

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Prof. Dr. Andreas K. Engel

Die Bedeutung von Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ für das Tumorwachstum und die Metastasierung von humanen Osteosarkomzellen in vitro und in vivo

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Linda Poschmann
aus Dortmund

Hamburg 2022

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: **23.03.2023**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: **PD Dr. Ursula Valentiner**

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: **Prof. Dr. Ralf Oheim**

1	Inhaltsverzeichnis	
1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Arbeitshypothese und Fragestellung	6
3	Einleitung	7
3.1	Das Osteosarkom.....	7
3.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	7
3.1.2	Klinik, Diagnostik und Therapie	8
3.1.3	Prognose	9
3.2	Die Metastasierungskaskade	9
3.3	Integrine	12
3.3.1	Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$	14
4	Material und Methoden.....	17
4.1	Geräte und Materialien.....	17
4.2	Zelllinie	17
4.3	shRNA ITG $\alpha 5$ und ITG $\beta 1$ Transfektion und Selektion.....	17
4.4	Zellkultur.....	17
4.5	Zellzählung.....	18
4.6	Durchflusszytometrie.....	18
4.7	Zellproliferation.....	20
4.8	Kolonieformation und Morphologie.....	21
4.9	Migration	22
4.10	Invasion.....	22
4.11	Statische Adhäsion	23
4.12	Flussversuch.....	23
4.13	Xenograft Mausmodell	24
4.14	Tierhaltung	25
4.15	DNA-Isolation.....	25

4.16	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	26
4.17	ALU-PCR	26
4.18	Histologie	28
4.18.1	Herstellung der histologischen Schnittpräparate	28
4.18.2	Histologische Färbungen.....	29
4.19	Statistische Auswertung.....	32
5	Ergebnisse	34
5.1	Untersuchung der Oberflächenmoleküle	34
5.2	Proliferationsverhalten in vitro	36
5.3	Kolonieformation	38
5.4	Das Migrationsverhalten der Osteosarkomzellen in vitro	39
5.5	Das Invasionsverhalten der Osteosarkomzellen in vitro.....	41
5.6	Das Verhalten der Zellen unter Flussbedingungen	43
5.7	Das statische Adhäsionsverhalten auf Fibronektin.....	44
5.8	Untersuchungen am Mausmodell.....	45
5.8.1	Untersuchung der Lebensdauer und des Tumorwachstums	45
5.8.2	Proliferationsmarker Ki-67	47
5.8.3	Mikroskopische Untersuchung der Lungenmetastasen	48
5.8.4	Quantitative DNA-Untersuchung der Lungen auf Metastasen	50
5.8.5	Quantitative DNA-Analyse des Blutes	51
6	Diskussion.....	52
7	Zusammenfassung.....	60
8	Summary.....	61
9	Abkürzungsverzeichnis	62
10	Quellenverzeichnis	64
11	Danksagung	71
12	Lebenslauf.....	73

13 Eidesstattliche Versicherung 74

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Osteosarkom ist der häufigste primäre Knochentumor des Menschen. Obwohl in der Krebsforschung insgesamt große Fortschritte erzielt werden, sterben immer noch 30 % der betroffenen Patient:innen an einem Osteosarkom. Wie bei vielen anderen Tumorerkrankungen stellt die Metastasierung auch beim Osteosarkom einen entscheidenden prognostischen Faktor dar.

In dieser Arbeit wird die Bedeutung der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ für das Proliferations- und Metastasierungsverhalten des Osteosarkoms genauer untersucht, um einen möglichen Angriffspunkt für neue Medikamente zur Behandlung dieser Erkrankung zu identifizieren.

Integrine sind heterodimere Glykoproteine, die eine entscheidende Rolle für das Überleben und bei der Migration von Zellen spielen. Integrine vermitteln die Adhäsion von Zelle zu Zelle und zur extrazellulären Matrix und sind an der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation beteiligt. Eine funktionierende Interaktion mit der extrazellulären Matrix ist für das Überleben der Zellen essentiell (Ganguly et al., 2013). In Tumorzellen können Integrine im Zusammenspiel mit verschiedenen Wachstumsfaktoren die unkontrollierte Proliferation und Migration der Tumorzellen erleichtern. Die protumoralen Eigenschaften des Integrin $\alpha 5\beta 1$ wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten für andere Krebsentitäten beschrieben (Hou et al., 2020). Unter anderem hat das Integrin $\alpha 5\beta 1$ proangiogene Eigenschaften, die bei einer Hemmung therapeutisch genutzt werden können.

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden wie ein Integrin $\alpha 5$ - und Integrin $\beta 1$ -Knockdown sich auf die Proliferation, die Migration und die Invasion der Osteosarkomzellen *in vitro* auswirkt und was dieser für das Tumorstadium und die Metastasierung im Mausmodell (*in vivo*) bedeutet.

3 Einleitung

3.1 Das Osteosarkom

Knochtumoren gehören zu den eher seltenen Tumoren des Menschen. Insgesamt machen sie weniger als 1 % aller diagnostizierten Krebserkrankungen aus (Ferguson & Turner, 2018). Im Kindes- und Jugendalter haben maligne Knochtumoren mit einem Anteil von 5 % jedoch eine größere Bedeutung (Erdmann et al., 2020). Während bei den Erwachsenen vor allem Chondrosarkome und Osteosarkome vorkommen, sind es im Kindes- und Jugendalter überwiegend Ewing-Sarkome und Osteosarkome (Ferguson & Turner, 2018).

Jungen sind etwas häufiger betroffen als Mädchen (Erdmann et al., 2020). Der Anteil, der an Knochtumoren verstorbenen Kinder und Jugendlichen von allen durch Krebserkrankungen verstorbenen Kindern lag im Jahr 2012 bei 10,6 % (Jungen) / 9,8 % (Mädchen) (Schmidt et al., 2017). Aufgrund dieser verhältnismäßig hohen Mortalität kommt den Knochtumoren, trotz der eher geringen Inzidenz, klinisch eine bedeutende Rolle zu. Der Bedarf erkrankte Kinder in Zukunft noch besser therapieren und heilen zu können, ist groß.

Das Osteosarkom ist der häufigste maligne Knochtumor des Menschen. Charakteristisch ist die Produktion von extrazellulärem Tumorosteoid. Bevorzugt befallen sind die Metaphysen der langen Röhrenknochen, wobei mehr als 50 % der Osteosarkome im Bereich des Kniegelenks auftreten (Yiallourous & Tallen, 2022).

3.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Osteosarkom tritt vor allem bei Kindern und Jugendlichen in der zweiten Lebensdekade auf. Eine zweite, kleinere Inzidenzspitze findet sich bei älteren Menschen über 60 Jahren (Corre et al., 2020). Die Inzidenz in Deutschland liegt bei etwa 4 Erkrankungen je 1 Millionen Einwohner pro Jahr (Yiallourous & Tallen, 2022). In 15-20 % der Fälle ist bei Diagnosestellung bereits eine Metastasierung erfolgt (Dürr et al., 2017). Die genauen Ursachen der Entstehung eines Osteosarkoms sind noch unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Osteosarkomzellen ihren Ursprung in mesenchymalen Stammzellen und/oder in differenzierteren osteoblastischen Vorläuferzellen haben (Corre et al., 2020). Bestimmte

Keimbahnmutationen, vorangegangene Strahlen- oder Chemotherapie oder ein Morbus Paget erhöhen das Risiko, an einem Osteosarkom zu erkranken (Dürr et al., 2017). Außerdem besteht im Rahmen einiger Syndrome, wie z. B. dem Li-Fraumeni-Syndrom oder dem Bloom-Syndrom, eine genetische Prädisposition, die mit einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen einhergeht und somit das Risiko für das Auftreten eines Osteosarkoms erhöht (Corre et al., 2020).

Das Osteosarkom ist sowohl auf intratumoraler Ebene als auch zwischen betroffenen Individuen sehr heterogen. Dementsprechend ist es schwer, gemeinsame biologische Prozesse der Osteosarkomgenese zu identifizieren (Corre et al., 2020).

3.1.2 Klinik, Diagnostik und Therapie

Das Osteosarkom äußert sich meistens durch lokale Schmerzen und Schwellung. In einigen Fällen ist eine pathologische Fraktur das erste Symptom der Erkrankung. Später können Allgemeinsymptome wie Fieber, Gewichtsverlust oder Leistungsschwäche dazu kommen (Yiallourous & Tallen, 2022).

Bei Verdacht auf ein Osteosarkom muss nach ausführlicher Anamnese und körperlicher Untersuchung ein Röntgenbild der betroffenen Region erstellt werden. Erhärtet sich der Verdacht, wird zur Ausbreitungsdiagnostik eine Magnetresonanztomographie angeschlossen. Zur Diagnosesicherung ist eine Biopsie des Tumors unabdingbar.

Aufgrund einer frühen mikrometastatischen Ausbreitung führt eine radikale Operation allein nur selten zur Heilung der Erkrankten (Lilienthal & Herold, 2020). Eine neoadjuvante Chemotherapie, operative Tumorsektion und anschließende Chemotherapie stellen aktuell die Therapie der Wahl dar. Strahlentherapeutische Maßnahmen sind eine Seltenheit (Yiallourous & Tallen, 2022).

Die meisten Osteosarkome im Kindesalter sind hochmaligne, da sie schnell wachsen und frühzeitig Metastasen bilden (Yiallourous & Tallen, 2022). Metastasen des Osteosarkoms findet man zum Großteil (80-90 %) in der Lunge (Dürr, 2014). Seltener metastasiert das Osteosarkom in das Skelettsystem. Bei fehlenden sichtbaren Metastasen muss dennoch in etwa 80 % der Fälle von einer bereits erfolgten Mikrometastasierung ausgegangen werden (Dürr et al., 2017). Dementsprechend erleiden auch nach erfolgreicher Therapie 20-40 % der

Patient:innen ein Rezidiv. Dies macht deutlich, wie entscheidend die Metastasierung bei der Prognose des Osteosarkoms ist (Yiallourous & Tallen, 2022).

3.1.3 Prognose

Die Prognose des Osteosarkoms hängt, wie bei fast allen Tumorerkrankungen, zum einen von der Lage, Größe und Ausbreitung des Primärtumors bei Diagnosestellung ab, zum anderen sind die Operabilität und das Ansprechen auf die Chemotherapie entscheidend. Kinder und Jugendliche haben eine deutlich höhere Überlebensrate als ältere Menschen, die an einem Osteosarkom erkrankt sind. Insgesamt können heute bei betroffenen Kindern und Jugendlichen Langzeit Überlebensraten von über 70 % erreicht werden (Yiallourous & Tallen, 2022).

Anders als bei vielen anderen pädiatrischen Tumorerkrankungen hat die empirische Intensivierung der Behandlung von Osteosarkomen in den letzten vier Jahrzehnten jedoch nicht zu einer wesentlichen Verbesserung der Überlebensraten geführt (Lilienthal & Herold, 2020). Nach wie vor überleben 30 % der erkrankten Patient:innen nicht, so dass weiterhin Bedarf besteht, die Diagnostik und die Therapie des Osteosarkoms zu verbessern und somit auch die Prognose für betroffene Patient:innen.

3.2 Die Metastasierungskaskade

Die Metastasierung, also die Ausbreitung von Tumorzellen aus dem Primärtumor in ein anderes, entferntes Gewebe, stellt die größte Bedrohung für Patient:innen mit malignen Tumoren dar. Etwa 90 % der krebisbedingten Todesfälle sind auf Metastasen zurückzuführen (Lambert et al., 2017).

Mittlerweile weiß man, dass die Metastasierung hauptsächlich als sequenzieller, mehrstufiger Prozess erfolgt, der als Invasions-Metastasierungskaskade bezeichnet wird (Lambert et al., 2017).

Ein entscheidender Schritt für die Metastasierung epithelialer Tumoren ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die eine Invasion und letztendlich eine Metastasierung epithelialer Tumorzellen ermöglicht (Lambert et al., 2017). Sie verleiht benignen und malignen Epithelzellen Eigenschaften wie eine erhöhte Motilität, Invasivität und die Fähigkeit extrazelluläre Matrix (ECM) abzubauen, die

wichtig für das metastatische Potenzial von Zellen sind (Lambert et al., 2017). Die EMT ist jedoch kein irreversibler, unidirektionaler Prozess, sondern kann vielmehr als fließender Übergang verschiedener Eigenschaften der Zellen angesehen werden (Kahlert et al., 2017). Da es sich um einen bidirektionalen Prozess handelt, können Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie die hier betrachteten Osteosarkomzellen, auch eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) durchlaufen und so epitheliale Eigenschaften erwerben (Kahlert et al., 2017). Man geht mittlerweile davon aus, dass Sarkome, also Tumoren mesenchymalen Ursprungs, einen metastabilen Phänotyp aufweisen können, der es ihnen ermöglicht zwischen epithelialer und mesenchymaler Differenzierung zu wechseln und sich somit sowohl die beweglichen-invasiven Eigenschaften des mesenchymalen, als auch die sessilen-proliferativen Eigenschaften des epithelialen Phänotyps zunutze zu machen (Sannino et al., 2017). Für die Invasion und Metastasierung von mesenchymalen Tumoren, wie den Osteosarkomen, spielt die Aufrechterhaltung eines definierten mesenchymalen Status eine bedeutende Rolle (Sannino et al., 2017; Yu et al., 2021).

Um invasiv wachsen zu können, müssen Signalwege aktiviert werden, die die Zytoskelett-Dynamik ändern und Zell-Matrix- sowie Zell-Zell-Kontakte auflösen, gefolgt von der aktiven Wanderung in das umliegende Gewebe (Friedl & Alexander, 2011). Der Verlust des Zelladhäsionsglykoproteins E-Cadherin führt zur Lockerung interzellulärer Verbindungen, und eine vermehrte Expression bestimmter Proteasen, insbesondere der Matrix-Metalloproteasen (MMP), zum Abbau umliegender ECM (Kahlert et al., 2017).

Die Intravasation stellt den nächsten Schritt der Metastasierungskaskade dar. In die Blutgefäße eingewanderte Tumorzellen müssen im Blutstrom überleben, ohne von Immunzellen erkannt und getötet zu werden. Um sich vor oxidativem Stress und der körpereigenen Abwehr durch Leukozyten zu schützen, bilden die zirkulierenden Tumorzellen einen Schutzmantel aus Thrombozyten und Fibrin, einen sogenannten Tumorzellembolus (Moch et al., 2019). Zirkulierende Tumorzellen (CTC) müssen die Gefäße anschließend wieder verlassen, um Fernmetastasen bilden zu können. Für eine erfolgreiche Extravasation sind die Adhäsion an das Gefäßendothel und das Durchwandern der Gefäßwand erforderlich. Interaktionen zwischen zirkulierenden Tumorzellen und Endothelzellen zur Bindung und Arretierung an den

Blutgefäßen sind ein notwendiger Schritt bei der Bildung einer Metastase. Viele Studien über Tumorzell-Endothelzell-Interaktionen basieren dabei auf dem Modell der Leukozyten Extravasation während einer Entzündungsreaktion (Strell & Entschladen, 2008; Zarbock & Ley, 2008). Die initialen Interaktionen werden maßgeblich durch Selektine vermittelt (McEver, 2015). Selektine sind calciumabhängige Typ I-Transmembranproteine, die entsprechend ihrer zellulären Lokalisation in drei Typen eingeteilt werden. Man unterscheidet Endothel- (E-), Thrombozyten- (P-) und Lymphozyten- (L-) Selektine. Die Interaktion des E-Selektins mit seinen Liganden vermittelt das Rollen der Zellen auf der Endotheloberfläche und aktiviert über verschiedene Signalkaskaden leukozytäre Integrine (McEver & Zhu, 2010; Zarbock & Ley, 2008). Diese sind den Selektinen nachgeschaltet und bewirken über eine Integrin/Rezeptor (z. B. ITGβ1/VCAM-1 oder ITGβ2/ICAM-1) vermittelte Kaskade die Festigung der Adhäsion und das Öffnen der Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen, so dass Leukozyten bzw. zirkulierende Tumorzellen das Endothel durchwandern können (Orr et al., 2000). Die Relevanz von E-/P-Selektin für die Metastasierung von Tumorzellen ist allerdings abhängig von der Tumorentität. Einige Tumorzellen bilden auch selektinunabhängig Metastasen (Khaustova et al., 2017; Lange et al., 2014), so dass hier voraussichtlich nachgeschaltete Integrine von Bedeutung sind.

Nach der Transmigration in das umliegende Gewebe, müssen die Zellen auf eine geeignete Umgebung treffen, in der sie überleben und proliferieren können. Diese passende Mikroumgebung bezeichnet man als prä-metastatische Nische, in der disseminierte Tumorzellen vorerst in einem Ruhezustand, der sogenannten "Tumor dormancy", überleben können und sich ggf. später vermehren (Gomatou et al., 2021). Als disseminierte Tumorzellen (DTC) bezeichnet man die zuvor zirkulierenden Tumorzellen, die den Blutkreislauf verlassen und sich in einem anderen Organ abgesiedelt haben (Gómez-Cuadrado et al., 2017). Entscheidend für eine Metastasen fördernde Umgebung sind auch die den Tumor umliegenden Zelltypen, wie z. B. Endothelzellen, Makrophagen oder Fibroblasten, die die Zusammensetzung der jeweiligen extrazellulären Matrix beeinflussen und bestimmte molekulare Marker exprimieren können, sowie die Ausstattung der Tumorzelloberfläche mit spezifischen Rezeptoren und Oberflächenmolekülen. Aus

klinischen Untersuchungen weiß man, dass viele Tumoren in bestimmte Organe präferiert metastasieren (Moch et al., 2019).

Haben die Tumorzellen in einem entfernt liegenden Organ eine passende Mikroumgebung gefunden, so entstehen kleinste Tumorzellabsiedlungen, sogenannte Mikrometastasen. Diese Mikrometastasen sind mit den üblichen bildgebenden Verfahren noch nicht nachweisbar. Um zu größeren Metastasen zu wachsen, müssen die Tumorzellen proliferieren und Blutgefäße in die Metastase einwachsen, da bei unzureichender Angiogenese die Tumorzellen nicht ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden und absterben (Gómez-Cuadrado et al., 2017).

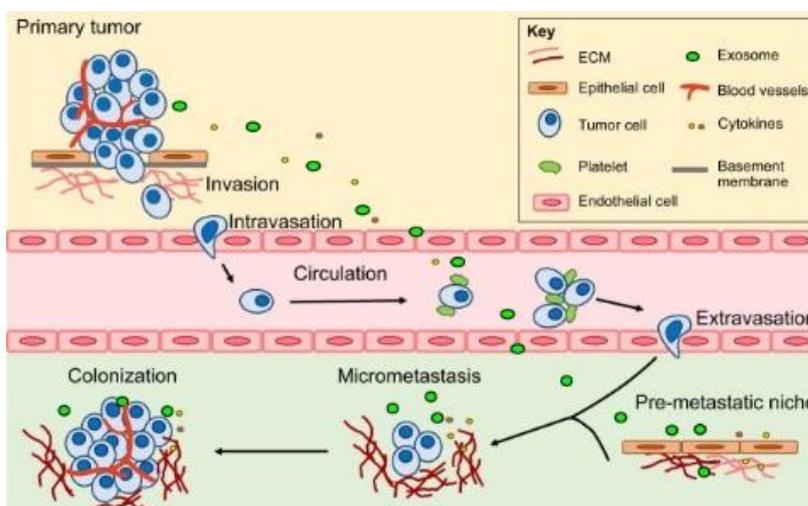


Abbildung 1: Die Metastasierungskaskade; Quelle: Gómez-Cuadrado et al., 2017.

