

Charakterisierung von Tumorzellen, die am Metastasierungsgeschehen beteiligt sind

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften am
Department Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Mag. rer. nat. Katrin Stübke
aus Calau

Hamburg, Januar 2011

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Anatomie II am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Schumacher angefertigt und von Frau Dr. Nehmann betreut.

Gutachter: 1. Prof. Dr. Wolfgang Deppert, Heinrich-Pette-Institut Hamburg

2. Prof. Dr. Udo Schumacher, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Datum der Promotion: 01. April 2011

Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Das Mammakarzinom der Frau.....	3
1.1.1 Anatomischer Aufbau der weiblichen Brust.....	3
1.1.2 Einteilung in nichtinvasives und invasives Karzinom	4
1.1.3 Einteilung des Mammakarzinoms in 5 Subtypen.....	6
1.1.4 Maligne Progression des Mammakarzinoms.....	7
1.2 Die Metastasierung als prognosebestimmender Faktor beim Mammakarzinom.....	7
1.3 Bedeutung der Zellmembran bei der Metastasierung.....	10
1.3.1 Rolle der Zelladhäsionsmoleküle	11
1.3.2 Bedeutung von Glykoproteinen der Zellmembran für die Metastasierung	11
1.3.3 Wechselwirkung zwischen Oligosacchariden und Lektinen.....	15
1.3.4 Selektinvermittelte Metastasierung von Tumorzellen.....	16
1.4 Untersuchungen an immundefizienten Mäusen.....	18
1.4.1 Prinzip der Selektindefizienzen.....	19
1.5 Fragestellungen und Zielsetzung.....	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Allgemein verwendete Materialien, Puffer, Medien und Lösungen	23
2.2 Eingesetzte Antikörper mit entsprechenden Isotypkontrollen.....	24
2.3 Zellbiologische Methoden.....	26
2.3.1 Verwendete humane Tumorzelllinien	26
2.3.2 Verwendete humane Kontrollzelllinie.....	26
2.3.3 Zellkulturbedingungen.....	26
2.3.4 Zellzahlbestimmung durch CASY.....	27
2.3.5 Detektion von Mykoplasmenkontamination in der Zellkultur.....	27
2.3.6 Durchflusszytometrische Analyse.....	28
2.4 Tierexperimentelles Arbeiten.....	30
2.4.1 Scid Mausmodell.....	30
2.4.2 Scid select Mausmodell.....	30
2.4.3 pfp/rag2 Mausmodell.....	31
2.4.4 pfp/rag2 Mausmodell mit Selektindefizienzen.....	31
2.4.5 Tumorentstehung durch Injektion von humanen Tumorzellen.....	31
2.4.6 MRT Messung tumortragender Tiere.....	32
2.4.7 Gewebe- und Blutentnahme	34
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	34
2.5.1 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen und Blut.....	34
2.5.2 Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwanzbiopsien.....	34
2.5.3 Isolierung von RNA aus humanen Tumorzellen und Mausblut.....	35
2.5.4 Isolierung von RNA aus Tumormaterial.....	35
2.5.5 Qualitätskontrolle der präparierten Nukleinsäuren.....	36
2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
2.5.7 Mykoplasmenachweis durch PCR Analyse.....	37
2.5.8 Genotypisierung der pfp/rag2 Knock-out Mäuse mit Selektindefizienzen.....	38
2.5.9 Absolute Quantifizierung humaner Tumorzellen im Mausblut mittels Alu-PCR System.....	39
2.5.10 Reverse Transkriptase PCR.....	40
2.5.11 Quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion (qRT PCR).....	40

2.5.12 Primerdesign und semi nested PCR.....	43
2.5.13 PCR Array.....	44
2.5.14 Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	46
2.6 Proteinchemische Methoden.....	46
2.6.1 Gewinnung von Membranproteinen aus Zellen.....	46
2.6.2 Gewinnung von Gesamtzelllysaten.....	47
2.6.3 Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte.....	47
2.6.4 Dotplot Analyse.....	48
2.6.5 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	49
2.6.6 Proteinnachweis durch Coomassiefärbung.....	49
2.6.7 Proteintransfer.....	50
2.6.8 Proteinfärbung mit Ponceau S	50
2.6.9 Immunodetektion membrantransferierter Proteine.....	51
2.7 Histologie und Immunhistologie	51
2.7.1 Anfertigung von Zytospins und Chamberslides.....	51
2.7.2 Zellen in Agarose.....	51
2.7.3 Einbettung von Mausgewebe.....	52
2.7.4 Hämatoxylin Eosin Färbung zur Bestimmung von Lungenmetastasen.....	52
2.7.5 Immunhistochemie.....	53
2.7.5.1 Antigen-Demaskierungs-Methoden.....	54
2.7.5.2 Avidin-Biotin-Methode.....	54
2.7.5.3 ABC-Methode mit Tyramid-Signalverstärkung (CSA).....	55
2.7.6 Lektinhistochemie.....	56
2.8 Statistische Analyse.....	56
3 Ergebnisse.....	57
3.1 Oberflächenanalyse der humanen Tumorzellen (in vitro)	57
3.1.1 Expressionsanalyse der kultivierten Tumorzelllinien.....	57
3.1.2 Charakterisierung der Oberflächenmoleküle von Mammakarzinomzellen auf Selektinliganden und Selektinbindungsstellen.....	59
3.1.3 Analyse von Tumormarkern auf der DU4475 Tumorzelllinie	63
3.2 Etablierung der E- und P-Selektin einzel- sowie doppeldefizienten Mauslinien	63
3.3 Mammakarzinom Xenograft-Mausmodelle (in vivo)	65
3.3.1 Tierexperimente.....	65
3.3.2 MRT Untersuchungen der Tiergruppen mit Primärtumor	65
3.3.3 Histologische Charakterisierung der verschiedenen Mauslinien.....	68
3.3.3.1 Histologische Analyse des Organbefalls nach MRT Untersuchung.....	68
3.3.3.2 Tumorbildung bei scid und pfp/rag2 Mauslinien.....	69
3.3.3.3 Gewicht der Primärtumore	71
3.3.3.4 Wachstumsdauer der Primärtumore.....	74
3.3.3.5 Bestimmung der Metastasenanzahl im Lungengewebe.....	77
3.3.4 Bestimmung der zirkulierenden Tumorzellen im Blut.....	82
3.3.5 Analyse disseminierter Tumorzellen im Knochenmark der Maus.....	83
3.4 Relative Quantifizierung vom Gewebe der Mäuse.....	84
3.4.1 Quantitative PCR mittels Roche LightCycler 480 und 2.0	84
3.4.1.1 Spezifität der Kandidatengene.....	84
3.4.1.2 EpCAM Untersuchung am Gewebe und Blut der entsprechenden Mauslinie	85
3.4.1.3 Mammaglobin1 Untersuchung am Gewebe und Blut der entsprechenden Mauslinie.....	90
3.4.2 PCR Array zur Analyse der metastasierenden DU4475 Zelllinie gegenüber dem Primärtumor.....	93
3.5 Proteinanalyse	94
3.6 Einwanderung von Makrophagen ins Tumorgewebe.....	96

3.7 Vergleich der Metastasierungseigenschaften der selektindefizienten gegenüber den selektinkompetenten Mäusen	97
3.8 Untersuchung der Expressionsmarker am Gewebe der Maus.....	99
4 Diskussion.....	103
4.1 Charakterisierung der DU4475 Tumorzelllinie auf Selektinliganden und Tumormarkern.....	103
4.2 Tumorgröße bei den verschiedenen Mausmodellen.....	104
4.3 Rekrutierung von murinen Makrophagen im Tumor.....	105
4.4 Metastasierungsanalyse durch in vivo Tiermodelle	105
4.5 Metastasierungsrate der DU4475 Tumorzelllinie.....	106
4.6 Morphologie und Vorkommen der DU4475 Tumorzellen als Metastasen.....	106
4.7 Problematik der Mikrometastasen und Metastasen auf Einzelzellebene	107
4.8 Metastasierung in selektinkompetenten und -defizienten Tieren	107
4.9 Knochenmarksmetastasen in den Tiermodellen.....	111
4.10 Expressionsmuster der Tumormarker in Zellkulturzellen, Primärtumor, Blut und Lunge	113
4.11 EpCAM Interaktion bei Zelladhäsion, Migration und Metastasierung.....	115
4.12 Expressionsanalyse der Fukosyltransferase3 im Primärtumor der Tiere.....	116
4.13 Immunhistologische Färbung von EpCAM und Mucin1.....	117
4.14 Expression von Mucin1 bei der Metastasierung	118
4.15 Lektinhistochemie zum Vergleich der Oberflächenglykosylierung der Tumorzellen	118
4.16 Ausblick und Therapieansätze	119
5 Zusammenfassung	120
6 Summary.....	122
7 Literaturverzeichnis.....	123
8 Anhang	136
8.1 Überblick zu allen gesammelten tierexperimentellen Daten.....	136
8.2 PCR Array für Gene der Zellzell- sowie Zellmatrixinteraktion.....	136
8.3 Sicherheitstechnische Daten.....	140
8.3.1 Gefahrenstoffe.....	140
8.3.2 Verzeichnis der Gefahrensymbole.....	141
8.3.3 Verzeichnis der R- und S-Sätze.....	141
8.4 Poster, Vorträge, Kongressteilnahmen.....	144
9 Danksagung.....	145
Eidesstattliche Erklärung.....	146

I Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	FAM	6-Carboxy Fluorescein
λ	Wellenlänge	FCS	Fötales Kälberserum
μ	Mikro- (10^{-6})	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
%	Prozent	FOV	<i>field of view</i>
Abb.	Abbildung	FRET	Fluoreszenz Resonanz Energietransfer
ACTB	β -Actin	FUT	Fukosyltransferase
APC	Allophycocyanin	g	Gramm
APS	Ammoniumpersulfat	G	Guanin
Aqua dest.	destilliertes Wasser	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	GSA-I	<i>Griffonia simplicifolia</i> Agglutinin
B2M	β 2-Mikroglobulin	h	Stunde
BCA	Bicinchoninsäure	HE	Hämatoxylin-Eosin
bp	Basenpaar(e)	Her2neu	Herceptin-Rezeptor-2neu
BSA	Rinderserumalbumin	HPA	<i>Helix pomatia</i> Agglutinin
C	Cytosin	HRP	Meerrettichperoxidase
CASY	<i>cell counter analysis system</i>	Ig	Immunglobulin
cDNA	<i>complementary DNA</i>	ITG	Integrin
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>	kbp	Kilobasenpaar
CK	Zytokeratin	kD	Kilodalton
Ct	<i>cycle threshold</i> (für Schwellenwert)	l	Liter
CTC	zirkulierende Tumorzellen	LCIS	lobuläres Karzinom <i>in situ</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol- Dihydrochlorid	LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
DCIS	duktales Karzinom <i>in situ</i>	M	Molar (g/mol)
DEPC	Diethyldicarbonat	m	Milli- (10^{-3})
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'- triphosphat	Mam1	Mammaglobin1
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	Mb	Megabasen
DTC	disseminierte Tumorzellen	min	Minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	MRT	Magnetresonanztomographie
EMT	epitheliale mesenchymale Transition	n	Nano- (10^{-9})
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
EtOH	Ethanol	OD	Optische Dichte
f	Femto- (10^{-15})	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
FA	<i>fip angle</i> (Drehwinkel)	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
		PE	Phycoerythrin

PFA	Paraformaldehyd	TDLE	terminale duktulolobuläre Einheit
pfp	<i>pore forming protein (perforin)</i>	TE	Echozeit
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamid
PSGL1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>	Tm	Hybridisierungstemperatur der Primer
rag2	<i>recombinase activating gene 2</i>	TR	<i>time of repetition</i> (Repetitionszeit)
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungszahl)	TSE	Turbo Spin Echo Sequenz
RT	Raumtemperatur	U	Unit (Maß für Enzymaktivität)
scid	<i>severe combined immunodeficiency</i>	ü. N.	über Nacht
SD	Standardabweichung	UPL	<i>Universal ProbeLibrary</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat	V	Volt
SEM	prozentuale Standardabweichung	VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>	W	Watt
Tab.	Tabelle	z. B.	zum Beispiel
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer		
TBS	Tris gepufferte Salzlösung		

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom der Frau

Beim Brustkrebs (Mammakarzinom, Carcinoma mammae) handelt es sich um einen invasiven, d. h. in das Gewebe wachsenden malignen Tumor. Dieser Tumor gehört zu der Gruppe der sogenannten Adenokarzinome, die aus bösartig verändertem Drüsengewebe hervorgehen. Das Mammakarzinom zählt mit einem Anteil von 29 % aller Krebsneuerkrankungen zur häufigsten Krebserkrankung bei Frauen. Die Inzidenz ist in Deutschland seit 1980 bis etwa ins Jahr 2000 stetig angestiegen, seitdem ist die Rate in etwa gleichbleibend und beträgt momentan etwa 58000 Frauen pro Jahr [GEKID und RKI 2010]. Jede zehnte bis elfte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens am Mammakarzinom, wobei die Mortalitätsrate seit Beginn der 1990er Jahre rückläufig ist. Das Erkrankungsrisiko steigt ab dem vierten Lebensjahrzehnt mit zunehmendem Alter allmählich an. Zu den allgemeinen Risikofaktoren am Mammakarzinom zu erkranken gehört der Lebensstil (beispielsweise Übergewicht, Alkoholkonsum), der hormonelle Status und die genetische Disposition. Die genetische Disposition beim Mammakarzinom wird in der Literatur bei etwa 5–10 % der Fälle als Ursache gesehen [Chang-Claude 1997], wobei Risikogene wie *BRCA1* und das *BRCA2* bekannt sind. Um das klinische Bild des Mammakarzinoms verstehen zu können, muss der normale Aufbau der weiblichen Brust erfasst werden.

1.1.1 Anatomischer Aufbau der weiblichen Brust

Das gesunde Gewebe der Brustdrüse (Mamma) besteht aus Drüsengewebe, Fettgewebe und umliegendem Bindegewebe. Das Drüsengewebe unterteilt sich in 20-30 von einander abgegrenzte Lappen (Lobi glandulae mammariae), die jeweils mit einem eigenen Hauptausführungsgang (Ductus lactifer colligens) auf der Brustwarze münden. Ein Lobus ist aufgebaut wie ein Baum aus verzweigten Drüsengängen (Ductus lactiferi) an deren Enden sich kleinere Drüsenläppchen (Lobuli glandulae mammariae) befinden, die die Milch produzieren und diese anschließend in kleine Drüsengänge abgeben. Die Drüsenendstücke (Azini) münden über terminale, subsegmentale und segmentale Drüsengänge in die Milchsäckchen (Sinus lactifer), welche wiederum über die Brustwarze nach außen führen. Als terminale duktulolobuläre Einheit (TDLE) bezeichnet man das terminale Gangsegment mit dem dazugehörenden Läppchen. Sie stellt das Bauelement der

Milchdrüse dar. Die Drüsen und Milchgänge sind von gefäß- und fettreichem, derben Bindegewebe umgeben. Die Milchgänge sind aus einem zweischichtigen kubischen Epithel aufgebaut, dessen basale Schicht aus kontraktiven Myoepithelzellen besteht.

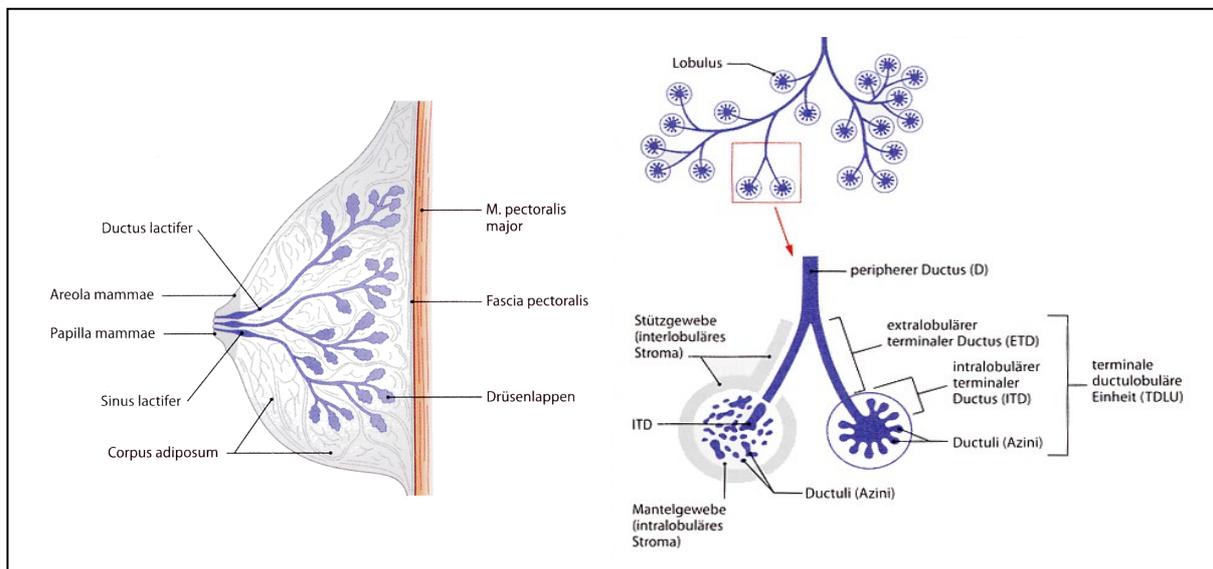


Abbildung 1.1: Aufbau der Brustdrüse mit Medianschnitt durch die Brustdrüse mit Darstellung der Drüsenlappen a) und schematischer Darstellung der terminalen ductulolobulären Einheit (TDLE) und ihrer Untereinheiten b). Die meisten Teile der TDLE sind von intralobulärem Stroma (Mantelgewebe) umgeben. Die Abbildungen wurden nach Zilles und Tillmann (2010) modifiziert.

Die Morphologie der Läppchen bei der nichtlaktierenden und der laktierenden Brustdrüse ist sehr unterschiedlich. In der nichtlaktierenden Brustdrüse, wie in der Abb. 1.1 dargestellt, sind die Läppchen klein und bestehen aus rudimentären Endstücken. Dagegen besitzt die laktierende Drüse große Läppchen und weite Alveolen.

Die Form und Größe der Brustdrüse entwickelt sich während der Pubertät und verändert sich auch im Laufe des Monatszyklus sowie mit dem Alter. Wenn der Hormonspiegel (Östrogene, Gestagene) während des Zyklus ansteigt, bereitet sich der Körper auf eine mögliche Schwangerschaft vor. Es fließt mehr Blut durch die Brust, und Wasser sammelt sich im Gewebe an. Mit zunehmendem Alter verändert sich das Verhältnis von Fettgewebe zu Binde- und Drüsengewebe. Beträgt es in der Jugend noch eins zu zwei, überwiegt später der Anteil des Fettgewebes.

1.1.2 Einteilung in nichtinvasives und invasives Karzinom

Das Mammakarzinom entsteht meistens im oberen äußeren Viertel der Brust, in dem der größte Anteil an Drüsengewebe vorkommt. In der Regel entstehen die Karzinome durch ungehemmte Proliferation der Gangepithelien oder der Endstücke der

Läppchen [Wellings *et al.*, 1975]. Im intralobulären Stroma, den Myoepithelzellen, liegen Stammzellen, aus denen die Proliferation der Gangepithelien und die Differenzierung der Endstücke während des Umbaus zur laktierenden Brustdrüse hervorgeht [Dimri *et al.*, 2005].

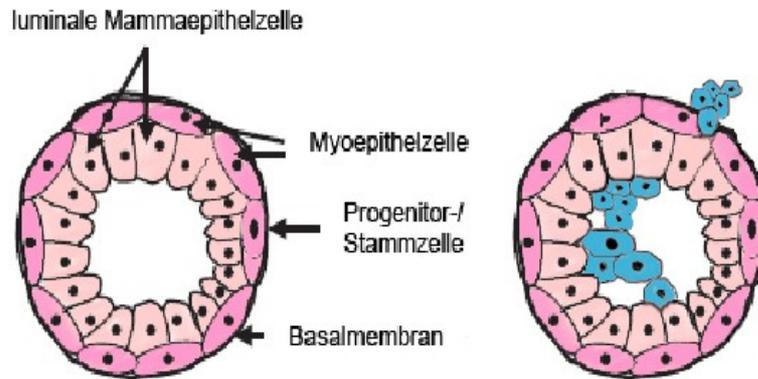


Abbildung 1.2: Darstellung des Milchganges bei einer normalen Brustdrüse a) und bei einem invasiven duktalem Karzinom des Milchganges b), welches sich aus den Vorstufen des duktalem Karzinom *in situ* (DCIS) entwickelt hat. Die entarteten Mammaepithelzellen sind blau hervorgehoben.

Die häufigste Form ist das duktales Mammakarzinom, das von der Zellschicht an der Innenseite der Milchgänge ausgeht (siehe Abb. 1.2), welches bei 85 % der Mammakarzinompatientinnen auftritt. Beim duktalem Mammakarzinom breiten sich die Tumorzellen zunächst nur innerhalb der Milchgänge und Läppchen aus und wachsen nicht in das Nachbargewebe ein. Wenn das duktales Karzinom *in situ* (DCIS) die Basalmembran der Milchgänge zerstört und in das angrenzende Stroma, später auch in das Lymphsystem und die Blutgefäße einwandert, spricht man von einem invasiven Karzinom.

Eine weitere Form ist das lobuläre Mammakarzinom, das vom Drüsenlappen ausgeht. Das lobuläre Karzinom *in situ* (LCIS) geht seltener in ein invasives Karzinom über als das DCIS und ist deshalb mit einem besseren Krankheitsverlauf assoziiert. Das invasive lobuläre Karzinom ist mit 10 % das zweithäufigste Karzinom. Seltenerer Formen des invasiven Mammakarzinoms sind z. B. das muzinöse, das medulläre, das papilläre und das tubuläre Karzinom, die alle eine vergleichsweise günstige Prognose haben.

Die meisten Tumore der Mamma sind jedoch gutartig. Es handelt sich dann überwiegend um vom Bindegewebe ausgehende Fibroadenomen, um Zysten oder um Fettgeschwulste (Lipome). Diese werden im folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Für die Prognose beim Mammakarzinom sind folgende Faktoren maßgeblich: die Größe des Primärtumors zum Diagnosezeitpunkt, die Ausbreitung des

Tumorgewebes regional in die Lymphknoten der Brust oder bis zur Achselhöhle und das Vorliegen von Fernmetastasen. Alle drei Eigenschaften werden in der TNM Klassifikation abgebildet. Die Abkürzung T beschreibt die Größe des Primärtumors, N den Befall regionaler Lymphknoten und M das Vorliegen von Fernmetastasen.

1.1.3 Einteilung des Mammakarzinoms in 5 Subtypen

Bei der Untersuchung verschiedener Mammakarzinome ergab eine Genchipanalyse fünf Subtypen dieser Karzinomform [Sørli *et al.*, 2001].

- luminal A (Progesteron/Östrogen positiv, Her2neu negativ)
- luminal B (Progesteron/Östrogen positiv, Her2neu positiv)
- *normal-like*
- Her2neu positiv
- *basal-like*

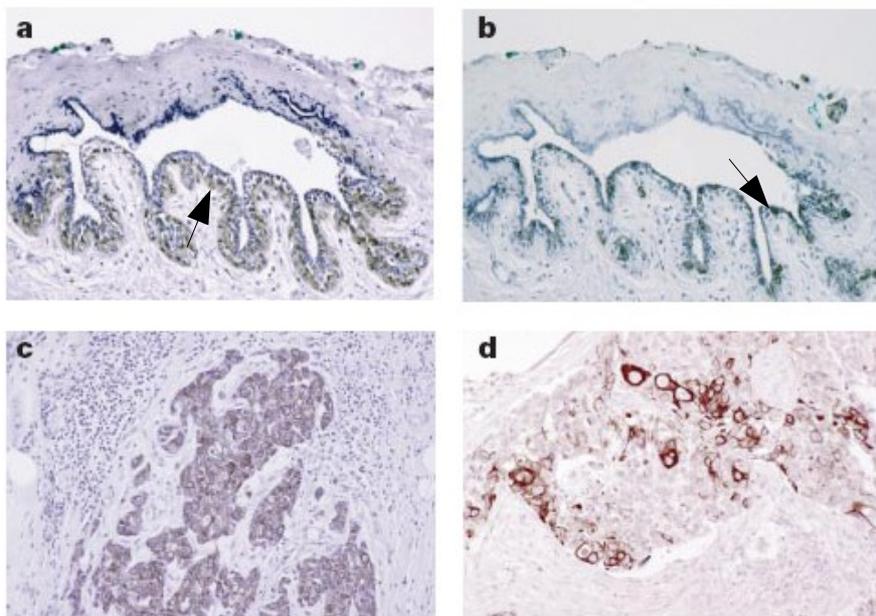


Abbildung 1.3: Immunhistologie an normalem (a, b) und malignem (c, d) Brustgewebe (luminales und basales Mammakarzinom) mit den humanen Antikörpern gegen Zytokeratin 5/6 und Zytokeratin 8/18 [Perou *et al.*, 2000].

Bei der gesunden Brustdrüse wurden in den Milchgängen die basalen Epithelzellen mit anti CK5/6 a) und die luminalen Epithelzellen mit anti CK8/18 dargestellt. Die Pfeile weisen auf die gefärbten Areale im Gewebe hin. Die Histologie vom malignen Brustgewebe zeigt mit dem Antikörper gegen das luminale CK8/18 entartete Epithelzellen im Stroma c) und mit dem Antikörper gegen CK5/6 entartete basale Epithelzellen d).

Die Progesteron/Östrogen Hormonrezeptor positiven Tumoren besitzen einerseits einen Phänotyp von luminalen Epithelzellen. Hierbei erfolgt eine zusätzliche Unterteilung in die Gruppe A mit Östrogen und/oder Progesteron positiven sowie Her2neu negativen Tumoren und in die Gruppe B mit Östrogen und/oder

Progesteron positiven sowie Her2neu positiven Tumoren [Carey *et al.*, 2006]. Andererseits zeigt ein Teil der Karzinome die Eigenschaften eines normalen Brustgewebes auf (*normal-like* mit 7,8 %). Östrogen negative Tumore dagegen sind Her2neu positiv (30 %) oder zeigen basale Eigenschaften (25 %) oder sind dreifach negativ (Östrogen, Progesteron und Her2neu negativ) [Smid *et al.*, 2008].

Die Begriffe luminal und basal beziehen sich auf die prinzipiellen Typen von Epithelzellen der Brustdrüse. Im normalen Brustgewebe sind die basalen Epithelzellen mit Antikörpern gegen Zytokeratin 5/6 detektierbar und zeigen einen Kontakt mit der Basalmembran, wohingegen luminal gelegene Epithelzellen das Zytokeratin 8/18 aufweisen. Basalzellen repräsentieren wahrscheinlich eine Kombination aus differenzierten Zelltypen mit hohem Proliferationspotential, während luminaire Zellen stärker differenziert sind.

1.1.4 Maligne Progression des Mammakarzinoms

Karzinome, die 80 % der malignen Tumore der Mamma umfassen, entwickeln sich aus Epithelzellen und bilden solide Tumore. Die Karzinogenese ist ein äußerst komplexer Prozess, der auf einem Mehrstufenmodell aufgebaut ist, welches noch unverstanden ist. Dieses Modell nach Hanahan und Weinberg (2000) ist in sechs Abschnitte der Krebsentstehung unterteilt und beschreibt die Schritte einer transformierenden Epithelzelle zum soliden Tumor:

- Selbstversorgung der Zelle mit Wachstumsfaktoren
- Resistenz gegenüber Wachstumsinhibitoren
- Umgehung des kontrollierten Zelltods (Apoptose)
- Unbegrenzt Replikationspotential
- Neoangiogenese des Tumors
- Gewebsinvasion und Metastasierung

1.2 Die Metastasierung als prognosebestimmender Faktor beim Mammakarzinom

Krebs als Systemerkrankung entsteht aus Zellen des Körpers, die sich ungehemmt teilen. Im Gegensatz zu benignen Tumoren, die auf ihren Entstehungsort beschränkt bleiben, dringen maligne Tumore durch ihre Invasivität rasch und schrankenlos in Nachbargewebe ein und zerstören dieses. Danach infiltrieren sie die Blut- oder

Lymphgefäße und siedeln sich in fernen Organen an. Diese Absiedlungen, die so genannten Metastasen, sind die Haupttodesursache von Krebspatienten.

Der Metastasierungsvorgang ist gekennzeichnet durch die Verschleppung einer Krebszelle vom Ursprungsorgan an eine andere Körperstelle, wobei der am neuen Ort angesiedelte Tumor als Metastase bezeichnet wird. Metastasierung erfolgt in Form von lymphogener und hämatogener Ausbreitung [Fidler 1978].

Die hämatogene Metastasierung beschreibt die Verschleppung von Tumorzellen auf dem Blutweg und ihr An- und Weiterwachsen an anderen Körperstellen.

Die lymphogene Metastasierung stellt einen Vorgang dar, bei dem Tumorzellen nach Einbruch in das Lymphgefäßsystem auf dem Lymphweg verschleppt werden und auf verschiedene Weise zu Metastasen heranwachsen. Die fehlende Basalmembran der Lymphkapillaren stellt kein Invasionshindernis für die Tumorzellen dar. Es hängt mehr von der Lage des Primärtumors und den unmittelbaren Lymphabflusswegen als von dem Ursprungsgewebe ab [Carr 1983].

Der Metastasierungsprozess wird oft als „Kaskade“ von verschiedenen komplexen Abläufen beschrieben (siehe Abb. 1.4). Die einzelnen Schritte sind eng miteinander verknüpft und jeder Schritt ist in einer definierten Reihenfolge für die Entstehung einer Metastase essentiell [Hart *et al.*, 1989; Hart und Saini 1992].

Zunächst erfolgt die Proliferation der Tumorzellen am Entstehungsort des Primärtumors, daraufhin folgt das Einwachsen von Blutgefäßen in den Tumor. Schließlich lösen sich vitale Zellen aus dem Gewebeverband, invadieren in den Blutstrom und bilden nach Anheften und Durchwandern des Endothels Fernmetastasen in den Organen aus. Die Ausbreitung von Metastasen in die Fremdorgane verläuft dabei nicht zufällig. Paget stellte 1889 die Theorie auf, dass disseminierte Zellen eines Primärtumors (*seeds*) sich nur in Organe (*soil*) einnisten, in denen eine geeignete Wachstums Umgebung vorliegt. Klinische Studien von Mammakarzinompatientinnen bestätigten diese Hypothese, denn Metastasen treten gehäuft in Lunge, Leber, Knochenmark und im Gehirn auf [Weigelt *et al.*, 2005].

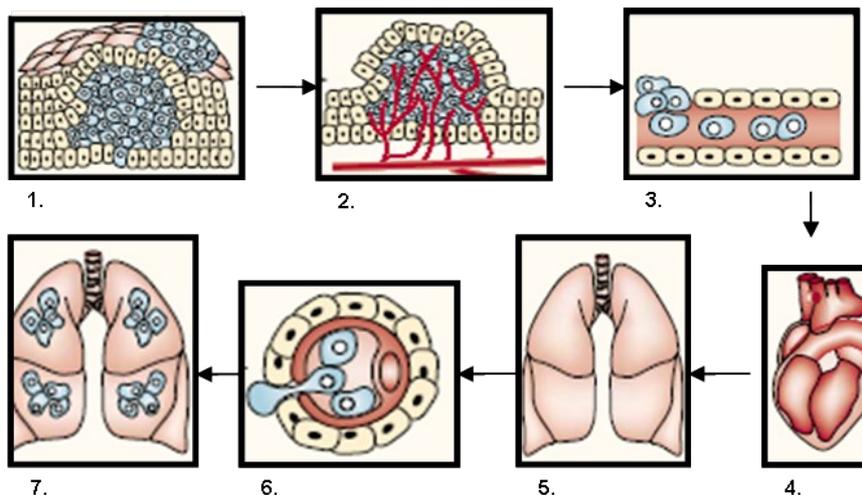


Abbildung 1.4: Hämatogene Metastasierungskaskade (modifiziert nach Fidler *et al.*, 2003)

Die primär entartete Zelle muss zunächst zu einer Tumormasse heranwachsen (1), die ab einer bestimmten Größe angiogene Signale aussendet, die zum Einwachsen von Blutgefäßen führen (2). In diesen Blutgefäßen können die zukünftigen metastatischen Zellen einwandern (3) und gelangen so in den Blutkreislauf (4). In Blutstrom müssen die Tumorzellen überleben und sich an das Endothel am Orte der zukünftigen Metastase anheften (5) und dieses durchwandern (6). Erst wenn die Tumorzellen an diesem Ort lokal proliferieren, resultieren Metastasen (7).

Die Einwanderung einer Tumorzelle in das Bindegewebe des Zielorgans der Metastasierung bedeutet noch nicht, dass aus dieser Zelle eine klinisch erkennbare Metastase entsteht. Nur ein geringer Anteil an Tumorzellen, der die Extravasation durchlaufen hat, ist befähigt in der Peripherie zu proliferieren. So können zum Beispiel Tumorzellen im Knochenmark sehr lange im Ruhestadium (*Dormancy*) verharren [Braun *et al.*, 2005]. Für die Kolonisierung von Metastasen in sekundären Organen sind deshalb Wachstumsfaktoren für die Aktivierung der Proliferation der Tumorzellen wichtig, wie z. B. *transforming growth factor* β (TGF- β) [Yin *et al.*, 1999]. Am Ort des Primärtumors bilden die Tumorzellen solide Epithelzellverbände, da die Tumorzellen untereinander durch verschiedene Zellkontakte miteinander verbunden sind. Zusätzlich zur Adhäsion zwischen zwei Zellen besitzen die Tumorzellen Moleküle, die sie mit der Basalmembran verbinden, was zu einer weiteren Stabilität des Gewebeverbandes führt. Um Fernmetastasen zu bilden, müssen Tumorzellen in den Blutstrom gelangen. Deshalb müssen die Tumorzellen ihren epithelialen Charakter verlieren, d. h. sie lösen die Zellkontakte und werden amöboid beweglich. Da das Fehlen von Zellkontakten und die damit gegebene Mobilität ein Kennzeichen des embryonalen Bindegewebes (Mesenchym) ist, spricht man von der epithelialen mesenchymalen Transition der Tumorzellen (EMT). Im Blutstrom liegen die Tumorzellen epithelialer Herkunft als Zellen mit teilweise mesenchymalen Eigenschaften vor, die sich am Ort der Metastase wieder zu typischen Epithelzellen umwandeln und solide Epithelstränge wie beim Primärtumor bilden.

1.3 Bedeutung der Zellmembran bei der Metastasierung

Alle Zellen werden an ihrer Oberfläche von einer Zellmembran bzw. Plasmamembran umgeben. Die Membranen sind im Wesentlichen aus Lipiden (Phospholipiden, Cholesterin, Glykolipiden) und Proteinen aufgebaut. Auf ihrer Außenseite trägt die Membran eine Schicht von Zuckerseitenketten, die die Glykokalyx bilden (siehe Kapitel 1.3.3). Diese Kohlenhydratketten gehen meist von Glykoproteinen aus, können aber auch Teil von Glykolipiden oder Proteoglykanen der Membran sein. Die Membranproteine lassen sich in integrale und periphere Membranproteine einteilen. In der Phospholipiddoppelschicht sind die integralen Membranproteine eingebaut und durchqueren oft die ganze Membran als sogenannte Transmembranproteine. Die peripheren Membranproteine dagegen liegen der Membran zur Seite des Extrazellulärraums oder zur zytoplasmatischen Seite an.

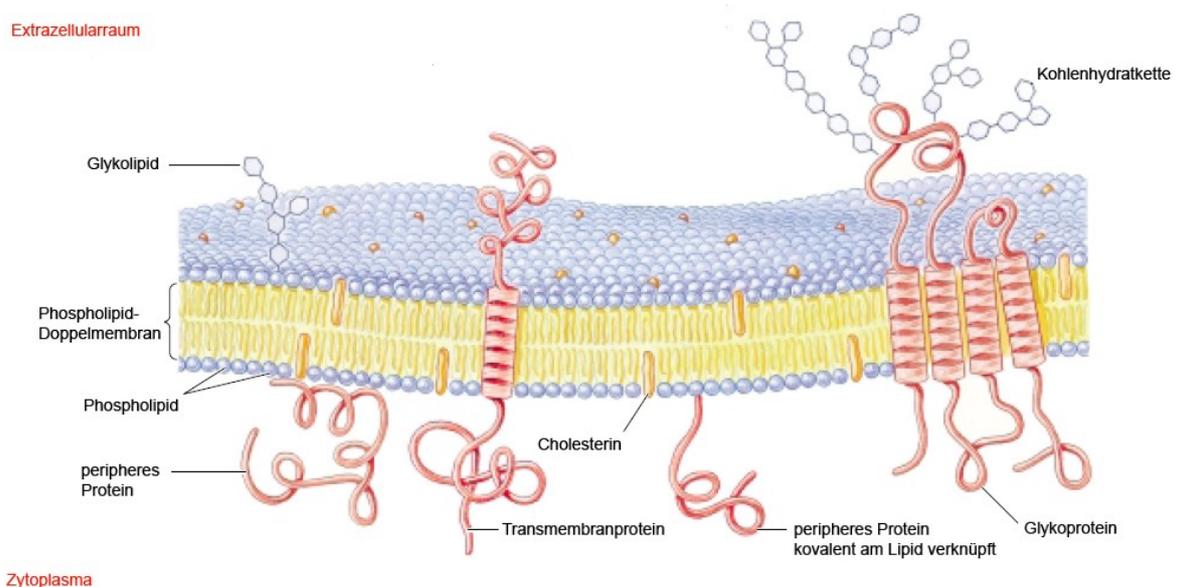


Abbildung 1.5: Aufbau der Zellmembran [Singer und Nicolson 1972].

Die Ausrichtung der Proteine in der Phospholipid-Doppelschicht ist asymmetrisch. Zum Teil ragen einige der Proteine nur an einer Seite der Membran heraus, oder es stehen Proteindomänen auf beiden Seiten der Membran heraus (modifiziert nach Nelson und Cox 2001).

Bei einem vielzelligen Organismus stehen Zellen, Tumorzellen eingeschlossen, untereinander und mit der extrazellulären Matrix über spezifische Membranproteine in strukturellen und funktionellen Kontakt. Aus diesem Grund spielt der molekulare Aufbau der Zellmembran, die die Interaktion zwischen Zellen und Umgebung vermittelt, eine wesentliche Rolle beim Metastasierungsgeschehen.

1.3.1 Rolle der Zelladhäsionsmoleküle

Im Rahmen dieser Untersuchung des Metastasierungsgeschehens vom humanen Mammakarzinom liegt das Hauptaugenmerk auf den Oberflächenstrukturen der Tumorzellen, die die Funktion der Zelladhäsion übernehmen.

Die integralen Membranproteine, die die Wechselwirkungen zwischen den Zellen vermitteln, werden Zelladhäsionsmoleküle, kurz CAM's (*cell adhesion molecules*), genannt. Die zwei grundlegenden Funktionen der Zelladhäsionsmoleküle sind zum einen der Zusammenhalt von Gewebe und zum anderen die Kommunikation von Zellen miteinander. Die Zelladhäsion vermitteln: Cadherine (E-, P- und N-Cadherine), Selektine (Typ C-Lektine mit E-, P- und L-Selektinen) und die Immunglobulinsuperfamilie der CAM's. Für die Zellmatrixadhäsion sind Integrine funktionell wichtig. Hierbei handelt es sich um heterodimere Rezeptoren, die an Proteine der extrazellulären Matrix binden wie z. B. an Laminin.

In Epithelzellen ist die Glykokalyx der apikalen Membran besonders hoch differenziert und mit den jeweils spezifischen Funktionen der Zelle korreliert. Epithelzellen bilden einen festen Gewebeverband und liegen mit der unteren Zellschicht einer Basalmembran auf. Bei entarteten Epithelzellen unterliegt die Zellmembran einer morphologischen Umwandlung. Im Rahmen der epithelialen mesenchymalen Transition regulieren die Tumorzellen des Primärtumors ihre Moleküle für die Zelladhäsion herunter. Dazu zählen unter anderem die Glykoproteine. So erst können sie sich von der Basalmembran lösen, aus dem Zellverband ausscheren und in die Blutgefäße einwandern. Am Ort der Metastase verläuft dieser Prozess in umgekehrter Reihenfolge. Die regulativen Vorgänge bei diesem Prozess sind mit aggressivem malignen Verhalten von Tumorzellen assoziiert [Bonnomet *et al.*, 2010].

1.3.2 Bedeutung von Glykoproteinen der Zellmembran für die Metastasierung

Es handelt sich bei den Glykoproteinen um Konjugate aus Kohlenhydraten und Proteinen. Es gibt drei Hauptklassen von Kohlenhydraten: die Monosaccharide (Einfachzucker), Oligosaccharide (Mehrfachzucker) und Polysaccharide (Vielfachzucker). Zu den Monosacchariden zählen u. a. Fucose (Fuc), Galactose (Gal), Glucose (Glc), Mannose (Man), N-Acetylgalactosamin (GalNAc), N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Sialinsäure (NeuAc).

Bei Glykoproteinen sind ein oder mehrere Oligosaccharide unterschiedlicher Komplexität kovalent an einem Protein gebunden. Die Kohlenhydrate sind über eine glykosidische Bindung mit der Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threoninrestes der Peptide verknüpft (O-glykosidisch) oder über eine N-Glykosylbindung am Amidstickstoff eines Asparaginrestes (N-glykosidisch), wie in Abbildung 1.6 dargestellt.

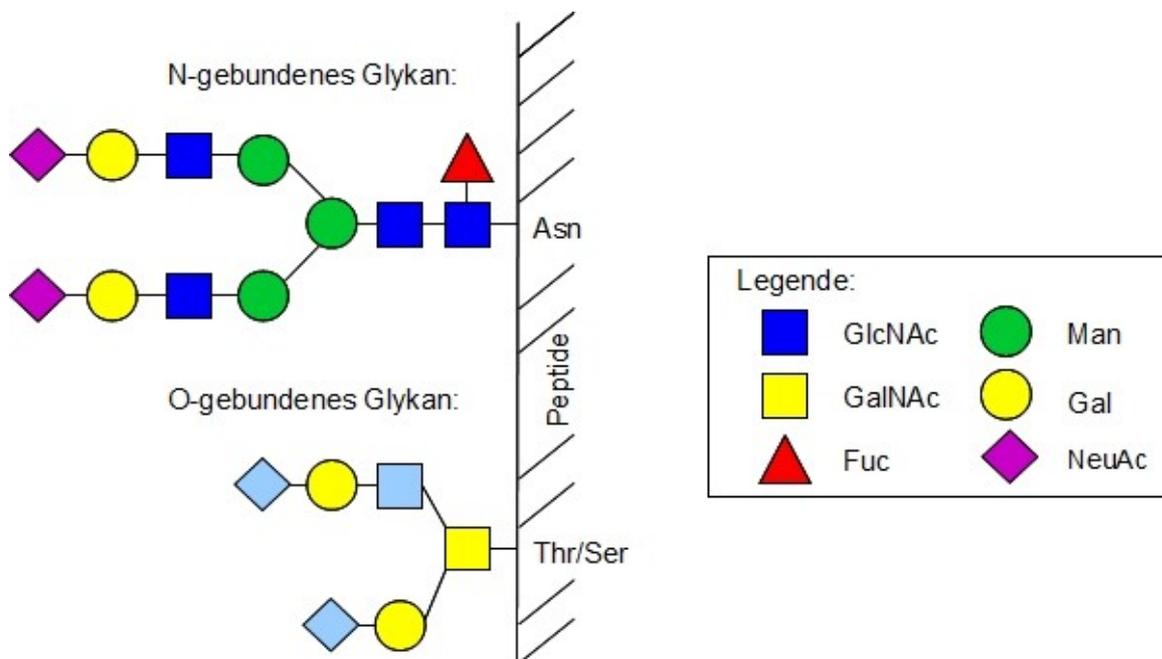


Abbildung 1.6: Anordnung von O- bzw. N-glykosidischen Verbindungen von Oligosacchariden (modifiziert nach dem *Consortium for functional Glycomics*)

Mucine gehören zu den Glykoproteinen und sind der strukturgebende Bestandteil des Schleims auf der Mucosa, der Schleimhaut. Die Mucine spielen eine große Rolle bei der Regulierung der Zelladhäsion sowie bei der Barrierefunktion der Schleimhäute.

Mittlerweile wurden über 21 Mitglieder der humanen Mucin Genfamilie identifiziert, die in der zeitlichen Reihenfolge ihrer Entdeckung mit Mucin1 bis Mucin21 bezeichnet werden. Die Mucinproteine werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Zum einen gibt es die membrangebundenen Mucine wie beispielsweise Mucin1 und Mucin4, welche von den Epithelzellen produziert werden. Sie sind Bestandteil der Glykokalyx auf der apikalen Membran des Epithels und sind außerdem an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt. Zum anderen gibt es die sekretorischen Mucine, die hauptsächlich von gastrointestinalen Becherzellen produziert werden und die Schleimschicht über der Epitheloberfläche bilden.

Mucine bestehen aus einem zentralen Core-Protein, welches in hohem Maße glykosyliert ist. Die Oligosaccharide verleihen den Mucinen eine hohe

Wasserbindungskapazität und schützen das Protein vor dem proteolytischen Abbau. Das zentrale Protein besitzt eine Transmembrandomäne, eine SEA (*sea urchin sperm protein enterokinase agrin*) Domäne und eine VNTR Region. VNTR steht für *variable number of tandem repeat*, eine Sequenz aus sich wiederholenden Aminosäuren mit hohem Anteil an Prolin, Threonin und Serin, daher auch PTS Domäne genannt. Gerade diese repetitiven Sequenzen sind am stärksten glykosyliert (60 – 80% der Molekülmasse) [Shirazi *et al.*, 2000] und tragen oft durch Sialyl- oder Sulfatgruppen eine hohe negative Ladung. Die Oligosaccharide in den Mucinen sind typischerweise sehr variabel und können sehr komplex sein [Carlstedt *et al.*, 1985]. Die Oligosaccharide sind O-glykosidisch an das Protein gebunden. An den Serin- oder Threoninresten befindet sich prinzipiell das gebundene N-Acetylgalactosamin [Corfield *et al.*, 1996]. Aber auch Fucose, Galactose, N-Acetylglucosamin und Sialinsäure sind im Allgemeinen auf Mucinen zu finden. Zusätzlich können auch N-glykosylierte Oligosaccharide vorkommen [Strous und Dekker 1992].

Bei vielen Adenokarzinomen sind Mucine überexprimiert, wie beispielsweise beim Kolonkarzinom, Mammakarzinom oder Prostatakarzinom [Kim *et al.*, 1996; Hanisch und Müller 2000]. Insbesondere das Mucin1 ist Themengebiet jahrelanger Forschung und wird immer noch intensiv auf dessen pathologische Funktion hin untersucht. Mucine werden als Tumormarker für die Diagnostik verwendet und dienen auch als Ansatzpunkte für neue Therapieformen. Mucin1 ist ein Typ 1 transmembranes Glykoprotein und wird auf der apikalen Oberfläche der meisten Epithelien wie der Brustdrüse, Lunge, Niere, Magen exprimiert. In vielen Adenokarzinomen findet sich das Protein dagegen in der basolateralen Zellmembran wieder. Der strukturelle Aufbau des Glykoproteins ist in Abbildung 1.7 erklärt.

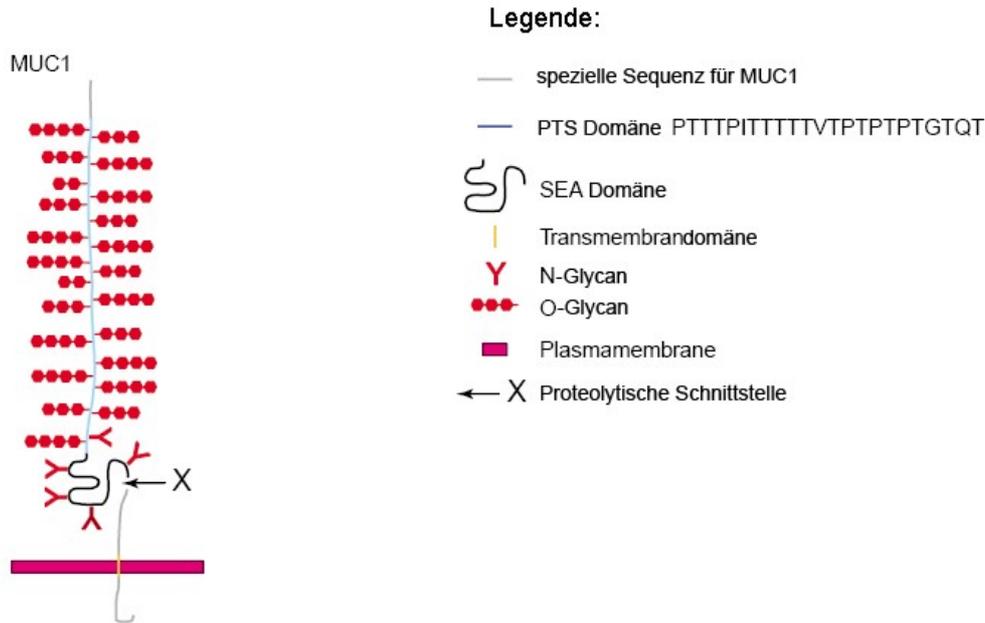


Abbildung 1.7: Strukturdarstellung des Glykoproteins Mucin1 (modifiziert nach Dekker *et al.*, 2002).

Zusätzlich existieren weitere CAM's, die aber nicht zum Strukturmodell der vier CAM Familien gehören. EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) wurde als erstes als tumorspezifisches Antigen bei verschiedenen Krebsarten verschiedenen Ursprungs identifiziert [Koprowski *et al.*, 1979]. Die von EpCAM vermittelte Adhäsion ist jedoch relativ schwach im Vergleich zu der anderer Adhäsionsmoleküle, wie z. B. der klassischer Cadherine [Litvinov *et al.*, 1994a].

