologischen malignen Tumoren steht es also an dritter Stelle. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate ist jedoch mit nur etwa 40% die niedrigste aller gynäkologischen Tumore. So sind maligne Tumore des Ovars zwar vergleichsweise seltene gynäkologische Tumore, weisen allerdings eine schlechte Prognose auf (Krebs in Deutschland 2007/2008. Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut, 2012, 12 und 76).

Der weitaus häufigste aller malignen Ovarialtumore ist mit ca. 90% das Ovarialkarzinom, also derjenige maligne Tumor, der vom Keimepithel ausgeht (Carreiras et al., 1996, 260-267; Auersperg et al., 2001, 255-288). In etwa 5% der Fälle zeigt sich eine familiäre Belastung mit Mutationen in den als Tumorsuppressorgenen wirkenden *breast cancer*-Genen 1 und 2 (BRCA1 und BRCA2) auf Chromosom 17 bzw. 13. Weiterhin gelten eine frühe Menarche, eine späte Menopause, sowie wenige Schwangerschaften bzw. Kinderlosigkeit als Risikofaktoren für diese Erkrankung. Im Gegensatz hierzu scheint die Einnahme von Ovulationshemmern, die den Eisprung mit nachfolgender Proliferation des Keimepithels verhindern, protektiv zu wirken.

Das klinische Bild des Ovarialkarzinoms zeigt häufig eine Ausbreitung des Tumors im kleinen Becken mit Infiltration der Nachbarorgane wie den Tuben, dem Rektum, der Blase, dem Uterus sowie der Vagina. Auch eine Ausbreitung entlang der

Lymphbahnen ist möglich. Der hämatogene Metastasierungsweg spielt hingegen, anders als bei vielen anderen Karzinomen, eine eher untergeordnete Rolle. Typisch für das Ovarialkarzinom ist aber die oft schon primäre, ausgedehnte intraperitoneale Ausbreitung. Diese sogenannte Peritonealkarzinose breitet sich zuerst entlang der parakolischen Rinnen bis hin zur Zwerchfellkuppel und in das große Netz hinein aus, kann aber letztendlich die gesamte Intraoperitonealhöhle mit Tumorgewebe überziehen. Da das lokale Tumorwachstum im Ovar lange Zeit keine Beschwerden macht und das Karzinom sich andererseits auch sehr früh intraperitoneal ausbreitet, werden die meisten Fälle erst im schon fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Schmalfeldt, 2007, 541-547; Pfeleiderer, 2002, 209-216; Jonat et al., 2007, 249-255). Die international gebräuchliche Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms erfolgt nach der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO-) Klassifikation. Hierbei bezeichnet das Stadium I ein auf das Ovar begrenztes Karzinom. Im Stadium II hat sich der Tumor bereits im kleinen Becken ausgebreitet, im Stadium III auch intraperitoneal, außerhalb des kleinen Beckens. Ein Stadium IV wird bei bereits vorliegenden Fernmetastasen diagnostiziert.

Am Anfang der Therapie steht eine radikale Operation mit dem Ziel der Entfernung des gesamten Tumorgewebes mit beiden Adnexen, dem Uterus, dem großen Netz, dem befallenen Peritoneum, sowie den pelvinen und paraaortalen Lymphknoten. Im seltenen Falle eines frühzeitig diagnostizierten, lokalen, noch nicht metastasierten Tumors bei jungen Frauen mit Kinderwunsch, kann evtl. organ- und somit fertilitätserhaltend operiert werden.

An die Operation schließt sich in der Primärbehandlung in nahezu jedem Fall eine Chemotherapie an, da es meist nicht gelingt, den Tumor operativ vollständig zu entfernen. Die Verwendung platinhaltiger Chemotherapeutika, wie Carboplatin in Kombination mit Taxanen, verspricht dabei im Hinblick auf Remission und Verlängerung der Überlebenszeit den größten Erfolg (Schmalfeldt, 2007, 541-547; Pfeleiderer, 2002, 209-216; Jonat et al., 2007, 249-255).

Das Lösen der Karzinomzellen vom Primärtumor des Ovars und ihre Ausbreitung in der Bauchhöhle erfolgt durch verschiedene Mechanismen. Einerseits tragen die Strömung der Peritonealflüssigkeit und die Darmbewegungen dazu bei, andererseits sind für die Mechanismen des Loslösens einzelner Zellen aus ihrem Verbund, ihre Migration und schlussendlich ihre erneute Adhäsion, die Interaktion verschiedener Zelladhäsionsmoleküle mit ihren Liganden in der extrazellulären Matrix (EZM)

entscheidend. An diesen Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen sind Integrine, eine Familie von transmembranären Oberflächenproteinen, entscheidend beteiligt. Im Fall des Ovarialkarzinoms scheinen besonders das Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit seinem Hauptmatrixliganden Vitronektin eine wichtige Rolle zu spielen (Carreiras et al., 1995, 530-536; Carreiras et al., 1999, 285-294; Hapke et al., 2003, 1073-1083).

1.1.1 Tumorprogression des Ovarialkarzinoms

Der Prozess der schrittweisen Entartung einer gesunden Zelle, die fest in den Gewebeverbund ihres Ursprungsorgans integriert ist, hin zu einer Tumorzelle mit metastatischem Potential wird als Tumorprogression bezeichnet. Molekularbiologische Studien haben verschiedene Gene, Protoonkogene und Tumorsuppressorgene, identifiziert, die im Laufe dieser Progression eine Rolle spielen. Für die Entwicklung invasiven Wachstumsverhaltens maligner Zellen spielen genetische Veränderungen, die zu veränderter Expression von Metastasierungssuppressorproteinen führen, eine Rolle (Yokota, 2000, 497-503). Die Aufgabe dieser Metastasierungssuppressorgene ist es, Prozesse wie Zelladhäsion, Migration und Invasion zu kontrollieren und zu inhibieren. Damit wird verhindert, dass Zellen sich unkontrolliert ausbreiten und gesundes Gewebe infiltrieren, verdrängen und zerstören. In vielen Tumorentitäten, so auch beim Ovarialkarzinom, wurde KAI1 aus der Familie der Tetraspanine als Metastasierungssuppressor identifiziert. Niedrige Expressionsraten von KAI1 korrelieren mit einem geringen Differenzierungsgrad des Tumors und somit einer schlechten Überlebensprognose der Patientinnen (White et al., 1998, 3143-3149; Liu et al., 2000, 10-15; Schindl et al., 2001, 244-248).

Im Gegensatz zu vielen anderen Tumorentitäten zeichnet sich das Metastasierungsmuster des Ovarialkarzinoms durch ein kontinuierliches Übergreifen auf benachbarte anatomische Strukturen und nicht vordringlich durch hämatogene Fernmetastasierung aus. Dieses Metastasierungsverhalten basiert auf der Beeinflussung und Modulation grundlegender zellbiologischer Prozesse im Laufe der Tumorprogression. In dieser Arbeit wird der Einfluss des Metastasierungssuppressors KAI1 auf die Motilität sowie das damit eng verknüpfte Adhäsions- und *spreading*-Verhalten humaner Ovarialkarzinomzellen untersucht. Wie im Folgenden erläutert wird, scheint hierbei die Interaktion von KAI1 mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ und dessen Hauptmatrixliganden Vitronektin eine entscheidende Rolle zu spielen.

1.2 Zellen und die extrazelluläre Matrix – Strukturgerüst und funktionelle Kommunikation

Zellen sind von einem Netzwerk aus hochmolekularen Proteinen, bestehend aus Kollagenen, Lamininen, Fibronectin, Vitronectin und Polysacchariden, der sogenannten extrazellulären Matrix (EZM), umgeben. Deren Komponenten werden von den in sie eingebetteten Zellen synthetisiert und in die Interzellularräume sezerniert (Timpl, 1996, 618-624). Vereinfacht gesehen dient die EZM als Fixierungs- und Strukturgerüst des Gewebes. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich jedoch neben der statischen Funktion auch ein Signalaustausch zwischen Matrixkomponenten und eingebetteten Zellen. Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen werden über verschiedene Zelloberflächenadhäsionsrezeptoren wie Integrine, Cadherine, und Mitglieder der Immunglobulin- und Selektinfamilie vermittelt, wobei Integrine die Hauptinteraktionsstelle zwischen EZM und Zytoskelett darstellen (Van der Flier und Sonnenberg, 2001, 285-298). Diese Adhäsionsrezeptoren sind zusammen mit anderen Membranproteinen, wie beispielsweise aus der Immunglobulinfamilie, Proteoglykanen, Komplementfaktorregulatorproteinen, Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und intrazellulären Signalmolekülen auf der Zelloberfläche in Multiproteinkomplexen organisiert. Hier bietet sich die Möglichkeit zur Interaktion und somit Integration ihrer verschiedenen Funktionen, was die komplexen Vorgänge der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation ermöglicht. Als ein wichtiger Organisator dieser großen Komplexe fungiert eine Proteinfamilie, die so genannten Tetraspanine.

1.3 Die Superfamilie der Tetraspanine

Die Familie der Tetraspanine (auch TM4SF = *transmembrane 4 superfamily* genannt) wurde erstmals 1990 beschrieben (Wright et al., 1990, 3195-3200; Classon et al., 1990, 1007; Oren et al., 1990, 4007-4015). Bis heute sind 33 humane Tetraspanine identifiziert worden (Charrin et al., 2009, 133-154).

Tetraspanine werden ubiquitär exprimiert, eine Ausnahme bilden die Erythrozyten, auf denen sich keine Tetraspanine finden. Einige sind auf vielen Zelltypen vertreten, so auch KAI1, andere sind auf einen bestimmten Zelltyp limitiert. So vielfältig wie ihr

Verteilungsmuster ist auch ihr Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Zellaktivierung, Proliferation, Adhäsion, Motilität und Differenzierung.

Strukturell sind Tetraspanine Transmembranmoleküle, die aus vier Transmembrandomänen bestehen und so eine kleine (EC1) und eine große (EC2) extrazelluläre sowie eine sehr kleine intrazelluläre Schleife formen (Abbildung 1). Die EC2 besteht aus einem konstanten Bereich, der die α -Helices A, B und E enthält, sowie einem nach der B-Helix gelegenen variablen Bereich. Von anderen Proteinen mit vier Transmembrandomänen unterscheiden sich Tetraspanine durch verschiedene konservierte Aminosäuren, einschließlich dem in dem variablem Bereich nach der B-Helix in der EC2 gelegenen CCG-Motiv (Cystein-Cystein-Glycin-Motiv) und zwei anderen Cysteinresten, die zu zwei essentiellen Disulfidbrücken in der EC2 beitragen (Kitadokoro et al., 2001, 12-18; Seigneuret et al., 2001, 40055-40064). Die Transmembrandomänen sind an der Interaktion mit anderen Tetraspaninen und Transmembrandomänen anderer Proteine beteiligt und enthalten typischerweise polare Aminosäuren. Diese bilden möglicherweise untereinander oder mit anderen Tetraspaninen Wasserstoffbrückenbindungen aus und fördern so Di- und Multimerisierung der Tetraspanine. Nahezu alle Tetraspanine enthalten membrannahe Cysteine, die palmitoyliert sind und eine wichtige Rolle in Aufbau und Organisation der *tetraspanin webs* zu spielen scheinen (Hemler, 2005, 801-811; Stipp et al., 2003, 106-112).

Tetraspanine spielen keine herausragende Rolle als Oberflächenrezeptoren, es sind nur wenige Beispiele von Interaktionen mit löslichen Liganden oder Rezeptoren auf benachbarten Zellen bekannt (Hemler, 2008, 747-758). Die vordringliche Aufgabe der Tetraspanine besteht darin, große Proteinnetzwerke in der Zellmembran aufzubauen und zu organisieren. Ein Tetraspanin rekrutiert dabei ein oder mehrere spezifische Bindungspartner und diese Primärkomplexe werden dann miteinander zu großen Netzwerken, den sogenannten *tetraspanin webs*, verknüpft (Boucheix und Rubinstein, 2001, 1189-1205; Hemler, 2001, 1103-1107; Stipp et al., 2003, 106-112). So wird offensichtlich, warum Tetraspanine in der Regulierung der meisten transmembranären Prozesse eine entscheidende Rolle spielen. Im Falle einiger Tetraspanine kann eine Änderung ihres Expressionsmusters in der Zelle im Rahmen der Tumorprogression Einfluss auf wichtige tumorbiologische Prozesse wie Adhäsion und Migration nehmen. Auffällig ist, dass die Expression einiger Tetraspanine in Tumoren mit hohem Metastasierungspotential hochreguliert ist (Co-029). Im

1.4 Das Tetraspanin KAI1/CD82

KAI1 (*kang ai*, chinesisch für „anti Krebs“) wurde 1992 erstmals als Metastasierungssuppressorgen beim Prostatakarzinom im Rattenmodell identifiziert. Eingebracht in Prostatakarzinomzellen der Ratte, konnte KAI1 die Metastasierung unterdrücken. Außerdem war die Expression von KAI1 in menschlichen Prostatakarzinomzelllinien nachweislich reduziert (Ichikawa et al., 1992, 3486-3490; Dong et al., 1995, 884-886). Bereits früher wurde es als Oberflächenprotein auf Lymphozyten identifiziert und deshalb anhand der *cluster of differentiation* (CD)-Klassifikation als CD82 bezeichnet (Gaugitsch et al., 1991, 377-383). Es ist mit den in der Vergangenheit identifizierten Antigenen R2, C33, IA4 und 4F9 identisch. Das Gen liegt auf Chromosom 11p11.2 und kodiert für ein 267 Aminosäuren großes Protein, welches zu der Familie der Tetraspanine gehört. Im menschlichen Körper ist die Expression von KAI1 weit verbreitet. Physiologisch hohe mRNA-Level werden in der Lunge, der Leber, der Niere, der Milz, der Prostata und der Plazenta gefunden. Moderat exprimiert ist es im Pankreas, dem Skelettmuskel und Thymus. Geringe Level finden sich im Gehirn, dem Herzen, dem Ovar, dem Magen sowie dem Uterus (Nagira et al., 1994, 144-157; Dong et al., 1995, 884-886). Seine Struktur ist evolutionär hoch konserviert. So weist die Aminosäurestruktur eine Übereinstimmung von 76% und eine Ähnlichkeit von 82% zwischen Mensch und Maus auf (Nagira et al., 1994, 144-157).

Wie es für Mitglieder dieser Proteinfamilie charakteristisch ist, so beteiligt sich auch das Tetraspanin KAI1 an der Bildung der *tetraspanin webs* (siehe auch Abbildung 5, Kapitel 1.8). Hier interagiert KAI1 mit einer Vielzahl an Bindungspartnern und ist an zahlreichen zellbiologischen Funktionen beteiligt.

Bekannt ist unter anderem seine wichtige Rolle als Kostimulator in der T-Zellaktivierung. Kostimulation von KAI1 und dem T-Zell-Rezeptor induziert Aktivierung, Differenzierung und Zytokinproduktion der T-Zellen und fördert weiterhin Zelladhäsion, Zell-*spreading* und Aktinpolymerisation (Lebel-Binay et al., 1995, 101-110; Lagaudrière-Gesbert et al., 1998, 4332-4344).

Auch in der B-Zellaktivierung scheint KAI1, hier im Komplex mit *major histocompatibility complex class II* (MHCII)-Rezeptoren, anderen B-Zellkostimmungsmolekülen, Tetraspaninen und Integrinen eine bisher allerdings noch weitgehend unklare Rolle zu spielen (Horváth et al., 1998, 30537-30543).

Wie ursprünglich für das Prostatakarzinom beschrieben, ist KAI1, neben diesen Funktionen im Rahmen der Immunzellaktivierung, inzwischen in vielen weiteren Organentitäten als Metastasierungssuppressorgen bekannt: Lunge, Pankreas, Brust, Leber, Kolon, Blase, Ösophagus, Schilddrüse, Endometrium, Ovar und Cervix. Sein Verlust oder seine geringe Expression werden in klinisch fortgeschrittenen malignen Tumoren gefunden und korrelieren mit einer schlechten Prognose (Adachi et al., 1996, 1751-1755; Guo et al., 1996, 4876-4880; Friess et al., 1998, 349-355; Yang et al., 2000, 3424-3429; Guo et al., 1998, 1481-1488; Maurer et al., 1999, 869-880; Yu et al., 1997, 1045-1049; Jackson et al., 2000, 9-17; Miyazaki et al., 2000, 955-962; Chen et al., 2004, 517-527; Liu et al., 2003, 1393-1398; Liu et al., 2000, 10-15; Liu et al., 2001, 1629-1634;).

Um die tumorbiologische Rolle von KAI1 zu untersuchen, wurde deshalb die niedrige endogene KAI1-Expression in einer humanen Mammakarzinomzelllinie mittels stabiler Transfektion von KAI1-cDNA erhöht. Dies führte *in vitro* zu einer verminderten zellulären Invasivität und vermindertem adhäsionsunabhängigem Zellwachstum. Im Tiermodell konnte bei Injektion dieser verstärkt KAI1-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Vektor- und Wildtypzellen eine Suppression der Metastasierungsrate nachgewiesen werden (Yang et al., 2001, 5284-5288). Ähnliches konnte im Tierversuch auch mit KAI1-überexprimierenden Melanomzellen gezeigt werden (Takaoka et al., 1998, 397-404).

Die Mechanismen, die diese metastasierungssupprimierenden Funktionen bedingen, sind noch nicht im Detail aufgeklärt. Da KAI1 selbst in seinen zytoplasmatischen Abschnitten kein enzymatisches Motiv besitzt, ist es wahrscheinlich, dass es nicht selbst als Signalinitiator fungiert, sondern eher über Modulation der Signaltransduktion seiner Bindungspartner eine Art Vermittlerfunktion ausübt (Maecker et al., 1997, 428-442).

1.4.1 Die Interaktionspartner von KAI1/CD82

Hinweise auf mögliche Funktionsmechanismen ergeben sich aus der Analyse des Zusammenspiels von KAI1 mit seinen Interaktionspartnern in den *tetraspanin webs*:

- **Andere Tetraspanine** wie CD9, CD63, CD81 und CD151 (Bienstock und Barrett, 2001, 139-153; Claas et al., 2001, 7974-7984; Miranti, 2009, 196-211). Diese Kontakte ermöglichen die Koordination der großen *tetraspanin webs*.
- **Immunrezeptoren** wie den MHC-I und -II Molekülen (Szöllösi et al., 1996, 2939-2946; Lagaudrière-Gesbert, 1997, 2790-2797), CD4 und CD8 (Imai und Yoshie, 1993, 6470-6481), CD19 (Bradbury et al., 1992, 2841-2850), CD46 (Lozahic et al., 2000, 900-907) und EW12/PGRL (Zhang et al., 2003, 2665-2674), FPRP/CD9P-1 (Charrin et al., 2001, 14329-14337). Sie interagieren mit KAI1 vor allem im Rahmen der beschriebenen B- und T-Zellaktivierung.
- **Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren** wie der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) (Odintsova et al., 2000, 1009-1012), der *heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF) (Nakamura et al., 2000, 18284-18290) und der *mesenchymal-epithelial transition factor* (c-Met), auch *hepatocyte growth factor receptor* (HGFR) genannt (Takahashi et al., 2007, 1919-1929). In der Verbindung mit dem Wachstumsfaktorrezeptor EGFR behindert KAI1 dessen ligandeninduzierte Dimerisierung und damit Aktivierung und verringert außerdem dessen Membranexpression durch Beschleunigung seiner Endozytoserate (Odintsova et al., 2000, 1009-1012; Odintsova et al., 2003, 4557-4566).
- **E-Cadherin** ist ein vor allem in Epithelien essentielles Adhäsionsmolekül (Afshari et al., 1999, 197). Zell-Zell-Adhäsion hindert Zellen daran, sich aus dem Verbund zu lösen und zu disseminieren. KAI1 stärkt die E-Cadherin-vermittelte interzelluläre Adhäsion und reduziert möglicherweise so die Disseminierung maligner Zellen (Abe et al., 2008, 163-170).
- **Matrix-Metalloproteinasen (MMP)** sind eine Gruppe von Enzymen, die Komponenten der EZM spalten können und so viele physiologische Funktionen, beispielsweise im Rahmen der Angiogenese oder Wundheilung, ausüben. So wurde ihre Überexpression in vielen Malignomen beobachtet, wo sie die Gewebeinvasion maligner Zellen ermöglichen (Olszyński und Zimowska, 2009, 76-84). Interessanterweise wird die Expression ihrer natürlichen Antagonisten, den *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMP) durch KAI1 hochreguliert und somit Tumorzellinvasion supprimiert (Jee et al., 2006, 655-661).
- **Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC)** ist ein Oberflächenprotein auf Gefäßendothelien. KAI1-exprimierende Zellen, die sich vom Primärtumor gelöst haben, können sich an diese Gefäßendothelien über die direkte Interaktion mit

DARC anheften. Diese Verbindung führt zur Hemmung der Zellproliferation und zur beschleunigten Zellalterung und somit zur Hemmung der Tumorzellmetastasierung. Damit in Einklang steht, dass die metastasierungssupprimierende Funktion von KAI1 in DARC-knockout-Mäusen signifikant beeinträchtigt ist (Bandyopadhyay et al., 2006, 933-938).

- **Intrazelluläre Signalproteine** wie die Proteinkinase C (PKC) (Zhang et al., 2001, 25005-25013) und die *focal adhesion kinase* (FAK) (Zhang et al., 2003, 27319-27328). Diese Proteine spielen auch in der Interaktion zwischen KAI1 und Integrinen eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 1.8).
- **KAI1-COOH-terminal interacting tetraspanin (KITENIN)**, ein weiteres Transmembranprotein, bindet an die zytoplasmatische Domäne von KAI1 und scheint sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine adhäsions-, invasions- und motilitätsfördernde Wirkung zu besitzen, die allerdings durch Assoziation mit KAI1 abgeschwächt werden kann (Lee et al., 2004, 4235-4243).
- **EWI2/PGRL**, ein Mitglied der Superfamilie der Immunglobuline zeigt in Assoziation mit KAI1 eine motilitätssupprimierende Wirkung auf Tumorzellen (Zhang et al., 2003, 2665-2674).
- Weitere Proteine, wie die Gamma-Glutamyl-Transpeptidase (γ GT) (Nichols et al., 1998, 4123-4129) und die Ganglioside GD1a, GM2 und GM3 (Odintsova et al., 2003, 4557-4566; Todeschini et al., 2008, 1925-1930) wurden in Komplexen mit KAI1 nachgewiesen.
- **Integrine der β_1 -Familie** $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ (Berditchevski et al., 2001, 4143-4151). Die Interaktion von KAI1 mit Integrinen hat vielfältige Auswirkungen und spielt u.a. auch in der Tumorprogression eine große Rolle. Hierauf wird in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

KAI1 kann im Rahmen der Interaktion mit seinen Bindungspartnern seine Funktionen auf verschiedene Arten ausüben. Einerseits ist über direkten physikalischen Kontakt die Beeinflussung der Expressionsrate seines Interaktionspartners möglich, so beispielsweise über die Beschleunigung von dessen Endozytoserate („*touch and down*“-Mechanismus), oder es kann direkt Eingriff in das Bindungsverhalten seines Interaktionspartners an weitere Partner nehmen („*physical hindrance*“-Mechanismus). Andererseits kann KAI1 seine Funktion über die Beeinflussung intrazellulärer Signaltransduktionswege ausüben (Tonoli und Barrett, 2005, 563-570) (Abbildung 2).

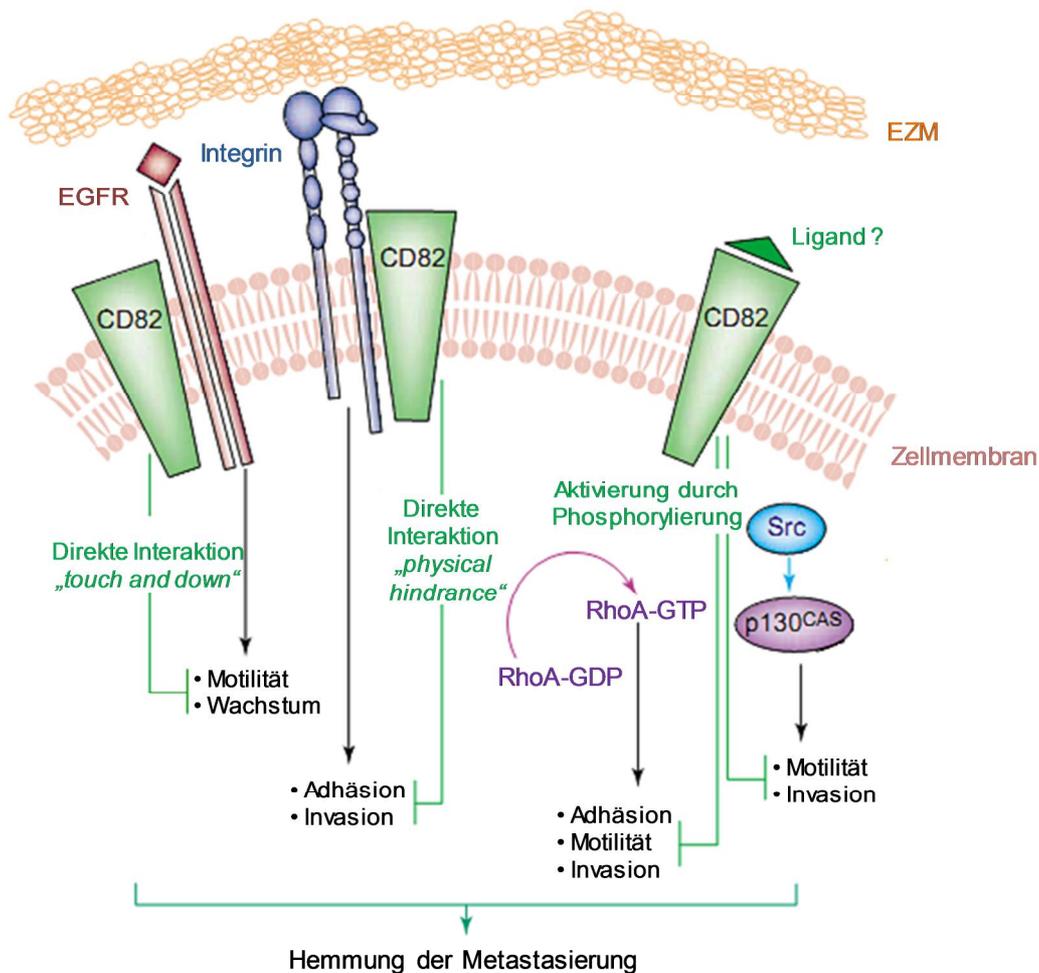


Abbildung 2: Mögliche Mechanismen der durch KAI1 induzierten Hemmung der Metastasierung maligner Tumoren (modifiziert nach Tonoli und Barrett, 2005, 563-570)

Das Tetraspanin KAI1 interagiert mit einer Vielzahl an Partnern. Seine Fähigkeiten als Metastasierungssuppressor scheint es auf zwei Arten zu ausüben. Einmal durch direkten physikalischen Kontakt mit anderen Proteinen. Als ein Beispiel ist hier die Beeinflussung der Signaltransduktion des Wachstumsfaktorrezeptors EGFR sowie der Integrine gezeigt. KAI1 kann deren Internalisierung induzieren („touch and down“) oder aber ihre normalen Interaktionsmechanismen oder ihre Lokalisation beeinflussen („physical hindrance“). Der zweite Mechanismus ist die Aktivierung von Proteinen, die an intrazellulären Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Hier gezeigt ist die Phosphorylierung der FAK, die dann, wiederum durch Phosphorylierung, ihre Substrate wie die Rho- und Src-Kinasen aktiviert und somit intrazelluläre Signalkaskaden auslöst. Auf diesen Wegen kann KAI1 die Unterdrückung pro-metastatischer Zellfunktionen wie Wachstum, Adhäsion, Motilität und Invasion modulieren (Tonoli und Barrett, 2005, 563-570).

Eine Veröffentlichung von Lee et al. zeigte, wie wichtig KAI1 in seiner Koordinations- und Vermittlerfunktion für transmembrane Prozesse ist und gibt Hinweise auf die Lokalisation der Interaktionsstellen mit anderen Molekülen innerhalb der Proteinstruktur von KAI1 (Lee et al., 2003, 7247-7255). Lee und Mitarbeiter entdeckten bei Magenkarzinompatienten mit vergleichsweise schlechter Prognose sowohl im Tumorgewebe als auch in Lymphknoten- und Peritonealmetastasen eine

KAI1-Splicevariante, bei der dem KAI1-Molekül der distale Teil des zweiten extrazellulären Loops (EC2) und Teile der vierten Transmembranregion fehlen. Genomische DNA-Analysen ergaben, dass diese Variante durch alternatives *splicen* des Exons 7 entsteht. Immunpräzipitationsexperimente zeigten, dass durch diese Deletion bedingte Strukturveränderungen die Interaktion mit dem Integrin $\alpha_3\beta_1$ schwächen. In der immunzytochemischen Färbung konnte gezeigt werden, dass die Splicevariante im Gegensatz zu dem vollständigen KAI1-Protein nicht mit dem Zell-Zell-Interaktionsprotein E-Cadherin auf der Zelloberfläche kolokalisiert ist. Kolon-Adenokarzinomzellen der Maus, die mit der Splicevariante stabil transfiziert wurden, zeigten *in vitro* im Vergleich zu stabil mit Wildtyp-KAI1 transfizierten Zellen erhöhte Zellproliferationsraten und ein erhöhtes invasives Potential. *In vivo* zeigte sich ein verringertes Tumorwachstum durch Transfektion der Zellen mit Wildtyp-KAI1, nicht aber durch Transfektion mit der Splicevariante. Außerdem zeigte sich ein höheres Metastasierungspotential der mit der Splicevariante transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit Wildtyp-KAI1 transfizierten Zellen.