3.3 Integrine

Integrine bilden eine Gruppe von heterodimeren, transmembranösen Zelloberflächen-Rezeptoren, die aus je einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Bei Säugetieren sind 18 verschiedene α - und 8 verschiedene β -Untereinheiten bekannt, die mindestens 24 verschiedene, funktionale heterodimere Rezeptoren bilden (Humphries et al., 2006). Integrine interagieren mit verschiedenen Liganden der ECM oder bestimmten Zelladhäsionsmolekülen und fungieren als wichtige Bindeglieder zwischen Zellen und der ECM. Intrazellulär sind Integrine über Verbindungproteine wie Vinculin, α -Aktinin oder Talin mit dem Zytoskelett verbunden (Takada et al., 2007).

Im Gesunden kommt den Integrinen eine Schlüsselrolle in der Gewebsintegrität, der Zellmigration und der Ausdifferenzierung von Zellen zu (Humphries et al., 2006).

Durch ihre heterodimere Struktur und zytoplasmatische Signale („inside-out signaling“) wird die Affinität einzelner Integrine zu ihren Liganden streng reguliert (Takada et al., 2007). Andersherum induziert eine extrazelluläre Ligandenbindung eine intrazelluläre Konformationsänderung und löst somit intrazelluläre Signalwege aus („outside-in signaling“) (Takada et al., 2007). Dieser Fähigkeit der Integration von extrazellulären Signalen ins Zellinnere verdanken die Integrine ihren Namen (Stewart & O'Connor, 2015).

Integrine können in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Man unterscheidet Leukozyten spezifische Integrine, Kollagen- oder Laminin-bindende Integrine und Integrine mit einer RGD-Bindungsstelle (siehe Abbildung 3) (Hynes, 2002). Der extrazelluläre Teil dieser Integrine trägt eine allgemeine Bindungsstelle für Liganden, die die Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz (RGD-Sequenz) tragen, wobei einzelne Integrine spezifisch für bestimmte Proteinliganden sind (Takada et al., 2007). Das RGD-Motiv von Fibronectin wird beispielsweise von mindestens drei wichtigen Integrinen erkannt ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 11\beta 3$) (Schaffner et al., 2013).

Integrine spielen eine bedeutende Rolle bei zahlreichen Schritten der Metastasierungskaskade maligner Tumorzellen. Die Bindung der Tumorzellen an die ECM des Ausgangsgewebes mittels Integrinen, aber auch die Integrinexpression in Gefäßen oder in möglichen entfernten Geweben bestimmt entscheidend mit, ob und wo Tumorzellen mögliche Neuabsiedlungen etablieren können (Ganguly et al., 2013).

Zudem geht man davon aus, dass die Stammzeleigenschaften und die Therapieresistenz eines Tumors vom Expressionsmuster seiner Integrine beeinflusst werden kann (Seguin et al., 2015). Schaffner et al. (2013) konnten zeigen, dass sich das Expressionsmuster der Integrine spezieller solider Tumoren von dem der gesunden Ausgangsgewebe unterscheidet und diese Tumoren bestimmte Integrine überexprimieren.

Da die meisten Krebspatient:innen aufgrund der Metastasierung versterben, und Integrine eine entscheidende Rolle im Metastasierungsprozess der Tumorzellen spielen, kommt den Integrinen in der Grundlagenforschung eine große Bedeutung zu.

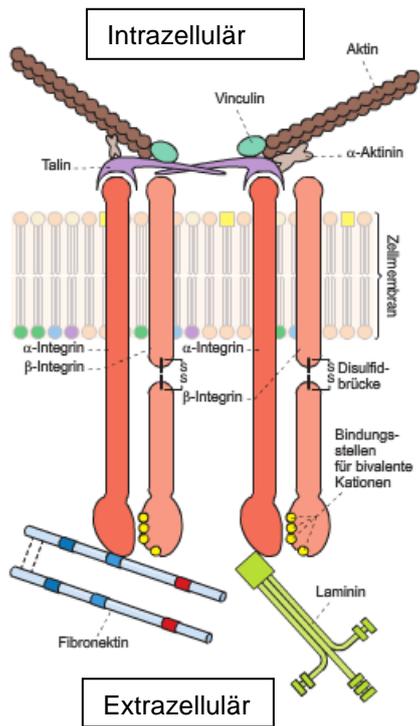


Abbildung 2: Aufbau der Integrine; Quelle: Welsch & Kummer, 2018.

3.3.1 Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$

Das Integrin $\alpha 5$ bildet nach aktuellem Wissensstand lediglich ein Heterodimer mit dem Integrin $\beta 1$, wohingegen das Integrin $\beta 1$ mit verschiedenen α - Untereinheiten heterodimere Integrine bildet. Die verschiedenen Bindungspartner der Integrine und die zentrale Rolle des $\beta 1$ -Integrin zeigt Abbildung 3.

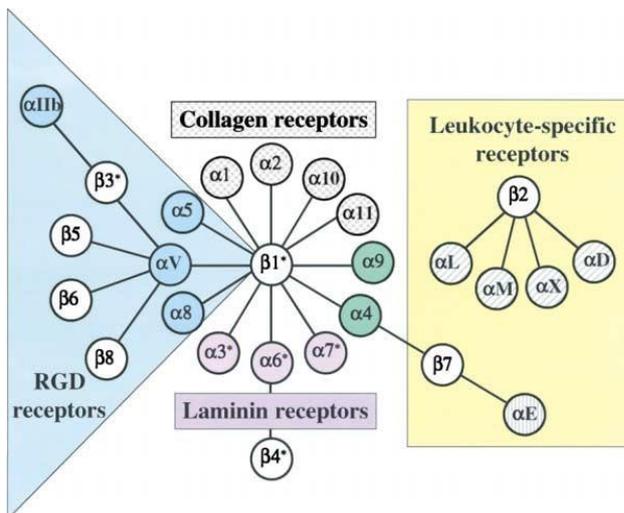


Abbildung 3: Bindungspartner und Untergruppen der verschiedenen Integrine. Die zentrale Rolle des Integrin $\beta 1$ wird aufgrund seiner zahlreichen Bindungspartner deutlich. Quelle: (Hynes, 2002).

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das Integrin $\beta 1$ eine wichtige Rolle in der Metastasierungskaskade spielt. Chen et al. (2016) konnten die besondere Rolle des Integrin $\beta 1$ in der Paravasationsphase des Metastasierungsprozesses aufzeigen. Sie konnten zeigen, dass das Integrin $\beta 1$ in Tumorzellen insbesondere für die Durchbrechung der endothelialen Basalmembran benötigt wird (Chen et al., 2016).

Das Heterodimer aus den Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$ bildet den Fibronektin-Rezeptor. Für die hohe Spezifität von Integrin $\alpha 5\beta 1$ zu Fibronektin ist die α -Untereinheit verantwortlich (Schaffner et al., 2013). Zudem sorgt die Kombination aus einer primären Interaktion der RGD-Stelle und einer sekundären Interaktion mit der Synergiestelle (Pro-His-Ser-Arg-Asn) des Fibronektins neben einer hohen Affinität auch für eine hohe Spezifität von Integrin $\alpha 5\beta 1$ für Fibronektin (Schaffner et al., 2013).

Fibronektin ist ein Glykoprotein und Bestandteil der extrazellulären Matrix. Es ist einerseits als Plasmafibronektin an der Blutgerinnung und Wundheilung beteiligt, andererseits als fibrilläres Fibronektin Bindungspartner der Integrine und wichtig bei der Führung von wandernden Zellen in der Embryonalzeit (Welsch & Kummer, 2018). Für die Migration der Zellen im Rahmen der Morphogenese und Wundheilung, spielt die chemotaktische Wirkung des Fibronektins eine wichtige Rolle (Wagener & Müller, 2010).

Als gesichert gilt die Beteiligung von Integrin $\alpha 5\beta 1$ an der physiologischen Angiogenese (Schaffner et al., 2013). Immer mehr Daten zeigen auch eine Beteiligung von Integrin $\alpha 5\beta 1$ an der tumoralen Neoangiogenese (Schaffner et al., 2013). Man weiß, dass Prozesse wie Migration, Invasion, Proliferation und das Überleben von Zellen über die bidirektionale Integrin-Signalübertragung reguliert werden, was wiederum ein Regulator für das Wachstum und die Metastasierung von Tumorzellen ist (Schaffner et al., 2013).

Neben Fibronektin bindet Integrin $\alpha 5\beta 1$ auch an Osteopontin, einen Bestandteil der Knochenmatrix (Humphries et al., 2006). Osteopontin ist ein Phosphoprotein, das zur Familie der Zellmatrixproteine gehört, und kleine Integrin-bindende, N-gebundene Glykoproteine enthält. Es ist unter anderem an Proliferation, Migration und Adhäsion knochenverwandter Zellen beteiligt und steht nachweislich im

Zusammenhang mit knochenbezogenen Erkrankungen wie der Osteoporose, der rheumatoiden Arthritis und dem Osteosarkom (Si et al., 2020).

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Materialien

Verwendete Materialien, Kits und Geräte werden im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode aufgeführt.

4.2 Zelllinie

Für alle Versuche dieser Arbeit wurden humane Osteosarkomzellen der Linie HOS verwendet. Die Zellen stammen aus der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf.

4.3 shRNA ITG α 5 und ITG β 1 Transfektion und Selektion

Der ITG α 5 und ITG β 1 Knockdown in den HOS Zellen (HOS shITG α 5 und shITG β 1) wurde über RNA-Interferenz mittels shRNA hergestellt. Die Herstellung der Viren und die Transduktion wurden von der Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie (Prof: Boris Fehse / PD Dr. Kristoffer Riecken, Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, UKE) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt (Schwankhaus et al., 2014; Weber et al., 2010; Weber et al., 2012).

4.4 Zellkultur

Die Kultivierung der verwendeten Zellen der Linie HOS erfolgte in T25 oder T75 Zellkulturflaschen (Sarstedt, Newton, USA) unter standardisierten Bedingungen (37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) in RPMI Medium (Gibco/Life Technologies, Karlsruhe, Germany) unter Zugabe von 10 % Hitze-inaktiviertem fetalen Rinderserum (FBS, Gibco), 2 mM L-Glutamine (Gibco), 250 μ l Puromycin (Sigma, Steinheim, Germany), 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin (Gibco).

Die Zellen wurden regelmäßig mit dem VenorGeM®-Mycoplasma Detection Kit (Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Germany) auf Mykoplasmen getestet.

Alle 2 Tage erfolgte eine lichtmikroskopische (Zeiss, Jena, Germany) Kontrolle des Zellwachstums. Bei ca. 70 %iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert, was ca. alle 4-5 Tage erforderlich war.

Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Kulturflasche mit 5-10 ml PBS-Puffer (Gibco by life technologies, Carlsbad, USA) gespült und anschließend wieder abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 4-5 ml 0,05 %-Trypsin-0,02 % EDTA (Gibco, Paisley, GB) 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch hinzupipettieren von 4-5 ml RPMI Medium wurde die Trypsinierung gestoppt. 1 ml der Zellsuspension wurde in eine neue T75 Kulturflasche mit 12-15 ml bereits vorgelegtem Medium überführt.

Medium, Puffer und Trypsin wurden zuvor im Wasserbad vorgewärmt. Die neu angelegte Kulturflasche wurde wieder unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Die nicht mehr benötigte Zellsuspension wurde entsorgt.

4.5 Zellzählung

Das Zählen der Zellen erfolgte unter einem Lichtmikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Germany). Hierzu wurden 10 µl Zellsuspension in 90 µl PBS-Puffer verdünnt. 10 µl der verdünnten Zellsuspension wurden unter ein Deckgläschen auf die Zählkammer pipettiert und anschließend alle 4 Quadrate ausgezählt (Summe = n). Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl } n}{4} \times 10^5$$

4.6 Durchflusszytometrie

Um von den Tumorzellen exprimierte Zelladhäsionsmoleküle mittels Durchflusszytometrie zu untersuchen, wurden die Zellen, wie oben beschrieben trypsiniert (4 ml Trypsin, 4 ml RPMI Medium). Diese Zellsuspension wurde auf die benötigte Anzahl von Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf Safe-Lock Tubes,

Eppendorf AG, Hamburg, Germany) verteilt und anschließend zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellpellets auf Eis zwischengelagert.

Die Antikörper und die jeweiligen Isotypkontrollen wurden in 100 µl FACS Puffer (500 ml PBS (Gibco) + 1 % BSA (Bovine Serum Albumin; GE Healthcare, Pasching, Österreich) + 0,05 % NaN₃) auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml gelöst. Bei den meisten Antikörpern entsprach dies einem Verhältnis von 1:100. Mit dieser Puffer-Antikörper-Mischung wurden die Zellpellets resuspendiert und anschließend für 20 Minuten bei Dunkelheit auf Eis inkubiert.

Die inkubierte Lösung wurde mit 2 ml FACS Puffer in FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) gegeben.

Es wurden folgende kommerzielle Antikörper genutzt:

CD24 [eBioSN3, eBioscience, Waltham, USA], CD44 [B-F24, Diaclone, Besancon Cedex, France], ITGα4 [9F10, BioLegend, London, UK], ITGα5 [P1D6, eBioscience], ITGαV [NKI-M9, BioLegend], ITGβ1 [TS2/16, eBioscience], ITGβ2 [TS1/18, BD Bioscience, Heidelberg, Germany], ITGβ3 [VI-PL2], ITGβ7 [473207, R&D], ALCAM [105902, R&D systems], ICAM-1 [HA58, eBioscience].

Die Antikörper waren mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) oder R-Phycoerythrin (PE) gekoppelt.

Zum Nachweis der Selektinbindung wurden rekombinante humane Fc-Selektin-Chimäre eingesetzt (Recombinant Human P- and recombinant Human E-Selectin/Fc Chimera, R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA), die durch biotinylierte Sekundärantikörper und Allophycocyanin-(APC)-markierte Streptavidin-Moleküle (eBioscience GmbH, Frankfurt a. M., Germany) zu Clustern zusammengeführt wurden (Kannagi et al., 2009).

Als Negativkontrollen wurden äquivalente Isotypkontrollen verwendet.

Die Tumorzellen wurden direkt vor den FACS Analysen zur Unterscheidung von toten oder lebenden Zellen mit Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) gefärbt. Die Analysen wurden mit dem CyFlow Cube 8 durchgeführt (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Germany) und mit dem Programm FCS Express (DeNovo Software, Glendale, USA) ausgewertet.

4.7 Zellproliferation

Zum Vergleich der Zellproliferation der verschiedenen Zelllinien wurde ein XTT Assay (Cell Proliferation Kit II; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird ein Tetrazoliumsalz in lebenden Zellen zu einem Farbstoff umgesetzt. Die Absorption des Farbstoffs korreliert somit direkt mit der Anzahl an lebensfähigen Zellen.

Zwei Tage vor Testbeginn wurden die Zellpopulationen auf Ausgangswerte eingestellt. Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und folgende Zellkonzentrationen aus den jeweiligen Zellreihen (HOS Luc, HOS shITG α 5 und HOS shITG β 1) hergestellt:

- 25.000 Zellen/ml
- 50.000 Zellen/ml
- 100.000 Zellen/ml

Jeweils 100 μ l dieser Zellsuspensionen wurden pro Well in eine 96-well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) gegeben und anschließend für 24 bzw. 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Um die Zellproliferation nach erfolgter Inkubation zu bestimmen, wurden pro Well 50 μ l XTT hinzu pipettiert. XTT wurde zuvor wie folgt angesetzt.

- XTT = 5 ml der Lösung 1 (XTT labeling reagent) + 100 μ l Lösung 2 (electron coupling reagent).

Es erfolgte die erneute Inkubation im Brutschrank für 5 Stunden, an die sich die fotometrische Messung im Elisa-Reader (MAX 002 Dias Microplate Reader; Dynex Technologies, Guernsey, GB) mit Ermittlung der Extinktion bei 490 nm anschloss. Der Versuch wurde insgesamt dreimal pro Zelllinie und Konzentration durchgeführt. Aus den erhobenen Messwerten wurden die Mittelwerte errechnet und verglichen. Pro Versuch und Gruppe wurden, je nach Zellkonzentration, je 18 (25000 Zellen/ml und 100000 Zellen/ml) bzw. 12 (50000 Zellen/ml) Messwerte erhoben (siehe Abb. 4 und 5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	blank	blank	blank	blank	blank	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1
B	LUC	LUC	LUC	LUC	LUC	LUC	100.000 Zellen / ml					
C	50.000 Zellen / ml											
D	LUC	LUC	LUC	LUC	LUC	LUC	shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5
E	100.000 Zellen / ml						50.000 Zellen / ml					
F							shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5
G	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1	100.000 Zellen / ml					
H	50.000 Zellen / ml											

Abbildung 4: Pipettierschema des XTT Proliferationsassays mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	blank	blank	blank	blank	blank						
B	LUC	LUC	LUC	LUC	LUC	LUC	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1
C	25.000 Zellen / ml						50.000 Zellen / ml					
D							shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5
E	LUC	LUC	LUC	LUC	LUC	LUC	25.000 Zellen / ml					
F	50.000 Zellen / ml											
G	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG β1	shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5	shITG α5
H	25.000 Zellen / ml						50.000 Zellen / ml					

Abbildung 5: Pipettierschema des XTT-Proliferationsassays mit einer Inkubationszeit von 48 Stunden.

4.8 Kolonieformation und Morphologie

Zur Beurteilung des Kolonieformationsverhaltens der Tumorzellen wurde ein Kolonieformations-Assay mit BD Matrigel matrix (BD Biosciences) durchgeführt. Hierzu wurden 600 Zellen in 1,5 ml kaltem RPMI Medium aufgeschwemmt und mit 1,5 ml kaltem Matrigel gemischt. Von dieser Mischung wurden je 50 µl in ein Well

pipettiert. Um das Matrigel zu festigen, wurde die Platte für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Wells mit 200 µl Medium (ohne Puromycin) überschichtet. Nach Sichtbarwerden der ersten Kolonien, erfolgte der erste Wechsel des Mediums, anschließend zweimal wöchentlich. Nach neun Tagen wurden die Kolonien lichtmikroskopisch ausgezählt und deren Morphologie beurteilt. Es erfolgte eine morphologische Unterscheidung der gebildeten Kolonien in drei Gruppen: kugelförmig, diskoid und intermediär.

4.9 Migration

Zur Beurteilung der Migration *in vitro* wurden Versuche mit einem Oris Zell-Migrationsassay (Platypus Technologies, USA) durchgeführt. Hierzu wurden in eine 96-well Platte die dazu bestimmten Platypus-Einsätze gesetzt und festgedrückt. In jeweils 6 Wells pro Zelllinie (HOS Luc, HOS shITGα5, HOS shITGβ1) wurden 200 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von 125.000 Zellen pro ml gefüllt. Dies entspricht einer Zellzahl von 50.000 Zellen pro Well. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Einsätze entfernt, das Medium vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, einmal mit RPMI Medium gespült und anschließend frisches, zellfreies Medium hinzugefügt. Fotografisch wurden die geeigneten Wells als Ausgangswert festgehalten. Um den Fortschritt der Migration in die zuvor zellfreie Fläche zu dokumentieren, wurden alle 24 Stunden Fotos angefertigt (5er Objektiv). Das Medium wurde regelmäßig gewechselt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image J (Wayne Rasband, NIH, Bethesda). Verglichen wurden die zellfreien Flächen zu Beginn des Versuchs mit den zellfreien Flächen nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubationszeit.