EpCAM gehört zu den Typ 1 transmembranen Glykoproteinen. Das Molekül besteht aus einer extrazellulären Domäne beginnend mit einer Signalsequenz (SP Domäne) und gefolgt von zwei EGF Domänen. Die zweite EGF Sequenz beinhaltet eine Thyroglobulin (TY) *repeat* Domäne [Chong und Speicher 2001]. Die kurze intrazelluläre Domäne besitzt 26 Aminosäuren. Als homophiles Adhäsionsmolekül vermittelt EpCAM eine calciumunabhängige Zellzelladhäsion [Litvinov *et al.*, 1994b; Winter *et al.*, 2003].

Die extrazelluläre Domäne besteht aus insgesamt 265 Aminosäuren mit einer cysteinreichen und einer cysteinarmen Region. Die EGF Domänen, in denen die cysteinreiche Region vorliegt, enthalten beide eine homologe Sequenz zu dem am Laminin bindenden Protein Entactin der extrazellulären Matrix [Mann *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 1990].

EpCAM liegt als Dimer und Tetramer vor [Trebak *et al.*, 2001]. Die Bildung des Tetramers sowie die interzelluläre Assoziation von EpCAM Proteinen wird über die beiden EGF Domänen vermittelt. Dabei wird durch die zweite EGF Domäne die laterale Interaktion von vier EpCAM Molekülen auf einer Zelloberfläche eingeleitet [Balzar *et al.*, 2001]. Die erste EGF Domäne dient als Bindung zwischen den Tetrameren von zwei benachbarten Zellen [Balzar *et al.*, 2001]. Die vergleichsweise kurze zytoplasmatische Domäne beinhaltet ein Internalisierungsmotiv für das Polypeptid [Hopkins 1992] und zwei Konsensussequenzen für die Interaktion mit dem Zytoskelettprotein α -Actinin [Balzar *et al.*, 1998].

Die Glykosylierungsstellen des EpCAM Moleküls befinden sich innerhalb der zweiten EGF Domäne. Eine zusätzliche Glykosylierung ist in der cysteinarmen Region lokalisiert [Perez und Walker 1989; Strnad *et al.*, 1989]. Das Glykoprotein liegt in einer N-glykosylierten Form vor [Thampoe *et al.*, 1988; Chong und Speicher 2001]. Es wird angenommen, dass die N-Glykane mit Mannoseoligosacchariden glykosidisch verknüpft sind [Durbin *et al.*, 1990; Schön *et al.*, 1993].

Im humanen Gewebe wird EpCAM nahezu in allen Epithelien exprimiert und ist in der basalen oder basolateralen Zellmembran lokalisiert. Dagegen variiert beim Karzinom die EpCAM Verteilung, abhängig vom Karzinomtyp. Bei gut differenzierten Adenokarzinomzellen des Kolons zeigte sich beispielsweise eine regelmäßige basolaterale Verteilung des Moleküls. Bei weniger differenzierten Adenokarzinomzellen dagegen war die Lokalisation luminal, basolaterale, zytoplasmatisch und auch membranständig [Ogura *et al.*, 1998]. Die Überexprimierung von EpCAM bei Mammakarzinomzelllinien erhöht die Proliferation, Migration sowie Invasivität der Tumorzellen [Osta *et al.*, 2004].

1.3.3 Wechselwirkung zwischen Oligosacchariden und Lektinen

Den Kohlenhydraten der Glykokalyx kommt bei den Zellzell- und Zellmatrixinteraktionen eine besondere Rolle zu. Mit Hilfe von spezifischen kohlenhydratbindenden Lektinen können die Oligosaccharide erkannt werden. Bei dieser Art von histochemischer Untersuchung hat sich besonders das Lektin *Helix pomatia* Agglutinin (HPA) aus der Weinbergschnecke bewährt. In histologischen Schnitten von Mammakarzinomen band sich dieses Lektin entsprechend an die Zellen solcher Primärtumoren, deren Trägerinnen eine schlechte Prognose hatten. HPA hat eine prognostische Signifikanz bei der Bindung an den metastatischen Phänotyp im Mammakarzinom [Leathem und Brooks 1987; Brooks *et al.*, 1996;

Brooks und Leathem 1999]. HPA positive Tumorzellen metastasieren außerdem im Tiermodell, wohingegen HPA negative Tumorzellen in der Maus keine Fernmetastasen aufzeigen [Leathem und Brooks 1987; Schumacher und Adam 1997; Valentiner *et al.*, 2005]. Damit stellen die Xenograft-Mausmodelle ebenso eine klinische Relevanz für das Metastasierungsgeschehen dar [Schumacher *et al.*, 2005].

1.3.4 Selektinvermittelte Metastasierung von Tumorzellen

Selektine sind Glykoproteine der Zellmembran eukaryotischer Zellen. Die Familie der Selektine umfasst drei Mitglieder, das Lymphozyten (L)-, das Endothel (E)- und das Plättchen (P)-Selektin [Köttgen *et al.*, 2003]. L-Selektin wird von allen Leukozyten gebildet. E- und P-Selektine werden auf Endothelzellen exprimiert, insbesondere auf solchen, die durch Immunmodulatoren wie *tumor necrosis factor α* (TNF- α) [Schmitz *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 1992] oder Interleukin-2 stimuliert worden sind. P-Selektin liegt außerdem intrazellulär gelagert in alpha Granula von Thrombozyten vor und in Weibel-Palade Körperchen bei den Endothelzellen [McEver *et al.*, 1989].

Der extrazelluläre Anteil des Glykoproteins ist zusammengesetzt aus drei verschiedenen Bindungsdomänen: der C-Typ Lektindomäne im N-Terminus, der EGF (*epidermal growth factor*) Domäne und der SCR Domäne (*short consensus repeats*). Die Selektinformen unterscheiden sich in ihrer Anzahl an Wiederholungen (*repeats*) innerhalb der extrazellulären Aminosäuresequenz. Beim Menschen hat P-Selektin neun, E-Selektin sechs und L-Selektin als kleinstes Protein zwei *repeats* [Vestweber und Blanks 1999]. Die anschließende Transmembrandomäne ist in der Plasmamembran verankert, gefolgt von einem kurzen zytoplasmatischen Anteil.

Ihre physiologische Funktion besteht darin, dass sie die initiale Phase der Anheftung von Leukozyten aus dem Blutstrom an das Endothel vermitteln und somit bei der Leukozytenmigration von entscheidender Bedeutung sind [Forlow *et al.*, 2000; Mayadas *et al.*, 1993; McEver *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2000]. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen gilt das Selektin als wichtiger Mediator des Leukozytenrollen. Der Transport der Selektine an die Zelloberfläche wird über zwei verschiedene Wege reguliert. Stimuli wie Histamin und Thrombin verursachen bei Endothelzellen eine schnelle Mobilisierung von dem in den Weibel-Palade Körperchen gelagertem P-Selektin an die Zelloberfläche. Zusätzlich kann mittels Transkriptionsaktivierung z. B. durch Zytokine wie TNF- α eine *de novo* Synthese initiiert werden, wodurch E-/P-Selektin exprimiert wird [Vestweber und Blanks 1999].

Die Ligandeninteraktion wird durch die calciumabhängige C-Typ Lektindomäne beeinflusst. Die Selektine sind heterophile Zelladhäsionsmoleküle, das heißt sie gehen Verbindungen mit benachbarten Zellen über Oligosaccharide ein [Vestweber und Blanks 1999]. Diese Oligosaccharidstrukturen können Teil von Glykoproteinen, Glykolipiden und Proteoglykanen sein [Varki 1997]. Es ist beschrieben, dass die Tumor assoziierten Kohlenhydratantigene sialyl Lewis a (Ca19.9) und sialyl Lewis x (CD15s) als Liganden für die Selektinfamilie fungieren können und damit Einfluss auf die Metastasierung der Tumorzellen nehmen. Die Selektinliganden werden durch 4 Glykosyltransferasen synthetisiert: N-Acetylglucosamintransferase, Galactosyltransferase, Fukosyltransferase (FUT) und Sialyltransferase.

Aufgrund dieser Anheftungsfunktion sind die Selektine auch für die Tumormetastasierung von Interesse [Laferrière *et al.*, 2004]. In einer Reihe von klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Tumoren, welche die Kohlenhydratliganden der Selektine exprimieren, eine besonders schlechte Prognose der Krebspatienten vorliegt [Kim *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 2002]. Heparin ist ein exzellenter Inhibitor der P- und L-Selektinbindung [Borsig 2007]. Die Konsequenz dieser Antiselektinaktivität beeinflusst die Metastasierung beispielsweise bei der P-Selektinliganden tragenden Mammakarzinomzelllinie 4T1 [Monzavi-Karbassi *et al.*, 2007].

Die Bedeutung der einzelnen Selektine in der Adhäsionskaskade konnte anhand von Knock-out Mausmodellen untersucht werden. L-selektindefiziente Mäuse zeigten eine deutlich gestörte Leukozytenrekrutierung an Entzündungsorten und ein defektes *Homing* der Leukozyten in sekundär lymphatische Organe [Patel *et al.*, 2002]. P-selektindefiziente Tiere wiesen u. a. eine milde Neutrophilie und eine gegenüber dem Wildtyp geringere Anfälligkeit für Ischämierereperfusionsschäden auf [Mayadas *et al.*, 1993]. Dagegen zeigten E-selektindefiziente Mäuse keine Störungen der entzündlichen Leukozytenrekrutierung [Labow *et al.*, 1994]. E- und P-selektindoppeltdefiziente Mäuse wiesen eine schwere Leukozytose, Wundheilungsstörungen und spontane Hautinfektionen auf [Frenette *et al.*, 1996].

Erste Ergebnisse im Rahmen der *in vivo* Metastasierungsanalyse lieferten Kim *et al.* 1998. Bei *rag2^{-/-}* (*recombination activating gene 2*) Tieren mit P-Selektindefizienz (*P^{-/-}*) waren weniger Lungenmetastasen zu finden als beim Wildtyp Tier nach intravenöser Injektion von humanen Kolonkarzinomzellen LS180. Eine weitere Arbeitsgruppe induzierte eine Inhibition der E-Selektinexpression durch *C-raf antisense* Oligonukleotide. Die Folge war eine Inhibition der Metastasierung des humanen

Kolonkarzinoms in die Leber von Nacktmäusen nach intraportaler Injektion der Tumorzellen [Khatib *et al.*, 2002].

1.4 Untersuchungen an immundefizienten Mäusen

Da die Prognose der meisten Tumorerkrankungen von der Entstehung von Metastasen abhängt und deren Entwicklung in großen Teilen nach wie vor unverstanden ist, besteht großes Interesse daran, anhand von Tiermodellen diese Vorgänge genauer zu erforschen.

In Vorversuchen konnte erstmals gezeigt werden, dass nach Transplantation humaner Kolonkarzinomzellen HT29 in E- und P-selektindefiziente scid Mäuse (E^{-/-}, P^{-/-}) bei der Spontanmetastasierung eine niedrigere Anzahl an Metastasen als bei den Wildtypmäusen scid (*severe combined immunodeficiency*) vorlag [Köhler *et al.*, 2010]. Die Hypothese, dass die beiden Selektine die Metastasierung beeinflussen, wurde also durch den Rückgang der Metastasen um etwa 84 % bestätigt. Aufgrund dieses Befundes ist es für die weitere Analyse des Metastasierungs Vorgangs notwendig, den Einfluss des E- und P-Selektins auf die Metastasierung beim Mammakarzinom zu untersuchen. Weiterhin stellt sich die Frage, ob und welche der beiden Selektine noch bei der Metastasierung von Tumorentitäten eine Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Analyse des Metastasierungs geschehens beim Mammakarzinom die immundefizienten Mausmodelle scid und pfp^(-/-)/rag2^(-/-) im Vergleich zu eingekreuzter Selektindefizienz untersucht.

Scid Mäuse sind durch eine Kreuzung der BALB/c Maus mit der C57BL/Ka Maus entstanden. Die Tiere tragen eine homozygote Mutation für das Gen *protein kinase DNA activated catalytic polypeptide* (Prkdc) [Bosma und Carroll 1991]. Durch diese genetischen Mutationen kommt es unter Anderem zu einem Defekt der DNA Reparatur Mechanismen. Folge davon ist eine fehlerhafte V(D)J Rekombination, so dass die Ausdifferenzierung der T- und B-Lymphozyten in einem frühen Stadium stehen bleibt. Hierbei handelt es sich um eine spontane Mutation im Genom.

Das pfp^(-/-)/rag2^(-/-) Modell enthält jeweils eine gezielte Mutation im *recombinase activating gene 2* (rag2) und im *Perforin1*-Gen kodierend für das *pore forming protein* (pfp). Dieser Mäusestamm besitzt durch den Knock-out des rag2-Gens eine künstlich erzeugte Aplasie von T- und B-Lymphozyten. Durch eine zusätzliche genetische Inaktivierung des Perforin-Gens wird auch die Funktion der Natürlichen Killerzellen

(NK-Zellen) aufgehoben. Durch die hohe genetische Stabilität dieser Knock-out Mutationen bleibt eine gleichbleibende Immundefizienz innerhalb der Mauslinie erhalten.

Im Vergleich zur $ppf^{(-/-)}/rag2^{(-/-)}$ Maus sind bei der *scid* Maus noch aktive NK-Zellen im Körper vorhanden. Beim Tumorwachstum und bei der Metastasierung können diese Zellen einen entscheidenden Beitrag leisten und das Wachstum sowie die Aussiedlung der Tumorzellen negativ beeinflussen. Diese Einflussnahme wird durch den Funktionsverlust der NK-Zellen beim $ppf/rag2$ Modell aufgehoben.

1.4.1 Prinzip der Selektindefizienzen

Knock-out Mäuse mit einzeldefizientem P- bzw. E-Selektin

Die P-Selektindefizienz wurde durch ein Transfektionskonstrukt in kultivierten embryonalen Stammzellen eingebaut. Dazu wurde als Erstes ein *Replacement*-Vektor für den P-Selektinlokus konstruiert, der die Aminosäuresequenz für das Signalpeptid und die Lektindomäne des P-Selektins trägt und zusätzlich ein Neomycin-Resistenzgen beinhaltet, gesteuert durch einen Phosphoglyceratkinase-Promotor (PGKneo) [Mayadas *et al.*, 1993]. Flankiert wird dieses Gen von zwei Thyminkinase-Genen, die eine Integration der DNA über ein homologes Rekombinationsereignis ermöglichen. Dieser Target-Vektor wurde durch Elektroporation in die murine embryonale Stammzelle eingebracht. Im Falle einer homologen Rekombination in den Selektinlokus des Stammes wird ein Großteil des P-Selektingens deletiert, während die restlichen Selektingene funktionell erhalten bleiben sollten.

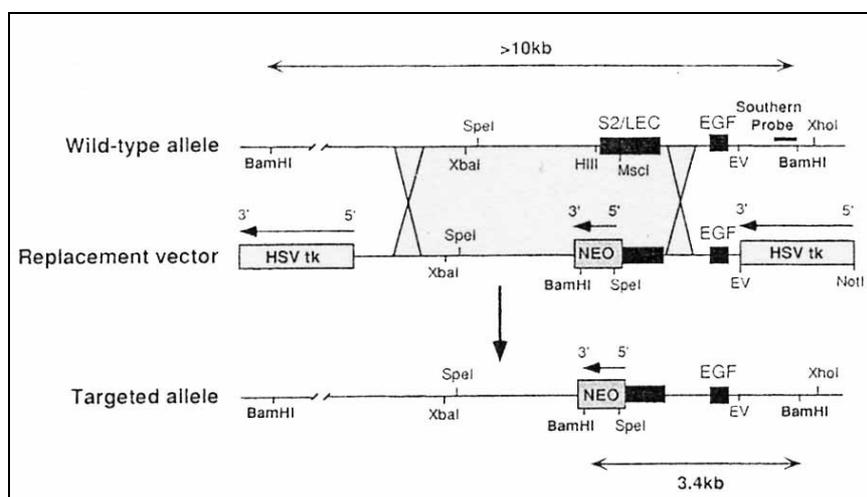


Abbildung 1.8 : Design des *Replacement*-Vektors und der P-Selektin Lokus [Mayadas *et al.*, 1993].

Transgene embryonale Stammzellklone, die heterozygot für die Selektinmutation sind, wurden in einen im Blastozystenstadium befindlichen Embryo übertragen. Die Blastozyste wurde in eine scheinchwangere C75BL6 Maus eingebracht. Die chimären Mäuse wurden gezielt verpaart.

Ein zweiter Vektor wurde für den E-Selektinlokus konstruiert. Wie bei der P-Selektindefizienz enthält das Konstrukt Exons für das Signalpeptid, die Lektindomäne und zusätzlich einen Teil der *epidermal growth factor* (EGF) Domäne des E-Selektins. Als Selektionskriterium wurde ein Hygromycin B-Resistenzgen eingefügt (PGKhygr) [Frenette *et al.*, 1996].

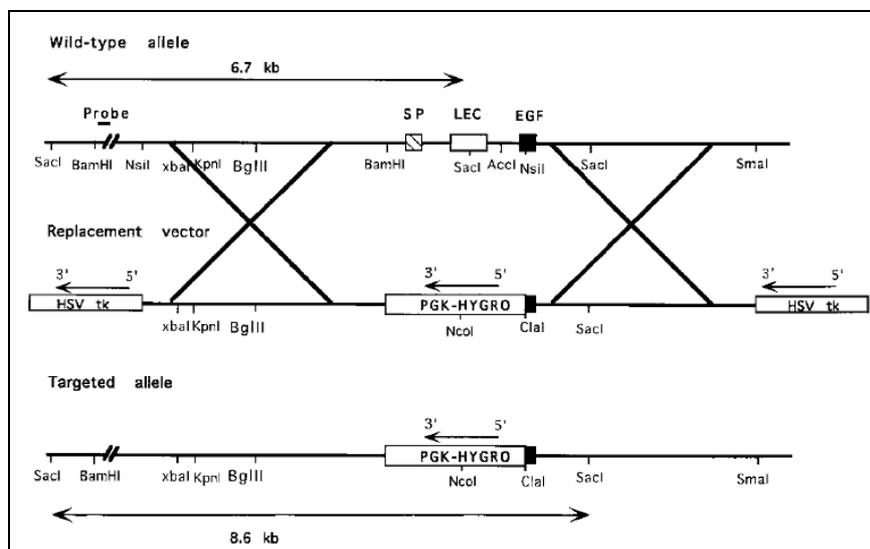


Abbildung 1.9: Design des *Replacement*-Vektors und der E-Selektin Lokus [Frenette *et al.*, 1996].

Knock-out Mäuse mit doppeltdefizientem P- und E-Selektin

Die Mutation in beiden endothelialen Selektinen wurde durch zwei *genetargeting* Schritte mittels homologer Rekombination in die embryonale Stammzelle (W9.5), die heterozygot für die P-Selektin Mutation ist, eingebaut. Zum Herstellen der E-Selektin Mutation wurde der konstruierte Vektor wie oben beschrieben durch Elektroporation in die embryonale Stammzelle eingebracht. Am Ende wurden Klone, die für die E- und P-Selektion Mutation heterozygot waren, in scheinchwangere Mäuse eingesetzt. Die $P^{+/-}/E^{+/-}$ Mäuse wurden miteinander gekreuzt [Frenette *et al.*, 1996].

1.5 Fragestellungen und Zielsetzung

Das humane Mammakarzinom zeichnet sich dadurch aus, dass bei gestreuten Metastasen auch die Lunge befallen wird. Für eine direkte Analyse der Metastasierung in die Lunge ist ein Tiermodell-System erforderlich, da die Gesamtheit des komplexen Vorgangs nicht *in vitro* nachgeahmt werden kann. Die Xenograft-Mausmodelle mit subkutan gespritzten humanen Tumorzellen haben sich in den letzten Jahren als geeignet erwiesen, da diese auch mit den klinischen Daten korreliert [Schumacher *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1996; Schumacher und Adam 1997].

In dieser Arbeit soll die Bedeutung von E- und P-Selektin bei der spontanen Metastasierung humaner xenotransplantierte Tumoren in immundefizienten Mäusen untersucht werden. Dabei sollen die zwei Mausstämme verwendet werden: die scid Maus und die pfp^(-/-)/rag2^(-/-) Maus. Auf diese Mausstämme werden humane Mammakarzinomzellen transplantiert. Die Metastasierungsrate des humanen Tumors soll in Wildtyp scid Mäusen und Wildtyp pfp^(-/-)/rag2^(-/-) Mäusen mit der Metastasierungsrate in E- und P-selektindefizienten scid Mäusen bzw. in E-selektin-, P-selektin- und E- und P-selektindefizienten pfp^(-/-)/rag2^(-/-) Mäusen verglichen werden. Folgende Aspekte sollen spezifisch untersucht werden:

Haben Tumore im scid bzw. pfp^(-/-)/rag2^(-/-) Mausmodell unterschiedliches Wachstum oder Unterschiede im Wachstum? Im Vergleich dazu soll ebenfalls das Wachstum in der E-selektin-, P-selektin- und E- bzw. P-selektindefizienten scid bzw. pfp^(-/-)/rag2^(-/-) Maus untersucht werden.

Weiterhin ist von Interesse, ob es eine Korrelation zwischen der Größe des Primärtumors und der Anzahl der Spontanmetastasen in der E- bzw. P-selektindefizienten Maus im Vergleich zu der E- und P-selektindefizienten Maus (sowohl in scid als auch pfp^(-/-)/rag2^(-/-)) sowie in den Wildtypmäusen gibt.

Durch eine quantitative Bestimmung der humanen Tumorzellen im Blut, kann eine mögliche Korrelation zwischen der Anzahl der im Blut gemessenen Tumorzellen und der histologisch ausgezählten Anzahl der Spontanmetastasen in allen aufgeführten Modellsystemen festgestellt werden.

Durch eine Charakterisierung der Tumorzellen sollen Antigenexpressionsmuster und Lektinbindungsverhalten der Tumorzellen im Primärtumor, im Blut und in den Metastasen aufgezeigt werden.

Dabei werden mögliche Unterschiede zwischen den beiden Modellsystemen in der Art der Antigenexpression und der Lektinbindungsstellen bei Primärtumoren, Tumorzellen im Blut und bei Metastasen untersucht.

Ist die Bindung der Tumorzellen an das endotheliale Selektin bei dem Mammakarzinom DU4475 ein Schlüsselprozess bei der Metastasierung?

Die in dieser Arbeit untersuchten klinisch relevanten Modellsysteme, mit denen die Bedeutung der einzelnen Selektine bei der Metastasierung näher charakterisiert werden, können wertvolle Hinweise für einen neuen Ansatz zur Behandlung von metastasierenden malignen Tumoren liefern. Neue Ansätze zur Therapie sind dringend erforderlich, da die bisherigen Behandlungsmethoden keine entscheidenden Fortschritte erbracht haben.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemein verwendete Materialien, Puffer, Medien und Lösungen

Die nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden im Reinheitsgrad zur Analyse von den Firmen Biomol (Hamburg), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), BD Biosciences (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (KGaA, Darmstadt), peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma (Sigma-Aldrich, Hamburg), Dako (Dänemark), Biorad (Biorad Laboratories, München), Pharmacia Biotech, Promega (Madison, USA), Honeywell Riedel de Haen (Seelze), Serva (Heidelberg) und Acris (Hiddenhausen) bezogen.

Für Reaktionen in Volumina 0,5 bis 2 ml wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet. Die Reaktionsansätze für PCR und cDNA Synthese erfolgten in RNase freien Reaktionsgefäßen der Firma Biozym. Bei der Zellkultur wurden Kulturflaschen, Zellschaber, Pipetten und „xwell“-Platten von Nunc (Nunc A/S Roskilde, Dänemark) und Falconröhrchen von Sarstedt (Nümbrecht) verwendet. Zentrifugationen erfolgten in der Tischzentrifuge Biofuge pico von Heraeus Instruments (Hanau), in der Kühlzentrifuge Universal 3212 von Hettich (Tuttlingen) und in der Ultrazentrifuge Beckmann TL-100 (Ramsey, USA). Es wurde weiterhin der Heizblock HLC HBT 130, der Heizmagnetrührer RCT basic IKAMAG® safety control, der Minishaker MS 1 (IKA Work Inc, Staufen), der Rollmischer (RM5 Assistent-Präzision-Hecht, Sondheim/Rhön) und das Schwenkgerät (ST5 CAT, Staufen) verwendet. Photometrische Bestimmungen der optischen Dichte von RNA-, DNA- und Proteinkonzentrationen wurden mit dem Photometer Smartspec™ 3000 von BioRad Laboratories GmbH (München), Nanodrop von peqlab durchgeführt.

- Pufferzusammensetzung für die Histologie

Allgemein verwendete Puffer, Medien und Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser (Aqua dest.) angesetzt und ggf. bei 121 °C und 2×10^5 Pa 20 min autoklaviert. Phosphatgepufferte Salzlösung (0,05 M PBS, 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 150 mM NaCl, pH 7,4) und Trisgepufferte Salzlösung (TBS, 50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, pH 7,6) wurden verändert nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

Die 3,7 %ige Formalinlösung wurde immer frisch aus 37 %igem Formalin und 0,1 M

Natriumphosphatpuffer bestehend aus Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 (pH 7,4) angesetzt. Paraformaldehyd, 4%ig, wurde mit in 0,1 M Natriumphosphatpuffer hergestellt. Der Citratpuffer bestand aus 0,01 M Citronensäuremonohydrat (pH 6,0).

Der Lektinpuffer wurde zusammengesetzt aus 0,05 M Trisgepufferter Salzlösung (pH 7.6), 1 mM CaCl_2 und 1 mM MgCl_2 .

- Pufferzusammensetzung für Proteinlysate

Für die Membranpräparation wurde der Homogenisationspuffer (20 mM TrisHCl pH 7,4, 2 mM MgCl_2 , 0,25 M Sucrose) und der Resuspensionspuffer (50 mM TrisHCl (pH 8,0), 2 mM CaCl_2 , 80 mM NaCl, 1 % TritonX 100) verwendet.

Der Zellysepuffer für Gesamtzelllysate setzte sich aus 50 mM Tris (pH 8,0), 2 mM CaCl_2 , 80 mM NaCl und 1 % TritonX 100 zusammen.

2.2 Eingesetzte Antikörper mit entsprechenden Isotypkontrollen

Die in der Tabelle 2.1 aufgeführten Primärantikörper wurden für FACS Analysen, Immunhistologie oder für Westernblot Analysen verwendet. Entsprechende Isotypkontrollen wurden bei jeder Untersuchung einbezogen.

Als Sekundärantikörper wurden die biotinierten Antikörper Kaninchen anti Maus, Kaninchen anti Ratte (Dako), die HRP gekoppelten Ziege anti Maus (Dako) und die APC markierten Ziege anti Maus Immunglobulin Antikörper (BD Pharmingen) verwendet.

Spezies der Antikörper	Antigen; Klon	Hersteller
Maus IgG1	anti human Mucin-1 (CD227); VU4H5	Santa Cruz, Heidelberg
Maus IgG1	anti human Moc31; Moc31	Dako
Maus IgG1	anti human CK18; DC10	Dako
Maus IgG1 und IgG2a	anti Pan CK; C-11, PCK-26, CY-90, KS-1A3, M20, A53-B/A2	Sigma
Maus IgG1	anti human Her2 (c-erb-2); 300G9	Acris, Hiddenhausen
Maus IgG1	anti human CD43; MEM-59	Acris, Hiddenhausen
Maus IgG2b	anti human CD44; G44-26	BD Pharmingen
Maus IgG1	anti human VCAM; 1.4C3	Dako
Maus IgG2a	anti human Mucin4; 5B12	Abnova, Aachen
Maus IgM	anti CD15s (sialyl-Lewis x); CSLEX1	BD Pharmingen
Maus IgG1	anti Ca19.9 (sialyl-Lewis a); SPM110	Novus Biologicals, USA
Maus IgM	anti Ca19.9 (sialyl-Lewis a); 121SLE	Abcam, England
Maus IgG1	anti human PSGL1 (CD162); KPL1	Millipore, USA
Maus IgG1	anti human Mitochondrial; 113-3	Millipore, USA
Kaninchen IgG	anti human beta Actin; EP1123Y	Abcam, England
Ratte IgG2b	anti Maus F4/80; Cl:A3-1	Serotec, England
Ziege IgG	anti Maus LYVE-1 biotiniliert, polyklonal	R&D Systems
Human IgG1	Recombinant murin E Selectin/Fc Chimera; 575-ES	R&D Systems
Human IgG1	Recombinant murin P Selectin/Fc Chimera; 737-PS	R&D Systems
Maus IgG1	anti human CD227 FITC; HMPV	BD Pharmingen
Maus IgG1	anti human EpCAM PE; 1B7	eBiosciences
Maus IgG1	anti human CD24 PE;	eBiosciences
Maus IgG1	anti human CD9 (MRP-1) FITC; eBio SN4	eBiosciences
Maus IgG1	anti human CD44 (H-CAM) FITC; B-F24	Diaclone Research
Maus IgG2b	anti human CEACAM-1 (CD66a) PE; 283340	R&D Systems
Maus IgG1	anti human CEACAM-5 (CD66e) FITC; C365D3	AbD Serotec, Düsseldorf
Maus IgG2a	anti human L1-CAM (CD171) PE; eBio 5G3	eBiosciences
Ratte IgG2a	anti human ICAM-1 (CD54) PE; eBioKAT-1	eBiosciences
Ratte IgG2a	anti human ALCAM (CD166) PE; eBioALC48	eBiosciences
Maus IgM	anti human SSEA-1 (Lewis x; CD15) PE; VIMC6	Miltenyi Biotec, USA
Maus IgG1	anti human Integrin α 4 (CD49d) PE	BD Pharmingen
	Isotypkontrollen	Hersteller
	Maus IgG1 FITC; IS5-21F5	Miltenyi Biotec, USA
	Maus IgG1 PE	eBiosciences
	Maus IgG2a PE; S43.10	Miltenyi Biotec, USA

	Maus IgM PE; IS5-20C4	Miltenyi Biotec, USA
	Ratte IgG2a PE	eBiosciences
	Maus IgG2b PE; IS6-11E5.11	Miltenyi Biotec, USA
	Maus IgG1	Dako
	Maus IgM	Dako
	Maus IgG2a	Dako
	Rekombinant human IgG1 Fc; 110-HG	R&D Systems

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper mit entsprechender Isotypkontrolle

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete humane Tumorzelllinien

Drei humane Tumorzelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Tumor-zelllinien	Tumorentität	Entnahme-Quelle/Organ	Literatur
DU4475	duktales Mammakarzinom, metastasierend	Hautmetastase	ATCC, Langlois <i>et al.</i> , 1979
MCF7	duktales Mammakarzinom, schwach metastasierend	Pleuraeffusion	ATCC, Soule <i>et al.</i> , 1973
HT29	Kolonkarzinom, metastasierend	Primärtumor	ATCC, Fogh <i>et al.</i> , 1977

Tabelle 2.2: Auflistung der humanen Tumorzelllinien

2.3.2 Verwendete humane Kontrollzelllinie

Als Kontrolle wurden für die Untersuchung zusätzlich aus dem hiesigen Institut humane Fibroblasten aus der Haut als Zelllinie verwendet.

2.3.3 Zellkulturbedingungen

Die Zelllinien wurden unter Standardzellkulturbedingungen [Valentiner *et al.*, 2005] kultiviert. Dazu wurden die Zelllinien in sterilen Zellkulturflaschen in RPMI 1640 Medium mit 2 mM L-Glutamin (Gibco, Eggenstein), 10 % hitzeaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS, Gibco), 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (Gibco) bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ gezüchtet. Die Zelllinien

wurden zweimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen bei Konfluenz von 70-80 % passagiert. Hierzu wurden die adhärent wachsenden Zellen mit DPBS (ohne Mg_{2+} und Ca_{2+} , Gibco) gewaschen und anschließend mit 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco) von der Kulturschale abgelöst. Der Vorgang wurde durch Zugabe von frischem vorgewärmtem Vollmedium abgestoppt und die resuspendierten Zellen dann in einer Dichte von 10-20 % ausgesät. Bei den Suspensionszellen erfolgte eine Zentrifugation bei 1500 rpm. Das entstandene Zellpellet wurde mit frischem Medium versetzt und die Zellen in einer Dichte von 10-20 % ausgesät.

Zum Ablösen der Zellen wurde je nach Fragestellung entweder Trypsin/EDTA-Lösung (1x), oder *Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free PBS based* (Gibco) verwendet.

2.3.4 Zellzahlbestimmung durch CASY

Die Tumorzelllinien wurden mittels des CASY Prinzips (*cell counting analysis system*) ausgezählt. Das CASY-Verfahren nutzt das Widerstandsmessprinzip mit einer Methode der Signalauswertung (Pulsanalyse). Dabei werden die Zellen mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare gesaugt. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Die Zellen werden bei dieser Methode nach ihrer Größe unterschieden, wobei Zellfragmente und Fremdpartikel herausgefiltert werden.

2.3.5 Detektion von Mykoplasmenkontamination in der Zellkultur

Zur Überprüfung der Zellkultur auf Kontamination durch Mykoplasmen wurde ein optischer Test durchgeführt. Mykoplasmen kontaminierte Zellen sind morphologisch unauffällig. Dennoch verursachen Mykoplasmen eine Fülle von Effekten, die zu Artefakten und Fehlinterpretationen führen können. Zu diesem Zweck wurden von der humanen Mammakarzinomzelllinie DU4475 Zytospins hergestellt. Hierfür wurden 5 ml der Zellsuspension 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Das Zellpellet wurde mit 5 ml DPBS aufgeschwemmt. Von dieser Suspension wurden 200 μ l in die für Zytospins vorgesehene Vorrichtung gegeben und erneut zentrifugiert (3 min bei 1500 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und die Objektträger 24 h bei RT getrocknet. Die Zellen wurden in 100 % Ethanol 15 min bei RT fixiert. Danach wurde ein Tropfen *Vectashield mounting medium* (Vector Laboratories, Bulingame USA) mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) auf die Zellen gegeben und unter dem Fluoreszenzmikroskop

ausgewertet. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet selektiv an die DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit hoher Spezifität. Mykoplasmenfreie Kulturen zeigen bei dieser Methode nur eine nukleäre, kontaminierte Kulturen zusätzlich noch extranukleäre Fluoreszenz. Mitochondriale DNA wird durch DAPI nicht angefärbt.

Bei Suspensionszellen ist neben dem Kern oft nur wenig Zytoplasma zu finden, wodurch eine Bewertung der DAPI-Methode schwierig wird, da nicht mehr eindeutig zwischen nukleärer und extranukleärer Fluoreszenz unterschieden werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde als zusätzliche Methode zum Mykoplasmenachweis der spezifische Nachweis von Mykoplasmen mittels PCR Analyse (Kapitel 2.5.7) durchgeführt.

Die adhärennten humanen Tumor- und Fibroblastenzelllinien wurden jeweils in Zweikammer-Glasobjektträger (Nunc) ausgesät. Hierfür wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst. In jeder Kammer wurden 200 µl Zellsuspension und 1 ml Kulturmedium gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h (37 °C und 5 % CO₂) wurde der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden mit DPBS gespült und mit 100 %igem Ethanol für 15 min bei RT fixiert. Nach der Trockenzeit von 24 h wurden die Zellkerne mit einem Tropfen DAPI eingeschlossen und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Vor Beginn aller Versuche wurden alle Zelllinien auf Mykoplasmen getestet. Bei keiner der verwendeten Zelllinien konnten Mykoplasmen kontaminierte Zellen detektiert werden.

2.3.6 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie *fluorescence activated cell sorting* (FACS) wird als eine Methode angewendet, um die Oberflächenmarker der humanen Mammakarzinomzellen zu analysieren. Diese Anwendung setzt die Markierung der Zellen mit spezifischen Antikörpern voraus. Diese sind entweder direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, oder ein fluoreszierender sekundärer Antikörper bindet an den Fc-Teil des molekülspezifischen primären Antikörper. Die vom Gerät detektierte Fluoreszenzintensität steht in Relation zur Menge des gebundenen Antikörpers und ist damit ein Maß für das Expressionslevel des untersuchten Moleküls. Die markierten Zellen werden einzeln in einer Kapillare durch einen Laserstrahl erfasst. Dadurch kommt es zur Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe und das Licht wird in einer bestimmten Wellenlänge emittiert.

Zur Unterscheidung der Zelle dienen zwei Parameter, zum einen das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) als Maß für die Zellgröße und zum anderen das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*) für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns).

Die Zellen wurden mit einem Antikörper, der mit FITC, PE, APC markiert war, angefärbt. Tote Zellen wurden durch Zugabe von Propidiumiodid markiert, besitzen infolgedessen einen geringeren *forward scatter* und wurden durch das Festlegen eines Rasters von der Analyse ausgeschlossen.

Für die Analyse der Oberflächenmarker wurden die zu untersuchenden Zellen (ca. 10⁶ Zellen/ml) in FACS-Puffer aufgenommen und mit dem Antikörper in einer Konzentration von 2–10 µg/ml für 30 min auf Eis inkubiert. Falls dieser Antikörper nicht direkt fluoreszenzmarkiert war erfolgte nach dem Waschen in 1 ml FACS-Puffer eine Inkubation des Zellpellets mit 100 µl eines markierten Sekundär-Antikörpers (1:100 eingesetzt) für weitere 30 min. Nach dem Waschschrift wurde das Zellpellet in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen (+ 5 µl Propidiumiodid) und mittels FACS-Gerät untersucht. Zum Pelletieren der Zellen erfolgte die Zentrifugation bei max. 2250 rpm und 4 °C.

Für die Analyse von zytosolischen Proteinen wurden die Zellen zu Beginn 15 min fixiert mit 3,7 % Formalin 1 zu 1 gemischt mit FACS-Puffer. Die Antikörper-Inkubationen wurden in einer FACS-Lösung mit 0,5 % Saponin durchgeführt.

Für die Aufarbeitung der Knochenmarkszellen auf humane disseminierte Tumorzellen wurde das *Mouse Erythrozyte Lysing Kit* (R&D Systems) nach Angaben des Herstellers verwendet. Um die Eigenfluoreszenz der Erythrozyten zu eliminieren wurden die Proben mit 500 µl 1x M-Lyse Puffer für höchstens 3 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl 1x Waschpuffer resuspendiert. Nach der Zentrifugation wurde das entstandene Zellpellet ein zweites Mal gewaschen. Nach erneutem Pelletieren der Proben wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit frischem 2 %igem Formalin in FACS-Puffer für 15 min bei RT fixiert. Danach wurden die Proben zweimal mit DPBS gewaschen und letztendlich in 400 ml FACS-Puffer aufgenommen. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C mit max. 400 g für 10 min durchgeführt.

Der FACS-Puffer wurde mit 1 % BSA, 0,05 % NaN₃ und 500 ml DPBS (Gibco) angesetzt. Für Lektinfärbungen wurde der Puffer mit Ca²⁺ angereichert.

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit Hilfe eines FACS-Calibur von Beckton & Dickinson (BD, USA) durchgeführt. Hierbei wurde die FITC-Fluoreszenz im FL1-Kanal, die PE-Fluoreszenz im FL2-Kanal, die APC-Fluoreszenz im FL4-Kanal und Propidiumiodid im FL3-Kanal gemessen. Pro Messung wurden mindestens 10000 Zellen auf die Fluoreszenzintensität des gebundenen Antikörpers hin untersucht. Die erhaltenen Daten wurden mit der *CellQuest Software* (BD, USA) analysiert und mit dem Programm WinMDI ausgewertet.

2.4 Tierexperimentelles Arbeiten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von E- und P-Selektin bei der spontanen Metastasierung humaner xenotransplantierte Tumoren in immundefizienten Mäusen untersucht. Dabei wurden die immundefizienten Mausstämme scid und pfp/rag2 verwendet.

Die Tierzucht wurde in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Standardbedingungen (21 °C; relative Luftfeuchtigkeit 50 %; 12 h Tag-Nacht-Rhythmus) durchgeführt. Die Tiere wurden mit sterilem Wasser und Standardfutter (ssniff M-Z, extrudiert, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) versorgt und pathogenfrei in einzeln gelüfteten Käfigen gehalten. Für den Tierversuch wurden insgesamt 90 weibliche Mäuse, im Alter von 5 bis 19 Wochen, verwendet.

2.4.1 Scid Mausmodell

Für den Tierversuch wurden pathogenfreie weibliche scid Mäuse (Charles River; Wilmington, USA) mit dem genetischen Hintergrund C.B-17/lcrCrl scid/scid eingesetzt. Dieses Mausmodell zeigt eine Spontanmutation im Genom, die die Funktionsfähigkeit von B- und T-Lymphozyten beeinflusst. Daher muss vor dem jeweils geplanten Tierprojekt immer der Immunglobulintiter bestimmt werden.

2.4.2 Scid select Mausmodell

In einem vorhergehenden Projekt wurden E- und P-selektindefiziente Knock-out Mäuse mit einem B6/129S2 Hintergrund von Jackson Laboratories (Maine, USA) mit den scid Mäusen gekreuzt, um ein homozygotes E- und P-selektindoppeltdefizientes scid Modell zu entwickeln. Das Prinzip der Selektindefizienzen wurde im Kapitel 1.4.1 bereits näher beschrieben.

2.4.3 pfp/rag2 Mausmodell

Das pfp/rag2 Mausmodell (Taconic; Lille Skensved, Dänemark) weist einen Defekt in der frühen Entwicklung von B- und T-Lymphozyten auf und besitzt zusätzlich keine funktionsfähigen natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Durch die genetische Stabilität dieser Mutationen musste kein Immunglobulintiter bestimmt werden.

2.4.4 pfp/rag2 Mausmodell mit Selektindefizienzen

Für die Etablierung der selektindefizienten Mausmodelle wurden E- und P-Selektin Knock-out Mäuse (Jackson Laboratory) mit pfp/rag2 (Taconic) gekreuzt. Die Nachkommen mit mutierten Selektin Allelen wurden durch Genotypisierung bestimmt und für die Tierversuche weitergezüchtet. Für die Tierversuche standen am Ende zur Verfügung: pfp/rag2 Mäuse, E-selektindefiziente pfp/rag2 Mäuse (pfp/rag2 sele), P-selektindefiziente pfp/rag2 Mäuse (pfp/rag2 selp) sowie E- und P-selektindefiziente pfp/rag2 Mäuse (pfp/rag2 select).

Mausstämme	Hintergrund	Literatur
B6; 129S2-Sele ^{tm1Hyn} ; Stock 002915	C57BL/6; 129S2	Labow <i>et al.</i> , 1994
B6; 129S2-Selp ^{tm1Hyn} ; Stock 002217	C57BL/6; 129S2	Mayadas <i>et al.</i> , 1993
B6; 129S2-Sele ^{tm1Hyn} Selp ^{tm1Hyn} ; Stock 002916	C57BL/6; 129S2	Frenette <i>et al.</i> , 1996
pfp/rag2 double targeted mutation mice: B6; 129S6-Pfp ^{tm1Clrk} -Rag2 ^{tm1Fwa N12}	C57BL/6; 129S6	Shinkai <i>et al.</i> , 1992

Tabelle 2.3: Zusammenstellung der verschiedenen Mausstämme für die Kreuzungen

2.4.5 Tumorinitiierung durch Injektion von humanen Tumorzellen

Für die Untersuchung der Metastasierungskaskade im Mausmodell musste eine geeignete Mammakarzinomzelllinie ausgesucht werden, die in der Maus Spontanmetastasen entwickelt und an Selektin bindet. Nur eine Zelllinie, die auf den Metastasierungsmarker HPA [Schumacher *et al.*, 2005] positiv getestet wurde und Selektinliganden trägt, wurde für die Injektion ausgewählt.

Im Rahmen des geplanten Tierversuches wurden scid und scid select Mäuse sowie die verschiedenen defizienten pfp/rag2 Tiere mit der humanen Mammakarzinomzelllinie DU4475 beimpft. Die Vitalität der Zellen war über 85 %. Dazu wurden jeweils 200 µl reinem RPMI-Medium mit 1×10^6 Tumorzellen subkutan zwischen die Schulterblätter injiziert und das Tumorwachstum beobachtet. Zum besseren Anwachsen der Tumorzellen wurde die Zelllinie mittels Matrigel im Verhältnis 1:1 mit RPMI Medium als zähflüssiges Trägermaterial in die

verschiedenen pfp/rag2 Mäuse injiziert. Verwendet wurde dafür BD Matrigel™ Matrix (BD Biosciences). Die Abbruchkriterien der Tierversuche waren ein Überschreiten der Größe des Primärtumors von über 20 % des Körpergewichts der Maus und eine beginnende Ulzeration des Tumors.

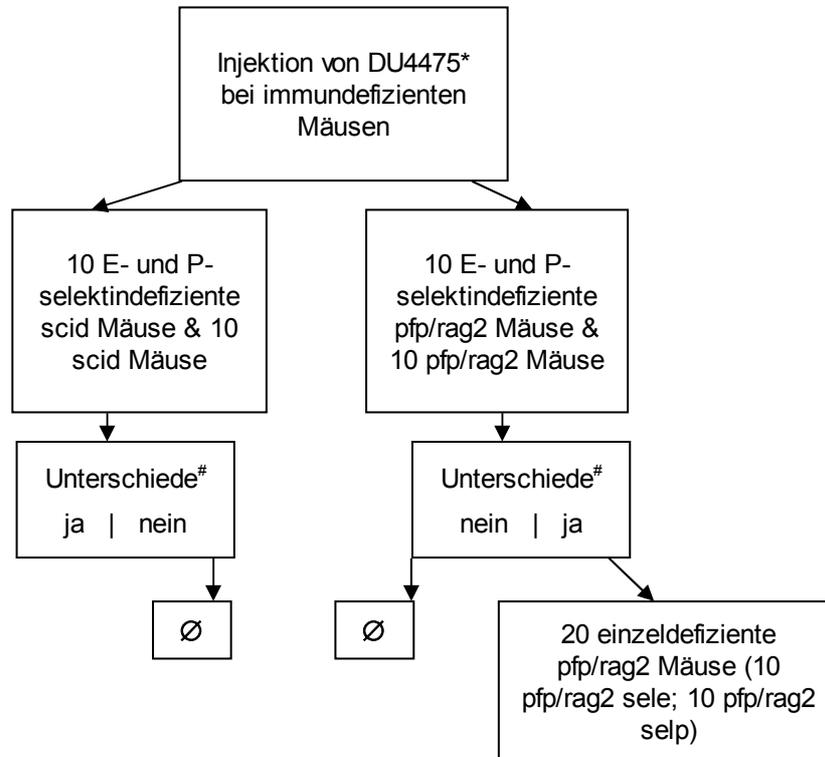


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

* DU4475 als Mammarkarzinomzelllinie wurde injiziert in pfp/rag2 bzw. scid Mäusen. # Die Unterschiede beziehen sich auf das Tumorwachstum und die Metastasierung.

2.4.6 MRT Messung tumortragender Tiere

Die Magnetresonanztomographie, kurz MRT, gehört zu den bildgebenden Verfahren. In der medizinischen Diagnostik wird diese Methode zur Darstellung von Struktur und Funktion der Gewebe und Organe im Körper eingesetzt. Es basiert physikalisch auf den Prinzipien der Kernmagnetischen Resonanz.

Für die Messungen wurden vereinzelt Tiere aus den sechs verschiedenen Gruppen herausgegriffen, bei denen sich bereits ein deutlich sichtbarer Primärtumor entwickelt hatte. Zu Beginn wurde das Gewicht der Tiere erfasst, um eine gezielte Narkose (1 % des Körpergewichtes) bei den Mäusen einzuleiten. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion (i. p.) mittels eines Gemischs aus 120 mg Ketamin (Gräub AG, Bern, Schweiz), 16 mg Rompun (Bayer AG, Leverkusen) und 0,9 % NaCl (Invitrogen) für ca. 45 min anästhesiert.

Die MRT Messungen wurden mit einem 3,0 Tesla MRT Scanner durchgeführt (Intera, Philips Medical Systems, Best, Niederlande). Der Scanner war mit einem konventionellen *body transmit coil and gradient system* ausgestattet, um eine maximale Amplitude von 30 mT/m und eine Anstiegszeit von 50 mT/s zu erreichen. Für die Untersuchung der tumortragenden Mäuse wurde eine für diesen Zweck angefertigte Kleintierspule verwendet. Es handelte sich hierbei um eine Vier-Element Spule (Philips Research Laboratories, Hamburg) mit einem Innendurchmesser von 2,5 cm und einer Länge von 10 cm. Das MR Sequenzprotokoll bestand aus einer T1 gewichteten Sequenz in 3 orthogonalen Ebenen und zusätzlich aus einer T2 gewichteten Sequenz in sagitaler Richtung. Die Messungen wurden in einer hochauflösenden T1 gewichteten 2D Turbo Spin Echo Sequenz (TSE) in koronarer Richtung, einer fettgesättigten T2 gewichteten 2D TSE in koronarer und sagitaler Richtung und einer T2* gewichteten 2D Gradienten Echo Sequenz durchgeführt.

Die Messparameter für die Ganzkörper koronare T1 TSE Sequenz waren folgende: Repetitionszeit (TR) = 1275 ms; Echozeit (TE) = 33 ms; Drehwinkel (*flip angle*; FA) = 90 °; Bildausschnitt (*field-of-view*; FOV) = 100×35 mm²; Matrix = 464×464 Pixel; Schichtdicke = 1 mm; 14 Schichten; *number of acquisitions* (NA) = 3; räumliche Auflösung = 0.22×0.22×1 mm; Untersuchungszeit = 5 min 18 s. Für die fettgesättigte Ganzkörper koronar und sagittal T2 TSE Sequenz waren die Parameter: TR = 2361 ms; TE = 90 ms; FA= 90 °; FOV = 100×35 mm²; Matrix = 448×448 Pixel; Schichtdicke = 1 mm; 14 Schichten; NA = 3; räumliche Auflösung = 0.22×0.22×1mm; Untersuchungszeit = 3 min 37 s. Die Messparameter für die Ganzkörper T2* Gradienten Echo Sequenz waren folgende: TR = 252 ms; TE = 7 ms; FA = 15 °; FOV = 100×35 mm²; Matrix = 464×464 Pixel; Schichtdicke = 1 mm; 14 Schichten; NA = 5; räumliche Auflösung = 0.22×0.22×1 mm; Untersuchungszeit = 3 min 27 s. Die Messung und Datenauswertung der MRT Aufnahmen erfolgten in der hiesigen Radiologie durch Dr. med. K. Peldschus, Dr. rer. nat. E. Forberich und J. Salamon. Die Auswertung der im Kernspintomographen erzeugten Bilder erfolgte mit Hilfe der Bildverarbeitungsanwendung K-Pacs.