Die hier genannten Interaktionen von KAI1 verdeutlichen, wie vielfältig der Einfluss von KAI1 auf unterschiedliche zellbiologische Prozesse ist. Unter den Bindungspartnern mit am besten untersucht ist aber wohl eine Gruppe von Transmembranproteinen, die so genannten Integrine, welche in der Zell-Matrix-Interaktion eine tragende Rolle spielen. Ein Vertreter dieser Familie, das Integrin $\alpha_v\beta_3$, ist entscheidend für die Motilität maligner Ovarialepithelzellen (Carreiras et al., 1999, 285-294; Hapke et al., 2003, 1073-1083). Das legt die Frage nach einer möglichen Interaktion von Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit KAI1 nahe. Dementsprechend schließt sich im Folgenden ein Exkurs über die Familie der Integrine, speziell das Integrin $\alpha_v\beta_3$ an, bevor dann die genaue Interaktion mit KAI1 erläutert werden wird.

1.5 Die Superfamilie der Integrine

Integrine sind Transmembranproteine, die Prozesse wie Zellproliferation, -migration, -adhäsion, -differenzierung und Zellzyklusregulierung steuern indem sie, getriggert durch Signale aus dem Extrazellulärraum, das zelluläre Genexpressionsmuster beeinflussen. Weiterhin können sie in Signalkaskaden anderer Proteine wie beispielsweise der Wachstumsfaktorrezeptoren eingreifen (Howe et al., 1998, 220-231; Dedhar, 1999, 37-43).

Strukturell gesehen sind Integrine Glykoproteine, die aus je einer α - und β -Integrinkette bestehen, die nicht-kovalent miteinander verbundenen sind (Hynes, 1987, 549-554) (Abbildung 2 und 3). Mittlerweile sind 18 verschiedene α - und 8 β -Integrinketten bekannt, die sich zu 24 verschiedenen heterodimeren Integrinen zusammensetzen (Damsky und Werb, 1992, 772-781; Van der Flier und Sonnenberg, 2001, 285-298; Shattil et al., 2010, 288-300). Jeder Zelltyp besitzt ein unterschiedliches Expressionsmuster an Integrinen und jedes Heterodimer bindet verschiedene Komponenten der EZM. Umgekehrt binden auch die einzelnen EZM-Proteine wiederum viele verschiedene Integrine (überlappende Ligandenspezifität) (Hynes, 1987, 549-554; Ruoslahti und Pierschbacher, 1987, 491-497).

Die intrazellulären Domänen der Integrinketten sind relativ kurz und haben keine katalytische Funktion, so dass intrazelluläre Signaltransduktion und Bindung an das Aktinskelett der Zelle über die Interaktion mit einer Vielzahl von Signal- und Strukturmolekülen vermittelt werden.

Die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle wird von den Kopfgruppen beider Integrinketten gebildet (Giancotti und Ruoslahti, 1999, 1028-1032; Xiong et al., 2001, 339-345; Xiong et al., 2002, 151-155; Zaidel-Bar et al., 2007, 858-867). Die Bindung an Proteine der EZM erfolgt über spezifische Aminosäuresequenzen in den jeweiligen Matrixproteinen. So erkennen viele Integrine das RGD-Motiv (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) in Fibronectin, Vitronectin und anderen Proteinen (Hynes, 1992, 11-25; Van der Flier und Sonnenberg, 2001, 285-298). Außer Komponenten der EZM und, wie bereits besprochen, Tetraspaninen binden Integrine eine Vielzahl anderer Liganden, wie beispielsweise Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulinfamilie, die für die Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich sind (z.B. *intercellular adhesion molecules*: ICAMs und *vascular cell adhesion molecule-1*: VCAM-1), Plasmaproteine (z.B. Fibrinogen, Von-Willebrand-Faktor), Komplementfaktoren (z.B. iC3b) und Proteine der *a disintegrin and metalloproteinase*- (ADAM-) Familie (Van der Flier und Sonnenberg, 2001, 285-298). Unter den Membranproteinen spielen Integrine eine wichtige Rolle, da sie Signale über die Zellmembran hinweg in beide Richtungen vermitteln können (Abbildung 3). Einerseits regeln Signale aus dem Zellinneren die extrazelluläre Adhäsion und die Integrinaffinität gegenüber dem EZM-Liganden (sog. *inside-out signaling*), andererseits bewirkt die Kopplung von Integrinen an die EZM Signaltransduktion in das Zellinnere (sog. *outside-in signaling*) (Giancotti und Ruoslahti, 1999, 1028-1032;

Arnaout et al., 2005, 381-410). An dieser Übermittlung extrazellulärer Reize, dem *outside-in signaling*, sind Integrine auf verschiedenen Wegen beteiligt. Da die zytoplasmatischen Domänen der Integrinketten selbst keine katalytische Funktion besitzen, wird der Kontakt zu signalübermittelnden Kinasen, wie vor allem der *focal adhesion kinase* (FAK), über Adapterproteine vermittelt.

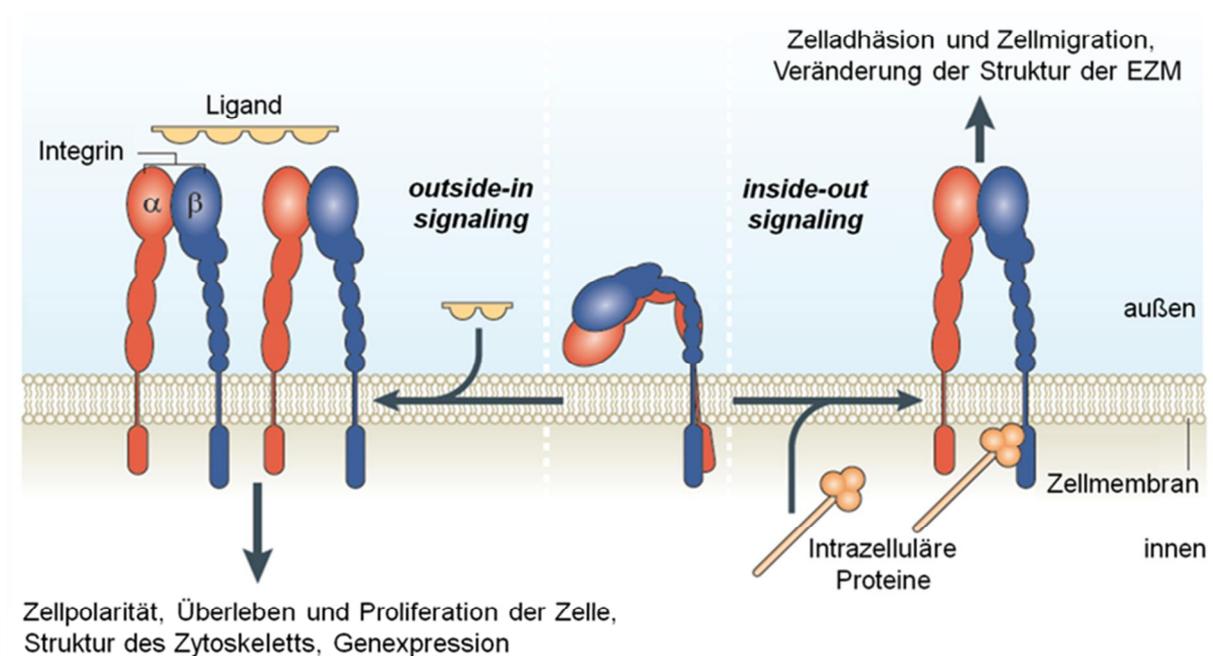


Abbildung 3: Bidirektionale integrinvermittelte Signaltransduktion über die Zellmembran (modifiziert nach Shattil et al., 2010, 288-300)

Integrine sind Transmembranmoleküle, die aus je einer α - und β -Kette bestehen. Dabei liegt der Großteil des Moleküls auf der extrazellulären Seite der Membran, die intrazelluläre C-terminale Region beider Ketten ist relativ kurz. Durch Änderung der Konformation beider Proteinketten und folglich der Gesamtstruktur können Integrine ihre Bindungsaffinität zu ihren Liganden verändern und somit verschiedene Aktivierungszustände annehmen. Die Aufgabe der Integrine ist die Übermittlung von Signalen über die Zellmembran hinweg. Anders als bei anderen Signaltransduktionsmolekülen, können Integrine sowohl Signale aus dem Zellinneren nach außen vermitteln (*inside-out signaling*), als auch in der umgekehrten Richtung (*outside-in signaling*).

Inside-out signaling: Binden intrazelluläre Aktivatorproteine an die zytoplasmatische Domäne der β -Integrinkette, so ändert sich die Konformation des Integrins, was zu einer Erhöhung der Affinität zu extrazellulären Liganden führt („Aktivierung der Integrine“). So kann die Zelle die Stärke ihrer extrazellulären Adhäsion abstimmen und somit Prozesse wie Zellmigration und die Strukturierung ihrer Umgebung regulieren.

Outside-in signaling: Auch die Bindung extrazellulärer Liganden kann die Konformation der Integrine ändern und, da viele ihrer Liganden multivalent sind, eine Clusterbildung der Integrine bewirken. Hierdurch kann die Zellstruktur (Zellpolarität und die Struktur des Zytoskeletts) verändert werden und der Zelle können Signale, die ihr Überleben oder ihre Proliferation sichern, übermittelt werden.

Zwar werden diese beiden Prozesse aus didaktischen Gründen oftmals getrennt beschrieben, tatsächlich aber sind sie miteinander eng verbunden und arbeiten synergistisch zusammen (Shattil et al., 2010, 288-300).

Über die FAK sind Integrine an wichtige Signalprozesse der Zelle gekoppelt und beeinflussen so Motilität, Zellzyklus, Zellwachstum und Apoptose (Schlaepfer et al., 1999, 435-478; Morino et al., 1995, 269-273; Sieg et al., 2000, 249-256; Zhao und Guan, 2011, 610-615). Auch die Aktivierbarkeit von Wachstumsfaktorrezeptoren, wie dem EGFR und dem *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR), wird durch Interaktion mit Integrinen gesteigert und die Signaltransduktion somit synergistisch gefördert (Moro et al., 1998, 6622-6632).

Der zweite Weg der transmembranären integrinvermittelten Signaltransduktion, das *inside-out signaling*, dient u.a. der Regulierung der Zelladhäsion. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist, dass Integrine verschiedene Aktivierungs- und somit Affinitätszustände annehmen können. Durch die Interaktion zytoplasmatischer Faktoren mit den zytoplasmatischen Integrindomänen ändern sich die Konformationen der α - und β -Ketten und deren Stellung zueinander, so dass die Affinität zu den Liganden in der EZM steigt. Die Stärke der Bindung zwischen dem jeweiligen Integrin und einem speziellen EZM-Liganden kann durch Clusterbildung der Integrine gesteigert werden (Hughes und Pfaff, 1998, 359-364). An den Membranabschnitten dieser Clusterbildung, den sog. Fokalen Adhäsionen, ist das Zytoskelett über die zytoplasmatische Domäne der β -Integrinkette mechanisch an die EZM gekoppelt (Dike et al., 1999, 441-448; Arnaout et al., 2007, 495-507). Das *inside-out* Aktivieren und Deaktivieren von Integrinen in diesen Fokalen Adhäsionen und die dadurch regulierte Balance zwischen Adhäsion und Lösung der Zellen sind für die Fähigkeit von Zellen, sich aktiv und gerichtet bewegen zu können, d.h. für eine erfolgreiche Zellmigration wichtig.

1.6 Die Rolle der Integrine in der Zellmigration

Die Motilität von Zellen ist für viele biologische Prozesse essentiell. In der Embryogenese ermöglicht sie beispielsweise die korrekte morphologische Entwicklung und neuronale Organisation. Bei Erwachsenen wären physiologische Prozesse wie Wundheilung, Angiogenese und Leukozytenmigration im Rahmen von Entzündungsprozessen ohne die migratorischen Fähigkeiten von Zellen nicht möglich (Sanderson und Smith, 1999, 1-16). Aber auch maligne Tumoren nutzen Zellinvasion und -migration um in das umgebende Gewebe eindringen zu können, Anschluss an das Blutgefäßsystem zu gewinnen und zu metastasieren. Sowohl in

physiologischen Migrationsprozessen, als auch in der Metastasierung von Tumoren spielen Integrine eine entscheidende Rolle.

Verschiedenartige Reize können Zellmigration induzieren. Dabei kann eine Aktivierung der Zelle beispielsweise durch Wachstumsfaktoren eine Erhöhung der Motilität bewirken. Auch ein chemischer Gradient (Chemotaxis), ein elektrisches Feld (Elektrotaxis) oder eine Änderung der Struktur der EZM (Haptotaxis) können zu erhöhter gerichteter Zellmotilität führen. Die Zelle reagiert mit einer Polarisierung ihrer Struktur, d.h. sie bildet einen führenden und einen hinteren Zellpol aus. Am vorderen Pol („*leading edge*“) bilden sich flache, stabile Ausstülpungen der Zellmembran (Lamellipodien) und einzelne schmale, fingerförmige Ausläufer (Filopodien) in die Bewegungsrichtung der Zelle aus, die die Umgebung nach Anhaftungspunkten an das Substrat sondieren (Abbildung 4). In diesen Zellfortsätzen baut sich ein Gerüst aus Aktin auf, indem die einzelnen Filamente am vorderen Pol durch Polymerisierung verlängert werden. Integrine, die sich im Bereich des vorderen Zellpols befinden, werden durch *inside-out signaling* aktiviert, was zu vermehrtem Einbau von Integrinen in die Membran der Zellausläufer, deren Clusterbildung und Ausbildung von Fokalen Adhäsionen führt. Hierdurch wird das wachsende Aktingerüst über die Integrine in der EZM verankert und die Zelle gewinnt den nötigen Substratkontakt in der neuen Umgebung um eine gerichtete Vorwärtsbewegung vollziehen zu können. Umgekehrt kann die Aktivierung von Integrinen durch einen extrazellulären Reiz u.a. die Aktivierung von Rho-GTPasen (z.B. Rac, Rho und Cdc42) induzieren, die dann wiederum die Polymerisierung der Aktinfilamente bewirken (*outside-in signaling*) und somit Motilität induzieren.

Gleichzeitig mit der zellulären Vorwärtsbewegung werden am hinteren Zellpol („*rear end*“) Aktinfilamente abgebaut und für die Zelladhäsion wichtige Membranproteine, speziell die Integrine, durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und zu frühen Endosomen geleitet. Von dort aus können sie abgebaut, oder aber erneut verwendet werden, indem sie an den vorderen Zellpol transportiert und dort wie beschrieben wieder in die Zellmembran eingebaut werden. Auch können Integrine durch laterale Motilität in der Zellmembran an den vorderen Zellpol gelangen. Durch Aktin-Myosin Interaktion kann sich das Zytoskelett jetzt, da es am vorderen Zellpol stabil in der Umgebung verankert ist, kontrahieren und die Zelle somit nach vorne ziehen (Abbildung 4) (Ramsay et al., 2007, 567-578; Caswell und Norman, 2008, 257-263; Vicente-Manzanares et al., 2009, 199-206; Schmidt und Friedl, 2009, 83-92).

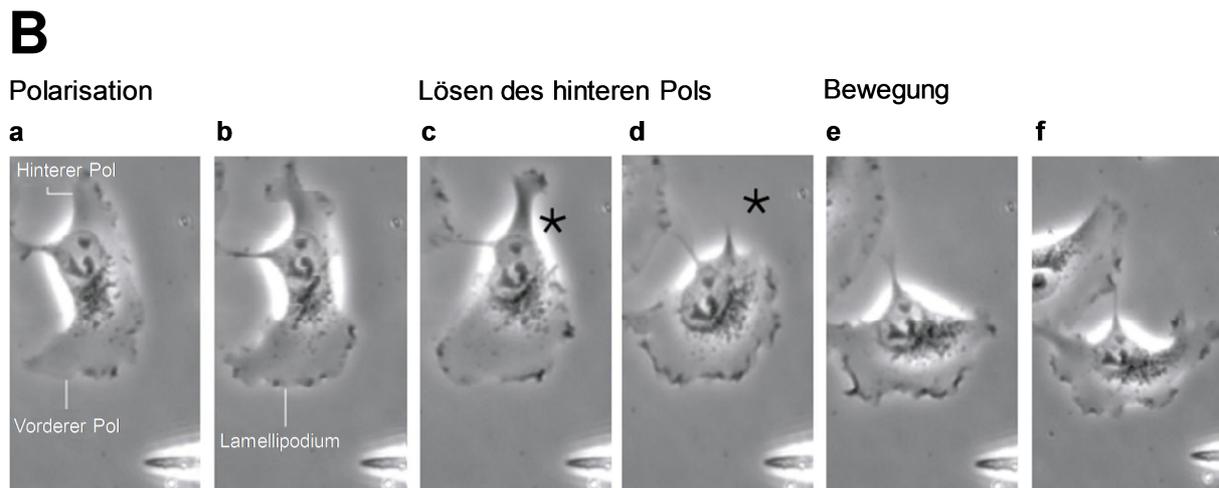
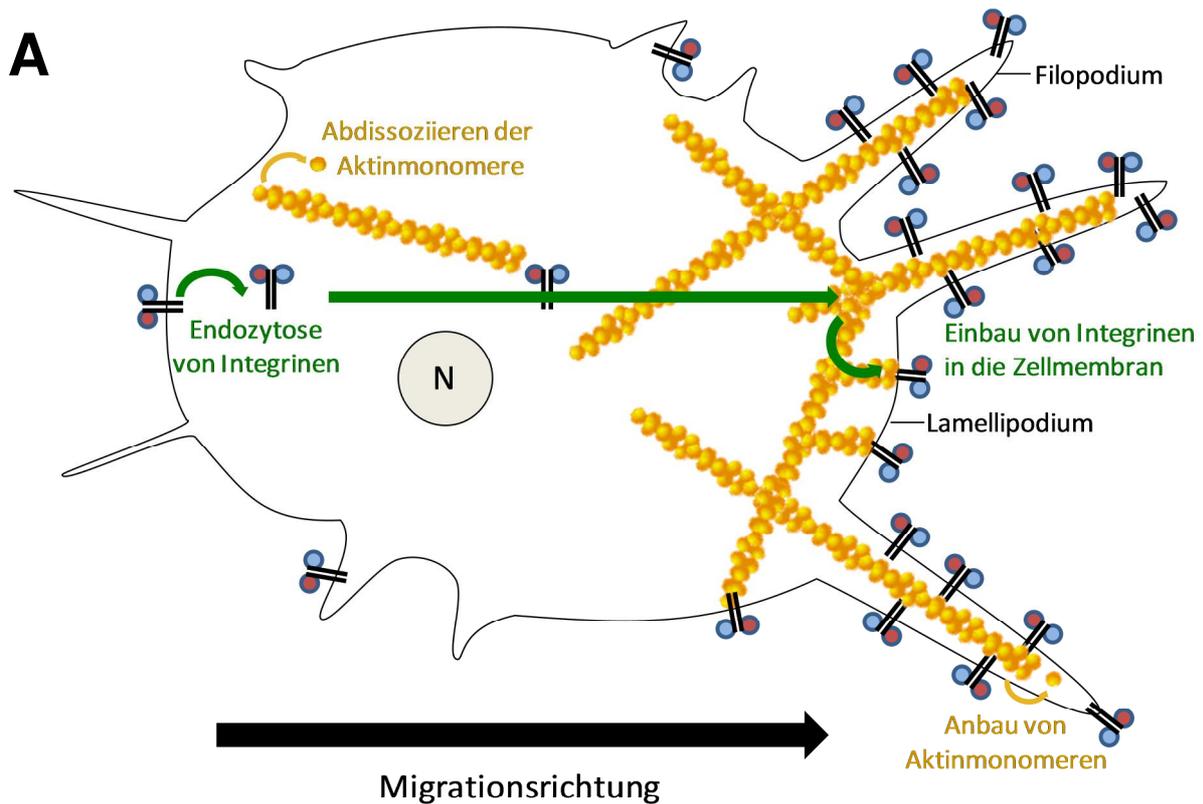


Abbildung 4: Mechanismen der Zellmigration (B: modifiziert nach Hood und Cheresch, 2002, 91-100)

Zellmigration lässt sich als Abfolge verschiedener Prozesse verstehen.

4A: schematische Darstellung der unter B erläuterten Prozesse (N = Nukleus)

4B: zeigt den Prozess der Zellmigration schrittweise am Beispiel von Adenokarzinomzellen, die auf einen chemotaktischen Gradienten (Insulin) hin migrieren

a,b: Die Zelle polarisiert ihre Struktur, d.h. sie entwickelt einen vorderen und einen hinteren Zellpol. Am vorderen Pol bilden sich, durch Aktinpolimerisation und lokale Verminderung der Oberflächenspannung der Zellmembran, Ausläufer (Lamellipodien und Filopodien) aus. Oberflächenrezeptoren, Integrine und Proteine des Zytoskeletts werden an den vorderen Zellpol transportiert, wo sie neue Kontaktpunkte mit der EZM schaffen.

c,d: Am hinteren Zellpol werden Kontakte zur EZM durch Endozytose der Membranproteine abgebrochen (*) und die Aktinfilamente abgebaut.

e,f: Jetzt werden durch Aktin-Myosin-Interaktion kontraktile Kräfte entwickelt und die Zelle kann sich, gehalten durch die Kontakte zur EZM, gerichtet vorwärts bewegen (Hood und Cheresch, 2002, 91-100).

Wie beschrieben, ist für eine zielgerichtete Zellmigration also eine genaue Abstimmung intra- und extrazellulärer Signale nötig. Entartete Zellen scheinen die Fähigkeit verloren zu haben, adäquat auf Einflüsse aus dem Extrazellulärraum zu reagieren (Assoian und Zhu, 1997, 93-98). Tumorzellen nutzen die Möglichkeit, die beschriebenen Prozesse für Zellmigration und -invasion außerhalb der physiologischen Grenzen zu beeinflussen. Dies geschieht einerseits durch Veränderung der Integrinexpression. Viele Studien haben deutliche Änderungen des Integrinexpressionsmusters maligner Zellen im Vergleich zu prä-neoplastischen Zellen des gleichen Typs gefunden (Mizejewski, 1999, 124-138). Andererseits kann auch die Aktivität bestimmter Integrine verändert werden, wodurch physiologische Signaltransduktionswege beeinflusst werden können. Integrine können als wichtige Schnittstelle im *outside-in signaling* die extrazellulären Signale kontrollieren und modifizieren, entweder direkt oder auch durch Interaktion mit anderen Molekülen der Zelloberfläche, wie beispielsweise den Wachstumsfaktorrezeptoren (Hood und Cheresch, 2002, 91-100). Einige Integrine, darunter auch das Integrin $\alpha_v\beta_3$, können die zelluläre Migration erleichtern, indem sie die Aktivität proteolytischer Enzyme wie den Matrixmetalloproteasen regulieren. Dieser Mechanismus ist besonders unter Tumorzellen verbreitet, um Gewebearrrieren zu zerstören (Ramsay et al., 2007, 567-578).

Jeder Zelltyp besitzt ein bestimmtes Muster an Integrinen, um bestmöglich an die jeweiligen Umgebung und Anforderungen an die Zellfunktion adaptiert zu sein. Im Verlauf der Tumorprogression ändert sich das Verhalten einer Zelle von einer Funktion zum Nutzen des Gesamtorganismus hin zu einem für den Gesamtorganismus schädlichem Verhalten, wie invasivem Wachstum, Induzierung der Angiogenese und Tumormetastasierung. Dies geht mit einer Änderung des Integrinexpressionsmusters einher (Mizejewski, 1999, 124-138). Im Ovarialkarzinom scheint dabei u.a. das bereits erwähnte Integrin $\alpha_v\beta_3$ und seine Bindung an Vitronektin eine herausragende Rolle zu spielen (Hapke et al., 2003, 1073-1083).

1.7 Das Integrin $\alpha_v\beta_3$

Erstmals in einer Veröffentlichung erwähnt wurde die Familie der Integrine 1987. Hynes benannte sie nach ihrer Funktion, Signale aus dem Zellinneren und dem extrazellulären Milieu zu vermitteln, sie also miteinander in Relation zu setzen, d.h.

zu „integrieren“ (Hynes, 1987, 549-554). Aber bereits 1985 isolierten Pytela et al. aus menschlichen Osteosarkomzellen einen Zelloberflächenrezeptor für das EZM-Protein Vitronektin (Pytela et al., 1985, 5766-5770), welcher später als das Integrin $\alpha_v\beta_3$ klassifiziert wurde.

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert. Über Zell-EZM- und Zell-Zell-Interaktionen und die nachgeschalteten intrazellulären Effekte sowie Interaktion mit der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) und Wachstumsfaktorrezeptoren spielt es beispielsweise eine wichtige Rolle in der physiologischen und tumorinduzierten Angiogenese und Neovaskularisierung sowie bei Tumorzellmigration und -invasion (Friedlander et al., 1996, 1939-1947; Van Leeuwen, 1996, 308-315; Zheng et al., 2000, 24565-24574; Eliceiri und Cheresh, 1999, 1227-1230; Eliceiri und Cheresh, 2001, 563-568; Vacca et al., 2001, 993-1003; Cruet-Hennequart et al., 2003, 1688-1702). Weiterhin verhindert das Integrin $\alpha_v\beta_3$ Anoikis (griechisch *anoikis* = heimatlos; d.h. programmierten Zelltod aufgrund des Verlusts der Zelladhäsion) von Tumorzellen epithelialen Ursprungs und ermöglicht ihnen auch unabhängig von ihrer Verankerung in der EZM zu überleben und zu proliferieren (Cleardin, 1998, 541-548).

Obwohl das Integrin $\alpha_v\beta_3$ als „klassischer Vitronektinrezeptor“ bezeichnet wird, ist dieser Name irreführend, da es weder selektiv mit Vitronektin interagiert noch dessen einziger Rezeptor ist (Horton, 1997, 721-725). Auch die Integrine $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$ und $\alpha_v\beta_8$ binden an Vitronektin als Liganden in der EZM (Schvartz et al., 1999, 539-544). Vitronektin ist ein multifunktionelles Glykoprotein, welches sich sowohl im Blutplasma als auch in der EZM vieler Organe findet. Durch seine Interaktion mit Glukosaminoglykanen, Kollagen, Plasminogen, Integrinen, Wachstumsfaktoren, dem Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor (uPAR), dem Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) sowie Faktoren des Komplementsystems ist es für eine Vielzahl von Zell- und Körperfunktionen essentiell (Schvartz et al., 1999, 539-544; Felding-Habermann und Cheresh, 1993, 864-868). Außer an Vitronektin bindet das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auch an eine Vielzahl weiterer extrazellulärer Proteine wie Fibronektin, Fibrinogen, den Von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin und Osteopontin (Gladson und Cheresh, 1994, 83-99). Theoretisch ist auch eine Bindung an Kollagen Typ I und Laminin möglich, jedoch ist hier erst eine Konformationsänderung durch Denaturierung nötig, um die RGD-Sequenz zugänglich zu machen (Felding-Habermann und Cheresh, 1993, 864-868; Horton, 1997, 721-725). α_v -Integrine

binden an die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) von Vitronektin. Jedoch scheint, wie es für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ gezeigt wurde, nach dieser initialen Bindung in einem zweiten Schritt noch eine RGD-unabhängige Bindung zu erfolgen, welche die Assoziation zwischen Integrin und Vitronektin stabilisiert (Orlando und Cheresh, 1991, 19543-19550).

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ spielt in vielen Tumorentitäten, u.a. auch im Ovarialkarzinom, eine wichtige Rolle. Sowohl normale Ovarialepithelzellen als auch Karzinomzellen exprimieren das Integrin $\alpha_v\beta_3$ und nutzen es u.a. zur Adhäsion an Vitronektin. Auch sind sie in der Lage, Vitronektin selbst zu synthetisieren, zu sezernieren und in einem fibrillären Netzwerk zu organisieren (Cannistra et al., 1995, 216-225; Carreiras et al., 1995, 530-536; Carreiras et al., 1996, 260-267; Reuning, 2011, 1909-1919). Die maligne Entartung scheint dabei mit einer gesteigerten Expression von Integrin $\alpha_v\beta_3$ einherzugehen (Felding-Habermann et al., 1992, 2018-2022). So wurde in Gewebeproben invasiver Ovarialkarzinome, verglichen mit Proben niedrig maligner Ovarialtumore (*ovarian tumors of low malignant potential* = LMP = Borderline-Tumoren), eine signifikant erhöhte Expression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ gemessen (Liapis et al., 1997, 443-449).