4.10 Invasion

Zur Beurteilung der Zellinvasion *in vitro* wurde ein Assay mit Platypus-Einsätzen (Platypus Technologies, USA) und Matrigel (BD Biosciences) durchgeführt. Der Versuch wurde in einer 96-well-Platte angesetzt. Es wurden insgesamt 12 Wells befüllt, 4 pro Zelllinie. Das Matrigel wurde mit serumfreiem Medium auf 3,5 mg/ml verdünnt. Zuerst erfolgte die Beschichtung der Wells mit diesem zuvor verdünnten

Matrigel. Hierzu wurden jeweils 100 µl mit einer Einzelpipette in ein Well pipettiert und sofort wieder abpipettiert. Zur Verfestigung der Matrigelbeschichtung wurde die Platte 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Stopfen in den Wells positioniert und anschließend pro Well 200 µl Zellsuspension (25.000 Zellen/200 µl) hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Stopfen entfernt und das Medium vorsichtig abpipettiert. In jedes Well wurden 40 µl Matrigel-Medium-Gemisch (Verhältnis 1:1) gegeben und die 96-well-Platte wurde zur Festigung des Matrigels für 30 Minuten im Brutschrank gelagert. Im Anschluss wurden pro Well 200 µl serumfreies Medium hinzugegeben. Die Wells wurden alle 48 Stunden, insgesamt sechsmal, fotografiert (5er Objektiv). Insgesamt wurde der Versuch zweimal durchgeführt und diese Ergebnisse zusammengefasst.

4.11 Statische Adhäsion

Zweimal 60 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml wurden in mit Fibronectin vorbeschichtete Kanäle eines IBIDI-Slides gegeben. Pro Kanal wurden je drei Blickfelder mit Hilfe eines Axiovert 200 Mikroskops (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) fotografisch dokumentiert und deren Position gespeichert. Es erfolgte eine einstündige Inkubation der Slides im Brutschrank. Danach wurden die Kanäle mindestens fünfmal kräftig mit RPMI Medium (Gibco/Life Technologies, Karlsruhe, Germany) gespült. Anschließend erfolgte eine erneute fotografische Dokumentation derselben drei Blickfelder. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Axio Vision (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen). Die Zellen vor Inkubation und nach Inkubation und Spülung wurden gezählt, der prozentuale Anteil der adhärennten Zellen errechnet und dieser Anteil miteinander verglichen.

4.12 Flussversuch

Um die Zelladhäsion unter Flussbedingungen zu untersuchen, wurden Ividi-Slides (µ-Slide VI 0.4, Ividi GmbH, Martinsried, Germany) mit Endothelzellen (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) beschichtet. Hierzu wurden 30 µl einer

HUVEC Endothelzellsuspension (1×10^6 Zellen/ml) in jede Flusskammer gegeben und mit 60 μ l Endothelmedium (Endothel Cell Medium, ScienCell Research Laboratories; Carlsbad, USA) pro Zu- und Ablauf aufgefüllt und anschließend für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit konfluieren die Endothelzellen und bilden Monolayer in den Flusskammern.

Das Endothel wurde 4 Stunden vor Versuchsbeginn mit IL- α 1 stimuliert. Aus allen drei Zelllinien (HOS Luc, HOS shITG α 5 und HOS shITG β 1) wurden 1×10^6 Zellen isoliert und mit Medium auf insgesamt 10 ml verdünnt. Diese Zellsuspension wurde in eine Perfusorspritze (Luer-Lok-Spritze 20 ml; Becton, Dickinson and Company Limited, Drogheda, Ireland) gefüllt und mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 8,5 ml pro Stunde mittels Perfusor über die beschichteten Flusskammern geleitet. Zuvor ausgewählte Bereiche, an denen die Flusskammer komplett mit Endothel bedeckt war, wurden eingestellt und eine Minute lang mit Hilfe eines Axiovert 200 Mikroskops (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) per Video dokumentiert. Pro Slide wurden drei Bereiche ausgewählt und gefilmt. Im Nachhinein wurden die Videos mit der Software CapImage 8.5 (Dr. Heinrich Zeintl, Heidelberg, Germany) ausgewertet und die Ereignisse

- *Adhäsion* (dauerhafte Haftung am Endothel)
- *Tethering* (abwechselndes Haften und Rollen auf dem Endothel)
- *Rolling* (Rollen auf dem Endothel ohne Haften)

gezählt und verglichen.

Insgesamt wurden 9 Messwerte pro Zelllinie erhoben und von diesen die Mittelwerte berechnet und verglichen.

4.13 Xenograft Mausmodell

Zur Untersuchung des Metastasierungsverhaltens der Tumorzellen in vivo wurde ein Xenograft Mausmodell mit Severe combined immune deficiency mice (SCID) Mäusen genutzt. Die Tumorzellen wurden in insgesamt 30 immundefiziente Mäuse subkutan injiziert, es gab drei Untersuchungsgruppen aus jeweils 10 Tieren. Das Tumorstadium und der Gesundheitsscore der Tiere wurden dokumentiert. Die Tiere wurden getötet, sobald das Tumorgewicht 10 % des Ausgangsgewichts der jeweiligen Maus überschritten hatte, oder ein Tumorstadium von 1,5 cm³ erreicht

wurde. Im Falle einer Ulzeration des Tumors wurden die Mäuse vorzeitig getötet. Zwecks weiterführender Analysen wurden den Mäusen die Primärtumoren, die Lungen und Blut entnommen.

4.14 Tierhaltung

Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen in Filtertop-Käfigen gehalten (20 ± 1 °C, 50 % relative Luftfeuchtigkeit, zirkadiane Rhythmik: 19:00-7:00 Uhr Dunkelheitsphase). Die Tiere wurden mit Einstreufutter gefüttert und erhielten steriles Wasser ad libitum. Täglich erfolgte eine Begutachtung der Aktivität, des Nahrungsverhaltens und des Fells. Die Tiere liefen unter der Versuchsnummer G09/88. Die Versuchsvorhaben wurden nach § 8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 (BGB1. I S. 1207, 1313) vom Amt für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt.

4.15 DNA-Isolation

Zur späteren Durchführung einer ALU-PCR wurde aus den zuvor entnommenen Lungen und dem Blut DNA isoliert. Zur DNA-Isolation wurde das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany) verwendet.

Das Lungengewebe musste zu Beginn unter denaturierenden Bedingungen lysiert werden. Hierzu wurde das Lungengewebe in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße (Eppis) mit je 150 µl PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) und einer autoklavierten Silberkugel gegeben. Das Gewebe wurde in einer Kugelmühle für 3,5 Minuten bei einer Frequenz von 25 Umdrehungen pro Sekunde homogenisiert. Das Homogenisat wurde abzentrifugiert und 100 µl in ein neues Eppi gegeben. Zu diesem wurden 100 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (QIAamp DNA Mini Kit) gegeben und anschließend durchmischt (Vortex Minishaker MS2 JK, IKA, Staufen, Germany). Es erfolgte die einstündige Inkubation bei 56 °C, wobei alle 20 Minuten erneut kurz durchmischt wurde. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer erfolgte eine weitere zehnmütige Inkubation bei 70 °C. Daraufhin wurden 200 µl Ethanol (99 %)

hinzugegeben und wieder durchmischt. Die entstandene Masse wurde nun komplett (nach Entfernung der Silberkugel) auf die vorbereiteten QIAamp Mini Säulen gegeben und bei 6000 g für 1 Minute zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Sammel tube gesetzt, und es wurden 500 µl AW1-Buffer hinzugefügt. Anschließend wurde erneut bei 6000 g für 1 Minute zentrifugiert. Die neu entstandene Säule wurde wieder in ein neues Sammel tube überführt, und es wurden 500 µl AW2-Puffer hinzugegeben. Anschließend wurde für 3 Minuten mit 17000 g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein steriles 1,5 ml Eppi gesetzt, und 200 µl AE-Puffer hinzugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, wurde erneut bei 6000 g für 1 Minute zentrifugiert.

Diese Säule wurde verworfen und das Eluat in 1,5 ml Eppis bei -20 °C gelagert.

4.16 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA Konzentration wurde mittels Nano Drop Spektralphotometer (Thermo Scientific™, Dreieich, Germany) bestimmt. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung und die Berechnung des Mittelwertes. Von jeder Probe wurde ein 20 µl Aliquot mit einer Konzentration von 30 ng/µl (Verdünnung mit AE-Puffer, Qiagen GmbH, Germany) hergestellt. Die gewonnene DNA wurde zur Durchführung der ALU-PCR eingesetzt.

4.17 ALU-PCR

Alu Sequenzen sind in großer Zahl im humanen Genom vorkommende, repetitive DNA-Sequenzen. Da es sich bei den verwendeten Tumorzellen um humane Zellen handelt, können mit dem Nachweis von Alu-Sequenzen in einer Probe aus murinem Gewebe, Rückschlüsse auf die humane Zellmasse gezogen werden.

Hierzu wurde eine Standardreihe aus der zuvor extrahierten DNA der HOS Tumorzellen und der murinen Background DNA nach folgendem Schema erstellt.

Tabelle 1: Standardreihe Alu PCR

Zellen	(Konzentration 30 ng/μl)			
2000	A	12,5 μl DNA aus Zellen	+	50 μl Background DNA
200	B	2 μl aus A	+	18 μl Background DNA
20	C	2 μl aus B	+	18 μl Background DNA
2	D	2 μl aus C	+	18 μl Background DNA
0,2	E	2 μl aus D	+	18 μl Background DNA
0,02	F	2 μl aus E	+	18 μl Background DNA
0,002	G	2 μl aus F	+	18 μl Background DNA
-	H	20 μl Background DNA		

Nach Erstellen der Standardreihe wurde der Master Mix (LightCycler® Probes Master, Roche Life Science, Mannheim, Germany) angesetzt. Hierzu wurden pro Probe

- 0,2 μl Primer reverse (Sequenz 5`-GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT-3`)
- 0,2 μl Primer forward (Sequenz 5`-TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA-3`)
- 5,0 μl LightCycler® 480 Green I Master
- 2,6 μl Aqua dest.

zusammenpipettiert. 2 μl der DNA Proben wurden nach festgelegtem Schema in eine 96-well-Platte pipettiert. Anschließend wurden die vorbereiteten 8 μl des Master Mix pro Well hinzugefügt. Die PCR dieses Ansatzes wurde nach dem Protokoll in Tabelle 2 durchgeführt. Die Messung der Proben erfolgte mit dem LightCycler® 480 (Roche Life Science, Mannheim, Germany).

Tabelle 2: Ablauf Alu-PCR Programm

Programm	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklus [n]
Vorinkubation	95	300	1
Amplifikation			40
<i>Denaturierung</i>	95	10	
<i>Annealing</i>	67	10	
<i>Elongation</i>	72	10	
Schmelzkurve			1
<i>Denaturierung</i>	95	5	
<i>Annealing</i>	65	60	
<i>Melting</i>	97	kontinuierlich	
Abkühlung	40	30	1

4.18 Histologie

4.18.1 Herstellung der histologischen Schnittpräparate

Zur histologischen Beurteilung der Primärtumoren und der möglichen Metastasen in den Mäuselungen wurden histologische Schnitte angefertigt. Die Gewebeproben wurden zuerst in Paraffin eingebettet. Hierzu mussten die Gewebe in 3,7 %igem Phosphat-gepufferten Formalin 24 Stunden fixiert werden. Anschließend erfolgte die Entwässerung und Paraffindurchtränkung im Gewebeautomaten (Leica TP 1020, Leica, Nussloch, Germany). Die so vorbereiteten Gewebe wurden dann in Paraffinblöcke gegossen (Ausgießvorrichtung Leica EG 1160, Leica, Nussloch, D), um später am Mikrotom Schnitte der Primärtumoren und Lungen anzufertigen.

Zur Erstellung von Lungenserienschnitten wurde eine Schichtdicke von 5 µm am Mikrotom (MICROM HM30, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) gewählt und jeder zehnte Schnitt in Wasser über zwei Stufen, erst bei Raumtemperatur, dann bei 37 °C, vorgestreckt auf einen unbeschichteten Objektträger gezogen. Die kompletten Lungen wurden so aufgeschnitten. Die übrigen Schnitte wurden verworfen. Aus der Mitte der Lungenblöcke wurden außerdem 2 x 20 Schnitte für die

Immunhistochemie angefertigt und auf beschichtete Objektträger (HistoBond®, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Germany) gezogen.

Aus den Primärtumoren wurden jeweils 10 Schnitte mit Schichtdicken von 5 µm erstellt. Die Schnitte wurden anschließend über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C auf den Objektträgern getrocknet.

4.18.2 Histologische Färbungen

4.18.2.1 Entparaffinieren

Um spätere Färbungen auf wässriger Basis durchführen zu können, mussten die Schnitte entparaffiniert werden. Hierzu wurden sie im Färbeautomaten (Shandon Varistain 24-4, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) nach dem folgenden Protokoll bei Raumtemperatur behandelt.

Tabelle 3: Entparaffinierungsprotokoll

Lösung	Inkubationszeit (in Minuten)
Xylol	5
Xylol	5
Abs. Ethanol	3
Abs. Ethanol	5
96 % Ethanol	5
70 % Ethanol	5
50 % Ethanol	5
Aqua dem.	2
Aqua dem.	2

4.18.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur mikroskopischen Übersicht und Beurteilung der Primärtumoren und zur Bestimmung der Anzahl der Lungenmetastasen wurden geeignete Schnitte

ausgewählt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Färbung erfolgte mit dem Färbeautomaten (Shandon Varistain 24-4, Thermo Scientific) nach dem folgenden Protokoll und anschließender Entwässerung.

Tabelle 4: Hämatoxylin-Eosin-Färbeprotokoll

Lösung	Inkubationszeit (in Minuten)
Hämatoxylin	3
Aqua dem.	2
Leitungswasser	5
Eosin	3

Um das Färbeergebnis zu erhalten, erfolgte nach abgeschlossener Färbung das Eindecken mit Eukitt® (ORSAtec GmbH, Germany). Dazu mussten die Schnitte vorher entwässert werden. Dies geschah in aufsteigender Ethanol-Reihe (siehe Tabelle 4). Bis zur Eindeckung der Schnitte wurden diese in Xylol gelagert.

Zum Eindecken wurde jeweils ein Tropfen Eukitt® mit Hilfe eines Glasstabes auf den gefärbten und entwässerten Schnitt getropft und dann ein Deckglaschen aufgelegt. Luftbläschen wurden vorsichtig ausgestrichen und überschüssiges Eukitt® entfernt.

Tabelle 5: Entwässerungsprotokoll gefärbter Schnitte

Lösung	Inkubationszeit
Aqua dem.	30 Sekunden
70 % Ethanol	15 Sekunden
96 % Ethanol	30 Sekunden
96 % Ethanol	30 Sekunden
abs. Ethanol	5 Minuten
abs. Ethanol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten

Aus den erstellten Lungenserienschnitten wurden 10 aufeinanderfolgende Schnitte aus der Mitte des Paraffinblocks ausgewählt und H.E. gefärbt. Diese Schnitte wurden mikroskopisch betrachtet und die vorhandenen Metastasen gezählt. Als eine Metastase wurde jede zusammenhängende Tumorzellabsiedlung im Lungengewebe von mehr als drei Zellen gezählt, unabhängig von ihrer Gesamtzellzahl. Später wurde die Gesamtanzahl der Metastasen in der rechten Lungenhälfte mittels folgender Formel berechnet (Jojovic & Schumacher, 2000):

$$X = (\bar{x}_{10} - 0,2 \times \bar{x}_{10}) \times z$$

Formel 1: Berechnung der Lungenmetastasen X = Lungenmetastasen gesamt; \bar{x}_{10} = Mittelwert aus 10 ausgezählten Schnitten; z = Gesamtzahl der Schnitte

Um den Fehler zu minimieren, der durch das Auszählen von lediglich 10 Schnitten aus dem mittleren Bereich der Lungenhälfte entsteht, muss ein Korrektionsfaktor von 20 % beachtet werden.

4.18.2.3 Immunhistochemische Ki-67 Färbung

Zur Bestimmung der Proliferation in vivo wurde immunhistochemisch der Proliferationsmarker Ki-67 zur Darstellung gebracht und quantitativ bewertet.

Zur Färbung wurden folgende Antikörper verwendet:

- Primärantikörper: Ki-67 (M7240); Dako 35 mg/l
- Sekundärantikörper: Ziege Anti-Maus; Dako 0,77 g/l, 1:200 in TBS
- Iso-Kontrolle: Maus IgG1, (Dako, USA) 100 mg/l, 1:910

Um eine Freilegung der Epitope zu erreichen, mussten die entparaffinierten Schnitte zuerst mit speziellen Puffern unter Hitzezufuhr vorbehandelt werden. Die Vorbehandlung erfolgte im Wasserbad bei 85 °C für 15 Stunden in 0,2 M Borsäure. Nachdem die Schnitte auf Eis abgekühlt waren, wurden diese zweimal für 5 Minuten in TBS-T (Tris Buffered Saline + 1 ml Tween 20) und einmal 5 Minuten in TBS (Tris Buffered Saline: 30,29 g Trizma Base + 43,54 g NaCl + 100 ml HCl [2 mol/l] auf 5 l Aqua dest. [pH = 7,6]) gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung

unspezifischer Bindungsstellen mit Serum (Rabbit-Serum; 1:10 in TBS) für 30 Minuten.

Der eingesetzte Antikörper wurde mit Antikörperdiluent verdünnt. Der Primärantikörper und die Isotypen-Kontrolle wurden zeitgleich eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte getrennt voneinander gewaschen. Nach Aufbringen des Sekundärantikörpers erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch anschließende Waschgänge entfernt. Zur Markierung der gebundenen Antikörper mit alkalischer Phosphatase (AP) wurde erneut für 30 Minuten mit dem ABC-AP-Komplex (ABC-Kit) inkubiert. Nach weiteren Waschgängen erfolgte die Behandlung mit dem Permanent AP Red Kit, durch das die alkalische Phosphatase zu rotem Chromogen umgesetzt wird. Eine dreiminütige Inkubation in Leitungswasser stoppte diesen Vorgang. Dann erfolgte die kurze Spülung mit Aqua dem. Die Kerne wurden etwa 5 Sekunden in Hämatoxylin nach Mayer mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte entwässert und eingedeckt (s. o.). Die Schnitte wurden mit einem Zeiss Axioplan Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

Für die Auswertung der Ki-67 Immunhistologie wurden willkürlich fünf geeignete Areale in einem Ki-67 gefärbten Schnitt der Primärtumoren ausgewählt. In diesen Arealen wurden jeweils 100 Zellen ausgewertet und die davon positiv gefärbten gezählt. Aus den fünf ermittelten Werten wurde der Mittelwert berechnet. Dieser Mittelwert gibt den prozentualen Anteil der Tumorzellen im Mitosestadium an.