Nach der MRT Untersuchung wurden die Tiere getötet, um den Primärtumor, potenziell metastasierte Gewebe wie die Lunge und Organe mit auffälligem Befund zu entnehmen. Eine anschließende histologische Untersuchung dieser Organe diente als Sicherheit, um eine gezielte Diagnose zur Metastasierung zu erstellen.

2.4.7 Gewebe- und Blutentnahme

Die Mäuse wurden durch eine i. p. Injektion mit dem Gemisch aus Ketamin-Rompun-NaCl anästhesiert, wie in Kapitel 2.4.6 beschrieben wurde. Nach der Entnahme von Primärtumor, Lunge, Milz, Leber und Knochenmark wurden diese Organe in 3,7 % Formalin fixiert. Für die Expressionsanalyse (Kapitel 2.5.11) erfolgten eine finale Blutentnahme aus dem Herz sowie die Kryokonservierung des Primärtumorgewebes und der halben rechten Lunge.

Über den hämatogenen Weg erfolgt die Metastasierung des Mammakarzinoms vor allem über die Lunge und über das Knochenmark. Organe wie die Leber können aber auch betroffen sein.

Für den Nachweis von hämatogen disseminierten Tumorzellen bietet sich das Skelettsystem neben der Blutentnahme an. Die Knochenmarkszellen wurden durch das Ausspülen mit NaCl gewonnen und für die Immunhistochemie als Zellen in 2 %iger Agarose formalinfixiert (siehe 2.7.2), oder für die FACS Analysen weiter verarbeitet (siehe 2.3.6).

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen und Blut

Für die Isolierung genomischer DNA aus humanen Zellen wurde das *QIAamp® DNA* bzw. *Blood Mini Kit* (QIAGEN) verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen (*QIAamp® DNA Mini Kit Handbook, Tissue Protocol*). Die über Silica Säulen eluierte DNA wurde bei 4 °C und längerfristig bei -20°C gelagert.

2.5.2 Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwanzbiopsien

Für die Genotypisierung der eingekreuzten Selektindefizienzen in den *pfp/rag2* Mausmodellen wurde eine Gewebebiopsie entnommen um eine DNA Extraktion durchzuführen. Für diese Methode wurde das *REDExtract-N-Amp PCR Reaction Kit* von Sigma verwendet.

Zu Beginn wurde die Extraktion- und Gewebepräparationslösung im Verhältnis 4:1 miteinander gemischt und auf die Gewebebiopsie für 15-30 min bei RT inkubiert, je nach Menge an Biopsiematerial. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben bei 95 °C für 3 min. Zum Stoppen der Reaktion wurden 100 µl Neutralisationspuffer

zur Lösung gegeben. Die DNA Probe wurde für die PCR Analyse (Kapitel 2.5.8) weiter verwendet und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Isolierung von RNA aus humanen Tumorzellen und Mausblut

Für die Isolierung von RNA aus humanen Zellen wurde das RNeasy Mini Kit und für Mausblut das *QIAamp® Blood Mini Kit* (QIAGEN) verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen (*RNeasy Mini Handbook und QIAamp RNA Blood Mini Handbook*).

Das aus dem Herzen entnommene Mausblut wurde in EDTA-Röhrchen gegeben und anschließend wurden für die RNA-Isolierung 200 µl Blut pro Qiagensäule verwendet. Die über die Säulen gebundene RNA wurde durch 30 µl *RNase free water* in ein steriles Reaktionsgefäß eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Isolierung von RNA aus Tumormaterial

Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion. Trizol ist ein Gemisch aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat (einem gebrauchsfertigen Phenol-Isothiozyanat-Gemisch pro 50-100 mg Gewebe), welches die Zellen lysiert, dabei RNasen hemmt und die RNA stabil hält. Die RNA wird aus der Lösung durch Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Isopropanol-Präzipitation isoliert.

Das Tumorgewebe wurde im tief gefrorenen Zustand zermahlen und in 1000 µl peqGold TriFast Trizol (peqlab) aufgenommen. Die Suspension wurde anschließend homogenisiert und bei RT für 5 min inkubiert. Der Überstand wurde nach fünfzehnminütiger Zentrifugation von 14000 rpm bei 4 °C in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Probe für 15 s kräftig geschüttelt, bei RT für 3 min inkubiert und anschließend bei 12000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Isopropanol zur wässrigen Phase hinzugegeben, leicht gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 1000 µl kaltem 75% EtOH gewaschen und anschließend bei 12000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die präparierte RNA wurde einer Qualitätskontrolle unterzogen.

Zur Isolierung der präparierten Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit verwendet. Das Volumen der Probe wurde mit DEPC-Wasser auf 100 µl eingestellt und die Probe nach Vorschrift des Herstellers aufgearbeitet. In Abweichung vom Herstellerprotokoll wurde die RNA mit 25 µl *RNAse free water* eluiert und der Durchfluss erneut auf die Säue aufgetragen und ein zweites Mal eluiert. Das Endvolumen der aufgereinigten RNA in wässriger Lösung betrug somit 25 µl. Die RNA wurde einer Qualitätskontrolle unterzogen. Zur Entfernung der genomischen DNA, als Störfaktor der relativen Quantifizierung der RNA Transkripte, wurde nach Angaben des Herstellers (*RNAse-free DNase Set*; Qiagen) ein DNase Verdau auf den Qiagensäulen durchgeführt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.5.5 Qualitätskontrolle der präparierten Nukleinsäuren

Native Gelelektrophorese:

Die Analyse der RNA erfolgte über die Auftrennung in neutralen Agarosegelen (1,0 % Agarose in 1x TBE Puffer mit Ethidiumbromid zur Anfärbung der Nukleinsäuren). Als Laufpuffer wurde UltraPure 10x TBE Puffer (Gibco) verwendet. Es wurde 1 µg RNA pro Probe aufgetragen.

Photometrische Konzentrationsbestimmung:

Mittels photometrischer Bestimmung der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurden die Konzentration und die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt. Die Berechnung der Konzentration für RNA (gemessen bei 260 nm, Schichtdicke 1 cm) lautet $1 \text{ OD} = 40 \text{ µg/ml}$.

Durch die Bestimmung des Quotienten der bei 260nm und 280nm gemessenen Absorption ($A_{260}:A_{280}$) erhält man eine Information über die Reinheit der Nukleinsäurepräparation. Liegt der Quotient für RNA im Bereich 1,9–2,0, handelt es sich um eine reine Präparation. Für die Aufreinigung mit Trizol ist ein Wert zwischen 1,5–1,7 akzeptabel. Phenol absorbiert ebenfalls bei 260 nm, wodurch eine höhere RNA-Konzentration vorgetäuscht werden kann. Es ist unbedingt darauf zu achten, bei der Präparation kein Trizol mitzuschleppen. Bei niedrigeren Quotienten kann man eine Verunreinigung durch Proteine und/oder Phenol erkennen. Eine genaue Bestimmung der Nukleinsäuremenge ist dann nicht möglich.

2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *polymerase chain reaction* (PCR) ist eine molekulargenetische Methode zur Vervielfältigung von DNA, beruhend auf einer enzymatischen Reaktion [Mullis *et al.*, 1986].

Zur Amplifikation von PCR Produkten wurden zwei prinzipielle Verfahren angewendet, zum einem die konventionelle PCR in einem herkömmlichen Thermocycler und zum anderen die Real-time PCR mit dem LightCycler 2.0 und 480. Zum Auswerten der entstandenen Amplifikate im Thermocycler wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet.

Die für die entsprechenden PCR Läufe ausgewählten Primer wurden lyophilisiert geliefert (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) und mit Aqua dest. auf die entsprechende Konzentration eingestellt.

2.5.7 Mykoplasmenachweis durch PCR Analyse

Das Venor®GeM-Mykoplasmen Detektionskit (minerva biolabs, Berlin), auf Basis der PCR Methodik, erlaubt eine schnelle und sehr sensitive Detektion von Mykoplasmenkontaminationen in biologischen Proben. Das Detektionslimit liegt bei 1 bis 5 fg Mykoplasmen DNA. Die PCR Probe wurde durch kurzzeitiges Erhitzen für den Test vorbereitet. Im Probenmaterial enthaltene Mykoplasmen wurden so lysiert und DNasen inaktiviert. Zusätzlich wurde auch die DNA von der Probe isoliert und mit analysiert.

Das PCR Programm beinhaltete eine initiale Denaturierung bei 94 °C für 2 min. Für 39 Zyklen erfolgte bei 94 °C für 30 s die Denaturierung der DNA, die Primerhybridisierung bei 55 °C für 30 s und die Extensionszeit von 30 s bei 72 °C. Abschließend wurden die Produkte auf 4 °C herunter gekühlt.

Das Gesamtvolumen des Ansatzes für eine Reaktion betrug 25 µl. Für jede Testreihe wurde eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mitgeführt. Der PCR Reaktionsansatz wurde mit einem 10x Reaktionspuffer (2,5 µl), 2,5 µl dNTP-Primermix, 2,5 µl interne DNA Kontrolle, 2,0 µl DNA Produkt und 0,2 µl Polymerase (5 U/µl) angesetzt.

Bei Mykoplasmenbefall hätte das PCR Produkt eine Größe von ca. 270 bp. Das Testsystem beinhaltet außerdem eine interne Kontrolle, welche nur bei mykoplasmenfreien Proben ein 191 bp großes PCR Produkt ergab.

2.5.8 Genotypisierung der pfp/rag2 Knock-out Mäuse mit Selektindefizienzen

Die Genotypisierung der pfp/rag2 Tiere mit und ohne Selektindefizienz wurde je nach entsprechendem Genlokus mit verschiedenen PCR Ansätzen realisiert. Folgende Primer wurden für die Genotypisierung der Mäuse verwendet:

Gen	Sequenz	Amplifikat	Quelle
pfp	for: 5'-AGC CAG TCC AGC TCT GGC ATG-3' rev: 5'-TTG ATA TTA GCA GCT GCC TC-3'	1500 bp -/- 510 bp +/+	Walsh <i>et al.</i> , 1994
rag2	for_1: 5'-GGG AGG ACA CTC ACT TGC CAG TA-3' rev: 5'-AGT CAG GAG TCT CCA TCT CAC TGA-3' for_2: 5'-CGG CCG GAG AAC CTG CGT GCA A-3'	350 bp -/- 263 bp +/+	Kim <i>et al.</i> , 1998
E-Selektin	for_1: 5'-GGA CTG TGT AGA GAT TTA CAT CC-3' rev: 5'-GCA GGT GTA ACT ATT GAT GGT-3' for_2: 5'-CAC GAG ACT AGT GAG ACG TG-3'	315 bp -/- 664 bp +/+	Labow <i>et al.</i> , 1994
P-Selektin	for_1: 5'-TTG TAA ATC AGA AGG AAG TGG-3' rev: 5'-AGA GTT ACT CTT GAT GTA GAT CTC C-3' for_2: 5'-CAC GAG ACT AGT GAG ACG TG-3'	479 bp -/- 322 bp +/+	Mayadas <i>et al.</i> , 1993

Tabelle 2.4: Auflistung der PCR Primer

pfp/rag2 Genlokus:

Die Genotypisierung der pfp/rag2 Mäuse wurde mittels *touchdown* PCR durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein Gradient von Primerhybridisierungstemperaturen durchlaufen, beginnend mehrere Grad über der Schmelztemperatur der Primer. Dieser Vorgang sollte die Bildung unspezifischer Nebenprodukte verringern [Don *et al.*, 1991]. Anschließend wurden mehrere Zyklen unter Standardbedingungen durchgeführt.

Das Programm für das pfp Gen wurde folgendermaßen realisiert: Nach der initialen Denaturierung von 3 min bei 94 °C folgten 12 Zyklen mit 20 s Denaturierung, einer Primerhybridisierung beginnend mit 66 °C (-0,5 °C pro Zyklus) bei 1 min 30 s und einer Extensionsphase von 2 min bei 72 °C. Im zweiten Teil wurden 25 Zyklen mit 20 s Denaturierung, 2 min Primerhybridisierung bei 60 °C und 3 min Extension bei 72 °C durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Extensionsphase von 3 min bei 72 °C mit anschließender Abkühlung der Produkte auf 4 °C. Das Programm für das rag2 Gen wurde gleichermaßen realisiert. Der einzige Unterschied im Protokoll war eine verkürzte Extensionszeit von 45 s bei 72 °C.

Der PCR Reaktionsansatz wurde mit 12,5 µl 2x *Red Taq Readymix* (Sigma) mit 10 pmol Primer und 2 µl DNA Probe in einem 25 µl Volumen angesetzt. Der Vorteil dieser Reaktionsansätze war die direkte Beladung der Produkte ins Agarosegel.

Die Amplifikationsgröße beim Wildtypgen pfp war 510 bp. Mäuse mit heterozygoten pfp Allelen besaßen ein Produkt bei 510 und 1500 bp. Zusätzlich konnte ein

Zwischenprodukt bei ca. 700 bp auftreten, welches auch bei dem mutierten Genprodukt von 1500 bp als weitere Bande sichtbar war. PCR Produkte des Gens *rag2* für reine Wildtyptiere lagen bei 263 bp, wohingegen sich eine Mutation im Allel mit 350 bp Genprodukt zeigte. Der Primer *for_2* für die *rag2* PCR bindet dabei die ins Genom eingebaute Gen-Kassette [Kim *et al.*, 1998].

E- und P-Selektin Genlokus:

Die Genotypisierung der *pfp/rag2* Mäuse mit eingekreuzter Selektindefizienz wurde mit einem einfachen PCR Programm durchgeführt. Bei dieser Methode wurde der *REDEExtract-N-Amp PCR Reaction Mix* von Sigma verwendet. Dieser Ansatz enthält einen JumpStart Taq Antikörper für eine spezifische hot start amplification. Der Reaktionsansatz beinhaltet 20 µl Gesamtvolumen mit 1x *REDEExtract-N-Amp* PCR Reaktionsmix (mit schon beinhalteten dNTP's, Taq Polymerase, *REDTaqDye*), je 0,4 µM Primer und 4 µl des DNA Gewebeextrakts.

Das PCR Programm hatte eine dreiminütige Vordenaturierung bei 94 °C. Die 35 PCR Zyklen wurden mit Denaturierung bei 94 °C für 30 s, die Primerhybridisierung bei 58 °C für 30 s und die Extension bei 72 °C für 35 s durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Inkubationszeit von 10 min bei 72 °C, gefolgt von der Kühlung der Produkte auf 4 °C.

Die Produktgrößen der E-Selektin PCR waren für den homozygoten Wildtyp bei 664 bp und für die homozygote Mutante bei 315 bp. Der heterozygote Genotyp beinhaltete beide Produktgrößen. Bei der P-Selektin PCR ergaben sich die Amplifikate homozygot Wildtyp mit 322 bp und homozygot Mutante mit 479 bp. Durch die Bindung aller drei Primer und Amplifikation zweier Produktbanden zeigte sich der heterozygote Genotyp. Der gemeinsame Primer *for_2* für die E- und P-Selektin PCR bindet dabei die ins Genom eingebaute Gen-Kassette [Frenette *et al.*, 1996].

2.5.9 Absolute Quantifizierung humaner Tumorzellen im Mausblut mittels Alu-PCR System

Die Bestimmung zirkulierender humaner Tumorzellen im Blut der Maus erfolgte durch eine absolute Quantifizierung der isolierten DNA mittels humanspezifischer Alu Primer [Nehmann *et al.*, 2010]. Im menschlichen Genom treten die Alu-Sequenzen als repetitive DNA-Sequenzen auf und machen über 10 % des Genoms aus [Batzer und Deininger 2002].

Die absolute Quantifizierung der DNA Proben wurde anhand einer Standardkurve der

DNA aus der DU4475 Zelllinie durchgeführt. Es erfolgten zwei unabhängige PCR Läufe, wobei die zu untersuchenden Proben als Triplikate eingesetzt wurden. Zur Auswertung wurden nur PCR Läufe akzeptiert, die eine geeignete Effizienz von 1,8 bis 2,0 und eine kleine Fehlerquote ($< 0,05$) aufwiesen. Die Auswertung erfolgte über die Software des LightCycler 480 Gerätes.

2.5.10 Reverse Transkriptase PCR

Die Reverse Transkriptase PCR dient dem Nachweis spezifischer mRNA. Dazu wird zunächst mit einer Reversen Transkriptase ein zur mRNA komplementärer DNA Strang synthetisiert und anschließend eine Standard PCR durchgeführt.

Die PCR erfolgte in zwei Schritten mit dem *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* von Roche (Mannheim). Der Reaktionsansatz wurde mit 1,5 μg RNA, 2,5 μM Oligo(dT)-18 Primer, 60 μM *Random Hexamer* Primer in einem Volumen von 13 μl mit RNase freiem H_2O angesetzt. Die Ansätze wurden danach bei 65 °C für 10 min erhitzt und der zweite Ansatz für die cDNA Synthese angesetzt. Dazu wurden ein 1x Reverse Transkriptase Reaktionspuffer (8 mM MgCl_2), 20 U *Protektor RNase Inhibitor*, 1 mM dNTP-Mix und 10 U Reverse Transkriptase in einem Volumen von 7 μl zusammen mit dem inkubierten 13 μl Ansatz pipettiert. Die Synthese erfolgte für 10 min bei 25 °C, gefolgt von 60 min bei 50 °C. Zum Inaktivieren der *Transcriptor Reverse Transcriptase* erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 85 °C für 5 min. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und bei -20 °C weg gefroren.

2.5.11 Quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion (qRT PCR)

Mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR wird die mRNA Expression der Gene EpCAM, Mucin1, Mammaglobin1, Her2neu, Zytokeratin 18 und CEACAM5 bestimmt. Die Primer sind in Tabelle 2.5 gelistet. Das Prinzip beruht auf einer simultanen Koamplifikation des zu untersuchenden Gens und eines *single copy* Gens, d. h. eines in nur einer Kopie vorliegenden Referenzgens, das in allen Geweben gleich stark exprimiert ist. Als Referenzgen wurden GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase; NCBI: BC009081.1) und ACTB (β -Actin; NCBI: BC004251.1) gewählt. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass die Menge des gebildeten PCR Produkts unabhängig von der eingesetzten Menge an Primer, Nukleotiden und Taq-Polymerase ist und die Reaktion im logarithmischen Bereich abläuft. Zum Ausgleich von Schwankungen zwischen einzelnen PCR Reaktionen wurde die Expression

zusätzlich in den beiden Mammakarzinomzelllinien DU4475 und MCF7 als interner Standard gemessen. Die Detektion der PCR Produkte sowie die quantitative Bestimmung der Produktmengen erfolgte mit Hilfe des LightCyclers 2.0/480 und der LightCycler Software 4.05/480 (Roche, Mannheim).

Bei dem LightCycler-System erfolgte die Messung der Amplifikation von PCR Produkten durch verschiedene Fluoreszenztechniken. Der LightCycler besitzt sechs verschiedene Fluoreszenzkanäle, mit denen Emissionssignale gemessen werden können, und bietet zwei prinzipielle Möglichkeiten der Detektion von PCR Produkten: SYBR Green oder Hydrolysesonden. Die Quantifizierung des PCR Produktes erfolgt, wenn das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundrauschen hervortritt und die PCR in die exponentielle Phase übergeht. In der vorliegenden Arbeit wurde mit beiden Detektionsmethoden gearbeitet. SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, den die DNA unspezifisch bindet. Bei einer Anregungswellenlänge im blauen Bereich ($\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$) fluoresziert es grün bei einem Emissionsmaximum von $\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$. Ungebunden emittiert der Farbstoff eine geringe Fluoreszenzmenge, wodurch eine minimale Hintergrundfluoreszenz entsteht. Bei der Interkalation von SYBR Green I in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA erfolgt ein starker Anstieg der Fluoreszenz.

Bei den Hydrolysesonden (*Universal ProbeLibrary*, Roche) handelt es sich um sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide. Sie tragen zwei dicht nebeneinander liegende Fluorophore, die über Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) miteinander interagieren können. Dabei überträgt der kurzwelligere Reporter-Farbstoff Fluorescein (FAM) am 5'-Ende, der mittels blauem Licht angeregt wird, seine Energie strahlungslos an den langwelligeren LightCycler-spezifischen Quencher-Farbstoff nahe des 3'-Oligonukleotidendes. Dieser gibt ein detektierbares rotes Licht ab. Während der PCR Amplifikation wird die an der Zielsequenz hybridisierte Sonde durch die 5'-3' Exonuklease der Taq DNA Polymerase zerstört. Durch die räumliche Trennung von Reporter- und Quencher-Farbstoff wird die Unterdrückung der Emission des Reporters aufgehoben.

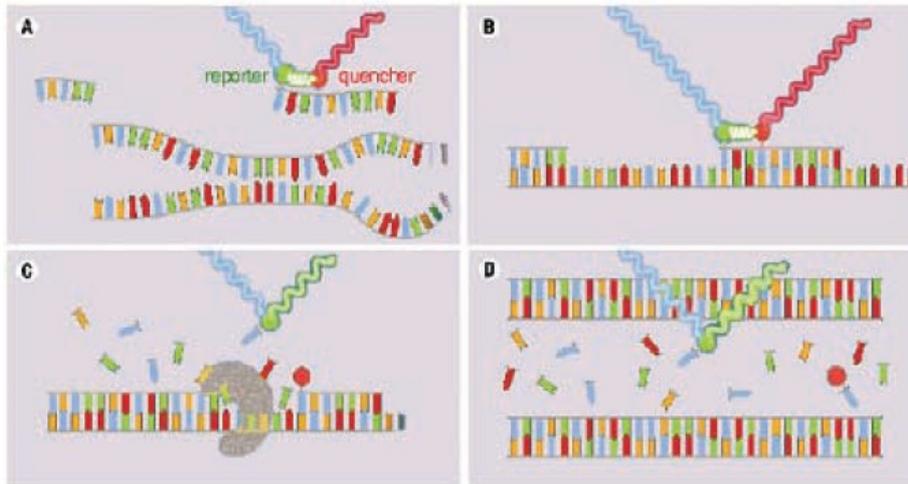


Abbildung 2.2: Prinzip des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET):

Die Lichtquelle des LightCyclers (470nm, blau) regt den Reporter-Farbstoff (a) Fluorescein energetisch an. Durch die direkte Nähe des zweiten Farbstoffs wird die Energie des Reporter-Farbstoffes strahlenlos an den Quencher-Farbstoff übertragen. Der LightCycler-Farbstoff des Quenchers wird zur Emission von rotem Licht (640 nm) angeregt. Die Sonde (b) hybridisiert im Zuge der PCR Amplifikation (b) an die Zielsequenz. Durch die Phosphorylierung am 3'-Ende kann die Sonde nicht verlängert werden. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase wird die Sonde gespalten (c), so dass die Sondenfragmente von der Zielsequenz dissoziieren. Der Reporter-Farbstoff ist durch die räumliche Trennung zu Quencher wieder befähigt seine Grünfluoreszenz (530 nm) zu emittieren, die vom LightCycler detektiert wird. Die Produktion von PCR Produkten wird durch den Anstieg der Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes detektiert. (No. LC 18/2004 Roche Handbuch)

Mit den ausgewählten Primerpaaren wurde zunächst eine Real-time PCR zur Bestimmung der idealen Hybridisierungstemperatur und Extensionszeit durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse (*T_m Calling*), wobei das PCR Produkt langsam erhitzt wurde (Temperaturänderung: 0,1 °C/s).

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die Schmelztemperatur (*T_m*) des amplifizierten PCR Produktes und einer daran hybridisierten Sonde ermittelt. Dabei handelt es sich um diejenige Temperatur, bei der 50 % der Sonden an ihrer Zielsequenz hybridisiert und 50 % von dieser dissoziiert vorliegen. Der *T_m*-Wert ist abhängig vom GC-Gehalt der Zielsequenz und der Länge des Produktes.

Die relative Quantifizierung der Proben mit unbekannter Expressionsstärke fand in vier unabhängigen PCR Läufen und in Triplikaten statt, immer mit paralleler Analyse des Referenzgens. Zur Auswertung wurden nur PCR Läufe akzeptiert, die eine geeignete Effizienz von 1,8 bis 2,0 und eine kleine Fehlerquote (< 0,05) aufwiesen. Für die Festlegung geeigneter Tumormarker wurden lediglich Amplifikate berücksichtigt, welche einen Ct-Wert von 35 nicht überschritten.

2.5.12 Primerdesign und semi nested PCR

Bevor eine PCR bzw. Real-time PCR durchgeführt wurde, mussten zuerst geeignete Primer gesucht werden, welche spezifisch für das gesuchte Genprodukt sind. Die Primer mussten dabei bestimmte Kriterien erfüllen:

- die gesuchte cDNA humanspezifisch und mit ausreichender Effizienz amplifizieren
- keine Bildung von Homodimeren mit sich selbst
- keine gDNA amplifizieren
- keine Ausbildung interner Haarnadelstreifen (*hairpin loops*)
- Schmelztemperaturen (T_m) der Primer sollten gleich sein

Gerade die Sequenzhomologie zwischen Mensch und Maus erschwert die Suche nach geeigneten humanspezifischen Primern. So liegt beispielsweise beim Referenzgen ACTB eine Sequenzidentität von 91 % der mRNA von Maus und Mensch vor. Die Primersuche erfolgte mittels Primer-BLAST und BLAST von Maus- und Humansequenzen (NCBI).

Für die nested PCR wurde mit den ausgewählten Primern eine PCR am Thermocycler durchgeführt. Bei der nested PCR wird nach erfolgreicher erster Amplifikation das erste Produkt als Template für eine zweite PCR verwendet. Die Amplifikationsprodukte wurden für eine 1:10 Verdünnungsreihe eingesetzt, die zur Erstellung der Standardkurve am LightCycler Gerät dienen. Eine ausgewählte Verdünnung wurde als Kalibrator in jedem LightCycler Lauf eingesetzt. Die Primer sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

Das PCR Programm richtete sich nach den PCR Oligonukleotiden und wurde für jeden Primer entsprechend eingestellt. Das Grundprinzip des PCR Programms ist eine zweiminütige Vordenaturierung bei 94 °C. Es wurden 30 PCR Zyklen durchgeführt mit Denaturierung bei 94 °C für 20 s, die Primerhybridisierung bei 55-60 °C für 30 s und die Extension bei 37 °C für 1 min. Die entstandenen Produkte wurden bei 4 °C gekühlt.

Der PCR Reaktionsansatz wurde mit der peqGOLD Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l; Preqlap Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit 1x Reaktionspuffer S, 1x Enhancer Solution P, 40 mM dNTP-Mix und 0,8 pmol Primer und 2 μ l cDNA Probe in einem 25 μ l Volumen angesetzt.

Gen	Sequenz	Amplifikat	Quelle
CEA (CEACAM5)	A for 5'-TCT GGA ACT TCT CCT GGT CTC TCA GCT GG-3' B rev 5'-TGT AGC TGT TGC AAA TGC TTT AAG GAA GAA GC-3' C for 5'-GGG CCA CTG TCG GCA TCA TGA TTG G-3'	A+B 160 bp C+B 132 bp	Mori <i>et al.</i> , 1995
CK18	A for 5'-TGC TCA CCA CAC AGT CTG AT-3' B rev 5'-CAC TTT GCC ATC CAC TAG CC-3' C for 5'-TGG AGG ACC GCT ACG CCC TA-3 D rev 5'-CCA AGG CAT CAC CAA GAC TA-3'	A+B 413 bp C+D 392 bp	Tschentscher <i>et al.</i> , 1997
Mucin1	A for 5'-ACC ATC CTA TGA GCG AGT ACC C-3' B rev 5'-GCC ACC ATT ACC TGC AGA AAC-3' C for 5'-AGT GCC GCC GAA AGA ACT AC-3'	A+B 107 bp B+C 161 bp	cdsJ05581 mRNA X52229, Mitas <i>et al.</i> , 2001
Her2neu	A for 5'-CCC AGC TCT TTG AGG ACA AC-3' B rev 5'-GGA TCA AGA CCC CTC CTT TC-3' C rev 5'-AGC CAG CTG GTT GTT CTT GT-3'	A+B 153 bp A+C 227 bp	AK295195
Mam1	A for 5'-CGG ATG AAA CTC TGA GCA ATG T-3' B rev 5'-CTG CAG TTC TGT GAG CCA AAG-3' C for 5'-TGC CAC TAC AAA TGC CAT AGA-3'	A+B 108 bp A+C 158 bp	AF015224 cds U33147, Mitas <i>et al.</i> , 2001
EpCAM	A for 5'-CCAGAACAATGATGGGCTTT-3' B rev 5'-TCTCCTTCTGAAGTGCAGTCCGC-3' C for 5'-CTGGTGTGTGAACACTGCTGGGG-3'	A+B 245 bp B+C 161 bp	NM_002354.2
GAPDH	A for 5'-TCG ACA GTC AGC CGC ATC-3' B rev 5'-AAA CCA TGT AGT TGA GGT CAA TG-3' C rev 5'-GTT AAA AGC AGC CCT GGT GA-3'	A+B 191 bp A+C 130 bp	BC009081.1

Tabelle 2.5: Verwendung ausgewählter Primer für die nested PCR

2.5.13 PCR Array

1. PCR basiertes Genexpressionsprofil bei Tumorzellen (biomol, Hamburg)
Die PCR Arrays im 96-Well-Format sind für die gleichzeitige Profilierung der Expression von 84 Extrazellulärmatrix- und Zelladhäsionsspezifischen Genen, fünf Referenzgenen sowie zwei Negativkontrollen ausgelegt (Katalognummer: PAHS-013). Zu den Referenzgenen zählen β 2-Mikroglobulin (B2M), Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1), Ribosomal Protein L13a (RPL13A), GAPDH und ACTB. Die PCR Arrays beinhalten SYBR Green zur Detektion der Amplifikate.

Zu Beginn erfolgte eine RNA-Isolierung aus den Zelllinien DU4475 und HT29 für die anschließende cDNA Synthese von 1,4 µg RNA. Die Gesamt-RNA wurde anhand des Standardprotokolls mittels *RT² First Strand Kit* in cDNA umgeschrieben, und das gesamte Volumen dieses Reaktionsansatzes (20 µl) wurde mit 90 µl Aqua dest. verdünnt. Der RT² qPCR Mastermix wurde in einem *multi-channel reservoir* angesetzt mit einem Endvolumen von 2700 µl. Für den Ansatz wurden 2x *SABiosciences RT² qPCR Master Mix*, 102 µl der verdünnten cDNA Probe und 1248 µl Aqua dest. eingesetzt. Pro Probe ergaben sich 25 µl des PCR Ansatzes.

Das PCR Programm mit 10 min Vordenaturierung bei 95 °C sowie 40 Zyklen mit 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C wurde mit den ABI 7500 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der Delta Delta Ct-Methode mittels einer kostenfrei zur Verfügung gestellten auf Excel basierenden Analyse Software (SDS 2.1).

Der *cutoff* Wert für die Datenanalyse geeigneter Tumormarker lag bei einem Ct-Wert von 35 für die Expression der Amplifikate. Für die Auswertung wurden nur Expressionsmarker gewählt, die eine Tendenz der Hoch- bzw. Herunterregulierung gegenüber der Kontrollzelllinie HT29 ergaben.

2. PCR basiertes Genexpressionsprofil beim Tumorgewebe (Roche, Mannheim)

Die *RealTime ready* Katalog Assays und *RealTime ready* Designer Assays sind funktionell ausgetestete käuflich erwerbbar qPCR Assays für humane Targetgene. Jeder Assay beinhaltet die Primer und eine *Universal Probe Library* (UPL) Sonde. UPL basiert auf kurzen Hybridisierungssonden, die aus einem Oligonukleotidenpaar besteht, die benachbart hybridisieren können. Es wurden vier verschiedene Gensequenzen untersucht (ITGA4, EpCAM, FUT3 und PSGL1). Als Referenzgene wurden GAPDH und B2M ausgewählt. Die Proben wurden als Triplikate in zwei unabhängigen Läufen untersucht.

Die Gesamt-RNA wurde mittels *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* in cDNA umgeschrieben (siehe 2.5.10). Der gesamte Reaktionsansatz wurde mit 180 µl Aqua dest. verdünnt. Der PCR Ansatz wurde mit 2x *LightCycler 480 Probes Master*, 1 µl vom 10x *RealTime ready Assay*, 5 µl der verdünnten cDNA Probe und 4 µl Aqua dest. für ein Endvolumen von 20 µl angesetzt.

Das PCR Programm wurde nach Angaben des Herstellers mit dem festgelegten Protokoll für *Monocolor Hydrolysis Probe/UPL Probe* am LightCycler 480 gestartet. Mit 10 min Vordenaturierung bei 95 °C sowie 45 Zyklen mit 10 s bei 95 °C, 30 s bei

60 °C und 1 s bei 72 °C wurde die PCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der integrierten Software des Gerätes. Auch hier wurden nur die Expressionsdaten der Targetgene berücksichtigt, die einen Ct-Wert kleiner 35 aufwiesen.

2.5.14 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die PCR Produkte wurden vor der Sequenzierreaktion gereinigt. Die Sequenzierreaktion erfolgt nach dem Prinzip von Sanger [1977]. Um DNA eines PCR Produktes von Salzen und Enzymen zu reinigen, wurde eine Natriumacetat Fällung durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Ansätze mit Aqua dest. auf 170 µl aufgefüllt, 17 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 500 µl 100 % EtOH zugefügt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde 20 min luftgetrocknet. Die DNA Konzentrationen wurden spektralphotometrisch bestimmt und für die Sequenzierreaktion als Template eingesetzt. Für ein Reaktionsvolumen von 20 µl wurden 20 ng PCR Produkt (ca. 100 bp Länge), 10 pmol Sequenzierprimer, 2µl *BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix Version 1.1* und 7 µl des *2,5x Sequencing Buffer* der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) eingesetzt.

Das PCR Programm bestand aus folgenden Schritten: Für das Auftrennen der DNA Sequenzen wurde initial eine Vordenaturierung bei 95 °C für 10 min durchgeführt. Danach erfolgte die Denaturierung für 10 s bei 95 °C, gefolgt von der Primerhybridisierung bei 55 °C für 10 s und der Extension bei 60 °C für 3 min. Diese Schritte wurden mit 35 Zyklen wiederholt. Die Sequenzierprodukte wurden auf 4 °C abgekühlt. Nach Ende des *cycle sequencing* erfolgte erneut eine Aufreinigung des Reaktionsansatzes. Für die Sequenzierungen wurde ein ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) verwendet.

2.6 Proteinchemische Methoden

2.6.1 Gewinnung von Membranproteinen aus Zellen

Integrale Membranproteine der Tumorzellen lösen sich ideal mit Detergenzien wie TritonX 100. Für eine Aufreinigung werden die Proteine durch Solubilisieren in Lösung gebracht.

Das in DPBS gewaschene Zellpellet wurde mit Homogenisationspuffer (1:6, w/v) versetzt und die Zellen gut aufgeschwemmt. Zum Aufschließen der Zellen wurde die

Zelllinie mit einem TissueLyser (Qiagen) für 2 min bei 20 Hüben/s homogenisiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für 15 min wurde die Probe bei 4 °C und 800 g zentrifugiert, der entstandene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wie zuvor zentrifugiert. Nach 15 min wurde der Überstand in ein 2 ml Beckmanröhrchen gegeben und 1 h bei 55000 rpm und 4 °C (Vakuum) in der TL-100 (Rotor: 100.2) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und erneut für 30 min bei 55000 rpm und 4 °C (Vakuum) zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthielt die Membranproteine und wurde bei -20 °C bzw. -80 °C gelagert.

Der *Protein Inhibitor Cocktail* (Merck) wurde mit einer Verdünnung von 1:100 frisch zum Homogenisationspuffer bzw. Zellysepuffer gegeben.

2.6.2 Gewinnung von Gesamtzelllysaten

Die Zellkulturzellen wurden zweimalig mit DPBS gewaschen. In 2 ml kaltem DPBS wurden die adhärennten Zellen mittels Zellschaber vom Flaschenboden entfernt. Nach Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 1500 rpm wurde der Überstand entfernt. Abhängig von der Zelldichte wurde das Zellpellet in entsprechender Menge in Zellysepuffer aufgenommen.

Das Tumor- und Lungengewebe der Mäuse wurde durch Stickstoff gekühlt und mit einem Mörser zerkleinert. Eine Gewebemenge von ca. 50 mg wurde in *MP Lysing Matrix D*-Reaktionsröhrchen mit 500 µl Lysepuffer gegeben und mit dem FASTPREP®-24 INSTRUMENT der Firma MP Biomedical (Solon, USA) homogenisiert.

Die Proben (Zellen oder Gewebe) wurden 20 min auf Eis inkubiert. Nach der 20minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm (4 °C) wurde das entstandene Zelllysate im Überstand abgenommen und der Proteingehalt bestimmt. Die Lysate wurden bei -80 °C gelagert.

2.6.3 Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte

Die Bicinchoninsäure (BCA)-Methode zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit (Nachweisgrenze liegt bei 0,1-1 µg/ml) und eine geringe Störanfälligkeit aus. Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die Cu²⁺ werden dabei zu Cu⁺-Ionen reduziert, die mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption dieses Farbkomplexes

erfolgt bei 562 nm. Die Reduktion wird durch die Seitenketten von Cystein, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindung hervorgerufen, wobei die Intensität der Farbstoffbildung das Redoxverhalten der beteiligten Gruppen u. a. von der Temperatur abhängt, so dass durch deren Variation die Sensitivität des Tests verändert werden kann.

Die für die Quantifizierung benötigte Standardreihe (BSA Stock mit 2 mg/ml) von 200, 150, 100, 50, 25, 12,5 und 5 µg/ml wurde bei jeder Messung mitgeführt. Die Zelllysate wurden verdünnt (1:20-1:50) mit der BCA Technik gemessen. Dazu wurden 25 µl der angesetzten Standardkonzentrationen und die unbekannt Proben als Triplikate in eine 96 well Mikrotiterplatte pipettiert. Das Volumen der BCA Arbeitslösung betrug 200 µl und wurde zu Standard und Proteinprobe hinzugegeben. Die in der Mikrotiterplatte befindliche Lösung wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Messung wurde mit dem Spektralphotometer durchgeführt. Die Arbeitslösung bestand aus *BCA™ Protein Assay Reagent A* und *BCA™ Protein Assay Reagent B* (50:1) der Firma Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA).

2.6.4 Dotblot Analyse

Für die Etablierung der Westernblot Methode zur Darstellung der Membranproteine wurde als Vorversuch ein Dotblot durchgeführt. Diese Methode wurde für den semiquantitativen bzw. quantitativen Nachweis von auf Membranen immobilisierten Antigenen verwendet. Dazu wurde die zu analysierende Probe ohne elektrophoretische Auftrennung direkt auf die Membran pipettiert. Mit dieser Methode kann die Effizienz der Proteinextraktion überprüft werden und die Bindungsfähigkeit der gewählten Antikörper für das Glykoprotein ausgetestet werden.

Dazu wurde das kommerziell erhältliche Mucin1, IgG Serum der Maus und die entsprechenden Proteinlösungen der Extraktion aufgetragen. Die Membran wurde nach dem vollständigen Antrocknen der Proteine in TBS mit 3 %igem Tween 20 (TBST) für 30 min getränkt, um die Proteinbindungsstellen der Membran zu blockieren. Es folgte eine Inkubation von 45 min mit dem Antikörper Maus-anti-human Muc1 in verschiedenen Verdünnungen (1:200, 1:1500, 1:800 und 1:1000). Nach den stringenten Waschschritten erfolgte die Inkubation von 30 min mit dem *horseradish* Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper Ziege anti Maus (1:200). Für die Entwicklungslösung wurde Diaminobenzidin verwendet (siehe 2.6.9).

2.6.5 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die analytische Elektrophorese wurde nach Laemmli *et al.* (1970) mit dem Mini-PROTEAN 3 System (Biorad, München) durchgeführt. Bei dieser denaturierenden Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine durch Bindung von SDS negativ geladen und denaturiert, Disulfidbrücken werden durch β -Mercaptoethanol aufgebrochen. Die Proteine können so im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Für die Auftrennung der Proteine wurde die Konzentration der Trenngele nach der Größe der zu trennenden Proteine ausgewählt. Die zu analysierenden Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit SDS-Ladepuffer [Sambrook *et al.*, 1989] mit einer Proteinkonzentration von 40 μ g auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurde der *full range rainbowTM molecular weight marker* (12-225 kDa; GE Healthcare) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in der vertikalen Mini-PROTEAN 3 Gelkammer (BioRad) im 1x Laufpuffer (10x Tris/Trici/SDS Puffer von Biorad) für 20 min bei 60 V und 300 mA zum Einlaufen und anschließend für 30 min bei 100 V und 300 mA zum Auftrennen.

Für die SDS-PAGE wurde das Trenngel (7 %-Gel) mit 30 % Acrylamid, 1,5 M TrisHCL (pH 8,8), 10 %iges SDS, 10 %iges APS und TEMED angesetzt. Für das Sammelgel (5 %-Gel) wurde 30 % Acrylamid, 0,5 M TrisHCL (pH 6,8), 10 %iges SDS, 10 %iges APS und TEMED verwendet. Der Ladepuffer für die Elektrophorese bestand aus 0,5 M TrisHCl (pH 6,8), Glycerin, 10 % (w/v) SDS und 0,5 % Bromphenolblau. Die Gelgröße betrug 8 cm (B) x 7,3 cm (H) x 0,1 cm (T).

2.6.6 Proteinnachweis durch Coomassiefärbung

Nach dem elektrophoretischen Trennvorgang wurde das gesamte Gel in Coomassie-Färbelösung gegeben [Bennett und Scott 1971]. Diese enthält neben Ethanol oder Methanol, um den Coomassie-Farbstoff in Lösung zu bringen auch Essigsäure, um die Proteine im Gel zu fixieren. Als Farbstoff dient Coomassie-Brillant-Blau R-250. Dieser lagert sich an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren und färbt so alle Proteine unspezifisch an.

Zur Detektion von Proteinen wurden die Gele zunächst für 20 min in Fixier- bzw. Färbelösung (200 mg Coomassie blau, 90 ml Methanol, 20 ml Essigsäure, 90 ml Aqua dest.) inkubiert und danach bis zum gewünschten Kontrast in einer Entfärbelösung (20 ml Essigsäure, 20 ml Methanol, 160 ml Aqua dest.) entfärbt. Alle

Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Durch Auftragen eines Albuminstandards im Bereich von 10-50 µg/ml war es möglich, eine Konzentrationsabschätzung der aufgetragenen Proteinmenge durchzuführen. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert.

2.6.7 Proteintransfer

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf einen entsprechenden Trägerfilter zur weiteren Behandlung mit Antikörpern zu übertragen, wurde die Semidry Blot-Methode [Kyhse-Andersen 1984] durchgeführt. Dabei wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel über ein senkrecht zum Gel angelegtes Feld eluiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Zur Durchführung des Blots wurden Gel, Transfermembran und vier Blottingpapiere gleicher Größe im Transferpuffer für 5 min äquibriert. Die einzelnen Komponenten wurden in der Semidry Blotkammer zusammengebaut. Auf 2 Blottingpapiere wurden zunächst die Membran und anschließend das Gel sowie zwei weitere Blottingpapiere aufgebracht. Der Transfer wurde bei 300 mA und 100 V für 60 min durchgeführt. Als Transfereinheit wurde das Mini-PROTEAN 3 System (Biorad) verwendet. Der Transferpuffer wurde für jeden Westernblot aus 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % (w/v) Methanol (pH 9,2) frisch angesetzt.

Im Anschluss wurde die Membran zunächst zweimal für je 10 min mit TBS-Puffer gewaschen und für 60 min mit 4 % BSA in TBS bei Raumtemperatur blockiert.

2.6.8 Proteinfärbung mit Ponceau S

Für die Routinekontrolle der Transfereffizienz kann bei Nitrocelluloseblots mit hohen Proteinmengen die Färbung mit dem Standard-Ponceau-S-Verfahren erfolgen. Die Nachweisgrenze der unspezifischen Proteinfärbung liegt bei 5-15 ng Protein pro mm². Die Färbung ist reversibel und verträgt sich mit einer anschließenden Immunfärbung.

Der Blot wurde 5 min bei RT in Ponceaurot (2 % in 3 % Trichloressigsäure) inkubiert und die überschüssige Farbe danach mit Wasser gewaschen. Dieses Verfahren ist empfindlicher als die Coomassiefärbung des Gels (untere Grenze bei ca. 50 ng/Bande) und die Trichloressigsäure fixiert gleichzeitig die Proteine auf dem Blot. Beim späteren Absättigen der Proteinbindungsstellen der Membran verschwindet die Farbe.

2.6.9 Immunodetektion membrantransferierter Proteine

Die Detektion der Proteine erfolgte je nach Fragestellung mit unterschiedlichen Antikörpern. Zur Detektion der Membranproteine wurde die Nitrocellulosemembran ü. N. bei 4 °C mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte ein stringentes Waschen der Membran mit TBST (4x 5 min). Als sekundärer Antikörper wurde Ziege anti Maus HRP (1:200) für 30 min zugesetzt und die Membran danach wieder mit TBST gewaschen. Die Entwicklungslösung wurde für max. 30 min zugegeben. Durch Zugabe von Aqua dest. wurde die Reaktion gestoppt. Die entsprechende Antikörperkonzentration wurde mit einer TBS Lösung mit 4 % BSA eingestellt. Die Diaminobenzidin-Gebrauchslösung wurde für die Entwicklung mit TBS (pH 7,6) und 30 % H₂O₂ angesetzt.

2.7 Histologie und Immunhistologie

2.7.1 Anfertigung von Zytospins und Chamberslides

Für die immunhistologische Untersuchung von Oberflächenmarkern der Tumorzellen wurden die Suspensionszellen DU4475 mittels Zytospins durch Zentrifugation auf einen Objektträger aufgetragen (siehe Kapitel 2.3.5).

2.7.2 Zellen in Agarose

Adhäsive Zellen wurden zunächst vom Zellboden abgelöst. Durch Zentrifugation im Falconröhrchen bei 1500 rpm für 5 min wurden die Zellen vom RPMI Medium getrennt und das Pellet zweimal mit DPBS gewaschen. Durch erneutes Zentrifugieren wurde das DPBS entfernt. Zum Fixieren des Zellpellets wurde Paraformaldehyd für ca. 20 min zugegeben. In DPBS wurden die Zellen gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in frischem DPBS aufgenommen.

Die Zellen wurden für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert, um das DPBS zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit der frisch angesetzten 2%igen Agaroselösung im flüssigen Zustand aufgeschwemmt und unverzüglich zentrifugiert. Nach Erkalten der Agarose wurde das entsprechende Zellpellet im Einbettungskasten in 0,1 mol Phosphatpuffer getränkt.

Bei der Einbettung von Knochenmarkszellen der Maus erfolgte ein abgewandelter Ablauf. Das Knochenmark im Mausfemur wurde in einem 1,5 ml Reaktionsröhrchen

mit 4 %igem Formalin ausgespült und darin für ca. 20 min fixiert. Die gewonnenen Zellen wurden für 10 min bei 1500 rpm (Tischzentrifuge) bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mit 1 ml DPBS wurde das Knochenmark gewaschen, wiederholt 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Aufgeschwemmt wurde das Zellpellet durch 1 ml DPBS. Die Zellen wurden für längere Zeit bei 4 °C gelagert.

2.7.3 Einbettung von Mausgewebe

Primärtumor, Lunge, Leber, Milz, Magen und Darm der Tiere wurden beim finalen Töten entnommen und in 3,7 %igem Formalin für 24 h fixiert. Mit Ausnahme der Lunge wurde nach dem Wechsel in 0,1 molarem Natriumphosphatpuffer das Gewebe im Automaten Shandon Processor 2 LE in einer aufsteigenden 2-Propanolreihe (50%, 70%, 90%, absoluter Alkohol, Xylol) entwässert und paraffiniert.

Die entsprechenden Organe wurden dann mit Paraplast plus (Kendall, Mansfield, USA) eingebettet und ausgehärtet. Zum Anfertigen der Paraffinschnitte wurde ein Schlittenmicrotom (MICROM GmbH, Walldorf) verwendet.

Die fixierte Lunge wurde unter einem Stereomikroskop in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Die entstehenden Lungenschnitte wurden zufällig über einen Objektträger verteilt, in 5 %igem Agar eingelegt und mit einem Deckgläschen zusammengedrückt. Dieser Block wurde wiederum in Paraffin eingebettet, von dem 5 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt wurden.

2.7.4 Hämatoxylin Eosin Färbung zur Bestimmung von Lungenmetastasen

Zum Anfärben von Zell- und Gewebestrukturen der Mauslunge wurde die Hämatoxylin Eosin Färbetechnik verwendet, kurz H. E. Färbung. Die H. E. Färbung der Lungenschnitte erfolgte in einem Färbeautomaten (*Thermo Electron Corporation, Shandon Variostain 24-4*, Astmoor, England) nach Herstellerangaben. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert (XEM 200) und in einer absteigenden Alkoholreihe bis zum Aqua dest. rehydratisiert. Danach erfolgte die Anfärbung mit Hämatoxylin für 1 min, 2 min und folgend in 5 min in Aqua dest., in Eosin für 3 min und wieder in Aqua dest. für 30 s. Zum Schluss wurden die Schnitte wieder in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend dreimal für 5 min in Xylol inkubiert. Als Eindeckmedium wurde Eukitt (Kindler, Freiburg) verwendet.

Die Bestimmung der Metastasenanzahl pro Lunge erfolgte an den H. E. gefärbten Serienschnitten nach einer etablierten Methode [Jojović und Schumacher 2000]. Die Metastasen eines jeden zehnten gefärbten Lungenschnittes wurden unabhängig von ihrer Größe mikroskopisch an zehn im Mittelfeld liegenden Schnitten ausgezählt. Der Mittelwert der Metastasen aller zehn Schnitte einer Lunge wurde ermittelt und mit der Gesamtzahl der Schnitte multipliziert. Die Gesamtzahl der Lungenmetastasen einer Lunge errechnet sich anschließend nach Abzug von 20 %. Zur Auswertung der Gewebeschnitte wurde das Mikroskop der Firma Carl Zeiss (Axioplan 2, Jena) verwendet und die vorliegenden Metastasen bei einer 100fachen Vergrößerung ausgezählt.