Die Überexpression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ führt zu gesteigerter Adhäsion, Motilität und Proliferation humaner Ovarialkarzinomzellen auf Vitronektin (Hapke et al., 2003, 1073-1083). Die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Vitronektin-Interaktion befähigt die Karzinomzellen, auch an Endothelzellschichten zu adhären und sie zu durchdringen. Somit können sich Karzinomzellen in der Peritonealhöhle ausbreiten und durch ihr Eindringen in Blutgefäße auch Fernmetastasen setzen. Dieser Prozess wird durch die Assoziation von Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit MMP-2 erleichtert (Brooks et al., 1996, 683-693; Leroy-Dudal et al., 2005, 482-488; Leroy-Dudal et al., 2005, 531-543; Kenny et al., 2008, 1367-1379).

Die signifikante Hochregulierung von Integrin $\alpha_v\beta_3$ während der Tumorprogression sowohl auf Endothelzellen als auch auf den Tumorzellen prädestiniert das Integrin als Markerprotein der Angiogenese für Tumorlokalisationsdiagnostik und als Zielstruktur für therapeutische Interventionen. Verschiedene Therapieansätze zielen darauf ab das Integrin $\alpha_v\beta_3$ zu antagonisieren. Vitaxin/Abegrin (Etaracizumab), ein monoklonaler Antikörper gegen Integrin $\alpha_v\beta_3$ konnte jedoch in verschiedenen Phase I-Studien die an ihn gestellten hohen Erwartungen nur teilweise erfüllen (Gutheil et al., 2000, 3056-3061; Delbaldo et al., 2008, 35-43). Die einzig bisher

veröffentlichte Phase II-Studie an Patienten mit metastasiertem Melanom konnte im Vergleich zur herkömmlichen Therapie mit Dacarbazin keine verbesserten Ergebnisse aufzeigen (Hersey et al., 2010, 1526-1534). Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz von synthetischen RGD-Peptiden, die die Ligandenbindung von Integrin $\alpha_v\beta_3$ kompetitiv hemmen. Hier zeigte sich Cilengitide in Phase I- und II-Studien mit Glioblastom-Patienten erfolgreich, so dass derzeit eine Phase III-Studie durchgeführt wird (Dijkgraaf et al., 2006, 605-610; Reardon et al., 2008, 5610-5617; Mas-Moruno et al., 2010, 753-768).

1.8 Die Interaktion zwischen KAI1 und Integrinen

Wie in den vorausgegangenen Kapiteln beschrieben, spielen Integrine und Tetraspanine, neben vielfältigen anderen Funktionen, vor allem in der Regulierung von Zelladhäsion und -motilität eine wichtige Rolle. So liegt es nahe, ein mögliches Zusammenspiel und eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Proteine zu untersuchen.

Im Rahmen der Tumorprogression spielt die Komplexbildung von Integrinen mit Tetraspaninen eine wichtige Rolle (Hemler et al., 1996, 67-71). Integrine haben in der Zell-EZM-Interaktion und damit auch in der Zellmotilität eine entscheidende Funktion. Tumorzellen scheinen nicht mehr adäquat auf Einflüsse aus dem Extrazellulärraum zu reagieren (Assoian und Zhu, 1997, 93-98), das Muster ihrer Integrinexpression ändert sich (Mizejewski, 1999, 124-138) und die Zellen zeigen ein malignes Invasions- und Migrationsmuster.

KAI1 ist in vielen Tumorentitäten als Metastasierungssuppressor bekannt und seine Expressionsstärke verringert sich, u.a. auch im Ovarialkarzinom, im Laufe der Tumorprogression (Liu et al., 2000, 10-15). Wurde aber durch stabile Transfektion der Tumorzellen mit KAI1-cDNA die endogene KAI1-Expression der Zellen wieder erhöht, so konnte in verschiedenen Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* eine verringerte Tumorigenität nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.4). Beim Ovarialkarzinom zeigte sich zudem im Vergleich zwischen gut und schlecht differenzierten Tumoren eine deutliche Umverteilung der subzellulären KAI1-Expression. Mit zunehmender Entdifferenzierung sinkt die Expression auf der Zellmembran, hingegen steigt jedoch die zytoplasmatische Expression an, so dass

KAI1 für seine Funktion als Koordinator der *tetraspanin webs* auf der Zelloberfläche nicht zur Verfügung steht (Houle et al., 2002, 69-78).

Um festzustellen, ob und in wie weit der metastasierungssupprimierende Effekt von KAI1 durch seine Interaktion mit Integrinen zu erklären ist, müssen die Wechselbeziehungen der beiden genauer analysiert werden (siehe auch Abbildung 5):

- Verschiedene Tetraspanine, u.a. auch KAI1, können über ihre zytoplasmatischen Domänen die Proteinkinase C (PKC), ein intrazelluläres Signaltransduktionsmolekül, in Fokale Adhäsionen rekrutieren. Dort agieren die Tetraspanine u.a. als Bindeglied zwischen der PKC und Integrinen der β_1 -Familie. In diesen PKC-Tetraspanin-Integrin-Komplexen werden α -Ketten der Integrine PKC-abhängig phosphoryliert. Dieser Schritt reguliert zelluläre Prozesse wie Signaltransduktion, Zellmorphologie, Zytoskelettorganisation und Zellmigration (Zhang et al., 2001, 25005-25013).
- Für α_6 -Integrine wurde gezeigt, dass KAI1 nicht nur die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflusst, sondern eine erhöhte KAI1-Expression auch ihre Exprimierung auf der Zelloberfläche durch Internalisierung vermindern kann („*touch and down*“, siehe auch Abbildung 2, Kapitel 1.4.1). Die Adhäsion der Zellen an das EZM-Protein Laminin wird somit deutlich verringert (He et al., 2005, 3346-3354). Auch die Endozytoserate des EGFR scheint durch erhöhte KAI1-Expression beschleunigt zu werden (Odintsova et al., 2000, 1009-1012).
- Für Lungenkarzinomzellen wurde gezeigt, dass KAI1 die Reifung von β_1 -Integrinvorstufen verzögert, was zu einer verminderten Expression der reifen Integrine auf der Zelloberfläche führt. Auch dieser Prozess führt wiederum zu einer Einschränkung der Zellmigration (Jee et al., 2007, 703-708).
- Plasminogen kann nach seiner Aktivierung zu Plasmin durch den Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) u.a. Fibrin spalten und somit Zellmigration und Gewebeumgestaltung befördern. Die proteolytische Aktivität von uPA wird durch die Bindung an seinen Rezeptor uPAR stark erhöht. Überexpression von KAI1 führt zur Relokalisierung des uPAR auf der Zelloberfläche in Fokale Adhäsionen und veranlasst dessen Komplexbildung mit dem Integrin $\alpha_5\beta_1$. In diesem Komplex ist die Fähigkeit des uPAR, seinen Liganden uPA zu binden und somit Fibrinogen zu Fibrin zu spalten, deutlich reduziert (Bass et al., 2005, 14811-14818).

- Über die Interaktion mit den Gangliosiden GM2 und GM3 kann KAI1 u.a. die Zellmotilität supprimieren. In invasiven Blasenkarzinomzellen wurde gezeigt, dass der Komplex GM2/GM3/CD82 u.a. die Zellmotilität beeinträchtigt, indem er die HGF-induzierte Aktivierung des Protoonkogens c-Met (= HGF-Rezeptor) blockiert. Auch die HGF-unabhängige Aktivierung von c-Met durch die Interaktion mit α_3 -Integrinen wird durch diese Komplexbildung behindert (Todeschini et al., 2008, 1925-1930).
- KAI1 kann die integrininduzierte Aktivierung und Phosphorylierung der zytoplasmatischen *focal adhesion kinase* (FAK) sowie ihres Substrates, der protoonkogenen Tyrosinkinase Src abschwächen. Somit kann es die Aktivierung der an der Regulierung von Migration und Invasion beteiligten Substraten dieser Aktivierungskaskaden, wie p130Cas-CRK, kontrollieren (Zhang et al., 2003, 27319-27328; Sridhar und Miranti, 2006, 2367-2378).

Die genannten Interaktionswege machen deutlich, wie eng KAI1 und Integrine zusammenarbeiten. Bisher wurde jedoch nur eine Interaktion von KAI1 mit Integrinen der β_1 -Familie nachgewiesen. Ob auch Integrine einer anderen β -Subfamilie mit KAI1 interagieren, blieb unklar.

Bezogen auf das Ovarialkarziom zeigten frühere Studien, dass die Stärke der Expression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ mit der Tumorprogression von Ovarialtumoren korreliert (Liapis et al., 1997, 443-449). Durch die Bindung an seinen Matrixliganden Vitronektin verstärkt es *in vitro* die Adhäsion, Migration und Proliferation von humanen Ovarialkarzinomzellen signifikant (Hapke et al., 2003, 1073-1083). Auch dass KAI1, u.a. in Ovarialepithelzellen, als Metastasierungssuppressor eine wichtige Rolle spielt, konnte bereits gezeigt werden (Liu et al., 2000, 10-15). Die dieser Funktion zu Grunde liegenden genauen Mechanismen blieben aber noch ungeklärt.

So lag es nahe diese beiden Erkenntnisse auf mögliche Verknüpfungen hin zu untersuchen, d.h. zu überprüfen, ob in Ovarialkarzinomzellen, in denen durch stabile Transfektion die KAI1-Expression wieder induziert wurde, ein metastasierungssupprimierender Einfluss auf Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte tumorbiologische Funktionen erreicht werden kann. Dafür wurden kultivierte humane Ovarialkarzinomzellen, die in der Wildtypform nur eine geringe endogene KAI1-Expression aufweisen, stabil mit KAI1-cDNA transfiziert, um zellbiologische Effekte als Funktion einer erhöhten KAI1-Expression zu untersuchen. Diese Untersuchungen waren nicht Teil der

vorliegenden Dissertation. Sie wurden in der AG von Frau Prof. Reuning durchgeführt und bilden die unmittelbare experimentelle Grundlage der vorliegenden Arbeit (Ruseva et al., 2009, 1759-1771). Sie sollen im Folgenden zum besseren Verständnis der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente kurz erörtert werden.

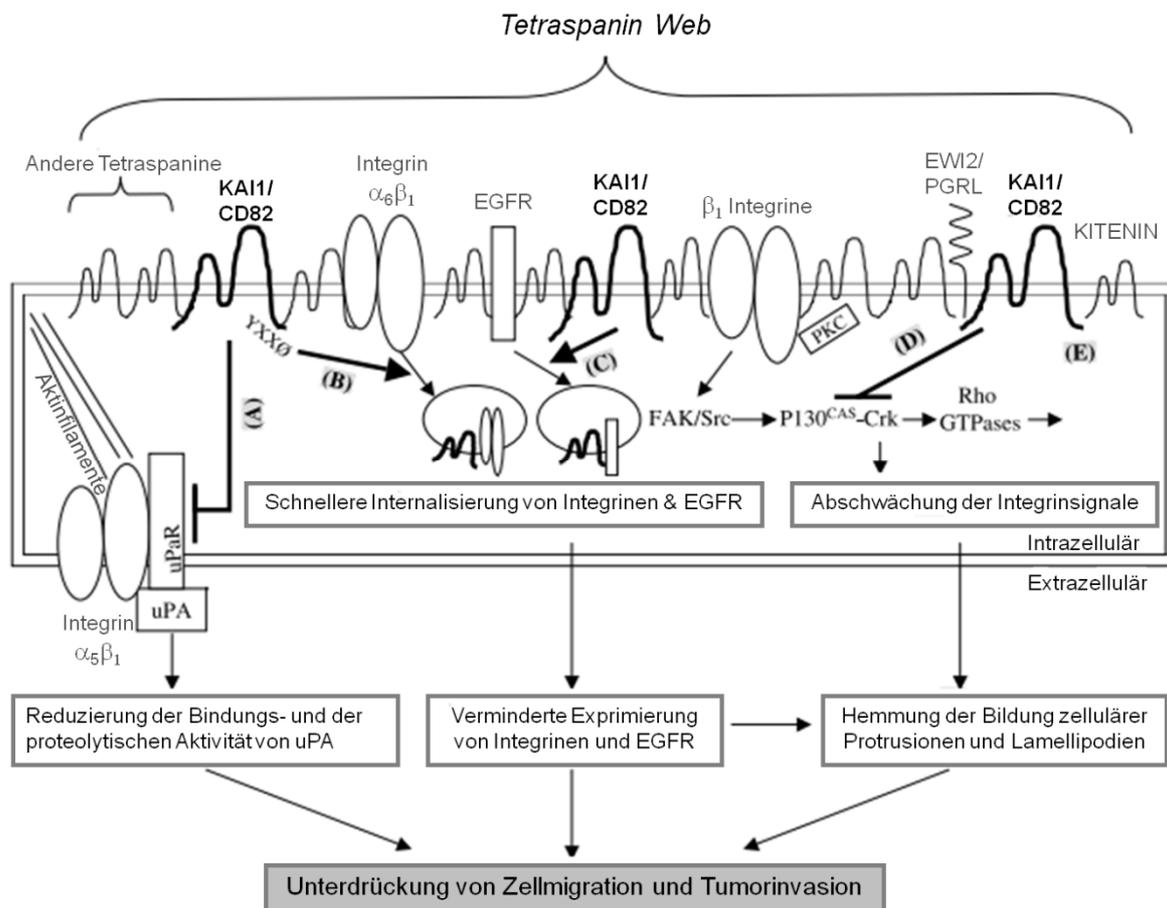


Abbildung 5: Mechanismen, die in den *tetraspanin webs* zur KAI1-vermittelten Unterdrückung von Zellmigration und Tumorinvasion beitragen (modifiziert nach Liu und Zhang, 2006, 183-194)

(A) KAI1 hemmt indirekt die Bindung von uPA an uPAR und somit die perizelluläre Plasminogenaktivierung, indem KAI1 die Relokalisierung von uPAR in Fokale Adhäsionen und seine Assoziation mit dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ induziert (Bass et al., 2005, 14811-14818).

(B) und (C) KAI1 beschleunigt die Internalisierung von Integrin $\alpha_6\beta_1$ und EGFR (He et al., 2005, 3346-3354; Odintsova et al., 2000, 1009-1012).

(D) KAI1 schwächt die integrinvermittelte Signaltransduktion und Aktivierung von FAK/Src und ihren Substraten wie P130CAS-Crk (Zhang et al., 2003, 27319-27328; Sridhar und Miranti, 2006, 2367-2378). KAI1 rekrutiert außerdem aktivierte PKC in Fokale Adhäsionen und vermittelt so die Phosphorylierung von β_1 -Integrinen (Zhang et al., 2001, 25005-25013). Folglich werden zelluläre Protrusionen, Retraktionen und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts gehemmt.

(E) Der Komplex KAI1/CD82-EWI2/PGRL verstärkt die motilitätshemmende Wirkung beider Moleküle (Zhang et al., 2003, 2665-2674), während KAI1/KITENIN die motilitätsfördernde Aktivität von KAITENIN abschwächt (Lee et al., 2004, 4235-4243) (siehe auch Kapitel 1.4.1).

1.9 Experimentelle Grundlagen der vorliegenden Dissertation

Für die Charakterisierung tumorbiologisch relevanter Effekte einer veränderten KAI1-Expressionshöhe wurden die humanen Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und OVCAR-3 verwendet (siehe Kapitel 2.1). Beide Zelllinien zeigen nur geringe endogene KAI1-Expressionsspiegel. Durch RT-PCR wurde mit der Hilfe von RNA, die aus humanem Ovarialkarzinomgewebe gewonnen wurde, KAI1-cDNA hergestellt und in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Hygro kloniert. Stabile Zelltransfektion wurde mittels Lipofektion durchgeführt. Anschließend wurden unter Selektion mit dem Antibiotikum Hygromycin OV-MZ-6- und OVCAR-3-Zellklone isoliert, die KAI1 in ansteigender Höhe exprimieren, um Effekte des KAI1 dosisabhängig zu untersuchen (Ruseva et al., 2009, 1759-1771). Das Ausmaß der KAI1-Expression der einzelnen OV-MZ-6-Klone wurde mittels immunzytochemischer Färbung (Abbildung 6, Kapitel 2.1), Western Blot-Analyse sowie Durchflusszytometrie (Daten werden im Kapitel 3.1 vorgestellt) überprüft. In Koimmunpräzipitationsstudien und immunzytochemischen Doppelfärbungen konnte gezeigt werden, dass KAI1 und Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf der Oberfläche von stabil mit beiden Molekülen transfizierten OV-MZ-6-Zellklonen kolokalisiert vorliegen, was ein erster Hinweis auf eine funktionelle Wechselwirkung der beiden Proteine sein kann (Ruseva et al., 2009, 1759-1771). In früheren Studien wurde bereits eine Interaktion von KAI1 mit Integrinen der β_1 -Familie beschrieben. Im nächsten Schritt untersuchten Reuning und Ruseva die Auswirkungen der veränderten KAI1-Expression auf Zelladhäsion und -proliferation. In früheren Studien wurde gezeigt, dass das Integrin $\alpha_v\beta_3$, welches auf der Oberfläche humaner Ovarialkarzinomzellen exprimiert wird, fast ausschließlich an das EZM-Protein Vitronektin bindet (Hapke et al., 2001, 26340-26348). Auf dieser Basis wurde die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Adhäsion humaner Ovarialkarzinomzellen an Vitronektin als Funktion der KAI1-Expression dieser Zellen ermittelt. Im Adhäsionsversuch zeigte sich deutlich eine positive Korrelation der Höhe der KAI1-Expression mit der Adhäsionsstärke an Vitronektin. In Zellproliferationsversuchen wurde der Einfluss der KAI1-Reexpression auf die Zellproliferationsrate der humanen Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 bzw. OVCAR-3 gemessen. Bei allen Zellklonen zeigte sich im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen eine von der Stärke der KAI1-Expression abhängige deutliche Reduktion der Proliferationsaktivität (Ruseva et al., 2009, 1759-1771).

1.10 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit bauen auf den beschriebenen, von Ruseva et al. durchgeführten Experimenten auf (Ruseva et al., 2009, 1759-1771).

- **Analyse der Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit ihrer KAI1-Expression:** Da für die Migration von Zellen eine optimale Substratanhaftung erforderlich ist, stellte sich von diesen Erkenntnissen ausgehend die Frage, welchen Einfluss die mit der verstärkten KAI1-Expression korrelierende Zelladhäsion auf die migratorische Fähigkeit der Zellen hat. Denkbar wäre, dass die durch die Präsenz von KAI1 verstärkte Zellanhaftung an die EZM über eine stabile Interaktion mit der Substratgrundlage zu einer kraftvolleren und effizienteren Vorwärtsbewegung der Zellen führt, ähnlich wie es für den Effekt einer erhöhten Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Expression beobachtet wurde (Hapke et al., 2003, 1073-1083). Da für eine optimale motile Aktivität eine Balance zwischen Zellanhaftung und -lösung nötig ist, wäre es umgekehrt aber auch möglich, dass das für eine effektive Migration nötige Maß an Adhäsion in den KAI1-überexprimierenden Zellen überschritten wird und die Zellen in ihrer Motilität eingeschränkt werden.
- **Analyse des *spreading*-Verhaltens humaner Ovarialkarzinomzellen in Anhängigkeit ihrer KAI1-Expression:** Weiterhin sollte anhand der Daten, die aus den Motilitätsassays gewonnen wurden, untersucht werden, wie sich die erhöhte KAI1-Expression in dem *spreading*-Verhalten der Zellen widerspiegelt. Durch verstärktes *spreading* vergrößern Zellen ihre Kontaktfläche zu der EZM oder benachbarten Zellen und bilden neue Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakt- und Adhäsionspunkte aus. So ist dies auch eng mit Änderungen in dem Adhäsions- und Migrationsverhalten dieser Zellen verknüpft. Setzt man den Einfluss, den eine erhöhte KAI1-Expression auf diese drei Faktoren - Zellphänotyp, Adhäsionsstärke der Zellen an die EZM und die Zellmotilität - ausübt, miteinander in einen Kontext, so können wichtige Erkenntnisse über die Funktionsweise von KAI1 als Metastasierungssuppressor im Ovarialkarzinom gewonnen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zelllinien

Für die Studien im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zwei humane Ovarialkarzinomzelllinien verwendet. Diese wurden von Ruseva et al., wie in Kapitel 1.9 beschrieben, mit KAI1-cDNA stabil transfiziert, um die niedrige endogene KAI1-Expression in diesen Zellen wieder anzuheben. Die KAI1-cDNA wurde basierend auf RNA aus humanem Ovarialkarzinomgewebe mittels RT-PCR generiert. Als Nachweis der erfolgten Reexpression von KAI1 in den Zellen dienten u.a. immunzytochemische Färbungen.

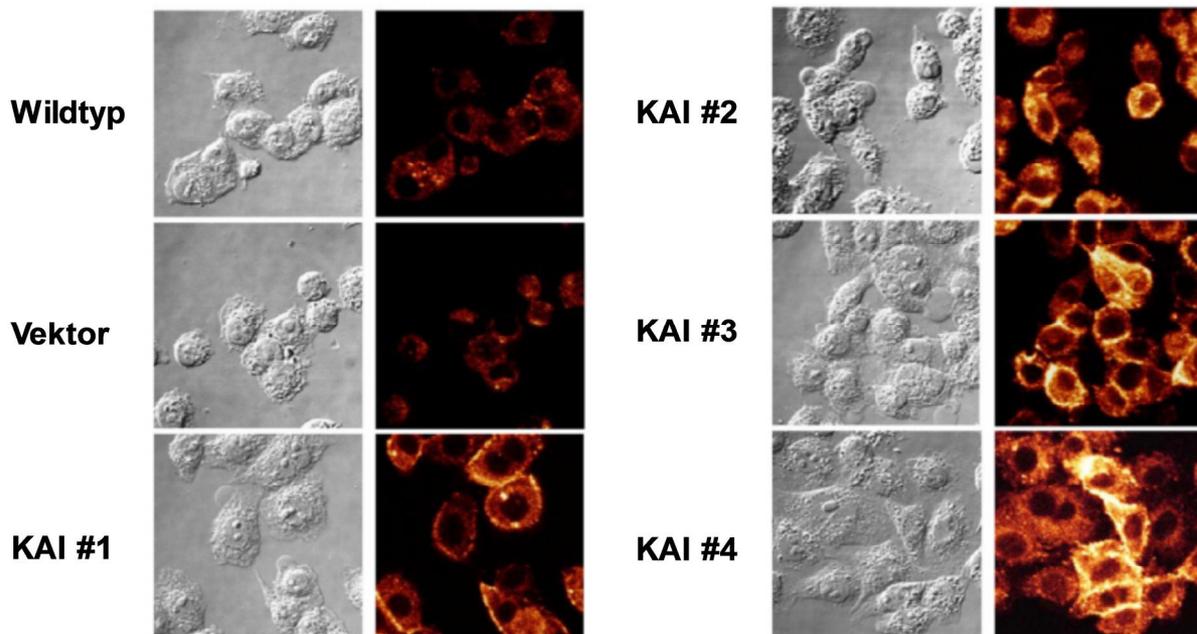


Abbildung 6: Nachweis der KAI1-Expression in stabilen Ovarialkarzinomzelltransfektanten durch immunzytochemische Färbung (modifiziert nach Ruseva et al., 2009, 1759-1771)

Stabil transfizierte OV-MZ-6-Zellen zeigen im Vergleich zu Wildtyp- und Vektor-transfizierten Zellen verschiedengradig erhöhte KAI1-Expressionslevel (2-fach (KAI#1) bis 6,2-fach (KAI#4) erhöht gegenüber den Wildtypzellen, siehe Kapitel 3.1).

Die Intensität der Fluoreszenzfärbung wurde dabei mit Hilfe des glowOv/Un LUT-Programms in Farben einer Leuchtskala umgewandelt: Niedrige Intensität (Rot), mittlere Intensität (Gelb), hohe Intensität (Weiß).

Primärantikörper: Monoklonaler Mausantikörper, gerichtet gegen humanes KAI1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)

Sekundärantikörper: Alexa-Fluor-488-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

OV-MZ-6: Diese humane Ovarialkarzinomzelllinie wurde aus dem Aszites einer Patientin mit schlecht differenziertem serös-papillärem Zystadenokarzinom des Ovars gewonnen (Möbus et al., 1992, 76-84).

OVCAR-3: Diese humane Ovarialkarzinomzelllinie wurde aus dem Aszites einer Patientin mit schlecht differenziertem papillärem Zystadenokarzinom des Ovars unter Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Adriamycin und Cisplatin gewonnen und von American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA bezogen (Hamilton et al., 1983, 5379-5389).

2.2 Material

Reagenzien und Materialien

<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM) mit Glutamax™	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES) Puffer (1M)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
1% (^w / _v) Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Hygromycin B (50 mg/ml)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
L-Arginin und L-Asparagin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vitronektin	Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Kollagen Typ I	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Unbeschichtete Zellkulturplatten mit Glasboden für den Motilitätsassay (P35G-0-14-C)	MatTek Corporation, Ashland, USA
Poly-D-Lysin Zellkulturplatten mit Glasboden für den Motilitätsassay (P35GC-0-14-C)	MatTek Corporation, Ashland, USA

Deckel für MatTek-Schalen mit gasdurchlässiger Folie (CultFoil (25µm))	PeCon GmbH, Erlbach, Deutschland
--	----------------------------------

Geräte

LSM 510 Meta mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 100 M) und Objektiv Plan Neofluar 20x/0,5 Ph2	Zeiss, Jena, Deutschland
Inkubationssystem des Mikroskops: <ul style="list-style-type: none"> • Temperaturregeleinheit (Tempcontrol 37-2 digital) • Regulierung der CO₂-Zufuhr (CTI-Controller 3700 digital) • Heizeinsatz P • Inkubator S 	PeCon GmbH, Erlbach, Deutschland
Durchflusszytofluorometer „FACS Calibur“	Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

Software

Zeiss LSM Image Browser Version 3.2.0.70	Zeiss, Jena, Deutschland
Image J 1.40g	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Cellquest (FACS)	Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

Antikörper

Primärantikörper: Monoklonaler Mausantikörper, gerichtet gegen humanes KAI1 (Klon TS82b)	Diaclone, Stamford, CT, USA
Sekundärantikörper: Alexa Fluor 488-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Zellkulturmedium

Das Kulturnährmedium für OV-MZ-6- sowie OVCAR-3-Zellen setzte sich wie folgt zusammen:

- DMEM mit GlutamaxTM (enthält L-Alanyl-L-Glutamin, ein stabilisiertes Dipeptid von Glutamin)
- 10 mM HEPES
- 10% (v/v) FCS
- 550 mM L-Arginin
- 272 mM L-Asparagin

Da Ruseva et al. die stabile Transfektion der Ovarialkarzinomzelllinien mit einem Hygromycinresistenzgen als Selektionsmarker auf dem Expressionsvektor pcDNA3.1/Hygro durchgeführt haben (siehe Kapitel 1.9), wurde dem Nährmedium Hygromycin B in einer Konzentration von 150 mg/l hinzugefügt (=Selektionsmedium).

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultur

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert und alle 3-4 Tage passagiert (d.h. die toten Zellen wurden entfernt und die verbleibenden Zellen ausgedünnt neu ausgesät). Dabei wurden die adhärennten Zellen zunächst mit sterilem PBS gewaschen und dann mit PBS, 0,05% (w/v) EDTA abgelöst. Anschließend wurde die Lösung bei 20-25°C für 3 min bei 1500 x g abzentrifugiert. Ein Teil des Zellpellets wurde in frischem Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Für ihre Kryokonservierung wurden kultivierte Zellen wie beschrieben abgelöst, zentrifugiert und anschließend ca. 5 x 10⁶ Zellen in 5 ml Einfriermedium (90% (v/v) FCS, 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert. Zunächst wurden die Zellen für ca. 3-4 Tage bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgesetzt.

2.3.2 FACS-Analyse

Zur Klassifizierung der KAI1-Expressionsstärke wurden die stabil transfizierten Zellklone zusätzlich zu der bereits besprochenen immunzytochemischen Färbung und Auswertung unter dem CLSM sowie der Western-Blot-Analyse (siehe Kapitel 1.9; Ruseva et al., 2009, 1759-1771) auch mittels Durchflusszytofluorometrie (*fluorescence activated cell sorting* = FACS) untersucht.

Das Prinzip der FACS-Analyse beruht darauf, dass Zellen in einer dünnen Kapillare einzeln einen Laserstrahl passieren und diesen dabei je nach ihrer Größe, Oberflächenstruktur sowie Granularität in verschiedene Richtungen streuen. Da ähnliche Zellen auch ähnliche Streueigenschaften haben, lassen sich Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Probe ziehen.