4.19 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Erstellung der hier enthaltenen Diagramme erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad™, San Diego, USA). Zur statistischen Auswertung wurden, wenn nicht anders angegeben, eine One-way-ANOVA Analyse durchgeführt. Bei den statistischen Tests der ALU-PCR Ergebnisse wurde den Tests keine Normalverteilung zugrunde gelegt, alle anderen statistischen Tests folgen der parametrischen Statistik. Das Signifikanzniveau lag

bei allen Tests bei mindestens $P < 0,05$. Die Darstellung des Signifikanzniveaus ist in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Darstellung des Signifikanzniveaus

*	$P < 0,05$
**	$P < 0,01$
***	$P < 0,001$

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung der Oberflächenmoleküle

Während des gesamten Versuchszeitraums erfolgten regelmäßige Kontrollen des Knockdowns mittels Durchflusszytometrie/FACS. Als Referenzwert diente die relative Fluoreszenz (ITG α 5- und ITG β 1-Expression) der HOS Luc Zellen um die Expressionsveränderung in den HOS shITG α 5 und shITG β 1 Zellen nachzuweisen. Untersucht wurden zudem folgende Oberflächenmoleküle auf den Zellen der drei Zellreihen:

- *CD24*
- *CD44*
- *ITG α 4*
- ***ITG α 5***
- *ITG α V*
- ***ITG β 1***
- *ITG β 2*
- *ITG β 3*
- *ITG β 7*
- *ALCAM*
- *ICAM-1*
- *E-Selektin Bindung*
- *P-Selektin Bindung*

Mittels FACS konnte in den Zelllinien sowohl der ITG α 5 als auch der ITG β 1 Knockdown bestätigt werden.

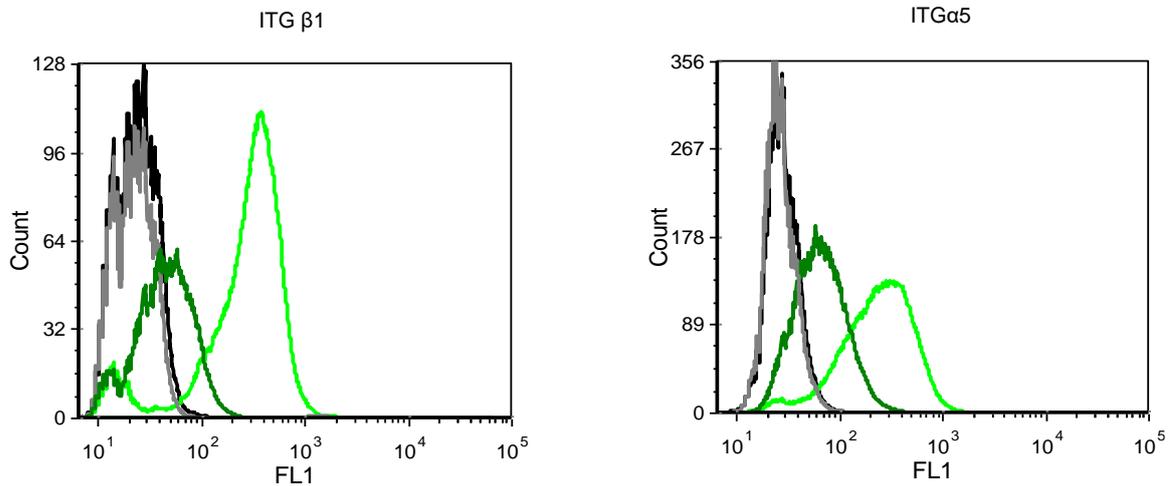


Abbildung 6: FACS Ergebnisse HOS Luc verglichen mit HOS shITGβ1 (links) und HOS shITGα5 (rechts). Im linken Diagramm zeigt sich eine verminderte ITGβ1 Expression der shITGβ1 Zellen (Dunkelgrün) im Vergleich zu den Luc Kontrollzellen (Hellgrün). Im rechten Diagramm zeigt sich eine verminderte ITGα5 Expression der shITGα5 Zellen (Dunkelgrün) im Vergleich zu den Luc Kontrollzellen (Hellgrün). Die jeweiligen Iso-Kontrollen sind in grau (shITGβ1 und shITGα5) und schwarz (Luc) dargestellt. Links gefärbt mit anti ITGβ1 und rechts mit anti ITGα5.

Weiterhin zeigte sich, dass ein genetischer ITGβ1-Knockdown mit einer verminderten ITGα5-Expression einhergeht.

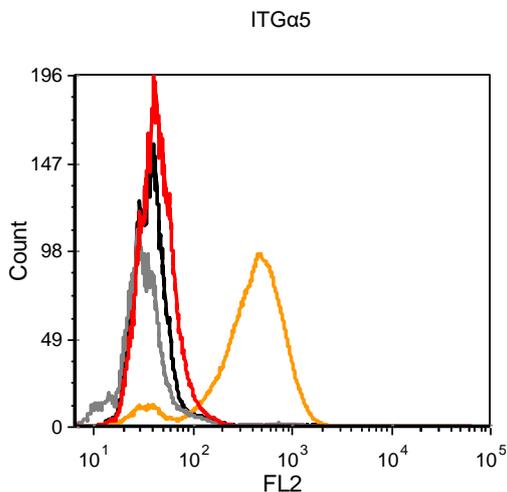


Abbildung 7: FACS Ergebnisse Vergleich HOS Luc und HOS shITGβ1. Die HOS shITGβ1 Zellen (Rot) zeigen eine deutlich verminderte ITGα5 Expression im Vergleich zu den Luc Kontrollzellen (Orange). Die Iso-Kontrollen sind in grau (shITGβ1) und schwarz (Luc) dargestellt. Gefärbt mit anti ITGα5.

Bei der Expression von CD24, CD44, ITGα4, ITGαV, ITGβ2, ITGβ3, ITGβ7, ALCAM, ICAM-1, E-Selektin Bindung und P-Selektin Bindung zeigten sich keine Unterschiede zwischen den HOS shITGα5, shITGβ1 und Luc Zellen.

5.2 Proliferationsverhalten in vitro

Zur Beurteilung des Proliferationsverhaltens der Tumorzellen in vitro wurde, wie oben beschrieben, ein XTT-Proliferationsassay mit drei verschiedenen Zellkonzentrationen angesetzt. Um sowohl den Faktor Zeit, als auch den Einfluss der anfänglichen Zellkonzentration in die Untersuchung mit einfließen zu lassen, wurden unterschiedliche Zellkonzentrationen gewählt.

Bei einer Zellkonzentration von 50.000 Zellen pro ml zeigte sich nach 24 Stunden ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) in der Proliferation zwischen HOS Luc und HOS shITG α 5 sowie zwischen HOS shITG β 1 und HOS shITG α 5. Kein signifikanter Unterschied ließ sich zwischen der Proliferation von HOS Luc und HOS shITG β 1 nachweisen. Der Mittelwert der Extinktion der Luc Kontrollgruppe lag bei dieser Konzentration nach 24 Stunden bei 0,698. Die HOS shITG β 1 Gruppe zeigte einen Mittelwert von 0,684 und die HOS shITG α 5 Gruppe von 0,822. Dies entspricht 98,0 % (shITG β 1) bzw. 117,8 % (shITG α 5) der Extinktion der Luc Kontrollgruppe. Die Zellen der Linie HOS shITG α 5 proliferierten schneller als die der anderen beiden Zelllinien.

Bei einer Zellkonzentration von 100.000 Zellen pro ml zeigte sich dieser Unterschied noch deutlicher ($P < 0,001$). Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen HOS Luc und HOS shITG α 5 und zwischen HOS shITG β 1 und HOS shITG α 5, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen HOS Luc und HOS shITG β 1. Der Mittelwert der Extinktion der Luc Kontrollgruppe lag bei einer Konzentration von 100.000 Zellen pro ml nach 24 Stunden bei 0,954, in der HOS shITG β 1 Gruppe bei 0,929 und in der HOS shITG α 5 Gruppe bei 1,138. Dies entspricht einem Anteil von 97,4 % (shITG β 1) bzw. 119,3 % (shITG α 5) der Extinktion der Luc Kontrollgruppe.

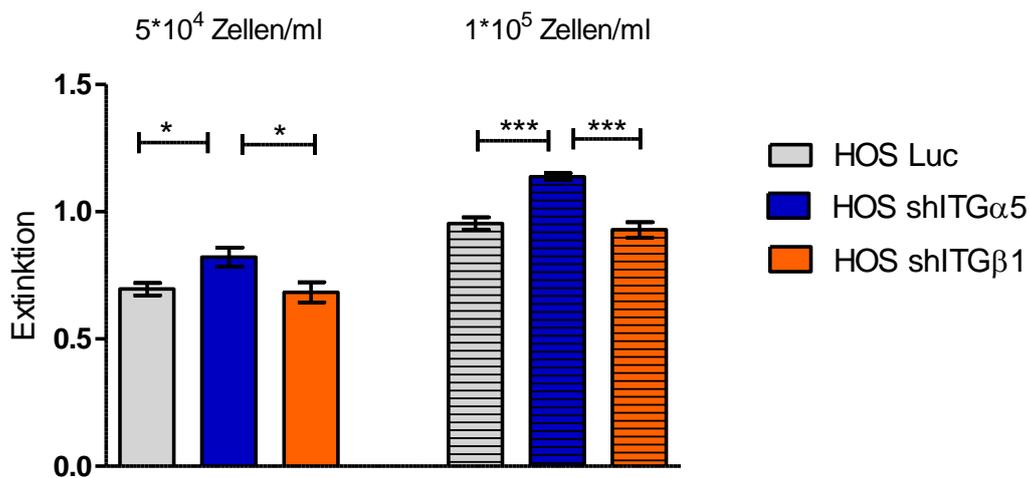


Abbildung 8: Proliferationsverhalten nach 24 Stunden im XTT-Proliferationsassay. Dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen Extinktionen je Zelllinie und Ausgangskonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Die HOS shITG α 5 Zellen proliferierten signifikant schneller als die beiden anderen Zellreihen.

Nach 48 Stunden zeigte sich bei den Tumorzellen der Konzentration von 25.000 Zellen pro ml eine signifikant langsamere Proliferation der HOS shITG β 1 Zellen im Vergleich zu den Hos Luc sowie den HOS shITG α 5 Zellen ($P < 0,001$). Zwischen HOS Luc und HOS shITG α 5 zeigte sich bei dieser Konzentration kein signifikanter Unterschied in der Proliferation. Der Mittelwert der Extinktion lag in der Luc Kontrollgruppe bei 1,058, in der HOS shITG β 1 Gruppe bei 0,952 und in der HOS shITG α 5 Gruppe bei 1,068. Dies entspricht einem Anteil von 90,0 % (shITG β 1) bzw. 100,9 % (shITG α 5) der Extinktion im Vergleich zur Luc Kontrollgruppe.

Bei einer Konzentration von 50.000 Zellen pro ml und einer Wachstumsdauer von 48 Stunden konnte kein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen HOS Luc und HOS shITG β 1 festgestellt werden, jedoch erneut zwischen der Proliferation von HOS Luc und HOS shITG α 5 Zellen ($P < 0,001$), sowie zwischen HOS shITG β 1 und HOS shITG α 5 Zellen ($P < 0,01$). Auch in diesem Fall proliferierten die Zellen der Linie HOS shITG α 5 signifikant schneller. Die Proliferation dieser Zellen zeigte einen Anteil von 116,2 % im Vergleich zur Luc Kontrollgruppe. Die Mittelwerte der Extinktion lagen bei 1,044 (Luc), 1,078 (shITG β 1) und 1,213 (shITG α 5). Die Zellen der shITG β 1 Gruppe zeigten einen Anteil von 103,3 % der Proliferation im Vergleich zur Luc Kontrollgruppe.

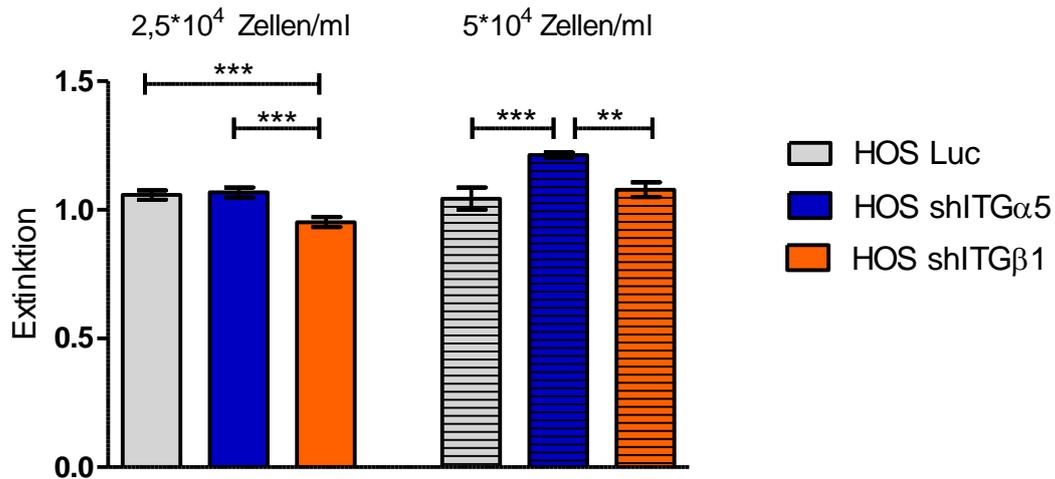


Abbildung 9: Proliferationsverhalten nach 48 Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen Extinktionen je Zelllinie und Ausgangskonzentration nach 48-stündiger Inkubation. Bei einer Konzentration von 25.000 Zellen/ml zeigte sich eine signifikant geringere Proliferation der HOS shITG β 1 Zellen. Bei einer Konzentration von 50.000 Zellen/ml zeigte sich erneut eine signifikant gesteigerte Proliferation der HOS shITG α 5 Zellen im Vergleich zu beiden anderen Zelllinien.

Zusammenfassend zeigten die HOS shITG α 5 Zellen die höchste Proliferation im Vergleich zu den HOS Luc und den HOS shITG β 1 Zellen. Nur bei einer Zellkonzentration von 25.000 Zellen pro ml und 48 Stunden Inkubation war die Proliferation der HOS Luc und shITG α 5 Zellen gleich.

5.3 Kolonieformation

Zur Beurteilung des Kolonieformationsverhaltens der Tumorzellen wurde ein Assay in Matrigel angesetzt und bewertet. Bewertet wurde die Gesamtzahl der entstandenen Kolonien pro Well, so wie das Aussehen dieser Kolonien. Das Aussehen wurde in *kugelförmig (k)*, *diskoid (d)* und *intermediär (i)* unterteilt. Insgesamt wurden 64 Messwerte pro Zelllinie erhoben.

Da alle drei Zelllinien in der überwiegenden Zahl kugelförmige Kolonien bildeten, wurde im Folgenden lediglich die Gesamtzahl der Kolonien verglichen.

Auch die Gesamtzahl der gebildeten Kolonien zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Zelllinien.

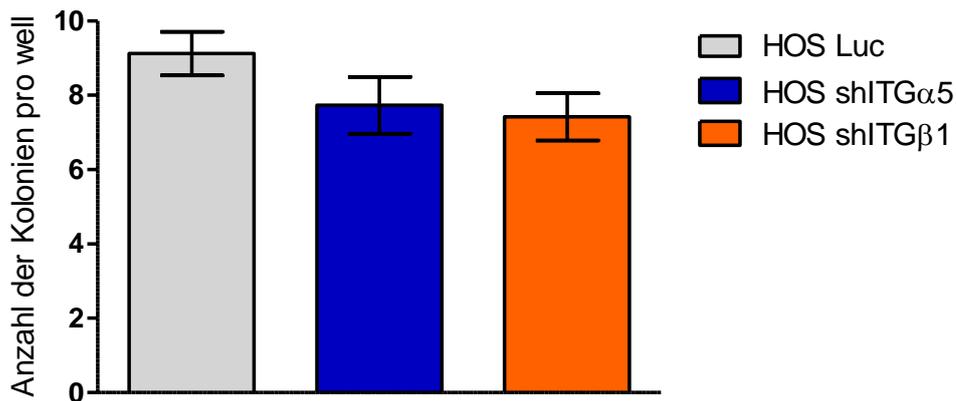


Abbildung 10: Quantitativer Vergleich der gebildeten Kolonien. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der gebildeten Kolonien nach neun Tagen Inkubation. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Zelllinien.

5.4 Das Migrationsverhalten der Osteosarkomzellen in vitro

Zur Untersuchung des Einflusses des Knockdowns der Integrine α 5 und β 1 auf die Migration der Osteosarkomzellen wurde ein Migrationsassay durchgeführt. Der Versuch wurde mit 50.000 Zellen pro Well angesetzt.

In diesem Versuch zeigte sich eine signifikant geringere Migration der HOS shITG α 5 und HOS shITG β 1 Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Beurteilt wurde der zellfreie Flächenanteil in Prozent des Ausgangswertes nach 24 und nach 48 Stunden Inkubationszeit.

Der Anteil der zellfreien Fläche im Vergleich zur Ausgangsfläche lag in der HOS Luc Gruppe bei 45,1 % nach 24 Stunden und bei 5,3 % nach 48 Stunden. In der HOS shITG β 1 Gruppe waren nach 24 Stunden noch 63,7 % und nach 48 Stunden noch 31,7 % der Ausgangsfläche zellfrei. In der HOS shITG α 5 Gruppe zeigten sich nach 24 Stunden noch 80,1 % und nach 48 Stunden noch 60,3 % der Ausgangsfläche zellfrei.

Die HOS Luc Zellen migrierten signifikant schneller als die Zellen der anderen beiden Zelllinien. Auch zwischen HOS shITG α 5 und shITG β 1 zeigte sich ein

signifikanter Unterschied im Migrationsverhalten. Am langsamsten migrierten die HOS shITG β 1 Zellen.

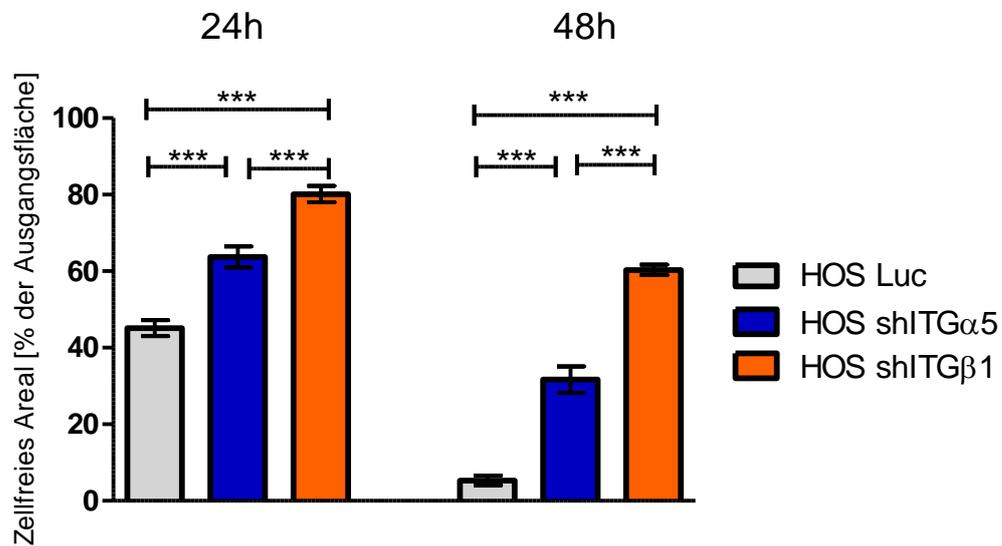


Abbildung 11: Migration der Osteosarkomzellen. Dargestellt ist der Anteil (in %) des zellfreien Areals im Vergleich zum Ausgangswert nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien waren jeweils statistisch signifikant.