2.7.5 Immunhistochemie

Aufgabe der Immunhistochemie ist die Darstellung molekularer Strukturen in histologischen Gewebeschnitten. Dies wird mit Hilfe von gegen Antigene gerichteten Antikörpern erreicht. Diese können entweder direkt mit einem Farbstoff markiert oder an Enzyme gekoppelt sein, die eine zuerst farblose Substrat-Chromogen-Lösung in farbige Produkte aufspalten.

Es existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen Detektionssystemen, die je nach Hersteller variieren. Dazu gehören u. a. Avidin-Biotin-Methoden, CSA-Methodik, und die Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Methodik. Im Folgenden soll nur kurz auf die Methoden, die in den letztendlichen Färbeprotokollen zur Anwendung gekommen sind, eingegangen werden.

Antikörper	Reaktivität	Vorbereitung	Verwendung
anti mitochondrial	Human	EDTA 60 °C ü. N.	CSA Kit 1:1000
anti CD15s	Human	-	1 zu 40
anti Ca19.9	Human	-	1 zu 200
anti PSGL1	Human	120 °C <i>retrievalsolution</i> 1699	1 zu 100
anti CD44	Human	Citratpuffer 60 °C ü. N.	CSA Kit 1 zu 5000
anti Moc31	Human	Protease 37 °C 15 min	1 zu 35
anti CK18	Human	Protease 37 °C 15 min	1 zu 25
anti PanCK	Human	Protease 37 °C 15 min	1 zu 200
anti ICAM	Human	Mikrowelle <i>retrievalsolution</i> 1699	1 zu 150
anti Muc1	Human	Mikrowelle <i>retrievalsolution</i> 1699	1 zu 50
anti Vimentin	Human	Citratpuffer 60 °C ü. N.	1 zu 250
anti Lyve1	Maus	0,1 % Trypsin 37 °C 15 min	1 zu 100
anti F4/80	Maus	0,1 % Trypsin 37 °C 15 min	1 zu 100
GSA-I	Maus	0,1 % Trypsin 37 °C 15 min	1 zu 100
HPA	Human	0,1 % Trypsin 37 °C 15 min	1 zu 100

Tabelle 2.6: verwendete Antikörper und Lektine für die Immunhistologie

2.7.5.1 Antigen-Demaskierungs-Methoden

In Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe zeichnet sich zwar durch eine gute Haltbarkeit und guten Erhalt der morphologischen Strukturen aus, jedoch kommt es während der Fixierung an formalinsensitiven Epitopen zu einer Bildung von sogenannten Konformationsänderungen, die zu einer Maskierung des entsprechenden Antigens bzw. Epitops führen. Demaskierungsverfahren der Epitope umfassen den proteolytischen Abbau durch Enzyme wie Trypsin und Protease (beides von Sigma) sowie das Erhitzen des Gewebes in speziellen Pufferlösungen wie Citrat, EDTA, oder in einer handelsüblichen *retrievalsolution* (Dako) mit entsprechendem pH-Wert. Der tatsächliche Wirkmechanismus ist dabei weitgehend ungeklärt.

2.7.5.2 Avidin-Biotin-Methode

Diese sogenannte ABC-Methode (Alkaline Phosphatase Standard ABC-Kit; Vector Laboratories, Burlingame, USA) ist eine der am häufigsten benutzten Verfahren der Immunhistochemie und basiert auf der hohen Spezifität und Bindungsaffinität von

Avidin für das Vitamin Biotin. Die Verwendung von Biotin bietet den Vorteil, dass fast alle Proteine (Antikörper sowie Enzyme) mit Biotin-Molekülen konjugiert werden können. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Sensitivität. Die grundsätzliche Abfolge der Reagenzien lautet: ungekoppelter Primärantikörper, biotinmarkierter Sekundärantikörper, Avidin-Biotin-Enzymkomplex. Die Färbung schließt mit einer Substrat-Chromogen-Lösung ab.

Die Enzymreaktivität des Komplexes von Avidin mit der Alkalischen Phosphatase wurde visualisiert unter Verwendung von Neufuchsin als Chromogen und Naphtol-AS-bisphosphate als Kopplungskomponente des Farbstoffs.

Dafür wurden 10 ml einer 4% Natriumnitritlösung mit 400 µl Neufuchsin gemischt und 80 mg Tetramisolhydrochlorid in 200 µl TBS (pH 8,24) gelöst und zur Neufuchsinlösung hinzugefügt. Anschließend wurden 40 mg Naphtol-AS-Biphosphat in 1000 µl Dimethylformamid gelöst und als Substrat für die Alkalische Phosphatase hinzugegeben. Zur Hemmung endogener Alkalischer Phosphatase im Gewebe wurde zusätzlich Levamisol verwendet. Zuletzt wurden 260 µl Tween 20 dazugegeben und gründlich geschwenkt. Die Objektträger wurden in dieser Lösung für 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Ende der Entwicklungszeit wurde die Reaktion unter fließendem Leitungswasser für 10 min gestoppt. Alle Schnitte wurden anschließend gegen gefärbt mit Hämalaun als Kernfarbstoff.

2.7.5.3 ABC-Methode mit Tyramid-Signalverstärkung (CSA)

Die sogenannte *catalyzed signal amplification*-Methode (CSA) der Firma Dako basiert auf der ABC- und Peroxidase-Methode. Nach der Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex wird ein spezielles Amplifikationsreagenz zwischengeschaltet. Dieses Reagenz enthält ein biotinhaltiges Substrat (Biotinyl-Tyramid), das durch die gebundene Peroxidase katalytisch in eine reaktive und schließlich unlösliche Form überführt wird. Das abgelagerte Biotin vermittelt die Bindung von peroxidase markiertem Streptavidin, wodurch zusätzliche Enzymmoleküle gebunden werden. Diese Methode ist sensitiver als herkömmliche ABC-Färbemethoden.

Die Färbemethode kann auch mit einer Alkalischen Phosphatase durchgeführt werden. Zur Entwicklung wird das Substrat-Chromogen-System *Liquid Permanent Red* eingesetzt, oder das Alkalische Phosphatase *Red System*, beides von Dako.

2.7.6 Lektin histochemie

Es wurden die biotinilierten Lektine HPA (*Helix pomatia* Agglutinin) und GSA-I (*Griffonia simplicifolia* Agglutinin) in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

Das HPA Lektin erkennt spezifisch die Kohlenhydratstrukturen N-Acetylgalactosamin, N-Acetylglucosamin und GalNac- α 1,3 GalNac. Auch das GSA-I bindet spezifisch an N-Acetylgalactosamin, aber auch an α -D-Galactose. HPA ist beispielsweise mit seiner N-Acetylgalactosaminspezifität ein sehr nützlicher prognostischer Indikator beim Mammakarzinom [Leathem und Brooks 1987, Brooks und Leathem 1999, Schumacher und Adam 1997; Schumacher *et al.*, 2005].

Die Aufnahmen der gesamten histologischen Färbungen erfolgten mit dem Photomikroskop der Firma Carl Zeiss (Axioplan 2, Jena) mittels *AxioVision Rel 4.8* Software und mit dem Zeiss *MIRAX MIDI Slide Scanner* mit integrierter *MIRAX Viewer* Software.

2.8 Statistische Analyse

Die Auswertung aller Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.00. Die statistisch signifikanten Unterschiede der erhobenen Daten wurden durch einen ungepaarten t-Test nachgewiesen und als signifikant betrachtet, wenn der p-Wert < 0,05 war. Dafür wurde vorausgesetzt, dass die Daten normalverteilt waren und gleiche Varianzen hatten. Für die Auswertung von mehr als 2 Datensätzen pro Analyse wurde ein *One-Way-Anova* Test durchgeführt. Für nicht normalverteilte Daten, wie die Anzahl an Lungenmetastasen, wurde eine Poisson Regression per SPSS Statistics 19 durchgeführt. Die statistische Auswertung mit SPSS erfolgte in der hiesigen Medizinischen Biometrie und Epidemiologie durch Frau L. Herich.

3 Ergebnisse

Für die Untersuchung der spontanen Metastasierung von humanen Mammakarzinomzellen im Xenograft-Mausmodell erfolgte zunächst eine *in vitro* Analyse der kultivierten Tumorzellen auf potentielle Oberflächenbindungsstellen für das im Mausendothel befindliche Selektin. Im daran anschließenden Tierexperiment wurde *in vivo* die Bedeutung von E- und P-Selektin als Zelladhäsionsmoleküle bei der spontanen Metastasierung humaner xenotransplanteder Tumoren in immundefizienten Mäusen untersucht. Zusätzlich erfolgte eine molekulare Analyse der metastasierenden Tumorzellen in den klinisch relevanten Modellsystemen. Es wurden molekularbiologische Methoden etabliert, um das Transkriptom der metastasierenden Tumorzellen zu erfassen.

3.1 Oberflächenanalyse der humanen Tumorzellen (*in vitro*)

3.1.1 Expressionsanalyse der kultivierten Tumorzelllinien

Zu Beginn wurde ein PCR basiertes Genexpressionsprofil mittels isolierter cDNA von den Tumorzelllinien DU4475, MCF7 und HT29 erstellt. Die Daten der PCR Arrays der Mammakarzinomzelllinien DU4475 und MCF7 wurden im Vergleich zur Kolonkarzinomzelllinie HT29 untersucht. Aufgrund einer vorhergehenden tierexperimentellen Studie mit der Tumorzelllinie HT29 zeigte sich in *scid select* (E^{-/-}) (P^{-/-}) Tieren ein Metastasierungsrückgang um 84 % gegenüber *scid* (E^{+/+}) (P^{+/+}) Mäusen. Daher war es interessant, Unterschiede oder Ähnlichkeiten der Zelllinien im Bezug zu den Metastasierungs- bzw. Adhäsionseigenschaften zu untersuchen. Hierzu wurde das Expressionsprofil von extrazellulärer Matrix- und zelladhäsionsspezifischen Genen untersucht.

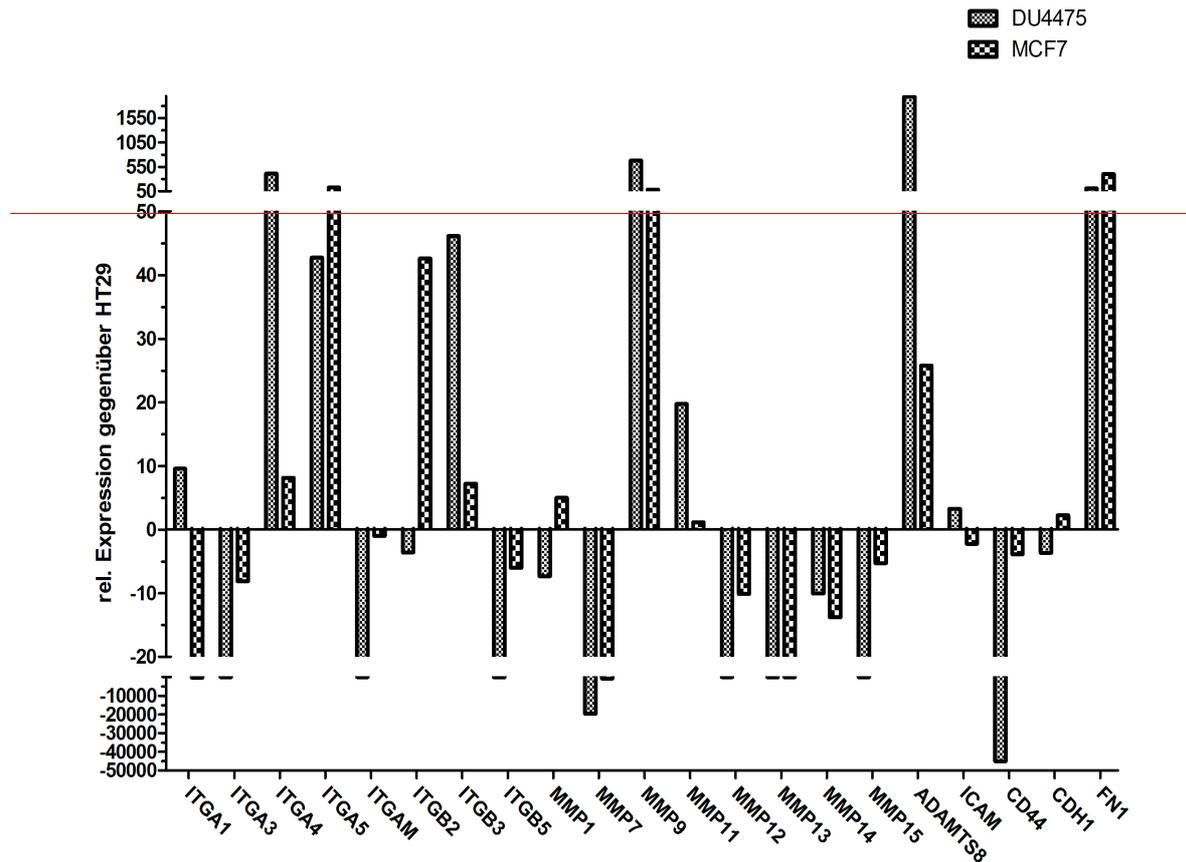


Abbildung 3.1: Relative Expression von DU4475 und MCF7 gegenüber der HT29 Tumorzellen, gemessen mit dem PCR Array für die Genen der Zell- sowie Zellmatrixinteraktion.

Von den 84 untersuchten Genen für Zell- sowie Zellmatrixinteraktion waren nur geringfügige Expressionsunterschiede zwischen den Zelllinien DU4475 und MCF7 vergleichend zur Zelllinie HT29 erkennbar. Die Untersuchung wurde auf den Vergleich zwischen stark regulierten Transkripten eingeschränkt (Abb. 3.1).

Bei DU4475 waren insgesamt nur 5 Kandidatengene stark überexprimiert, d. h. über einem Expressionsniveau von 50 (Abb. 3.1, rote Linie). Dazu gehörten die Gene ADAMTS8, FN1, ITGA4, MMP9 und SGCE. Bei MCF7 waren sogar 8 Gene gegenüber der HT29 Genexpression hochreguliert (COL12A1, COL5A1, COL6A2, FN1, ITGA5, KAL1, MMP16, MMP9). Stark herunterregulierte Genexpression, d. h. über einem Expressionsniveau von -50, waren bei DU4475 7 Gene (CD44, ITGB5, LAMB3, MMP12, MMP13, MMP7, THBS1) detektierbar. Bei MCF7 waren 6 Gene gegenüber der HT29 Genexpression heraufreguliert (COL16A1, ITGA1, ITGA6, LAMB1, MMP13, MMP7).

Dabei fiel besonders bei DU4475 die stark verringerte Expression des Glykoproteins CD44 (***) ($p < 0,001$ mit einer Differenz zu MCF7 von 45007) auf. Bei den untersuchten Integrinen zeigte DU4475 die stärkste Expressionserhöhung bei ITGA4

gegenüber HT29 ($p > 0,05$, Differenz zu MCF7: 402,3). Ein weiterer signifikanter Expressionsunterschied zwischen den ausgewählten Kandidatengen von DU4475 und MCF7 war nicht vorhanden. Bei DU4475 waren die E-, P- und L-Selektine im Gegensatz zu MCF7 und HT29 nicht detektierbar (Kapitel 8.2).

3.1.2 Charakterisierung der Oberflächenmoleküle von Mammakarzinomzellen auf Selektinliganden und Selektinbindungsstellen

Die Transkriptomdaten aus dem PCR-Array (siehe 2.5.13) wurden mit der FACS Methode (siehe 2.3.6), in Bezug auf die tatsächliche Expression der Oberflächenmoleküle, validiert. Es wurde quantitativ das Vorliegen von verschiedenen Oberflächenmarkern auf den humanen Tumorzelllinien DU4475, MCF7 und HT29 untersucht. Als Träger der Selektinliganden wurden die Antikörper gegen die Epitope der Membranproteine CD44, PSGL1, CD24 und CD43 sowie die Kohlenhydratstrukturen der Selektinliganden sialyl Lewis a (Ca19.9) und sialyl Lewis x (CD15s) untersucht und mit entsprechender Isotypkontrolle abgeglichen. In der Abbildung 3.2 sind ein Teil der FACS Ergebnisse in Form von Histogrammen dargestellt.

FACS Analyse der Mammakarzinomzelllinien im Vergleich:

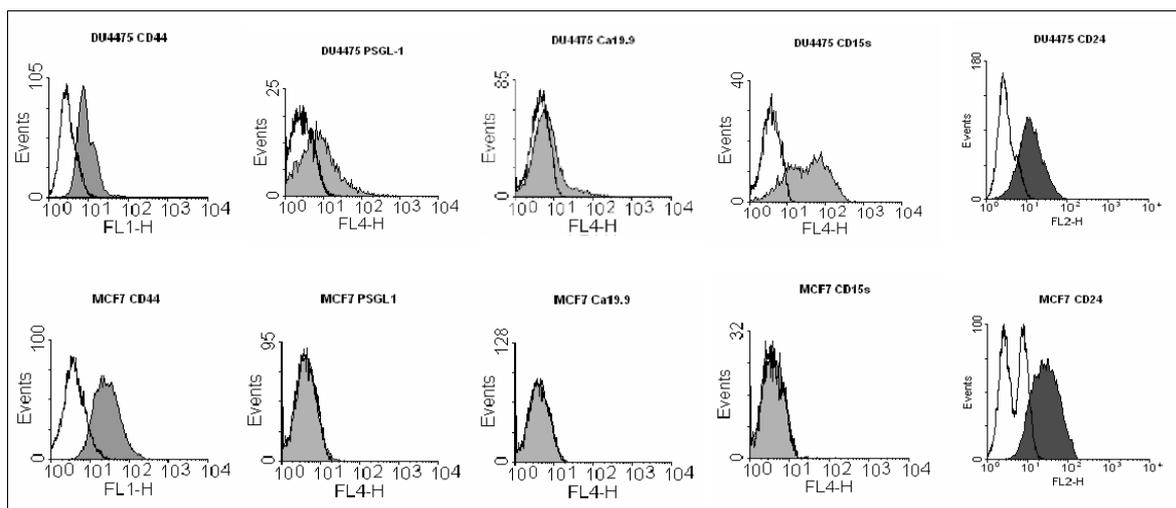


Abbildung 3.2: FACS Analyse der DU4475 und MCF7 Zellen auf Selektinliganden.

Bei den Histogrammen ist die Anzahl der Ereignisse (*events*) gegenüber der Fluoreszenzintensität (logarithmisch) im ausgewählten Fluoreszenzkanal aufgetragen. Als weiße Signalfäche ist die Isotypkontrolle dargestellt, farbig zeigen sich die Bindungsmuster des untersuchten Oberflächenmoleküls.

Die FACS Analyse zeigte bei DU4475 ein Vorliegen der Oligosaccharide CD15s und Ca19.9 im Gegensatz zu MCF7, die keine der beiden Kohlenhydratstrukturen für die Selektinbindungsstellen aufwies. Ca19.9 war nur bei einer Subpopulation von DU4475 auf der Zellmembran vorhanden.

Bei den Tumorzellen DU4475 ergab sich eine positive Antikörperfärbung auf die Glykoproteine CD44, CD24 und PSGL1. Potenzielle Selektinbindungsstellen, vermittelt durch die 3 detektierbaren Glykoproteine, lagen somit vor. Die MCF7 Zellen besaßen nur CD24 und CD44 als Oberflächenmoleküle.

FACS Analyse der im PCR Array auffälligen Oberflächenmarker:

Die Daten zu den stark regulierten Zelladhäsionsmolekülen CD44 und ITGA4, die bei der Expressionsanalyse mittels PCR Array besonders auffällig waren, wurden zusätzlich mit der FACS Analyse untersucht.

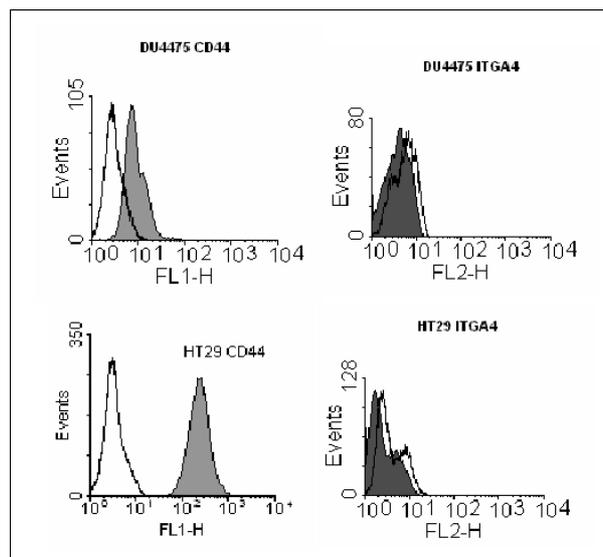


Abbildung 3.3: FACS Analyse der Oberflächenmarker CD44 und Integrin $\alpha 4$ bei DU4475 und HT29.

Bei den Histogrammen ist die Anzahl der Ereignisse gegenüber der Fluoreszenzintensität (logarithmisch) im ausgewählten Fluoreszenzkanal aufgetragen. Die Zelllinien DU4475 und HT29 sind CD44 positiv und ITGA4 negativ.

Die erhöhte mRNA Expression des CD44 Genlokus von HT29 zeigte sich hierbei auch auf Proteinebene durch die Vielzahl an CD44 positiven Oberflächenmolekülen bei HT29 im Gegensatz zur DU4475 Tumorzelllinie. Dagegen war bei beiden Tumorzelllinien kein ITGA4 als Membranprotein vorliegend, entgegen der erhöhten mRNA Expression bei DU4475 (Abb. 3.1).

FACS Analyse der Selektinbindungsstellen:

Zusätzlich zu den Selektinliganden wurde auch untersucht, ob die rekombinanten Selektinchimäre eine Bindung mit den Tumorzellen eingehen. Dazu wurden die Zellen DU4475 und MCF7 mit einem Komplex aus selektinegekoppelter Fc-Chimäre und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper inkubiert und anschließend per FACS untersucht.

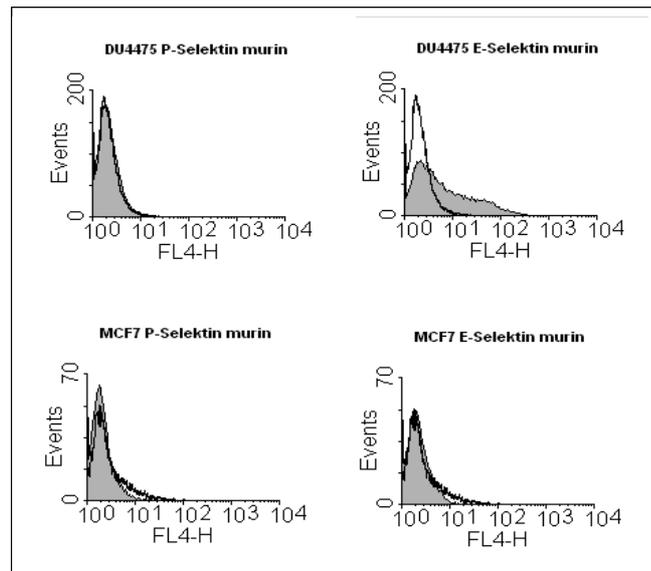


Abbildung 3.4: FACS Analyse der DU4475 und MCF7 Tumorzelllinien auf Selektinbindungsstellen.

Bei den Histogrammen ist Anzahl der Ereignisse gegenüber der Fluoreszenzintensität (logarithmisch) im ausgewählten Fluoreszenzkanal aufgetragen. MCF7 zeigte keinerlei E- bzw. P-Selektinbindung.

Bei den beiden Zelllinien zeigte die Analyse nach den Selektinbindungsstellen nur bei DU4475 eine Bindung mit der murinen E-Selektin Fc-Chimäre (ca. 30 % waren positiv). Oberflächenmoleküle für die Bindung mit murinem P-Selektin lagen bei beiden Zelllinien nicht vor.

Zusätzlich wurde die Oberflächenbeschaffenheit der Zelllinie HT29 hinsichtlich der Selektinliganden mittels der Antikörper gegen die Oligosaccharide CD15s, Ca19.9 und gegen das Glykoprotein PSGL1 untersucht. Exemplarisch ist in der folgenden Abbildung die Mammakarzinomzelllinie DU4475 für den Vergleich mit HT29 dargestellt.

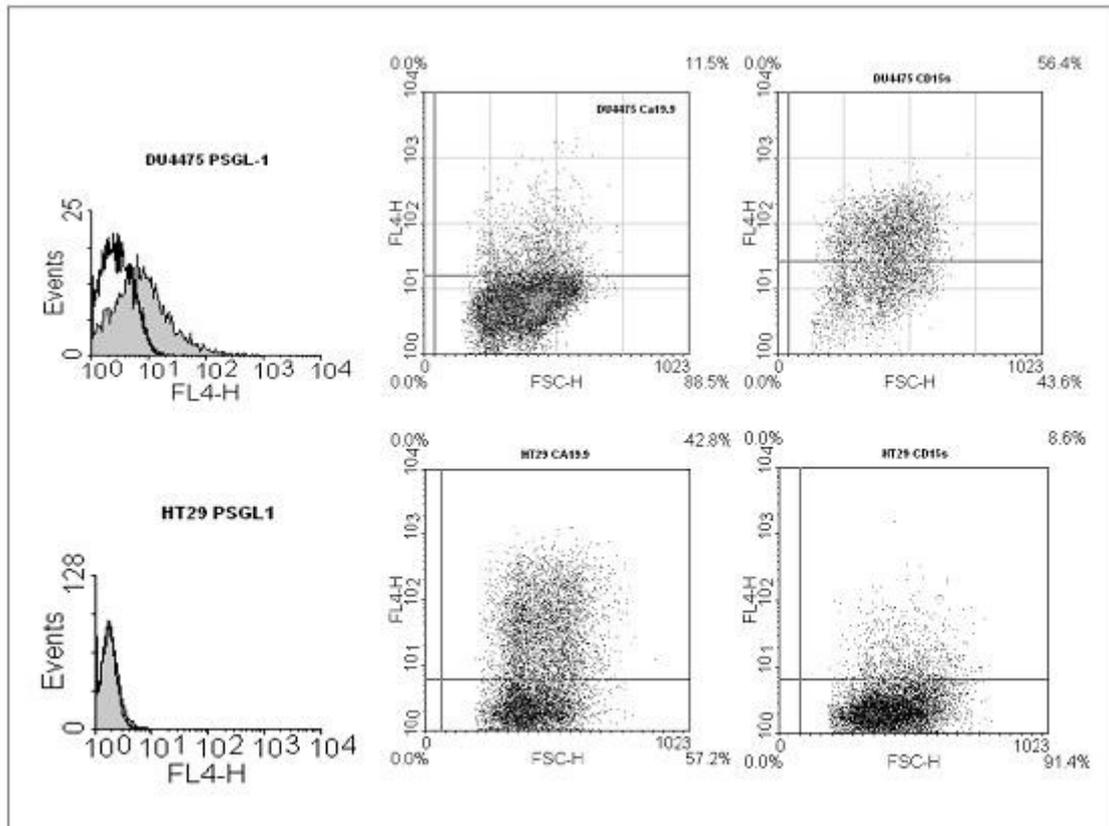


Abbildung 3.5: FACS Analyse der Oberflächenmarker PSGL1 sowie der Oligosaccharide Ca19.9 und CD15s bei DU4475 und HT29

Dargestellt ist für das Glykoprotein PSGL1 ein Histogramm, bei dem die Anzahl der Ereignisse gegenüber der Fluoreszenzintensität (logarithmisch) im ausgewählten Fluoreszenzkanal aufgetragen ist. Die quantitative Analyse der Oligosaccharide Ca19.9 und CD15s ist durch einen Dotplot gezeigt. Die Fluoreszenzintensität des untersuchten Antikörpers ist gegenüber der Zellgröße aufgetragen.

Die Oligosaccharide sialyl Lewis x und sialyl Lewis a lagen in verschiedenen Verhältnissen auf den Zelllinien DU4475 und HT29 vor. DU4475 hatte 3,7 % weniger Ca19.9 Oligosaccharide auf der Zelloberfläche als HT29 (Verhältnis: 11,5 zu 42,8 %). Das prozentuale Verhältnis von CD15s positiven Zellen war bei DU4475 gegenüber HT29 6,5:1. Nur bei DU4475 befand sich das Glykoprotein PSGL1 auf der Zelloberfläche.

Zusammenfassung der FACS Daten:

Für die Xenotransplantation im Mausmodell System erwies sich DU4475 als geeignete humane Tumorzelllinie. Die FACS Analyse zeigte potentielle Bindungsstellen der Zelllinie mit dem Selektin, zum einen durch das Vorhandensein von den Selektinliganden CD15s, Ca19.9, den Glykoproteinen CD24, CD44, CD43, PSGL1 und zum anderen durch die vorliegenden Selektinbindungsstellen für murines E-Selektin.

3.1.3 Analyse von Tumormarkern auf der DU4475 Tumorzelllinie

Die DU4475 Tumorzelllinie wurde auf Grund der selektinbindenden Eigenschaften ausgewählt, um das Metastasierungsgeschehen im Xenograft-Mausmodell mit und ohne Selektindefizienz zu untersuchen. Für ein genaueres Verständnis über die Oberflächenstruktur der Zelllinie wurden weitere Marker mittels der FACS Methode ermittelt. Die gesamten FACS-Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Oberflächenmarker	Fluoreszenzstärke*	Selektinliganden [#]	Fluoreszenzstärke*
allgemeine Marker		CD15s (sialyl Lewis x)	++
CD9 (MRP-1)	+++	Ca19.9 (sialyl Lewis a)	+
CD90	+	CD162 (PSGL1)	+
CEACAM1 (CD66a)	++	CD44 (H-CAM)	++
CEACAM5 (CD66e)	+	CD43	++
CEACAM6 (CD66c)	-	CD24	+
L1CAM	++	Selektinbindungsstellen	Fluoreszenzstärke*
ICAM	++	murines E-Selektin	++
ALCAM	++	murines P-Selektin	-
VCAM	-		
Mucin4	-		
CD15 (Lewis x)	-		
CD49d (Integrin α 4)	-		
epitheliale Marker			
Mucin1 (CD227, CA15-3)	++		
EpCAM (CD326)	++		
Subgruppen			
CD24	+		
Her2neu (c-erb-2)	-		

Tabelle 3.1: Überblick zu den Oberflächenmarkern von DU4475 Tumorzellen für die FACS Analyse.

* nicht markiert (-); schwach markiert (+); mittel markiert (++); stark markiert (+++); # zu den Liganden gehören die Oligosaccharide bzw. die entsprechenden Kohlenhydratstrukturen der Glykoproteine mit Selektinbindungsstellen

Diese *in vitro* Daten der FACS Analyse und der PCR Arrays dienen als Ausgangspunkt bzw. Anhaltspunkt für anschließende Untersuchungen im Gewebe wie der Mauslunge, um die Spontanmetastasen im Tiermodell darzustellen und Veränderungen während der Metastasierungskaskade aufzuzeigen.

3.2 Etablierung der E- und P-Selektin einzel- sowie doppeldefizienten Mauslinien

Die Genotypisierung der Mausmodelle pfp/rag2, E-selektin- bzw. P-selektineinzeldefizienten pfp/rag2 (pfp/rag2 sele, selp) und E- und P-selektindoppeldefizienten pfp/rag2 (pfp/rag2 select) erfolgte mittels PCR Analyse.

Die E- bzw. P-selektindefizienten Mäuse und die E- und P-doppeltselektindefizienten Mäuse wurden mit den immundefizienten $\text{pfp}^{(-/-)}/\text{rag2}^{(-/-)}$ Tieren (Kapitel 2.4.4) verpaart. Die F1 Nachkommen wurden miteinander gekreuzt und die F2 Generation wurde mittels PCR-Genotypisierung auf die Mutationen in den vier Genloci (E-Selektin, P-Selektin, pfp und rag2) hin untersucht.

Die Ergebnisse der Genotypisierung resultieren aus den Untersuchungen der PCR Produkte, die mittels Agarosegel detektiert wurden. Bei jeder PCR wurden eine Positivkontrolle mit heterozygoten Allelen und eine Negativkontrolle einbezogen, um zu testen, wie effektiv die PCR abgelaufen ist. Die Genotypenbestimmung anhand von selektinspezifischen Amplifikaten ist als Beispiel in Abbildung 3.6 dargestellt.

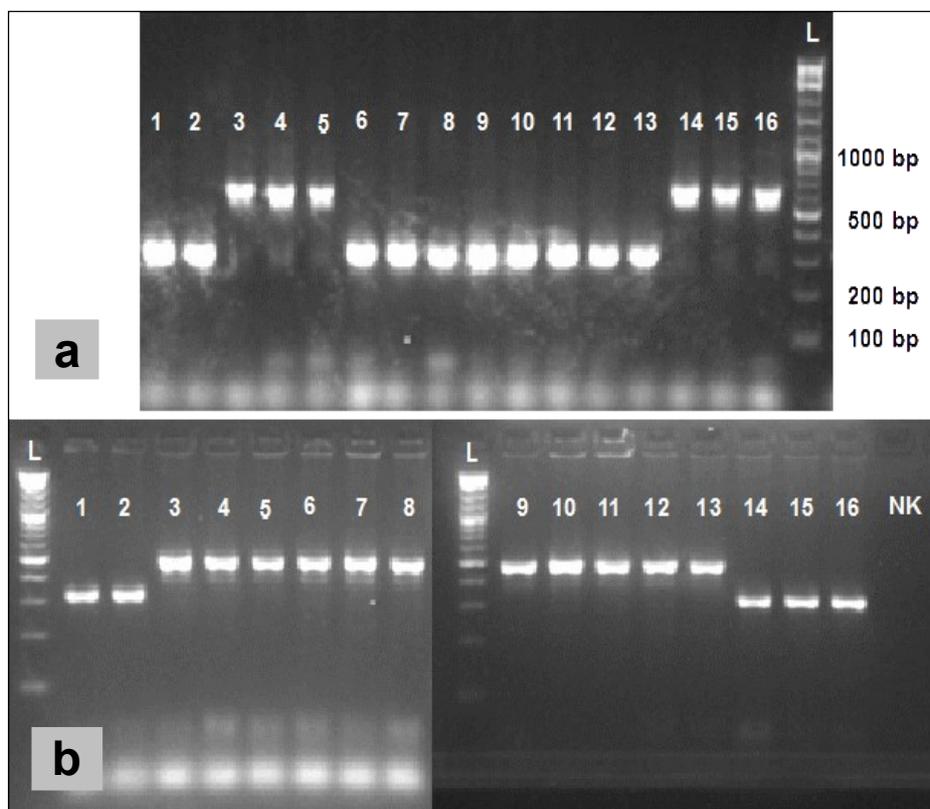


Abbildung 3.6: Genotypisierung der verschiedenen Selektindefizienzen mittels a) E-Selektin PCR und b) P-Selektin PCR.

Die Proben 1 und 2 zeigten Allele von homozygoten E-selektindefizienten Tieren (E^{-/-}: 315 bp, P^{+/+}: 322 bp); Proben 3-5 waren PCR Produkte von homozygoten P-selektindefizienten Tieren (E^{+/+}: 664 bp, P^{-/-}: 479 bp). E und P-doppeltselektindefiziente Tiere waren Nr. 6-13 und Nr. 14-16 waren Wildtypiere. Die Negativkontrolle beinhaltet keine unspezifischen PCR Produkte. Das „L“ steht für Längenstandard und „NK“ für Negativkontrolle.

3.3 Mammakarzinom Xenograft-Mausmodelle (*in vivo*)

Für die Analyse des Metastasierungsgeschehens des Mammakarzinoms DU4475 wurden zwei immundefiziente Mauslinien verwendet: die scid Maus und die pfp/rag2 Knock-out Maus.

3.3.1 Tierexperimente

Im Rahmen der Untersuchung des Tumorwachstums und der Spontanmetastasierung wurden scid und scid select Mäuse sowie die verschiedenen selektindefizienten pfp/rag2 Tiere und deren Wildtyp mit der Tumorzelllinie DU4475 beimpft und das Tumorwachstum beobachtet. Zur Optimierung des Versuchsaufbaus wurde die Zelllinie DU4475 in Matrigel in die verschiedenen pfp/rag2 Mäuse injiziert (1. Ansatz). In einem zweiten Ansatz mit erhöhter Tierzahl ($n > 10$) wurden die pfp/rag2 Tiere den E- und P-selektindefizienten pfp/rag2 Tieren gegenüber gestellt.

Nach erfolgtem Tumorwachstum zeigten sich phänotypisch keine Unterschiede bei selektindefizienten Mäusen gegenüber den Kontrolltieren.

3.3.2 MRT Untersuchungen der Tiergruppen mit Primärtumor

Die Aufnahmen sollten mögliche Unterschiede bei der Metastasierung zwischen den verschiedenen Mauslinien mit und ohne Selektindefizienz aufzeigen. Dazu wurden vereinzelt Tiere aus den sechs verschiedenen Gruppen herausgesucht, bei denen sich bereits ein deutlich sichtbarer Primärtumor entwickelt hatte. Insgesamt wurden 18 Tiere mit der MRT Methode untersucht. Von den scid Tieren wurden drei selektindefiziente und drei selektinkompetente Mäuse ausgewählt. Bei der pfp/rag2 Population wurden drei Wildtypiere, vier pfp/rag2 Mäuse mit E-Selektindefizienz, zwei Tiere mit P-Selektindefizienz und drei E- und P-doppeltselektindefiziente Mäuse untersucht.

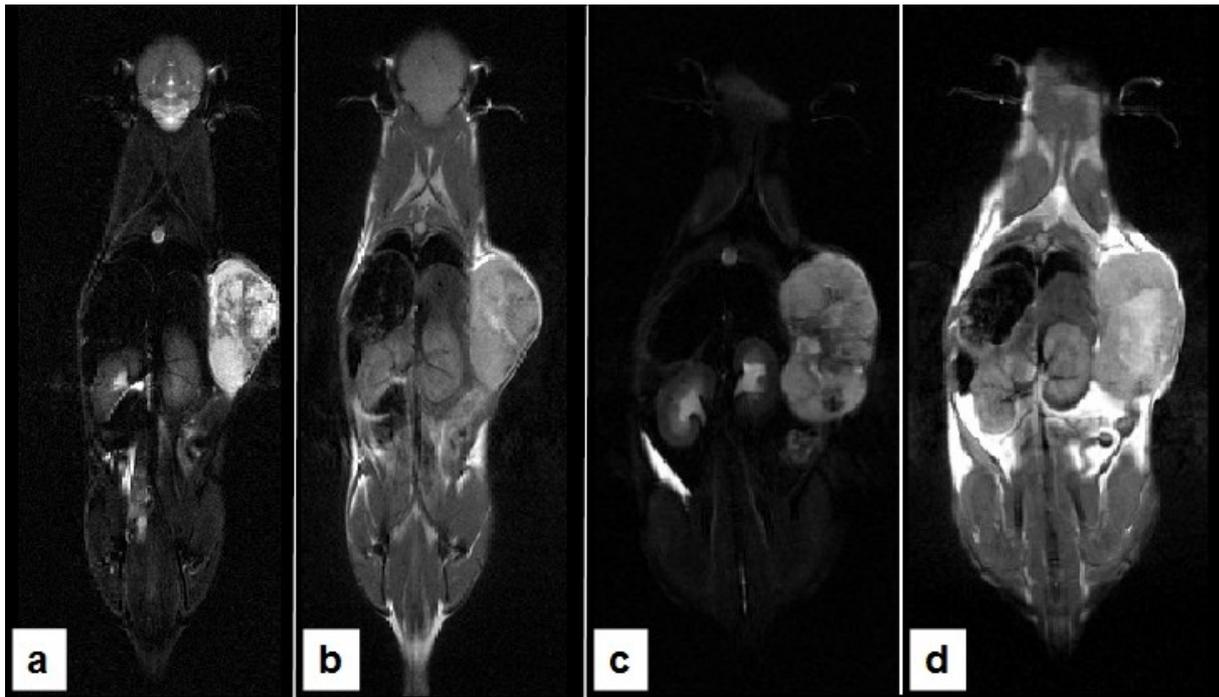


Abbildung 3.7: MRT Aufnahmen von pfp/rag2 (a und b) und pfp/rag2 select Mäusen (c und d).

Der lokal gewachsene Primärtumor ist jeweils an der rechten Flanke der Tiere deutlich sichtbar. In Abbildung a) und c) sind Messbilder einer T2 gewichteten Sequenz dargestellt. Die Abbildungen in c) und d) wurden T1 gewichtet aufgenommen.

Die Primärtumore zeigten sich mit vielen Einblutungen und Nekrosen als morphologisches Korrelat für Signalhypointensitäten in den T2 gewichteten Bildern/Signalanhebungen in den T1 gewichteten Bilddaten. Makrometastasen von einer Größe oberhalb der Auflösungsgrenze von 1 mm konnten nicht detektiert werden. Die histologischen Untersuchungen der Spontanmetastasen im Lungengewebe bestätigten den Befund (Kapitel 3.7). Es fanden sich jedoch folgende auffällige Befunde:

Eins der pfp/rag2 Tiere mit E-Selektindefizienz wies einen starken Aszites auf. Dem Tier wurden nach Beendigung der MRT Messung 7 ml Flüssigkeit aus der Peritonealhöhle entnommen und auf Grund von Nierenversagen eine gelblich verfärbte linke Niere festgestellt (Abb. 3.10 d).

Bei einem pfp/rag2 select Tier (Abb. 3.8) zeigte sich eine Liquorabflussstörung. Die Seitenventrikel kommen global vergrößert zur Darstellung. In Zusammenschau mit dem histologischem Präparat, siehe Abbildung 3.10 a, ist dies ein Ausdruck eines Hydrozephalus occlusivus.

Rechts axillär war eine deutlich hyperintense punktförmige Struktur zu sehen. Dies entspricht am ehesten einem vergrößerten Lymphknoten.

In der linken Lunge stellte sich eine signalhyperintense peribronchiolär gelegene Raumforderung dar. Diese ist am ehesten vereinbar mit einer ödematösen Reaktion auf eine größere Mikrometastase (Abb. 3.10 i).

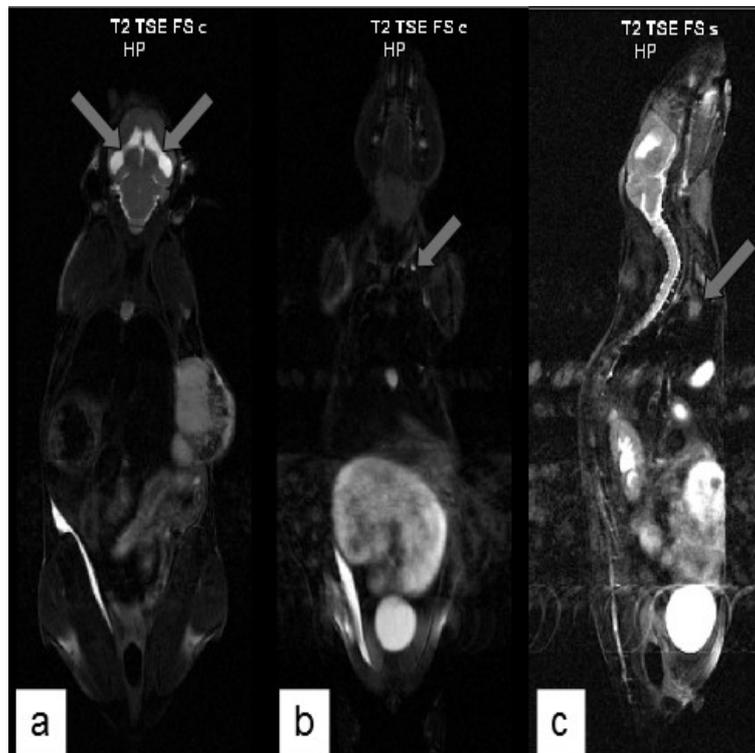


Abbildung 3.8: MRT Aufnahmen einer pfp/rag2 select Maus mit einem 1,83 g Primärtumor.

Die Abbildungen zeigen eine T2 gewichtete Messung mit coronaler (a und b) und sagittaler Aufnahme (c). In der sagittalen Aufnahme zeigten sich in anterior-posterioren Phasenkodierichtung bandförmige Atemartefakte.

Ein zweites pfp/rag2 select Tier, in Abbildung 3.9 dargestellt, wies einen beidseitigen Nierenstau und einen vergrößerten Magen auf. In der linken Niere stellten sich Rinde und Mark durch gestautes Nierenbeckenkelchsystem verschmälert dar und die Nebenniere war ödematös vergrößert. Auch in anderen Tieren zeigten sich Stauungen in der Niere mit Verdrängung der Rinde und des Nierenmarkes in geringerer Ausprägung.

Bei allen Mäusen zeigte sich ein global dilatierter Magen-Darmtrakt mit besonders aufgeweitetem illeozökalem Übergang. Dies ist am ehesten Folge einer bakteriellen Besiedelung, die im histologischen Schnitt sichtbar wurde (Abb. 3.10 g, h).

Das rechte Ovar stellte sich ödematös vergrößert und mit deutlich angrenzender Fettgewebsimbibierung dar. Zusätzlich zeigte sich ein Hirntumor (Abb. 3.10 b, c).

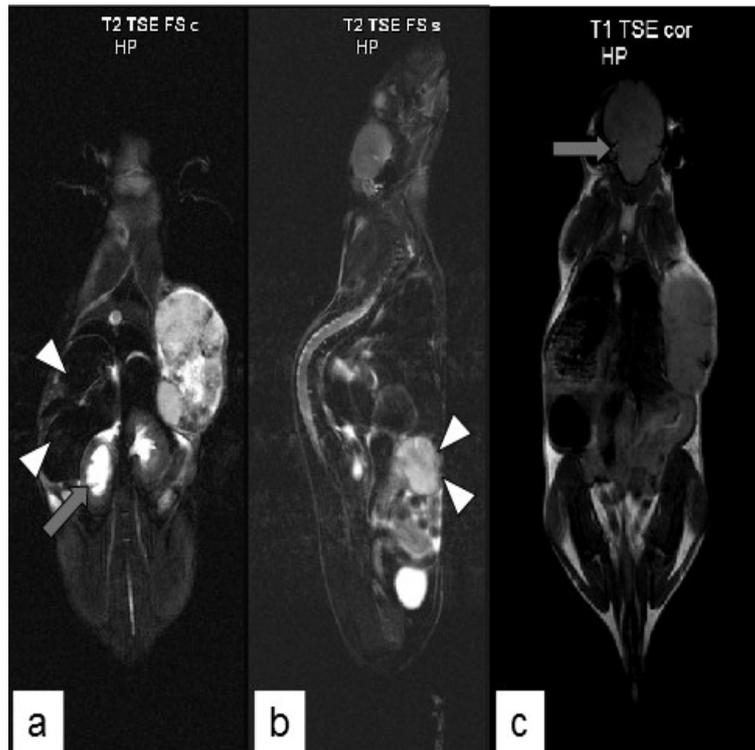


Abbildung 3.9: MRT Aufnahmen einer pfp/rag2 select Maus mit einem 2,13 g Primärtumor.

Die Abbildungen mit coronaler a) und mit sagitaler Aufnahme b) zeigen eine T2 gewichtete Messung. Die Abbildung c) zeigt eine T1 gewichtete Messung, die in coronaler Ebene aufgenommen wurde.

3.3.3 Histologische Charakterisierung der verschiedenen Mauslinien

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse des Tierversuchs mit Tumorentstehung und Metastasierung der Tumorzelllinie DU4475 beschrieben. Die Ergebnisse der Mauslinien scid und scid select werden getrennt von denen der pfp/rag2 sowie deren Selektindefizienzen dargestellt.

3.3.3.1 Histologische Analyse des Organbefalls nach MRT Untersuchung

Es zeigte sich nach histologischer Untersuchung (H. E. Färbung, siehe Abb. 3.10) keine Ausbreitung von Spontanmetastasen in Organen wie der Leber, Niere, Nebenniere sowie dem Gehirn. Die sichtbare Hirnmetastase des pfp/rag2 select Tieres war murinen Ursprungs und zeigte keine morphologische Übereinstimmung mit der Tumorzelllinie DU4475. Die vergrößerten Lymphknoten an Schulter und Ovar wiesen keinen Metastasenbefall auf.

3.3.3.2 Tumorbildung bei scid und pfp/rag2 Mauslinien

scid und scid select Modelle:

Nach der Injektion der DU4475 Tumorzellen kam es sowohl bei den scid wie auch bei den scid select Mäusen zu lokalem Tumorwachstum an der Injektionsstelle. Das Anwachsen des Primärtumors betrug bei scid 100 % (n = 9) und bei scid select 91 % (n = 11).

pfp/rag2, pfp/rag2 sele, selp und select Modelle:

In den einzelnen Tiergruppen erfolgte kein einheitliches Anwachsen der Primärtumore bei Injektion ohne Matrigel. Durch einen zusätzlichen Versuch wurde die Wirkung vom Matrigel auf das Anwachsen der Zelllinie DU4475 mit einer Anzahl von sechs pfp/rag2 Tieren ausgetestet. Hierbei erfolgte bei allen Tieren ein Anwachsen der Primärtumore. Daraufhin wurde die Zelllinie erneut in zwei Versuchsansätzen in die pfp/rag2 Wildtypmäuse und in die einzel- und doppelselektindefizienten Mäuse injiziert und das Wachstum des Tumors beobachtet. Bei allen vier Tiergruppen betrug die Anwachsrate des Primärtumors nach Matrigelzugabe 100 %.

Die beiden Versuchsansätze beinhalteten 21 pfp/rag2 Wildtypmäuse, 10 E-selektindefiziente und 9 P-selektindefiziente Tiere (pfp/rag2 sele, oder selp) sowie 24 E- und P-selektindefiziente Mäuse (pfp/rag2 select).