Darüber hinaus ist es möglich, Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine in einer Antigen-Antikörperreaktion mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkiertem Antikörper zu markieren. Auch diese Zellen passieren anschließend einzeln den monochromatischen Laserstrahl geeigneter Anregungswellenlänge. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff durch das Laserlicht angeregt und emittiert Photonen, die von einem Photodetektor gemessen werden. Die Photonenkonzentration verhält sich hierbei proportional zur Menge an gebundenem Antikörper und damit zur Konzentration des markierten Antigens. Auch die gleichzeitige Markierung unterschiedlicher Proteine mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich.

Für die Analyse der KAI1-Expressionshöhe in OV-MZ-6- und OVCAR-3-Ovarialkarzinomzellklonen nach stabiler Transfektion mit KAI1-cDNA wurden unterschiedliche Zellklone sowie zum Vergleich Vektor-transfizierte Zellen und untransfizierte Zellen (Wildtyp) untersucht. Dabei wurden die Zellklone mit einem Primärantikörper gegen KAI1 inkubiert und dieser wiederum mittels eines fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörpers im Durchflusszytofluorometer visualisiert. Pro Zellklon wurden für die Analyse ca. 10^5 Zellen in 200 μ l PBS, 2% (w/v) PFA für 20 min bei 4°C fixiert und anschließend in 200 μ l PBS, 2% (w/v) BSA für 30 min zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 1 μ g des Primärantikörpers (monoklonales Maus IgG gegen KAI1 (#TS82b)) in PBS, 1% (w/v) BSA für 2 h inkubiert. Nach anschließender 30-minütiger Inkubation mit 0,6 ng des Sekundärantikörpers (Alexa Fluor 488-konjugiertes Ziegenanti-Maus IgG) in PBS, 1% (w/v) BSA, erfolgte die Auswertung mittels Durchflusszytofluorometrie.

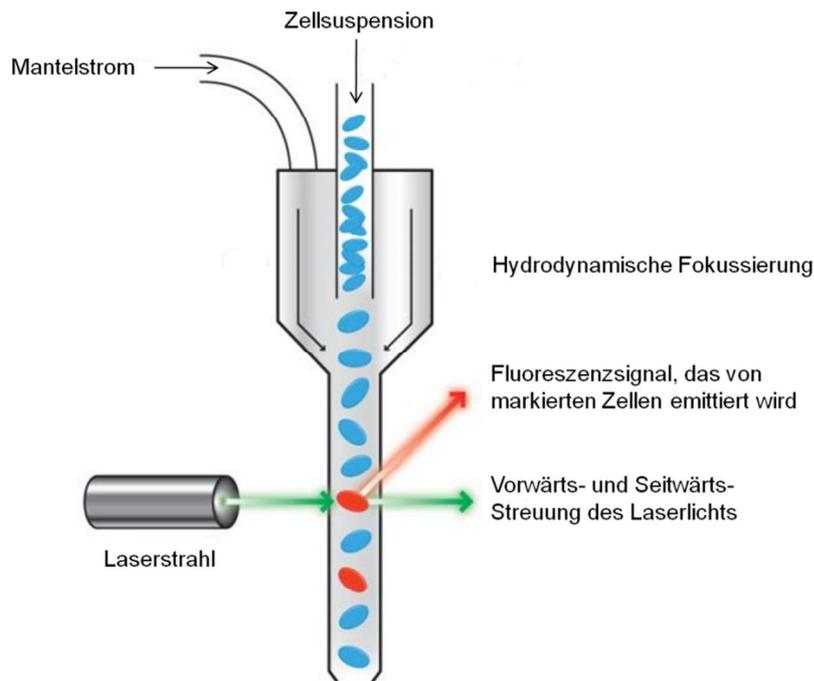


Abbildung 7: Analyse einer Zellprobe mittels Durchflusszytometrie = FACS (modifiziert nach Sony Insider, 2011, ohne Seitenangabe)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellproben auf bestimmte Eigenschaften der einzelnen Zellen hin analysiert werden. Die zu untersuchende Zellsuspension wird aus dem Probenreservoir gesaugt und durch einen Mantelstrom mit schnellerer Fließgeschwindigkeit geleitet, was durch hydrodynamische Fokussierung eine Vereinzelnung der Zellen bewirkt, so dass diese einzeln den Laserstrahl passieren können. Das Laserlicht wird auf der Zelloberfläche je nach Zellgröße und Oberflächenstruktur in unterschiedlichem Maße abgelenkt (Vorwärts- und Seitwärtsstreuung). Zusätzlich bietet die FACS-Analyse die Möglichkeit, bestimmte Zellstrukturen mittels fluoreszierender Farbstoffe in einer Antikörperreaktion anzufärben. Monochromatisches Laserlicht regt die Farbstoffe zur Lichtemission an und somit können diese Strukturen nachgewiesen und ihre Konzentration ermittelt werden (Göttlinger, C. et al., 2000, 1-28; Radbruch, A., 2000, 38-52).

2.3.3 Zellmotilitätsstudien mittels *time-lapse*-Videomikroskopie

Die Motilität der Zellen in Abhängigkeit ihrer KAI1-Expressionshöhe wurde nach Adhäsion an unterschiedliche Proteine der EZM untersucht, um somit Rückschlüsse auf die Beteiligung verschiedener Adhäsionsproteine ziehen zu können.

Für die Studie wurden Petrischalen (Abbildung 8) verwendet, in die zentral ein kreisförmiges Glasstück eingelassen ist, um so eine optimale optische Auflösung im Strahlengang des Mikroskops zu erzielen. Diese zentralen Glasplatten wurden mit Vitronektin oder Kollagen Typ I beschichtet. Mit Poly-D-Lysin beschichtete Platten wurden als unabhängige Kontrolle verwendet, da die Zelladhäsion an dieses

Substrat nicht über Integrine vermittelt wird (Rainaldi et al., 1998, 755-760; Cowles et al., 2000, 725-737). Die Adhäsion beruht hier auf Interaktionen zwischen der polyanionischen Zelloberfläche und den polykationischen Polylysinmolekülen (Mazia et al., 1975, 198-200). Hierfür wurden bereits fertig vorbeschichtete Platten verwendet. Die Beschichtung mit Vitronektin erfolgt mit 5 µg/ml Vitronektin in 300 µl PBS für 1 h bei ca. 4°C. Die Beschichtung mit Kollagen Typ I mit 5 µg/ml Kollagen Typ I in 300 µl PBS für 1 h bei Raumtemperatur. Nach Abschluss der Beschichtung wurden die Platten mit PBS gespült.

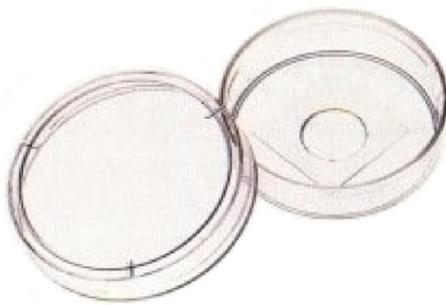


Abbildung 8: MatTek Glasboden-Petrischale (MatTek Corporation, 2004, ohne Seitenangabe)

Die Petrischale besitzt einen Durchmesser von 35 mm. Sie besteht aus Plastik, besitzt jedoch in der Mitte eine kreisförmige 14 mm große Öffnung, in die ein Glasstück eingelassen ist, um das optische Ergebnis im Strahlengang des Mikroskops zu optimieren. Der Glaseinsatz wurde mit Proteinen der EZM (Vitronektin oder Kollagen Typ I) beschichtet. Für die Versuche mit Poly-D-Lysin wurden bereits vorbeschichtete Platten verwendet.

Die Korrelation der KAI1-Expressionshöhe mit der Motilität stabil transfizierter Ovarialkarzinomzellen wurde mittels *time-lapse*-Videomikroskopie (engl. *time-lapse* = Zeitraffer) an einem konfokalen Laser-*Scanning*-Mikroskop durchgeführt.

Die konfokale Laser-*Scanning*-Mikroskopie (engl. *confocal laser scanning microscopy* = CLSM; Abbildung 9) ermöglicht gegenüber anderen Mikroskopieverfahren eine erhöhte optische Auflösung. Als Lichtquelle dient hierbei ein Laser, der im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie das Objektfeld nicht als Ganzes ausleuchtet, sondern durch eine Lochblende hindurch jeweils nur einen Punkt fokussiert und somit das Feld Punkt für Punkt abrastert (in dem verwendeten CLSM: 512 x 512 Pixel pro Bild). Hierdurch wird das Streulicht aus benachbarten Bereichen deutlich reduziert. Zusätzlich wird eine zweite (in derselben Ebene wie das Objektiv fokussierte, also konfokale) Lochblende in das System geschaltet, die Licht ausblendet, welches aus höheren oder tieferen Ebenen des Objektes auf den Detektor trifft. Somit wird das Streulicht aus nicht im Fokus liegenden Ebenen ausgeblendet. Damit ist es auch möglich, Schnitte durch das Objekt in verschiedenen Ebenen zu legen und so ein dreidimensionales Bild des Objektes zu erzeugen.

Weiterhin können auch, wie in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, verschiedene Zellstrukturen durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff-tragenden Antikörpern selektiv dargestellt werden (Wilhelm et al., *Confocal laser scanning microscopy principles*, Carl Zeiss Jena GmbH).

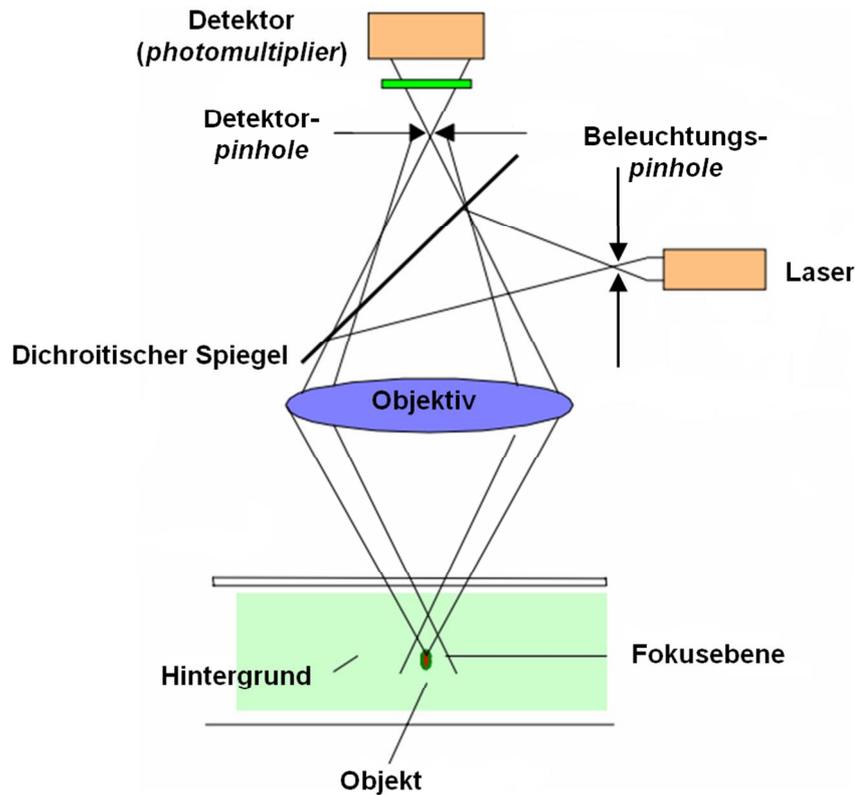


Abbildung 9: Schema eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (modifiziert nach Wilhelm et al., *Confocal laser scanning microscopy principles*, Carl Zeiss Jena GmbH)

Das Verfahren der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie ermöglicht eine hohe räumliche Auflösung des Bildes. Über das Objektiv des Mikroskops wird ein Laserstrahl auf das Objekt fokussiert. Eine eingeschaltete Lochblende (Beleuchtungs-*pinhole*, engl. *pinhole* = Lochblende) ermöglicht das punktgenaue Abrastern des Objektes. Eine zweite Lochblende (Detektor-*pinhole*) reduziert einfallendes Streulicht bevor die auf den Detektor auftreffenden Lichtstrahlen durch Einsatz eines Photoelektronenvervielfachers (*photomultiplier*) verstärkt werden.

Die für die *time-lapse*-Videomikroskopie benötigten Geräte (Abbildung 10) sowie die dazugehörige Software wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Heinz Höfler, Herrn Prof. Dr. Axel Walch und Herrn Dr. Peter Hutzler (Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München am Helmholtz Zentrum München) zur Verfügung gestellt.

Das CLSM wurde dazu verwendet, *time-lapse*-Aufnahmen von den Bewegungen lebender Zellen zu erstellen, um ihr Bewegungsmuster und die von ihnen zurückgelegte Wegstrecke analysieren zu können. Hierbei handelt es sich um ungerichtete Zellmotilität, d.h. nicht entlang eines Gradienten. Die stabil mit KAI1 transfizierten OV-MZ-6- und OVCAR-3-Zellklone wurden wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben kultiviert, in PBS, 0,05% (w/v) EDTA von der Kulturflasche abgelöst und abzentrifugiert. Anschließend wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen in 5 ml Medium in einer mit gereinigten Proteinen der EZM vorbeschichteten MatTek-Petrischale ausgesät. Um ein Verdunsten des Mediums zu verhindern, wurde die Petrischale von einer gasdurchlässigen Folie (CultFoil, 25 μ m) bedeckt. Die so geschützte Petrischale wurde in die Inkubationskammer des Mikroskops gestellt. Dieses in das Mikroskop eingepasste Zellkultivierungssystem gewährleistet eine konstante Temperatur von 37 °C und eine CO₂-Konzentration von 5% (v/v) und ermöglicht es so, die gleichen Bedingungen wie in einem Zellinkubationsschrank herzustellen und somit lebende Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg beobachten zu können.

Ca. 45 min nach Aussaat der Zellen auf die MatTek-Petrischale begannen die Zellen auf Vitronektin und Kollagen Typ I zu adhären, so dass es möglich wurde, die für eine scharfe Darstellung der Zellen korrekte Ebene zu fokussieren. Nur für die Versuche auf den mit Poly-D-Lysin beschichteten Platten wurden die Zellen bereits am Vortag ausgesät. Hier brauchten die Zellen deutlich mehr Zeit um zu adhären als auf Vitronektin oder Kollagen Typ I. Kurz bevor die Zellen aus dem Zellinkubationsschrank in die Zellinkubationskammer des Mikroskops eingesetzt wurden, wurde bei den mit Poly-D-Lysin beschichteten Platten nur ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt, um abgestorbene und abgelöste Zellen zu entfernen. Nach dem Fokussieren des Strahlengangs in der Ebene der adhären Zellen wurde ein Bildausschnitt gewählt, in dem sich ca. 20-30 Zellen befanden, die möglichst vereinzelt lagen und die Aufnahme der *time-lapse*-Serie gestartet. Der angeschlossene Computer speicherte über einen Zeitraum von 12 h alle 3 min ein Bild, so dass im Zeitraffer eine Serie mit 240 Bildern entstand. Aus dieser Serie wurden die ersten 40 Bilder (= 2 h) von der Auswertung ausgeschlossen, um die Motilität nur in der Phase der vollständigen Zell-EZM-Adhäsion zu erfassen. Zur Auswertung kamen also pro *time-lapse*-Serie 200 Bilder, die die Nachverfolgung der Zellmotilität (= Länge der zurückgelegten Wegstrecke) über einen Zeitraum von 10 h zuließen.

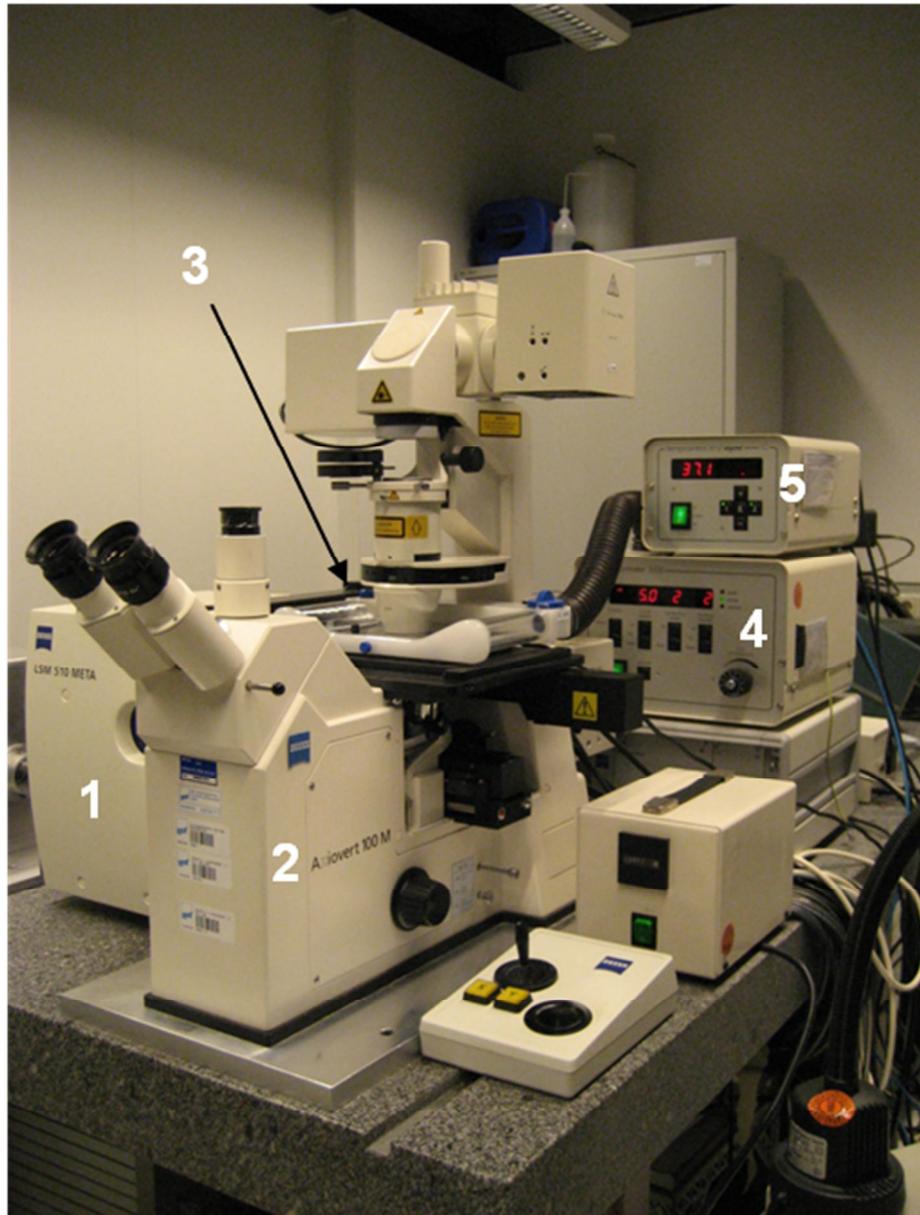


Abbildung 10: Aufbau des CLSM-basierten Messsystems für Zellmotilitätsstudien

(Aufbau fotografiert am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München am Helmholtz Zentrum München)

- 1: Zeiss LSM 510 Meta
- 2: Inverses Mikroskop (Axiovert 100 M)
- 3: Inkubationskammer mit Heizeinsatz
- 4: pH-Wert-Regler (Regulierung der CO₂-Zufuhr; CTI-Controller 3700 digital)
- 5: Temperaturregler (Tempcontrol 37-2 digital)

Das konfokale Laser-*Scanning*-Mikroskop besteht aus dem Laser-*Scanning*-Modul (1) gekoppelt an ein inverses Mikroskop (2). Für die beschriebenen Versuche wurde ein HeNe 543 nm Laser verwendet. Das Objekt (Zellen adhären an eine mit EZM-Proteinen beschichtete MatTek-Petrischale) befindet sich in einer Inkubationskammer (3), in der über Steuerelemente (4 + 5) Zellkultivierungsbedingungen hergestellt werden, d.h. die CO₂-Konzentration, damit verbunden der pH-Wert, sowie die Temperatur reguliert werden.

2.3.4 Analyse der zellulären Motilität

Die Auswertung der *time-lapse*-Videomikroskopieaufnahmen wurde mit Hilfe der Software *Zeiss LSM Image Browser* durchgeführt. Dabei wurde die Motilität jeder einzelnen Zelle als Strecke gemessen, die der Zellkern innerhalb des Auswertungszeitraums von 10 h zurücklegte (Abbildung 11). Für die Messung der Bewegung des Nukleus wurde die *time-lapse*-Bildserie mit Hilfe des *LSM Image Browser*s langsam (2 Bilder pro sec) automatisch abgespielt und die Wegstrecke, die der Nukleus zurücklegte, dabei manuell nachgezeichnet.

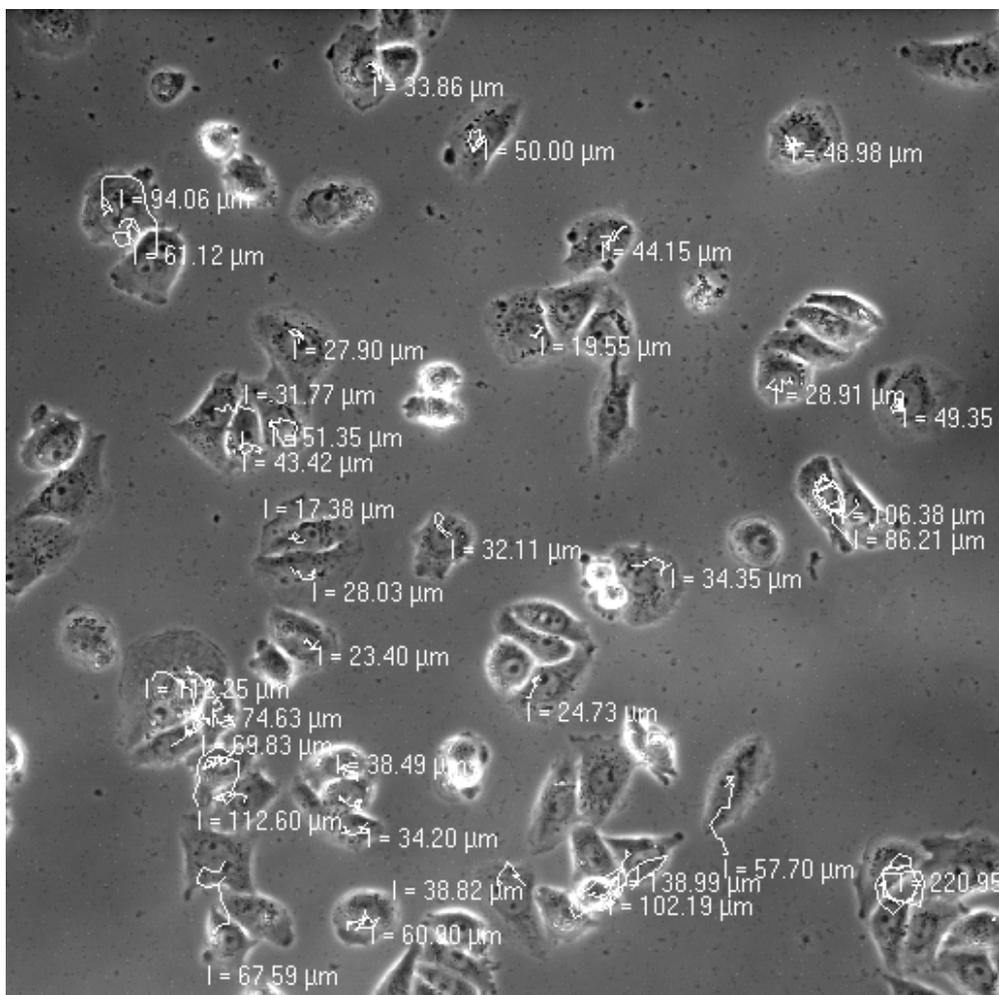


Abbildung 11: Prinzip der Bestimmung der zurückgelegten Wegstrecke einzelner Zellen als Maß ihrer zellulären Motilität

Dargestellt sind Zellen des KAI1-überexprimierenden OV-MZ-6-Klons KAI1#4, die auf einer mit Vitronektin beschichteten Petrischale ausgesät und in die Inkubationskammer des CLSM platziert wurden. Anschließend wurde mittels *time-lapse*-Videomikroskopie alle 3 min ein Bild gespeichert. Anhand dieser Aufnahmen konnte die migratorische Aktivität der Zellen als Bewegung ihres Nukleus über den Messzeitraum von 10 h nachvollzogen werden. Dargestellt ist das letzte Zellbild der Serie mit den eingezeichneten und ausgemessenen Wanderungstrecken der Nuklei.

So ergab sich die von einer einzelnen Zelle zurückgelegte Wegstrecke als Linie, deren Länge durch den *Zeiss LSM Image Browser* bestimmt wurde. Dieser Vorgang wurde mit jeder Einzelnen zur Auswertung geeigneten Zelle wiederholt. Die genauen Kriterien, die den Einschluss einer Zelle in die statistische Versuchsauswertung definierten, werden in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Pro Zellklon wurden 3-4 *time-lapse*-Bildserien pro Adhäsionsprotein durchgeführt, so dass die zurückgelegten Wegstrecken von mindestens 40 Zellen analysiert werden konnten.

2.3.5 Analyse des *spreading*-Verhaltens der Zellen

Werden Zellen auf einer Matrix ausgesät, so ist für eine erfolgreiche Adhäsion die intensive Interaktion zwischen der Zelle und dem Substrat notwendig. Über Integrine und andere Adhäsionsproteine verbindet die Zelle ihr Aktinzytoskelett mit der EZM, was u.a. zu einer Änderung der Zellmorphologie führt. Die Ausbreitung und Abflachung der Zelle, indem sie ihre Kontaktfläche zu EZM vergrößert, das sogenannte *spreading*, zeigt also eine erfolgreiche Adhäsion und Interaktion zwischen Zelle und EZM an, was wiederum eine Voraussetzung für die Zellmigration darstellt (Cuvelier et al., 2007, 694-699).

Wie in Kapitel 1.9 beschrieben, zeigt sich bei erhöhter zellulärer KAI1-Expression eine zunehmende Adhäsionsstärke der Ovarialkarzinomzellen an Vitronektin (Ruseva et al., 2009, 1759-1771). Durch die für die Motilitätsstudien am CLSM aufgenommenen Bildserien war es möglich, jede Zelle individuell zu vermessen. So wurde im nächsten Schritt untersucht, wie sich eine veränderte Adhäsionsstärke auf das *spreading*-Verhalten der Zellen auswirkt. Die Ergebnisse konnten dann mit den Erkenntnissen aus den Migrationsversuchen in einen Kontext gesetzt werden, um das Zusammenspiel zwischen der Adhäsionsstärke, dem *spreading*-Verhalten und der migratorische Aktivität der Zellen hinsichtlich der KAI1-Expressionsstärke (KAI1-transfizierter Klon vs. Vektor-transfizierter Klon) oder aber auch der integrinabhängigen (Vitronektin) vs. integrinunabhängigen (Poly-D-Lysin) Adhäsion zu beleuchten.

Deshalb wurde in den am CLSM erstellten *time-lapse*-Aufnahmen mit Hilfe des Programms *Image J* das *spreading*-Verhalten analysiert, indem die *spreading*-Fläche jeder Zelle vermessen wurde, d.h. abgerundete Zellen mit kleiner Kontaktfläche zur

EZM zeigten ein schwächeres *spreading* als Zellen, die sich abgeflacht und ausgebreitet hatten.

Hierzu wurde die *spreading*-Fläche in dem 10 h Auswertungszeitraum der *time-lapse*-Serien alle 30 min vermessen, so dass sich für jede einzelne Zelle die Entwicklung der *spreading*-Fläche im zeitlichen Verlauf darstellte. Zur besseren Beurteilbarkeit wurde dafür der Bildausschnitt der jeweils auszuwertenden Zelle 2- bis 3-fach vergrößert und der Zellumfang manuell nachgezeichnet. Mittels der Software wurde dann die Fläche in μm^2 berechnet.

Ausgewertet wurden jeweils der OV-MZ-6-Klon mit höchster KAI1-Expression (KAI1#4) sowie Vektor-transfizierte OV-MZ-6-Zellen, die auf Vitronektin und Poly-D-Lysin als Kontrolle zur Adhäsion gebracht wurden.