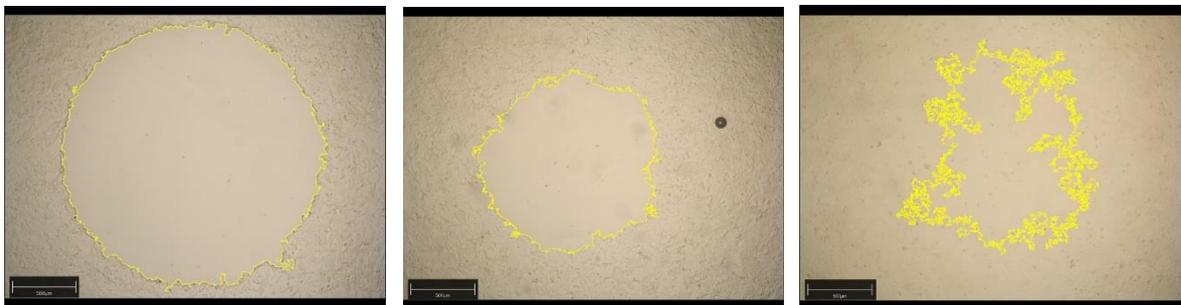


Abbildung 12: Migration der HOS Luc Zellen. Links ist die Ausgangsfläche dargestellt, in der Mitte die Migration nach 24 Stunden Inkubation, rechts nach 48 Stunden Inkubation.

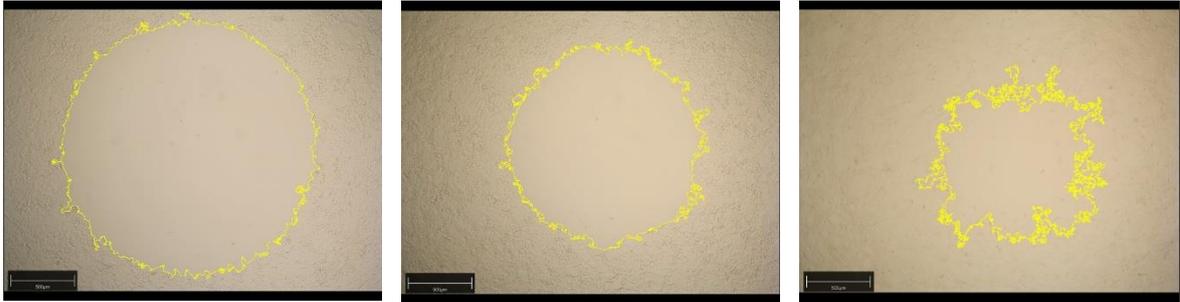


Abbildung 11: Migration der HOS shITG α 5 Zellen. Links ist die Ausgangsfläche dargestellt, in der Mitte die Migration nach 24 Stunden Inkubation, rechts nach 48 Stunden Inkubation.

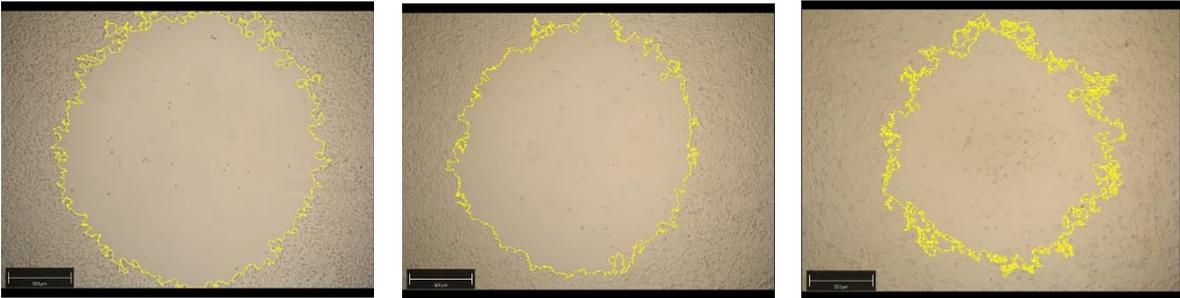


Abbildung 14: Migration der HOS shITG β 1 Zellen. Links ist die Ausgangsfläche dargestellt, in der Mitte die Migration nach 24 Stunden Inkubation, rechts nach 48 Stunden Inkubation.

5.5 Das Invasionsverhalten der Osteosarkomzellen in vitro

Verglichen wurde das Invasionsverhalten der Tumorzellen im Invasionsassay mit Matrigel. Da sich die überwiegende Zahl der Zellen nach 10 Tagen avital zeigte, wurden im Folgenden nur die Werte bis einschließlich Tag 8 in die Auswertung mit einbezogen.

Die HOS shITG β 1 Zellen überlebten nur einen Tag und waren nicht in der Lage zu invadieren. Zwischen dem Invasionsverhalten in Matrigel der Zellen der Kontrollgruppe (HOS Luc) und den HOS shITG α 5 Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied, wobei die Zellen der Kontrollgruppe etwas schneller invadierten, als die HOS shITG α 5 Zellen. In der HOS Luc Gruppe zeigte sich nach einem Tag ein Anteil von 100,6 % der Ausgangsfläche zellfrei, nach 3 Tagen waren es noch 81,6 %, nach 6 Tagen 73,0 % und nach 8 Tagen noch 63,0 %. In der HOS shITG α 5 Gruppe waren nach einem Tag 107,1 %, nach 3 Tagen 97,3 %, nach 6 Tagen 84,4 % und nach 8 Tagen noch 79,6 % der Ausgangsfläche zellfrei.

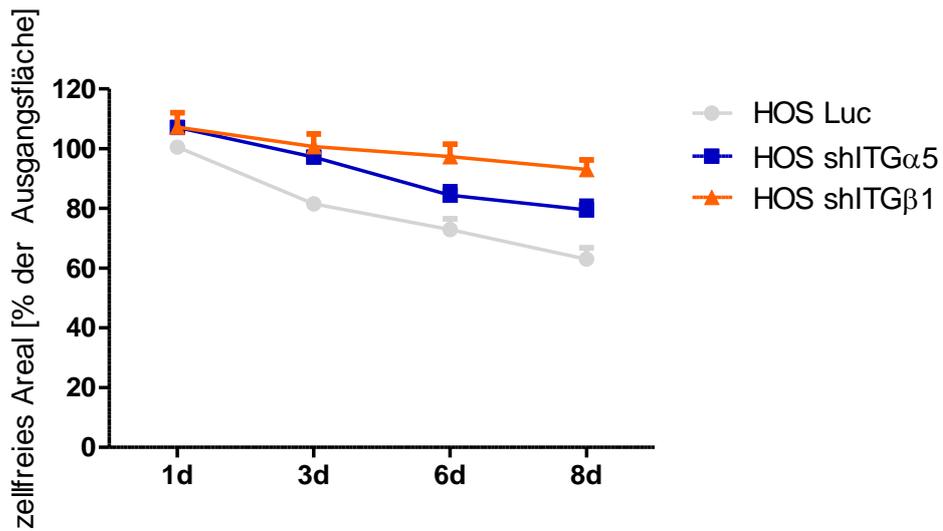


Abbildung 15: Invasionsverhalten in vitro. Dargestellt ist die zellfreie Fläche in % des Ausgangswertes im Invasionsassay mit Matrigel. Die HOS shITG β 1 Zellen waren nach einem Tag avital. Zwischen den anderen beiden Zelllinien ließ sich kein signifikanter Unterschied im Invasionsverhalten in vitro feststellen.

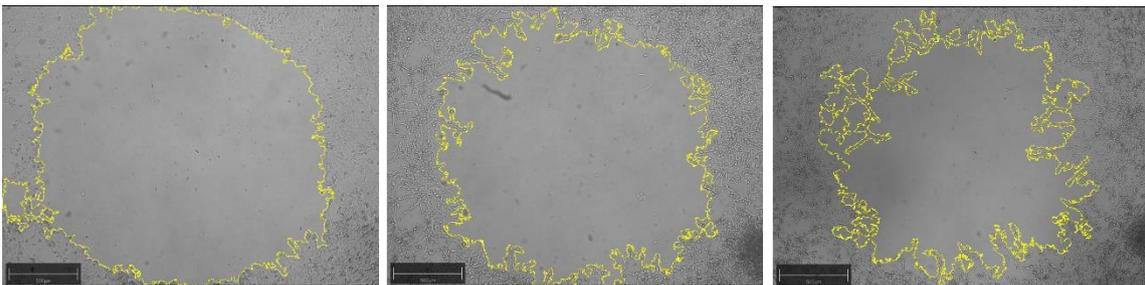


Abbildung 16: HOS Luc. Dargestellt ist links die Ausgangsfläche, in der Mitte die Invasion nach 3 Tagen und rechts die Invasion nach 8 Tagen Inkubation.

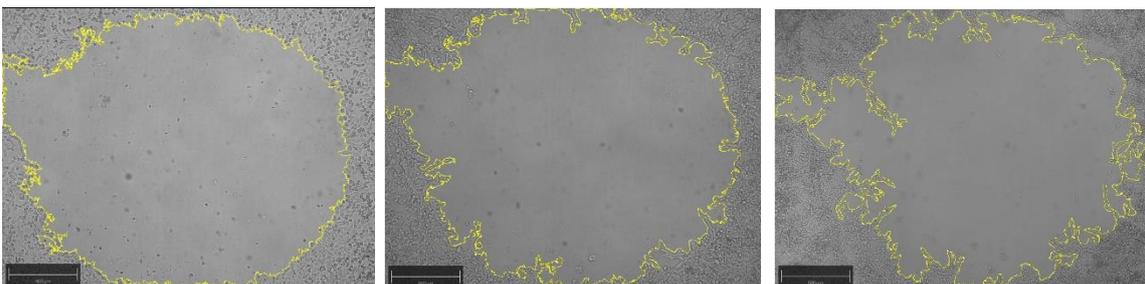


Abbildung 17: HOS shITG α 5. Dargestellt ist links die Ausgangsfläche, in der Mitte die Invasion nach 3 Tagen und rechts die Invasion nach 8 Tagen Inkubation.

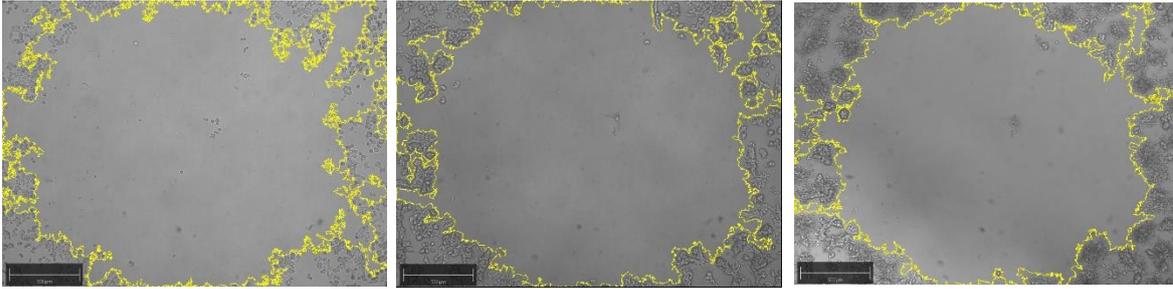


Abbildung 18: HOS shITG β 1. Dargestellt ist links die Ausgangsfläche, in der Mitte die Invasion nach 3 Tagen und rechts die Invasion nach 8 Tagen Inkubation. Die Zellen waren nach 1 Tag avital.

5.6 Das Verhalten der Zellen unter Flussbedingungen

Dargestellt ist das Adhäsionsverhalten auf zuvor stimuliertem Endothel unter Flussbedingungen. Da das primär miterfasste „Rolling“ in keiner der Gruppen auftrat, wurde es im Folgenden nicht mit aufgeführt.

Unter Berücksichtigung aller adhäsiven Ereignisse zeigten die ITG β 1-Knockdown Zellen (27 events/min) mehr Ereignisse als die Luc Kontrollzellen (22 events/min) und signifikant mehr als die shITG α 5 Zellen (14 events/min, $P < 0,05$). Im Vergleich dazu war die Anzahl der festen Adhäsionen bei den shITG β 1 Zellen (7 events/min) am niedrigsten, in der Luc Kontrollgruppe am höchsten (17 events/min), die shITG α 5 Zellen lagen mit 11 festen Adhäsionen dazwischen. Bezogen auf die Festigkeit der Adhäsionen ließen sich in der Luc Kontrollgruppe signifikant mehr feste Adhäsionen als Tethering beobachten ($P < 0,05$). Bei den ITG α 5-Knockdown Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen festen Adhäsionen und Tethering. Bei den Zellen mit dem ITG β 1-Knockdown konnten signifikant mehr vorübergehende als feste Adhäsionen beobachtet werden ($P < 0,01$). Auffallend war die signifikant höhere Anzahl vorübergehender Adhäsionen der HOS shITG β 1 Zellen auf Endothel im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen ($P < 0,001$).

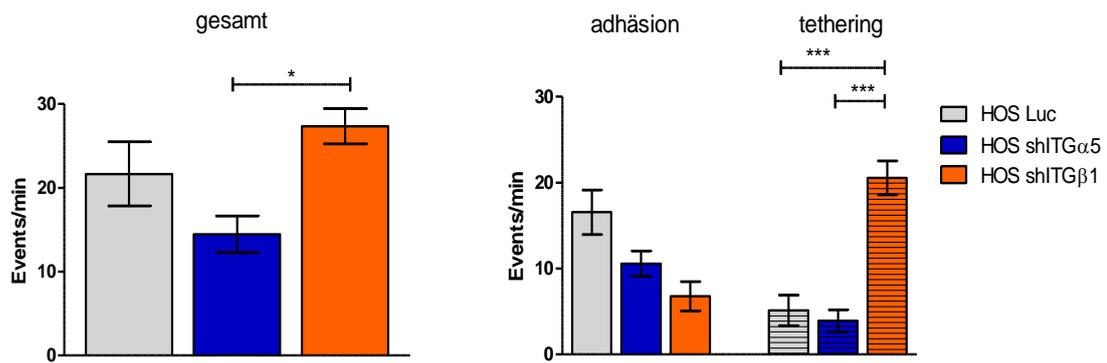


Abbildung 19: Anzahl der vorübergehenden und dauerhaften Adhäsionen unter Flussbedingungen auf Endothelzellen. Grau: Luc, blau: shITGα5, orange: shITGβ1. Die shITGα5 Zellen zeigten die niedrigste Gesamtanzahl adhäsiver Events. Die beiden Knockdown-Gruppen zeigten weniger feste Adhäsionen als die Kontrollgruppe. Bei den shITGβ1 Zellen traten jedoch signifikant mehr vorübergehende Adhäsionen als in den anderen beiden Gruppen auf.

5.7 Das statische Adhäsionsverhalten auf Fibronektin

Da es sich beim Integrin $\alpha5\beta1$ um den primären Fibronektin-Rezeptor handelt, wurde auch das Adhäsionsverhalten auf mit Fibronektin beschichteten Slides in vitro untersucht und verglichen. In der Luc Kontrollgruppe zeigten sich im Mittel 95,2 statische Adhäsionen. In der Gruppe mit dem ITGα5-Knockdown wurden im Mittel 78,2 Adhäsionen gezählt und in der Gruppe mit dem ITGβ1-Knockdown waren es im Mittel 56,3 Adhäsionen. Beide Gruppen zeigten eine geringere Anzahl an statischen Adhäsionen auf Fibronektin als die Luc Kontrollgruppe, wobei nur der Unterschied zwischen der shITGβ1 Gruppe und der Luc Kontrollgruppe statistisch signifikant war.

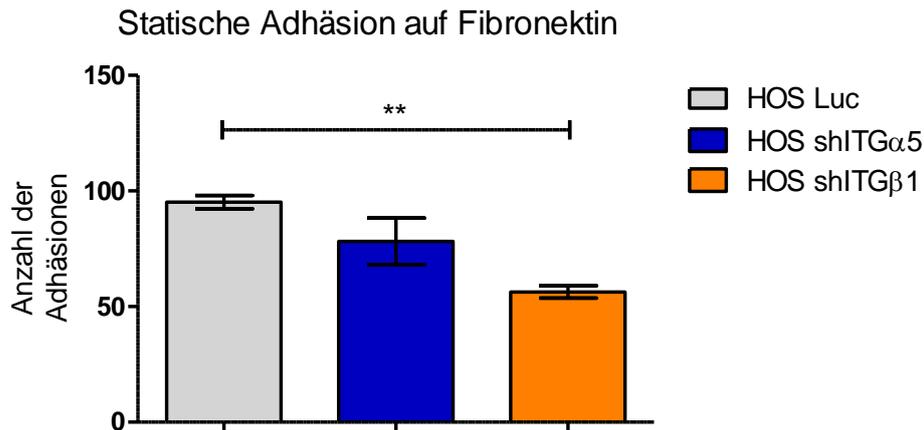


Abbildung 20: Anzahl der statischen Adhäsionen auf einem mit Fibronektin beschichteten Slide. Dargestellt sind die drei Zelllinien im Vergleich. In der shITG β 1 Gruppe zeigten sich signifikant weniger statische Adhäsionen als in der Kontrollgruppe (Luc).

5.8 Untersuchungen am Mausmodell

Um das Metastasierungsverhalten der Osteosarkome in vivo zu untersuchen, wurden insgesamt 30 SCID Mäuse mit HOS Zellen beimpft, je 10 Mäuse erhielten HOS Luc, HOS shITG α 5 und HOS shITG β 1 Zellen. In der Beobachtungsphase wurden das Tumorstadium und der Zustand der Mäuse regelmäßig kontrolliert und dokumentiert. Im Verlauf verstarb eine Maus der Gruppe HOS shITG α 5 vorzeitig, diese wurde aus dem Versuchsablauf ausgeschlossen und in den weiteren Analysen nicht mehr berücksichtigt. Im Falle eines lokalen Ulkus wurde dies dokumentiert und die Maus vorzeitig getötet. In der Kontrollgruppe entwickelten 5 von 10 Mäusen ein Ulkus. In der Gruppe mit ITG α 5-Knockdown waren es 6 von 9 Tieren und in der Gruppe mit ITG β 1-Knockdown 7 von 10 Tieren. Die übrigen Mäuse wurden bei einer Tumorstadium von ca. 1,5 cm³ getötet.

5.8.1 Untersuchung der Lebensdauer und des Tumorstadiums

Die Lebensdauer der Tiere wurde dokumentiert und verglichen. Die Tiere der beiden Knockdown-Gruppen lebten signifikant länger bis zum Erreichen des Endpunktes als die Tiere der Kontrollgruppe ($P < 0,05$). Im Mittel lebten die Tiere der

Kontrollgruppe 26,3 Tage im Vergleich zu den Knockdown-Gruppen, bei denen es im Mittel 39,3 (shITG α 5) bzw. 37,3 (shITG β 1) Tage waren.