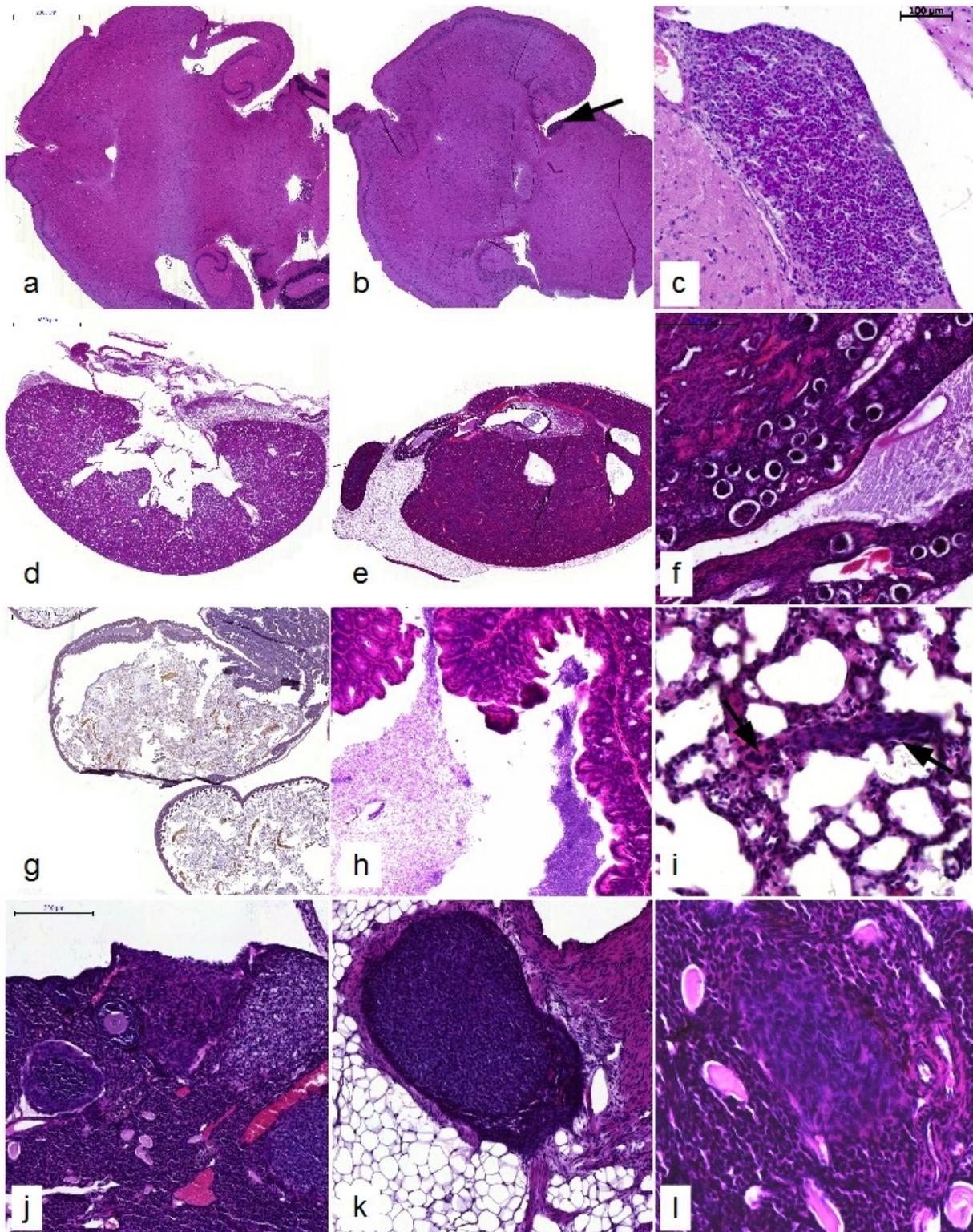


Abbildung 3.10: Organbefunde der im MRT auffälligen Tiere.

Die betroffenen Organe wurden histologisch aufgearbeitet (H. E. Färbung) und die Befunde konnten so histologisch gesichert werden. Dargestellt sind Ausschnitte von Gehirn (a-c), Niere (d-f), Darm (g-h), Lunge (i) und Ovar (j-l). Die Aufnahmen wurden in 10facher Vergrößerung (a, b, d, e, g), in 100facher Vergrößerung (h, f, j), in 200facher Vergrößerung (c, k) und in 400facher Vergrößerung (i, l) dargestellt.

3.3.3.3 Gewicht der Primärtumore

Das Tumorgewicht schwankte bei allen Versuchstieren zwischen 0,2 g bis 4,3 g (n = 90 Mittelwert: 2,1 g, Median: 2,0 g, Standardabweichung (SD): 0,7 g). Zusätzlich wurde auch das Volumen der einzelnen Tumore bestimmt. Dabei ergaben sich keinerlei Unterschiede zum ermittelten Gewicht, wie in der folgenden Abbildung zu sehen ist. Folglich wurden die weiteren Analysen mit dem Tumorgewicht durchgeführt.

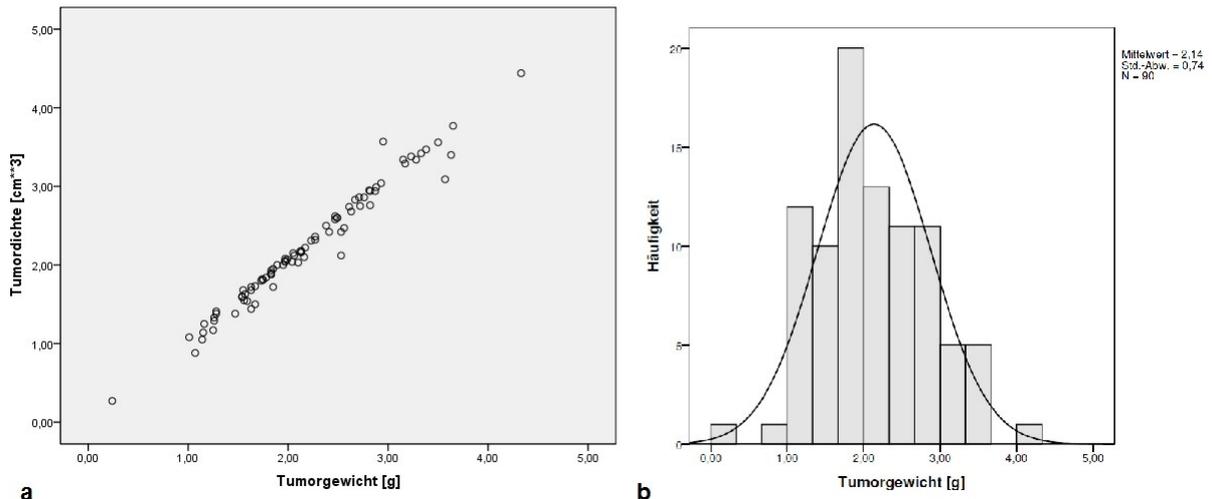


Abbildung 3.11: Streudiagramm zum Vergleich aller ermittelten Tumolvolumina der selektinkompetenten und -defizienten scid und pfp/rag2 Mäuse gegenüber dem Tumorgewicht a) sowie die Häufigkeitsverteilung der Tumorgewichte aller Tiere mittels Histogramm b) mit n = 90.

scid und scid select Modelle:

Bei den scid Mäusen lagen die Tumorgewichte zwischen 0,9 und 2,5 g (n = 9, Mittelwert: 1,7 g, Median 1,7 g, SD 0,6 g). Bei scid select war das Tumorgewicht zwischen 1,1 g und 3,6 g schwer (n = 10, Mittelwert: 2,4 g, Median: 2,6 g, SD: 0,9 g).

Das Tumorgewicht der scid select Tiere war signifikant erhöht, mit einem p-Wert von 0,027 (Varianzanalyse), im Vergleich zur scid Gruppe.

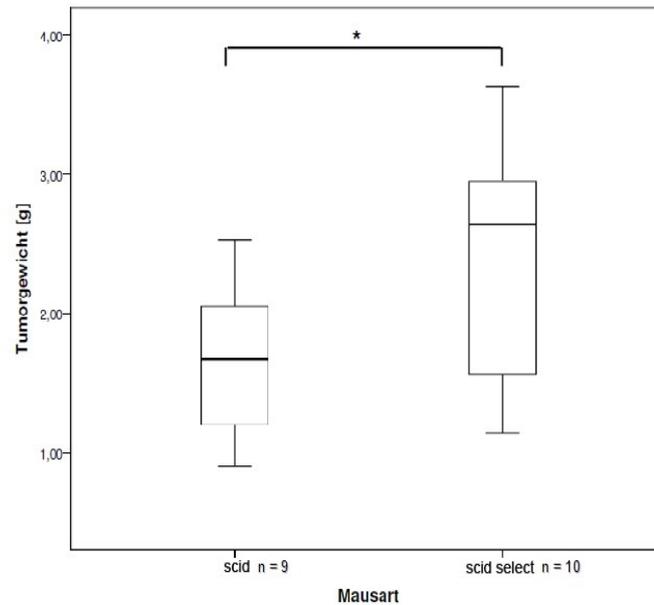


Abbildung 3.12: Tumorgewicht von scid und scid select.

Die Daten sind als Boxplot Diagramm mit Median (n = Stichprobenanzahl; * signifikant, d. h. $p < 0,05$) dargestellt.

pfp/rag2, pfp/rag2 sele, selp und select Modelle:

Mit Verlust des E- und /oder P-Selektins in den pfp/rag2 Tieren war das Gewicht der Primärtumore gegenüber den pfp/rag2 Kontrolltieren nicht signifikant verändert.

Bei den pfp/rag2 Mäusen (1. Ansatz) lagen die Werte zwischen 1,0 g und 2,5 g (n = 6, Mittelwert: 1,5 g, Median: 1,4 g, SD: 0,5 g). Bei den pfp/rag2 sele Tieren lagen die Werte zwischen 0,2 g und 2,9 g (n = 10, Mittelwert: 1,9 g, Median: 1,9 g, SD: 0,7 g). Das Tumorgewicht der pfp/rag2 selp Tiere lag zwischen 1,3 g und 3,5 g (n = 9, Mittelwert: 2,2 g, Median: 2,1 g, SD: 0,7 g). Bei den pfp/rag2 select Mäusen (1. Ansatz) lagen die Werte zwischen 1,5 g und 2,8 g (n = 11, Mittelwert: 2,1 g, Median: 2,0 g, SD: 0,4 g). Bei den E- und /oder P-selektindefizienten pfp/rag2 Tieren stieg das Gewicht der Primärtumore vom Median ausgehend um das 1,4fache an, war aber gegenüber den pfp/rag2 Kontrolltieren nicht signifikant verändert.

Das Tumorgewicht schwankte im zweiten Ansatz bei den pfp/rag2 Wildtyptieren zwischen 1,2 g und 3,7 g (n = 16, Mittelwert: 2,5 g, Median: 2,6 g, SD: 0,7 g). Bei pfp/rag2 select ergaben sich Werte zwischen 1,3 g und 4,3 g (n = 13, Mittelwert: 2,5 g, Median: 2,5 g, SD: 0,9 g). Auch im zweiten Ansatz ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Tumorgewichten der selektinkompetenten und -defizienten Mauslinie pfp/rag2.

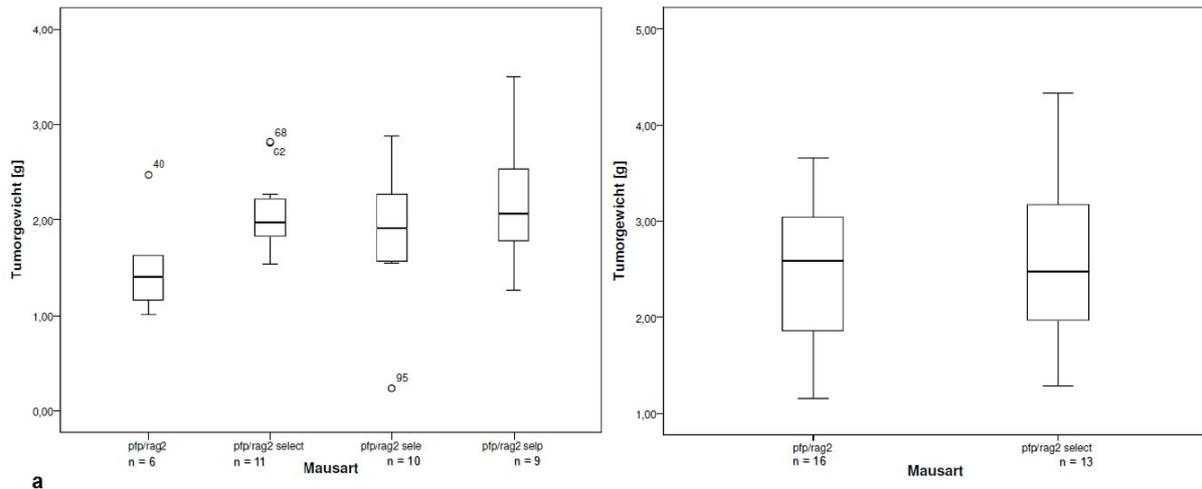


Abbildung 3.13: Tumorgewicht der verschiedenen pfp/rag2 Tiere aufgeteilt in den ersten Ansatz a) und in den zweiten Ansatz b).

Die Daten sind als Boxplot Diagramm mit Median (n = Stichprobenanzahl) dargestellt. Die Abbildungen beinhalten Ausreißerwerte ° (1,5fache der Boxlänge) und die Nummern sind auf die Fallnummern der Tiere bezogen.

Das Tumorgewicht der pfp/rag2 Wildtypiere unterlag bei Betrachtung der einzelnen Versuchsansätze starken Schwankungen ($p = 0,003$), wie die folgende Abbildung verdeutlicht. Das Tumorwachstum hatte keinen Einfluss auf diese Schwankungen.

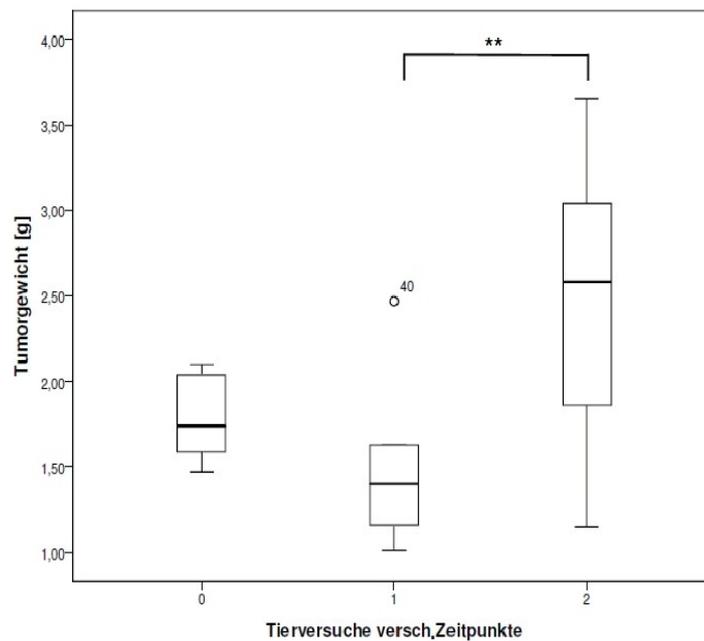


Abbildung 3.14: Tumorgewicht der pfp/rag2 Wildtypiere aufgeteilt nach den 3 Versuchsansätzen.

Die Daten sind als Boxplot Diagramm mit Median (** signifikant, d. h. $p = 0,003$) dargestellt und beinhalten Ausreißerwerte ° (1,5fache der Boxlänge). Die Nummern sind auf die Fallnummern der Tiere bezogen.

Das Tumorgewicht unterschied sich bei Betrachtung aller Tiere nur hinsichtlich der scid und scid select Tiere, durch signifikante Erhöhung des Gewichtes bei den doppelselektindefizienten Tieren. Bei der Gruppierung der Tumorgewichte in kleiner und größer 2 g (siehe Tabelle 3.2) lag eine erhöhte Anzahl an kleinen Tumoren bei den Wildtyptieren vor. Dagegen war die Verteilung bei den selektindefizienten scid und pfp/rag2 Mäusen so verschoben, dass eine höhere Anzahl an Tumoren über 2 g auftrat. Die Häufigkeitsverteilung der Tumorgewichte bei den E-selektineinzeldefizienten pfp/rag2 Tieren entsprach der Verteilung der Wildtyptiere und die der P-selektineinzeldefizienten pfp/rag2 Tieren ähnelte der Verteilung der selektindoppeltdefizienten Tiere.

Mausart	Tumorgewicht unter und über 2 g		Gesamt
	unter 2 g	über 2 g	
scid	6	3	9
scid select	3	7	10
pfp/rag2	15	13	28
pfp/rag2 select	10	14	24
pfp/rag2 sele	6	4	10
pfp/rag2 selp	4	5	9
Gesamt	44	46	90

Tabelle 3.2: Kreuztabelle mit den Tumorgewichten unter und über 2 g in Abhängigkeit von der Mausart. Es lag kein signifikanter Unterschied bei der Häufigkeitsverteilung von den Tumoren vor.

3.3.3.4 Wachstumsdauer der Primärtumore

Die Wachstumsdauer wurde ab Beginn der Injektion der Tumorzelllinie ins Tier bis zum Tag des Tötens der einzelnen Mäuse bestimmt. Zusätzlich wurden die Zeitpunkte, bei dem ein sichtbares Tumorstadium vorlag, ausgewertet. Die Wachstumsdauer variierte von 21 d bis 127 d (n = 84, Mittelwert: 43,5 d, Median: 39,5 d, SD: 20,1 d) für alle Tiere.

scid und scid select Modelle:

Die Dauer des Wachstums bei den Tumoren von scid und scid select war gleich. Sowohl bei den scid Mäusen als auch bei den scid select Mäusen lagen die Werte zwischen 21 d bis 40 d (scid mit n = 9, Mittelwert: 29 d, Median: 26 d, SD: 6,6 d und scid select mit n = 10, Mittelwert: 30,5 d, Median: 29,5 d, SD: 5,8 d). Bei den selektindefizienten Tieren war die Wachstumsdauer der Tumore sichtbar erhöht, aber gegenüber der scid Gruppe nicht signifikant verändert (siehe Median in Abb. 3.15 a).

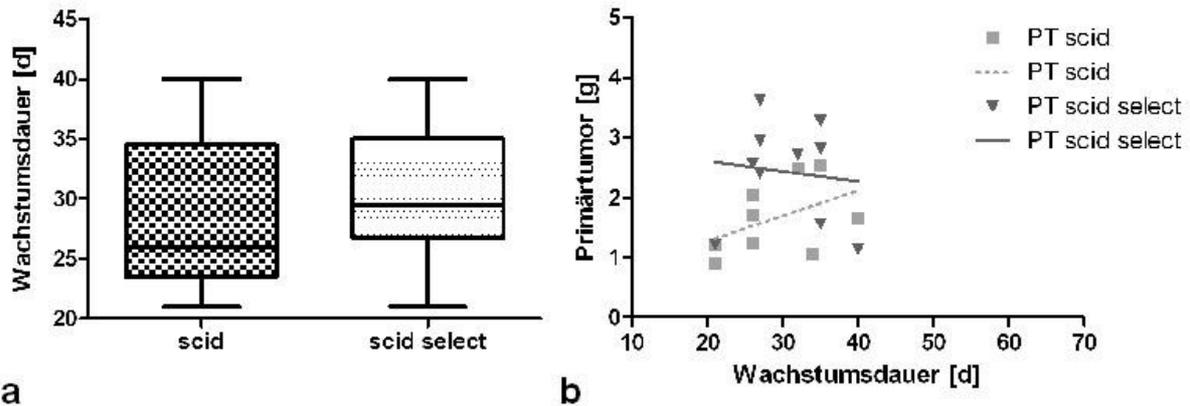


Abbildung 3.15: Wachstumsdauer des Primärtumors bei scid und scid select Tieren

Die Wachstumsdaten sind a) als Boxplot Diagramm und b) als Korrelationsanalyse der Primärtumorgewichte in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer des Tumors (PT steht für Primärtumor) dargestellt.

pfp/rag2, pfp/rag2 sele, selp und select Modelle:

Die beiden Tierversuchsansätze unterschieden sich hinsichtlich der Wachstumsdauer des Tumors nicht voneinander. In beiden Fällen war kein Wachstumsunterschied zwischen Selektindefizienz und Wildtyp zu erkennen (Abb. 3.16 a, c). Die pfp/rag2 Tiere des 1. Ansatzes mit E-Selektinverlust zeigten ein deutlich verlangsamtes Tumorstadium, im Vergleich zu den doppelstselektindefizienten pfp/rag2 Tieren. Dies wird noch deutlicher bei der Überlebenskurve der Tiere (Abb. 3.17 b).

Bei den pfp/rag2 Mäusen (1. Ansatz) lagen die Werte zwischen 40 d bis 91 d (n = 6, Mittelwert: 58,3 d, Median: 57 d, SD: 18,7 d). Bei pfp/rag2 sele lagen die Werte zwischen 28 d bis 127 d (n = 10, Mittelwert: 65 d, Median 59,5 d, SD: 31,3 d). Bei pfp/rag2 selp lagen die Werte zwischen 27 d bis 114 d (n = 9, Mittelwert: 48,7 d, Median: 40 d, SD: 30,2 d). Bei pfp/rag2 select lagen die Werte zwischen 26 d bis 82 d (n = 11, Mittelwert: 39,5 d, Median: 40 d, SD: 15,5 d).

Im zweiten Ansatz mit den pfp/rag2 Wildtypieren schwankte die Wachstumsdauer zwischen 35 d und 47 d (n = 16, Mittelwert: 41,6 d, Median: 41 d, SD: 4,2 d). Bei pfp/rag2 select ergaben sich Werte zwischen 34 d und 69 d (n = 13, Mittelwert: 42,7 d, Median: 39 d, SD: 9,3 d).

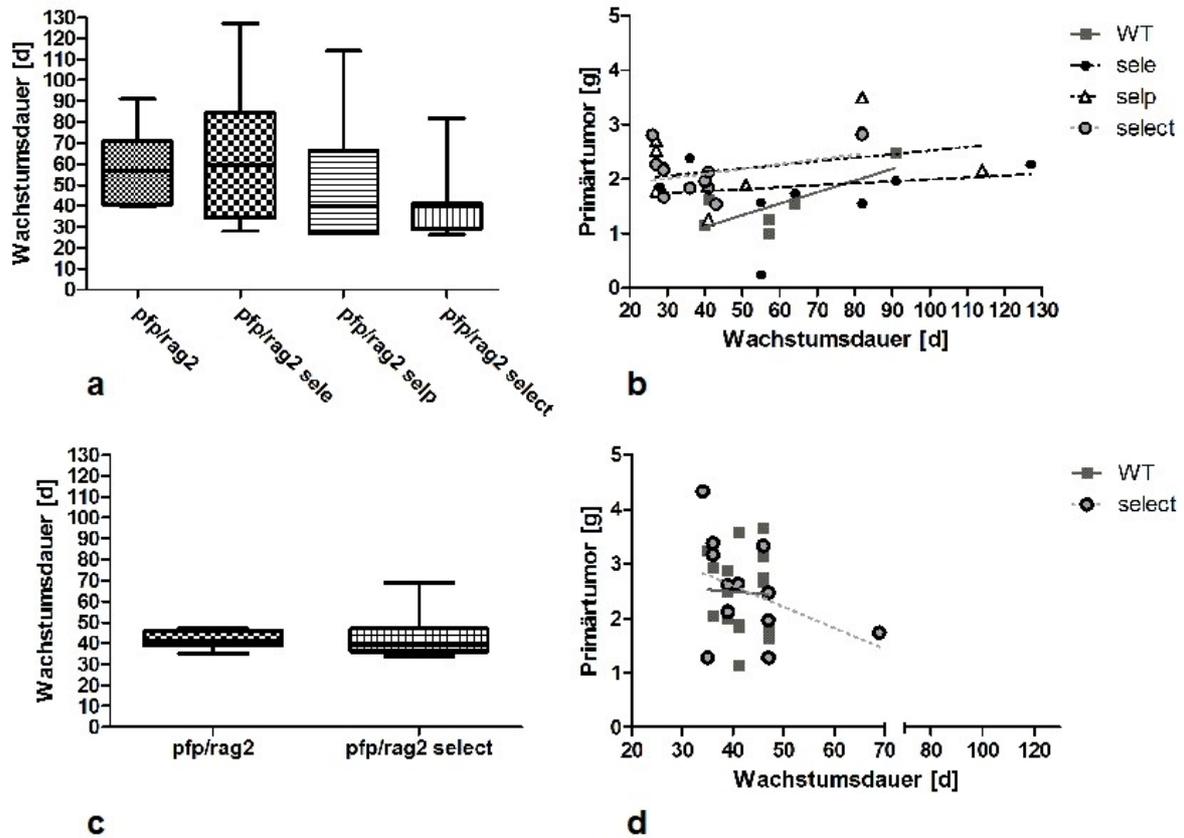


Abbildung 3.16: Wachstumsdauer des Primärtumors bei pfp/rag2 Wildtyp (WT) und Selektindefizienz mit der Einteilung in erster Ansatz (a, b) und zweiter Ansatz (c, d).

Dargestellt sind die Wachstumsdaten als Boxplot Diagramm mit Median (a, c) sowie die Korrelationsanalyse der Primärtumorgewichte in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer des Tumors (b, d).

Zusammenfassend zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Wachstum des Tumors zwischen den Wildtyp-Tieren und den selektindefizienten Tieren sowohl bei den scid als auch bei den pfp/rag2 Linien. Die erreichte Tumorgroße war bei allen Mausarten unabhängig von der Wachstumsdauer des Primärtumors. Die Korrelationsanalyse der Daten in Abbildungen 3.15 und 3.16 ergaben für keine der Tiergruppen eine signifikante Gewichtsveränderung der Primärtumore beim Anstieg der Dauer des Tumorwachstums.

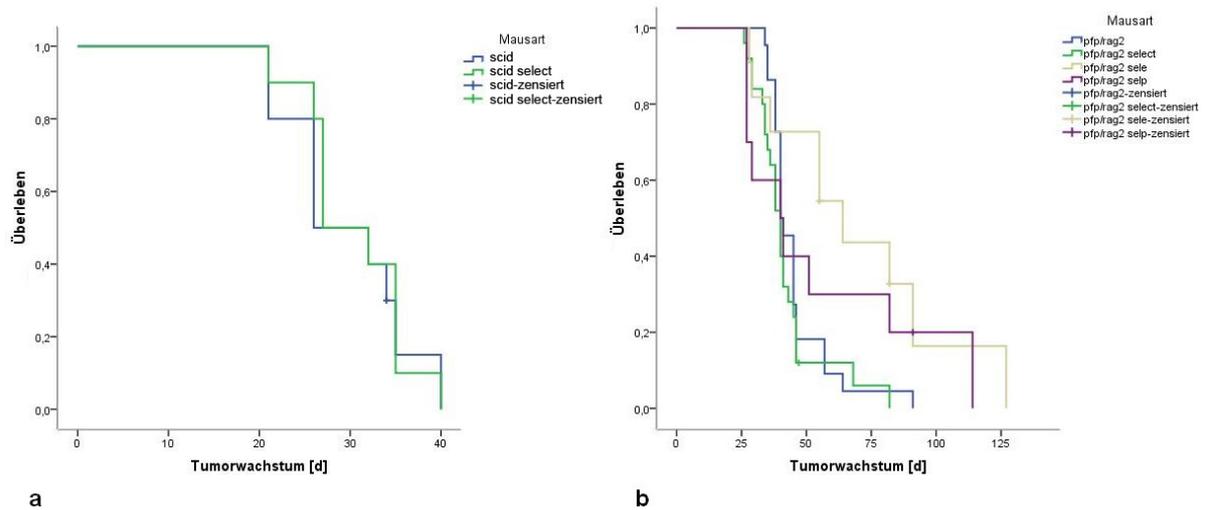


Abbildung 3.17: Überlebenskurve der einzelnen Mauslinien in Abhängigkeit vom Tumorwachstum.

Das Überleben der Tiere ist für scid und scid select a) und für pfp/rag2 und pfp/rag2 select für beide Versuchsansätze dargestellt b). Die Überlebenswahrscheinlichkeit war nur bei den E-selektindefizienten Tieren signifikant erhöht (* $p = 0,032$). Die zensierten Tiere waren bereits vor Beendigung des Experiments verstorben.

Anhand des Log Rank Tests ergaben sich sowohl bei den scid und scid select Tieren als auch bei den zwei Versuchsansätzen der pfp/rag2 und pfp/rag2 select Mauslinie keine Unterschiede in der Überlebenszeit. Betrachtet man dagegen die Gesamtheit der pfp/rag2 Linie mit Ansatz 1 und 2, ergaben sich Unterschiede zwischen den Tierarten. Diese wurde anhand einer Cox Regression untersucht. Die Wahrscheinlichkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt zu Versterben war bei den E-selektindefizienten pfp/rag2 Tieren um 60 % geringer (signifikant bei $p = 0,032$) und bei den P-selektindefizienten pfp/rag2 Tieren war diese um 33 % geringer (nicht signifikant) als bei den Wildtyptieren.

3.3.3.5 Bestimmung der Metastasenanzahl im Lungengewebe

Durch die vom Primärtumorwachstum verursachte Absiedlung von DU4475 Tumorzellen im Organismus der Mäuse entstanden in 94 % der Fälle (79 von 84 Tieren) spontane Lungenmetastasen. In 100 % der Fälle metastasierte der Primärtumor bei den Wildtyptieren scid und pfp/rag2. Sowohl bei den selektindefizienten pfp/rag2 Tieren als auch bei den selektindoppeltdefizienten pfp/rag2 bzw. scid Tieren waren zu 91 % Spontanmetastasen auffindbar. Die Metastasen wurden in den entnommenen linken Lungenlappen der Mäuse ausgewertet (Kapitel 2.7.4). Zur Auswertung der Metastasen wurde das Poisson Regressionsmodell mit 3 unabhängigen Variablen (Mausart, Tumorgewicht und

-wachstum) mit Interaktionstermen und einem Zufallseffekt: Ansatz verwendet. Die Anzahl an spontanen Lungenmetastasen zeigte bei Betrachtung aller Interaktionsterme hochsignifikante Unterschiede.

scid und scid select Modelle:

Die Spontanmetastasierung war bei den scid select Tieren trotz erhöhtem Tumorgewicht hoch signifikant gegenüber den Wildtyptieren reduziert ($p < 0,001$, siehe Abb. 3.20). Bei den scid Mäusen lag die Metastasenanzahl der ausgezählten halben Lungen zwischen 112 und 7757 Metastasen ($n = 9$, Mittelwert 1382, Median: 739, SD: 2407). Bei den scid select Tieren lagen die Werte zwischen 0 und 2072 Metastasen ($n = 10$, Mittelwert: 845, Median: 637, SD: 761).

pfp/rag2, pfp/rag2 sele, selp und select Modelle:

Die unabhängig voneinander durchgeführten Tierversuche (Vorversuch 0, Ansatz 1 und 2) hatten einen entscheidenden Einfluss auf die Metastasierungsrate der verschiedenen pfp/rag2 Tiere. Die Versuchsansätze unterschieden sich allein bei den pfp/rag2 Wildtyptieren hoch signifikant voneinander ($p < 0,001$, siehe Abb. 3.18). Daher wurden die Ansätze zuerst getrennt voneinander untersucht.

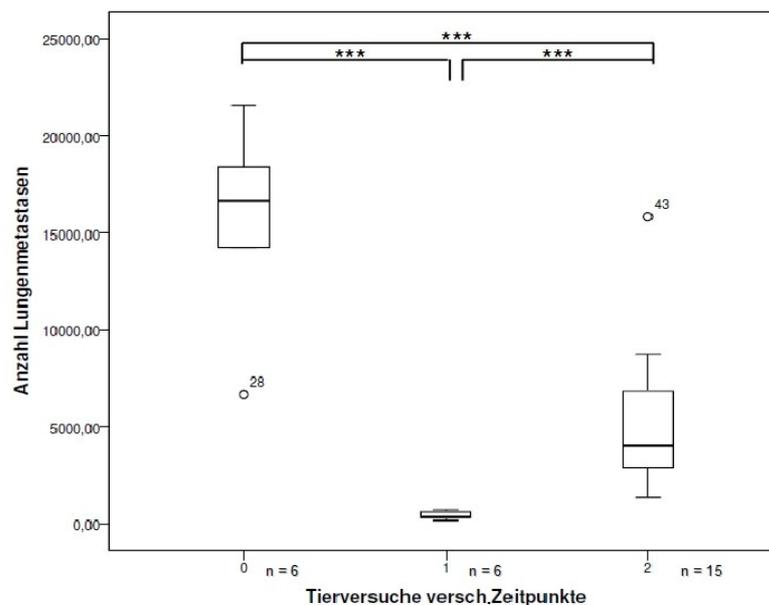


Abbildung 3.18: Anzahl an spontanen Lungenmetastasen ausgezählt anhand von H. E. Lungenschnitten der verschiedenen pfp/rag2 Wildtypen.

Die Abbildung ist unterteilt in die Versuchsansätze 0, 1 und 2. Die Daten sind als Boxplot Diagramm mit Median ($n =$ Stichprobenanzahl) dargestellt und beinhaltet Ausreißerwerte $^{\circ}$ (1,5fache der Boxlänge). Die Nummern sind auf die Fallnummern der Tiere bezogen.

- Ansatz 1

Bei den pfp/rag2 Mäusen schwankte die Metastasenanzahl zwischen 176 und 717 Metastasen (n = 6, Mittelwert: 422, Median: 360, SD: 201). Bei den pfp/rag2 sele Tieren lagen die Werte zwischen 0 und 20074 Metastasen (n = 10, Mittelwert: 3039, Median: 795, SD: 6082). Bei pfp/rag2 selp waren 0 bis 11646 Metastasen auszählbar (n = 9, Mittelwert: 2485, Median: 1269, SD: 3667). Bei den pfp/rag2 select lagen die Werte zwischen 0 und 14149 Metastasen (n = 11, Mittelwert: 1621, Median 154, SD: 4226).

Bei allen vier pfp/rag2 Tiergruppen, selektinkompetent und -defizient, lagen signifikante Unterschiede in der Metastasierung vor (Abb. 3.19 a). Bei Verlust beider Selektine des Endothels war ein signifikanter Rückgang der Metastasierung gegenüber den Wildtyp pfp/rag2 Tieren zu verzeichnen ($p < 0,001$). Bei den selektineinzeldefizienten pfp/rag2 Tieren zeigte sich eine erhöhte Metastasierungsrate gegenüber dem Wildtyp pfp/rag2, daher wurden in den fortlaufenden Analysen nur die doppelt selektindefizienten pfp/rag2 Tiere den pfp/rag2 Wildtyp Gruppen gegenübergestellt.

- Ansatz 2

Bei den pfp/rag2 Wildtyptieren schwankte die Metastasenanzahl zwischen 1368 und 15840 Metastasen (n = 15, Mittelwert: 5253, Median: 4018, SD: 3733). Bei pfp/rag2 select ergaben sich Werte zwischen 646 und 22464 Metastasen (n = 13, Mittelwert: 8691, Median: 5819, SD: 7639).

Mit erhöhter Anzahl an Versuchstieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen. Es lag hierbei eine höhere Varianz an Lungenmetastasen bei E- und P-doppeltselektindefizienten pfp/rag2 Tieren vor. Die Standardabweichung bei den pfp/rag2 select Mäusen ist gegenüber den Wildtypen ums zweifache erhöht.

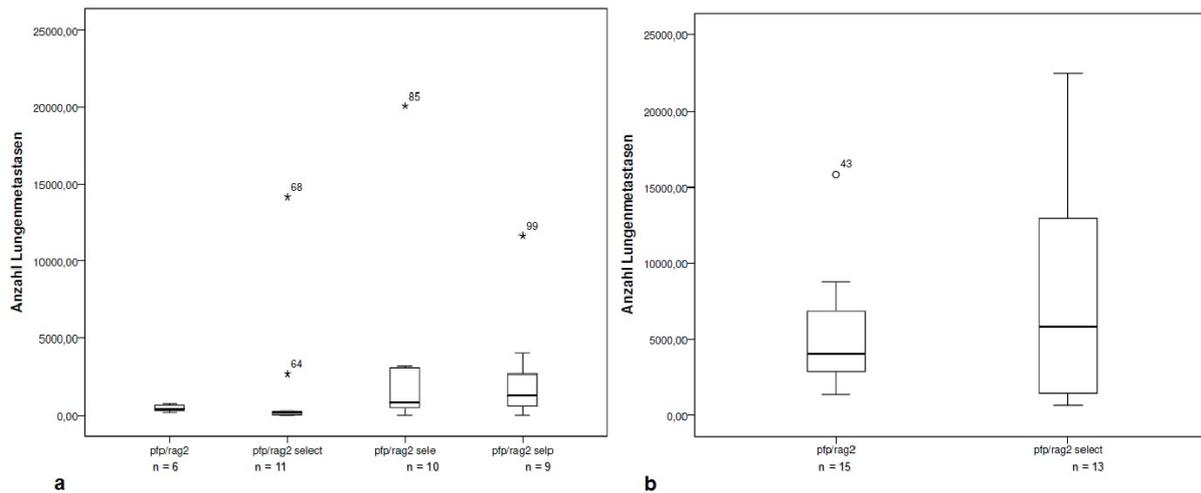


Abbildung 3.19: Anzahl an spontanen Lungenmetastasen anhand von H. E. Lungenschnitten der verschiedenen pfp/rag2 Wildtypen gegenüber den selektindefizienten pfp/rag2 Tieren des 1. Ansatzes a) und des 2. Ansatzes b).

Das Boxplot Diagramm beinhaltet Ausreißerwerte ° (1,5fache der Boxlänge) und Extremwerte * (3fache der Boxlänge). Die Nummern sind auf die Fallnummern der Tiere bezogen (n = Stichprobenanzahl).

- Zusammenfassung der Ansätze

Bei allen pfp/rag2 Tieren schwankte die Metastasenanzahl zwischen 176 und 15840 Metastasen (n = 21, Mittelwert: 3873, Median: 3348, SD: 3843). Bei den pfp/rag2 select Mäusen ergaben sich Werte zwischen 0 und 22464 Metastasen (n = 24, Mittelwert: 5451, Median: 1440, SD: 7153).

Mit Einbezug der Zufallsgröße Ansatz wurden die verschiedenen pfp/rag2 Tiere beider Tierversuche hinsichtlich der Metastasierung untersucht. Hierbei ergab sich eine signifikante Reduzierung der Metastasierung bei E- und P-Selektindefizienz ($p < 0,001$) sowie bei E-Selektinverlust ($p = 0,002$) gegenüber den Wildtypen. Bei den P-selektineinzeldefizienten Tieren zeigte sich dagegen eine signifikant erhöhte Metastasierungsrate ($p < 0,001$) im Vergleich zu pfp/rag2 Tieren.

scid und pfp/rag2 Modelle mit und ohne Selektindefizienz:

Zusammenfassend zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Spontanmetastasierung bei beiden E- und P-selektindefizienten scid und pfp/rag2 Tieren gegenüber den Wildtypen. Die pfp/rag2 Mäuse entwickelten signifikant mehr spontane Lungenmetastasen als die scid Tiere.

Zudem ergab sich bei den verschiedenen scid und pfp/rag2 Mauslinien mit und ohne Selektindefizienz eine Abhängigkeit zwischen dem metastatischen Potential der Tumorzelllinie und dem Tumorgewicht sowie der Länge des Tumorzustands.

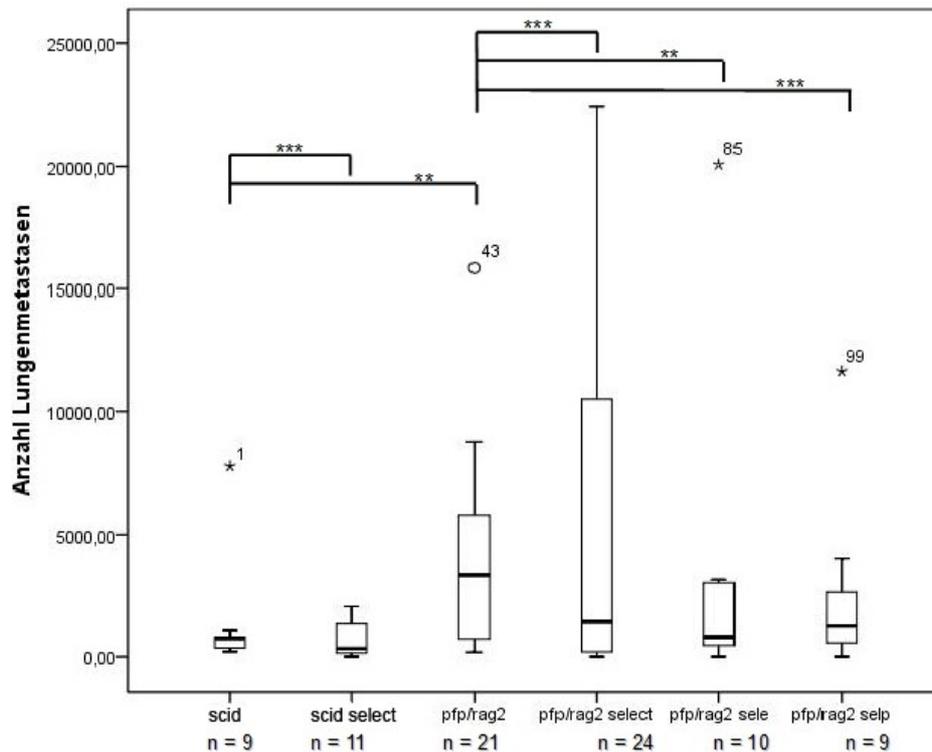


Abbildung 3.20: Überblick über die spontane Metastasierung bei den verschiedenen Mauslinien scid und pfp/rag2 (Ansatz 1 und 2) mit Einbezug der statistischen Signifikanzen per Poisson Regression.

Das Boxplot Diagramm beinhaltet Ausreißerwerte ° (1,5fache der Boxlänge) und Extremwerte * (3fache der Boxlänge). Die Nummern sind auf die Fallnummern der Tiere bezogen (n = Stichprobenanzahl). Die p-Werte wurden mit dem Poisson Regressionsmodell mit Hilfe der ermittelten Kovariaten (Tumorgewicht = 2,16 g und -wachstum = 45,74 d) berechnet.

Die Metastasierung wurde zusätzlich gruppiert nach dem Tumorgewicht unter und über 2 g betrachtet, entsprechend der Häufigkeitsverteilung des Tumorgewichtes aller Tiere (Kapitel 3.3.3.3, Mittelwert = 2,14 g). Mit Zunahme des Gewichtes über die 2 g nahm die Metastasierung der selektindefizienten Tiere (Abb. 3.21 b, d) im Vergleich mit den Wildtyptieren zu (Abb. 3.21 a, c).

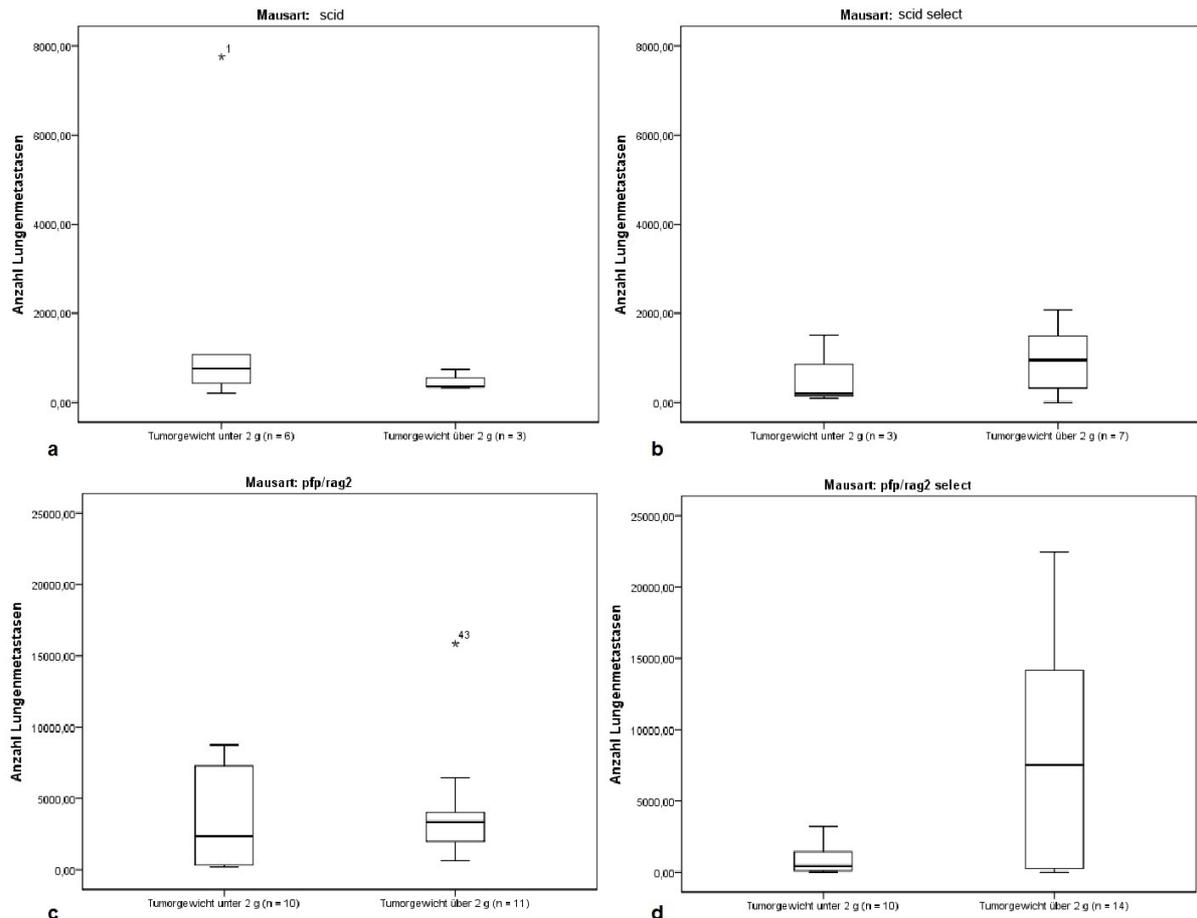


Abbildung 3.21: Überblick über die spontane Metastasierung bei den verschiedenen Mauslinien gruppiert nach dem Tumorgewicht unter und über 2 g.

Das Boxplot Diagramm beinhaltet Extremwerte * (3fache der Boxlänge). Die Nummern sind auf die Fallnummern der Tiere bezogen (n = Stichprobenanzahl).

3.3.4 Bestimmung der zirkulierenden Tumorzellen im Blut

Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut der Mäuse erfolgte mit Hilfe der quantitativen PCR Methode unter Verwendung eines humanspezifischen Primers. Das entnommene Herzblut der pfp/rag2 Tiere mit und ohne Selektindefizienz (Ansatz 2) wurde für die Isolierung der DNA verwendet. Die t-Testanalyse ergab keinen Unterschied in der Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen im Blut von pfp/rag2 und pfp/rag2 select Tieren.

	pfp/rag2 n = 8	pfp/rag2 select n = 8
Mittelwert	7,31E+007	4,23E+007
Median	3,16E+007	3,75E+007
SD	1,11E+008	2,65E+007
SEM	3,92E+007	9,35E+006
Minimum	4,54E+006	6,34E+006
Maximum	3,39E+008	8,47E+007

Tabelle 3.3: Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen in 1 ml Mausblut.

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl an Tumorzellen im Blut der zwei Mausarten lag nicht vor.

3.3.5 Analyse disseminierter Tumorzellen im Knochenmark der Maus

Über den hämatogenen Weg erfolgte die Metastasierung des Mammakarzinoms vor allem in die Lunge und in das Knochenmark. Die frisch gewonnenen Knochenmarkszellen aus den pfp/rag2 Wildtypen, den einzel- und doppelstselektindefizienten pfp/rag2 Tieren wurden für die FACS Analysen weiter verarbeitet (Kapitel 2.3.6) und mit dem Antikörper gegen den humanen Oberflächenmarker EpCAM untersucht.

Bei der pfp/rag2 Gruppe mit 28 Tieren fanden sich bei 9 Mäusen disseminierte EpCAM positive Tumorzellen (32,14 %) im Knochenmark. In nur 8,3 % der Fälle konnten bei den 24 pfp/rag2 select Tieren EpCAM positive Zellen der Knochenmarksproben detektiert werden. Bei den 19 einzeldefizienten pfp/rag2 Tieren waren keine EpCAM positiven Zellen detektierbar.

	EpCAM +	EpCAM -	Zeilensumme:
pfp/rag2	9	19	28
pfp/rag2 select	2	22	24
Spaltensumme:	11	41	52

Tabelle 3.4: Kontingenztabelle für die Knochenmarksmetastasierung.

Mit dem Fisher's exakt Test ergab sich ein p-Wert von 0,0463, d. h. bei den pfp/rag2 Tieren ist die Dissemination von Tumorzellen, die EpCAM positiv sind, signifikant erhöht gegenüber den selektindefizienten Tieren. Im Rahmen der immunhistologischen Färbungen wurden die EpCAM positiven Tumorzellen im Knochenmark auf weitere Marker untersucht.

3.4 Relative Quantifizierung vom Gewebe der Mäuse

Für die *in vitro* Untersuchungen der Genexpression wurde die RNA der kultivierten Tumorzellen DU4475 aus den entnommenen Primärtumoren, Lungen und dem Blut isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der relativen PCR Methode quantifiziert.

3.4.1 Quantitative PCR mittels Roche LightCycler 480 und 2.0

Bei der relativen Quantifizierung mit Hilfe einer *Real-time* PCR wurden die Tumorzellen auf Expressionsmuster folgender Kandidatengene analysiert: Mucin1, Zytokeratin 18 (CK18), Karzinoembryonales Antigen (CEACAM5), Mammaglobin1, Her2-neu (c-erb-2) und Epitheliales Zelladhäsionsmolekül (EpCAM). Als Referenzgene dienten die Expressionsdaten der humanen Haushaltsgene ACTB (β -Aktin; NCBI: BC004251.1) und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase; NCBI: BC009081.1). Mit Hilfe der Sequenzierung der PCR Produkte konnte die Spezifität der Primer sicher gestellt werden.

3.4.1.1 Spezifität der Kandidatengene

Zur Validierung der Primer für die relative Quantifizierung wurde cDNA der kultivierten Tumorzellen mittels Thermocycler-PCR amplifiziert und im Agarosegel untersucht. Es wurde stets die gleiche Ausgangsmenge von 1,5 μ g RNA eingesetzt. Zur Überprüfung, ob die Primer rein spezifisch an die humanen Gensequenzen binden und keine homologen Regionen der murinen Gene amplifizieren, wurden Kontrollproben aus Mausblut mit untersucht.