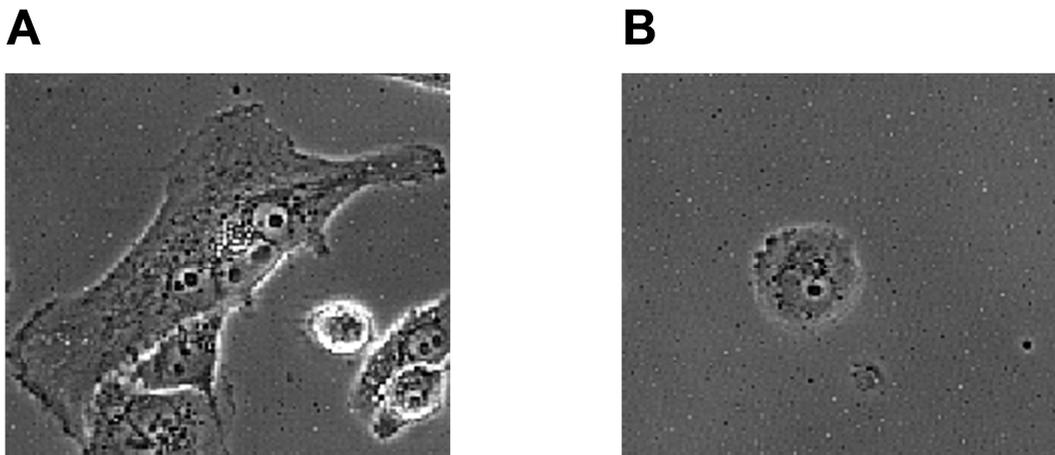


Abbildung 12: *Spreading*-Verhalten humaner Ovarialkarzinomzellen auf Vitronektin

Unterschiedliches Zell-*spreading* hier am Beispiel (A) eines KAI1-überexprimierenden OV-MZ-6-Klons (KAI1#2) und (B) einer Zelle eines Vektor-transfizierten OV-MZ-6-Klons. Die Bildausschnitte aus den *time-lapse*-Bildserien sind mit dem *Zeiss LSM Image Browser* dargestellt. In diesem Beispiel zeigt die Zelle (A) ein deutlich ausgeprägteres *spreading*-Verhalten mit flacherer Zellmorphologie und Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien. Die Zelle (B) hingegen zeigt ein geringer ausgeprägtes *spreading*-Verhalten mit abgerundeter Morphologie.

2.3.6 Statistische Auswertung der Daten

Zur Analyse der Unterschiede im Ausmaß der zellulären Migration zwischen den KAI1-transfizierten Zellklonen und den Vektor-transfizierten Zellen wurden die Mittelwerte der Zellwanderungstrecken von mind. 40 Zellen pro Klon miteinander verglichen. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels des Mann-Whitney-

U-Tests berechnet. Dieser statistische Test dient zur Überprüfung von Übereinstimmung und Signifikanz zweier, im Gegensatz zum t-Test verteilungsunabhängiger, d.h. nicht notwendigerweise normalverteilter Stichproben (Sachs, 2004, 383-393). Dabei wurde ein Signifikanzniveau von 5% gewählt, d.h. bis zu einem p-Wert $< 0,05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet. Ebenso wurde mit den Mittelwerten der Ergebnisse aus den Untersuchungen der *spreading*-Flächen der Zellen verfahren.

3. ERGEBNISSE

Die Tumorprogression des Ovarialkarzinoms scheint mit einer Verminderung der endogene KAI1-Expression der Zellen einherzugehen (Liu et al., 2000, 10-15). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nach Reetablierung der KAI1-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen, dessen Auswirkung auf die Zellmotilität und das *spreading*-Verhalten der Zellen zu überprüfen.

3.1 Bestimmung der KAI1-Expressionshöhe mittels FACS-Analyse

Als Zellmodell dienten zwei humane Ovarialkarzinomzelllinien, die in der AG Reuning stabil mit KAI1-cDNA transfiziert worden waren (Ruseva et al., 2009, 1759-1771).

Der Erfolg der Transfektion wurde, wie bereits in Kapitel 1.9 beschrieben, mittels immunzytochemischer Färbung und Western Blot-Analyse in der AG Reuning überprüft (nicht Teil der vorliegenden Dissertation). In der vorliegenden Arbeit wurde die KAI1-Expressionshöhe zusätzlich mittels Durchflusszytofluorometrie bestimmt.

Ziel war es, Transfektanten mit verschiedener KAI1-Expressionshöhe zu isolieren, um KAI1-dosisabhängige Effekte untersuchen zu können.

Es wurden vier individuelle mit dem KAI1-Expressionsvektor transfizierte OV-MZ-6-Zellklone sowie ein OVCAR-3-Klon auf ihre KAI1-Expressionshöhe hin untersucht. Als Maß für den endogenen KAI1-Gehalt der Zelllinien dienten untransfizierte Wildtypzellen sowie Zellen, die mit dem leeren Expressionsvektor transfiziert wurden (Vektor).

Klon KAI#1 zeigte in der FACS-Analyse im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen eine Verdopplung der KAI1-Expressionsstärke. Klon KAI#2 exprimiert die 2,8-fache und Klon KAI#3 die 5,2-fache Menge an KAI1. KAI#4 zeigte eine 6,2-fache Erhöhung der KAI-Expression verglichen mit dem endogenen Gehalt Vektor-transfizierter Zellen.

Die gemessene KAI1-Expressionshöhe des OVCAR-3-Klons lag 7,9-fach über der in Vektor-transfizierten OVCAR-3-Zellen.

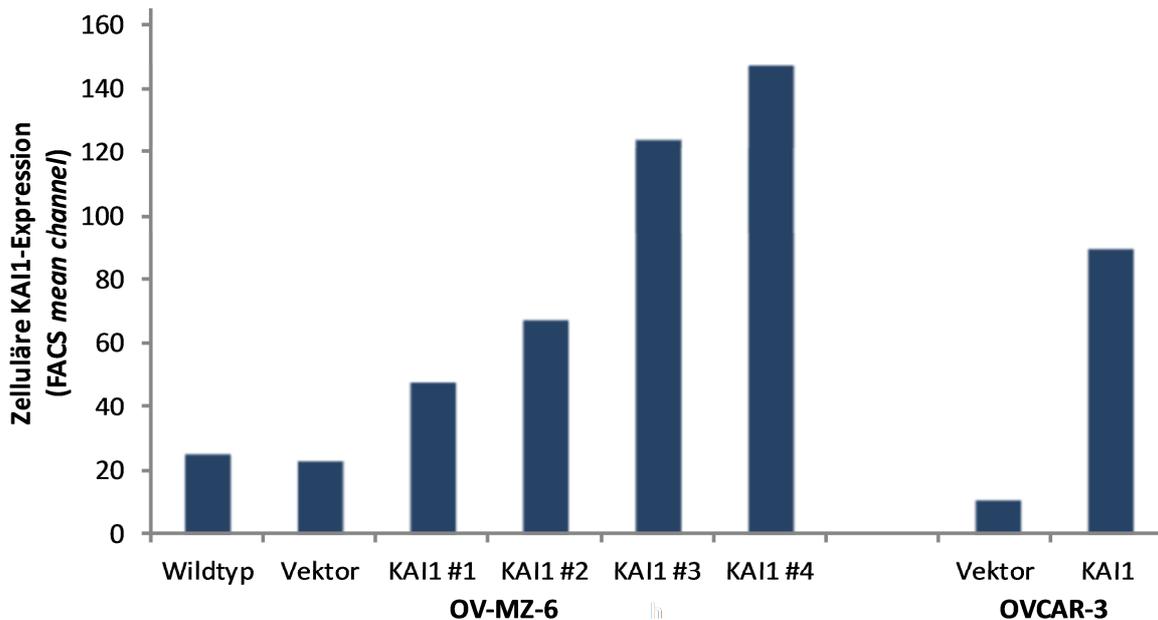


Abbildung 13: Ermittlung des KAI1-Expressionsniveaus verschiedener stabil KAI1-transfizierter humaner Ovarialzellkarzinomzellklone mittels FACS-Analyse

Die zelluläre KAI1-Expressionshöhe wurde nach stabiler Transfektion der humanen Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und OVCAR-3 mittels Durchflusszytofluorometrie gemessen.

Es wurden vier KAI1-transfizierten OV-MZ-6-Zellklone (KAI1#1 – KAI1#4) nach ansteigender KAI1-Expressionsstärke isoliert. Sie zeigten gegenüber Vektor-transfizierten- (Vektor) und Wildtypzellen deutlich erhöhte KAI1-Expressionslevel. Der am stärksten KAI1-exprimierende OV-MZ-6-Klon KAI1#4 zeigte eine 6,2-fach erhöhte KAI1-Expression im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen.

Der KAI1-transfizierte OVCAR-3-Zellklon zeigte einen 7,9-fach erhöhten Expressionsspiegel an KAI1 im Vergleich zu Vektor-transfizierten OVCAR-3-Zellen.

3.2 Migratorische Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen als Funktion der KAI1-Expressionshöhe

Die Adhäsion von Zellen an Proteine der EZM stellt, wie bereits in Kapitel 1.6 erwähnt, eine Voraussetzung für ihre Fähigkeit zu migrieren dar, denn nur durch den stabilen Kontakt des Zytoskeletts zur EZM in den Fokalen Adhäsionen kann sich die Zelle in der Matrix, in die sie eingebettet ist, vorwärts bewegen.

Wie Hapke et al. zeigten, korreliert die Expression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ positiv mit der Adhäsion und Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen (Hapke, 2003, 1073-1083). Wie in der Arbeit von Ruseva et al. gezeigt, liegt KAI1 auf der Zelloberfläche mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ kolokalisiert vor, was auf eine Interaktion beider Proteine hinweisen könnte. Weiterhin konnten Ruseva et al. zeigen, dass die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Adhäsion der Zellen an Vitronektin durch Reetablierung von KAI1 in stabilen Zelltransfektanten zusätzlich verstärkt wurde. In der vorliegenden Studie sollte

überprüft werden, ob eine Erhöhung des KAI1-Expressionsniveaus in OV-MZ-6- und OVCAR-3-Zellen einen Einfluss auf die ungerichtete, d.h. nicht entlang eines chemischen Gradienten, elektrischen Feldes, o.ä. ausgerichtete, migratorische Aktivität dieser Zellen nimmt. Hierbei wurden mittels *time-lapse*-Videomikroskopie vier KAI1-transfizierte OV-MZ-6-Klone mit ansteigender KAI1-Expressionshöhe mit Wildtyp- sowie Vektor-transfizierten Zellen verglichen. Um sicherzustellen, dass es sich bei den gefundenen Effekten nicht um zelltypspezifische Effekte handelt, wurde zusätzlich ein KAI1-transfizierter OVCAR-3-Klon mit dem entsprechenden Vektor-transfizierten Zellklon verglichen. Die zelluläre Motilität wurde auf Petrischalen untersucht, deren Böden mit den gereinigten EZM-Proteinen Vitronektin und Kollagen Typ I beschichtet waren. Kollagen Typ I ist hauptsächlich ein Ligand für Integrine der β_1 -Familie, die wiederum bereits bekannte Interaktionspartner von KAI1 darstellen (Helfrich et al., 1996, 317-328; Cowles et al., 2000, 725-737; Hemler et al., 1996, 67-71; Berditchewski, 2001, 4143-4151). Mit Poly-D-Lysin beschichtete Petrischalen wurden als unabhängige Kontrolle verwendet, da hier die Zelladhäsion nicht über Integrine vermittelt wird. Die OV-MZ-6- und OVCAR-3-Zellklone wurden in Medium suspendiert in die vorbeschichteten Petrischalen ausgesät und diese mit einer gasdurchlässigen Folie bedeckt in die Inkubationskammer des Mikroskops gestellt. Nach erfolgter Zelladhäsion wurde als Maß für die migratorische Aktivität der Klone mittels des *Zeiss LSM Image Browser* die Strecke gemessen, die jede Zelle innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 10 h zurücklegte (Abbildung 14). Dazu wurden die Bewegungen des Nukleus jeder Zelle manuell nachgezeichnet und vermessen. Zu Beginn der Erstellung der *time-lapse*-Videomikroskopieserien wurde das Mikroskop auf die adhären Zellen fokussiert (Zeitpunkt 0, Beginn des 12 h Beobachtungszeitraumes). Die Auswertung wurde jedoch erst 2 h später nach vollständiger Zelladhäsion und erfolgtem Zellspreading begonnen. Der Auswertungszeitraum umfasste somit 10 h (\cong 200 Bilder).

3.2.1 Kriterien für den Ein- und Ausschluss von Zellen in die Versuchsauswertung

Die Auswertung der am CLSM erstellten *time-lapse*-Serien wurde wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben mit Hilfe des *Zeiss LSM Image Browser* durchgeführt. Der Bildausschnitt wurde so gewählt, dass sich ca. 20-30 Zellen darin befanden. Jedoch konnten nicht

alle Zellen, die sich in dem gewählten Bildausschnitt befanden, auch in der statistischen Auswertung berücksichtigt werden.

Folgende Kriterien wurden definiert, um eine Zelle in die Auswertung einzuschließen:

- Die Zelle musste vereinzelt oder in möglichst geringem Kontakt zu benachbarten Zellen liegen, um eine gegenseitige Beeinflussung oder Behinderung während der Zellmigration zu minimieren.
- Die Zelle, oder zumindest ihr Nukleus, musste sich während des Beobachtungszeitraumes immer innerhalb des Bildausschnittes befinden. Befanden sich einzelne periphere Zellausläufer kurzzeitig außerhalb des Ausschnittes wurde dies toleriert, solange der Nukleus sichtbar war und seine Bewegungen somit eindeutig nachzuvollziehen waren.
- Die Zelle musste über die gesamten Zeitraum hinweg an die Matrix adhärent sein.

Folgende Kriterien führten zum Ausschluss einer sich im Bildausschnitt befindlichen Zelle aus der nachfolgenden Analyse:

- Die Zelle befand sich in einem größeren Zellcluster und wurde somit in ihrer Motilität durch Nachbarzellen beeinflusst. Vereinzelter Kontakt zu benachbarten Zellen wurde toleriert.
- Die Zelle wurde teilweise von einer anderen Zelle überdeckt, so dass die Bewegung des Nukleus nicht mehr eindeutig sichtbar und somit nicht nachvollziehbar war.
- Die Zelle befand sich zwar zu Anfang des Auswertungszeitraums im Bildausschnitt, verließ diesen aber im Laufe der 10 h Versuchsdauer.
- Die Zelle trat erst später, im Laufe des 10 h Auswertungszeitraums, in den Bildausschnitt ein.
- Die Zelle teilte sich im Laufe der 10 h.
- Die Zelle war nicht über den gesamten Zeitraum hinweg an die Matrix adhärent.

In die statistischen Auswertungen gingen pro Zellklon die gemessenen Wegstrecken von mindestens 40 Zellen aus mehreren ($n= 3-4$) *time-lapse*-Serien ein.

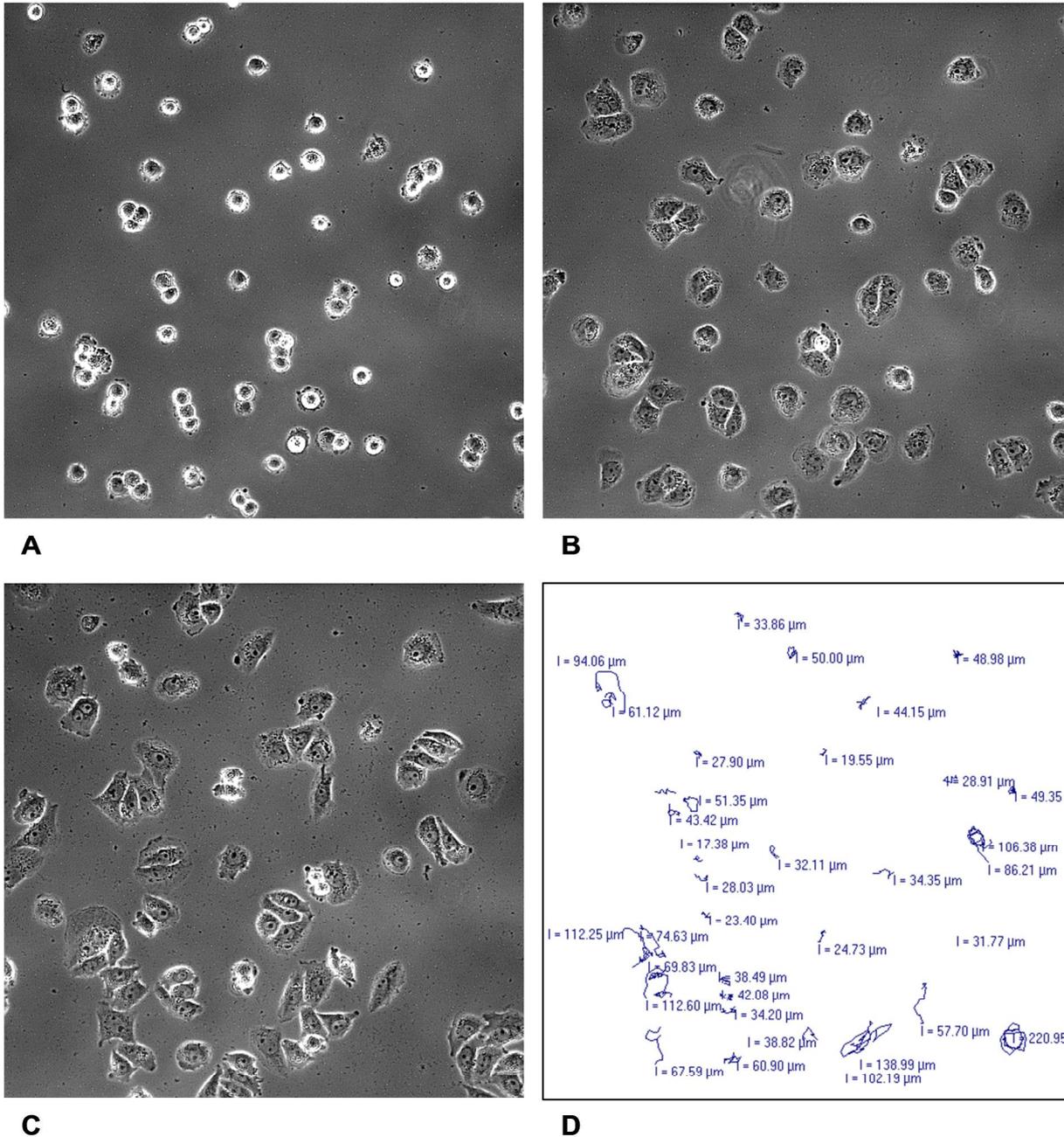


Abbildung 14: Exemplarische CLSM-Bilder von dem OV-MZ-6-Zellklon KAI1#4 aus einer *time-lapse*-Serie

Hier gezeigt sind Ausschnitte aus einer *time-lapse*-Serie, die den stark KAI1-überexprimierenden OV-MZ-6-Klon KAI1#4 (6,2-fach über Vektor-transfizierten Zellen) auf Vitronektin als Substratgrundlage zeigt. Das manuelle Nachzeichnen der Bewegungen des Nukleus jeder einzelnen Zelle erlaubte die Analyse der zellulären Motilität.

A. Zeitpunkt 0 der *time-lapse*-Serie. Die Zellen begannen zu adhären, so dass auf den Bildausschnitt fokussiert werden konnte. Der Computer speicherte jetzt alle 3 min ein Bild.

B. 2 h nach Beginn der *time-lapse*-Serie. Die Zellen waren jetzt vollständig adhären, so dass die Bilder ab diesem Zeitpunkt für die Auswertung verwendet werden konnten.

C. Endpunkt der *time-lapse*-Serie (12 h nach Beginn der Aufzeichnung).

D. Die im Rahmen der Auswertung nachgezeichneten und ausgemessenen Wanderungstrecken der Nuklei sind eingezeichnet. Zur Verbesserung der Übersicht wurde hier das darunterliegende Zellbild ausgeblendet.

3.2.2 Effekte der KAI1-Expressionshöhe auf die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte zelluläre Motilität von OV-MZ-6- und OVCAR-3-Zellen auf Vitronektin

Die Wanderungstrecken auf mit Vitronektin beschichteten Petrischalen einzelner Zellen von vier KAI1-überexprimierenden OV-MZ-6-Zellklonen, den entsprechenden Vektor-transfizierten Zellen und untransfizierten Zellen des Wildtyps wurden basierend auf den Bewegungen der Nuklei manuell nachgezeichnet und die Mittelwerte miteinander verglichen. Ebenso wurde mit einem OVCAR-3-Klon und den OVCAR-3 Vektor-transfizierten Zellen verfahren.

Die Motilität des Zellklons KAI1#1 (KAI1-Expression 2-fach im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen) auf Vitronektin lag bei durchschnittlich 73% ($p < 0,001$) der Motilität der Vektor-transfizierten Zellen. Die Motilität des Klons KAI1#2 (KAI1-Expression 2,8-fach) lag bei 64% ($p < 0,001$), die des Klons KAI1#3 (KAI1-Expression 5,2-fach) bei 45% ($p < 0,001$). Die Motilität des am stärksten KAI1-exprimierenden Klons KAI1#4 (KAI1-Expression 6,2-fach im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen) lag bei 32% ($p < 0,001$). Die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -abhängige Motilität der OV-MZ-6-Zellen auf Vitronektin korreliert demnach invers mit der Höhe der KAI1-Expression der Zellen (Abbildung 15A). Der Effekt einer KAI1-abhängigen Verminderung der Zellmigration bestätigte sich bei der Untersuchung der KAI1-transfizierten OVCAR-3-Zellen auf Vitronektin unter gleichen Bedingungen. Hierbei wurde die Motilität des KAI1-überexprimierenden Zellklons (KAI1-Expression 7,9-fach im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen) auf 57% der Vektor-transfizierten Zellen reduziert ($p < 0,001$) (Abbildung 15B).

OV-MZ-6-Zellen	KAI1#1	KAI1#2	KAI1#3	KAI1#4
KAI1-Expression (n-fach über Vektor-transfizierten Zellen)	2	2,8	5,2	6,2
Motilität in Prozent der Vektor-transfizierten Zellen (=100%)	73% ($p < 0,001$)	64% ($p < 0,001$)	45% ($p < 0,001$)	32% ($p < 0,001$)

OVCAR-3-Zellen	KAI1
KAI1-Expression (n-fach über Vektor-transfizierten Zellen)	7,9
Motilität in Prozent der Vektor-transfizierten Zellen (=100%)	57% (p < 0,001)

Tabelle 1: Auswirkung der erhöhten KAI1-Expression auf die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte zelluläre Motilität von OV-MZ-6- und OVCAR-3-Zellen auf Vitronektin (Signifikanzniveau p < 0,05)

Die hier vorgestellten Daten zeigen also, dass durch Erhöhung der KAI1-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte zelluläre Motilität auf Vitronektin als EZM-Proteinsubstrat in Abhängigkeit von der KAI1-Expressionshöhe signifikant dosisabhängig reduziert wird.

3.2.3 Effekte der KAI1-Expressionshöhe auf die zelluläre Motilität von OV-MZ-6-Zellen auf Kollagen Typ I

Kollagen Typ I ist ein wichtiger Ligand für Integrine der β_1 -Familie (Helfrich et al., 1996, 317-328; Cowles et al., 2000, 725-737). Diese wiederum waren bis zu dem Nachweis der Kollokalisierung mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ durch Ruseva et al. die einzigen Integrine, von denen eine Interaktion mit KAI1 bekannt war (Hemler et al., 1996, 67-71; Berditchevski, 2001, 4143-4151). Deshalb wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die KAI1-Expressionshöhe einen Effekt auf die Zellmotilität humaner OV-MZ-6-Ovarialkarzinomzellen nach Adhäsion an Kollagen Typ I zeigt.

Auch auf Kollagen Typ I zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Motilität humaner OV-MZ-6-Zellen durch KAI1, allerdings schwächer ausgeprägt als auf Vitronektin. Die OV-MZ-6- Klone KAI1#1 und KAI1#2 (mit 2- bzw. 2,8-fach erhöhter KAI1-Expression) zeigten keine signifikante Verminderung der Motilität. Die Motilität des Zellklons KAI1#3 (KAI1-Expression 5,2-fach) betrug 71% (p < 0,001) der Motilität Vektor-transfizierter Zellen, die des Klones KAI1#4 (KAI1-Expression 6,2-fach) 80% (p=0,0013) (Abbildung 16A). In dieser Analyse zeigte sich also auch eine signifikant verminderte Motilität von OV-MZ-6-Zellen auf Kollagen Typ I durch Reexpression von KAI1, die vermutlich auf der Interaktion von KAI1 mit Integrinen der β_1 -Subfamilie beruht.

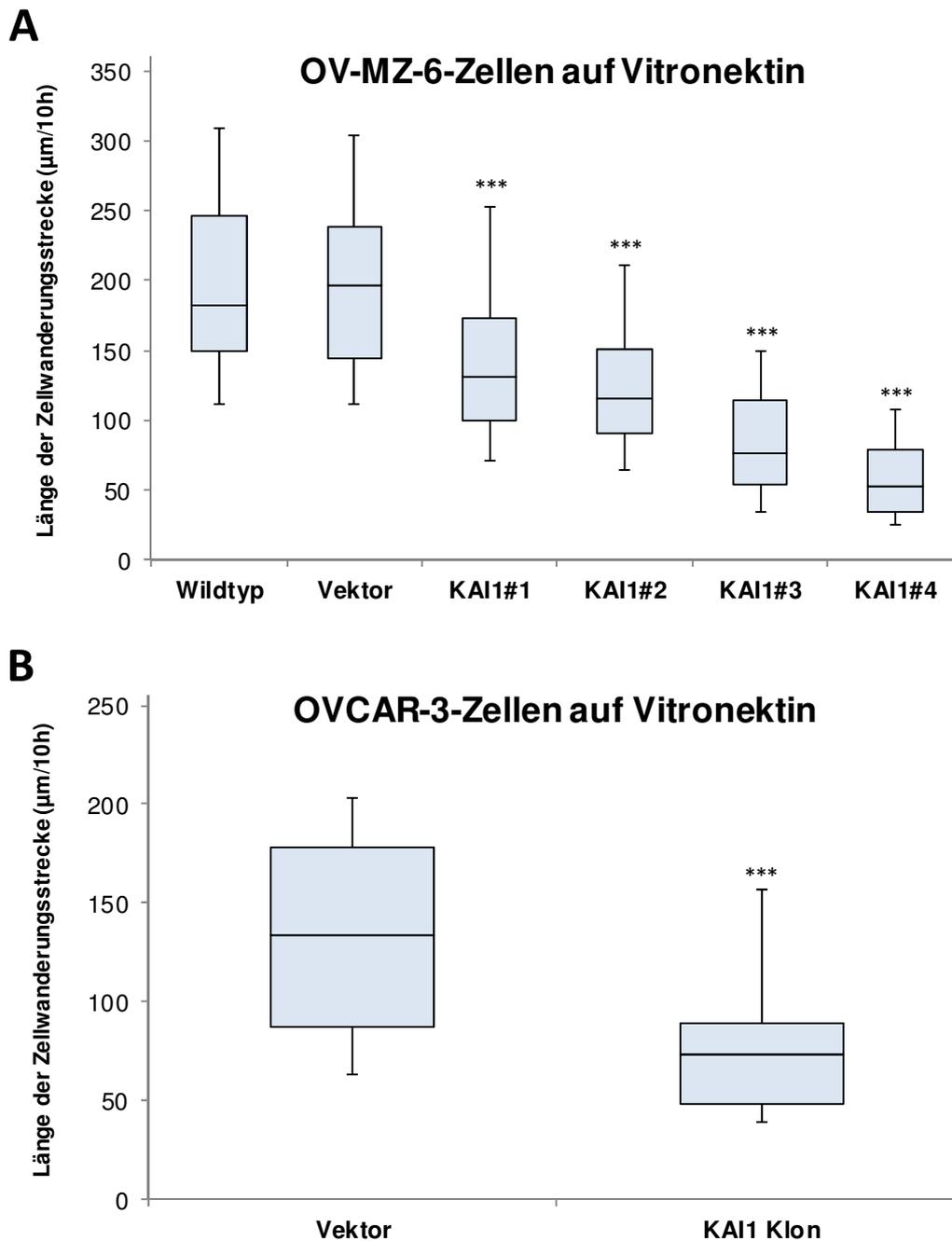


Abbildung 15: Dosisabhängige Effekte der KAI1-Expression auf die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte ungerichtete Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen auf Vitronektin

Die motile Aktivität KAI1-überexprimierender Klone der Zelllinien OV-MZ-6 und OVCAR-3 sowie als Kontrolle der jeweiligen Vektor-transfizierten- und Wildtyp-Zellen nach deren Adhäsion an Vitronektin, wurde anhand von videomikroskopischen *time-lapse*-Aufnahmen anhand der Bewegung ihrer Nuklei nachgezeichnet und ausgemessen. Die Daten sind dargestellt als Boxplot der Zellwanderungsstrecke im $\mu\text{m}/10\text{ h}$. Zur Auswertung kam jeweils ein Minimum von $n \geq 40$ Zellen. Die verstärkte KAI1-Expression zeigt eine dosisabhängige Verminderung der zellulären Motilität auf Vitronektin im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen (Vektor). (Signifikanzen im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen: *** = $p < 0,001$)

A: Die 4 verschiedenen KAI1-transfizierten OV-MZ-6-Klone exprimieren KAI1 in unterschiedlicher Höhe (Klon#1: schwächste Expression; Klon#4: stärkste Expression). Es zeigte sich ein KAI1-dosisabhängiger Effekt der Suppression der Motilität. Je stärker die KAI1-Expression ausgeprägt war, desto geringer war die zelluläre Motilität.