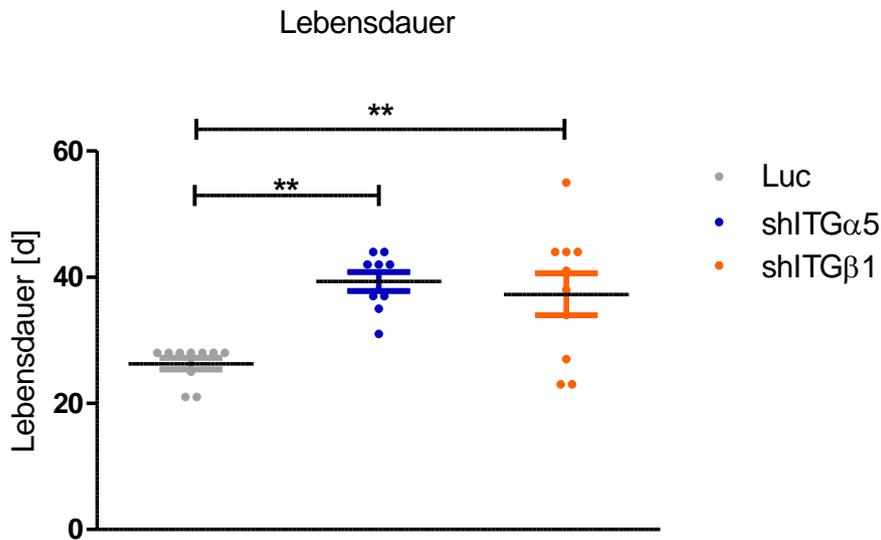


Abbildung 21: Lebensdauer der Tiere im Mausmodell bis zum Erreichen des Endpunktes, angegeben in Tagen. Die Mäuse der beiden Knockdown-Gruppen lebten signifikant länger als die der Kontrollgruppe.

Alle entnommenen Primärtumoren wurden gewogen und dann zur histologischen Untersuchung aufgearbeitet und gefärbt. Das Gewicht der Primärtumoren wurde ebenfalls dokumentiert und verglichen. In Bezug auf das Tumorgewicht bei Entnahme zeigte sich, dass die Tumoren der Gruppe mit ITG β 1-Knockdown signifikant weniger wogen als die Tumoren der anderen beiden Gruppen. In der Kontrollgruppe wogen die Tumoren im Durchschnitt 1,32 g. In der Gruppe mit ITG α 5-Knockdown 1,34 g und in der Gruppe mit ITG β 1 Knockdown waren es durchschnittlich nur 0,78 g. Da insgesamt 18 der 29 Primärtumoren im Verlauf ulzerierten und die Tiere somit vorzeitig getötet werden mussten, ist ein Vergleich jedoch nur bedingt möglich.

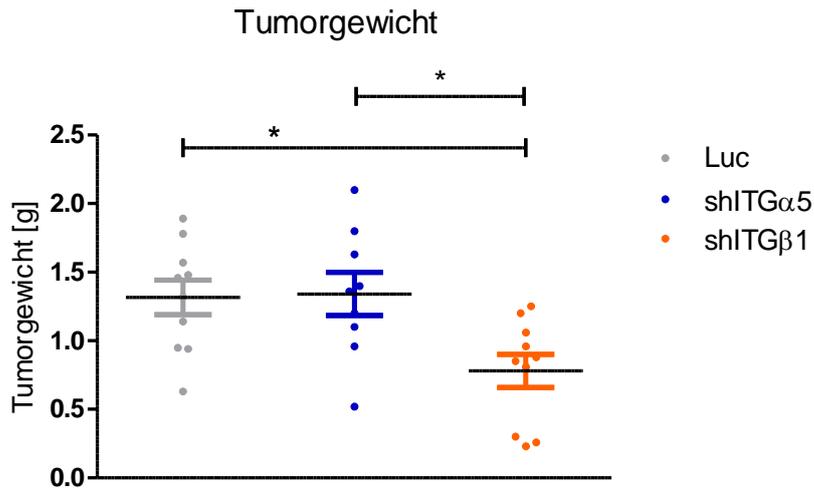


Abbildung 22: Gewicht des Primärtumors. In der shITG β 1 Gruppe zeigte sich ein signifikant geringeres Tumorgewicht als in den anderen beiden Gruppen.

Die Tumoren der shITG β 1 Gruppe wogen signifikant weniger als die Tumoren der anderen beiden Gruppen bei einer deutlich längeren Wachstumsdauer. Auch die Tumoren der shITG α 5-Gruppe zeigten eine längere Wachstumsdauer bei allerdings ähnlichem Tumorgewicht, so dass bei beiden Knockdown-Zelllinien eine Verlangsamung des lokalen Tumorstwachstums festgestellt werden konnte.

5.8.2 Proliferationsmarker Ki-67

Zur Beurteilung der Zellteilungsaktivität im Primärtumor wurden geeignete Primärtumorschnitte immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Ki-67 gefärbt und beurteilt. Ki-67 ist ein Protein, das nur während der Zellteilung in menschlichen Zellen vorkommt.

Die Auszählung der 29 Primärtumoren ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen in Bezug auf die Mitoseaktivität. Im Mittel befanden sich 34,3 % der ausgezählten Zellen in der Kontrollgruppe im Mitosestadium. In der Gruppe mit ITG α 5-Knockdown waren es durchschnittlich 30,3 % und in der Gruppe mit ITG β 1-Knockdown waren 31,3 % der Zellen Ki-67-positiv.

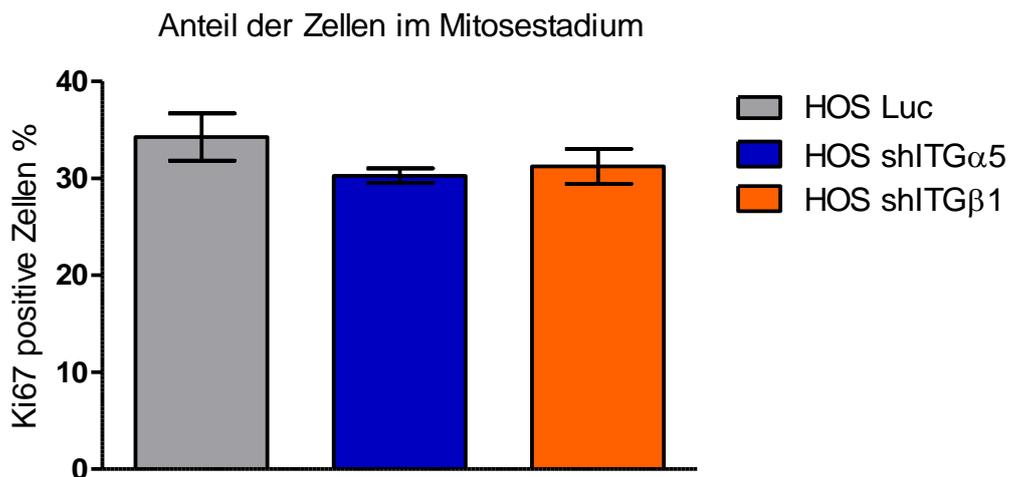


Abbildung 23: Anteil der Ki-67-positiven Zellen der Primärtumoren angegeben in %. Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen waren nicht signifikant.

5.8.3 Mikroskopische Untersuchung der Lungenmetastasen

Zur Beurteilung des spontanen Metastasierungsverhaltens der Osteosarkomzellen im Xenograft Modell wurden die zuvor angefertigten Lungenserienschnitte H.E. gefärbt und mikroskopisch auf das Vorhandensein von Metastasen untersucht.

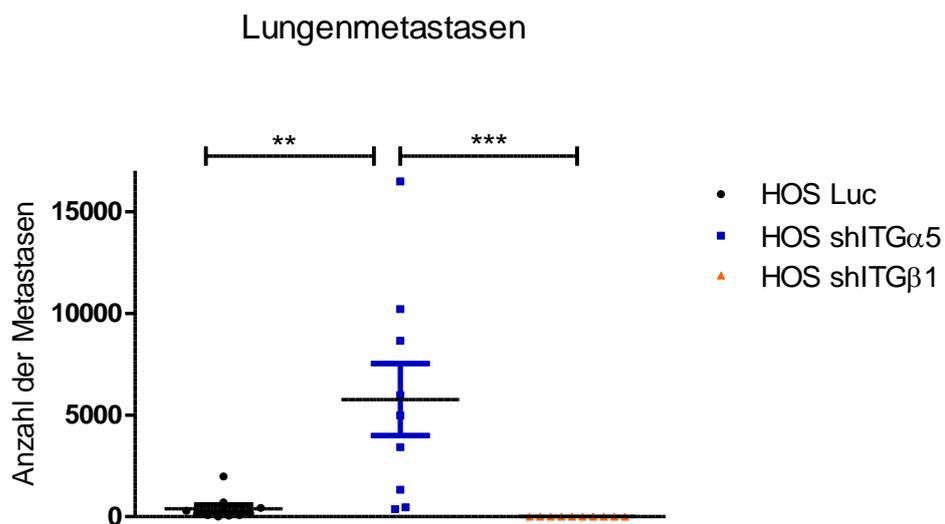


Abbildung 24: Anzahl der mikroskopisch ermittelten Lungenmetastasen im Tierversuch. Auffällig ist das Fehlen von Lungenmetastasen in der shITG β 1-Gruppe. Die höchste Anzahl von Lungenmetastasen war in der shITG α 5-Gruppe nachzuweisen.

Auffällig war das Fehlen von Lungenmetastasen in allen untersuchten Lungen der shITG β 1 Gruppe. Im Gegensatz hierzu, ließen sich in der Gruppe mit ITG α 5-Knockdown die meisten Metastasen finden, mit einem Mittelwert von 5754,3. Dieser Wert lag deutlich höher als der Mittelwert in der Luc Kontrollgruppe (395,5, $P < 0,01$).

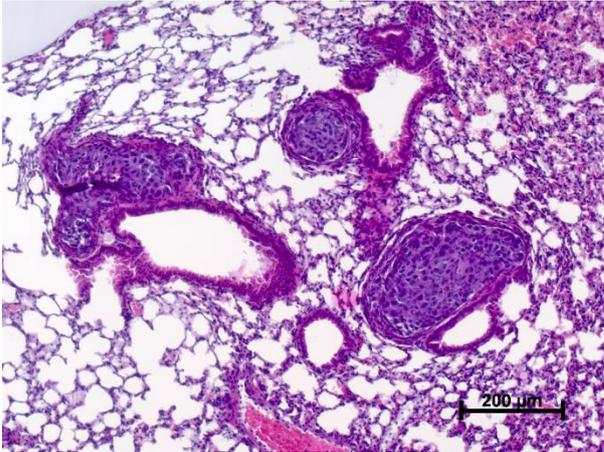


Abbildung 25: Intravasal gelegene Lungenmetastasen einer SCID Maus der HOS Luc Kontrollgruppe, H.E. gefärbt.

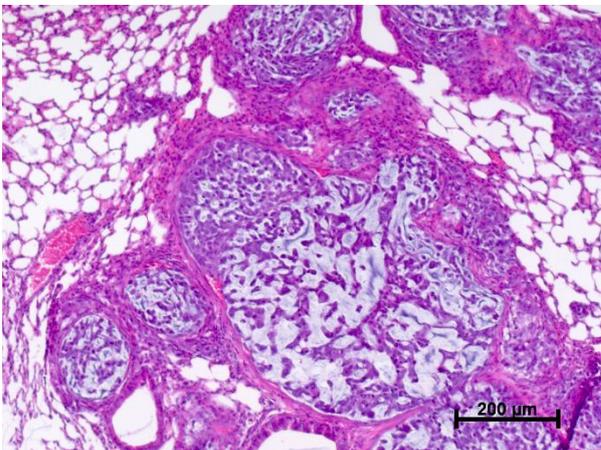


Abbildung 26: Intravasal gelegene Lungenmetastasen einer SCID Maus aus der Gruppe HOS shITG α 5, H.E. gefärbt.

Mikroskopisch zeigten die Lungenmetastasen der HOS Luc und shITG α 5 Zellen Unterschiede. Die Metastasen der shITG α 5 Gruppe waren lockerer strukturiert und

enthielten viele nekrotische Anteile. In beiden Gruppen lagen die Metastasen überwiegend intravasal.

5.8.4 Quantitative DNA-Untersuchung der Lungen auf Metastasen

Zur quantitativen Analyse disseminierter Tumorzellen in der Lunge wurde die DNA aus dem linken Lungenflügel isoliert, um mittels spezifischer Primer humane Alu-Sequenzen und damit die Anwesenheit von humanem Material nachzuweisen.

In der PCR waren auch in den Lungen der Mäuse aus der shITG β 1-Gruppe Tumorzellen nachweisbar, die mikroskopisch nicht detektierbar waren. Dementsprechend waren die Werte sehr niedrig und lagen zwischen 0,1 und 1,3 Zellen pro 60 ng DNA (Mittelwert 0,63 Zellen pro 60 ng DNA).

Zudem zeigte sich, dass auch in der quantitativen DNA Untersuchung die Tumorlast in den Lungen der Mäuse aus der shITG α 5-Gruppe am größten war. Im Mittel ließen sich in dieser Gruppe 196,59 Zellen pro 60 ng DNA nachweisen. In der Luc Kontrollgruppe waren es nur 7,74 Zellen pro 60 ng DNA im Mittel. Auch dieser Unterschied war statistisch signifikant, was das Ergebnis der mikroskopischen Auswertung bestätigt.

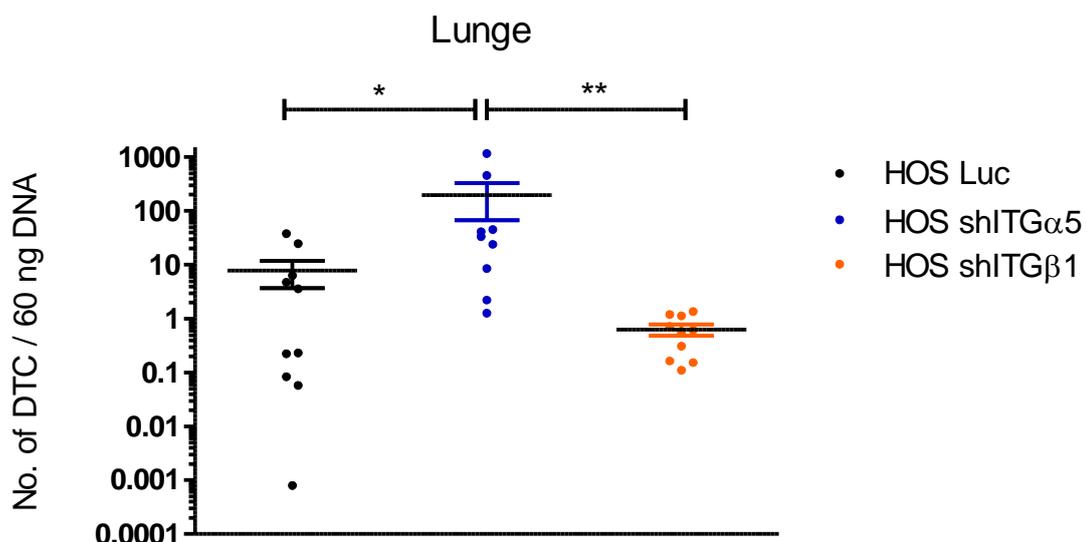


Abbildung 27: Ergebnisse der ALU PCR aus dem murinen Lungengewebe der entnommenen linken Lungenflügel. Dargestellt ist die Anzahl an disseminierten Tumorzellen pro 60 ng untersuchter DNA. Es zeigte sich eine signifikant höhere Tumorzelllast in den Proben der shITG α 5 Gruppe als in beiden anderen Gruppen.

5.8.5 Quantitative DNA-Analyse des Blutes

Auch aus zuvor entnommenem Blut wurde DNA isoliert und diese mittels ALU-PCR untersucht, um die Tumorlast dieses Kompartiments zu bestimmen. In den Untersuchungen der Blutproben zeigte sich eine signifikant höhere Tumorzelllast in den Proben der Mäuse aus den Knockdown-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Luc Kontrollgruppe wurden im Mittel 3,86 zirkulierende Zellen pro ml Blut nachgewiesen. In der shITG α 5-Gruppe lag der Mittelwert bei 51,59 Zellen pro ml Blut und in der shITG β 1-Gruppe bei 35,53 Zellen pro ml Blut.

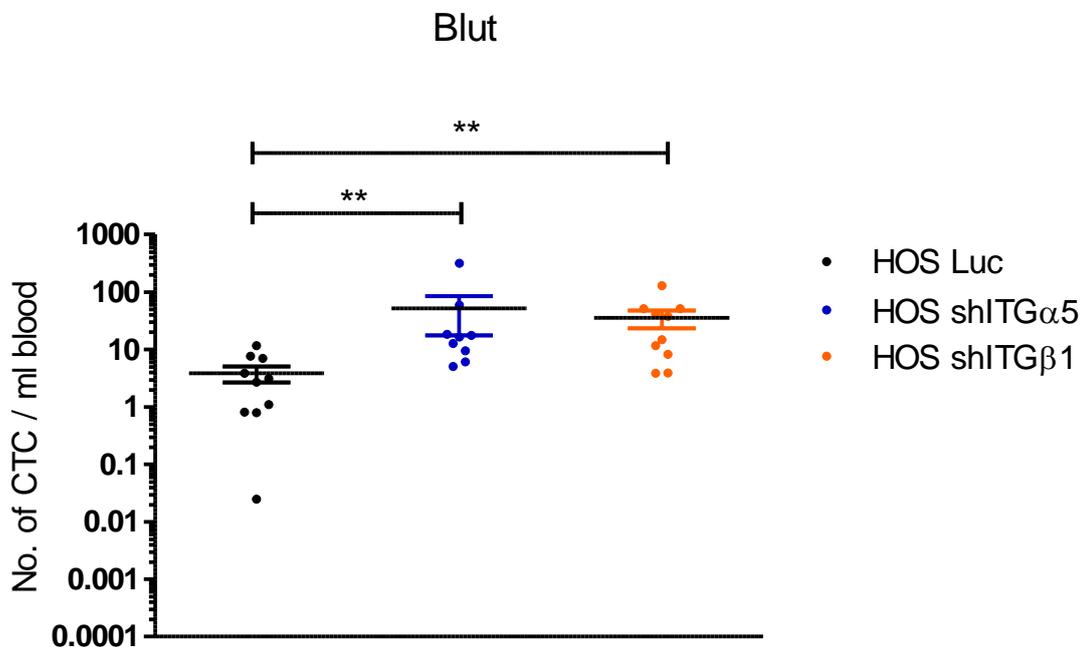


Abbildung 28: Ergebnisse der ALU PCR des Blutes. Angegeben ist die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro ml Blut. Es zeigten sich signifikant mehr Tumorzellen im Blut der beiden Knockdown Zelllinien als im Blut der Mäuse aus der Kontrollgruppe.

6 Diskussion

Wie bei den meisten anderen Tumorentitäten auch, stellt beim Osteosarkom die Metastasierung die größte Bedrohung für das Überleben der betroffenen Patient:innen dar. Lokal begrenztes Tumorstadium lässt sich operativ sehr gut therapieren, deutlich schwieriger ist die systemische Behandlung beim metastasierten Stadium. Da sich die Neuerkrankungs- und Sterberaten von bösartigen Knochentumoren in Deutschland seit 1999 nicht wesentlich verändert haben, besteht in diesem Bereich noch viel Forschungsbedarf (Kraywinkel, 2018). Es fehlt an alternativen effektiven und zielgerichteten Therapiemöglichkeiten neben den bereits etablierten Chemotherapeutika.

Die Bedeutung der Integrine für das Tumorstadium und die Metastasierung wurde bereits für viele Tumorentitäten nachgewiesen (Ganguly et al., 2013). Sie beeinflussen das Proliferations-, Invasions- und Metastasierungsverhalten eines Tumors und sind so maßgeblich an der Aggressivität eines Tumors beteiligt (Seguin et al., 2015).