Das Referenzgen ACTB war für die Analyse humaner RNA nicht geeignet, da die ausgetesteten Primer auch die murinen Sequenzen der Kontrollproben amplifiziert haben. Beim GAPDH war die gewählte Primersequenz dagegen rein humanspezifisch und wurde für die relative Quantifizierung eingesetzt.

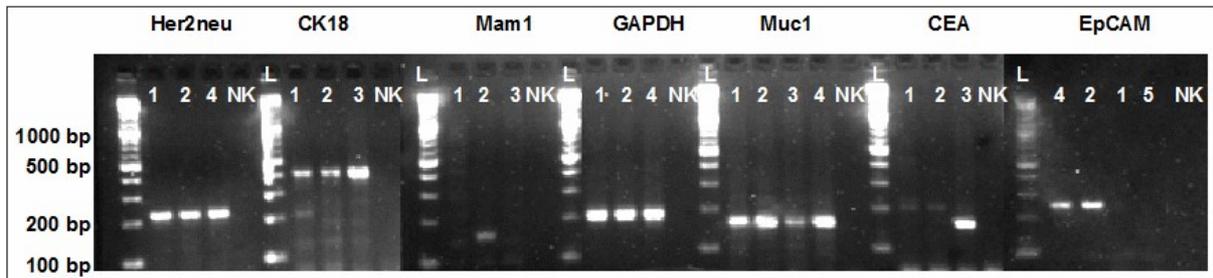


Abbildung 3.22: Detektion der PCR Produkte ausgewählter Primer mittels Agarosegel.

Für die verschiedenen Primer wurde die cDNA der humanen Fibroblasten (1), die humanen Tumorzelllinien DU4475 (2), HT29 (3), MCF7 (4), vom Mausblut (5) sowie eine Negativkontrolle (NK) mittels Thermocycler-PCR amplifiziert. Die entstandenen Produkte wurden auf ein 2,0 %iges Agarosegel aufgetragen. Das „L“ steht für Längenstandard.

(Die Produktgrößen für folgenden Primer lauten: Her2neu 227 bp, CK18 413 bp, Mam1 158 bp, GAPDH 191 bp, Muc1 161 bp, CEA 160 bp, EpCAM 245 bp.)

Alle Primer zeigten spezifische Produktgrößen nach der Auftrennung im Agarosegel. Die Tumorzelllinie DU4475 (siehe Probe 2 in Abb. 3.22) besaß mRNA Transkripte für Her2neu, CK18, Mam1 und Muc1. Die Zelllinien MCF7, HT29 und der Fibroblasten wurden zusätzlich herangezogen, um die Expressionsstärke von regulierbaren Gensequenzen zu untersuchen. Entsprechend der Tumorentität zeigte sich für HT29 ein eindeutiges Produkt mit den Primern CK18 und CEA, eine geringere Muc1-Expression sowie keinerlei Expression für Mam1. Dagegen blieb die Expression des Referenzgens GAPDH überall gleich stark.

3.4.1.2 EpCAM Untersuchung am Gewebe und Blut der entsprechenden Mauslinie

In Abhängigkeit der Mausart und des untersuchten Gewebes zeigte die univariate Varianzanalyse bei der Genexpression von EpCAM, dass sich die Expression im Gewebe von den Mausarten unterscheidet. Es traten dabei Wechselwirkungen zwischen der Mausart und dem Gewebe auf.

scid und scid select:

Der Vergleich der Tiergruppen hinsichtlich der einzelnen EpCAM Expressionen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen selektinkompetenten und selektindefizienten scid Mäusen ($p = 0,037$). Die EpCAM Expression im Primärtumor der scid select Tiere war signifikant vermindert gegenüber den Wildtyptieren ($p = 0,013$). In Lunge und Blut war die Expression beim Vergleich der Tiergruppen nicht verändert. Gegenüber den Wildtyptieren liegt dennoch eine geringere, aber nicht

signifikant verringerte, EpCAM Expression in den Metastasen der scid select Lungen vor und eine leicht erhöhte EpCAM Expression der zirkulierenden Tumorzellen im Blut dieser Mäuse (Abb. 3.23).

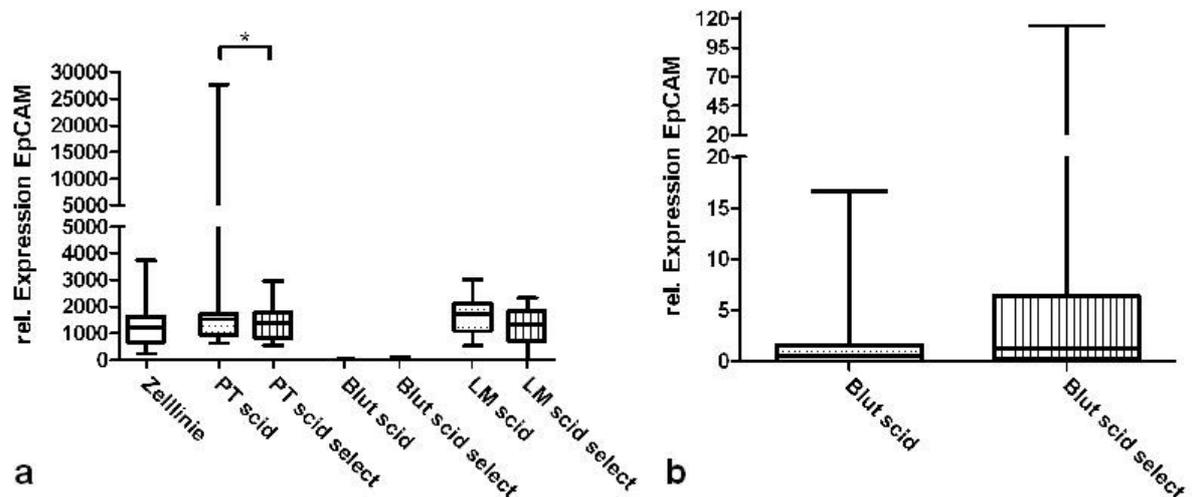


Abbildung 3.23: EpCAM Expression von humanen DU4475 in verschiedenen Geweben a) bzw. im Blut der scid und scid select Tiere b).

Die Expression der EpCAM Moleküle wurde als Boxplot mit Median dargestellt. Die Abkürzungen PT und LM stehen für Primärtumor und Lungenmetastasen.

Bei Betrachtung der EpCAM Expression in Abhängigkeit des Primärtumorgewichtes zwischen den scid und scid select Tieren ergab sich kein Expressionsunterschied in den Primärtumoren und zirkulierenden Tumorzellen im Blut. Bei Tumoren unter 2 g wiesen die Lungenmetastasen der scid select Mäuse eine signifikante Verminderung der Expression gegenüber den Metastasen der Wildtypen auf.

Betrachtet man die einzelnen Expressionen innerhalb einer Tiergruppe war bei scid select das EpCAM Transkript im Blut bei zwei von zehn Tieren mit Tumorlast signifikant erhöht (1,21 g und 2,95 g; beide Tiere mit > 1000 Lungenmetastasen). Bei den Primärtumoren und Lungenmetastasen zeigten sich keine Expressionsunterschiede innerhalb der scid sowie der scid select Gruppe. Die folgende Abbildung geht auf die EpCAM Expression in den Lungenmetastasen und den zirkulierenden Tumorzellen im Blut ein:

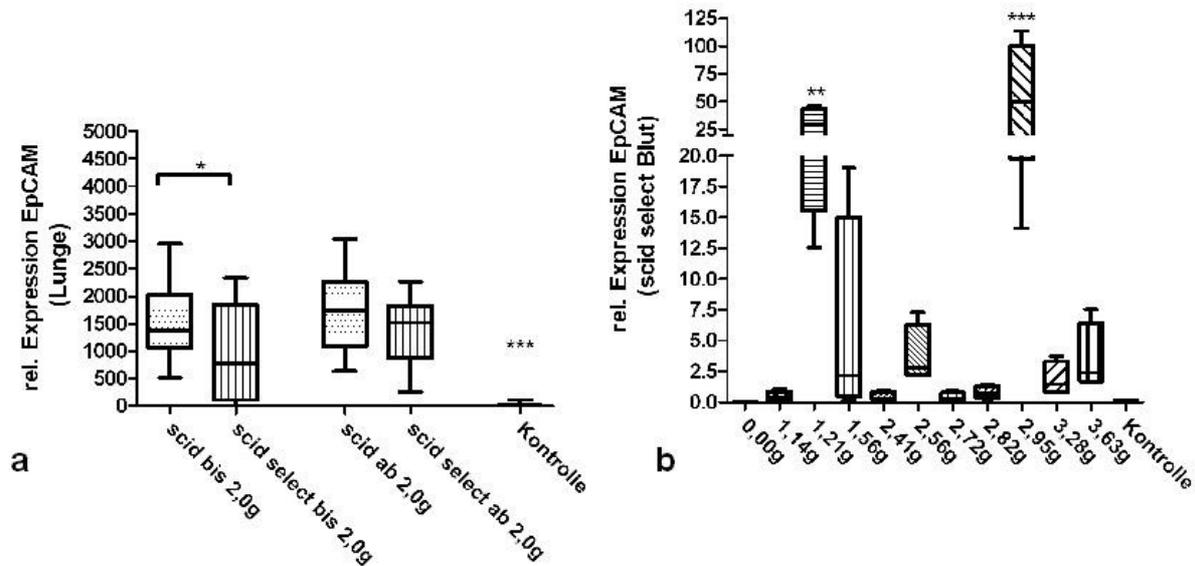


Abbildung 3.24: EpCAM Expression von humanen DU4475 im Lungengewebe a) bzw. im Blut der scid und scid select Tiere b).

Die Expression der EpCAM Moleküle wurde hierbei in Abhängigkeit des Primärtumorgewichtes dargestellt, um den Einfluss des Gewichtes auf die Expressionsstärke zu untersuchen.

pfp/rag2 und pfp/rag2 select:

Die EpCAM Expression war im Primärtumor und im Lungengewebe signifikant erhöht gegenüber der Expression in den kultivierten Tumorzellen DU4475.

Im Primärtumor der selektindefizienten Mäuse zeigte sich eine signifikante Verminderung der EpCAM Expression im Vergleich zum selektinkompetenten Tier ($p < 0,001$). Auch bei der pfp/rag2 Mauslinie lag eine geringere EpCAM Expression in den Metastasen der pfp/rag2 select Lunge vor und eine verminderte EpCAM Expression der zirkulierenden Tumorzellen im Blut dieser Mäuse (Abb. 3.25). Beides war aber nicht signifikant verändert.

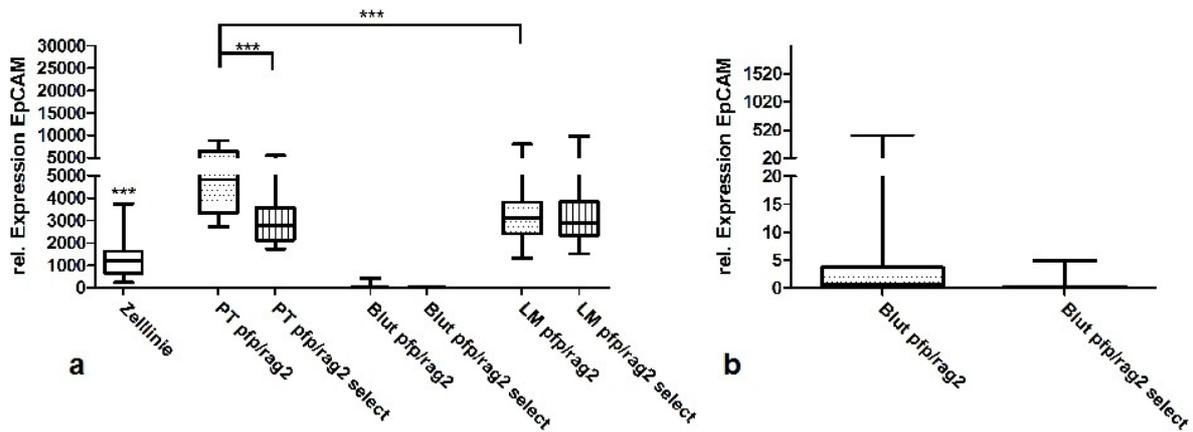


Abbildung 3.25: EpCAM Expression von humanen DU4475 in verschiedenen Geweben a) bzw. im Blut der pfp/rag2 und pfp/rag2 select Tiere b).

Die Expression der EpCAM Moleküle wurde als Boxplot mit Median dargestellt. Die Abkürzungen PT und LM stehen für Primärtumor und Lungenmetastasen.

In Abhängigkeit des Primärtumorgewichtes zwischen den pfp/rag2 und pfp/rag2 select Tieren wiesen die entnommenen Primärtumore konstant eine reduzierte EpCAM Expression bei selektindefizienten Tieren auf (Abb. 3.26 a).

Innerhalb der untersuchten Tiergruppen ergab sich keine Schwankung der EpCAM Expression im Primärtumor. Jedoch zeigte sich bei den zirkulierenden Tumorzellen im Blut von pfp/rag2 Mäusen eine signifikant erhöhte Expression bei einer Tumorgröße unter 2,0 g gegenüber den selektindefizienten Tieren. Dies wurde hervorgerufen durch eine stark erhöhte Expression des EpCAM Moleküls bei einem pfp/rag2 Tier mit 1,63 g Tumor (Lungenmetastasen 371,2). Im Lungengewebe war dagegen in einem pfp/rag2 select Tier die Expression signifikant höher als bei dem Rest dieser Gruppe. Hierbei handelt es sich um ein pfp/rag2 select Tier mit der höchsten Metastasenanzahl in der Lunge (2,81 g mit über 14000 Lungenmetastasen).

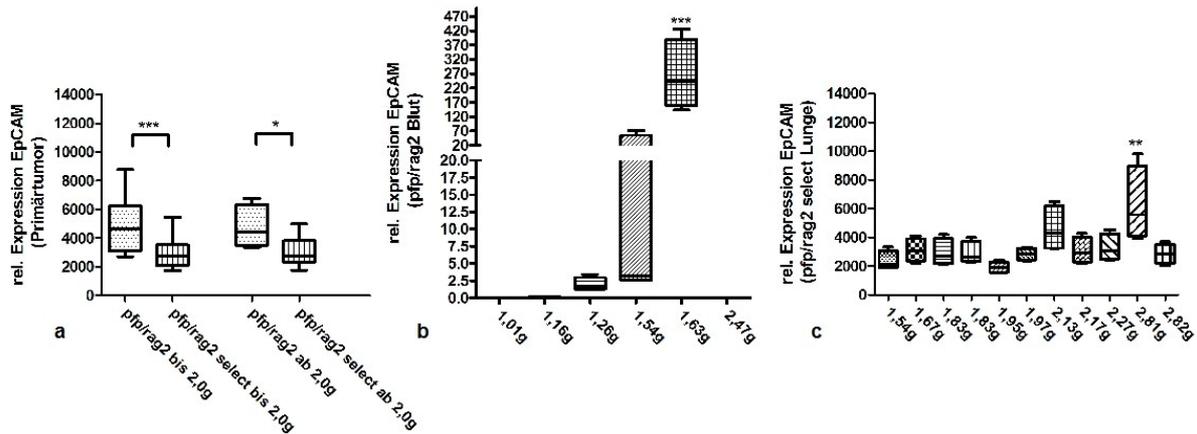


Abbildung 3.26: EpCAM Expression von humanen DU4475 im Primärtumor a) bzw. im Blut der pfp/rag2 Tiere b) und im Lungengewebe der pfp/rag2 select Mäuse c).

Die Expression der EpCAM Moleküle wurde hierbei in Abhängigkeit des Primärtumorgewichtes dargestellt, um den Einfluss des Gewichtes auf die Expressionstärke zu untersuchen.

Zusammenfassung der EpCAM Daten:

Die humane mRNA des Oberflächenmoleküls EpCAM ist bei allen untersuchten Proben (Tumor, Lunge und Blut) exprimiert. Im Primärtumor der immundefizienten scid und pfp/rag2 Tiere zeigte sich bei Selektinverlust eine signifikante Expressionsverminderung. Alle Tumor tragenden Tiere, ob selektinkompetent oder -defizient, entwickelten EpCAM positive Metastasen in der Lunge.

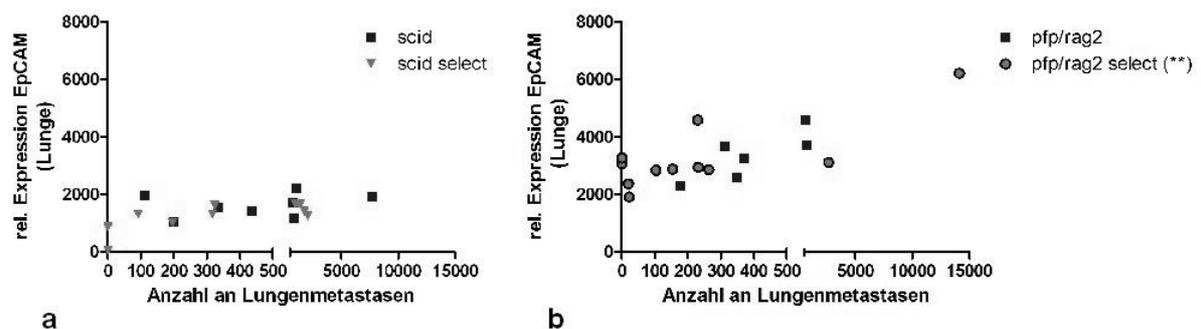


Abbildung 3.27: Korrelationsanalyse der EpCAM Expression von den Metastasen der Lunge im Vergleich zur Anzahl an Lungenmetastasen.

Die EpCAM Expression in Abhängigkeit von der Anzahl an Lungenmetastasen ist für die scid a) und für die pfp/rag2 Tiere b) mit und ohne Selektindefizienz dargestellt.

Die beiden Graphen in Abbildung 3.27 zeigten bei allen Tiergruppen einen Anstieg der Expression von EpCAM mit zunehmender Anzahl an Lungenmetastasen. Eine direkte Korrelation ergab sich aber nur bei den Metastasen der pfp/rag2 select Tiere mit einem Wert von $p = 0,0016$ (** mittels Pearson Korrelation). Selbst bei den Tieren

ohne auszählbare Metastasen lag die Expression des Moleküls in einem detektierbaren Bereich. Ausgenommen ist dabei ein Tier der scid select Gruppe ohne Tumorentwicklung. Hier war keine EpCAM Expression gemessen worden. Mit der isolierten mRNA konnten somit humane Transkripte (DU4475 Metastasen) innerhalb der Mauslunge aufgedeckt werden.

Bei der pfp/rag2 Linie war die EpCAM Expression im Primärtumor und in den Lungenmetastasen deutlich höher als bei der scid Linie (Primärtumor $p < 0,001$; Lungenmetastasen $p < 0,001$). Nur bei den zirkulierenden Tumorzellen im Blut ergaben sich keine Expressionsunterschiede zwischen den zwei Mauslinien.

3.4.1.3 Mammaglobin1 Untersuchung am Gewebe und Blut der entsprechenden Mauslinie

Die univariate Varianzanalyse ergab bei der Expression von Mammaglobin1, unter Berücksichtigung der Einflussfaktoren Mausart und des untersuchten Gewebes, einen Unterschied bei der Expression im Gewebe (** $p = 0,003$) Die Genexpression war dabei unabhängig von den betrachteten Mausarten.

scid und scid select:

Der Vergleich zwischen der Mammaglobin1 Expression der verschiedenen Mausarten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen selektinkompetenten und selektindefizienten scid Mäusen ($p = 0,063$). Die Untersuchung der Mammaglobin1 Expression im Gewebe zeigte allein beim Blut der selektindefizienten scid Mäuse einen signifikanten Rückgang (* $p = 0,024$) gegenüber den Wildtypen. Im Vergleich zu den Primärtumoren und den untersuchten Metastasen war das mRNA Mammaglobin1 Transkript in der Zelllinie DU4475 deutlich stärker exprimiert, aber nicht signifikant verändert (Abb. 3.28 a).

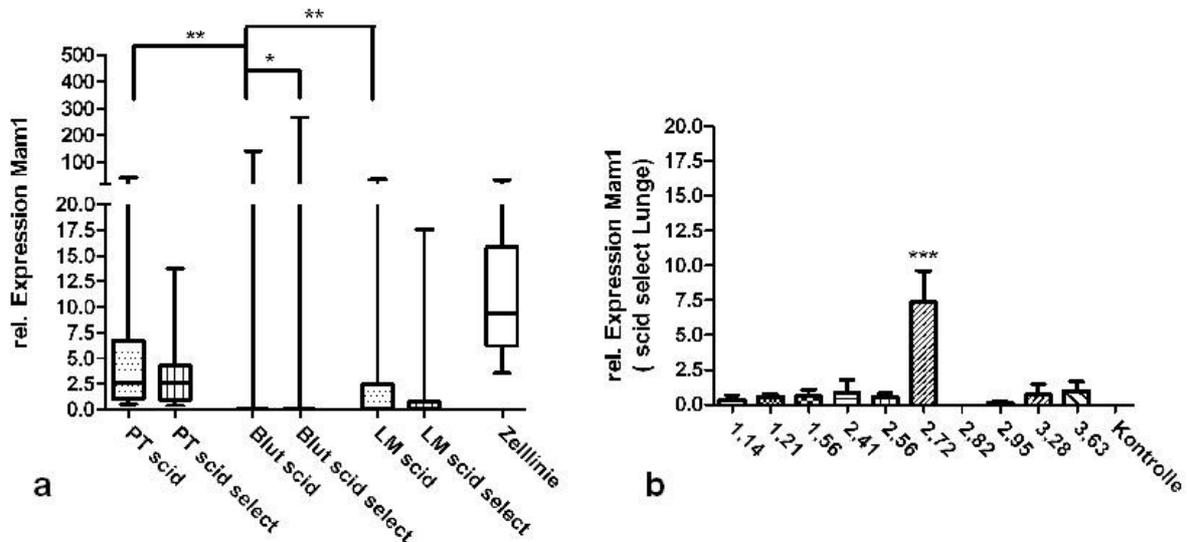


Abbildung 3.28: Mammaglobin1 Expression von humanen DU4475 in verschiedenen Geweben a) bzw. im Lungengewebe der scid select Tiere b).

Die Expression der Mammaglobin1 Moleküle wurde als Boxplot mit Median dargestellt. Die Abkürzungen PT und LM stehen für Primärtumor und Lungenmetastasen.

Innerhalb der Tiergruppe scid war ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den zirkulierenden Tumorzellen im Blut und den Primärtumoren (** $p = 0,002$) sowie den Lungenmetastasen (** $p = 0,001$) zu sehen. Der einzige Ausreißerwert ergab sich bei den Lungenmetastasen der scid select Tiere. Bei diesem Tier, mit einem Tumorgewicht von 2,72 g und 317 Lungenmetastasen, war die Expression signifikant erhöht.

pfp/rag2 und pfp/rag2 select:

Der Vergleich zwischen der Mammaglobin1 Expression der verschiedenen Mausarten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den selektinkompetenten und selektindefizienten pfp/rag2 Mäusen ($p = 0,973$) und war unabhängig vom betrachteten Gewebe.

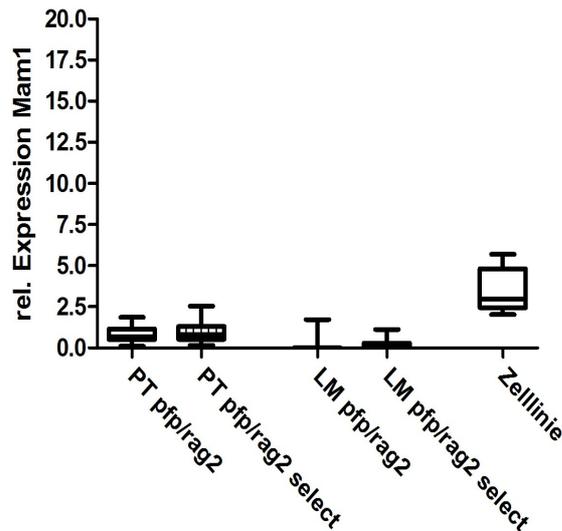


Abbildung 3.29: Mammaglobin1 Expression von humanen DU4475 Zellen in verschiedenen Geweben der pfp/rag2 und pfp/rag2 select Tiere.

Die Expression der Mammaglobin1 Moleküle wurde als Boxplot mit Median dargestellt. Die Abkürzungen PT und LM stehen für Primärtumor und Lungenmetastasen.

Zusammenfassung der Mammaglobin1 Daten:

Der Vergleich zwischen der Mammaglobin1 Expression der verschiedenen Mausarten zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen scid und pfp/rag2 Mäusen ($p = 0,023$). Dabei war die Gesamtexpression bei den pfp/rag2 Tieren reduziert.

Die humane mRNA des Oberflächenmoleküls Mammaglobin1 war nicht bei allen untersuchten Proben (Lunge, Blut) exprimiert. Bei 65 % der Tumor tragenden Tiere entwickelten sich Mammaglobin1 exprimierende Metastasen in der Lunge (60 % der Wildtypiere scid und pfp/rag2 sowie 68,2 % der E- und P-selektindefizienten Tiere). Bei der Untersuchung der Blutproben der tumortragenden Mäuse fanden sich in 41 % der Fälle Transkripte (50 % der Wildtypiere scid sowie 33,3 % der scid select Tiere). Bei den Primärtumoren und Lungenmetastasen ergaben sich keine Expressionsunterschiede hinsichtlich der selektinkompetenten und selektindefizienten Tiere. Dagegen zeigte sich im Blut der scid select Tiere eine signifikante Verminderung der Mammaglobin1 Expression von zirkulierenden Tumorzellen gegenüber den Wildtypen.

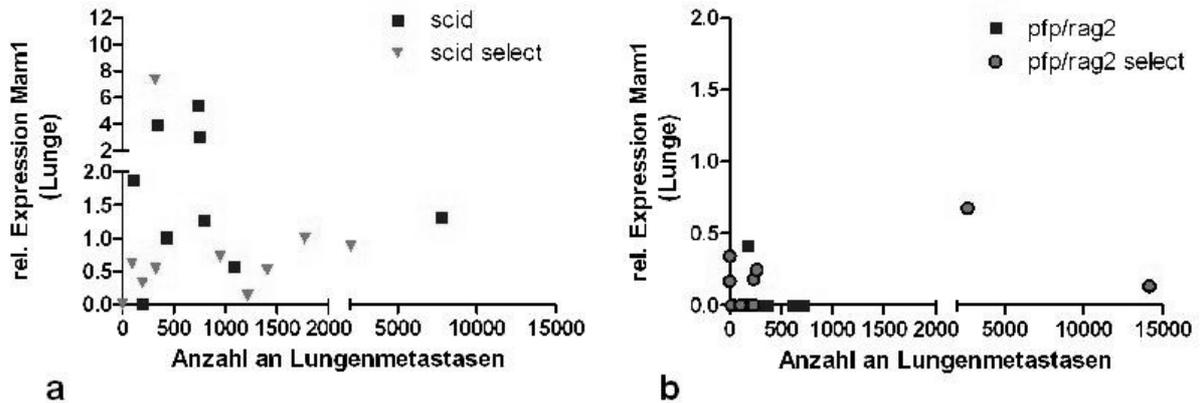


Abbildung 3.30: Mammaglobin1 Expression der Spontanmetastasen im Vergleich zur Anzahl an Lungenmetastasen bei der scid a) und pfp/rag2 Mauslinie b).

Im Fall der Analyse des Lungengewebes mit dem Mammaglobin1 Marker ergab sich bei allen Tiergruppen keine Korrelation zwischen der Expressionshöhe des humanen Transkriptoms und der Anzahl an Lungenmetastasen. Die Verteilung der Mammaglobin1 positiven Metastasen im Lungengewebe der scid und pfp/rag2 Mäuse steht nicht im Zusammenhang mit der Gesamtanzahl an Lungenmetastasen. Nicht jede der gebildeten Lungenmetastasen der Lunge exprimiert das Mammaglobin1.

3.4.2 PCR Array zur Analyse der metastasierenden DU4475 Zelllinie gegenüber dem Primärtumor

Nur die Primärtumore der scid Linie zeigten signifikante Größenunterschiede in Abhängigkeit von der E- und P-Selektindefizienz. Trotz des erhöhten Tumorgewichtes der scid select Tiere erfolgte eine signifikant verringerte Spontanmetastasierung in die Lunge. Daher wurden die isolierten Primärtumore der scid und scid select Tiere nochmals auf Tumor- bzw. Metastasierungseigenschaften analysiert. Hierzu wurde das *Single Assay System* von Roche mit den Hydrolysesonden für die Gensequenzen EpCAM, FUT3, ITGA4 und PSGL1 (SELPLP) verwendet.

Am Beispiel von scid versus scid select Tumoren, im Vergleich zur Zelllinie DU4475, zeigte sich ein signifikanter Unterschied von $p = 0,001$ in der Expression von PSGL1 (Abb. 3.31 a). Bei den selektindefizienten Tieren war ein Expressionsrückgang detektierbar. Zusätzlich war das mRNA Transkript für die Fukosyltransferase 3 bei den Primärtumoren der selektindefizienten Tiere vermindert exprimiert ($p = 0,018$). ITGA4 und EpCAM zeigten keinen Expressionsunterschied in den Primärtumoren

von scid und scid select Tieren. Die Analyse wurde mit der univariaten Varianzanalyse untersucht.

Das sich die EpCAM Expression zwischen scid und scid select Primärtumoren nicht unterscheidet deckt sich nicht mit den Expressionsergebnissen anhand der selbst gewählten Primer der MWG-Biotech AG. Die folgende Abbildung zeigt beim Vergleich der Primer einen signifikanten Unterschied zwischen der EpCAM Expression von scid und scid select Primärtumoren.

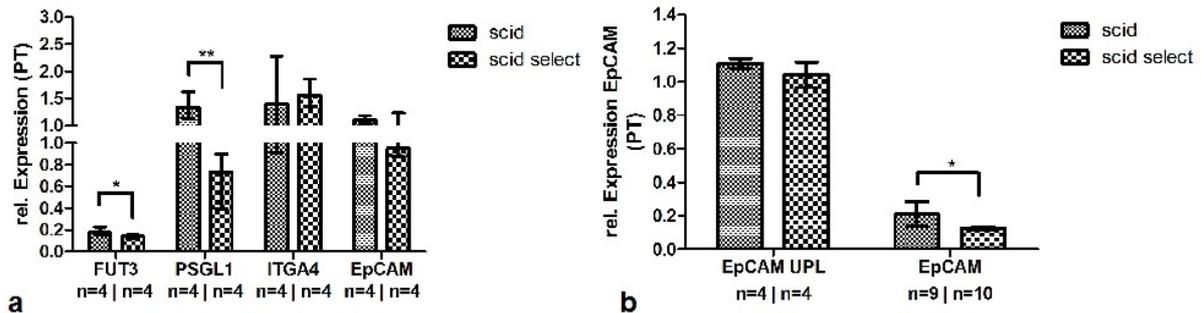


Abbildung 3.31: Übersicht der Expression von DU4475 Primärtumoren a) und der Vergleich von den Expressionsdaten beim Einsatz verschiedener EpCAM Primer b).

Die ermittelten Daten von scid und scid select Tumoren sind im Balkendiagramm als Mittelwert mit SEM dargestellt. Die Abkürzung PT steht für Primärtumor (p-Wert * und ** < 0,05). Die EpCAM Expressionshöhe hängt hierbei vom eingesetzten Kalibratorotyp ab. Bei den Hydrolysesonden (UPL) wurde die cDNA der DU4475 Zelllinie eingesetzt und bei der SYBR Green PCR wurde stets das Produkt der semi nested PCR verwendet.

3.5 Proteinanalyse

Zur Untermauerung der mRNA Expressionsdaten von Primärtumor und Lunge der verschiedenen Mausgruppen wurde zusätzlich die Proteinexpression mittels Westernblot untersucht.

Eine Proteinanalyse des Mucin1 und des EpCAM Membranproteins wurde mit der Westernblot Methode etabliert, um die Proteinexpression der Tumorzellen im Vergleich zu kommerziell erworbenem Protein darzustellen. Dazu erfolgten die Herstellung von Ganzzellextrakten und die Membranpräparation der Tumorzellen mittels Ultrazentrifuge. Für die Austestung der Antikörper und isolierten Proteine wurde als Vorversuch das Dotblot Verfahren angewendet. Dazu wurde das isolierte Protein in verschiedenen Verdünnungen und auch unverdünnt unter Antikörpereinsatz untersucht. Die Ganzzellextrakte aus Primärtumor und Lungengewebe zweier pfp/rag2 Mäuse sind in der folgenden Abbildung als Dotblot dargestellt.

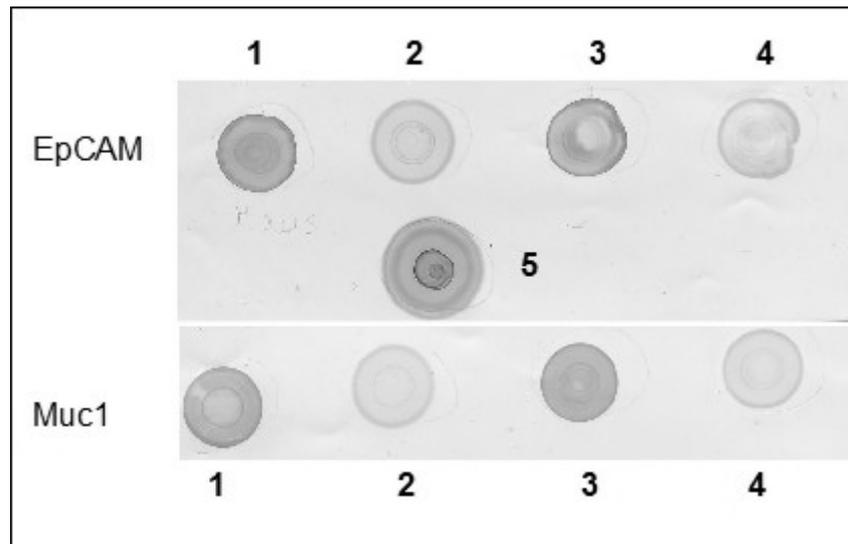


Abbildung 3.32: Dotblot Untersuchung an verschiedenen Proteinextrakten für die Antikörper EpCAM und Muc1.

Die Proteine aus Primärtumor (Probe 1, 3) sowie aus Lungengewebe (Probe 2, 4) waren unverdünnt aufgetragen. Die Antikörperverdünnungen für EpCAM war hierbei 1 zu 1000 und für Muc1 1 zu 50. Als Positivkontrolle diente reines Mausserum (Probe 5).

Bei beiden Tieren waren die Proteine nach immunhistologischer Färbung positiv auf humanes EpCAM und Mucin1. Sogar das Lungengewebe der mit Spontanmetastasen befallenen Tiere war deutlich angefärbt.

Beim Beladen des SDS-Polyacrylamidgels wurde pro Probe 40 µg eingesetzt, um ein einheitliches Konzentrationsverhältnis zu erhalten. Das EpCAM Protein besitzt eine Größe von 40 kD. Als Referenzgen wurde zusätzlich ACTB (42 kD) mit aufgetragen und angefärbt.

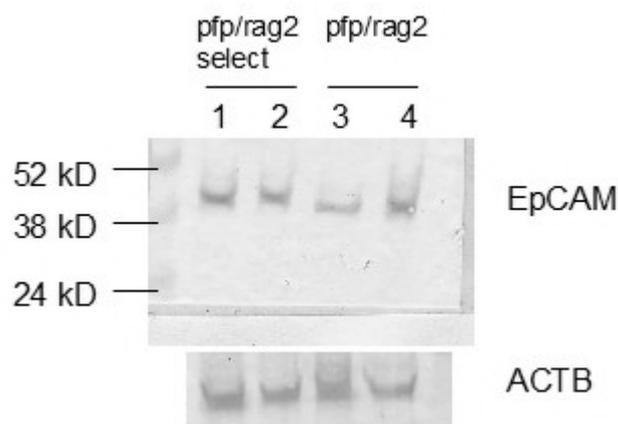


Abbildung 3.33: Expression der EpCAM Proteine in Primärtumoren von pfp/rag2 und pfp/rag2 select Tieren.

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit humanspezifischen Antikörpern detektiert. Die Antikörperverdünnungen für EpCAM war hierbei 1 zu 1000 und für ACTB 1 zu 1500.

Die Expressionsstärke der EpCAM Proteine der untersuchten Primärtumore blieb bei den pfp/rag2 select Mäusen im Vergleich zu den pfp/rag2 Wildtyp-Tieren gleich.

3.6 Einwanderung von Makrophagen ins Tumorgewebe

Mit dem Antikörper gegen das murine F4/80 Epitop ergab sich eine stärkere Färbung im scid select Tumorgewebe.

Es zeigte sich bei allen Tumoren eine vermehrte Ansammlung von Makrophagen im tumorumgebenen Bindegewebe der Maus. Aber auch innerhalb des Primärtumors fanden sich eingewanderte murine Immunzellen. Zur besseren Unterscheidung der Makrophagenanzahl in den Primärtumoren von scid und scid select Tieren wurden die mit F4/80 gefärbten Immunzellen innerhalb der Gesamtfläche eines Tumorschnittes ausgezählt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.5 aufgelistet:

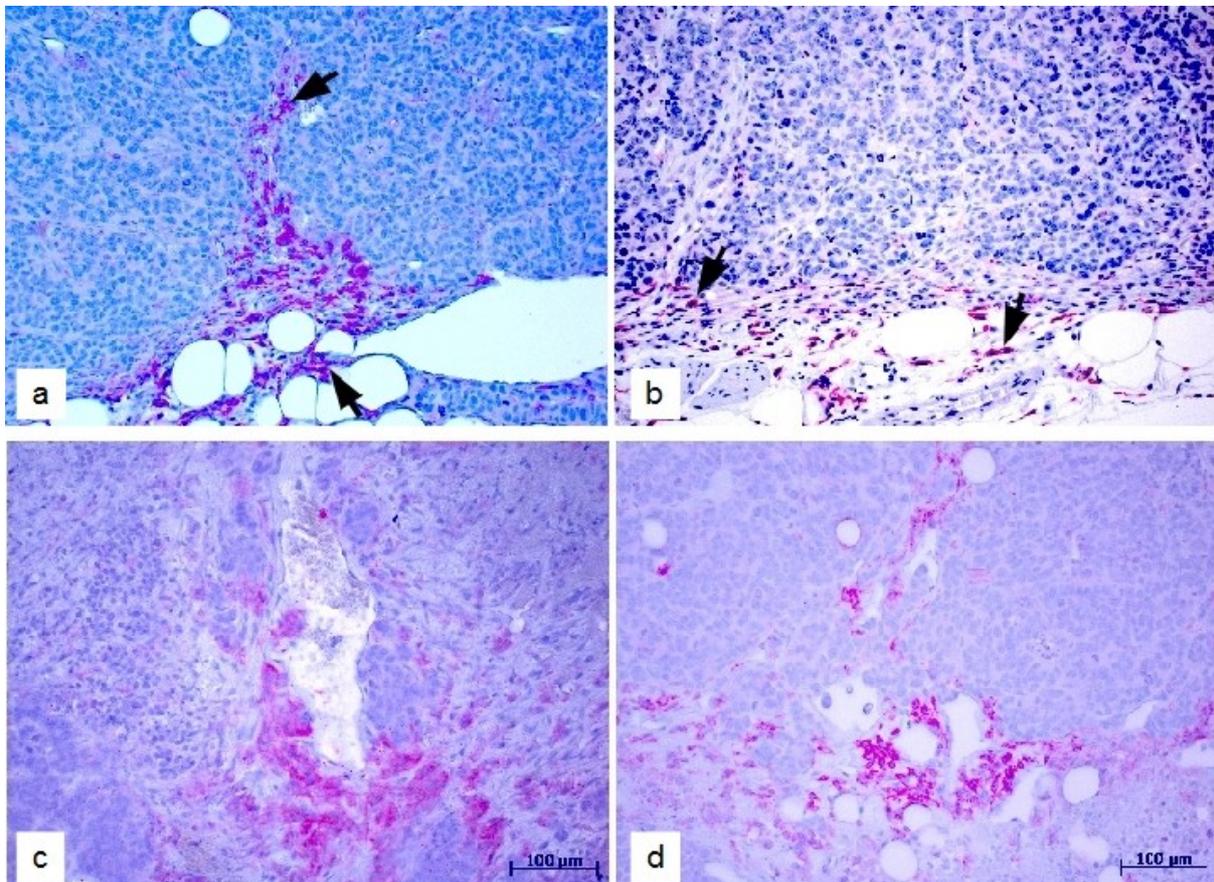


Abbildung 3.34: F4/80 Färbung auf murine Makrophagen in scid select gewachsenen Tumoren.

Die einzelnen Pfeile weisen auf vereinzelt vorliegende Makrophagen im tumorumgebenden Bindegewebsseptum (a, b) hin. Im Tumor selbst waren Makrophagen in der Nähe von Blutgefäßen zu finden (c, d).

Der gesamte Objektträger mit Tumorgewebe wurde auf F4/80 positiv angefarbte Makrophagen untersucht und ausgezählt.

	scid Tumor [g]	Makrophagenanzahl	Makrophagen pro 1 g	scid select Tumor [g]	Makrophagenanzahl	Makrophagen pro 1 g
MW	1,71	543	344,96	2,21	701	333,83
Median	1,70	608	247,04	2,41	594	293,94
SD	0,67	403	251,56	0,94	472	210,17

Tabelle 3.5: Rekrutierung von Makrophagen im Primärtumor.

Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen der Makrophageneinwanderung bei scid und scid select vor.

Zusätzlich wurden die Tumore mit dem Lektin GSA-I angefärbt. Mit der Lektinfärbung konnte diese Makrophagenaktivität zusätzlich dargestellt werden. Dieses Lektin bindet spezifisch an α -Galactose und besitzt eine selektive Makrophagenaffinität bei Maus und Ratte [Laitinen 1987; Honda *et al.*, 1998].

Mit dem GSA-I Lektin war im Bereich des murinen Bindegewebes eine positive Färbung zu finden. Innerhalb der Nekrose lag eine unspezifische Anfärbung des Lektins vor, da sich nekrotische Areale mit dem F4/80 Antikörper nicht gefärbt haben.

3.7 Vergleich der Metastasierungseigenschaften der selektindefizienten gegenüber den selektinkompetenten Mäusen

Die Anzahl der Spontanmetastasen in der Lunge war bei den selektindefizienten Tieren signifikant reduziert gegenüber den selektinkompetenten Tieren. Um die Morphologie der Metastasen innerhalb der Lunge zu charakterisieren wurden die Schnitte mit H. E. angefärbt und mikroskopiert.

Die Spontanmetastasen fanden sich in verschiedenen Arealen der Lunge wieder. Einerseits war eine Einnistung in die Alveolen des Lungenparenchym zu erkennen (Abb. 3.35 b, c, e, f). Andererseits befand sich ein Teil dieser Zellen noch direkt im Ast der A. pulmonalis (Abb. 3.35 a). Zwischen den scid und pfp/rag2 Tieren zeigte sich kein morphologischer Unterschied der Metastasen, ausgenommen die erhöhte Anzahl an Lungenmetastasen bei der pfp/rag2 Mauslinie (Kapitel 3.3.3.5).

In dem Fall einer pfp/rag2 select Maus befanden sich mehrere Mikrometastasen unterschiedlicher Größe im Lungenparenchym (Abb. 3.35 c), aber auch intraarterielle Metastasen (Abb. 3.35 d). Das Stadium des Austritts aus dem Endothel ist hierbei erkennbar.

Die Metastasen der Lunge sind bei allen Tieren in der Regel Mikrometastasen, d. h. sie übersteigen eine Anzahl von über 40 Zellen innerhalb einer Metastase nicht. Da die DU4475 Tumorzellen aber auch die Eigenschaft besitzen als Einzelzellmetastasen in sekundären Organen aufzutreten, war es unerlässlich einen

humanen Marker zur Suche der Lungenmetastasen zur Hilfe zu nehmen. Dafür wurde der anti mitochondriale Antikörper verwendet. Selbst in den selektindefizienten Tieren konnten Einzelzellmetastasen in der Lunge entdeckt werden, die sich im Lungenparenchym eingenistet hatten (Abb. 3.35 e, f).

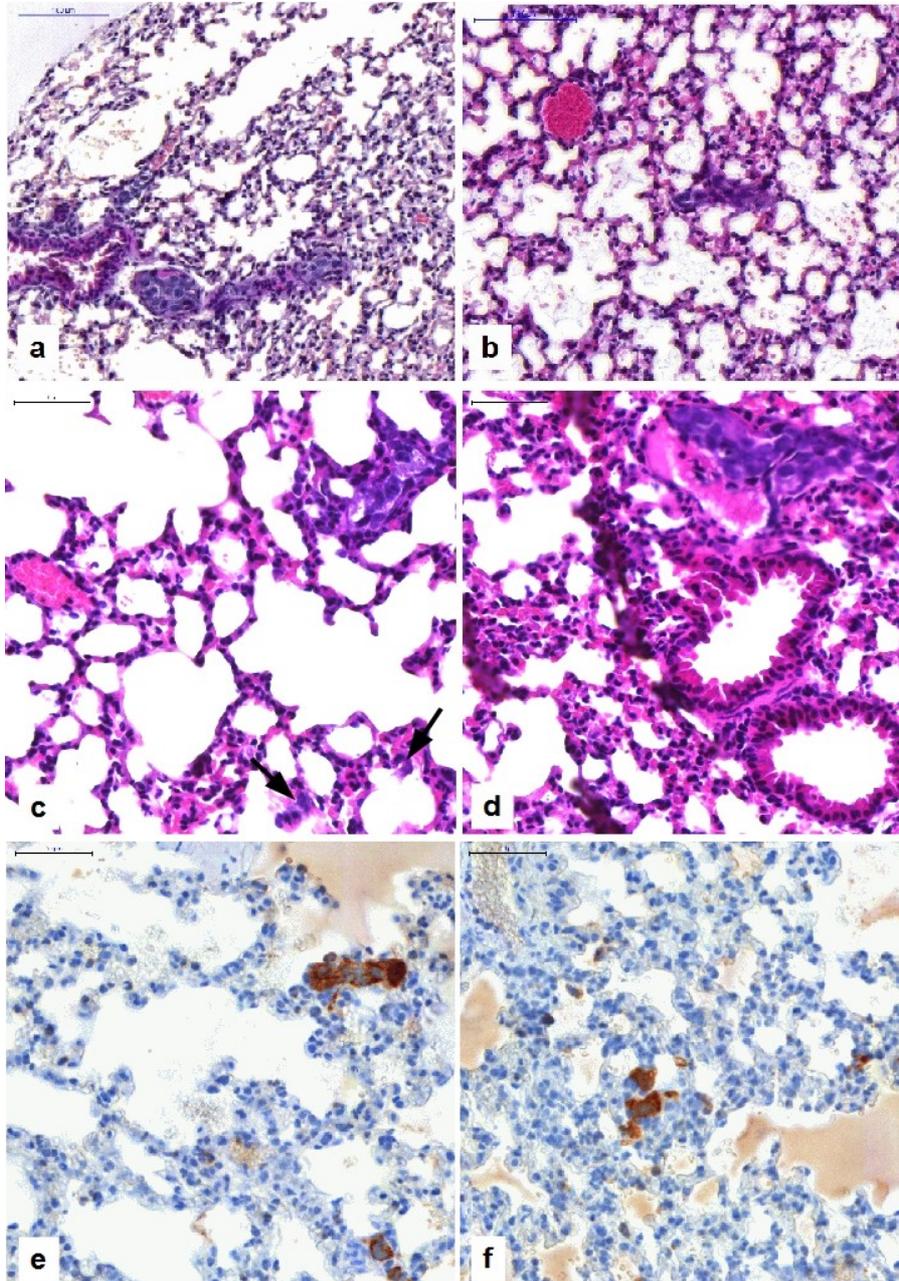


Abbildung 3.35: Histologische Darstellung der Spontanmetastasen im Lungengewebe.

In den H. E. Färbungen ist die Lunge einer scid Maus mit ausgebrochener intraarterieller Lungenmetastase a) und eine Metastase im Lungenparenchym der scid select Maus b) erkennbar (200fache Vergrößerung). Die H. E. Färbungen einer pfp/rag2 select Lunge zeigten Mikro- sowie Einzelzellmetastasen (siehe Pfeile) c) und intraarterielle Lungenmetastasen d) in 400facher Vergrößerung. Durch den anti mitochondrialen Antikörper gegen humane Zellen in einer pfp/rag2 select Mauslunge (e, f) wurden Mikro- und Einzelzellmetastasen braun angefärbt (400fach vergrößert).

Die Einnistung der Spontanmetastasen erfolgte in den bindegewebigen Septen der Lunge. Zusätzlich fanden sich Metastasen innerhalb der Pulmonalarterie und ihren Ästen. Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung von Pulmonalarterien, die parallel mit den Bronchien verlaufen, der Pulmonalvenen, die in den Septen verlaufen, war die Zuordnung zu den Pulmonalarterienästen eindeutig. Um auszuschließen, dass ein Befall der Lymphgefäße vorliegt, wurde eine Färbung mit dem Lymphendothelmarker LYVE-1 durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass die Tumorzellen nicht in Lymphgefäße eingedrungen waren. Die Endothelzellen umgeben nicht die Metastasen, was eine Verbreitung der DU4475 Zellen durch das Lymphgefäßsystem ausschließt.