B: Dieser Effekt bestätigte sich mit KAI1-überexprimierenden OVCAR-3-Zellen.

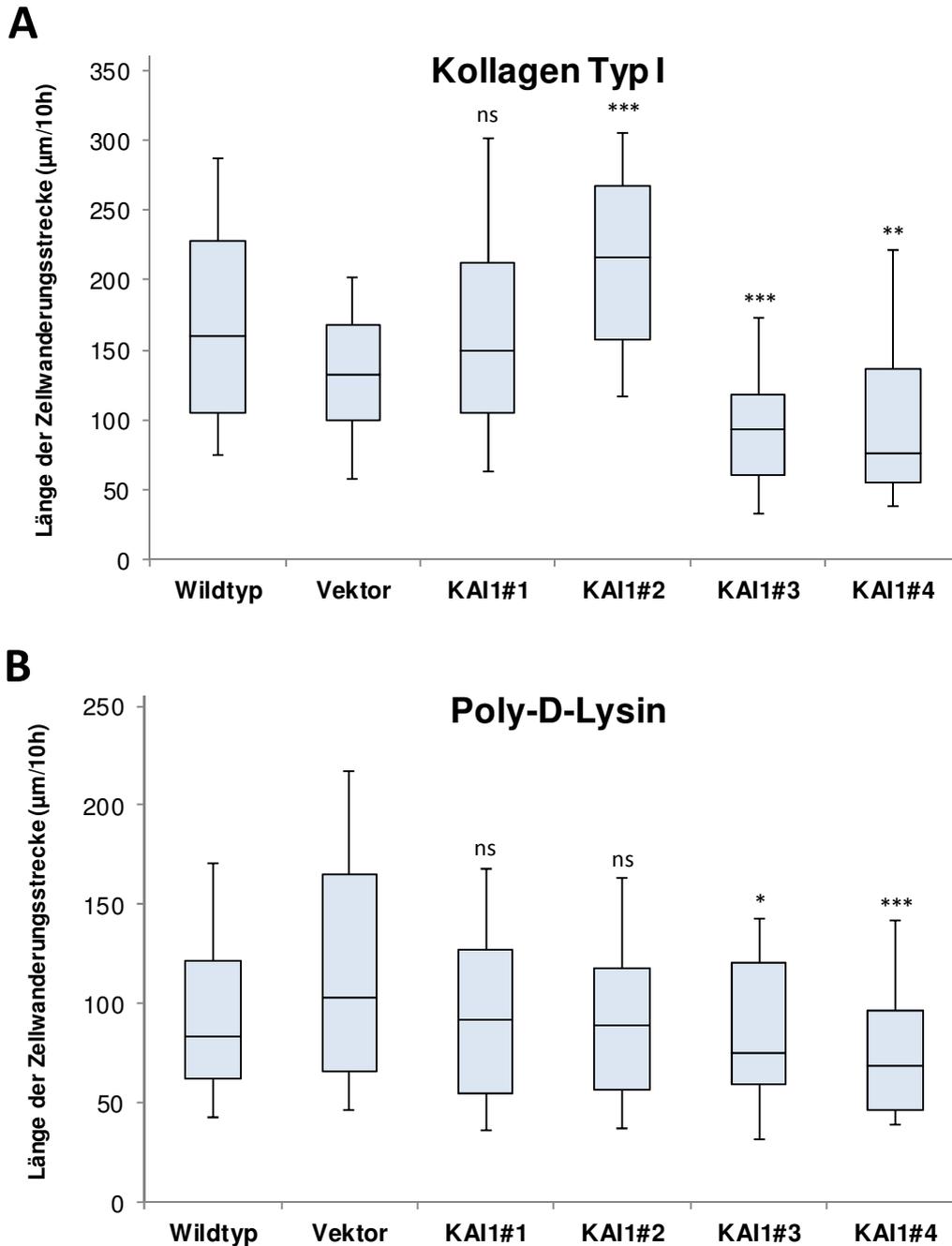


Abbildung 16: Dosisabhängige Effekte der KAI1-Expression auf die ungerichtete Motilität humaner OV-MZ-6-Zellen auf Kollagen Typ I und auf Poly-D-Lysin

Die vier verschiedenen KAI1-transfizierten OV-MZ-6-Klone exprimieren KAI1 in unterschiedlicher Höhe (Klon#1: schwächste Expression; Klon#4: stärkste Expression). Als Kontrolle dienen Vektor-transfizierter- (Vektor) und Wildtyp-Zellen (Wildtyp) mit niedrigem endogenen KAI1-Gehalt. Die Bewegung der Zellen wurde anhand von videomikroskopischen *time-lapse*-Aufnahmen nachgezeichnet und ausgemessen. Die Daten sind als Boxplot der Zellwanderungsstrecke im $\mu\text{m}/10\text{ h}$ dargestellt. Zur Auswertung kam jeweils ein Minimum von $n \geq 40$ Zellen. (Signifikanzen im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant)

A: Motilität der Zellen nach deren Adhäsion an Kollagen Typ I. Klon KAI1#3 und KAI1#4 zeigten eine signifikante Verminderung der zellulären Motilität.

B: Motilität der Zellen nach deren Adhäsion an Poly-D-Lysin. Auf einem hohen Signifikanzniveau zeigte sich eine Einschränkung der Motilität nur für den Klon KAI1#4.

3.2.4 Effekte der KAI1-Expressionshöhe auf die zelluläre Motilität von OV-MZ-6-Zellen auf Poly-D-Lysin

Als Kontrolle wurde auch die Motilität der KAI1-überexprimierenden Zellen in Adhäsion an Poly-D-Lysin gemessen. Die Zelladhäsion an dieses Peptid wird über elektrostatische Wechselwirkungen und nicht über Integrine vermittelt (Rainaldi et al., 1998, 755-760; Cowles et al., 2000, 725-737).

Auf Poly-D-Lysin ließ sich für die beiden KAI1-Klone mit schwächerer KAI1-Expression (KAI1#1, KAI1#2) kein signifikanter Motilitätsunterschied gegenüber Vektor-transfizierten Zellen erkennen. Die Motilität des Klons KAI1#3 wurde auf 76% der Motilität im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen vermindert ($p=0,02$). Der Klon KAI1#4 wurde in seiner Motilität auf 69% des Niveaus der Motilität Vektor-transfizierter Zellen gehemmt ($p < 0,001$) (Abbildung 16B).

3.3 Analyse des *spreading*-Verhaltens humaner OV-MZ-6-Ovarialkarzinomzellen

Hapke und Mitarbeiter zeigten, dass eine erhöhte Expression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ in OV-MZ-6-Zellen die Verstärkung von Zelladhäsion, -proliferation und auch -migration auf Vitronektin bedingt (Hapke, 2003, 1073-1083). Wegen des bekannten Wechselspiels zwischen Integrinen und dem Tetraspanin und Metastasierungssuppressor KAI1 wurde in der AG Reuning die Adhäsion humaner OV-MZ-6-Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit von der KAI1-Expression untersucht. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, beeinflusst die KAI1-Expressionsstärke auch die Motilität von OV-MZ-6-Zellen. In Kapitel 1.6 wurde erörtert, dass die Morphologie einer Zelle eng mit ihrem Adhäsions- und somit auch Migrationsverhalten verknüpft ist. So wurde im nächsten Schritt das *spreading*-Verhalten der OV-MZ-6-Zellen in Abhängigkeit der KAI1-Expressionshöhe sowie des Matrixproteins (Vitronektin vs. Poly-D-Lysin) untersucht.

Hierzu wurde die Größe der *spreading*-Fläche in μm^2 in den am CLSM entstandenen videomikroskopischen *time-lapse*-Aufnahmen mittels der Software *Image J* ausgemessen. Wie in der Motilitätsstudie, so wurde auch hier die Auswertung erst 2 h nach Start der CLSM-Aufnahmen begonnen, um eine vollständige Adhäsion der Zellen an das Matrixprotein sicherzustellen. Die *spreading*-Fläche jeder einzelnen Zelle, wie sie sich in der 2D-Aufnahme am CLSM Mikroskop in der Ansicht von oben

darstellte, wurde alle 30 min ausgemessen, indem der Umfang der Zelle in einer Vergrößerungsaufnahme manuell nachgezeichnet wurde. Anschließend wurden die Messwerte der individuellen Zellen eines Klons über die gesamte Dauer des Migrationsversuchs (10 h) gemittelt. Verglichen wurden dabei der OV-MZ-6-Klon mit der höchsten KAI1-Expression (KAI1#4) mit Vektor-transfizierten Zellen, die an Vitronektin oder Poly-D-Lysin zur Adhäsion gebracht wurden.

Die Ein- und Ausschlusskriterien, die analysierten Zellen in der Auswertung zu berücksichtigen, waren mit denen der Motilitätsstudien identisch (siehe Kapitel 3.2.1). Zusätzlich mussten einige Zellen von der Auswertung ausgeschlossen werden, weil sie einander aufgrund leichter Zellkontakte teilweise verdeckten und, obwohl ihr Nukleus zu jedem Zeitpunkt frei sichtbar war, die Zellmembrangrenzen deshalb nicht exakt vermessen werden konnten.

3.3.1 Einfluss des Matrixproteins und der KAI1-Expressionshöhe auf das Zell-spreading humaner OV-MZ-6-Ovarialkarzinomzellen

Die Ermittlung des Ausmaßes des Zell-spreadings fand analog zu den Motilitätsstudien über einen Auswertungszeitraum der *time-lapse*-Serien von 10 h statt. Die im Abstand von 30 min gemessene Größe der *spreading*-Fläche der an Vitronektin adhärenen einzelnen Zellen wurde gemittelt und mit der der an Poly-D-Lysin adhärenen Zellen verglichen. Zur Auswertung kamen dabei pro Zellklon und Matrixprotein ein Minimum von 35 Zellen. OV-MZ-6-Zellen, die an Vitronektin adhärten hatten, zeigten eine deutlich verbessertes Zell-spreading, und zwar unabhängig davon, ob es sich um Vektor-transfizierte oder KAI1-überexprimierende Zellklone handelte (Abbildung 17). Über den gesamten Messzeitraum gemittelt ergab sich eine 1,7-fach größere *spreading*-Fläche des Klons KAI1#4 auf Vitronektin im Vergleich zu den an Poly-D-Lysin adhärten Zellen. Die *spreading*-Fläche der Vektor-transfizierten Zellen war bei an Vitronektin adhärten Zellen 1,2-fach größer als auf Poly-D-Lysin (p jeweils $\leq 0,001$). Es ist also sowohl die Zelladhäsion von OV-MZ-6-Zellen als auch, wie diese Daten bestätigen, das Zell-spreading als eine Manifestation der Zelladhäsion auf Vitronektin deutlicher ausgeprägt als auf Poly-D-Lysin (siehe auch Abbildung 18). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Adhäsion hier durch Integrine vermittelt wird, während auf Poly-D-Lysin lediglich elektrostatische, also nicht rezeptorvermittelte Wechselwirkungen für die Zelladhäsion verantwortlich sind.

Vergleich man das *spreading*-Verhalten Vektor-transfizierter Zellen mit dem des stärker KAI1-exprimierenden Zellklons auf Vitronektin oder Poly-D-Lysin, zeigte sich jedoch keine signifikante Korrelation, d.h. eine Änderung der KAI-Expressionshöhe scheint zwar einen Einfluss auf die Adhäsionsstärke der Zellen an Vitronektin zu haben, für das integrinvermittelte Zell-*spreading* jedoch nicht relevant zu sein. Das Zell-*spreading* scheint also unabhängig von der KAI1-Expression der Zellen zu sein, bzw. reicht der niedrige endogene KAI1-Gehalt der Vektor-transfizierten Zellen bereits für ein ausgeprägtes integrinvermitteltes Zell-*spreading* aus, welches durch Erhöhung der KAI1-Expression nicht mehr gesteigert werden kann, auch wenn die Adhäsionsstärke der Zellen an das EZM-Protein hierdurch zunimmt.

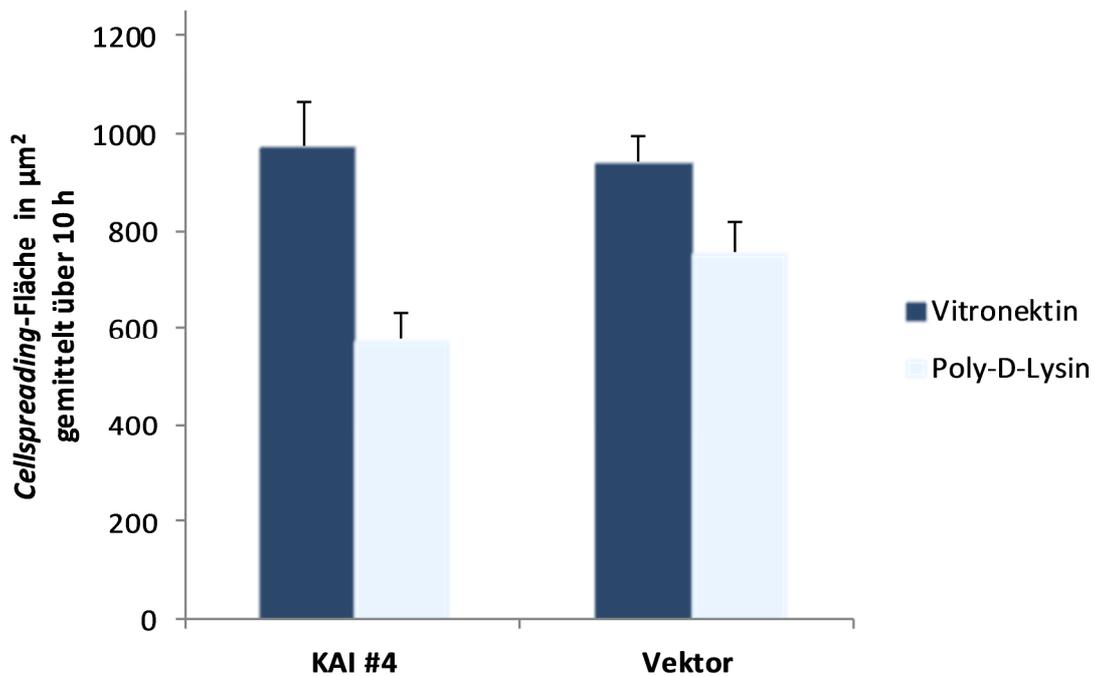


Abbildung 17: Vergleich der Zell-*spreading*-Flächen des OV-MZ-6-Klons KAI1#4 mit Vektor-transfizierten Zellen (Vektor) auf Vitronektin und Poly-D-Lysin.

Die durch Messung der *spreading*-Fläche der Zellen in den *time-lapse*-Aufnahmen gewonnenen Werte wurden für alle Zellen eines Klons über den gesamten Messzeitraum gemittelt (KAI1: n=52 Zellen; Vektor: n=38 Zellen).

Die statistische Auswertung zeigte für an Vitronektin adhärenente Zellen unabhängig von ihrer KAI1-Expressionsstärke dabei eine signifikant größere *spreading*-Fläche als für an Poly-D-Lysin adhärenente Zellen (p jeweils $\leq 0,001$). Der Vergleich der Größe der *spreading*-Fläche zwischen Zellen mit niedriger (Vektor) und hoher (KAI1#4) KAI1-Expression bezüglich der KAI1-Expressionsstärke ergab keinen signifikanten Unterschied.

Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis könnte in der Versuchsplanung liegen. Die *time-lapse*-Aufnahmen am CLSM, anhand derer das *spreading*-Verhalten analysiert wurde, wurden für den Motilitätsassay optimiert erstellt. Deshalb wurde die Phase des initialen Zell-*spreadings* nicht erfasst, die Auswertung wurde erst gestartet, als die primäre Adhäsion bereits abgeschlossen war, die dafür benötigte Zeit wurde nicht registriert. Auch die beiden ersten Stunden der Zeitrafferaufnahmen wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. So blieb die *spreading*-Fläche der Zellen über der Auswertungszeitraum hinweg im wesentlichen konstant (Daten hier nicht gezeigt), ein möglicher Unterschied hinsichtlich der Geschwindigkeit der initialen Zelladhäsion und des initialen Zell-*spreadings* in Abhängigkeit der KAI1-Expression der Zellen, konnte somit jedoch nicht erfasst werden.

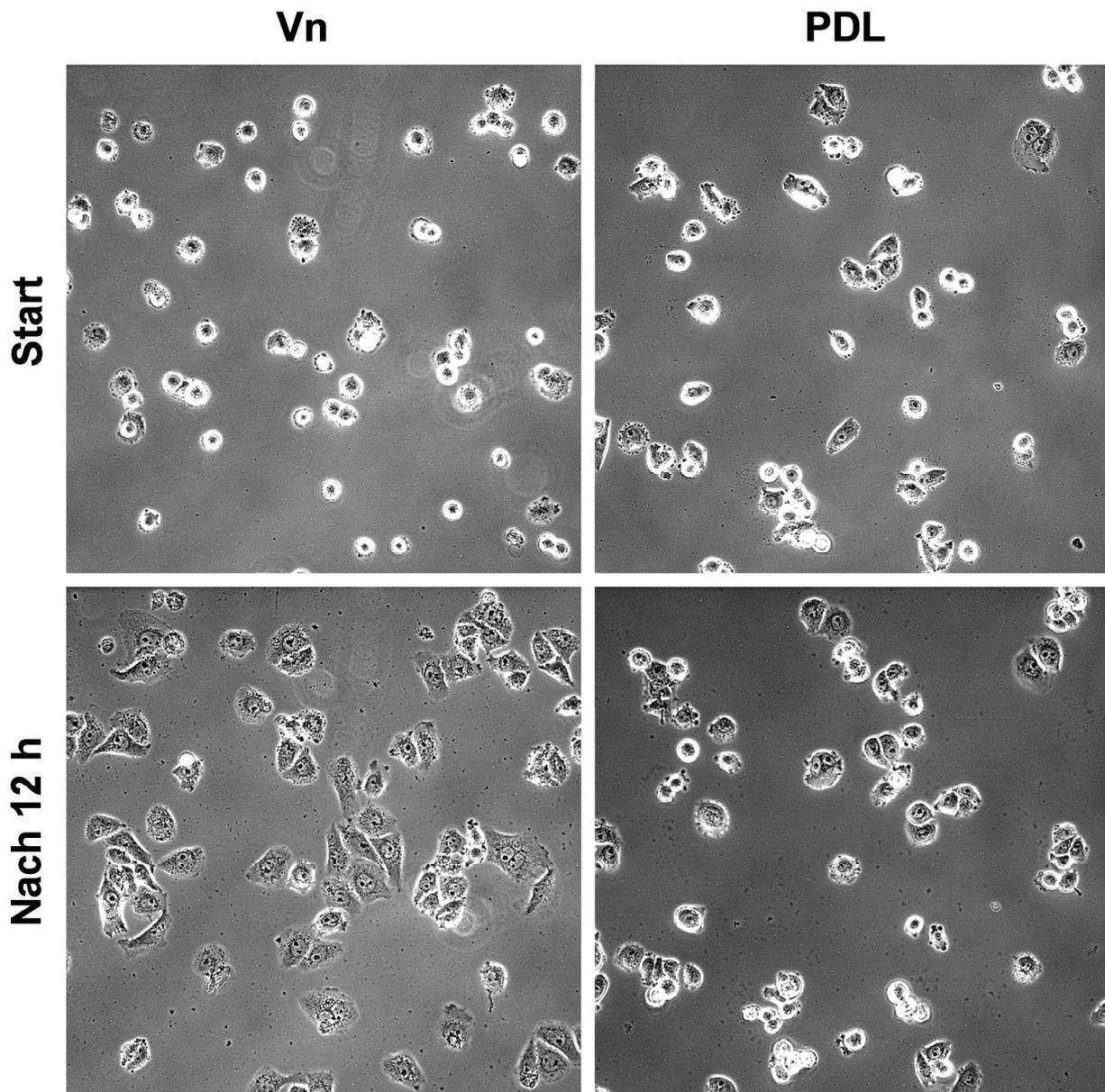


Abbildung 18: Ausschnitte aus *time-lapse*-Serien des KAI1-überexprimierenden OV-MZ-6-Klons KAI1#4 auf Vitronektin und Poly-D-Lysin

In dieser Abbildung wird der Einfluss des Substratproteins auf das Zell-*spreading* des OV-MZ-6-Klons KAI1#4 anhand von CLSM-Bildern aus *time-lapse*-Serien dargestellt. Die Bilder der linken Spalte („Vn“) zeigen die Zellen in Adhäsion an Vitronektin, die der rechten Spalte („PDL“) an Poly-D-Lysin.

Die obere Zeile („Start“) zeigt Aufnahmen zu Beginn der Serien (Zeitpunkt 0 des Aufnahmezeitraums). Hier begannen die Zellen gerade mit der Adhäsion an das jeweilige Protein und ihre Morphologie ähnelte sich, d.h. da das Zell-*spreading* gerade erst begonnen hatte, zeigte sich noch kein Einfluss des jeweiligen Matrixproteins.

Die untere Zeile („Nach 12 h“) zeigt die letzten Aufnahmen der Bildserien, d.h. 12 h nach den Start-Aufnahmen. Hier zeigten die Zellen auf Vitronektin ein deutlich ausgeprägteres *spreading*-Verhalten als auf Poly-D-Lysin.

Diese Bilder visualisieren, dass KAI1-überexprimierende Zellen in der Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Adhäsion an Vitronektin ein deutlicher ausgeprägtes Zell-*spreading* zeigen als in der nicht integrinvermittelten Adhäsion an Poly-D-Lysin.

4. DISKUSSION

Das Ovarialkarzinom gilt als eine der aggressivsten unter den malignen Tumorerkrankungen. Die 5-Jahres-Überlebensrate hängt stark von einer frühen Diagnosestellung ab. So beträgt sie für das Stadium FIGO I (der Tumor ist noch auf die Ovarien begrenzt) noch 80-90%, im Stadium FIGO IV (Vorliegen von Fernmetastasen) jedoch nur noch 11% (Schmalfeldt, 2007, 541-547). Versucht man, die individuelle Prognose einer Patientin zu ermitteln, so spielen Alter, Tumorstadium und -histologie, retroperitonealer Lymphknotenstatus, Ansprechen auf die Chemotherapie sowie vor allem die Größe des postoperativ verbleibenden Tumorrests als Prognosefaktor eine wichtige Rolle. Möglich ist auch eine Bestimmung des Tumorgenexpressionsmusters, um eine individuellere prognostische Aussage treffen zu können, auch wenn dies nicht routinemäßig durchgeführt wird. In vielen Studien hat sich gezeigt, dass eine Amplifikation von Onkogenen und somit eine vermehrte Expression ihres Proteinprodukts oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen als Indikatoren einer schlechten Prognose dienen (Tammela und Odunsi, 2004, 495-502; Yoshida et al., 2009, 992-997). So ist seit einigen Jahren beispielsweise bekannt, dass unter anderem niedrige Expressionsraten des putativen Metastasierungssuppressors KAI1 mit einem geringen Differenzierungsgrad des Tumors und somit einer schlechten Überlebensprognose von Ovarialkarzinompatientinnen korrelieren (White et al., 1998, 3143-3149; Liu et al., 2000, 10-15; Schindl et al., 2001, 244-248). Die Aufgabe von Metastasierungssuppressoren ist es, die metastatische Streuung von Tumoren zu verhindern, während sie jedoch nicht zwingend auch Einfluss auf das Wachstum des Primärtumors nehmen (Smith und Theodorescu, 2009, 253-264). Jedoch kann im Laufe der Tumorprogression ihr Aktivitäts- und Expressionsmuster verändert und die Metastasierung des Primärtumors somit ermöglicht werden.

Für die sich typischerweise kontinuierlich vom Ovar ausbreitende Streuung der Tumorzellen in der Peritonealhöhle spielen, neben der Strömung der Peritonealflüssigkeit, Adhäsion und Motilität der Tumorzellen eine entscheidende Rolle.

Für die Zellmotilität ist sowohl in physiologischen Migrationsprozessen als auch in der gesteigerten migratorischen Aktivität von Tumorzellen der Zellkontakt zu dem sie umgebenden Substrat essentiell. Membranrezeptoren wie Integrine vermitteln hierbei

den mechanischen Kontakt zwischen dem Zytoskelett der Zelle und der EZM und stehen gleichzeitig mit anderen Proteinen in Kontakt. So können sie extra- und intrazelluläre Signale verarbeiten und sind ein wichtiger Faktor für die motile Aktivität und Anpassung der Migrationsrichtung und -geschwindigkeit an das Aktivitätsmuster der Zelle. Integrin $\alpha_v\beta_3$ wird in den meisten Ovarialkarzinomzellen exprimiert und seine Expressionsstärke ist in malignen Tumoren deutlich höher als in Borderline-Tumoren, was auf eine Rolle in der Tumorprogression schließen lässt (Liapis et al., 1997, 443-449). Auch in *in vitro* Migrationsstudien, wie z.B. mittels Wundheilungs-Assays, konnte eine herausragende Rolle von Integrin $\alpha_v\beta_3$ für die motile Aktivität der Zelle nach Bindung an Vitronektin nachgewiesen werden (Carreiras et al., 1999, 285-294).

Neben den Integrinen sind viele andere Proteine an der Koordination und Regulierung der komplexen Migrationsvorgänge beteiligt. Auf der Zellmembran agieren Integrine und andere Membranproteine in Multi-Protein-Komplexen, so dass ihre Wirkungen nicht nur einzeln betrachtet werden können, sondern immer als Teil eines komplexen Netzwerks zu sehen sind. Neben dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ scheint u.a. KAI1 eine bedeutende Rolle in der Regulierung tumorbiologischer Vorgänge im Ovarialkarzinom zu spielen, wenn auch eine Interaktion der beiden Oberflächenproteine noch nicht nachgewiesen war.

Um die räumliche Beziehung von Integrin $\alpha_v\beta_3$ und KAI1 auf der Zelloberfläche und eine mögliche gegenseitige funktionelle Beeinflussung untersuchen zu können, transfizierten Ruseva et al. humane Ovarialkarzinomzellen der Zelllinien OV-MZ-6 und OVCAR-3 stabil mit KAI1-cDNA (Ruseva et al., 2009, 1759-1771). Wie in Kapitel 1.9 beschrieben, konnten sie durch Koimmunpräzipitation und immunzytochemische Doppelfärbung eine Kolo-kalisation von Integrin $\alpha_v\beta_3$ und KAI1 auf der Zelloberfläche, vor allem nach Interaktion von Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit Vitronektin, nachweisen. Interessanterweise konnte die durch Bindung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ an Vitronektin etablierte Zelladhäsion durch Wiedereinführung von KAI1 dosisabhängig noch deutlich gesteigert werden. Da die Adhäsion humaner Ovarialkarzinomzellen an Vitronektin fast vollständig Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelt ist (Hapke et al., 2006, 1073-1083), wäre es denkbar, dass der Einfluss von KAI1 auf deren adhäsive Kapazität über eine funktionelle Interaktion von KAI1 mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ vermittelt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Effekte einer durch KAI1 erhöhten Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Zelladhäsion auf die davon abhängige Zellmotilität und das Zell-*spreading*-Verhalten untersucht.

4.1 Einfluss des Metastasierungssuppressors KAI1 auf die migratorische Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen

Zur Charakterisierung des Effektes von KAI1 auf die zelluläre Motilität wurden an einem CLSM videomikroskopische *time-lapse*-Aufnahmen der Zellbewegungen erstellt. In diesen Studien zeigte sich, in Abhängigkeit von der Höhe der zellulären KAI1-Spiegel, eine statistisch signifikante Abnahme der Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten migratorischen Aktivität von humanen Ovarialkarzinomzellen, die auf Vitronektin zu Adhäsion gebracht wurden (siehe Kapitel 3.2.2). In einer früheren Studie der Arbeitsgruppe wurde zuvor nachgewiesen, dass die Adhäsion humaner Ovarialkarzinomzellen an Vitronektin durch eine Erhöhung der Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptordichte auf der Zellmembran nach stabiler Transfektion signifikant gesteigert werden konnte. Diese verbesserte Adhäsion bedingte dann auch eine gesteigerte Zellmotilität (Hapke et al., 2003, 1073-1083). Die Beobachtung einer durch KAI1 zusätzlich verstärkten Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Zelladhäsion an Vitronektin wirft die Frage auf, wie sich dies auf die migratorische Aktivität der Zellen auswirkt. Eine starke adhäsive Kapazität kann dazu führen, dass die Balance zwischen Adhäsion und Loslösen der Zellen von ihrem Substrat sich zu stark auf die Seite der Adhäsion verschiebt (DiMilla et al., 1993, 729-737; Huttenlocher und Horwitz, 2011, 3:a005074). Die hier vorgestellten Daten lassen vermuten, dass die metastasierungssupprimierende Wirkung von KAI1 zumindest teilweise darauf beruht, die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Adhäsion an Vitronektin soweit zu verstärken, dass die Zellen in ihrer Motilität beeinträchtigt werden. So konnte mit stabil KAI1-reexprimierenden OV-MZ-6-Zellen im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen eine durch die Stärke der KAI1-Expression bedingte Suppression der Motilität gezeigt werden. Dieser Effekt konnte im Versuch mit einer weiteren Ovarialkarzinomzelllinie (OVCAR-3) bestätigt werden.