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ auf das Proliferations-, das Invasions- und das Migrationsverhalten sowie die Metastasierung von Osteosarkomzellen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden, um mögliche Ansätze für neue Medikamente zu identifizieren.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind im Folgenden aufgelistet:

1. Ein genetischer ITG $\beta 1$ Knockdown geht mit einer verminderten ITG $\alpha 5$ Expression einher.
2. Im Tierversuch führte ein ITG $\beta 1$ Knockdown zu einer signifikanten Reduktion der Metastasierung in die Lunge und zu einem geringeren Wachstum des Primärtumors. Eine verminderte Migration der shITG $\beta 1$ Zellen konnte auch *in vitro* gezeigt werden.
3. Ein isolierter ITG $\alpha 5$ Knockdown bewirkte *in vitro* einen Proliferationsvorteil, jedoch eine reduzierte Migration im Vergleich zu den Kontrollzellen. *In vivo* war ein langsames Primärtumorstadium festzustellen als in der Luc Kontrolle, aber eine erhöhte Spontanmetastasierung in die Lunge.

Für die Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass der Knockdown von ITG β 1 bei den hier untersuchten HOS Osteosarkomzellen zusätzlich mit einer verminderten Expression von ITG α 5 einhergeht. Somit konnte ein isolierter Einfluss des Integrin β 1 Knockdowns nicht untersucht werden.

Soweit bekannt, bildet das Integrin α 5 lediglich ein Heterodimer mit dem Integrin β 1 (Takada et al., 2007), so dass durch den Integrin β 1 Knockdown dem Integrin α 5 der Bindungspartner fehlt und dieses Integrin ebenfalls herunterreguliert wird. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass beide Integrine eng miteinander kooperieren.

Integrin β 1 hingegen bildet Heterodimere mit zahlreichen verschiedenen α -Untereinheiten (Takada et al., 2007), ist somit Teil vieler verschiedener Integrine und wird auch ohne das Vorhandensein des Integrin α 5 zur Bildung anderer Heterodimere von der Zelle benötigt und exprimiert. Bestätigt wird diese Annahme durch eine unveränderte Integrin β 1 Expression in den in dieser Studie verwendeten HOS shITG α 5 Zellen. Die Expressionsmuster der Integrine beeinflussen sich gegenseitig, da nur intakte Integrin-Heterodimere aus α - und β -Untereinheit das endoplasmatische Retikulum (ER), den Ort an dem sie sich zu Heterodimeren zusammenlagern, verlassen und zur Zelloberfläche gelangen (Anderson et al., 2014). Ungebundene Untereinheiten verbleiben im ER und werden dort abgebaut (Anderson et al., 2014).

Eine Überexpression anderer Integrine im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in unseren Versuchen nicht. Insbesondere die Hochregulation der relevanten Integrin β 1 Bindungspartner α V und α 4 in den shITG α 5 Zellen konnten wir in dieser Arbeit mittels FACS Analyse ausschließen. In weiterführenden Untersuchungen müsste geklärt werden, welche tumorbiologisch relevanten Moleküle durch den Integrin α 5 und Integrin β 1 Knockdown reguliert werden.

In vitro zeigte sich ein Proliferationsvorteil der shITG α 5 Zellen im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen (Luc und shITG β 1). In unserem Versuch in der Zellkultur interagierten die Zellen lediglich untereinander und nicht mit einer ECM. In diesem in vitro Versuchsaufbau scheint das Fehlen des Integrin α 5 den Zellen einen Proliferationsvorteil zu bieten, der in Bezug auf das Primärtumorwachstum in den

Xenograft Mausversuchen nicht bestätigt werden konnte. Hier entsprach das durchschnittliche Tumorgewicht der shITG α 5 Gruppe bei längerer Wachstumsdauer dem der Luc Kontrollgruppe. Die shITG β 1 Zellen zeigten in vivo ein signifikant langsames Wachstum des Primärtumors, was sich zusätzlich in einem signifikant geringeren Gewicht des Tumors bei Entnahme äußerte. In allen drei Gruppen traten Ulzerationen der Tumoren auf, wobei keine der Gruppen signifikant mehr Ulzera zeigte. Aufgrund der hohen Ulzerationsrate ist der Vergleich des Gewichts der Primärtumoren nur bedingt aussagekräftig. In der Ki-67 Färbung konnten keine Unterschiede zwischen den Tumoren der verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden, so dass die verminderte Expression von ITG α 5 bzw. ITG β 1 keinen relevanten Einfluss auf den Anteil proliferierender Tumorzellen in vivo in den angewachsenen Tumorzellen zu haben scheint. Möglicherweise sind die Wachstumsverzögerungen der Knockdown Zellen in vivo durch vermehrte Apoptose in der Anwachsphase oder durch vermehrte Seneszenz zu erklären.

Im Migrationsassay mit Matrigel migrierten die Zellen der beiden Knockdown Gruppen (shITG α 5 und shITG β 1) signifikant langsamer als die Zellen der Kontrollgruppe (Luc), was auf die Wichtigkeit der Integrine für die Migration hinweist. Liu et al. (2016) konnten die Bedeutung des Integrin α 5 für die Migration von Osteosarkomzellen der Zelllinie MG63 zuvor ebenfalls herausarbeiten. Ein Knockdown des Integrin α 5 zeigte in vitro auch in dieser Studie eine signifikante Reduktion der Migration der MG63 Osteosarkomzellen. Sie konnten ferner einen signifikanten Rückgang im Invasionsverhalten dieser Zellen in vitro zeigen (Liu et al., 2016). In unserer Studie konnte kein Einfluss auf das Invasionsverhalten durch den ITG α 5 oder den ITG β 1 Knockdown nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit der reduzierten Migration in vitro zeigten die shITG β 1 Zellen in vivo im Mausmodell auch ein stark eingeschränktes Metastasierungspotenzial.

In vorangegangenen Studien konnte die besondere Rolle des Integrin β 1 in der Metastasierungskaskade bereits herausgearbeitet werden. Chen et al. (2016) konnten zeigen, dass das Integrin β 1 erforderlich war, um die endotheliale Basalmembran zu durchbrechen und, dass eine Abschwächung des Integrin β 1 im

Tumormausmodell zu einer verringerten metastatischen Besiedlung der murinen Lunge führt.

Kimura et al. (2012) untersuchten den Einfluss einer Behandlung mit dem Anti-ITG β 1-Antikörper AIB2 auf die Lungenmetastasierung von Osteosarkomzellen im Mausmodell. Sie etablierten die humane Osteosarkomzelllinie 143B als fluoreszierenden Dual-Color-Zellen und konnten so die Aussaat der Osteosarkomzellen in den Lungen der lebenden Tiere nach 24 Stunden sichtbar machen und die Lungenmetastasierung am Ende des Versuchs beurteilen. In der mit dem Anti-ITG β 1-Antikörper behandelten Gruppe zeigte sich in dieser Studie eine signifikant geringere Anzahl an Tumor-Kolonien in den Mäuselungen nach 24 Stunden, eine signifikante Hemmung der spontanen Lungenmetastasierung und ein signifikant verlängertes Überleben der Mäuse (Kimura et al., 2012).

In den Tierversuchen unserer Arbeit zeigten die Tiere der Gruppe mit den HOS shITG β 1 Zellen mikroskopisch gar keine sichtbaren Lungenmetastasen und eine sehr geringe Metastasenlast in der quantitativen Alu PCR. Somit lassen die Ergebnisse aus dem Tierversuch die Annahme zu, dass eine verminderte Integrin β 1 Expression bei gleichzeitig verminderter Integrin α 5 Expression zu einer geringeren Metastasierung der Osteosarkomzellen führt.

Auch Hou et al. (2020) konnten zuvor die funktionelle Rolle des Integrin α 5 β 1 für verschiedene Krebsentitäten herausarbeiten und beschrieben, dass das Integrin α 5 β 1 an der Metastasierung von Osteosarkomzellen beteiligt ist. In ihrem Review zitieren sie die Arbeit von Odagiri et al. (2014), die zeigen konnten, dass das Integrin α 5 β 1 die Aktivierung der p38 MAP-Kinase durch das Angiopoietin-ähnliche Protein 2 (ANGPTL2) steuern kann und somit durch eine vermehrte Intravasation eine Metastasierung erleichtert. Die Vorbehandlung mit einem ITG α 5 β 1-Antikörper hemmte in dieser Studie die ANGPTL2-induzierte p38 MAPK-Phosphorylierung der in dieser Arbeit untersuchten OS Zellen und führte so zu einer verminderten Metastasierung (Odagiri et al., 2014).

Im Blut ließ sich mehr Tumor-DNA in den Tieren der Knockdown Gruppen als in der Kontrollgruppe nachweisen. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass die shITG α 5 und shITG β 1 Osteosarkomzellen aus dem Primärtumorverband

auswandern und in die Blutgefäße invadieren können, die zirkulierenden Tumorzellen speziell der $\beta 1$ -Knockdown Gruppe jedoch schlechter aus den Blutgefäßen in die Lunge extravadiieren können, so dass dort kaum metastatische Zellen nachgewiesen werden konnten. Diese Hypothese wird durch das Ergebnis unserer Flussversuche gestützt.

Unter Flussbedingungen in vitro zeigten sich in der HOS Kontrollgruppe deutlich mehr feste Adhäsionen auf den Endothelzellen als in den beiden Knockdown Gruppen. Sowohl das Fehlen des Integrin $\alpha 5$ als auch des Integrin $\beta 1$ führte zu einer Abnahme der festen Adhäsionen am Endothel.

Diese geringere Adhäsionsfähigkeit der Knockdown Zellen am Endothel könnte ein Grund dafür sein, dass im Tierversuch in der shITG $\beta 1$ Gruppe zwar viele zirkulierende Tumorzellen, jedoch deutlich weniger Lungenmetastasen gefunden wurden. Da die feste Adhäsion am Endothel die erste Voraussetzung zur Extravasation und somit zur Einwanderung in das umliegende Gewebe darstellt, untermauern die Ergebnisse des Flussversuches in Bezug auf den Tierversuch die wichtige Rolle des Integrin $\beta 1$ für die Metastasierungskaskade. Die transendotheliale Migration und das Überleben im Blutkreislauf werden als geschwindigkeitsregulierende Schritte der Metastasierung beschrieben (Chen et al., 2016). Das Fehlen des Integrin $\beta 1$ kann so den Metastasierungsprozess entscheidend beeinflussen und therapeutisch genutzt werden.

Im Vergleich zu den hemmenden Einflüssen des ITG $\beta 1$ -Knockdowns zeigten die Mäuse, die mit den shITG $\alpha 5$ HOS Zellen beimpft wurden, die höchste Metastasenlast in der Lunge, sowohl histologisch als auch in der Alu PCR. Im Gegensatz zu diesen in vivo Ergebnissen, war in vitro auch bei den shITG $\alpha 5$ Zellen die Migration signifikant vermindert, die statische und dynamische Adhäsion allerdings nur tendenziell reduziert und die Proliferation sogar erhöht im Vergleich zur Luc Kontrollgruppe. In diesen Zellen war nur das Integrin $\alpha 5$ herunterreguliert bei gleichbleibender Integrin $\beta 1$ Expression. Wie bereits erwähnt, hat das Integrin $\beta 1$ zahlreiche weitere Bindungspartner neben dem Integrin $\alpha 5$. Da bekannt ist, dass sich die Integrin-Expression gegenseitig beeinflusst (Anderson et al., 2014), wäre es naheliegend, dass andere Integrin $\beta 1$ Bindungspartner oder Oberflächenmarker überexprimiert werden und Heterodimere mit dem „freien“ Integrin $\beta 1$ bilden. Auch

hier könnte eine erleichterte Paravasation Grund für die vermehrte Metastasierung in vivo sein. Chen et al. (2016) beschreiben, dass insbesondere die Adhäsion über die Integrine $\alpha3\beta1$ und $\alpha6\beta1$ an subendotheliales Laminin für eine erfolgreiche Transmigration erforderlich waren. Um diese These zu stützen sind weitere Untersuchungen zur Expression anderer Bindungspartner des Integrin $\beta1$ im Falle eines ITG $\alpha5$ -Knockdowns sinnvoll.

Sicherlich muss bei den vorliegenden Ergebnissen auch berücksichtigt werden, dass es sich um eine artifizielle Umgebung des Primärtumors handelt. Da die humanen Osteosarkomzellen subkutan injiziert wurden, unterscheidet sich die Mikroumgebung des Primärtumors stark von der ursprünglichen Umgebung im Knochengewebe. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass sich das Metastasierungsverhalten der verschiedenen Gruppen (Luc, shITG $\alpha5$ und shITG $\beta1$) deutlich voneinander unterscheidet. Der Einfluss der Mikroumgebung des Primärtumors kann in diesem Mausmodell zwar nicht hinreichend abgebildet werden, das Verhalten der Tumorzellen in diesem Modell zur spontanen Metastasierung bildet jedoch viele Schritte der metastatischen Kaskade sehr gut ab. Im Tierversuch zeigte sich ein deutlich vermindertes metastatisches Potenzial und eine langsamere Proliferation der HOS shITG $\beta1$ Zellen. Wie bereits anfänglich erwähnt, ist hierbei zu berücksichtigen, dass in den shITG $\beta1$ Zellen auch das Integrin $\alpha5$ herunterreguliert ist, so dass die Ergebnisse im Sinne einer verminderten Expression des Integrin $\alpha5\beta1$ zu interpretieren sind.

Das Integrin $\alpha5\beta1$ ist auch als primärer Fibronektinrezeptor bekannt. Entsprechend war die statische Adhäsionsfähigkeit an Fibronektin in vitro in der shITG $\beta1$ Gruppe statistisch signifikant niedriger als in der Luc Gruppe. In der shITG $\alpha5$ Gruppe war nur ein Trend zur reduzierten Adhäsion an Fibronektin nachzuweisen.

Es konnte von Shi et al. (2019) bereits gezeigt werden, dass Fibronektin im Osteosarkom überexprimiert wird. Eine erhöhte Fibronektin Expression ging in dieser Studie mit einem schlechten Ansprechen auf eine Chemotherapie und somit einem verringerten Gesamtüberleben einher (Shi et al., 2019). Dies könnte darauf hinweisen, dass eine vermehrte Bindung über das Integrin $\alpha5\beta1$ an Fibronektin dem Tumor einen Überlebens- und Verbreitungsvorteil bringt.

Ein Grund hierfür könnte die Anoikis-Resistenz der Tumorzellen sein. Um Zellen an ihrem Bestimmungsort zu halten und eine ungewollte Dissemination zu verhindern, löst die Trennung von Zell-Zell- oder Zell-ECM-Kontakten in der Zelle eine Kaskade aus, die in der Anoikis, einem programmierten Zelltod, endet (Paoli et al., 2013). Voraussetzung für eine Invasion und Metastasierung ist das Überleben der Tumorzellen trotz gestörter Interaktion mit der ECM oder umliegenden Zellen. Somit stellt die Anoikis-Resistenz eine wichtige Eigenschaft maligner Zellen dar (Cao et al., 2016). Sie ermöglicht es Zellen trotz der Loslösung aus festen Zellverbänden als disseminierte Zellen zu überleben. Von verschiedenen Integrinen, darunter dem Integrin $\alpha 5\beta 1$, ist bekannt, dass sie die Zelle vor der Apoptose und der Anoikis schützen können (Paoli et al., 2013). Cao et al. (2016) beschreiben, dass die Bindung über Integrin $\beta 1$ zu einer Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase und weiter zur Phosphorylierung der Tyrosinkinase Src führt. Die Aktivierung der Tyrosinkinase Src wird mit der Anoikisresistenz unter anderem in Osteosarkomen in Verbindung gebracht (Cao et al., 2016). Der Verlust von Integrin-vermittelter Zell-ECM-Interaktion (z. B. über Fibronectin) verringert die Phosphorylierung nachgeschalteter Effektoren (FAK oder PI3-K) und erhöht somit die Anfälligkeit der Zelle für Anoikis (Cao et al., 2016).

Das Integrin $\alpha 5\beta 1$ als Fibronectin-Rezeptor scheint auch in unseren Untersuchungen eine Rolle bezüglich des Wachstums- und des Metastasierungspotenzials der hier untersuchten HOS Osteosarkomzellen zu spielen und könnte ein vielversprechender Angriffspunkt für eine gezielte Therapie des Osteosarkoms sein.

In vorangegangenen Arbeiten wurde die funktionelle Rolle der Integrin $\alpha 5\beta 1$ Expression während der malignen Progression bereits kontrovers diskutiert. Insgesamt sprechen die meisten Studien für ein protumorales Verhalten dieses Integrins, wie es auch unsere Ergebnisse zeigen. Schaffner et al. (2013) beschreiben vor allem die proangiogene Eigenschaft des Integrin $\alpha 5\beta 1$. Da die Angiogenese eines Tumors eine wichtige Überlebensvoraussetzung darstellt, werden Integrin $\alpha 5\beta 1$ -Antagonisten bereits als potenziell antiangiogene Wirkstoffe vorgestellt und getestet. Mit MINT1526A steht z. B. ein monoklonaler Antikörper gegen ITG $\alpha 5\beta 1$ zur Verfügung, der bereits 2018 in einer klinischen Phase-I-Studie

getestet wurde (Weekes et al., 2018). Probanden dieser Studie litten an fortgeschrittenen unheilbaren oder metastasierten soliden Tumoren unterschiedlicher Entitäten. Primäres Ziel der Studie war es vorerst die Verträglichkeit zu testen und die passende Dosis zu finden (Weekes et al., 2018). Weitergehende, auch klinische Studien mit diesen Wirkstoffen könnten in Zusammenschau der Ergebnisse sinnvoll und erfolgversprechend sein.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass sowohl das Integrin $\alpha 5$ als auch das Integrin $\beta 1$ eine Bedeutung für die Proliferation, Migration und die Metastasierung maligner Tumoren besitzen.

Ein Integrin $\beta 1$ Knockdown, der mit einer verminderten Integrin $\alpha 5$ Expression einhergeht, führt zu einer signifikanten Reduktion der Metastasierung der Osteosarkomzellen (HOS) in die Lunge und zu einer verringerten Proliferation des Primärtumors. Das Integrin $\alpha 5\beta 1$ scheint daher als potenzieller Angriffspunkt für eine antitumorale Therapie des Osteosarkoms erfolgversprechend zu sein.

Der Integrin $\alpha 5$ Knockdown führte in unseren Versuchen zu einer vermehrten Metastasierung in die Lunge, was möglicherweise auf sekundäre Veränderungen des Expressionsmusters der Tumorzellen zurückzuführen ist.

Das Integrin $\alpha 5$ scheint folglich als alleiniges Angriffsziel einer Osteosarkom Therapie nicht sinnvoll zu sein und könnte im Gegenteil einen negativen Einfluss auf das Metastasierungsverhalten der Osteosarkomzellen haben.

Ein genetischer Knockdown kann zu weitergehenden Veränderungen des Expressionsmusters einer Zelle führen, wie bei dem hier untersuchten ITG $\beta 1$ Knockdown nachzuweisen war. Bei therapeutischen Ansätzen mit Integrin-Antikörpern ist dieses Risiko sicherlich geringer, muss aber trotzdem bedacht werden.