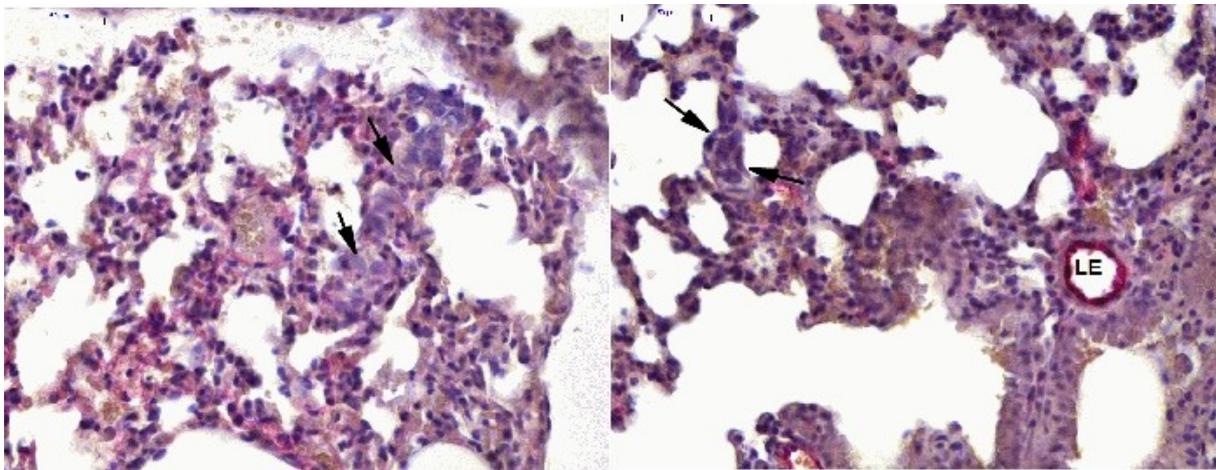


Abbildung 3.36: Lymphatisches Endothel (LE) der Maus gefärbt mit anti LYVE-1 an Lungengewebe, befallen mit Spontanmetastasen (siehe Pfeile) in 400facher Vergrößerung.

3.8 Untersuchung der Expressionsmarker am Gewebe der Maus

Die histologische Untersuchung des Mausgewebes bzw. der entwickelten Primärtumore und der Spontanmetastasen in der Maus wurde auf Grund der erstellten Expressionsdaten (mRNA und Protein) und der FACS Ergebnisse mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Zusätzlich dienten Gewebeschnitte von HT29 Primärtumoren und Lungengewebe mit Spontanmetastasen als positives Kontrollgewebe.

Die Tumorzelllinie DU4475 besaß durchgängig kein CD44 auf der Zellmembran der Primärtumore und Metastasen des Lungengewebes im Unterschied zu den HT29 Zellen des Primärtumors und deren Lungenmetastasen, die als positive Kontrollen dienten. Bei den HT29 Primärtumoren wurden häufig Siegelringzellen angefärbt, da dort viele Mucine oder mucinähnliche Kohlenhydratstrukturen innerhalb der Zellen vorliegen [Schumacher *et al.*, 1994]. Die HT29 Spontanmetastasen waren dagegen

eindeutig CD44 positiv.

In den DU4475 Primärtumoren aller Tiergruppen zeigten sich vereinzelt Ca19.9 und CD15s Oligosaccharide. In den entsprechenden Lungenmetastasen konnten aber keine der Kohlenhydratstrukturen dargestellt werden. Besonders auffällig waren die CD15s positiven Areale bei den Primärtumorgewebeschnitten. Hauptsächlich in den randständigen Invasionszonen des Tumors kamen die Selektinliganden vor.

Selbst Einzelzellmetastasen sind vereinzelt mit den Antikörpern gegen EpCAM (Moc31), Mucin1, Panzytokeratin und ICAM1 sowie mit dem HPA Lektin angefärbt worden. Auch im Knochenmark befanden sich disseminierte Tumorzellen, die Moc31, Muc1, PanCK und HPA positiv sind. Sogar einige Einzelzellen exprimierten diese Tumormarker auf der Oberfläche der DU4475 Metastasen. In der Abbildung 3.38 sind die Metastasen in Lungengewebe und Knochenmark mittels der Antikörper zur Darstellung der Mucin1, EpCAM, Panzytokeratin und durch die HPA Lektinfärbung dargestellt.

	Zellen in Agar *	Primärtumor *	Lungenmetastasen *	DTC's*
anti Mucin1	++	++	+ bis ++	++
anti ICAM1	++	++	+ bis ++	#
anti L1CAM	-	-	-	-
anti Moc31	+++	+	+ bis ++	++
anti CD44	-	-	-	-
anti CD15s	++	+ randständig	-	-
anti PSGL1	++ endogen Golgi/ER lokalisiert	+ endogen Golgi/ER lokalisiert	#	#
anti Ca19.9	+	+ nur einzelne Zellen	-	-
anti Vimentin	-	-	-	-
anti PanCK	+++	+++	+	++
anti CK18	++	+++	++	++

Tabelle 3.6: Allgemeine immunhistologische Färbungen für DU4475. (DTC = disseminierte Tumorzellen im Knochenmark; ER = Endoplasmatisches Retikulum; * nicht markiert (-); schwach markiert (+); mittel markiert (++); stark markiert (+++); # nicht ausgewertet)

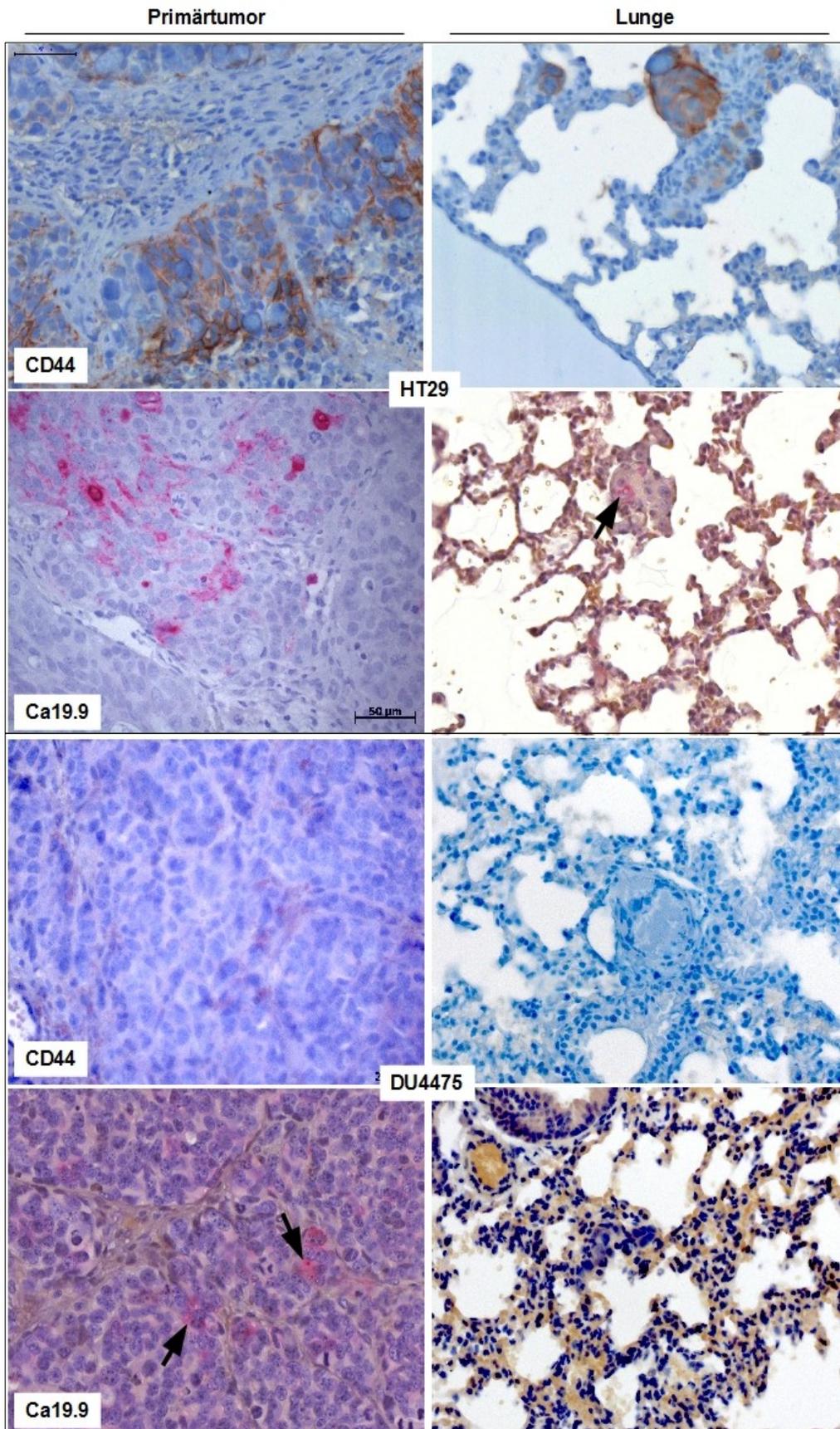


Abbildung 3.37: Untersuchung der Tumormarker Ca19.9 und CD44 an Primärtumoren der Zelllinien HT29 und DU4475 und die gebildeten Spontanmetastasen in der Lunge (400fache Vergrößerung).

HT29 Tumore und davon gebildete Lungenmetastasen wurden als Kontrollgewebe mit untersucht und zeigten positiv gefärbte Areale im Gegensatz zum DU4475 Primärtumor und deren Metastasen. Die Pfeile verweisen auf vereinzelt Ca19.9 positiv gefärbte Zellen im DU4475 Primärtumor.

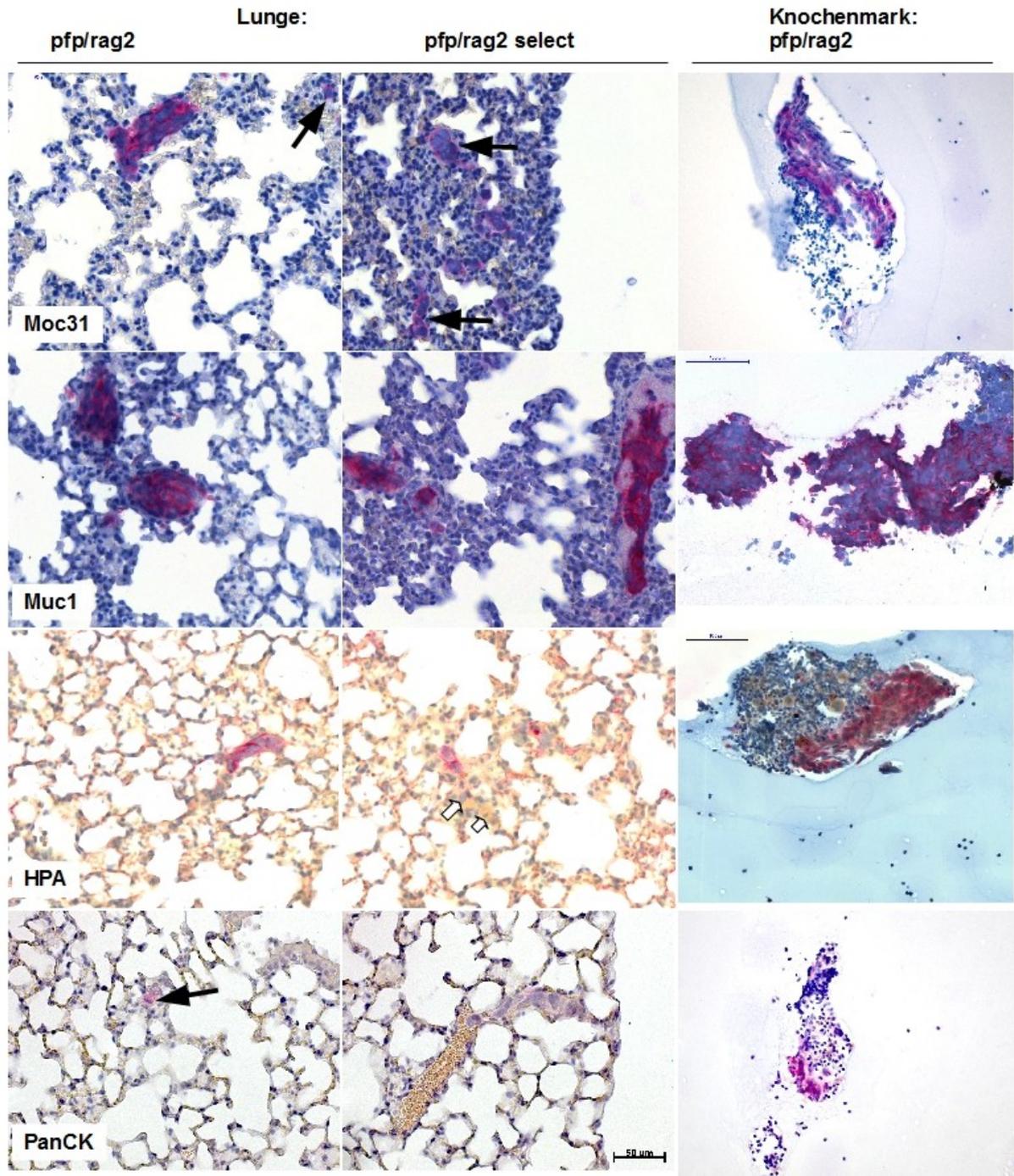


Abbildung 3.38: Untersuchung verschiedener Tumormarker an Lungen- und Knochenmarks-metastasen.

Das Lungengewebe ist mit 400facher Vergrößerung aufgenommen, das Knochenmark mit 200facher Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile deuten auf positiv gefärbte Einzelzellmetastasen hin und die weißen Pfeile kennzeichnen nicht gefärbte Metastasen. Zur Darstellung der EpCAM Moleküle wurde der Moc31 Antikörper verwendet.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die metastatische Mammakarzinomzelllinie DU4475 auf Transkriptomebene und Proteomebene charakterisiert. Dazu wurden zellbiologische und molekularbiologische Methoden verwendet, um die metastasierenden Tumorzellen unter Zellkulturbedingung und in klinisch relevanten Modellsystemen auf Oberflächenmarker zu untersuchen, die am Metastasierungsgeschehen beteiligt sein könnten. Zusätzlich wurde der Einfluss der Selektindefizienz auf das Tumorwachstum und die Tumormetastasierung in immundefizienten *scid* und *pfp/rag2* Mäusen analysiert. Dazu wurde die Zelllinie DU4475 subkutan zwischen die Schulterblätter der Mäuse injiziert, um das Tumorwachstum und die Spontanmetastasierung zu untersuchen. Dieses Projekt stützt sich auf die tierexperimentellen Daten mit der Kolonkarzinomzelllinie HT29. Die xenotransplantierten *scid select* Mäuse wiesen im Vergleich zu *scid* Tieren eine Reduzierung der Spontanmetastasierung um 84 % auf [Köhler *et al.*, 2010]. Durch den Verlust von E- und P-Selektin wurden die im Blut zirkulierenden HT29 Tumorzellen an der Extravasation ins Gewebe gehindert.

4.1 Charakterisierung der DU4475 Tumorzelllinie auf Selektinliganden und Tumormarkern

Für die Untersuchung des Metastasierungsgeschehens in selektindefizienten Mäusen sollte nur eine Zelllinie verwendet werden, die die entsprechenden Selektinliganden bzw. die Selektinbindungsstellen auf der Zelloberfläche besitzt. Eine entsprechende Charakterisierung der Mammakarzinomzelllinien war daher vor Beginn des Tierversuches notwendig.

Bei den untersuchten Mammakarzinomzelllinien MCF7 und DU4475 zeigt nur DU4475 Selektinbindungsstellen, durch eine Bindung mit der murinen E-Selektin Fc-Chimäre (Kapitel 3.1.2). Das PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) Glykoprotein auf der Zelloberfläche von DU4475 geht möglicherweise eine Bindung mit murinem E-Selektin ein.

PSGL1, auch bekannt unter CD162 oder SELPLG, gehört zur Gruppe der mucinähnlichen Moleküle und wird auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert. Dieses Molekül besitzt eine Ligandenaktivität für die Selektine. Die sulfatierten Tyrosine, aber auch die Tetrasaccharide sialyl Lewis x an den O-Glykanen, sind mögliche Liganden für eine hochaffine Bindung mit P-Selektin [Epperson *et al.*,

2000]. Dieses Molekül spielt eine wichtige Rolle beim *Tethering* der Leukozyten an aktivierten Thrombozyten oder Endothelzellen, die P-Selektin exprimieren. Dieses Glykoprotein ist *in vivo* der stärkste Ligand für das P-Selektin [Yang *et al.*, 1999] und bindet mit einer Affinität von $K_d = 300$ nM an das P-Selektin [Croce *et al.*, 1998]. PSGL1 hat aber auch Bindungsaffinität zu allen 3 Selektinen. Das Vorliegen der Oligosaccharide sialyl Lewis a und x (Ca19.9 und CD15s) ist ein Kennzeichen für eine Bindungsaffinität von Tumorzellen zu Lektinen einschließlich der Selektine.

Als geeignete Zelllinie erwies sich für die Untersuchung der Spontanmetastasierung in den selektinkompetenten und -defizienten Tiermodellen somit nur DU4475. Die Tumorzelllinie besitzt potentielle Bindungsstellen mit dem Selektin, zum einen durch das Vorhandensein von den Selektinliganden Ca19.9, CD15s, den Glykoproteinen CD24, CD44, CD43, PSGL1 und zum anderen durch die vorliegenden Selektinbindungsstellen für murines E-Selektin (Kapitel 3.1.2). Ein zusätzliches Auswahlkriterium war die starke Metastasierungsfähigkeit dieser HPA (+++) positiven Zelllinie DU4475. Valentiner *et al.* untersuchten 2005 verschiedene HPA positive Mammakarzinomzelllinien im scid Modell. Als die am stärksten metastasierende Ziellinie erwies sich DU4475 mit 86 % (6 von 7), bei einem Tumorwachstum von nur 20 bis 33 Tagen mit 100 % Anwachsrate der Tumorzellen. Die nicht invasiv wachsende Zelllinie MCF7 metastasierte nur in 33 % der Fälle mit einer Anwachsrate von 30 % (3 von 10).

4.2 Tumorgröße bei den verschiedenen Mausmodellen

Eine signifikant erhöhte Gewichtszunahme der Primärtumore ist nur bei scid select Mäusen im Vergleich zum Wildtyp scid erkennbar. Gegenüber den Kontrolltieren pfp/rag2 zeigt sich ein geringer Gewichtsanstieg der Primärtumore bei den einzel- bzw. doppeltselktindefizienten pfp/rag2 Tieren. Der Zeitfaktor für das Tumorwachstum spielt im Rahmen dieses Experimentes dabei keine Rolle.

Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen der Hynes Arbeitsgruppe [Taverna *et al.*, 2004]. Die humanen Tumorzellen (Kolonkarzinomzelllinie LS180, Melanomzelllinie A375 SM) wurden in rag2 und in einzel- sowie trippelselektindefiziente rag2 Mäuse ($E^{-/-}$, $P^{-/-}$, $L^{-/-}$) subkutan injiziert. Die Tumorgröße der selektindefizienten Tiere war signifikant erhöht gegenüber den Wildtypen.

4.3 Rekrutierung von murinen Makrophagen im Tumor

Das Tumorgewicht der scid select Tiere war signifikant erhöht im Vergleich zur scid Wildtypgruppe (Kapitel 3.3.3.3). Dies könnte durch die fehlenden Selektinliganden zustande kommen, die ein Auswandern von Tumorzellen verhindern. Ein weiterer Grund dafür hätte das gehinderte Auswandern von Makrophagen bei selektindefizienten Mäusen sein können. Diese Annahme wurde im späteren Verlauf durch immunhistologische Untersuchungen des Tumorgewebes allerdings widerlegt. Nach statistischer Auswertung der Daten zeigte sich kein Unterschied in der Einwanderung von Makrophagen bei scid und scid select. Ein Beispiel für die Selektinabhängigkeit bei der Rekrutierung von Makrophagen zum Primärtumor zeigte wiederum die Hynes Arbeitsgruppe [Taverna *et al.*, 2004]. Als Folge der Selektindefizienz wuchs der Tumor ungehemmt weiter. Bei den trippelselektindefizienten rag2 Tieren trat eine Reduzierung an eingewanderten Makrophagen im Primärtumor gegenüber den rag2 Wildtyptieren auf.

4.4 Metastasierungsanalyse durch *in vivo* Tiermodelle

Durch das Induzieren eines humanen Primärtumors mittels subkutaner Injektion der Maus kann gezielt mit humanspezifischen Markern der Mechanismus der Tumorentstehung und der Metastasierung untersucht werden. Der Prozess der Metastasierung erfolgt hierbei eigenständig durch das Ablösen von Tumorzellen vom Primärtumor und wird daher als Spontanmetastasierung bezeichnet. Dagegen können die humanen Tumorzellen, die durch eine i. v. Injektion direkt in das Blutsystem gegeben werden, nicht als wirkliche Metastasen betrachtet werden. Dieser Vorgang sollte korrekterweise als Dissemination der Tumorzellen bezeichnet werden.

Bei dem angewendeten Xenograft-Mausmodell handelt sich um ein klinisch relevantes Modellsystem, das dem Metastasierungsgeschehen beim Menschen entspricht [Leathem und Brooks 1987, Schumacher und Adam 1997, Valentiner *et al.*, 2005]. Das kohlenhydratbindende Lektin HPA nimmt daher als Metastasierungsmarker eine besondere Rolle ein. Entsprechend dem klinischen Bild metastasieren im Tiermodell nur Tumorzellen, die als HPA positiv getestet wurden. Bei einer tumortragenden Maus metastasieren die Tumorzellen dabei immer in die Lunge, wodurch eine Überprüfung des Metastasierungs Vorgangs vereinfacht durchführbar ist. Dies entspricht auch dem typischen Metastasierungs Weg bei den Mammakarzinom Patientinnen [Weigelt *et al.*, 2005; Minn *et al.*, 2005].

4.5 Metastasierungsrate der DU4475 Tumorzelllinie

Bei den tumortragenden Wildtyptieren scid und pfp/rag2 waren in 100 % der Fälle Metastasen in der Lunge auffindbar. Sowohl bei den selektineinzeldefizienten pfp/rag2 Tieren als auch bei den selektindoppeltdefizienten pfp/rag2 bzw. scid Tieren zeigten sich bei 91 % spontane Lungenmetastasen. Eine signifikant erhöhte Anzahl an Lungenmetastasen wiesen dabei die pfp/rag2 Mäuse gegenüber den scid Tieren auf. In der folgenden Tabelle ist die Metastasenanzahl der Tiere aufgelistet:

Lungenmetastasen	scid n = 9	scid select n = 10	pfp/rag2 n = 21	pfp/rag2 select n = 24
Mittelwert	1382	845	3873	5451
Median	739	637	3348	1440

Tabelle 4.1: Metastasierungsrate bei den Mauslinien scid, scid select sowie pfp/rag2 und pfp/rag2 select

Die Anzahl an gebildeten Lungenmetastasen ist bei den Tieren aber auch abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Vitalität der gespritzten Tumorzellen und die Größe der gebildeten Primärtumoren. Beispielsweise ergab sich bei der Untersuchung des ersten Ansatzes von tumortragenden pfp/rag2 Mäusen eine geringere Metastasierungsrate als im Vorversuch (Kapitel 3.3.3.5). Die Gesamtanzahl der Tiere war in beiden Tierversuchen gleich (n = 6).

4.6 Morphologie und Vorkommen der DU4475 Tumorzellen als Metastasen

Die gebildeten Spontanmetastasen der DU4475 Tumorzellen fanden sich in verschiedenen Arealen der Lunge wieder. Einerseits war eine Einnistung in die Alveolarsepten zu erkennen. Andererseits befand sich ein Teil dieser Zellen noch direkt im Ast der Pulmonalarterie. Zwischen den scid und pfp/rag2 Tieren zeigte sich kein morphologischer Unterschied der Metastasen.

Entgegen der Annahme des Metastasierungsrückgangs bzw. gehinderter Diapedese bei Selektindefizienz, zeigten sich bei dem Verlust von E- und/oder P-Selektin auch Mikrometastasen ausgewandert im Lungenstroma, aber auch intravasale Metastasen waren zu sehen. Sogar das Stadium des Austritts aus dem Endothel, die sogenannte Extravasation, konnte in den H. E. Färbungen dargestellt werden. Damit erfolgt auch bei Verlust von E- und P-Selektin auf dem Mausendothel die Extravasation von DU4475 Metastasen in die Lunge. Der lymphatische Metastasierungsweg wird in diesen Xenograft-Mausmodellen für DU4475 Tumorzellen nicht eingeschlagen. Die hämatogene Metastasierung ist dagegen deutlich erkennbar.

4.7 Problematik der Mikrometastasen und Metastasen auf Einzelzellebene

Da bei dem DU4475 Primärtumor nach der Spontanmetastasierung Einzelzellmetastasen und Mikrometastasen von maximal 40 Zellen in der Lunge entstanden sind, wie Vorstudien bereits zeigten [Valentiner *et al.*, 2005], war es unmöglich diese in den MRT Aufnahmen zu finden (Kapitel 3.3.2). Weitere Metastasen in Organen wie der Leber und dem Gehirn, die beim Mammakarzinom typisch sind, konnten mit den gängigen Methoden nicht nachgewiesen werden.

Gerade die Behandlung von diesen Einzelzellen, die scheinbar noch nicht zur Proliferation neigen, ist besonders bedeutsam für Therapiezwecke. Beispielsweise können zirkulierende Tumorzellen im Blut mit Antikörper gerichtet gegen die maligne Zelle, wie mit Herzeptin [Nielsen *et al.*, 2009], abgefangen und zerstört werden, bevor sie in Organe eindringen und diese zerstören. Um diesem Ziel näher zu kommen, war es wichtig eine Oberflächencharakterisierung der Metastasen in Lunge, Knochenmark und Blut der Tiere durchzuführen.

Die Untersuchung metastasierender Tumorzellen wird durch das Xenograft-Mausmodellssystem ermöglicht, da es sich um maligne Zellen humanen Ursprungs handelt. Aus diesem Grund gelingt es auch vereinzelt Tumorzellen im Bereich der unteren Detektionsgrenze aufzufinden, da mit humanen Markern gearbeitet werden kann. Beispielsweise kann somit die zirkulierende Anzahl an Tumorzellen im Blut, mittels sensitiver Alu PCR, Kapitel 3.3.4, genau bestimmt werden [Batzer und Deininger 2002; Nehmann *et al.*, 2010].

Doch nicht alle Einzelzellen der DU4475 Tumorzelllinie sind ohne geeignete immunhistologische Markierung im Lungengewebe der Maus zu finden. Deshalb mussten zusätzlich Marker gefunden werden, die durch eine spezifische Markierung das Auffinden möglich machen. Hierbei eignete sich besonders gut der humanspezifische anti mitochondriale Antikörper (Kapitel 3.7).

4.8 Metastasierung in selektinkompetenten und -defizienten Tieren

Bei Verlust von E- und P-Selektin findet in den scid und pfp/rag2 Linien die Extravasation der zirkulierenden Metastasen vermindert statt. Die Spontanmetastasierung ist innerhalb der Lungen bei den E- und P-selektindefizienten scid und pfp/rag2 Mäusen statistisch hochsignifikant gegenüber den Wildtyptieren reduziert (Kapitel 3.3.3.5). Repräsentativ für die pfp/rag2 Mauslinie war hierbei der 1. Ansatz mit vergleichbaren Tierzahlen wie bei den scid Mauslinien,

da das Metastasierungspotential stark abhängig von dem Versuchsansatz war. Für das Metastasierungs-geschehen innerhalb der Lunge ist das E- und P-Selektin auf den Endothelzellen der Maus nicht allein entscheidend. Weitere Oberflächenstrukturen des Endothels bewirken die Extravasation der Spontanmetastasen ins Lungengewebe.

Die Frage stellt sich nun, welche weiteren Moleküle sind bei der Metastasierung der Tumorzelllinie DU4475 bei der Extravasation ins Gewebe beteiligt und welche Interaktionspartner dabei eine funktionelle Rolle spielen. Zu den im Endothel weiterhin befindlichen Zelladhäsionsmolekülen zählen weitere Lektine, Immunglobuline und Integrine. Als entsprechende Bindungspartner sind die sogenannten Krebsrezeptoren beschrieben worden [Orr *et al.*, 2000; Miles *et al.*, 2008]. Potenzielle Interaktionspartner sind im folgenden aufgelistet.

Galektin 3:

Als endotheliales Oberflächenmolekül ist das Galektin 3, das zur Lektinfamilie gehörige Glykoprotein, funktionell wichtig für die Extravasation. Als Liganden werden die Glykoproteine TF (Thomsen-Friedenreich)-Antigen und Mucin 1 beschrieben [Strell und Entschladen 2008; Zhao *et al.*, 2009].

Immunglobulinsuperfamilie:

Zu den Mitgliedern der Immunglobulinsuperfamilie gehören CEACAM, L1CAM, VCAM, MadCAM und ICAM. Der einzige in Frage kommende Interaktionspartner ist das Mucin1 für das ICAM Molekül, welches auf dem DU4475 Primärtumor und den Metastasen stark exprimiert vorliegt. Das Mucin1 der MCF7 Mammakarzinomzelllinie interagiert beispielsweise mit dem ICAM Molekül der Endothelzellen. Gezeigt wurde diese Beobachtung bei Interleukin-1 β und TNF- α stimulierten HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) Zellen [Rahn *et al.*, 2005]. Mucin1 wurde schon 1996 als potentielles Target bei der Kolonisation von metastasierenden Tumorzellen beim Kontakt mit ICAM1 identifiziert [Regimbald *et al.*, 1996].

Die Zelladhäsionsmoleküle CD44 und Integrin α 4 als Liganden für VCAM und ICAM sind nicht bzw. zu schwach exprimiert, um eine Metastasierung von DU4475 zu bewirken. Die CD44 Proteinexpression scheint daher nicht das Kriterium der Extravasation des Mammakarzinoms zu sein. Auch ohne CD44 Glykoproteine kann DU4475 ins Lungengewebe auswandern. Dagegen ist bei HT29 Tumorzellen das

CD44 Molekül auf der Zellmembran des Primärtumors vorliegend, aber heterogen verteilt im Gewebe. Dieser Befund wurde schon 1997 bei den xenotransplantierten scid Tieren aufgezeigt [Mitchell *et al.*]. Bis zur Einnistung der abgelösten Metastasen bleibt das CD44 Molekül an der Oberfläche erhalten.

Integrine:

Bei den Integrinen des Endothels sind beispielsweise VCAM und CD44 Interaktionspartner von Integrin $\alpha 4\beta 1$. Beide Oberflächenmoleküle spielen bei DU4475 Tumorzellen keine Rolle, da diese Proteine nicht exprimiert vorliegen.

Es zeigt sich bei den selektindefizienten und -kompetenten Mauslinien scid und pfp/rag2 keine Korrelation zwischen dem metastatischen Potential der DU4475 Zellen und dem Tumorgewicht. Diese erhobenen Daten der Arbeit stimmen hinsichtlich der scid Mäuse mit den bereits beschriebenen Ergebnissen dieser Mauslinie überein [Valentiner *et al.*, 2005]. Beispielsweise bewirkt schon ein Tumor mit dem Gewicht von 0,9 g eine enorme Metastasierung in der Lunge einer scid Maus. Im Bezug zum Anstieg des Tumorgewichts über 2 g bleibt die Metastasierung innerhalb der Wildtypgruppen ungefähr auf einem Niveau. Bei den selektindefizienten scid und pfp/rag2 Tieren ist die Metastasierung bei einer Tumorengröße unter 2 g deutlich reduziert im Gegensatz zur Metastasierung bei den Wildtypen. Bei Verlust von E- und P-Selektin steigt bei einem Tumor über 2 g, entgegen der geringeren Metastasierung bei den Wildtyptieren, die Metastasierung drastisch an. Eine signifikant erhöhte Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen im Blut der selektindefizienten Tiere konnte dagegen nicht festgestellt werden. Gegenüber den pfp/rag2 Tieren ist die Anzahl nur geringfügig angestiegen.

Nun ist aber die Metastasierung gerade in den selektindefizienten Tieren stark erhöht, wenn der Tumor über 2 g ansteigt. Ein Anstieg wäre bei den Tieren mit funktionellen Selektinmolekülen erklärbar. Die Tatsache, dass ein gezielter Knock-out von E- und P-Selektin zu einer Kompensation durch das L-Selektin bzw. selektinähnlichen Molekülen führen kann, könnte eine mögliche Erklärung sein [Spicer *et al.*, 1995]. L-Selektin hat einen entscheidenden Einfluss auf die Streuung von Metastasen in periphere Organe [Borsig *et al.*, 2002]. Eine L-Selektin Expression direkt auf den Tumorzellen war dagegen mit dem PCR Array nicht nachzuweisen (Kapitel 3.1.1). Die immundefizienten pfp/rag2 Mäuse besitzen keine reifen B-, T- und

perforinproduzierenden NK-Zellen. Dennoch sind andere L-Selektin exprimierende Zellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten sowie ein Teilbereich anderer NK-Zellen) bei der Ausbreitung der Metastasen ebenfalls beteiligt. Bei den immundefizienten *rag2^{-/-}* Tieren mit eingekreuztem L-Selektin Knock-out zeigte sich nach i. v. Injektion von der Kolonkarzinomzelllinie LS180 eine signifikante Reduktion der Lungenmetastasen vergleichend mit den Wildtyp *rag2^{-/-}* Tieren [Borsig *et al.*, 2002]. Tumorzellen besitzen zudem die Möglichkeit sich an die zirkulierenden Leukozyten zu binden, um so eine Bindung ans Endothel einzuleiten. Solch eine Bindung kann über ICAM1 Glykoproteine an das Integrin LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) des Leukozyten entstehen [Strell und Entschladen 2008]. Dieser bindet wiederum über LFA-1 an das ICAM der Endothelzellen. Das LFA-1 Molekül ist nicht nur auf den B-, T-Lymphozyten sondern auch auf den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Monozyten) zu finden. Gerade bei den E- und P-selektindefizienten Tieren ist die Leukozytenanzahl im Blut gegenüber den Wildtyptieren um das 3,9fache erhöht [Frenette *et al.*, 1996]. Hochsignifikant erhöht ist dabei die Anzahl an den neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Bei der stark ICAM positiven DU4475 Zelllinie ist anzunehmen, dass auch *scid* und *pfp/rag2* Mauslinien mit doppeldefizienten E- und P-Selektin eine erhöhte Leukozytenzahl im Blut aufweisen, wodurch der Metastasierungsprozess über LFA1-Bindung beeinflussbar wäre.

Vergleich mit der Kolonkarzinomzelllinie HT29:

Die Metastasierung der Kolonkarzinomzelllinie HT29 im *scid* und *scid select* (*E^{-/-}/P^{-/-}*) Tiermodell weist einen stark selektinabhängigen Metastasierungsprozess auf. Die 16 % Spontanmetastasen innerhalb der Lunge der *scid select* Tiere kamen im Ast der Pulmonalarterie vor [Köhler *et al.*, 2010] und nicht im Lungengewebe selbst. Bei der humanen Tumorzelllinie HT29 handelt es sich um adhäsive Zellen, die aus einem Primärtumor entstammen. Die Suspensionszelllinie DU4475 dagegen entstammt direkt aus einer Hautmetastase. Für beide Tumorzelllinien konnten Selektinliganden bzw. die enthaltenen Oligosaccharide, die für eine Bindung mit dem Selektin wichtig sind, nachgewiesen werden (Kapitel 3.1.2). HT29 besitzt kein PSGL1 Glykoprotein auf der Zelloberfläche. Die im Gegensatz zu DU4475 gering detektierbaren CD15s Oligosaccharide der HT29 Tumorzellen stammen daher nicht vom PSGL1 Molekül. Dagegen besitzen bestimmte CD44 Varianten eine Modifikation durch CD15s und Ca19.9 [Lim *et al.*, 2008]. Das bei HT29 stark exprimiert vorliegende CD44 Molekül

könnte beispielsweise diese Subpopulation von CD15s auf dem Molekül tragen. Die Vielzahl an CD44 positiven Oberflächenmolekülen bei HT29 im Gegensatz zur DU4475 Tumorzelllinie ergibt sich aus der erhöhten mRNA Expression des CD44 Genlokus, nachweisbar durch das PCR Array. Denkbar wichtig bei der Metastasierung der HT29 Zellen ist die signifikant erhöhte CD44-Expression des Glykoproteins. Bis zur Einnistung der Lungenmetastasen bleibt das CD44 Molekül an der Oberfläche erhalten. Außerdem metastasiert HT29 in der Lunge der untersuchten Tiere nicht wie beim Mammakarzinom nur in Form von Mikrometastasen und Einzelzellen.

4.9 Knochenmarksmetastasen in den Tiermodellen

Bei 30 % der Frauen mit invasivem Mammakarzinom erfolgt eine Metastasierung in den Knochen [Sloan und Anderson 2002; Sgroi 2009]. Der Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark stellt einen klinisch relevanten prognostischen Faktor beim Mammakarzinom dar. Das Auffinden von Mikrometastasen im Knochenmark während der Diagnose vom Mammakarzinom ist mit einer schlechten Prognose assoziiert [Braun *et al.*, 2005]. Im Vergleich zu Patientinnen ohne Mikrometastasen im Knochenmark hatten Patientinnen mit Knochenmarksmetastasen größere Tumore, Tumore mit höherem histologischem Grad, häufiger Lymphknotenmetastasen und mehr Hormonrezeptor negative Tumorzellen. Außerdem überleben viele Tumorzellen nach dem Einsatz von Chemotherapie und persistieren im Knochenmark nach konventioneller adjuvanter Chemotherapie [Wiedswang *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2006].

Disseminierte Tumorzellen (DTC's) können bei Krebspatientinnen mittels Panzytokerin Antikörper ermittelt werden. Mehrere Studien zeigten, dass das Vorkommen und die Anzahl an zytokeratinpositiven DTC's im Knochenmark der Krebspatientinnen mit einer schlechten Überlebensprognose korreliert [Müller und Pantel, 2005; Müller *et al.*, 2005].

Für die Untersuchung der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark der Tiere wurden die pfp/rag2 Tiere verwendet, da durch die dysfunktionalen NK-Zellen ein höheres Potenzial zur Metastasierung vorliegt, im Gegensatz zum scid Mausmodell [Sodeur *et al.*, 2009]. Bei der Analyse von kleinzelligen Bronchialkarzinomen, wie auch beim untersuchten Mammakarzinom DU4475, konnte bei den pfp/rag2 Tieren eine signifikant erhöhte Metastasenanzahl gegenüber der Metastasierung bei den

scid Tieren aufgedeckt werden (Abb. 3.20).

Da epitheliale Zellen im Knochenmark von Krebspatienten natürlicherweise nicht vorkommen, sind Marker wie Zytokeratin, Mucin1 oder EpCAM zum Nachweis von Tumorzellen geeignet, die von epithelialen Karzinomen wie dem Mammakarzinom exprimiert werden. Die intrazelluläre Zytokeratinfärbung ist durch die aufwendige Aufarbeitung der Knochenmarkszellen für eine FACS Analyse nicht geeignet. Beim Solubilisieren und Permeabilisieren der Zellen kann es zu falschpositiven Ergebnissen kommen, wenn der Antikörper in destruierte Knochenmarkszellen internalisiert. Außerdem entsteht ein starkes Hintergrundrauschen durch die Vielzahl zerstörter Zellen. Dagegen erwiesen sich EpCAM und Mucin1 als geeignete Oberflächenmoleküle zur Feststellung disseminierter humaner Tumorzellen im murinen Knochenmark. Durch die Untersuchung humanspezifischer Antikörper zur Detektion von disseminierten Tumorzellen im Xenograft-Mausmodell wird das Problem mit falschpositiven Knochenmarkszellen praktisch gelöst.

Durch eine zusätzliche morphologische Beurteilung konnte ein falschpositiver Befund hämatopoetischer Zellen ausgeschlossen werden. Die Histologie zeigte eindeutige positiv angefärbte Tumorzellen. Sogar Einzelzellmetastasen konnten mittels dieser Einbettungsmethode des Knochenmarks sichtbar gemacht werden.

Bei den Tierversuchen zeigte sich bei Verlust von E- und P-Selektin eine signifikante Reduzierung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark im Vergleich zu den Wildtyp pfp/rag2 Mäusen. Auch im Knochenmark spielt das endotheliale Selektin bei der Wanderung von Immunzellen eine wesentliche Rolle. Bei CD34 positiven hämatopoetischen Zellen erfolgte eine Reduzierung des Rollens bei E- und P-selektindefizienten scid Mäusen um 95 % gegenüber den Wildtypen scid [Hidalgo *et al.*, 2002]. Das Vorkommen von disseminierten Tumorzellen im pfp/rag2 Xenograft-Mausmodell spiegelt zudem das klinische Bild der Patientin wieder, von der die Mammakarzinomzelllinie entstammt. Das duktales Mammakarzinom entwickelte trotz Mastektomie Metastasen im Knochen der Frau [Langlois *et al.*, 1979].

Weiterhin wäre es interessant zu sehen, in welchen Bereichen des Knochens sich die detektierbaren Metastasen des Mammakarzinoms einnisten. Dazu könnte in folgenden Tierexperimenten zusätzlich der Femur histologisch eingebettet werden,

um immunhistologische Untersuchung durchführen zu können. Möglicherweise unterscheidet sich die Nische der Metastasen bei den pfp/rag2 Tieren gegenüber der pfp/rag2 select Tieren.

4.10 Expressionsmuster der Tumormarker in Zellkulturzellen, Primärtumor, Blut und Lunge

Die Tumoren der untersuchten Mauslinien wurden herauspräpariert und biochemisch aufgearbeitet. Ebenso wurden die inneren Organe sowie Herzblut entnommen und mit der relativen Quantifizierungsmethode das Expressionsmuster der Tumorzellen und Metastasen untersucht. Das Hauptaugenmerk lag auf den bekannten Mammakarzinommarkern EpCAM und Mammaglobin1.

EpCAM Transkriptom:

Im Rahmen der Untersuchung des Metastasierungsprozesses konnten mit der Expression des tumorspezifischen Markers speziell im Lungengewebe Metastasen bei allen tumortragenden Tieren detektiert werden. Sogar bei tumortragenden Mäusen ohne auszählbare Lungenmetastasen wurden EpCAM Transkripte detektiert (Kapitel 3.4.1.2). Dennoch konnte mit der immunhistologischen Färbung des humanspezifischen anti mitochondrialen Antikörpers keine Metastase aufgedeckt werden. Ein falschpositives Ergebnis kann aber ausgeschlossen werden, da die parallel untersuchten Kontrolllungen ohne Metastasen keine Expression des humanen Markers aufzeigten. Die EpCAM Expression bei den tumortragenden Tieren unterscheidet sich hochsignifikant von der Expression in den Kontrolllungen (Abb. 3.24).

Im Blut der Tiere konnte ein geringerer Anteil an EpCAM exprimierender Tumorzellen nachgewiesen werden als im Tumor und im Lungengewebe. Die Daten der EpCAM Expression im Blut unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$) von allen anderen untersuchten Proben (Tumor und Lunge), durch geringere Expressionsraten. Die geringe EpCAM Expression humaner Tumorzellen im Blut beruht wahrscheinlich auf der geringen Ausbeute an humaner mRNA. Eine RNA Quantifizierung der isolierten Blutproben war nicht möglich.

Die Analyse der EpCAM Expression in Tumor, Blut und Lunge zeigte einen regulativen Prozess. Das mRNA Transkript des EpCAM Moleküls war nicht konstant gleich exprimiert. Im Fall der pfp/rag2 Tiere zeigte sich die Regulation der epithelialen

zur mesenchymalen Transition (EMT) gefolgt vom Umkehrprozess MET (mesenchymale zur epithelialen Transition). Ein erhöhter epithelialer Charakter tritt vergleichend zur Zellkultur im Primärtumor auf und weist einen Expressionsrückgang in den Lungenmetastasen auf. Dabei findet sich eine geringe EpCAM Expression auch im Blut der Mäuse, entsprechend dem klinischen Bild. EpCAM ist ein typischer Marker, der auch im Blut der Patientinnen nachgewiesen werden kann [Lacroix, 2006].

Die epitheliale zu mesenchymale Transition ist eine Phase des Metastasierungsprozesses. Hierbei haben die Epithelzellen ein erhöhtes Potential zu migrieren und invasiv, also Gewebe zerstörend, zu wachsen. Der sogenannte Umkehrprozess MET tritt auf, wenn die Tumorzellen in sekundären Organen wie der Lunge weiterwachsen und den gleichen Phänotyp annehmen wie der Primärtumor. Besonders wichtig ist es, im Tiermodell diese EMT Eigenschaften von zirkulierenden und disseminierenden Tumorzellen im Rahmen der Metastasierungskaskade zu verstehen. Bisher gibt es nur wenige Tiermodelle, die den Prozess der EMT auf die Formierung von zirkulierenden Tumorzellen beziehen [Chaffer *et al.*, 2006; Tsuji *et al.*, 2008; Gumireddy *et al.*, 2009]. Während des Metastasierungsprozesses kann sich nur ein Teil der phänotypisch veränderten epithelialen Tumorzellen zur Metastase entwickeln.

Der EMT Prozess wurde zuerst beschrieben von Krug *et al* im Jahre 1987 und ist eine Umwandlung von adhäsiven Epithelzellen zu mobilen mesenchymalen Zellen. Bekannte Marker dieser Transition sind E-Cadherin, N-Cadherin als Oberflächenmarker und Snail1, Slug, Twist als Transkriptionsfaktoren. Es erfolgt ein Verlust von E-Cadherin (Hauptkomponente der Adhärenz) mit gleichzeitigem Hochregulieren vom mesenchymalen N-Cadherin. Dadurch verlieren die Zellen ihre adhäsive Eigenschaft gegenüber Epithelzellen und werden mobil und invasiv. Repressor für E-Cadherin sind Snail1, Twist und Slug, welche proinvasive Eigenschaften besitzen [Bonnomet *et al*, 2010].

Zusätzlich ist zu bedenken, dass das Stroma im Lungengewebe ein anderes ist als im Primärtumor. Die exogenen Faktoren des Stromas beeinflussen die Oberflächenbeschaffenheit der Tumorzellen bzw. der Metastasen. Daher kann das Expressionmuster auch variieren [Finger und Giaccia, 2010]. Dazu zählt auch die Lage der Metastasen innerhalb der Lunge. Einerseits finden sich die Spontanmetastasen eingestriet im Lungenstroma als Einzelzell- oder

Mikrometastase und andererseits sind zirkulierende mobile Tumorzellen im Lungenendothel vorhanden.

Mammaglobin1 Transkriptom:

Im Gegensatz zur EpCAM Expression war die Mammaglobinexpression sehr schwach ausgeprägt. Die humane mRNA des Oberflächenmoleküls Mammaglobin1 war nicht bei allen untersuchten Proben (Lunge, Blut) exprimiert. Innerhalb der Primärtumore und Lungenmetastasen ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der selektinkompetenten und selektindefizienten Tiere. Bei 65 % der Tumor tragenden Tiere entwickelten sich Mammaglobin1 exprimierende Metastasen in der Lunge (60 % der Wildtyptiere scid und pfp/rag2 sowie 68,2 % der E- und P-selektindefizienten Tiere). Dieser Marker eignete sich somit nicht für eine Analyse aller in der Maus entstandenen Metastasen. Obwohl diese gewählten Mammaglobinprimer in klinischen Studien bei der Untersuchung von Lymphknotenmetastasen als sehr spezifisch und sensitiv klassifiziert wurden [Mitas *et al.*, 2001], konnte hier keine starke Expression des Gens nachgewiesen werden. Daher ist es wichtig immer mehrerer Zielgene im zu untersuchenden Gewebe einzusetzen, um verschiedene Formen von Metastasen detektieren zu können.

4.11 EpCAM Interaktion bei Zelladhäsion, Migration und Metastasierung

In invasiven Tumoren wurde ein stark heterogenes Expressieren von EpCAM beschrieben. EpCAM Expression war in Metastasen weniger detektierbar im Vergleich zum entsprechenden Primärtumor. Zusätzlich konnte bereits 1999 im Rahmen einer RT PCR Untersuchung an Krebspatienten EpCAM als Tumormarker für disseminierte Tumorzellen im Knochenmark eingesetzt werden [Chaubal *et al.*, 1999]. Die Assoziation von EpCAM mit Metastasen ist bisher ungenügend aufgeklärt. Momburg und Kollegen [1987] demonstrierten, dass Mikrometastasen mit entsprechendem EpCAM Antikörper detektierbar waren. Dagegen zeigte sich bei den Metastasen vom Primärtumor des Ovars die EpCAM Expression herunterreguliert.

In Abhängigkeit vom EpCAM Expressionslevel und der Umgebung fungiert das Molekül als Adhäsionsprotein in normalen Epithelien. Im Karzinom dagegen besitzt EpCAM scheinbar zwei Funktionen. Einerseits verhindert EpCAM die Zelladhäsion und ermöglicht die Migration sowie die Metastasierung. Andererseits vermittelt EpCAM die Zelladhäsion und verhindert die Migration [Trzpis *et al.*,

2007]. Damit besitzt das EpCAM zusätzlich eine entgegengesetzte Funktion als die anderen bekannten CAM Familienmitglieder.

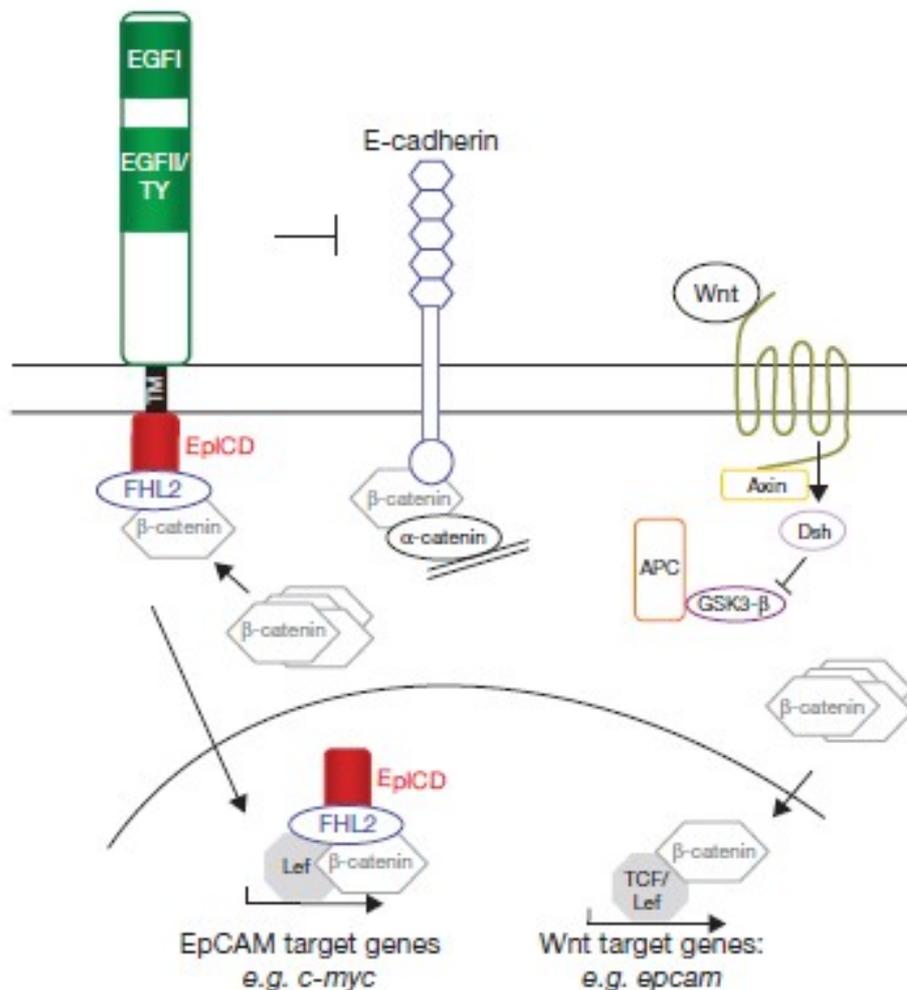


Abbildung 4.1: EpCAM Signalweg und Kommunikation mit E-Cadherin [Maetzel *et al.*, 2009].

EpCAM fungiert als Antagonist von E-Cadherin [Litvinov *et al.*, 1997] und beeinflusst die cadherinvermittelte Zelladhäsion durch das Aufbrechen der Bindung zwischen α -Catenin und F-Actin. Das Überexprimieren von EpCAM ist daher ein wichtiger Mechanismus zur Zerstörung der Zellzellkontakte, um Tumorzellen zur Migration zu aktivieren. Die vermehrte Produktion von EpCAM geht auch mit gesteigerter Proliferation einher [Osta *et al.*, 2004].

4.12 Expressionsanalyse der Fukosyltransferase3 im Primärtumor der Tiere

Am Beispiel von scid versus scid select Tumoren im Vergleich zur Tumorzelllinie DU4475 zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expression von PSGL1. Bei

den selektindefizienten Tieren war ein Expressionsrückgang detektierbar. Zusätzlich ist das mRNA Transkript für die Fukosyltransferase3 bei dem Primärtumor der selektindefizienten Tiere vermindert (siehe 3.4.2). Das Gen für Fukosyltransferase3 ist ein Mitglied der Familie der Fukosyltransferasen, die an der Lewis Antigen Biosynthese beteiligt sind. Die Fukosyltransferase3 besitzt eine $\alpha(1,3)$ -Fukosyltransferase und $\alpha(1,4)$ -Fukosyltransferase Aktivität. Eine maligne Transformation von Zellen ist mit einer abnormalen Glykosylierung der Zelloberfläche assoziiert. Beispielsweise erfolgt bei einer Neusynthese einer Fukosyltransferase ein Anstieg der Expression von sialyl Lewis x Tetrasacchariden auf der Zelloberfläche. Eine Untersuchung von CHO (*chinese hamster ovary*) Zellen, die *in vitro* nicht in der Lage sind an Selektine zu binden, konnte durch eine Transformation der Zellen mit der Fukosyltransferase3 eine Expression von sialyl Lewis x auf der Zelloberfläche erzeugen [Lowe *et al.*, 1990]. Diese transfizierten Zellen adhärirten daraufhin mit den Selektin exprimierten HUVEC-Zellen, nach TNF- α Stimulation der Endothelzellen. Durch die funktionelle Expression einer einzigen Fukosyltransferase konnte eine Bindung an ein Selektin hervorgerufen werden. Die hier hervorgerufene Expressionsminderung der Fukosyltransferase3 in den scid select Tumoren ist daher ein Kennzeichen für eine verminderte Invasivität der Tumorzellen, durch die die geringere Metastasierungsfähigkeit bedingt sein kann.

4.13 Immunhistologische Färbung von EpCAM und Mucin1

Die Entwicklung der Alkalischen Phosphatase mit dem Permanent Red System bewirkte eine Verstärkung der immunhistologischen Färbung. Das tumorassoziierte Glykoprotein EpCAM, detektierbar durch den Moc31 Antikörper, ist in Metastasen verschiedenster Größenordnung in der Lunge und im Knochenmark vorliegend. Selbst Einzelzellmetastasen sind deutlich positiv. Entgegen der bisherigen Beobachtungen, dass nur HT29 Metastasen größer 30 Zellen gleichmäßig anfärbbar waren [Jojović *et al.*, 1998], besitzen auch kleinere Metastasen von DU4475 deutlich EpCAM auf der Zelloberfläche. Nur vereinzelt finden sich im Lungengewebe Metastasen, die keine deutlich sichtbare Immunreaktion mit dem EpCAM Molekül aufweisen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um migrierende Tumorzellen, die sich noch in der EMT-Phase befinden. Auch beim Muc1 Antikörper zeigte sich laut Schumacher und Adam (1998) nur bei größeren Lungenmetastasen eine positive Färbung. In beiden Fällen wurde nicht dieses sensitive Permanent Red System angewendet.

Innerhalb einer Studie von 431 Krebspatientinnen wurden bei 13 % zirkulierende Tumorzellen detektiert, mit einer Expressionsrate von 55 % für EpCAM und 53 % für Muc1. DTC's waren sogar bei 24 % der Fälle zu finden. Dabei war bei dreifach negativen Tumoren, auch ein Charakteristikum der DU4475 Zelllinie, die höchste Präsenz an zirkulierenden Tumorzellen vorhanden [Fehm *et al.*, 2009].

4.14 Expression von Mucin1 bei der Metastasierung

Die FACS- und Westernblotergebnisse zur Mucin1-Färbung der DU4475 Tumorzelllinie werden durch die Arbeit von Walsh bestätigt, die im Vergleich mehrerer Mammakarzinomzelllinien die Muc1 Expression untersuchten [1999]. Diese konnten aber keine Tumorentstehung bei scid Mäusen bei orthotoper Transplantation mit DU4475 initiieren. Zu diesem Zeitpunkt war damit eine Analyse der Metastasierung nicht möglich.

Frühere Studien zu Mucin1 zeigten, dass das Protein Tumorwachstum, Inhibition von Zellzellkontakten, Schutz vor Erkennung und Zerstörung von Immunzellen begünstigt. Zudem dient das Glykoprotein als Selektinligandenträger, um die Extravasation von metastasierenden Zellen aus dem Blutstrom zu ermöglichen. Beim Kolonkarzinom war die Expression von Mucin1 im Primärtumor signifikant höher bei Patienten mit Metastasen als bei Patienten ohne Metastasen [Nakamori *et al.*, 1994].

Diese Kohlenhydratstrukturen CD15s und Ca19.9 finden sich in Glykolipiden und Glykoproteinen wie den Mucinen der Tumorzellmembran und bei zirkulierenden Mucinen im Serum von Krebspatienten [Zhang *et al.*, 1996].

4.15 Lektin histochemie zum Vergleich der Oberflächenglykosylierung der Tumorzellen

Die DU4475 Tumorzellen sowie die Primärtumore der Tiere zeigten eine starke HPA Färbung. Selbst in den spontanen Lungenmetastasen und den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark der Tiere konnten immunhistologische HPA positive Zellen nachgewiesen werden. Die Zugabe von HPA Lektin zu den DU4475 Tumorzellen inhibierte *in vitro* signifikant die Bindung an das stimulierte Endothel [Valentiner *et al.*, 2005]. Die Oligosaccharide N-Acetylglucosamin bzw. -galactosamin haben somit einen entscheidenden Einfluss auf die Metastasierungsfähigkeit der Zellen.

Im Gegensatz dazu besitzen die Primärtumore von DU4475 aller Tiergruppen nur in

vereinzelten Bereichen die Oligosaccharide CD15s und Ca19.9. In den Spontanmetastasen konnte in keinem der Tiere CD15s und Ca19.9 angefärbt werden. Dementsprechend finden sich weniger Selektinbindungsstellen als Lektinbindungsstellen auf den *in vivo* gewachsenen DU4475 Tumorzellen. Das E- und P-Selektin auf den Endothelzellen muss als hauptsächliches Zielmolekül der Metastasierung ausgeschlossen werden. Letztendlich war in der *in vivo* Studie trotz signifikantem Rückgang der Metastasierung beim Verlust der E- und P-Selektine eine Extravasation ins Lungenstroma zu verzeichnen.

4.16 Ausblick und Therapieansätze

Wichtig ist eine frühzeitige Diagnose vom Mammakarzinom und eine gezielte Therapie für den speziellen Tumortyp. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein genaueres Verständnis der molekularen Mechanismen der Metastasierung der Mammakarzinomzelllinie DU4475 zu erzielen. Mit Hilfe der erhobenen Daten, speziell der signifikante Metastasierungsrückgang bei den selektindefizienten Mäusen mit eingeschränkter Extravasation ins Gewebe, kann an eine Richtung der Einflussnahme während der Metastasierung weiter gearbeitet werden. Dann erst sind direkte Therapieversuche möglich. Bis dahin sind diese Aussagen nur spekulativ zu sehen. Beispiele für Therapieansätze sind die gezielte Behandlung der zirkulierenden Tumorzellen im Blutstrom durch spezielle Antikörpertherapie, um die Adhäsion ans Endothel und damit die Extravasation zu verhindern. Besonders im Hinblick auf die selektinunabhängige Metastasierung der Tumorzellen, bei denen möglicherweise Medikamente wie Heparin keine Wirkung hätten. Außerdem bietet das pfp/rag2 Xenograft-Mausmodell die Möglichkeit, nach der Tumorentwicklung eine zielgerichtete Behandlung der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark durchzuführen. Somit kann die Zahl an sogenannten Schläferzellen gemindert und das Risiko einer Fernmetastasierung gesenkt werden.

5 Zusammenfassung

Nach den Herz- und Kreislauferkrankungen sind maligne Tumoren die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt. Trotz aller Bemühungen der letzten Jahrzehnte ist es nicht gelungen, deren Todesrate wesentlich zu senken, da eine Behandlung der auftretenden Metastasen bisher noch das Hauptproblem darstellt. Der Prozess der Metastasierung gleicht einer Kaskade, die sehr komplex ist und mehrere voneinander abhängige Schritte beinhaltet. Es ist wichtig den Mechanismus der Metastasierung zu verstehen, um geeignete Therapien zu entwickeln. Für eine direkte Analyse der Metastasierung ist ein Tiermodellsystem wie das Xenograft-Mausmodell *scid* und *pfp/rag2* erforderlich, denn aufgrund der komplexen Schlüsselprozesse ist eine *in vitro* Untersuchung nicht geeignet.

Der wissenschaftliche Schwerpunkt der Arbeit lag auf dem Gebiet der molekularen Analyse der metastasierenden Tumorzellen in den klinisch relevanten Modellsystemen. Es wurden molekularbiologische Methoden etabliert, um das Transkriptom von metastasierenden Tumorzellen zu erfassen. Die erzielten Ergebnisse des Transkriptoms wurden mit tumorrelevanten Parametern korreliert, um ein integriertes Bild des Metastasierungs geschehens zu erhalten. Das Ziel war es, die Bedeutung von E- und P-Selektin bei der spontanen Metastasierung humaner xenotransplantierte Tumoren in den immundefizienten Mäusen zu untersuchen. Die Analyse der Metastasierungs vorgänge wurde in *scid select* ($E^{-/-}$, $P^{-/-}$) Mäusen sowie in *pfp/rag2 sele* ($E^{-/-}$, $P^{+/+}$), *pfp/rag2 selp* ($E^{+/+}$, $P^{-/-}$) und *pfp/rag2 select* ($E^{-/-}$, $P^{-/-}$) Tieren im Vergleich zu den Wildtyp *scid* bzw. *pfp/rag2* Tieren anhand von humanen Mammakarzinomzellen untersucht.

Während ein signifikant erhöhtes Primärtumorgewicht bei doppeltelektindefizienten *scid* Mäusen gegenüber den *scid* Tieren vorlag, war das Tumorstadium zwischen den selektindefizienten und den selektinkompetenten Tiere der Mauslinie *pfp/rag2* nicht signifikant verändert. Grundlegend war die erreichte Tumorstadium unabhängig von der Wachstumsdauer des Primärtumors. Die Metastasierung war bei Verlust von E- und P-Selektin in den Mauslinien *scid* und *pfp/rag2* signifikant reduziert gegenüber den Wildtyp Tieren. Dennoch zeigte sich ein zusätzlicher Einfluss, unabhängig vom endothelialen Selektin, auf die Metastasierungsrate der CD15s und Ca19.9 positiven DU4475 Tumorzelllinie. Auch in den selektindefizienten *scid* und *pfp/rag2* Tieren erfolgte die Extravasation der Tumorzellen ins Lungengewebe. Gegenüber den *pfp/rag2* Wildtypmäusen lag im Blut keine Erhöhung der zirkulierenden Tumorzellen

durch den Verlust von E- und P-Selektin vor.

Eine nähere Charakterisierung von Oberflächenmarkern zeigte, dass alle Tumor tragenden selektindefizienten und -kompetenten Tiere Metastasen entwickelten, die EpCAM positiv sind und sowohl in die Lunge einwandern als auch als zirkulierende Tumorzellen im Blut vorhanden sind. Die immundefizienten scid und pfp/rag2 Tiere zeigten bei E- und P-Selektinverlust eine signifikante Expressionsverminderung von EpCAM im Primärtumor gegenüber den Wildtypen. Weiterhin war die Expression von EpCAM im Primärtumor der pfp/rag2 Mäuse im Vergleich zu der Expression in den Lungenmetastasen und zirkulierenden Tumorzellen im Blut signifikant hochreguliert. EpCAM erwies sich somit als idealer Marker, um eine Genexpression während des Metastasierungsvorgangs zu erfassen. Zusätzlich konnten anhand des EpCAM Markers disseminierte Tumorzellen im Knochenmark der pfp/rag2 Tiere detektiert werden, wobei die Dissemination der Tumorzellen bei pfp/rag2 select signifikant reduziert vorlag. Immunhistologisch konnte zudem gezeigt werden, dass diese Metastasen im Knochenmark und in der Lunge stark Muc1 und EpCAM positiv waren.

Zusätzlich zum endothelialen Selektin sind weitere Oberflächenmoleküle an der Extravasation der metastasierenden Tumorzelle DU4475 beteiligt. Die Aufgabe ist es nun diesen Metastasierungsprozess weiter zu untersuchen und die Moleküle aufzudecken, die die Metastasierung vorantreiben.

6 Summary

Metastasis formation of human breast cancer cells transplanted into different strains of immunodeficient mice

Metastasis formation is a complex process and as such can only be modeled *in vivo*. We have therefore developed human breast cancer xenograft mouse models to analyze the molecular mechanisms of the metastatic spread of breast cancer cells. The scid and pfp^{-/-}rag2^{-/-} xenograft models are particularly suitable to analyze the presence and biological impact of circulating and disseminated tumor cells (DTC's) as any monoclonal antibody specifically directed against human antigens or human-specific PCR templates can be applied to detect cancer cells. The first aim of the present study was to analyze metastatic correlated cell surface molecules of human breast cancer cell lines grown in different immunodeficient mouse strains.

The second aim of the study was to determine if selectin ligands of the cancer cells are involved in adhesion to endothelial cells, one of the most crucial steps in the metastatic cascade, using EP-selectin double-deficient (EP^{-/-}), E and P-selectin single-deficient (E^{-/-} or P^{-/-}) mice.

DU4475 tumors developed in all animals and tumor growth rate was significantly reduced in the presence of E- and P-selectin in scid mice. Spontaneous metastases were found in the lungs and showed that wild-type mice displayed significantly more metastases than the EP-selectin double-deficient scid and pfp^{-/-}rag2^{-/-} mice. These results show that E- and P-selectin are involved in the adhesion of metastatic tumor cells to the endothelium and the colonization of tumor cells via the hematogenous pathway. However, metastatic deposits were found within the pulmonary arteries and had directly migrated in alveolar septa of selectin-deficient mice. Quantification of circulating tumor cells in the animals blood, by human-specific alu PCR, showed no difference in cell numbers between wild-type and selectindeficient mice. In particular EpCAM positive DTC's in bone marrow were significantly higher in wild-type pfp rag2 mice than the selectindeficient mice.

The human DU4475 breast cancer pfp/rag2 xenograft model is a new diagnostic model for detection of disseminated tumor cells in the bone marrow.

7 Literaturverzeichnis

Balzar M, Bakker HA, Briaire-de-Bruijn IH, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol.* 1998;18:4833-43.

Balzar M, Briaire-de Bruijn IH, Rees-Bakker HA, Prins FA, Helfrich W, de Leij L, Riethmüller G, Alberti S, Warnaar SO, Fleuren GJ, Litvinov SV. Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol.* 2001;21:2570-80.

Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet.* 2002 May;3:370-9.

Becker S, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Detection of cytokeratin-positive cells in the bone marrow of breast cancer patients undergoing adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 May;97:91-6.

Bennett J, Scott KJ. Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem.* 1971 Sep;43:173-82.

Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, Gilles C. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010 Jun;15:261-73.

Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 19;99:2193-8.

Borsig L. Antimetastatic activities of modified heparins: selectin inhibition by heparin attenuates metastasis. *Semin Thromb Hemost.* 2007 Jul;33:540-6.

Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:323-50.

Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2005 Aug 25;353:793-802.

Brooks SA, Lymboura M, Schumacher U, Leatham AJ. Histochemistry to detect Helix pomatia lectin binding in breast cancer: methodology makes a difference. *J. Histochem. Cytochem.* 1996 May 44; 519-524.

Brooks SA, Leatham AJ. Expression of N-acetyl galactosaminylated and sialylated glycans by metastases arising from primary breast cancer. *Invasion Metastasis*. 1998-1999;18:115-21.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006 Jun 7;295:2492-502.

Carlstedt I, Sheehan JK, Corfield AP, Gallagher JT. Mucous glycoprotein: a gel of a problem. *Essays Biochem* 1985;20:40–76.

Carr I. Lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1983;2:307-17.

Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res*. 2006 Dec 1;66:11271-8.

Chang-Claude J. Genetische Disposition bei Krebserkrankungen von Frauen. Forum der Deutschen Krebsgesellschaft e.V., Schwerpunktthema Frauen Leben und Krebs, Omnimed Verlagsgesellschaft 12. 1997, Heft 8: 595–597.

Chaubal S, Wollenberg B, Kastenbauer E, Zeidler R. Ep-CAM—a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from SCCHN. *Anticancer Res*. 1999 May-Jun;19:2237-42.

Chong JM, Speicher DW. Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM). *J Biol Chem*. 2001 Feb 23;276:5804-13.

Corfield AP, Warren BF. The modern investigation of mucus glycoproteins and their role in colorectal disease. *J Pathol* 1996;180:8–17.

Croce K, Freedman SJ, Furie BC, Furie B. Interaction between soluble P-selectin and soluble P-selectin glycoprotein ligand 1: equilibrium binding analysis. *Biochemistry*. 1998 Nov 24;37:16472-80.

Dekker J, Rossen JW, Büller HA, Einerhand AW. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci*. 2002 Mar;27:126-31.

Dimri G, Band H and Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Research* 2005, 7:171-179.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 1991 Jul 25;19:4008.

Durbin H, Rodrigues N, Bodmer WF. Further characterization, isolation and identification of the epithelial cell-surface antigen defined by monoclonal antibody AUA1. *Int J Cancer.* 1990;45:562-5.

Epperson TK, Patel KD, McEver RP, Cummings RD. Noncovalent association of P-selectin glycoprotein ligand-1 and minimal determinants for binding to P-selectin. *J Biol Chem.* 2000 Mar 17;275(11):7839-53.

Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Res.* 2009;11:R59.

Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 1978 Sep;38:2651-60.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun; 3:453-8.

Finger EC, Giaccia AJ. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Jun;29:285-93.

Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1977 Feb;58:209-14.

Forlow SB, White EJ, Barlow SC, Feldman SH, Lu H, Bagby GJ, Beaudet AL, Bullard DC, Ley K. Severe inflammatory defect and reduced viability in CD18 and E-selectin double-mutant mice. *J Clin Invest.* 2000 Dec;106:1457-1466.

Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell.* 1996 Feb 23;84:563-74.

GEKID und RKI, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 7. Ausgabe 2010:56

Gumireddy K, Li A, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Showe LC, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Huang Q. KLF17 is a negative regulator of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Nat Cell Biol.* 2009 Nov;11:1297-304.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100:57-70.

Hanisch FG, Müller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*. 2000 May;10:439-49.

Hart IR, Goode NT, Wilson RE. Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochim Biophys Acta* 1989 Jul 28; 989:65-84.

Hart IR, Saini A. Biology of tumour metastasis. *Lancet*. 1992 Jun 13;339:1453-1457.

Hidalgo A, Weiss LA, Frenette PS. Functional selectin ligands mediating human CD34(+) cell interactions with bone marrow endothelium are enhanced postnatally. *J Clin Invest*. 2002 Aug;110:559-69.

Honda T, Schulte BA, Spicer SS. Glycoconjugate with terminal galactose. A selective property of macrophages in developing rat lung. *Histochemistry*. 1989;91:61-7.

Hopkins CR. Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. *Trends Biochem Sci*. 1992;17:27-32.

Jožović M, Adam E, Zangemeister-Wittke U, Schumacher U. Epithelial glycoprotein-2 expression is subject to regulatory processes in epithelial-mesenchymal transitions during metastases: an investigation of human cancers transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Histochem J*. 1998 Oct;30:723-9.

Jožović M, Schumacher U. Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into SCID mice. *Cancer Lett*. 2000 May 1;152:151-6.

Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Córdón-Cardo C, Guise TA, Massagué J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 2003 Jun; 3:537–549.

Khatib AM, Fallavollita L, Wancewicz EV, Monia BP, Brodt P. Inhibition of hepatic endothelial E-selectin expression by C-raf antisense oligonucleotides blocks colorectal carcinoma liver metastasis. *Cancer Res*. 2002 Oct 1;62:5393–5398

Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4;95:9325-30.

Kim YS, Gum J Jr, Brockhausen I. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J*. 1996 Oct;13:693-707.

Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet.* 1979 Nov;5:957-71.

Köhler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer.* 2010 Feb 2;102:602-9.

Köttgen E, Reutter W, Tauber R. Human lectins and their correspondent glycans in cell biology and clinical medicine. *Med Klin (Munich).* 2003 Dec 15;98:717-738.

Krebs in Deutschland. 7. Auflage ed. 2010, Saarbrücken.

Krug EL, Mjaatvedt CH, Markwald RR. Extracellular matrix from embryonic myocardium elicits an early morphogenetic event in cardiac endothelial differentiation. *Dev Biol.* 1987 Apr;120:348-55.

Krupski T, Harding MA, Herce ME, Gulding KM, Stoler MH, Theodorescu D. The role of vascular endothelial growth factor in the tissue specific in vivo growth of prostate cancer cells. *Growth Factors.* 2001;18:287-302.

Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* 1984 Dec;10:203-9.

Labow MA, Norton CR, Rumberger JM, Lombard-Gillooly KM, Shuster DJ, Hubbard J, Bertko R, Knaack PA, Terry RW, Harbison ML, et al. Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity.* 1994 Nov;1:709-20.

Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2006 Dec;13:1033-67.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227:680-5.

Laferrrière J, Houle F, Huot J. Adhesion of HT-29 colon carcinoma cells to endothelial cells requires sequential events involving E-selectin and integrin beta4. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21:257-64.

Laitinen L. Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochem J.* 1987 Apr;19:225-34.

Langlois AJ, Holder WD, Iglehart JD, Nelson-Rees WA, Wells SA, Bolognesi DP. Morphological and biochemical properties of a new human breast cancer cell line. *Cancer Res.* 1979 Jul;39: 2604–07.

Leathem AJ, Brooks SA. Predictive value of lectin binding on breast-cancer recurrence and survival. *Lancet.* 1987 May 9;1:1054-6.

Lim KT, Miyazaki K, Kimura N, Izawa M, Kannagi R. Clinical application of functional glycoproteomics - dissection of glycotopes carried by soluble CD44 variants in sera of patients with cancers. *Proteomics.* 2008 Aug;8:3263-73.

Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM, Velders MP, Warnaar, SO. Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun.* 1994a Oct;2:417-428.

Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 1994b;125:437-46.

Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, Fleuren GJ, Warnaar SO. Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol.* 1997 Dec 1;139:1337-48.

Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, Larsen RD, Berhend TL, Marks RM. ELAM-1--dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell.* 1990 Nov 2;63:475-84.

Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol.* 2009 Feb;11:162-71.

Mann K, Deutzmann R, Aumailley M, Timpl R, Raimondi L, Yamada Y, Pan TC, Conway D, Chu ML. Amino acid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement membrane protein with binding activity for laminin, collagen IV and cells. *EMBO J.* 1989;8:65-72.

Matsumoto S, Imaeda Y, Umemoto S, Kobayashi K, Suzuki H, Okamoto T. Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumour cells. *Br J Cancer.* 2002 Jan 21;86:161-7.

Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. *Cell* 1993 Aug 13;74:541-554.

McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol. Chem.* 1995 May 12;270:11025-11028.

McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 1989 Jul;84:92-9.

Miles FL, Pruitt FL, van Golen KL, Cooper CR. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25:305-24.

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* 2005 Jul 28;436:518-24.

Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, Baron PL, Elliott BM, Brothers TE, Robison JG, Metcalf JS, Palesch YY, Zhang Z, Gillanders WE, Cole DJ. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer.* 2001 Jul 15;93:162-171

Mitchell BS, Horny HP, Adam E, Schumacher U. Immunophenotype of human HT29 colon cancer cell metastases in the lungs of scid mice: spontaneous versus artificial metastases. *Invasion Metastasis.* 1997;17:75-81.

Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res.* 1987 Jun 1;47:2883-91.

Monzavi-Karbassi B, Stanley JS, Hennings L, Jousheghany F, Artaud C, Shaaf S, Kieber-Emmons T. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans as major P-selectin ligands on metastatic breast cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2007 Mar 15;120:1179-91.

Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, Ueo H, Akivoshi T. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1995 Aug 1;55:3417-20.

Müller V, Pantel K. BM micrometastases and circulating tumor cells in breast cancer patients: where have we been, where are we now and where does the future lie? *Cytotherapy.* 2005;7:478-82.

Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Jänicke F, Pantel K. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res.* 2005 May 15;11:3678-85.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51:263-73.

Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirotani K, Irimura T. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 1994 Feb;106:353-61.

Nehmann N, Wicklein D, Schumacher U, Müller R. Comparison of two techniques for the screening of human tumor cells in mouse blood: quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) versus laser scanning cytometry (LSC). *Acta Histochem*. 2010 Sep;112:489-96.

Nelson L, Cox M. *Lehninger Biochemie*. 3. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2001:414

Nielsen DL, Andersson M, Kamby C. HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev*. 2009 Apr;35:121-36.

Ogura E, Senzaki H, Yoshizawa K, Hioki K, Tsubura A. Immunohistochemical localization of epithelial glycoprotein EGP-2 and carcinoembryonic antigen in normal colonic mucosa and colorectal tumors. *Anticancer Res*. 1998 Sep-Oct;18:3669-75.

Orr FW, Wang HH, Lafrenie RM, Scherbarth S, Nance DM. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol*. 2000 Feb;190:310-29.

Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res*. 2004 Aug 15;64:5818-24.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev*. 1889 Aug;8:98-101.

Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol*. 2002 Apr;14:73-81.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406:747-52.

Perez MS, Walker LE. Isolation and characterization of a cDNA encoding the KS1/4 epithelial carcinoma marker. *J Immunol*. 1989;142: 3662-7.

Rahn JJ, Chow JW, Horne GJ, Mah BK, Emerman JT, Hoffman P, Hugh JC. MUC1 mediates transendothelial migration in vitro by ligating endothelial cells ICAM-1. *Clin Exp Metastasis*. 2005;22:475-83.

Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC. The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res.* 1996 Sep 15;56:4244-9.

Sambrook and Russel. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74:5463-7.

Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci.* 1999 Jan;112:137-146.

Schön MP, Schön M, Mattes MJ, Stein R, Weber L, Alberti S, Klein CE. Biochemical and immunological characterization of the human carcinoma-associated antigen MH 99/KS 1/4. *Int J Cancer.* 1993;55:988-95.

Schumacher U, Adam E, Flavell DJ, Boehm D, Brooks SA, Leathem AJ. Glycosylation patterns of the human colon cancer cell line HT-29 detected by Helix pomatia agglutinin and other lectins in culture, in primary tumours and in metastases in SCID mice. *Clin Exp Metastasis.* 1994 Nov;12:398-404.

Schumacher U, Horny HP, Horst HA, Herrlich P, Kaiserling E. A CD44 variant exon 6 epitope as a prognostic indicator in breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 1996 Jun;22:259-61.

Schumacher U, Adam E. Lectin histochemical HPA-binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in severe combined immunodeficient mice. *Histochem J.* 1997 Sep;29:677-84.

Schumacher U, Adam E. Immunohistochemical detection of the MUC1 gene product in human cancers grown in scid mice. *J Histochem Cytochem.* 1998 Jan;46:127-34.

Schumacher U, Brooks SA, Mester J. The lectin Helix pomatia agglutinin as a marker of metastases--clinical and experimental studies. *Anticancer Res.* 2005 May-Jun;25:1829-30.

Sgroi DC. Breast cancer SRC activity: bad to the bone. *Cancer Cell.* 2009 Jul 7;16:1-2.

Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell.* 1992 Mar 6;68:855-67.

Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J*. 2000 Aug;76:473-8.

Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, Martens JW, Gratama JW, Sleijfer S, Foekens JA. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Jan 7;101:61-6.

Simon B, Podolsky DK, Moldenhauer G, Isselbacher KJ, Gattoni-Celli S, Brand SJ. Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:2755-9.

Singer SJ, Nicolson GL. *Science*. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. 1972 Feb 18;175:720-31.

Sloan EK, Anderson RL. Genes involved in breast cancer metastasis to bone. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Sep;59:1491-502.

Smalley M und Ashwort A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer*. 2003 Nov; 3:832-844.

Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, Foekens JA, Martens JW. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008 May 1;68:3108-14.

Sodeur S, Ullrich S, Gustke H, Zangemeister-Wittke U, Schumacher U. Increased numbers of spontaneous SCLC metastasis in absence of NK cells after subcutaneous inoculation of different SCLC cell lines into pfp/rag2 double knock out mice. *Cancer Lett*. 2009 Sep 18;282: 146-151

Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98:10869-74.

Soule HD, Vasquez J, Long A., Albert S, Brennan M. A human breast cancer cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973 Nov;51:1409–16.

Spicer AP, Rowse GJ, Lidner TK, Gendler SJ. Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice. *J Biol Chem*. 1995 Dec 15;270:30093-101.

Strell C, Entschladen F. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun Signal*. 2008 Dec 4;6:10.

Strnad J, Hamilton AE, Beavers LS, Gamboa GC, Apelgren LD, Taber LD, Sportsman JR, Bumol TF, Sharp JD, Gadski RA. Molecular cloning and characterization of a human adenocarcinoma/epithelial cell surface antigen complementary DNA. *Cancer Res.* 1989;49:314-7.

Strous GJ, Dekker J. Mucin-type glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1992;27: 57–92.

Taverna D, Moher H, Crowley D, Borsig L, Varki A, Hynes RO. Increased primary tumor growth in mice null for beta3- or beta3/beta5-integrins or selectins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 20;10:763-8.

Thampoe IJ, Ng JS, Lloyd KO. Biochemical analysis of a human epithelial surface antigen: differential cell expression and processing. *Arch Biochem Biophys.* 1988;267:342-52.

Trebak M, Begg GE, Chong JM, Kanazireva EV, Herlyn D, Speicher DW. Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J Biol Chem.* 2001;276:2299-309.

Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol.* 2007 Aug;17:386-95.

Tschentscher P, Wagener C, Neumaier M. Sensitive and specific cytokeratin 18 reverse transcription-polymerase chain reaction that excludes amplification of processed pseudogenes from contaminating genomic DNA. *Clin. Chem.* 1997 Dec;43:2244–2250.

Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, Hu MG, Katsurano M, Sasaki A, Hu GF. Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res.* 2008 Dec 15;68:10377-86.

Valentiner U, Hall DMS, Brooks SA, Schumacher U. HPA binding and metastasis formation of human breast cancer cell lines transplanted into severe combined immunodeficient (scid) mice. *Cancer Lett.* 2005 Mar 10;219:233-42.

Varki A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest.* 1997 Jan 15;99:158-62.

Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79:181-213.

Walsh MD, Luckie SM, Cummings MC, Antalis TM, McGuckin MA. Heterogeneity of MUC1 expression by human breast carcinoma cell lines in vivo and in vitro. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 Dec;58:255-66.

Walsh CM, Matloubian M, Liu CC, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, Huang MT, Young JD, Ahmed R, Clark WR. Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 8;91:10854-8.

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer.* 2005 Aug;5:591-602.

Weller A, Isenmann S, Vestweber D. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25;267: 5176-15183.

Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst.* 1975 Aug;55:231-73.

Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15;10:5342-8.

Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol.* 2003 Dec;163:2139-48.

Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett.* 2008 Sep 8;268:1-9.

Xu N, Rahman A, Minshall RD, Tirupathi C, Malik AB. beta(2)-Integrin blockade driven by E-selectin promoter prevents neutrophil sequestration and lung injury in mice. *Circ Res.* 2000 Aug 4;87:254-260.

Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med.* 1999 Dec 20;190:1769-82.

Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massagué J, Mundy GR, Guise TA. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest.* 1999 Jan;103:197-206.

Zhang K, Bäckström D, Brevinge H, Hansson GC. Secreted MUC1 mucins lacking their cytoplasmic part and carrying sialyl-Lewis a and x epitopes from a tumor cell line and sera of colon carcinoma patients can inhibit HL-60 leukocyte adhesion to E-selectin-expressing endothelial cells. *J Cell Biochem.* 1996 Mar 15;60:538-49.

Zhao Q, Guo X, Nash GB, Stone PC, Hilkens J, Rhodes JM, Yu LG. Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface. *Cancer Res.* 2009 Sep 1;69:6799-806.

Zilles K, Tillmann BN. *Anatomie*. 1. Auflage, Springer Medizin Verlag Berlin Heidelberg 2010:572-73.

8 Anhang

8.1 Überblick zu allen gesammelten tierexperimentellen Daten

Tierart	angewachsene Tumorzellen [%]	Primärtumor [g] (Mittelwert; Median)	Spontanmetastasenrate in der Lunge [%]	Metastasenanzahl (Mittelwert; Median)	Varianz (Min - Max)
scid n = 9	100	1,65 ; 1,67	100	1382 ; 739	200 - 7757
scid select n = 11	91	2,43 ; 2,64	91	845 ; 637	0 - 2072
pfp/rag2 n = 6	100	1,78	100	17858 ; 18310	14253 - 21584
pfp/rag2 n = 6	100	1,51 ; 1,40	100	422 ; 360	176 - 717
pfp/rag2 sele n = 10	100	1,87 ; 1,91	91	3039 ; 795	0 - 20074
pfp/rag2 selp n = 9	100	2,18 ; 2,06	91	2485 ; 1269	0 - 11646
pfp/rag2 select n = 11	100	2,09 ; 1,97	82	1621 ; 154	0 - 14149
pfp/rag2 n = 16	100	2,48 ; 2,58	100*	5253 ; 4018	1368 - 15840
pfp/rag2 select n = 13	100	2,5 ; 2,47	100	8691 ; 5819	646 - 22464

Tabelle 8.1: Primärtumorgewicht aller Tiere unter Angabe der Spontanmetastasenrate und Anzahl an Gesamtmetastasen der Lunge. (Dargestellt sind Mittelwert und Median, Min = Minimum, Max = Maximum; * ein Lungengewebe konnte auf Grund von Einbettungsproblemen nicht auf Metastasen hin untersucht werden.)

8.2 PCR Array für Gene der Zellzell- sowie Zellmatrixinteraktion

In der folgenden Tabelle sind die untersuchten 48 Gene mit den entsprechenden Kontrollgenen aufgeführt.

			Relative Expression gegenüber HT29	
Symbole	Erklärung	Gencode	DU4475	MCF7
ADAMTS 1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	C3-C5/METH1	-3,27	-8,96
ADAMTS 13	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 13	C9orf8/DKFZp434C232 2	10,71	5,29
ADAMTS 8	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8	ADAM-TS8/METH2	1987,45	77,16
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	CDW44/CSPG8	-45011,31	-11589,90
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	Arc-1/CD324	-3,64	-8,13
CNTN1	Contactin 1	F3/GP135	3,15	-3,16
COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1	CO11A1/COLL6	-2,12	-7,43
COL12A1	Collagen, type XII, alpha 1	COL12A1L	1,63	-634,41
COL14A1	Collagen, type XIV, alpha 1	UND	-5,55	-2,00
COL15A1	Collagen, type XV, alpha 1	FLJ38566	4,26	-1,04
COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1	447AA/FP1572	-2,33	115,39
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	OI4	1,02	-2,05
COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2	DKFZp686I14213	-2,37	13,69
COL5A1	Collagen, type V, alpha 1	COL5A1	40,37	-1,66
COL6A1	Collagen, type VI, alpha 1	OPLL	39,01	20,60
COL6A2	Collagen, type VI, alpha 2	DKFZp586E1322/PP36 10	1,63	-286,82
COL7A1	Collagen, type VII, alpha 1	EBD1/EBDCT	28,62	8,55
COL8A1	Collagen, type VIII, alpha 1	C3orf7	-1,01	-3,36
VCAN	Versican	CSPG2/DKFZp686K06 110	-1,70	-3,27
CTGF	Connective tissue growth factor	CCN2/HCS24	-9,10	-17,11
CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	CAP102	-3,39	1,10
CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	CTNNB/DKFZp686D02 253	6,97	11,98
CTNND1	Catenin (cadherin-associated protein), delta 1	CAS/CTNND	-5,43	-1,81
CTNND2	Catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (neural plakophilin-related arm-repeat protein)	GT24/NPRAP	-2,87	-138,93
ECM1	Extracellular matrix protein 1	ECM1	1,85	11,07
FN1	Fibronectin 1	CIG/DKFZp686F10164	108,56	-3,72
HAS1	Hyaluronan synthase 1	HAS	-4,04	-13,09
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	BB2/CD54	3,28	7,30
ITGA1	Integrin, alpha 1	CD49a/VLA1	9,55	2812,08
ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	BR/CD49B	-2,80	1,10

ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	CD49C/GAP-B3	-22,37	-2,75
ITGA4	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	CD49D/IA4	410,43	50,41
ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	CD49e/FNRA	42,73	-2,91
ITGA6	Integrin, alpha 6	CD49f/DKFZp686J01244	-4,29	16,50
ITGA7	Integrin, alpha 7	FLJ25220	4,64	4,77
ITGA8	Integrin, alpha 8	Integrin a8	1,63	-18,54
ITGAL	Integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)	CD11A/LFA-1	1,96	-7,07
ITGAM	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)	CD11B/CR3A	-47,74	-46,78
ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	CD51/DKFZp686A08142	1,02	-2,05
ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	CD29/FNRB	-2,29	1,99
ITGB2	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	CD18/LAD	-3,60	-153,48
ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	CD61/GP3A	46,14	6,38
ITGB4	Integrin, beta 4	CD104	-1,75	-1,03
ITGB5	Integrin, beta 5	FLJ26658	-208,62	-34,67
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	ADMLX/HHA	1,63	-160,06
LAMA1	Laminin, alpha 1	LAMA	1,63	-1,71
LAMA2	Laminin, alpha 2	LAMM	-9,51	-1,25
LAMA3	Laminin, alpha 3	BM600/E170	-5,08	1,95
LAMB1	Laminin, beta 1	CLM	1,97	157,30
LAMB3	Laminin, beta 3	BM600-125KDA/LAM5	-1092,56	-29,45
LAMC1	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	LAMB2	5,98	2,87
MMP1	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	CLG/CLGN	-7,34	-36,69
MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	SL-2/STMY2	-11,37	-30,93
MMP11	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	SL-3/ST3	19,72	17,10
MMP12	Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	HME/MME	-133,90	-13,21
MMP13	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	CLG3	-155,29	-1,71
MMP14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	MMP-X1/MT1-MMP	-10,05	1,37
MMP15	Matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	MT2-MMP/MTMMP2	-32,08	-6,05

MMP16	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	C8orf57/DKFZp761D112	-1,75	-89,29
MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	CLG4/CLG4A	-6,10	-6,16
MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	CHDS6/MMP-3	-5,19	-3,47
MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	MMP-7/MPSL1	-19702,62	-23,80
MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	CLG1/HNC	-1,55	-6,20
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	CLG4B/GELB	680,33	7,95
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	CD56/MSK39	2,68	-2,47
PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule	CD31/PECAM-1	-3,17	2,00
SELE	Selectin E	CD62E/ELAM	1,06	-54,26
SELL	Selectin L	CD62L/LAM-1	-21,63	-253,96
SELP	Selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)	CD62/CD62P	-5,60	-21,01
SGCE	Sarcoglycan, epsilon	DYT11/ESG	55,38	1,27
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	ON	16,32	1,13
SPG7	Spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)	CAR/CMAR	1,68	-1,15
SPP1	Secreted phosphoprotein 1	BNSP/BSPI	-4,73	-16,85
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	BIGH3/CDB1	2,07	14,22
THBS1	Thrombospondin 1	THBS/THBS-1	-113,01	-1425,03
THBS2	Thrombospondin 2	TSP2	17,47	2,16
THBS3	Thrombospondin 3	TSP3	10,36	1,10
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	CLGI/EPA	3,50	1,76
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	CSC-21K	-1,07	2,16
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	HSMRK222/K222	1,63	-5,45
CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B	DKFZp686H17246/TN	-2,17	-6,66
TNC	Tenascin C	HXB/TN	-2,03	1,14
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	CD106/DKFZp779G2333	-8,17	-5,15
VTN	Vitronectin	V75/VN	-1,99	-5,60
B2M	Beta-2-microglobulin	B2M	-1,00	9,68
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HGPRT/HPRT	2,24	-1,41
RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A	-2,35	-2,12
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate	G3PD/GAPD	1,04	-1,77

	dehydrogenase			
ACTB	Actin, beta	PS1TP5BP1	1,01	-1,83

Tabelle 8.2: Relative Expressionsdaten des PCR Arrays.

Die **fett** dargestellten Werte sind als überexprimiert gegenüber der Tumorzelllinie HT29 zu werten und die *kursiv* gedruckten Werte sind stark herunterregulierte Expressionswerte der Mammakarzinomzelllinien DU4475 und MCF7

8.3 Sicherheitstechnische Daten

R- und S-Sätze (Risiko- und Sicherheitssätze) sind kodifizierte Warnhinweise zur Charakterisierung der Gefahrenmerkmale von Gefahrenstoffen, also Elemente und Verbindungen sowie daraus hergestellten gefährlichen Zubereitungen. Die R-Sätze sind der Ausgangspunkt bei der Einstufung eines gefährlichen Stoffes. Liegen diese fest, so ergeben sich daraus sowohl die hierzu erforderlichen Gefahrenbezeichnungen mit Gefahrensymbolen als auch die nötigen S-Sätze.

8.3.1 Gefahrenstoffe

Gefahrenstoffe	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Acrylamid	T	R 45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62	S 53-45
Ammoniumperoxodisulfat	O, Xn	R 8-22-36/37/38-42/43	S 22-24-26-37
Citronensäure	Xi	R 36	S 26
3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid	Xn	R 20/22-40	S 28-36
Diethyldicarbonat	Xn	R 22-36/37/38	S 26-36
N,N-Dimethylformamid	T	R 61-20/21-36	S 53-45
Essigsäure 100 %	C	R 10-35	S (1/2)-23-26-45
Ethanol	F	R 11	S 7-16
Ethidiumbromid	T+	R 22-26-36/37/38-68	S (1/2)-26-28-36/37-45
Formalin 37 %	T	R 23/24/25-34-40-43	S 26-36/37/39-45-51
Guanidiniumthiocyanat	Xn	R 20/21/22-32-52/53	S 13-61
Levamisol	T	R 25	S 28-45
Naphtol-AS-bisphosphat	Xi	R 36/37/38	S 26-36
2-Mercaptoethanol	T, N	R 22-24-34-51/53	S 24-26-36/37/39-45-61
Methanol	F, T	R 11-23/24/25-39/23/24/25	S (1/2)-7-16-36/37-45

Natriumazid	T+, N	R 28-32-50/53	S (1/2)-28-45-60-61
Natriumdodecylsulfat	Xn	R 21/22-36/37/38	S 26-36/37
Natriumhydroxid	C	R 35	S (1/2)-26-37/39-45
Natriumnitrit	O, T, N	R 8-25-50	S (1/2)-45-61
Paraformaldehyd	Xn	R 20/22-37/38-40-41-43	S 26-36/37/39-45
Ponceau S	Xi	R 36/37/38	S 26-36
2-Propanol	F, Xi	R 11-36-67	S 7-16-24/25-26
Phenol	T, C	R 23/24/25-34-48/20/21/22-68	S (1/2)-24/25-26-28,6-36/37/39-45
Propidiumiodid	Xi	R 36/37/38	S 3/7-22-36/37/39-49-56
Salzsäure	C	R 34-37	S 26-36/37/39-45
Tetramethylethyldiamin	C, F	R 11-20/22-34	S (1/2)-16-26-36/37/39-45
Trichloressigsäure	C, N	R 35-50/53	S 26-36/37/39-45-60-61
Trichlormethan	Xn	R 22-38-40-48/20/22	S 36/37
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Xi	R 36/38	S 26
TritonX 100	Xn	R 22-41	S 24-26-39
Wasserstoffperoxid 30 %	C	R 34	S 3-26-36/37/39-45
Xylolersatz	Xn	R 10-36/37/38	S 26-27

Tabelle 8.3: Auflistung der einzelnen Gefahrenstoffe

8.3.2 Verzeichnis der Gefahrensymbole

O Brandfördernd

C Ätzend

F Leichtentzündlich

T Giftig

T+ Sehr giftig

Xn Gesundheitsschädlich

Xi Reizend

N Umweltgefährlich

8.3.3 Verzeichnis der R- und S-Sätze

Gefahrenhinweise (R-Sätze):

- R 8** Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen.
R 10 Entzündlich.
R 11 Leichtentzündlich.
R 22 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.

R 24	Giftig bei Hautkontakt.
R 25	Giftig bei Verschlucken.
R 26	Sehr giftig beim Einatmen.
R 28	Sehr giftig beim Verschlucken.
R 29	Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
R 34	Verursacht Verätzungen.
R 35	Verursacht schwere Verätzungen.
R 36	Reizt die Augen.
R 37	Reizt die Atmungsorgane.
R 38	Reizt die Haut.
R 39	Ernste Gefahr irreversiblen Schadens.
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.
R 41	Gefahr ernster Augenschäden.
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
R 44	Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
R 45	Kann Krebs erzeugen.
R 46	Kann vererbare Schäden verursachen.
R 50	Sehr giftig für Wasserorganismen.
R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
R 62	Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
R 68	Irreversibler Schaden möglich.

Kombination der R-Sätze:

R 20/21	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
R 20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken.
R 21/22	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
R 36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut.
R 37/38	Reizt die Atmungsorgane und die Haut.
R 39/23/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
R 42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich. Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei
R 48/20/21/22	längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
R 48/20/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken.
R 48/23/24/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

- R 50/53** Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
- R 51/53** Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
- R 52/53** Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

Sicherheitsratschläge (S-Sätze):

- S 3** Kühl aufbewahren.
- S 7** Behälter dicht verschlossen halten.
- S 13** Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.
- S 16** Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen.
- S 22** Staub nicht einatmen.
- S 23** Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen (Bezeichnung ist vom Hersteller anzugeben).
- S 24** Berührung mit der Haut vermeiden.
- S 26** Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
- S 27** Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen.
- S 28** Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben).
- S 28.6** Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglykol 400 und anschließend Reinigung mit viel Wasser.
- S 36** Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.
- S 37** Geeignete Schutzhandschuhe tragen.
- S 39** Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 45** Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
- S 49** Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- S 51** Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden.
- S 53** Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- S 56** Dieses Produkt und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
- S 60** Dieser Stoff und/oder sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
- S 61** Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Kombination der S-Sätze:

- S 1/2** Unter Verschluss aufbewahren.
- S 3/7** Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen Ort aufbewahren.
- S 24/25** Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.
- S 36/37** Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung

- tragen.
- S 36/37/39** Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 37/39** Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

8.4 Poster, Vorträge, Kongressteilnahmen

Poster/Kurzvortrag:

Characterization of EpCAM-Expression in breast cancer spread.

Stübke K, Schumacher U, Wicklein D, Nehmann N. 29. Deutscher Krebskongress. 24. – 27. Februar 2010, Berlin

Poster:

Characterization of EpCAM-Expression in breast cancer spread.

Stübke K, Schumacher U, Wicklein D, Nehmann N. 105th Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft. 26. – 29. März 2010, Hamburg

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher sowie meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Nina Nehmann für die Bereitstellung des Themas am Institut der Anatomie II (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf), durch die es mir ermöglicht wurde eine externe Doktorarbeit im medizinischen Fachbereich durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert danke ich für die Übernahme des schriftlichen Gutachtens für das Department Chemie.

Im Institut für Anatomie II herrschte jederzeit eine angenehme Arbeitsatmosphäre, wodurch die Promotionszeit doch wie im Fluge vergangen ist. Der gesamten Anatomie II Arbeitsgruppen danke ich daher für die gute Zusammenarbeit und Hilfeleistung.

Hierbei möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Daniel Wicklein bedanken, der mir bei der Zusammenstellung der FACS Daten helfend zur Seite stand. Außerdem danke ich Frau Susanne Feldhaus und Carsten Köpke für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei dem tierexperimentellen Teil meiner Arbeit. Bei der Aufarbeitung der Membranproteine gilt meine besonderer Dank Dagmara Niedzielska, die mir die Arbeit an der Ultrazentrifuge ermöglichte.

Herrn PD Dr. Jücker und seinem Labor, insbesondere Nicole Grabinski, danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Geräte zur RNA- und Protein-Extraktion.

Für die persönliche Unterstützung und für die kritische Durchsicht meiner Arbeit bin ich Frau Nehmann sehr dankbar.

Besonderer Dank gebührt auch meinen Eltern und meinem Freund Matthias. Ihre Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit war ein wichtiger Halt und eine gute Motivationsquelle.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur mit den angegebenen Methoden und Hilfsmitteln angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht, und die Inanspruchnahme fremder Hilfen ist namentlich aufgeführt.

Hamburg, Januar 2011

(Katrin Stübke)