Wie in dieser Arbeit beschrieben, zeigten die Zellen auch auf Kollagen Typ I eine Suppression ihrer Motilität durch die Reexpression von KAI1. Dies könnte auf die Wechselwirkung mit β_1 -Integrinen und deren Interaktion mit Kollagen Typ I

zurückgeführt werden. Auf Poly-D-Lysin als Substrat, auf dem Zelladhäsion nicht integrinabhängig stattfindet, wurde eine hochsignifikante Suppression der Zellmotilität nur von dem am höchsten KAI1-exprimierenden Zellklon KAI#4 erreicht. Unsere Ergebnisse an Ovarialkarzinomzellen stimmen mit Studien an anderen Tumorentitäten überein. In diesen Untersuchungen wurden Motilitätsstudien mittels Boyden-Kammer-, Matrigel-Invasionskammer- und/oder Wundheilungs-Assays durchgeführt. Auch hier konnte ein durch KAI1-induzierter suppressiver Effekt auf die Zellmotilität gezeigt werden. Dies wurde für Zellen aus Prostata-, Lungen-, Mamma-, kolorektalen und hepatozellulären Karzinomen sowie Melanomen nachgewiesen (Sridhar und Miranti, 2006, 2367-2378; Jee et al., 2007, 703-708; Yang et al., 2001, 5284-5288; Takaoka et al., 1998, 1443-1453; Liu et al., 2003, 1231-1236; Takaoka et al., 1998, 397-404). Wurden allerdings in diesen Studien zusätzlich die Auswirkungen der KAI1-Expression auf die Adhäsion an Proteine der EZM untersucht, so zeigte sich aber im Gegensatz zu den Daten von Ruseva et al. eine nicht veränderte oder aber verminderte zelluläre Adhäsion. So führte die erhöhte KAI1-Expression von hepatozellulären und kolorektalen Karzinomzellen zu einer Schwächung der Zelladhäsion an Fibronectin (Yang et al., 2008, 132-139; Liu et al., 2003, 1231-1236). Auch die für Prostatakarzinomzellen beschriebene Internalisierung von Integrin α_6 durch eine erhöhte KAI1-Expression führte zu verringerter Zelladhäsion an Laminin (He et al., 2005, 3346-3354). Diese Daten, die kein eindeutiges Bild bezüglich der Auswirkung der KAI1-Expressionshöhe auf die Zelladhäsion ergeben, dürfen jedoch nicht nur im Kontext der Interaktion zwischen KAI1 und Integrin $\alpha_v\beta_3$ betrachtet werden. Diese beiden Membranproteine interagieren in den *tetraspanin webs* und anderen Multiproteinkomplexen auf der Zellmembran auch noch mit vielen anderen Proteinen, die ebenfalls Einfluss auf die Zelladhäsion nehmen. So kann eine Änderung der KAI1-Expression über Wechselwirkung mit unterschiedlichen Proteinen, Integrinen, Tetraspaninen und anderen Bindungspartnern, auch zu unterschiedlichen Effekten führen. Das erklärt möglicherweise einen je nach zelltypspezifischem Expressionsmuster all dieser beteiligten Proteine unterschiedlichen Effekt auf die Zelladhäsion. Auch unterscheiden sich die Metastasierungsmuster unterschiedlicher Tumore sehr deutlich voneinander. In vielen Tumorentitäten, beispielsweise beim Mammakarzinom, steht neben der lymphogenen die hämatogene Metastasierung im Vordergrund. Beim Ovarialkarzinom spielt vor allem die kontinuierliche Ausbreitung

der Tumorzellen vom Ovar in der Peritonealhöhle und durch Strömungen der Peritonealflüssigkeit, in der sich flottierende Cluster von Ovarialkarzinomzellen befinden, eine Rolle. So ist möglicherweise je nach Tumorentität eine andere Balance zwischen zellulärer Adhäsion und Loslösen der Zellen vom Substrat für eine erfolgreiche Zellmigration und -invasion notwendig. Trotz unterschiedlicher Auswirkung auf die Zelladhäsion verringert eine experimentelle Reetablierung der im Laufe der Tumorprogression supprimierten endogenen KAI1-Expression die Zellmotilität in all den unterschiedlichen in diesem Zusammenhang untersuchten Tumorentitäten. Mittlerweile sind auch eine Reihe von *in vivo* Studien veröffentlicht worden, die den Einfluss einer veränderten KAI1-Expression untersuchen. Hier zeigte sich im Mausmodell bei Primärtumoren aus stabil mit KAI1 transfizierten humanen hepatozellulären Karzinomzellen (HCC), nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen, Prostatakarzinomzellen und Zellen eines malignen Melanoms eine deutlich reduzierte Fernmetastasierung oder Metastasierung in regionäre Lymphknoten im Vergleich zu Tumoren aus nicht mit KAI1 transfizierten Zellen (Yang et al., 2008, 132-139, Takeda et al., 2007, 1744-1749, Dong et al., 1995, 884-886; Takaoka et al., 1998, 397-404). So scheint die Motilitätshemmung und somit *in vivo* der anti-metastatische und anti-invasive Effekt von KAI1 als Metastasierungssuppressor tumorentitätenübergreifend vorhanden zu sein. Dies scheint durch zelltyp- und matrixspezifisch unterschiedliche Modulationen von Adhäsions- und Migrationsmechanismen hervorgerufen zu werden, wobei die genauen molekularen Mechanismen der durch KAI1 bewirkten Migrationshemmung und der dafür notwendigen funktionellen Wechselwirkung mit Integrinen weitgehend ungeklärt sind. Es gibt Hinweise darauf, dass KAI1 in der Wechselwirkung mit verschiedenen Bindungspartnern auf unterschiedlichen Wegen die Tumormetastasierung supprimieren kann (Tonoli und Barrett, 2005, 563-570, siehe auch Kapitel 1.4.1): Erstens durch Modulation von intrazellulären Signaltransduktionswegen. Zweitens durch physikalische Beeinflussung des Bindungsverhaltens seiner Bindungspartner an andere Proteine („*physical hindrance*“) oder drittens durch Beschleunigung der Endozytoserate seiner Bindungspartner („*touch and down*“). Für die funktionelle Interaktion von KAI1 mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ scheint der „*touch and down*“-Mechanismus in OV-MZ-6-Zellen keine Rolle zu spielen, da die Expressionslevel des Integrins $\alpha_v\beta_3$ in den stabilen Zelltransfektanten durch die Erhöhung der KAI1-Expression nicht beeinflusst wurden

(Ruseva et al., 2009, 1759-1771). Ähnliches wurde auch für Prostatakarzinomzellen gezeigt. Auch hier führte die Wiederherstellung der KAI1-Expression durch stabile Zelltransfektion zu keiner Änderung der Expressionshöhe des Integrins $\alpha_5\beta_1$ (Zhou et al., 2004, 7455-7463). Im Gegensatz dazu wurde allerdings auf einer anderen Prostatakarzinomzelllinie eine beschleunigte Internalisierung des Integrins α_6 beobachtet (He et al., 2005, 3346-3354). Demnach scheint der Einfluss von KAI1 auf die Oberflächenexpression der Integrine ein zellspezifisches Phänomen zu sein und möglicherweise auch von dem spezifischen Integrinmuster der Zelle abzuhängen.

Die Änderung der KAI1-Expression scheint in vielen Tumorentitäten Einfluss auf die intrazellulären Signaltransduktionswege der Integrine zu nehmen. Die Reexpression von KAI1 in einer Prostatakarzinomzelllinie führte zu Veränderungen in den integrinvermittelten Signaltransduktionskaskaden, wie etwa der verminderten Aktivierung und Phosphorylierung der Src-Kinase und ihren nachgeschalteten Substraten p130Cas und FAK Y861. Ebenso bewirkte die Reexpression von KAI1 eine verminderte p130CAS-CrkII-Komplexbildung (Sridhar und Miranti, 2006, 2367-2378; Zhang et al., 2003, 27319-27328).

Auch die Aktivierung von Rho-GTPasen durch integrinvermittelte Signalkaskaden reguliert die Zellmigration entscheidend (Huveneers und Danen, 2009, 1059-1069). Die Regulierung von Rho-GTPasen durch KAI1 in Tumorzellen ist bisher noch nicht untersucht worden. Aber die Aktivierung und Zytoskelettorganisation von T-Lymphozyten über die Aktivierung von Rho-GTPasen durch KAI1 als Kostimulationsmolekül ist bekannt (Delaguillaumie et al., 2002, 433-443).

Auch eine Motilitätssuppression von KAI1 mittels „*physical hindrance*“ (d.h. Beeinflussung des Bindungsverhaltens seines Interaktionspartners an weitere Partner) scheint möglich. Dabei können neben Integrinen auch andere Bindungspartner in den *tetraspanin webs* eine Rolle spielen. So ist eine Motilitätshemmung auch beispielsweise durch Wechselwirkung mit Wachstumsfaktorrezeptoren (Odintsova et al., 2000, 1009-1012; Odintsova et al., 2003, 4557-4566) möglich, denen wie in Kapitel 1.6 besprochen eine bedeutende Rolle in der integrinvermittelten Motilitätsinduktion zukommt.

4.2 Einfluss des Metastasierungssuppressors KAI1 auf das *spreading*-Verhalten humaner Ovarialkarzinomzellen

Ein verändertes Adhäsions- und Migrationsverhalten von Zellen geht auch mit einer Veränderung der Zellmorphologie einher, insbesondere was das Ausmaß des Zell-*spreadings* betrifft. Im Zuge der Etablierung stabiler Zellkontakte auf einem Wachstumssubstrat bilden sich zunächst Membranfortsätze, Lamellipodien und Filopodien aus, mit denen die Zelle das Substrat in alle Richtungen nach Anheftungspunkten sondiert. Hier wird durch Polymerisierung von Aktinfilamenten das Aktinskelett der Zelle über Integrine in der Umgebung verankert und die Zellmorphologie verändert sich von einer abgerundeten hin zu einer flach ausgebreiteten Zellform mit multiplen Substratanheftungspunkten, die eine stabile Adhäsion bewirken. Anhand der *time-lapse*-Aufnahmen wurde das Zell-*spreading* auf der Substratunterlage als Größe der *spreading*-Fläche ausgemessen. Hierbei wurde die Messung jedoch erst nach erfolgter primärer Adhäsion begonnen, nachdem die Zellen das *spreading* auf dem Substrat bereits vollzogen hatten.

Die Auswertung der videomikroskopischen *time-lapse*-Aufnahmen hinsichtlich der Größe der *spreading*-Fläche eines KAI1-überexprimierenden sowie eines Vektor-transfizierten Zellklons zeigte eine deutlich größere Fläche auf Vitronektin im Vergleich zu Poly-D-Lysin. Dieser Effekt war allerdings von dem Grad der KAI1-Expression unbeeinflusst.

Die äußere Form und damit das *spreading* einer Zelle wird durch ihr Aktinzytoskelett bestimmt und auch hier spielen Integrine eine entscheidende Rolle. Die Bindung von Integrinen an Proteine der EZM führt zur Ausbildung Fokaler Adhäsionen, in denen die Integrine mit dem Aktinzytoskelett der Zelle in Kontakt treten, die Aktinfilamente bündeln und so zu einer ausgebreiteten, flachen Zellmorphologie führen (Price, 1997, 941-943; Schönwälder und Burridge, 1999, 274-286, Bastmeyer, 1999-2001, ohne Seitenangabe).

Da die Zelladhäsion an Poly-D-Lysin durch elektrostatische Wechselwirkungen bewirkt wird, also nicht integrinvermittelt stattfindet (Rainaldi et al., 1998, 755-760; Cowles et al., 2000, 725-737), ist anzunehmen, dass die beobachtete Vergrößerung der *spreading*-Fläche auf Vitronektin daran liegt, dass die Zellen hier die Möglichkeit haben, über Integrine den Kontakt zwischen Zytoskelett und Substrat herzustellen. Bei dem *spreading* von OV-MZ-6- und OVCAR-3-Zellen auf Vitronektin ist davon

auszugehen, dass vor allem das Integrin $\alpha_v\beta_3$ eine wichtige Rolle in der Bildung Fokaler Adhäsionen und Reorganisation des Aktinzytoskeletts spielt.

Es stellte sich die Frage, wie die durch KAI1 vermittelte Erhöhung der zellulären Adhäsion die Größe der *spreading*-Fläche v.a. in Adhäsion an Vitronektin beeinflussen würde. In der Auswertung der *time-lapse*-Aufnahmen zeigt sich in dieser Frage kein signifikanter Effekt. Jedoch ist es möglich, dass in der initialen Geschwindigkeit der Zelladhäsion und des Zell-*spreadings* nach Aussäen der Zellen auf dem Substrat in der Petrischale für die CLSM-Studien ein Unterschied zeigte. Dieses wurde jedoch nicht erfasst, da die Zeitrafferstudie erst nach erfolgtem initialem *spreading* gestartet wurde und die Zeit, die hierfür benötigt wurde, in den CLSM-Bildern, die zur Ermittlung der Zellmotilität erfasst wurden, nicht registriert wurde. Auch wurden, wie beschrieben, die ersten beiden Stunden der Zeitrafferserien nicht mit in die Auswertung eingeschlossen.

Ein erneuter Versuchsansatz sollte also auch die zeitliche Dynamik bis zu dem abgeschlossenen *spreading* der Zellen berücksichtigen um möglicherweise so einen Unterschied in Abhängigkeit der KAI1-Expressionshöhe darstellen zu können.

4.3 Veränderung der Expression des Metastasierungssuppressors KAI1 als Therapieansatz

Zwar ist KAI1 in seiner Funktion als Metastasierungssuppressor durch Beeinflussung zentraler tumorbiologischer Prozesse bereits seit Jahren bekannt, aber noch hat dieses Wissen keinen Eingang in gängige Therapiekonzepte oder Medikamente gefunden. Es wurden jedoch bereits einige *in vitro* und *in vivo* Studien veröffentlicht, die vielversprechende unterschiedliche therapeutische Ansätze verfolgen, deren klinischer Einsatz am Patienten jedoch noch nicht unmittelbar bevorsteht. Ein Ansatz bedient sich der Methoden der Gentherapie, um im Tiermodell die Expression von KAI1 in Tumorgewebe zu erhöhen. In Nacktmäusen wurde subkutan durch Injektion von Pankreaskarzinomzellen in die Leiste ein heterotoper (d.h. an einer atypischen Körperstelle entstehender) Primärtumor etabliert. Direkt in den Primärtumor wurden anschließend KAI1 enthaltende Expressionsvektoren injiziert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde sowohl das Volumen des Primärtumors als auch die pulmonale Metastasierung durch die verstärkte Anwesenheit von KAI1 signifikant reduziert (Xu et al., 2008, 1126-1132). In einer Studie von Takeda et al. wurden

replikationsdefiziente Adenoviren als Vektor benützt, um die KAI1-Expression im Mausmodell des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms wiederherzustellen. Dabei wurde zunächst durch direkte intrapulmonale Injektion von Zellen einer nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie Primärtumore erzeugt. Diese Mäuse wurden dann durch intratracheale Applikation von Adenoviren, die für KAI1 codierende cDNA transportierten, behandelt. Nach drei Wochen zeigte sich eine signifikante Verkleinerung der mediastinalen Lymphknotenmetastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Takeda et al., 2007, 1744-1749).

Therapeutisch ist es deutlich einfacher, hyperaktive Gene zu hemmen als Gene zu ersetzen, um die verringerte Expression eines Proteins wiederherzustellen. So müssen auch in diesem Fall alternative therapeutische Optionen bedacht werden. So wäre die Entwicklung von Medikamenten, welche beispielsweise die Transkription des KAI1-Gens fördern, oder von anderen, die auf der Ebene der KAI1-Interaktionspartner angreifen, eine weitere Möglichkeit. Der diesbezügliche Stand der Forschung wurde 2009 in einer Arbeit von Smith und Theodorescu zusammengefasst (Smith und Theodorescu, 2009, 253-264): Die transkriptionelle Regulierung von KAI1 scheint über ein p53-Response-Element durch p53 induzierbar zu sein (Mashimo et al., 1998, 11307-11311). Davon ausgehend zeigten Mashimo et al., dass das Zytostatikum Etoposid über Aktivierung von p53 die Expression von KAI1 induziert (Mashimo et al., 2000, 370-376). Wu et al. behandelten Mäuse nach der Injektion von Magenkarzinomzellen in die Milz mit Etoposid und fanden sowohl eine Erhöhung der KAI1-Expression im Tumorgewebe als auch eine deutliche Reduktion der Anzahl und des Gewichts der Metastasen (Wu et al., 2003, 237-249). So könnte Etoposid möglicherweise auch in der Humantherapie die Transkription von KAI1 induzieren. Etoposid wird zwar erfolgreich als Chemotherapeutikum, z.B. bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Ferraldeschi et al, 2007, 2135-2152) angewandt, allerdings ist dabei der Effekt auf die KAI1-Expression nie ermittelt worden. Gerade durch das breite Effektorspektrum von Etoposid und der Induktion von p53 ist es deshalb jedoch durchaus möglich, dass KAI1 dabei nur eine geringe Rolle spielt.

Eine weitere Möglichkeit, therapeutisch die Expression von KAI1 zu erhöhen, zeigten El Touny und Banerjee auf. Der Verlust der KAI1-Expression im Prostatakarzinom-Mausmodell konnte durch Fütterung der Tiere mit dem Phytoöstrogen Genistein, welches in Soja enthalten ist, wiederhergestellt werden. Die Behandlung mit

Genistein führte *in vitro* zu einer verminderten Invasionsfähigkeit von TRAMP-C2-Prostatakarzinomzellen. Dieser Effekt konnte spezifisch der Induktion der KAI1-Expression zugeordnet werden (El Touny und Banerjee, 2007, 169-175).

Diese Veränderung der Metastasierung von Tumoren wurde allerdings noch nicht in präklinischen Studien getestet und der Mechanismus der KAI1-Induktion durch Genistein ist noch völlig unklar.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Das Tetraspanin KAI1 wird im menschlichen Körper ubiquitär exprimiert und beeinflusst Prozesse wie Zelladhäsion, Motilität, Invasivität und Apoptose. Diese Ereignisse spielen sowohl in vielen physio- als auch pathophysiologischen Ereignissen, wie der Tumorprogression und –metastasierung, eine entscheidende Rolle. Wie ursprünglich für das Prostatakarzinom beschrieben, ist KAI1 inzwischen in vielen weiteren Tumorentitäten als Metastasierungssuppressor bekannt. Sein Verlust oder seine geringe Expression werden in klinisch fortgeschrittenen malignen Tumoren wie u.a. dem Ovarialkarzinom gefunden und korrelieren mit einer schlechten Prognose (Liu et al., 2000, 10-15).

Tetraspanine konstituieren große Proteinnetzwerke auf der Zellmembran, die sogenannten *tetraspanin webs*, in denen sie sowohl untereinander als auch mit anderen Membranproteinen interagieren (Hemler, 2008, 747-758). Unter diesen spielen Zelladhäsiv- und Signaltransduktionsrezeptoren aus der Superfamilie der Integrine eine besondere Rolle (Berditchevski et al., 2001, 4143-4151).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde nach Reexpression von KAI1 in kultivierten humanen Ovarialkarzinomzellen erstmals eine Kollokalisierung des Tumorsuppressors KAI1 mit dem tumorbiologisch relevanten Integrin $\alpha_v\beta_3$ und seinem Liganden Vitronektin auf der Zelloberfläche gezeigt. Diese physikalische Interaktion ging funktionell auch mit Veränderungen tumorzellbiologischer Eigenschaften einher, so mit einer Erhöhung der zelladhäsiven Kapazität (Ruseva et al., 2009, 1759-1771).

Diese Beobachtungen dienten als Basis für die vorliegende Arbeit, die sich mit der zellmigratorischen Aktivität als Funktion der KAI1-Expression beschäftigte. In der Tat wurde nach zellulärer Reexpression von KAI1 eine signifikante Verminderung der migratorischen Aktivität der Ovarialkarzinomzellen beobachtet, die an Vitronektin zur

Adhäsion gebracht wurden. Da die Zellmigration stark von der Zelladhäsion abhängig ist, liegt es nahe, dass der Rückgang der motilen Aktivität der Zellen auf der KAI1-bedingten verstärkten Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Immobilisierung der Zellen auf dem Wachstumssubstrat Vitronektin beruht.

Die durch KAI1 gesteigerte Integrin $\alpha_v\beta_3$ -abhängige Zelladhäsion nahm jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß des Zell-*spreadings*. Allerdings zeigten Zellen, die auf Vitronektin zur Adhäsion gebracht wurden, im Vergleich zu solchen auf Poly-D-Lysin, wie erwartet, ein deutlich ausgeprägteres Zell-*spreading*, jedoch unabhängig von der KAI1-Expressionshöhe.

Angesichts des beschriebenen Einflusses des Metastasierungssuppressors KAI1 auf tumorbiologische Vorgänge erscheinen therapeutische Maßnahmen sinnvoll, mittels derer die KAI1-Expression in Tumoren reetabliert bzw. sein Expressionsverlust verhindert werden könnte. In den letzten Jahren wurden bereits mögliche KAI1-basierte Therapiekonzepte vorgeschlagen und in ersten Studien *in vitro* und *in vivo* erprobt. Als Voraussetzung für eine erfolgversprechende therapeutische Intervention bedarf es jedoch der weiteren intensiven Erforschung der komplexen Protein/Protein-Wechselwirkungen des KAI1 mit seinen ebenfalls tumorbiologisch relevanten Bindungspartnern wie den Integrinen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

5.1 Zeitschriftenartikel

Abe, M., Sugiura, T., Takahashi, M., Ishii, K., Shimoda, M., Shirasuna, K. A novel function of CD82/KAI-1 on E-cadherin-mediated homophilic cellular adhesion of cancer cells. *Cancer Lett.* 266 (2008) 163-170

Adachi, M., Taki, T., Ieki, Y., Huang, C.L., Higashiyama, M., Miyake, M. Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 56 (1996) 1751-1755

Afshari, C., Bruno, M., Lamb, P., Kenney, N., Barrett, J.C. Interaction of the metastasis suppressing proteins KAI1 and E-cadherin in epithelial cells. Abstract. *Proc Am Assoc Cancer Res* 40 (1999) 197

Arnaout, M.A., Goodman, S.L., Xiong, J.P. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 19 (2007) 495-507

Arnaout, M.A., Mahalingam, B., Xiong, J.P. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21 (2005) 381-410

Assoian, R.K., Zhu, X. Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol.* 9 (1997) 93-98

Auersperg, N., Wong, A.S., Choi, K.C., Kang, S.K., Leung, P.C. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev.* 22 (2001) 255-288

Bandyopadhyay, S., Zhan, R., Chaudhuri, A., Watabe, M., Pai, S.K., Hirota, S., Hosobe, S., Tsukada, T., Miura, K., Takano, Y., Saito, K., Pauza, M.E., Hayashi, S., Wang, Y., Mohinta, S., Mashimo, T., Iizumi, M., Furuta, E., Watabe, K. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat Med.* 12 (2006) 933-938

Bass, R., Werner, F., Odintsova, E., Sugiura, T., Berditchevski, F., Ellis, V. Regulation of urokinase receptor proteolytic function by the tetraspanin CD82. *J Biol Chem.* 280 (2005) 14811-14818

Berditchevski, F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci.* 114 (2001) 4143-4151

Bienstock, R.J., Barrett, J.C. KAI1, a prostate metastasis suppressor: prediction of solvated structure and interactions with binding partners; integrins, cadherins, and cell-surface receptor proteins. *Mol Carcinog.* 32 (2001) 139-153

Boucheix, C., Rubinstein, E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci.* 58 (2001) 1189-1205

Bouras, T., Frauman, A.G. Expression of the prostate cancer metastasis suppressor gene KAI1 in primary prostate cancers: a biphasic relationship with tumour grade. *J Pathol.* 188 (1999) 382-388

Bradbury, L.E., Kansas, G.S., Levy, S., Evans, R.L., Tedder, T.F. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J Immunol.* 149 (1992) 2841-2850

Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., Cheresch, D.A. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell.* 79 (1994) 1157-1164

Buommino, E., Baroni, A., Canozo, N., Petrazzuolo, M., Nicoletti, R., Voza, A., Tufano, M.A. Artemisinin reduces human melanoma cell migration by down-regulating alpha V beta 3 integrin and reducing metalloproteinase 2 production. *Invest New Drugs.* 27 (2009) 412-418

Burridge, K., Chrzanowska-Wodnicka, M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12 (1996) 463-518

Cannistra, S.A., Ottensmeier, C., Niloff, J., Orta, B, DiCarlo, J. Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 58 (1995) 216-225

Carreiras, F., Denoux, Y., Staedel, C., Lehmann, M., Sichel, F., Gauduchon, P. Expression and localization of alpha v integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 62 (1996) 260-267

Carreiras, F., Lehmann, M., Sichel, F., Marvaldi, J., Gauduchon, P., Le Talaer, J.Y. Implication of the alpha v beta 3 integrin in the adhesion of the ovarian-adenocarcinoma cell line IGROV1. *Int J Cancer.* 63 (1995) 530-536

Carreiras, F., Rigot, V., Cruet, S., Andre, F., Gauduchon, P., Marvaldi, J. Migration properties of the human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1: importance of alpha(v)beta3 integrins and vitronectin. *Int J Cancer.* 80 (1999) 285-294

Caswell, P., Norman, J. Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion. *Trends Cell Biol.* 18 (2008) 257-263

Charrin, S., Le Naour, F., Oualid, M., Billard, M., Faure, G., Hanash, S.M., Boucheix, C., Rubinstein, E. The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem.* 276 (2001) 14329-14337

Charrin, S., Le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P.E., Boucheix, C., Rubinstein, E. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J.* 420 (2009) 133-154

Chen, Z., Mustafa, T., Trojanowicz, B., Brauckhoff, M., Gimm, O., Schmutzler, C., Köhrle, J., Holzhausen, H.J., Kehlen, A., Klonisch, T., Finke, R., Dralle, H., Hoang-Vu, C. CD82, and CD63 in thyroid cancer. *Int J Mol Med.* 14 (2004) 517-527

- Chen, J., Zhang, J., Zhao, Y., Li, J., Fu, M. Integrin beta3 down-regulates invasive features of ovarian cancer cells in SKOV3 cell subclones. *J Cancer Res Clin Oncol.* 135 (2009) 909-917
- Claas, C., Stipp, C.S., Hemler, M.E. Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem.* 276 (2001) 7974-7984
- Classon, B.J., Williams, A.F., Willis, A.C., Seed, B., Stamenkovic, I. The primary structure of the human leukocyte antigen CD37, a species homologue of the rat MRC OX-44 antigen. *J Exp Med.* 172 (1990) 1007
- Clezardin, P. Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis. *Cell Mol Life Sci.* 54 (1998) 541-548
- Cowles, E.A., Brailey, L.L., Gronowicz, G.A. Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 52 (2000) 725-737
- Cruet-Hennequart, S., Maubant, S., Luis, J., Gauduchon, P., Staedel, C., Dedhar, S. alpha(v) integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells. *Oncogene.* 22 (2003) 1688-1702
- Cuvelier, D., Théry, M., Chu, Y.S., Dufour, S., Thiéry, J.P., Bornens, M., Nassoy, P., Mahadevan, L. The universal dynamics of cell spreading. *Curr Biol.* 17 (2007) 694-699
- Damsky, C.H., Werb, Z. Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr Opin Cell Biol.* 4 (1992) 772-781
- Dedhar, S. Integrins and signal transduction. *Curr Opin Hematol.* 6 (1999) 37-43
- Delaguillaumie, A., Lagaudrière-Gesbert, C., Popoff, M.R., Conjeaud, H. Rho GTPases link cytoskeletal rearrangements and activation processes induced via the tetraspanin CD82 in T lymphocytes. *J Cell Sci.* 115 (2002) 433-443
- Dijkgraaf, I., Kruijtzter, J.A., Frielink, C., Corstens, F.H., Oyen, W.J., Liskamp, R.M., Boerman, O.C. Alpha v beta 3 integrin-targeting of intraperitoneally growing tumors with a radiolabeled RGD peptide. *Int J Cancer.* 120 (2007) 605-610
- Dike, L.E., Chen, C.S., Mrksich, M., Tien, J., Whitesides, G.M., Ingber, D.E. Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35 (1999) 441-448
- DiMilla, P.A., Stone, J.A., Quinn, J.A., Albelda, S.M., Lauffenburger, D.A. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol.* 122 (1993) 729-737

Dong, J.T., Lamb, P.W., Rinker-Schaeffer, C.W., Vukanovic, J., Ichikawa, T., Isaacs, J.T., Barrett, J.C. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*. 268 (1995) 884-886

Dong, J.T., Suzuki, H., Pin, S.S., Bova, G.S., Schalken, J.A., Isaacs, W.B., Barrett, J.C., Isaacs, J.T. Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res*. 56 (1996) 4387-4390

El Touny, L.H., Banerjee, P.P. Genistein induces the metastasis suppressor kangai-1 which mediates its anti-invasive effects in TRAMP cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 361 (2007) 169-175

Eliceiri, B.P., Cheresh, D.A. Adhesion events in angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 13 (2001) 563-568

Eliceiri, B.P., Cheresh, D.A. Role of alpha v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest*. 103 (1999) 1227-1230

Felding-Habermann, B., Cheresh, D.A. Vitronectin and its receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 5 (1993) 864-868

Felding-Habermann, B., Mueller, B.M., Romerdahl, C.A., Cheresh, D.A. Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J Clin Invest*. 89 (1992) 2018-2022

Ferraldeschi, R., Baka, S., Jyoti, B., Faivre-Finn, C., Thatcher, N., Lorigan, P. Modern management of small-cell lung cancer. *Drugs*. 67 (2007) 2135-2152

Fong, Y.C., Liu, S.C., Huang, C.Y., Li, T.M., Hsu, S.F., Kao, S.T., Tsai, F.J., Chen, W.C., Chen, C.Y., Tang, C.H. Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the alphavbeta3 integrin/FAK/Akt and NF-kappaB-dependent pathway. *Lung Cancer*. 64 (2009) 263-270

Friedlander, D.R., Zagzag, D., Shiff, B., Cohen, H., Allen, J.C., Kelly, P.J., Grumet, M. Migration of brain tumor cells on extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves alphaV and beta1 integrins. *Cancer Res*. 56 (1996) 1939-1947

Friess, H., Guo, X.Z., Berberat, P., Graber, H.U., Zimmermann, A., Korc, M., Büchler, M.W. Reduced KAI1 expression in pancreatic cancer is associated with lymph node and distant metastases. *Int J Cancer*. 79 (1998) 349-355

Gaugitsch, H.W., Hofer, E., Huber, N.E., Schnabl, E., Baumruker, T. A new superfamily of lymphoid and melanoma cell proteins with extensive homology to *Schistosoma mansoni* antigen Sm23. *Eur J Immunol*. 21 (1991) 377-383

Giancotti, F.G., Ruoslahti, E. Integrin signaling. *Science*. 285 (1999) 1028-1032

Guo, X.Z., Friess, H., Di Mola, F.F., Heinicke, J.M., Abou-Shady, M., Graber, H.U., Baer, H.U., Zimmermann, A., Korc, M., Büchler, M.W. KAI1, a new metastasis suppressor gene, is reduced in metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 28 (1998) 1481-1488

Guo, X., Friess, H., Graber, H.U., Kashiwagi, M., Zimmermann, A., Korc, M., Büchler, M.W. KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases. *Cancer Res*. 56 (1996) 4876-4880

Guo, X.Z., Xu, J.H., Liu, M.P., Kleeff, J., Ho, C.K., Ren, L.N., Li, H.Y., Köninger, J., Cui, Z.M., Wang, D., Wu, C.Y., Zhao, J.J., Friess, H. KAI1 inhibits anchorage-dependent and -independent pancreatic cancer cell growth. *Oncol Rep*. 14 (2005) 59-63

Hamilton, T.C., Young, R.C., McKoy, W.M., Grotzinger, K.R., Green, J.A., Chu, E.W., Whang-Peng, J., Rogan, A.M., Green, W.R., Ozols, R.F. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res*. 43 (1983) 5379-5389

Hammond, C., Denzin, L.K., Pan, M., Griffith, J.M., Geuze, H.J., Cresswell, P. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J Immunol*. 161 (1998) 3282-3291

Hapke, S., Kessler, H., Arroyo de Prada, N., Benge, A., Schmitt, M., Lengyel, E., Reuning, U. Integrin alpha(v)beta(3)/vitronectin interaction affects expression of the urokinase system in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem*. 276 (2001) 26340-26348

Hapke, S., Kessler, H., Lubber, B., Benge, A., Hutzler, P., Höfler, H., Schmitt, M., Reuning, U. Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem*. 384 (2003) 1073-1083

He, B., Liu, L., Cook, G.A., Grgurevich, S., Jennings, L.K., Zhang, X.A. Tetraspanin CD82 attenuates cellular morphogenesis through down-regulating integrin alpha6-mediated cell adhesion. *J Biol Chem*. 280 (2005) 3346-3354

Helfrich, M.H., Nesbitt, S.A., Lakkakorpi, P.T., Barnes, M.J., Bodary, S.C., Shankar, G., Mason, W.T., Mendrick, D.L., Väänänen, H.K., Horton, M.A. Beta 1 integrins and osteoclast function: involvement in collagen recognition and bone resorption. *Bone*. (1996) 317-328

Hemler, M.E. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol*. 155 (2001) 1103-1107

Hemler, M.E. Targeting of tetraspanin proteins—potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov*. 7 (2008) 747-758

Hemler, M.E. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6 (2005) 801-811

- Hemler, M.E., Mannion, B.A., Berditchevski, F. Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1287 (1996) 67-71
- Hood, J.D., Cheresh, D.A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer.* 2 (2002) 91-100
- Horton, M.A. The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *Int J Biochem Cell Biol.* 29 (1997) 721-725
- Horváth, G., Serru, V., Clay, D., Billard, M., Boucheix, C., Rubinstein, E. CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem.* 273 (1998) 30537-30543
- Houle, C.D., Ding, X.Y., Foley, J.F., Afshari, C.A., Barrett, J.C., Davis, B.J. Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol.* 86 (2002) 69-78
- Howe, A., Aplin, A.E., Alahari, S.K., Juliano, R.L. Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol.* 10 (1998) 220-231
- Hughes, P.E., Pfaff, M. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol.* 8 (1998) 359-364
- Huttenlocher, A., Horwitz, A.R. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a005074 (2011)
- Huveneers, S., Danen, E.H. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci.* 122 (2009) 1059-1069
- Hynes, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 48 (1987) 549-554
- Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69 (1992) 11-25
- Ichikawa, T., Ichikawa, Y., Dong, J., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., Isaacs, W.B., Oshimura, M., Barrett, J.C., Isaacs, J.T. Localization of metastasis suppressor gene(s) for prostatic cancer to the short arm of human chromosome 11. *Cancer Res.* 52 (1992) 3486-3490
- Imai, T., Yoshie, O. 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 (1993) 6470-6481
- Jackson, P., Kingsley, E.A., Russell, P.J. Inverse correlation between KAI1 mRNA levels and invasive behaviour in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett.* 156 (2000) 9-17
- Jackson, P., Millar, D., Kingsley, E., Yardley, G., Ow, K., Clark, S., Russell, P.J. 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 (2000) 169-176

Jakubowska, A., Gronwald, J., Menkiszak, J., Górski, B., Huzarski, T., Byrski, T., Edler, L., Lubinski, J., Scott, R.J., Hamann, U. Integrin beta3 Leu33Pro polymorphism increases BRCA1-associated ovarian cancer risk. *J Med Genet.* 44 (2007) 408-411

Jee, B.K., Lee, J.Y., Lim, Y., Lee, K.H., Jo, Y.H. Effect of KAI1/CD82 on the beta1 integrin maturation in highly migratory carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 359 (2007) 703-708

Jee, B.K., Park, K.M., Surendran, S., Lee, W.K., Han, C.W., Kim, Y.S., Lim, Y. 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 (2006) 655-661

Juliano, R.L., Varner, J.A. Adhesion molecules in cancer: the role of integrins. *Curr Opin Cell Biol.* 5 (1993) 812-818

Kaur, S., Kenny, H.A., Jagadeeswaran, S., Zillhardt, M.R., Montag, A.G., Kistner, E., Yamada, S.D., Mitra, A.K., Lengyel, E. β 3-integrin expression on tumor cells inhibits tumor progression, reduces metastasis, and is associated with a favorable prognosis in patients with ovarian cancer. *Am J Pathol.* 175 (2009) 2184-2196

Kenny, H.A., Kaur, S., Coussens, L.M., Lengyel, E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest.* 118 (2008) 1367-1379

Kerbel, R.S., Kamen, B.A. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 4 (2004) 423-436

Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., Grandi, G., Bolognesi, M. CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J.* 20 (2001) 12-18

Lagaudrière-Gesbert, C., Lebel-Binay, S., Hubeau, C., Fradelizi, D., Conjeaud, H., Signaling through the tetraspanin CD82 triggers its association with the cytoskeleton leading to sustained morphological changes and T cell activation. *Eur J Immunol.* 28 (1998) 4332-4344

Lagaudrière-Gesbert, C., Lebel-Binay, S., Wiertz, E., Ploegh, H.L., Fradelizi, D., Conjeaud, H. The tetraspanin protein CD82 associates with both free HLA class I heavy chain and heterodimeric beta 2-microglobulin complexes. *J Immunol.* 158 (1997) 2790-2797

Lammerding, J., Kazarov, A.R., Huang, H., Lee, R.T., Hemler, M.E. Tetraspanin CD151 regulates alpha6beta1 integrin adhesion strengthening. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100 (2003) 7616-7621

Lebel-Binay, S., Lagaudrière, C., Fradelizi, D., Conjeaud, H. CD82, member of the tetra-span-transmembrane protein family, is a costimulatory protein for T cell activation. *J Immunol.* 155 (1995) 101-110

Lee, J.H., Park, S.R., Chay, K.O., Seo, Y.W., Kook, H., Ahn, K.Y., Kim, Y.J., Kim, K.K. 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 (2004) 4235-4243

Lee, J.H., Seo, Y.W., Park, S.R., Kim, Y.J., Kim, K.K. Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res.* 63 (2003) 7247-7255

Leroy-Dudal, J., Demeilliers, C., Gallet, O., Pauthe, E., Dutoit, S., Agniel, R., Gauduchon, P., Carreiras, F. Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves alphav integrins and the participation of MMP2. *Int J Cancer.* 114 (2005) 531-543

Leroy-Dudal, J., Heyman, L., Gauduchon, P., Carreiras, F. Adhesion of human ovarian adenocarcinoma IGROV1 cells to endothelial cells is partly mediated by the alphav integrins-vitronectin adhesive system and induces an alteration of endothelial integrity. *Cell Biol Int.* 29 (2005) 482-488

Liapis, H., Adler, L.M., Wick, M.R., Rader, J.S. 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 (1997) 443-449

Liu, F.S., Chen, J.T., Dong, J.T., Hsieh, Y.T., Lin, A.J., Ho, E.S., Hung, M.J., Lu, C.H. KAI1 metastasis suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma. *Am J Pathol.* 159 (2001) 1629-1634

Liu, F.S., Dong, J.T., Chen, J.T., Hsieh, Y.T., Ho, E.S., Hung, M.J. Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 78 (2000) 10-15

Liu, F.S., Dong, J.T., Chen, J.T., Hsieh, Y.T., Ho, E.S., Hung, M.J., Lu, C.H., Chiou, L.C. KAI1 metastasis suppressor protein is down-regulated during the progression of human endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 9 (2003) 1393-1398

Liu, L., Wu, D.H., Li, Z.G., Yang, G.Z., Ding, Y.Q. Effects of KAI1/CD82 on biological behavior of human colorectal carcinoma cell line. *World J Gastroenterol.* 9 (2003) 1231-1236

Liu, W.M., Zhang, X.A. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett.* 240 (2006) 183-194

Lozahic, S., Christiansen, D., Manié, S., Gerlier, D., Billard, M., Boucheix, C., Rubinstein, E. CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol.* 30 (2000) 900-907

- Lu, D., Wang, W.X., Xu, Y.Q., Jiang, Q.Y., Yang, Y. [Inhibitory effect of KAI1 gene on breast cancer cell growth in vitro] *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 29 (2007) 580-583
- Maecker, H.T., Todd, S.C., Levy, S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J*. 11 (1997) 428-442
- Malik, F.A., Sanders, A.J., Jiang, W.G. KAI-1/CD82, the molecule and clinical implication in cancer and cancer metastasis. *Histol Histopathol*. 24 (2009) 519-530
- Mas-Moruno, C., Rechenmacher, F., Kessler, H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem*. 10 (2010) 753-768
- Mashimo, T., Bandyopadhyay, S., Goodarzi, G., Watabe, M., Pai, S.K., Gross, S.C., Watabe, K. Activation of the tumor metastasis suppressor gene, KAI1, by etoposide is mediated by p53 and c-Jun genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 274 (2000) 370-376
- Mashimo, T., Watabe, M., Hirota, S., Hosobe, S., Miura, K., Tegtmeyer, P.J., Rinker-Shaeffer, C.W., Watabe, K. The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95 (1998) 11307-11311
- Maurer, C.A., Graber, H.U., Friess, H., Beyermann, B., Willi, D., Netzer, P., Zimmermann, A., Büchler, M.W. Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases. *Surgery*. 126 (1999) 869-880
- Mazia, D., Schatten, G., Sale, W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol*. 66 (1975) 198-200
- Miranti, C.K. Controlling cell surface dynamics and signaling: how CD82/KAI1 suppresses metastasis. *Cell Signal*. 21 (2009) 196-211
- Miyazaki, T., Kato, H., Shitara, Y., Yoshikawa, M., Tajima, K., Masuda, N., Shouji, H., Tsukada, K., Nakajima, T., Kuwano, H. Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 89 (2000) 955-962
- Mizejewski, G.J. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. 222 (1999) 124-138
- Möbus, V., Gerharz, C.D., Press, U., Moll, R., Beck, T., Mellin, W., Pollow, K., Knapstein, P.G., Kreienberg, R. Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 52 (1992) 76-84
- Morino, N., Mimura, T., Hamasaki, K., Tobe, K., Ueki, K., Kikuchi, K., Takehara, K., Kadowaki, T., Yazaki, Y., Nojima, Y. Matrix/integrin interaction activates the mitogen-activated protein kinase, p44erk-1 and p42erk-2. *J Biol Chem*. 270 (1995) 269-273

Moro, L., Venturino, M., Bozzo, C., Silengo, L., Altruda, F., Beguinot, L., Tarone, G., Defilippi, P. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 17 (1998) 6622-6632

Nagira, M., Imai, T., Ishikawa, I., Uwabe, K.I., Yoshie, O. Mouse homologue of C33 antigen (CD82), a member of the transmembrane 4 superfamily: complementary DNA, genomic structure, and expression. *Cell Immunol.* 157 (1994) 144-157

Nakamura, I., Duong, L. T., Rodan, S.B., Rodan, G.A. Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function. *J Bone Miner Metab.* 25 (2007) 337-344

Nakamura, K., Mitamura, T., Takahashi, T., Kobayashi, T., Mekada, E. Importance of the major extracellular domain of CD9 and the epidermal growth factor (EGF)-like domain of heparin-binding EGF-like growth factor for up-regulation of binding and activity. *J Biol Chem.* 275 (2000) 18284-18290

Nichols, T.C., Guthridge, J.M., Karp, D.R., Molina, H., Fletcher, D.R., Holers, V.M. Gamma-glutamyl transpeptidase, an ecto-enzyme regulator of intracellular redox potential, is a component of TM4 signal transduction complexes. *Eur J Immunol.* 28 (1998) 4123-4129

Odintsova, E., Sugiura, T., Berditchevski, F. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol.* 10 (2000) 1009-1012

Odintsova, E., Voortman, J., Gilbert, E., Berditchevski, F. Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *J Cell Sci.* 116 (2003) 4557-4566

Olszyński, K., Zimowska, M. [Structure and function of matrix metalloproteinases] *Postepy Biochem.* 55 (2009) 76-84

Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R., Levy, S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol.* 10 (1990) 4007-4015

Orlando, R.A., Cheresch, D.A. Arginine-glycine-aspartic acid binding leading to molecular stabilization between integrin alpha v beta 3 and its ligand. *J Biol Chem.* 266 (1991) 19543-19550

Price, L.S. Morphological control of cell growth and viability. *Bioessays.* 19 (1997) 941-943

Pytela, R., Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E. 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 USA.* 82 (1985) 5766-5770

Rainaldi, G., Calcabrini, A., Santini, M.T. Positively charged polymer polylysine-induced cell adhesion molecule redistribution in K562 cells. *J Mater Sci Mater Med.* 9 (1998) 755-760

- Ramsay, A.G., Marshall, J.F., Hart, I.R. Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 567-578
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., Geuze, H.J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 183 (1996) 1161-1172
- Reardon, D.A., Fink, K.L., Mikkelsen, T., Cloughesy, T.F., O'Neill, A., Plotkin, S., Glantz, M., Ravin, P., Raizer, J.J., Rich, K.M., Schiff, D., Shapiro, W.R., Burdette-Radoux, S., Dropcho, E.J., Wittemer, S.M., Nippgen, J., Picard, M., Nabors, L.B. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol.* 26 (2008) 5610-5617
- Reuning, U. Integrin $\alpha\beta 3$ promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells by implicating rel transcription factors. *J Cell Biochem.* 112 (2011) 1909-1919
- Ria, R., Vacca, A., Ribatti, D., Di Raimondo, F., Merchionne, F., Dammacco, F. Alpha(v)beta(3) integrin engagement enhances cell invasiveness in human multiple myeloma. *Haematologica.* 87 (2002) 836-845
- Ruoslahti, E., Pierschbacher, M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238 (1987) 491-497
- Ruseva, Z., Geiger, P.X.C., Hutzler, P., Kotzsch, M., Lubber, B., Schmitt, M., Gross, E., Reuning, U. Tumor suppressor KAI1 affects integrin $\alpha\beta 3$ -mediated ovarian cancer cell adhesion, motility, and proliferation. *Exp Cell Res.* 315 (2009) 1759-1771
- Sanderson, C.M., Smith, G.L., Cell motility and cell morphology: how some viruses take control. *Expert Rev Mol Med.* 1 (1999) 1-16
- Schindl, M., Birner, P., Breitenacker, G., Oberhuber, G. Downregulation of KAI1 metastasis suppressor protein is associated with a dismal prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 83 (2001) 244-248
- Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R., Sieg, D.J. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol.* 71 (1999) 435-478
- Schoenwaelder, S.M., Burridge, K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol.* 11 (1999) 274-286
- Schmidt, S., Friedl, P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res.* 339 (2010) 83-92
- Schwartz, I., Seger, D., Shaltiel, S. Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol.* 31 (1999) 539-544

- Seigneuret, M., Delaguillaumie, A., Lagaudrière-Gesbert, C., Conjeaud, H. Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem.* 276 (2001) 40055-40064
- Shattil, S.J., Kim, C., Ginsberg, M.H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11 (2010) 288-300
- Si, S.H., Yang, J.M., Peng, Z.H., Luo, Y.H., Zhou, P. Effects of KAI1 gene on growth and invasion of human hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells. *World J Gastroenterol.* 10 (2004) 2019-2023
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., Schlaepfer, D.D. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 2 (2000) 249-256
- Smith, S.C., Theodorescu, D. Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins. *Nat Rev Cancer.* 9 (2009) 253-264
- Sridhar, S.C., Miranti, C.K. Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. *Oncogene.* 25 (2006) 2367-2378
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., Hemler, M.E. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci.* 28 (2003) 106-112
- Szöllósi, J., Horejsí, V., Bene, L., Angelisová, P., Damjanovich, S. 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 (1996) 2939-2946
- Tagawa, K., Arihiro, K., Takeshima, Y., Hiyama, E., Yamasaki, M., Inai, K. 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 (1999) 970-976
- Takahashi, M., Sugiura, T., Abe, M., Ishii, K., Shirasuna, K. Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD82 affects cancer cell migration. *Int J Cancer.* 121 (2007) 1919-1929
- Takaoka, A., Hinoda, Y., Satoh, S., Adachi, Y., Itoh, F., Adachi, M., Imai, K. Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene.* 16 (1998) 1443-1453
- Takaoka, A., Hinoda, Y., Sato, S., Itoh, F., Adachi, M., Hareyama, M., Imai, K. Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. *Jpn J Cancer Res.* 89 (1998) 397-404
- Takeda, T., Hattori, N., Tokuhara, T., Nishimura, Y., Yokoyama, M., Miyake, M. Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model. *Cancer Res.* 67 (2007) 1744-1749

- Tammela, J., Odunsi, K. Gene expression and prognostic significance in ovarian cancer. *Minerva Ginecol.* 56 (2004) 495-502
- Timpl, R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol.* 8 (1996) 618-624
- Todeschini, A.R., Dos Santos, J.N., Handa, K., Hakomori, S.I. Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105 (2008) 1925-1930
- Tonolini, H., Barrett, J.C. CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? 11 (2005) 563-570
- Vacca, A., Ria, R., Presta, M., Ribatti, D., Iurlaro, M., Merchionne, F., Tanghetti, E., Dammacco, F. $\alpha(v)\beta(3)$ integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. *Exp Hematol.* 29 (2001) 993-1003
- Van der Flier, A., Sonnenberg, A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305 (2001) 285-298
- Van Leeuwen, R.L., Yoshinaga, I.G., Akasaka, T., Dekker, S.K., Vermeer, B.J., Byers, H.R. Attachment, spreading and migration of melanoma cells on vitronectin. The role of $\alpha V \beta 3$ and $\alpha V \beta 5$ integrins. *Exp Dermatol.* 5 (1996) 308-315
- Vicente-Manzanares, M., Choi, C.K., Horwitz, A.R. Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci.* 122 (2009) 199-206
- White, A., Lamb, P.W., Barrett, J.C. Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines. *Oncogene.* 16 (1998) 3143-3149
- Wright, M.D., Henkle, K.J., Mitchell, G.F. An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* worms that closely resembles a human tumor-associated antigen. *J Immunol.* 144 (1990) 3195-3200
- Wu, Q., Ji, Y., Zhang, M.Q., Chen, Y.Q., Chen, F., Shi, D.L., Zheng, Z.H., Huang, Y.J., Su, W.J. Role of tumor metastasis suppressor gene KAI1 in digestive tract carcinomas and cancer cells. *Cell Tissue Res.* 314 (2003) 237-249
- Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L., Arnaout, M.A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$. *Science.* 294 (2001) 339-345
- Xiong, J.P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., Arnaout, M.A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science.* 296 (2002) 151-155
- Xu, J.H., Guo, X.Z., Ren, L.N., Shao, L.C., Liu, M.P. KAI1 is a potential target for anti-metastasis in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol.* 14 (2008) 1126-1132

- Yáñez-Mó, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdés, M., Sánchez-Madrid, F. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* 19 (2009) 434-446
- Yang, J.M., Peng, Z.H., Si, S.H., Liu, W.W., Luo, Y.H., Ye, Z.Y. KAI1 gene suppresses invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells in vitro and in animal models. *Liver Int.* 28 (2008) 132-139
- Yang, X., Wei, L., Tang, C., Slack, R., Montgomery, E., Lippman, M. KAI1 protein is down-regulated during the progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 6 (2000) 3424-3429
- Yang, X., Wei, L.L., Tang, C., Slack, R., Mueller, S., Lippman, M.E. Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res.* 61 (2001) 5284-5288
- Yokota, J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis.* 21 (2000) 497-503
- Yoshida, S., Furukawa, N., Haruta, S., Tanase, Y., Kanayama, S., Noguchi, T., Sakata, M., Yamada, Y., Oi, H., Kobayashi, H. Expression profiles of genes involved in poor prognosis of epithelial ovarian carcinoma: a review. *Int J Gynecol Cancer.* 19 (2009) 992-997
- Yu, Y., Yang, J.L., Markovic, B., Jackson, P., Yardley, G., Barrett, J., Russell, P.J. Loss of KAI1 messenger RNA expression in both high-grade and invasive human bladder cancers. *Clin Cancer Res.* 3 (1997) 1045-1049
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., Geiger, B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol.* 9 (2007) 858-867
- Zhang, X.A., Bontrager, A.L., Hemler, M.E. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem.* 276 (2001) 25005-25013
- Zhang, X.A., He, B., Zhou, B., Liu, L. Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration. *J Biol Chem.* 278 (2003) 27319-27328
- Zhang, X.A., Lane, W.S., Charrin, S., Rubinstein, E., Liu, L. EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 63 (2003) 2665-2674
- Zhao, X., Guan, J.L. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 63 (2011) 610-615
- Zheng, D.Q., Woodard, A.S., Tallini, G., Languino, L.R. Substrate specificity of alpha(v)beta(3) integrin-mediated cell migration and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation. *J Biol Chem.* 275 (2000) 24565-24574

Zhou, B., Liu, L., Reddivari, M., Zhang, X.A. The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity. *Cancer Res.* 64 (2004) 7455-7463

5.2 Monographien

Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.), „Krebs in Deutschland 2007/2008. Häufigkeiten und Trends“, Berlin, 8. Ausgabe, 2012

Stefan Wilhelm, Bernhard Gröbler, Martin Gluch, Hartmut Heinz, „Confocal laser scanning microscopy principles“ Carl Zeiss Jena GmbH, ohne Datumsangabe

5.3 Buchbeiträge

Gladson, C.L., Cheresh, D.A. The αv integrins. In: „Integrins, the Biologic Problem“ Takada, Y. (Hrsg.) Orlando, FL, CRC Press, 1994, 83-99

Jonat, W., Bauerschlag, D., Schem, C., Maa-Poppenhusen, K., Maass, N., Löning, M., Friedrich, M., Lehmann-Willenbrock, E., Bonatz, G., Pfisterer, J., Schollmeyer, T., Kiechle, M., Maligne Ovarialtumoren. In: „Gynäkologie & Geburtshilfe“ Diedrich, K., Holzgreve, W., Jonat, W., Schultze-Mosgau, A., Schneider, K.-T. M., Weiss, J.M. (Hrsg.), Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007, 2. Auflage, 249-255

Pfleiderer, A., Maligne Tumoren der Ovarien. In: „Gynäkologie und Geburtshilfe. Sicher durch Studium und Praxis“ Pfleiderer, A., Breckwoldt, M., Martius, G. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 2002, 4. korrigierte Auflage, 209-216

Göttlinger, C., Mechtold, B., Radbruch, A., Chapter 1: Operation of a Flow Cytometer, Chapter 3: Immunofluorescence: Basic Considerations. In: „Flow Cytometry and Cell sorting“, Radbruch, A. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2000, 2.Auflage, 1-28 und 38-52

Sachs, L., Prüfgröße des Wilcoxon-Mann-Whitney Tests: Vergleich zweier unabhängiger Stichproben. In: „Angewandte Statistik“, Sachs, L. Springer Verlagsgesellschaft, Berlin-Heidelberg-New York, 2004, 11. Auflage, 383-393

Schmalfeldt, B., Maligne epitheliale Ovarialtumoren. In: „Gynäkologie und Geburtshilfe“ Kiechle, M. (Hrsg.), Elsevier GmbH Urban & Fischer, München, 2007, 1.Auflage, 541-547

5.4 Internet-Quellen

Bastmeyer (1999-2001) Molekulare Zusammensetzung der Zell/Substratkontakte auf strukturierten Oberflächen (<http://www.uni-konstanz.de/sfb513/reports/1999-2001/B07.pdf>) Stand: 15.6.2011

MatTek Corporation (2004) Glass Bottom Culture Dishes (<http://www.glass-bottom-dishes.com/german/index.html>) Stand: 20.12.2011

Sony Insider (2011) Sony Acquires iCyt And Officially Enters Flow Cytometry Business (<http://www.sonyinsider.com/2010/02/12/sony-acquires-icyt-and-officially-enters-flow-cytometry-business/>) Stand: 20.12.2011

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ute Reuning, Klinische Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität München, für die interessante Themenstellung, die fachlich kompetente, unermüdlich freundliche und geduldige Beratung und Begleitung über den gesamten Zeitraum meiner Arbeit. Besonders ihre stetige Erreichbarkeit und Bereitschaft schnell zu helfen waren dabei eine große Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Marion Kiechle und Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit an der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität München anfertigen zu können.

Für die positive Arbeitsatmosphäre in den Laboratorien der Frauenklinik sowie die fachkundige Einführung in die praktische Laborarbeit und Unterstützung wann immer möglich und nötig danke ich Frau Anke Benge und Frau Claudia Abou-Ajram.

Große Teile der experimentellen Arbeit wurden am Institut für Pathologie am Helmholtz Zentrum München angefertigt. Für die freundliche Bereitstellung des CLSM dort danke ich Herrn Prof. Dr. Heinz Höfler, Direktor des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München. Für die nette, unkomplizierte und sehr hilfreiche Betreuung und Unterstützung vor Ort danke ich Herrn Prof. Dr. Axel Walch, sowie Herrn Dr. Peter Hutzler. Frau Prof. Dr. Birgit Luber und Frau Dr. Joëlle Deplazes möchte ich für die Einarbeitung in die Arbeit mit dem CLSM und in die Auswertung der dort gewonnenen Daten danken.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Dr. Matthias Kotzsch vom Institut für Pathologie der Technischen Universität Dresden für die hilfreichen Ratschläge bei der statistischen Auswertung der Daten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung meiner Ausbildung und ihre beständige Unterstützung und Förderung bedanken.