7 Zusammenfassung

Das Osteosarkom ist der häufigste maligne Knochentumor des Menschen. Oft wird es erst in einem bereits fortgeschrittenen, metastasierten Stadium diagnostiziert. Nach wie vor überleben 30 % der erkrankten Patient:innen nicht, so dass weiterhin ein großer Bedarf besteht, die Diagnostik und die Therapie des Osteosarkoms zu verbessern und somit auch die Prognose für betroffene Patient:innen.

Integrine sind maßgeblich an der Interaktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt und spielen somit auch bei Krebszellen, wie den hier untersuchten Osteosarkomzellen, eine bedeutende Rolle für die Migration, Proliferation und die Metastasierung. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung des Integrin $\alpha 5$ und Integrin $\beta 1$ in vitro und in vivo untersucht werden. Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass ein genetischer ITG $\beta 1$ Knockdown mit einer verminderten Integrin $\alpha 5$ Expression einhergeht, so dass kein isolierter ITG $\beta 1$ Knockdown, sondern ein ITG $\alpha 5\beta 1$ Knockdown untersucht wurde.

In vitro zeigte sich eine signifikant verminderte Migration der Tumorzellen der beiden Knockdown Gruppen, wobei die shITG $\beta 1$ Zellen am langsamsten migrierten.

Eine verminderte ITG $\alpha 5\beta 1$ Expression führte im Tierversuch zu einer signifikant verringerten Metastasierung in die Lunge. Mikroskopisch fanden sich keine Lungenmetastasen in dieser Gruppe und auch in der quantitativen Alu PCR wurden signifikant weniger Tumorzellen in den Lungen der shITG $\beta 1$ Gruppe gefunden. Eine verminderte Integrin $\alpha 5$ Expression führte hingegen zu einer höheren Metastasenlast in der Lunge, was möglicherweise auf sekundäre Veränderungen im Zelladhäsions-Expressionsmuster der Tumorzellen zurückzuführen ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ einen entscheidenden Einfluss auf das Migrationsverhalten der HOS Osteosarkomzellen und eine große Bedeutung für das Metastasierungsverhalten dieser Osteosarkomzellen im Tierversuch haben. Insbesondere das Integrin $\alpha 5\beta 1$ scheint als Angriffspunkt für eine antitumorale und antimetastatische Therapie des Osteosarkoms in Frage zu kommen. Mit dem monoklonalen Antikörper MINT1526A, der bereits in klinischen Studien getestet wird, könnte ein potenzieller medikamentöser Ansatz für das Osteosarkom zur Verfügung stehen.

8 Summary

Osteosarcoma is the most common malignant bone tumor in humans. It is often only diagnosed in an advanced, metastasized stage. As 30 % of patients with osteosarcoma do not survive, there is still a great need to improve the diagnosis and treatment of osteosarcoma and thus also the prognosis for affected patients.

Integrins are significantly involved in the interaction between cells and extracellular matrix (ECM) and thus play an important role in migration, proliferation and metastasis also in cancer cells, such as the osteosarcoma cells studied here. In this work, we aimed to investigate the importance of integrin $\alpha 5$ and integrin $\beta 1$ in vitro and in vivo. An important finding of this work is that genetic ITG $\beta 1$ knockdown is associated with decreased integrin $\alpha 5$ expression, so rather than the isolated ITG $\beta 1$ knockdown, ITG $\alpha 5\beta 1$ knockdown was investigated.

In vitro, there was significantly decreased migration of tumor cells from the two knockdown groups, with shITG $\beta 1$ cells migrating the slowest.

Decreased ITG $\alpha 5\beta 1$ expression resulted in significantly reduced metastasis to the lung in animal experiments. Microscopically, no lung metastases were found in this group, and quantitative Alu PCR also revealed significantly fewer tumor cells in the lungs of the shITG $\beta 1$ group. In contrast, decreased integrin $\alpha 5$ expression resulted in a higher metastatic burden in the lung, possibly due to secondary changes in the cell adhesion expression pattern of tumor cells.

Integrins $\alpha 5$ and $\beta 1$ were shown to have a crucial influence on the migratory behaviour of HOS osteosarcoma cells and a major role in the metastatic behaviour of these osteosarcoma cells in animal experiments. In particular, integrin $\alpha 5\beta 1$ seems to be a target for antitumor and antimetastatic therapy of osteosarcoma. The monoclonal antibody MINT1526A, which is already being tested in clinical trials, may provide a potential drug approach for osteosarcoma.

9 Abkürzungsverzeichnis

µl	<i>Mikroliter</i>
Abs.	<i>absolut</i>
AP	<i>alkalische Phosphatase</i>
Aqua dem.	<i>demineralisiertes Wasser</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CTC	<i>zirkulierende Tumorzellen</i>
DNA	<i>Desoxyribinukleinsäure</i>
DTC	<i>disseminierte Tumorzellen</i>
ECM	<i>Extrazelluläre Matrix</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymale Transition</i>
ER	<i>endoplasmatisches Retikulum</i>
FACS	<i>Flourescence-Activated Cell Sorting</i>
ggf.	<i>gegebenenfalls</i>
h.	<i>Stunden</i>
H.E.	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IL-α1	<i>Interleukin α1</i>
ITGα5	<i>Integrinα5</i>
ITGβ1	<i>Integrinβ1</i>
LP	<i>Lektinpuffer</i>
MET	<i>mesenchymal-epitheliale Transition</i>
mg	<i>Milligramm</i>
ml	<i>Milliliter</i>
MMP	<i>Matrix-Metalloproteasen</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomographie</i>
nm	<i>Nanometer</i>
OS	<i>Osteosarkom</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Kettenreaktion</i>
RGD	<i>Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>

RPMI *Roswell Park Memorial Institute*
SCID.....*Severe combined immune deficiency mice*
shITG α 5*genetischer Integrin α 5 Knockdown*
shITG β 1*genetischer Integrin β 1 Knockdown*
shRNA *short hairpin RNA*
TBS *Tris Buffered Saline*
z.B. *zum Beispiel*

10 Quellenverzeichnis

- Anderson, L. R., Owens, T. W. & Naylor, M. J. (2014) „Structural and mechanical functions of integrins“, *Biophysical reviews* 6 (2): 203–213.
- Cao, Z., Livas, T. & Kyprianou, N. (2016) „Anoikis and EMT: Lethal "Liaisons" during Cancer Progression“, *Critical reviews in oncogenesis* 21 (3-4): 155–168.
- Chen, M. B., Lamar, J. M., Li, R., Hynes, R. O. & Kamm, R. D. (2016) „Elucidation of the roles of tumor integrin β 1 in the extravasation stage of the metastasis cascade“, *Cancer research* 76 (9): 2513–2524.
- Corre, I., Verrecchia, F., Crenn, V., Redini, F. & Trichet, V. (2020) „The Osteosarcoma Microenvironment: A Complex But Targetable Ecosystem“, *Cells* 9 (4): 976.
- Dürr, H. R. (2014) „Knochtumoren“, in Bartl, R. (Hg.) *Klinische Osteologie: Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG. 310–321.
- Dürr, H. R., Eisenhart-Rothe, R. von, Feuchtinger, T., Lindner, L., Nathrath, M., Schmid, I. & Teichert-von Lüttichau, I. (2017) „Multidisziplinäre Therapie des Osteosarkoms“, in München, T. & Lindner, L. (Hg.) *Knochtumoren und Weichteilsarkome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 6. Aufl., München, W. Zuckschwerdt Verlag. 122–127.
- Erdmann, F., Kaatsch, P. & Spix, C. (2020) *Annual Report 2019 (1980-2018)*, Mainz, University Medical Center of the Johannes Gutenberg Universität Mainz. [Online im Internet] URL: <https://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ergebnisse/jahresberichte/jahresbericht-2019.html>, [Stand: 27.12.2021, 12:57].
- Ferguson, J. L. & Turner, S. P. (2018) „Bone Cancer: Diagnosis and Treatment Principles“, *American family physician* 98 (4): 205–213.

- Friedl, P. & Alexander, S. (2011) „Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity“, *Cell* 147 (5): 992–1009.
- Ganguly, K. K., Pal, S., Moulik, S. & Chatterjee, A. (2013) „Integrins and metastasis“, *Cell adhesion & migration* 7 (3): 251–261.
- Gomatou, G., Syrigos, N., Vathiotis, I. A. & Kotteas, E. A. (2021) „Tumor Dormancy: Implications for Invasion and Metastasis“, *International journal of molecular sciences* 22 (9): 4862.
- Gómez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B. & Brunton, V. G. (2017) „Mouse models of metastasis: progress and prospects“, *Disease Models & Mechanisms* 10 (9): 1061–1074.
- Hou, J., Du Yan, Liu, Y., Huang, P. & Cui, H. (2020) „The Roles of Integrin $\alpha 5\beta 1$ in Human Cancer“, *OncoTargets and therapy* 13: 13329–13344.
- Humphries, J. D., Byron, A. & Humphries, M. J. (2006) „Integrin ligands at a glance“, *Journal of cell science* 119 (Pt 19): 3901–3903.
- Hynes, R. O. (2002) „Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines“, *Cell* 110 (6): 673–687.
- Jojovic, M. & Schumacher, U. (2000) „Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into SCID mice“, *Cancer letters* 152 (2): 151–156.
- Kahlert, U. D., Joseph, J. V. & Kruyt, F. A. E. (2017) „EMT- and MET-related processes in nonepithelial tumors: importance for disease progression, prognosis, and therapeutic opportunities“, *Molecular Oncology* 11 (7): 860–877.

- Kannagi, R., Ohmori, K. & Kimura, N. (2009) „Anti-oligosaccharide antibodies as tools for studying sulfated sialoglycoconjugate ligands for siglecs and selectins“, *Glycoconjugate journal* 26 (8): 923–928.
- Khaustova, N. A., Maltseva, D. V., Oliveira-Ferrer, L., Stürken, C., Milde-Langosch, K., Makarova, J. A., Rodin, S., Schumacher, U. & Tonevitsky, A. G. (2017) „Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis“, *Biochimie* 142: 197-206.
- Kimura, H., Tome, Y., Momiyama, M., Hayashi, K., Tsuchiya, H., Bouvet, M. & Hoffman, R. M. (2012) „Imaging the inhibition by anti- β 1 integrin antibody of lung seeding of single osteosarcoma cells in live mice“, *International journal of cancer* 131 (9): 2027–2033.
- Kraywinkel, K. (2018) „Faktenblatt Epidemiologie bösartiger Knochtumoren in Deutschland“, *Der Onkologe* 24 (3): 192–198.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. (2017) „EMERGING BIOLOGICAL PRINCIPLES OF METASTASIS“, *Cell* 168 (4): 670–691.
- Lange, T., Kupfernagel, M., Wicklein, D., Gebauer, F., Maar, H., Brügge, K., Müller, I., Simon, R., Schlomm, T., Sauter, G. & Schumacher, U. (2014) „Aberrant presentation of HPA-reactive carbohydrates implies Selectin-independent metastasis formation in human prostate cancer“, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (7): 1791–1802.
- Lilienthal, I. & Herold, N. (2020) „Targeting Molecular Mechanisms Underlying Treatment Efficacy and Resistance in Osteosarcoma: A Review of Current and Future Strategies“, *International journal of molecular sciences* 21 (18): 6885.

- Liu, X.-Z., Li, C.-J., Wu, S.-J., Shi, X. & Zhao, J.-N. (2016) „Involvement of $\alpha 5$ integrin in survivin-mediated osteosarcoma metastasis“, *Asian Pacific journal of tropical medicine* 9 (5): 478–483.
- McEver, R. P. (2015) „Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall“, *Cardiovascular Research* 107 (3): 331–339.
- McEver, R. P. & Zhu, C. (2010) „Rolling cell adhesion“, *Annual review of cell and developmental biology* 26: 363–396.
- Moch, H., Höfler, H. K., Lax, S., Moll, R., Tannapfel, A. & Zimmermann, D. R. (2019) „Tumorerkrankungen“, in Höfler, G., Kreipe, H. H. & Moch, H. (Hg.) *Pathologie: Das Lehrbuch*, 6. Aufl., München, Elsevier Urban & Fischer. 132–178.
- Odagiri, H., Kadomatsu, T., Endo, M., Masuda, T., Morioka, M. S., Fukuhara, S., Miyamoto, T., Kobayashi, E., Miyata, K., Aoi, J., Horiguchi, H., Nishimura, N., Terada, K., Yakushiji, T., Manabe, I., Mochizuki, N., Mizuta, H. & Oike, Y. (2014) „The secreted protein ANGPTL2 promotes metastasis of osteosarcoma cells through integrin $\alpha 5\beta 1$, p38 MAPK, and matrix metalloproteinases“, *Science signaling* 7 (309): ra7.
- Orr, F. W., Wang, H. H., Lafrenie, R. M., Scherbarth, S. & Nance, D. M. (2000) „Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis“, *The Journal of Pathology* 190 (3): 310–329.
- Paoli, P., Giannoni, E. & Chiarugi, P. (2013) „Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression“, *Biochimica et biophysica acta* 1833 (12): 3481–3498.
- Sannino, G., Marchetto, A., Kirchner, T. & Grunewald, T. G.P. (2017) „Epithelial-to-Mesenchymal and Mesenchymal-to-Epithelial Transition in Mesenchymal Tumors: A Paradox in Sarcomas?“, *Cancer research* 77 (17): 4556-4563.

- Schaffner, F., Ray, A. M. & Dontenwill, M. (2013) „Integrin $\alpha 5\beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors“, *Cancers* 15: 27–47.
- Schmidt, M., Schubert-Fritschle, G. & Engel, J. (2017) „Epidemiologische Kenngrößen und Prognose“, in München, T. & Lindner, L. (Hg.) *Knochentumoren und Weichteilsarkome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 6. Aufl., München, W. Zuckschwerdt Verlag. 1–10.
- Schwankhaus, N., Gathmann, C., Wicklein, D., Riecken, K., Schumacher, U. & Valentiner, U. (2014) „Cell adhesion molecules in metastatic neuroblastoma models“, *Clinical & experimental metastasis* 31 (4): 483–496.
- Seguin, L., Desgrosellier, J. S., Weis, S. M. & Cheresh, D. A. (2015) „Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance“, *Trends in cell biology* 25 (4): 234–240.
- Shi, K., Wang, S.-l., Shen, B., Yu, F.-q., Weng, D.-f. & Lin, J.-h. (2019) „Clinicopathological and prognostic values of fibronectin and integrin $\alpha \beta 3$ expression in primary osteosarcoma“, *World Journal of Surgical Oncology* 17 (1): 23.
- Si, J., Wang, C., Zhang, D., Wang, B., Hou, W. & Zhou, Y. (2020) „Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases“, *Medical Science Monitor* 26.
- Stewart, R. L. & O'Connor, K. L. (2015) „Clinical significance of the integrin $\alpha 6\beta 4$ in human malignancies“, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 95 (9): 976–986.
- Strell, C. & Entschladen, F. (2008) „Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells“, *Cell Communication and Signaling: CCS* 6: 10.
- Takada, Y., Ye, X. & Simon, S. (2007) „The integrins“, *Genome Biology* 8 (5): 1–9.

- Wagener, C. & Müller, O. (2010) *Molekulare Onkologie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 287.
- Weber, K., Mock, U., Petrowitz, B., Bartsch, U. & Fehse, B. (2010) „Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis“, *Gene therapy* 17 (4): 511–520.
- Weber, K., Thomaschewski, M., Benten, D. & Fehse, B. (2012) „RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking“, *Nature protocols* 7 (5): 839–849.
- Weekes, C. D., Rosen, L. S., Capasso, A., Wong, K. M., Ye, W., Anderson, M., McCall, B., Fredrickson, J., Wakshull, E., Eppler, S., Shon-Nguyen, Q., Desai, R., Huseni, M., Hegde, P. S., Pourmohamad, T., Rhee, I. & Bessudo, A. (2018) „Phase I study of the anti- $\alpha 5\beta 1$ monoclonal antibody MINT1526A with or without bevacizumab in patients with advanced solid tumors“, *Cancer chemotherapy and pharmacology* 82 (2): 339–351.
- Welsch, U. & Kummer, W. (2018) „Gewebe“, in Welsch, U. & Kummer, W. (Hg.) *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie*, 5. Aufl., München, Elsevier. 115–146.
- Yiallourous, M. & Tallen, G. (2022) *Osteosarkom (Kurzinformation)*, Berlin, Pediatric Oncology and Hematology Publications. [Online im Internet] URL: https://www.gpoh.de/sites/gpoh/kinderkrebsinfo/content/e9031/e10591/e77088/e63957/e74483/OsteosarkomKurzinfo20062022_ger.pdf [Stand: 17.12.2022, 14:39].
- Yu, X., Yustein, J. T. & Xu, J. (2021) „Research models and mesenchymal/epithelial plasticity of osteosarcoma“, *Cell & Bioscience* 11: 94.

Zarbock, A. & Ley, K. (2008) „Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium“, *The American journal of pathology* 172 (1): 1–7.

11 Danksagung

Es war ein langer Weg bis zum Verfassen dieser letzten Worte, den ich nicht allein gegangen bin. An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir geholfen haben diesen Weg zu Ende zu gehen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin und Doktormutter Frau PD Dr. med. Ursula Valentiner für das Überlassen dieser Thematik und die gute Betreuung bedanken.

Von Herzen danke ich Dir für die konstruktive und freundschaftliche Zusammenarbeit. Es war ein wirklich langer Weg und ich bin Dir unendlich dankbar, dass ich auch nach einer langen Pause auf deine Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit bauen konnte. Ohne deine Unterstützung läge diese Arbeit vermutlich immer noch als halbfertige Datei auf meinem Computer.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher, ehemaliger Leiter des Instituts für Anatomie und experimentelle Morphologie, für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit an seinem Institut.

Mein besonderer Dank gilt auch den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und experimentelle Morphologie, die mich während meiner Arbeit im Labor 2014 und 2015 begleitet haben. Ohne eure Hilfe hätte ich viele meiner Versuche nicht durchführen können. Vielen Dank für eure Unterstützung.

Vom Beginn der experimentellen Versuche im Labor bis zur Fertigstellung dieser Dissertationsschrift sind viele Jahre vergangen. Was ich als junge Studentin begonnen habe, beende ich nun als Ärztin und Mutter zweier wunderbarer Kinder. Meinem Mann und meinen beiden Kindern bin ich so dankbar, dass Sie mir die Zeit und den Raum gegeben haben, diese Arbeit zu beenden. Danke für die Zeit, die Ihr mir freigeräumt habt und die Kraft, die Ihr mir während unserer gemeinsamen Stunden gegeben habt. Danke für eure Entbehrungen in den letzten Monaten.

Eine große Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit waren meine engsten Freunde. Ihr habt mir immer zugehört und mir Mut gemacht. Ich bin so froh, dass es Euch gibt und Ihr mich auf meinem Lebensweg begleitet. Danke.

Während meiner gesamten akademischen Laufbahn haben mich meine Eltern immer begleitet und unterstützt. Ohne Euch, Mama und Papa, wäre ich heute nicht da, wo ich jetzt bin. Ihr habt immer an mich geglaubt. Ihr habt mir den Rücken frei gehalten. Ich danke Euch von ganzem Herzen für eure Liebe und eure bedingungslose Unterstützung.

Ihr habt mich immer darin bestärkt, diese Arbeit noch fertigzustellen und mir geholfen, nie aufzugeben. *Das ist Dogge Nummer 2.* Für Euch.

12 Lebenslauf

13 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: