Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Gynäkologie

Prof. Dr. med. Fritz Jänicke

Der Einfluss des Adhäsionsmoleküls ALCAM auf die Adhäsionseigenschaften von Mammakarzinomzellen

Dissertation

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

vorgelegt von: Judith Overhoff

aus Aachen

Hamburg 2014

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.07.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Dr. Karin Milde-Langosch

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **IV**

1 Einleitung **1**

1.1 Anatomie der weiblichen Brust 1

1.2 Das Mammakarzinom 2

1.2.1 Wachstum und Metastasierung des Mammakarzinoms 2

1.2.2 Epidemiologie des Mammakarzinoms 2

1.2.3 Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms 4

1.2.4 Charakterisierung eines Mammakarzinoms 5

1.2.5 Therapie des Mammakarzinoms 6

1.3 Adhäsionsmoleküle 8

1.3.1 Einteilung der Adhäsionsmoleküle 8

1.3.2 Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie 8

1.3.3 Bedeutung von Adhäsionsmolekülen bei Karzinomzellen 8

1.4 Der Metastasierungsvorgang 10

1.4.1 Ablauf der Metastasierung 10

1.4.2 Die Rolle von Ig-CAMs bei der Metastasierung 11

1.5 ALCAM/CD166 12

1.5.1 Der Aufbau von ALCAM/CD166/MEMD 12

1.5.2 Die Funktion von ALCAM 13

1.5.3 Der prognostische Einfluss von ALCAM auf Karzinome unterschiedlicher Genese 13

1.5.4 Die Bedeutung von ALCAM beim Mammakarzinom 14

1.6 Zielsetzung der Arbeit 16

2 Material und Methoden **17**

2.1 Zellbiologisches Material 17

2.1.1 Verwendete Zelllinien 17

2.1.2 Allgemeine Zellkultur 20

2.1.3 Passagieren der Zelllinien . . . 20
2.1.4 Cryokonservierung der Zellen . . . 21
2.1.5 Zählen und Einstellen von Zellzahlen . . . 21
2.2 ELISA Adhäsions-Versuche . . . 22
2.3 Durchflussversuch . . . 23
2.4 Western Blot-Verfahren . . . 26
2.4.1 Proteinextraktion aus Zellen . . . 26
2.4.2 Konzentrationsbestimmung der extrahierten Proteine . . . 27
2.4.3 Western Blot-Versuch . . . 27
2.4.4 Reblot-Verfahren . . . 31
2.5 Durchflusszytometrie . . . 31
2.6 Statistische Auswertung . . . 33

3 Ergebnisse **34**
3.1 Auswahl der Zelllinien . . . 34
3.2 ELISA Adhäsions-Versuche . . . 35
3.2.1 Adhäsionsverhalten von MCF-7-Zellen an Proteinen der extrazellulären Matrix . . . 35
3.2.2 Adhäsionsverhalten von MDA-MB-Zellen an Proteinen der extrazellulären Matrix . . . 38
3.3 Durchflussversuche . . . 43
3.3.1 Adhäsionsverhalten von MCF-7-Zellen an E-Selektin und Endothelzellen 43
3.3.2 Adhäsionsverhalten von MDA-MB-Zellen an E-Selektin und Endothelzellen . . . 46
3.4 Durchflusszytometrie . . . 51

4 Diskussion **55**
4.1 Der Einfluss des Adhäsionsmoleküls ALCAM auf die Adhäsionseigenschaften von Mammakarzinomzellen . . . 55
4.2 Der Einfluss von ALCAM auf das Adhäsionsverhalten von Karzinomzellen an Proteinen der extrazellulären Matrix . . . 56
4.3 Der Einfluss von ALCAM auf das Adhäsionsverhalten von Karzinomzellen im dynamischen Flussmodell an E-Selektin und humanen Endothelzellen . . . 57
4.4 Unterschiede bei der Adhäsion an Proteine der extrazellulären Matrix und an Endothelzellen . . . 61
4.5 Unterschiedliche Ergebnisse zwischen den Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 62

5 Zusammenfassung **63**

Literaturverzeichnis **I**

Danksagung **VI**

Lebenslauf **VII**

Eidesstattliche Versicherung **VIII**

Abkürzungsverzeichnis

4-OH-TAM	4-OH-Tamoxifen
μl	Mikroliter
Ak	Antikörper
ALCAM	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
ADH	Atypische Duktale Hyperplasie
APS	Ammoniumpersulfat
aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchonin Acid
BCL-2	B-Cell Lymphoma-2
BRCA-1	Breast Cancer-1
BSA	Bovine Serum Albumin
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CAM	Cell Adhesion Molecule
CD6/15/166	Cluster of Differentiation 6/15/166
C-Typ	Constant Type
DCIS	Duktales Carcinoma In Situ
DFS	Disease Free Survival
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
ER	Östrogen Receptor
E-Selektin	Endothelial-Selectin
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
Fc-Teil	Fragment Crystalline-Teil

FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
LCIS	Lobuläres Carinoma In Situ
G418	Geneticin 418
Her2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HPMEC	Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cell
Ig	Immunglobulin
kDa	kilo Dalton
M	molare Masse
MMP	Matrix Metalloproteinase
nm	Nanometer
OAS	Overall Survival
OPN	Osteopontin
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
PR	Progesteron Receptor
PSA	Prostate Specific Antigene
RFS	Recurrence Free Survival
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonucleid acid
SCC	Side Scatter
SDS	Sodiumdodecyl Sulfate
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline with TWEEN 20
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
TNM	Tumor;Nodes;Metastasis
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A
V-Typ	Variable Type

1 Einleitung

1.1 Anatomie der weiblichen Brust

Die Mamma setzt sich zusammen aus funktionsbestimmendem Drüsengewebe und formgebendem Bindegewebe. 12-15 Einzelmilchdrüsen (Lobi glandulae mammariae) und jeweils ein Milchgang (Ducus lactiferi) bilden den Drüsenapparat, welcher in der Brustwarze (Papilla mammaria) mündet. Abbildung 1.1 zeigt schematisch den Aufbau der Mamma.

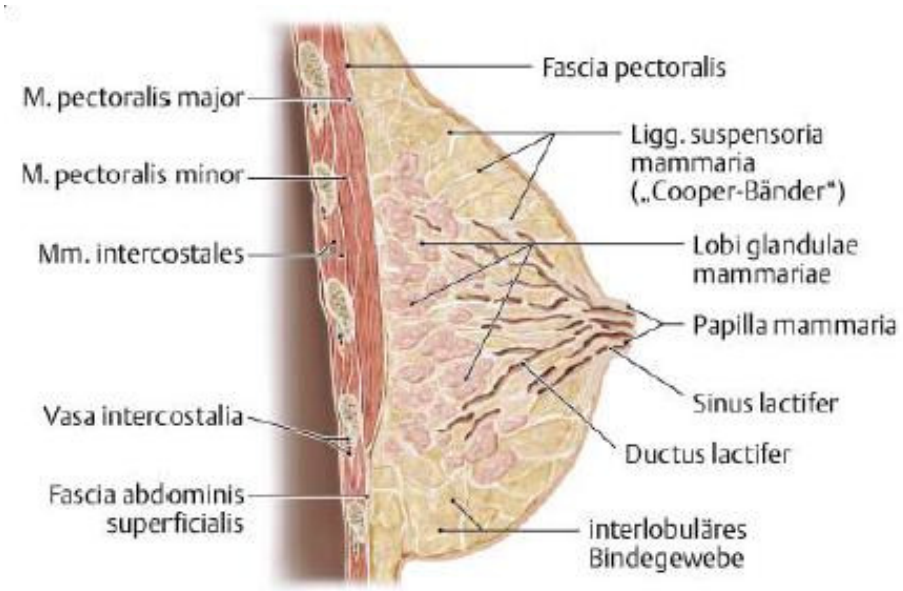

Abbildung 1.1: Anatomie der weiblichen Brustdrüse, Duale Reihe Anatomie, 2. Auflage, S.1176

Dieser Aufbau findet sich sowohl bei Männern als auch bei Frauen, wobei die weibliche Brust sich im Laufe der geschlechtlichen Entwicklung, bedingt durch die Wirkung von Sexualhormonen, stärker verändert. Eingeteilt wird die Mamma in vier Quadranten. Etwa 55% aller Mammakarzinome sind im oberen, äußeren Quadranten lokalisiert, nur etwa 5% im unteren, inneren.

1.2 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau. Unterschieden werden duktale Karzinome, welche vom Gewebe der Milchgänge ausgehen und lobuläre Karzinome, die vom Gewebe der Brustdrüsenläppchen ausgehen. Darüber hinaus gibt es seltenere Karzinome wie z.B. das tubuläre, das papilläre, das medulläre, das muzinöse oder gemischte Tumore. Prozentual machen duktale Karzinome etwa 80% der Fälle aus. Histopathologisch lassen sich Karzinome in invasive und nichtinvasive (DCIS: duktales Carcinoma in situ bzw. LCIS: lobuläres Carcinoma in situ) aufteilen (Breckwoldt et al., 2007).

1.2.1 Wachstum und Metastasierung des Mammakarzinoms

Das Wachstum eines Mammakarzinoms kann von schnell bis sehr langsam (über einen Zeitraum von 10-20 Jahren) variieren. Zu tasten ist eine Verhärtung ab einer Größe von etwa einem Zentimeter Durchmesser. Hat ein Karzinom eine Größe von zwei Zentimetern erreicht, liegt die Wahrscheinlichkeit, dass noch eine zweite Lokalisation vorliegt, bei 25%. Man spricht von einem multifokalen Geschehen, wenn sich dieser zweite Karzinomherd im gleichen Quadranten bildet und von multizentrischem Geschehen, wenn sich der zweite Herd in einem anderen Quadranten bildet. Die Metastasierung kann schon bei einem geringen Tumordurchmesser erfolgen, wobei zunächst überwiegend Lymphknoten im axillären Lymphabflussgebiet betroffen sind. Darauf folgend sind häufige Metastasierungsorte Knochen, Lunge, Pleura und Gehirn (Breckwoldt et al., 2007).

1.2.2 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Die folgenden Daten beziehen sich ausschließlich auf Deutschland und stammen aus dem Bericht des Robert Koch-Institutes zum Thema Krebs in Deutschland von 2007/2008. Das Lebenszeitrisiko an Brustkrebs zu erkranken liegt bei 9,2% was bedeutet, dass etwa jede elfte Frau im Laufe ihres Lebens erkrankt. Mit etwa 72000 Neuerkrankungen pro Jahr ist Brustkrebs die mit Abstand häufigste Krebserkrankung der Frau. Die Häufigkeit von Brustkrebs unter allen Krebsarten beträgt wie in Abbildung 1.2 zu sehen etwa 32% und zeigt zusätzlich prozentual die häufigsten Krebssterbefälle (etwa 17%).

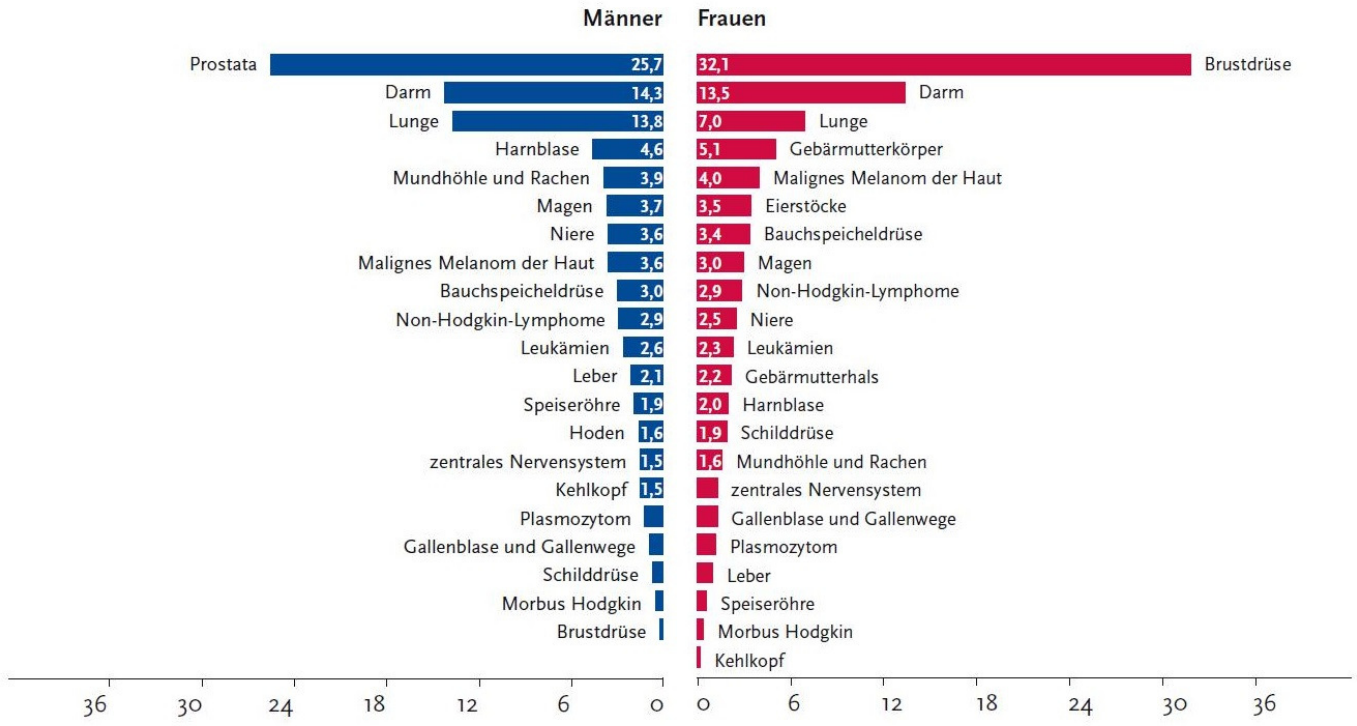

Abbildung 1.2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 (ohne melanotischen Hautkrebs) Quelle: Krebs in Deutschland 2007/2008, RKI.

Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 62,5 Jahren erkranken schon relativ junge Frauen. Das Risiko zu erkranken ist jedoch sehr abhängig vom Alter und steigt im höheren Alter stark an. Wie in Abbildung 1.3 zu sehen, beträgt die Inzidenz (das neue Auftreten von Brustkrebs) pro 100000 Frauen gleichen Alters im Zeitraum eines Jahres bei 38-jährigen etwa 51, während sie bei 80-jährigen bei etwa 272 liegt (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2006).

Altersgruppen	Frauen (pro 100.000)
1 bis 14	0,0
15 bis 34	10,3
35 bis 39	51,7
40 bis 44	101,8
45 bis 49	164,1
50 bis 54	228,8
55 bis 59	280,5
60 bis 64	290,1
65 bis 69	284,7
70 bis 74	264,3
75 bis 79	282,5
80 bis 84	272,1
85 bis 100	240,7

Abbildung 1.3: Schätzung der altersabhängigen Inzidenz pro 100.000 Frauen für Brustkrebs in Deutschland 2002, Quelle: GEKID, RKI: Krebs in Deutschland

1.2.3 Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms

Als vorrangige Risikofaktoren gelten ein hohes Alter (>60 Jahre), endokrine Faktoren wie eine frühe Menarche (<12 Jahre), keine oder späte (>30 Jahre) Gravidität, der Zustand nach vorangegangenem LCIS, DCIS oder Mammakarzinom, der Zustand nach atypischer duktaler Hyperplasie (ADH) und der Zustand nach zahlreichen Mamma-Biopsien. Darüber hinaus gibt es noch zahlreiche weitere Risikodeterminanten, die das Risiko zu erkranken positiv oder negativ beeinflussen können. So beeinflussen z.B. Hormonsubstitution, Alkoholkonsum, Rauchen, Übergewicht und das Vorliegen eines Diabetes mellitus das Risiko negativ, während aktive Bewegung und Stillen positiven Einfluss haben. Ein geringer Anteil der Brustkrebsfälle (etwa 5%) ist auf eine familiäre, genetische Prädisposition zurückzuführen. Vorrangig ist hier das Tragen einer Mutation im BRCA-1-Gen zu nennen, wodurch häufig schon Erkrankungen vor dem 40. Lebensjahr auftreten und ein Lebenszeitrisiko von 80% vorliegt (Breckwoldt et al., 2007).

1.2.4 Charakterisierung eines Mammakarzinoms

Bevor eine Therapie begonnen werden kann, wird ein Karzinom zunächst anhand mehrerer Stanzbiopsien eingeteilt. Wichtig dabei sind folgende Faktoren:

1. Die Typisierung des Karzinoms (duktal, lobulär etc.)
2. Das Grading des Tumors
3. Östrogenrezeptorstatus (ER-positiv oder ER-negativ)
4. Progesteronrezeptorstatus (PR-positiv oder PR-negativ)
5. HER2/neu-Status

Darüber hinaus ist das aktuelle Ausmaß der Metastasierung (Staging) für die Therapie von Bedeutung. Jüngste Untersuchungen führten zu einer weiterentwickelten Einteilung des Mammakarzinoms basierend zusätzlich auf der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67. So ergibt sich die Einteilung, laut Goldhirsch et al. (2011), in 5 verschiedene Untergruppen, welche in Abbildung 1.4 dargestellt sind.

Intrinsic Subtype (1)	Clinico-pathologic definition	Notes
Luminal A	**'Luminal A'** ER and/or PgR positive(76) HER2 negative (77) Ki-67 low (<14%)*	This cut-point for Ki-67 labelling index was established by comparison with PAM50 intrinsic subtyping (7). Local quality control of Ki-67 staining is important.
Luminal B**	**'Luminal B (HER2 negative)'** ER and/or PgR positive HER2 negative Ki-67 high	Genes indicative of higher proliferation are markers of poor prognosis in multiple genetic assays (78). If reliable Ki-67 measurement is not available, some alternative assessment of tumor proliferation such as grade may be used to distinguish between 'Luminal A' and 'Luminal B (HER2 negative)'.
	'Luminal B (HER2 positive)' ER and/or PgR positive Any Ki-67 HER2 over-expressed or amplified	Both endocrine and anti-HER2 therapy may be indicated.
Erb-B2 overexpression	**'HER2 positive (non luminal)'** HER2 over-expressed or amplified ER and PgR absent	
'Basal-like'	**'Triple negative (ductal)'** ER and PgR absent HER2 negative	Approximately 80% overlap between 'triple negative' and intrinsic 'basal-like' subtype but 'triple negative' also includes some special histological types such as (typical) medullary and adenoid cystic carcinoma with low risks of distant recurrence. Staining for basal keratins (79) although shown to aid selection of true basal-like tumors, is considered insufficiently reproducible for general use.

*This cut-point is derived from comparison with gene array data as a prognostic factor [7]. Optimal cut-points in Ki-67 labelling index for prediction of efficacy of endocrine or cytotoxic therapy may vary.
**Some cases over-express both luminal and HER2 genes.

Abbildung 1.4: Einteilung des Mammakarzinoms in intrinsische Subtypen nach Goldhirsch et al. (2011)

Diese Einteilung richtet sich nach dem Ansprechen auf eine mögliche Therapie. So haben z.B. Studien gezeigt, dass Tumore vom Luminal A-Typ nur schlecht auf eine Chemotherapie ansprechen. Als Konsequenz kann bei Patientinnen, die einen Luminal A-Typ-Tumor aufweisen, auf eine Chemotherapie verzichtet und intensiv mit einer endokrinen Therapie behandelt werden (Goldhirsch et al., 2011). *Basal-like*-Tumore bzw. Triple-negative-Karzinome, welche weder eine Her-2/neu- noch eine ER- oder PR-Expression aufweisen, gelten als *high-risk*-Tumore mit sehr schlechter Prognose. Die Prognose für eine Karzinomerkrankung wird oft anhand des Overall Survivals (OAS) und des rückfallfreien Intervalls (RFS: recurrance free survival oder auch DFS: disease free survival) gestellt. Das Overall Survival gibt die Zeit an, zwischen der Erstdiagnose einer Erkrankung bzw. dem Beginn einer Therapie und dem Versterben des Patienten, während das rückfallfreie Intervall angibt, wie lange ein Patient im Durchschnitt nach einer Behandlung ohne Progression der Erkrankung lebt.

1.2.5 Therapie des Mammakarzinoms

Im Zuge der personalisierten Therapie wird ein Karzinom, ausgehend von der Einteilung der Karzinome nach intrinsischem Subtyp, gezielt so behandelt, dass es bestmöglich auf die Therapie anspricht. Zur Verfügung stehen die lokale Operation des Tumorherdes mit entweder totaler Mastektomie oder brusterhaltender Operation. Schon intraoperativ kann die erste Bestrahlung des verbleibenden Gewebes um den exzidierten Tumor erfolgen, anschließend wird die komplette Mamma in mehreren Sitzungen bestrahlt, wobei eine Studie von Whelan et al. (2010) zeigen konnte, dass auch Patientinnen, die 16 statt 25 Bestrahlungssitzungen hatten, fast identische Daten hinsichtlich des rezidivfreien Intervalls zeigten. Liegt ein HER2/neu-positiver Tumor vor, sollte mittels Trastuzumab (Herceptin®), einem Antikörper gegen den HER2/neu-Rezeptor, therapiert werden. Abhängig vom Hormonrezeptorstatus wird eine endokrine Therapie, z.B. mit dem Östrogenrezeptor-Hemmer Tamoxifen, angewandt. Ob Patienten zusätzlich chemotherapeutisch, z.B. mit dem Zytostatikum Cisplatin, behandelt werden, hängt vom erwarteten Ansprechen des Tumors auf die Therapie ab. Je nachdem welcher Karzinom-Subtyp vorliegt, wird in unterschiedlichen Kombinationen dieser Therapiemöglichkeiten behandelt. Für Patientinnen, die an einem Hormonrezeptor-positiven Karzinom erkrankt sind, welcher im frühen Stadium mit nicht metastasiertem Karzinom erkannt wurde, gibt es die Möglichkeit das Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie mittels des Oncotype DX-Testes zu ermitteln. Dieser Gentest charakterisiert ein Mammakarzinom anhand von 21 verschiedenen, prognostisch relevanten Genen. Untersucht wird eine Gewebeprobe des Tumors neben dem ER-Rezeptorstatus auch auf den HER2/neu-Rezeptorstatus, auf Gene, die die Invasivität beeinflussen und auf Proliferationsmarker. Wird bei diesem Test eine gute Prognose ermittelt, kann von einer für die Patientin anstrengenden und nicht effizienten Chemotherapie

abgesehen werden. Abbildung 1.5 nach Goldhirsch et al. (2011) gibt einen Überblick darüber, welche Therapieoptionen bei welchem Karzinom-Subtyp angewandt werden.

'Subtype'	Type of therapy	Notes on therapy
'Luminal A'	Endocrine therapy alone	Few require cytotoxics (e.g. high nodal status or other indicator of risk: see text).
'Luminal B (HER2 negative)'	Endocrine ± cytotoxic therapy	Inclusion and type of cytotoxics may depend on level of endocrine receptor expression, perceived risk and patient preference.
'Luminal B (HER2 positive)'	Cytotoxics + anti-HER2 + endocrine therapy	No data are available to support the omission of cytotoxics in this group.
'HER2 positive (non luminal)'	Cytotoxics + anti-HER2	Patients at very low risk (e.g. pT1a and node negative) may be observed without systemic adjuvant treatment.
'Triple negative (ductal)'	Cytotoxics	
'Special histological types'*		
A. Endocrine responsive	Endocrine therapy	
B. Endocrine nonresponsive	Cytotoxics	Medullary and adenoid cystic carcinomas may not require any adjuvant cytotoxics (if node negative).

*Special histological types: Endocrine responsive (cribriform, tubular, and mucinous); Endocrine nonresponsive (apocrine, medullary, adenoid cystic and metaplastic).

Abbildung 1.5: Therapie ausgehend vom Subtyp des Mammakarzinoms nach Goldhirsch et al. (2011)

1.3 Adhäsionsmoleküle

1.3.1 Einteilung der Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle (CAM: cell adhesion molecule) spielen eine wichtige Rolle im Organismus. Über Ligand-Rezeptor-Bindungen zwischen zwei Zellen oder einer Zelle und der sie umgebenden Zell-Matrix, haben sie einen Einfluss auf die physiologische Entwicklung und Funktion von Geweben und Organen, sowie auf die Interaktion von Zellen untereinander und ihren Bezug zur Umgebung (Ofori-Acquah und King, 2008).
Es gibt vier Hauptgruppen von Adhäsionsmolekülen:

1. Integrine
2. Cadherine
3. Selektine
4. Ig-Superfamilie

1.3.2 Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie

Die Ig-Superfamilie (Immunglobulin-Superfamilie) bildet mit über 765 verschiedenen Proteinen eine der größten Proteingruppen im Körper des Menschen (Wong et al., 2012). Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie eine oder mehrere Kopien einer Immunglobulin-Sequenz besitzen. Bei membranständigen Proteinen ist diese extrazellulär gelegene Sequenz über einen transmembranösen und einen intrazellulär gelegenen Teil mit dem Zellinneren verbunden, worüber eine Kommunikation mit dem Inneren der Zelle stattfinden kann. Ig-CAMs arbeiten Calcium-unabhängig und können meist sowohl homophile als auch heterophile Bindungen eingehen. Es kommen neben membranständigen Ig-CAMs auch cytoplasmatische Formen vor.

1.3.3 Bedeutung von Adhäsionsmolekülen bei Karzinomzellen

Eine Zelle muss, wie von Hanahan und Weinberg (2000) beschrieben und von Colotta et al. (2009) ergänzt, 7 Kriterien erfüllen, damit von einer malignen Zelle gesprochen werden kann.

Dazu gehören:

1. ausreichende Menge an Wachstumssignalen
2. herabgesetztes Ansprechen auf Anti-Wachstums-Signale
3. Umgehung von Apoptose (programmierter Zelltod)
4. unendliches Replikationspotential
5. anhaltende Angiogenese (Gefäßneubildung)
6. Gewebeinvasion und Metastasierung
7. karzinomgebundene Entzündung

Abbildung 1.6 zeigt diese 7 Kennzeichen grafisch veranschaulicht.

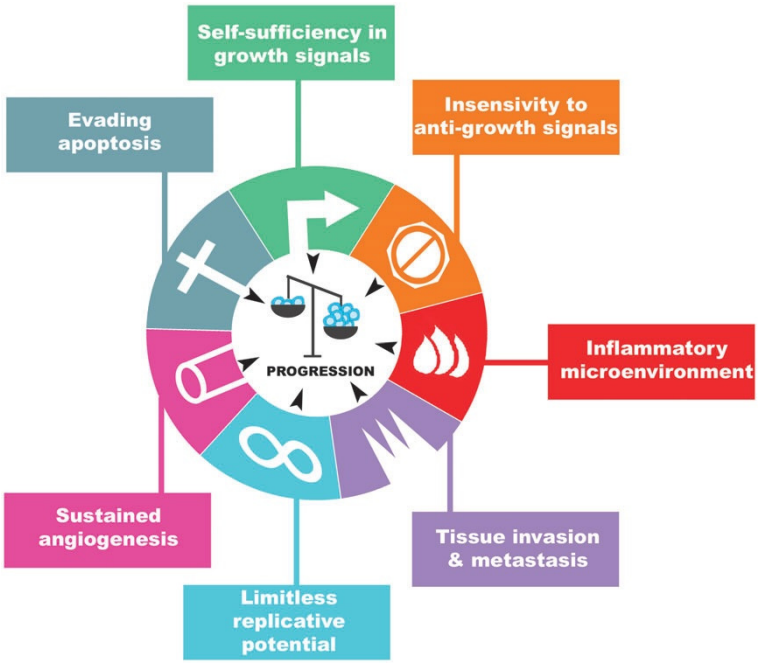

Abbildung 1.6: 7 Kennzeichen einer Karzinomzelle nach Colotta et al. (2009)

Bei jedem dieser Schritte spielen Adhäsionsmoleküle eine Rolle (Weidle et al., 2010).

1.4 Der Metastasierungsvorgang

1.4.1 Ablauf der Metastasierung

Durch den Metastasierungsprozess kommt es zum Absiedeln und Proliferieren von malignen Zellen potentiell an jede andere Lokalisation des Körpers, ausgehend vom Primärtumor unter Umgehung des Immunsystems. Nach der von Stephen Paget (1889) erstmals vorgestellten *seed and soil*-Theorie sind verschiedene Schritte für diesen Prozess notwendig, die in einer bestimmten Reihenfolge stattfinden müssen. Zunächst findet ein lokales Wachstum des Primärtumors statt, welcher in der Anfangsphase bei kleinem Durchmesser nur durch Diffusion ernährt werden kann. Mit zunehmender Größe kommt es, angeregt durch von den Zellen des Primärtumors sezernierten Angiogenesefaktoren, zu Gefäßneubildungen innerhalb des Tumors, wodurch die Versorgung mit Nährstoffen über die Blutzufuhr ermöglicht wird. Dadurch erhält der Tumor ein eigenes Gefäßnetz. Dieses besitzt, da es sehr schnell gebildet wurde, sehr dünne, instabile Gefäßwände. Nach Überqueren der endothelialen Basalmembran, kann es zum Einbruch des Tumors ins Gefäßsystem kommen. Bei diesem Schritt, der Invasion der Tumorzelle, können Zellen sowohl in die Blutbahn als auch in die Lymphbahn gelangen. In einer zum Blutkreislauf gehörenden Kapillare gelangen die Tumorzellen ausgehend vom Primärtumor in die Zirkulation und damit in den Rest des Körpers. Wird eine Tumorzelle im Laufe der Zirkulation nicht vom Immunsystem als solche erkannt und somit abgebaut, kann es an geeigneter Stelle zur Adhäsion der Tumorzelle an Gefäßwände kommen. Nach erneutem Durchbrechen der endothelialen Basalmembran, kommt es zur Extravasation der Tumorzelle und an neuer Lokalisation, bei einer günstigen Mikroumgebung, zur Proliferation und Bildung eines Tochtergeschwulstes. Diese Schritte der Metastasierung sind in Abbildung 1.7 grafisch dargestellt.

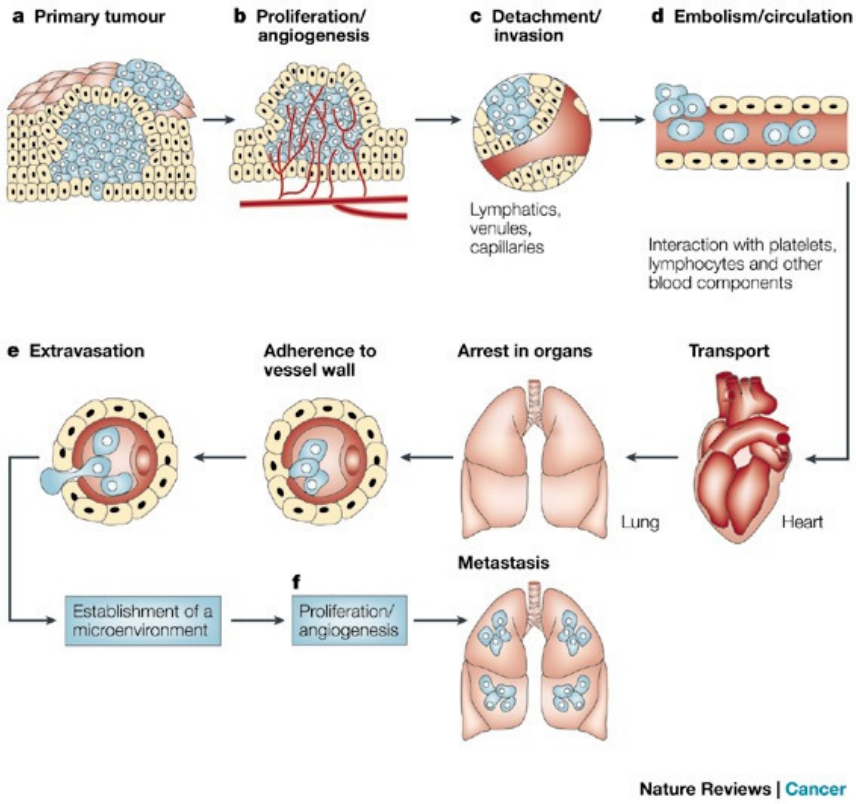

Abbildung 1.7: Hauptschritte der Metastasierung nach Isaiah J. Fidler (2003)

1.4.2 Die Rolle von Ig-CAMs bei der Metastasierung

Um die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen für den Metastasierungsprozess zu beschreiben, wird im folgenden der Einfluss von Adhäsionsmolekülen der Ig-Superfamilie auf die einzelnen Schritte der Metastasierung aufgezeigt.
Ein Charakteristikum von Karzinomzellen ist die Fähigkeit zur Umgehung der Apoptose. In verschiedenen Studien wurde herausgefunden, dass eine unterschiedliche Expression von Adhäsionsmolekülen der Ig-Superfamilie Einfluss auf die Apoptoseneigung einer Zelle und die damit verbundenen anti-apoptotischen Signale hat. So zeigten z.B. Hein et al. (2010), dass eine verminderte ALCAM-Expression in MDA-shALCAM-Zellen zu einer Verminderung der Apoptosehäufigkeit führt. Gleichzeitig wurde herausgefunden, dass bei einer verminderten ALCAM-Expression auch eine Herabregulierung von Proteinen (z.B. VEGF-A) stattfindet, die wichtig für die in Primärtumoren stattfindende Angiogenese sind. Damit die Möglichkeit einer Intravasation gegeben ist, gilt die Degradierung der extrazellulären Matrix durch die Karzinomzelle als weiterer wichtiger Schritt. Hier spielen Matrix Metalloproteinasen (MMPs), deren Aktivität durch Zell-Zell-Kontakte beeinflusst wird, eine große Rolle. Der Zusammen-

hang zwischen Zell-Zell-Kontakten, bzw. ALCAM-Zellmatrix-Kontakten als Voraussetzung für die Aktivierung von MMP-2 in Melanomzellen, konnte in einer Studie von van Lunter et al. (2005) gezeigt werden. Hinsichtlich der Invasivität konnte mit Hilfe von Invasionsassays nachgewiesen werden, dass durch ein Herabregulieren von ALCAM in MDA shALCAM-Zellen eine 80-90 prozentige Reduktion der Invasivität dieser Zellen erreicht wird (Hein et al., 2010). Um wieder aus dem Gefäßsystem herauszufinden, muss eine Metastase an Endothelzellen anhaften. Glinskii et al. (2005) konnten zeigen, dass dafür unter anderem eine Interaktion von Adhäsionsmolekülen mit Galektin-3, einem auch auf Endothelzellen vorkommenden Proteinrezeptor, verantwortlich ist, wobei Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie als Liganden für diesen dienen können (Wong et al., 2012).

1.5 ALCAM/CD166

1.5.1 Der Aufbau von ALCAM/CD166/MEMD

ALCAM (Acitvated Leucocyte Cell Adhesion Molecule) wurde zuerst in einer Arbeit von Bowen et al. (1995) als CD6-Ligand beschrieben und charakterisiert. Seinen Namen erhielt es, da es unter anderem auf aktivierten T- und B-Lymphozyten sowie Monozyten zu finden ist. Das Gen für ALCAM ist auf Chromosom 3 (3q13.1q13.2) lokalisiert. Exprimiert wird ALCAM von Zellen vieler unterschiedlicher Gewebearten, wie z.B. neuronalen Zellen, mesenchymalen Stammzellen, Stromazellen im Knochenmark und Osteoblasten (Weidle et al., 2010). ALCAM kann sowohl zytoplasmatisch als auch in einer membranständigen Form vorliegen. Als Mitglied der Ig-Superfamilie ist (membranständiges) ALCAM aufgebaut aus 5 Immunglobulinartigen Domänen – 2 V-Typ Domänen und 3 C2-Typ Domänen (VVC2C2C2) – mit einer Gesamtmasse von (glykosyliert) 100 – 105 kDa bzw. unglykosyliert 69 kDa. Die extrazelluläre Domäne besteht aus 500 Aminosäuren, der transmembranöse Teil aus 22 Aminosäuren und der kurze intrazellulär gelegene zytoplasmatische Teil aus 34 Aminosäuren. Abbildung 1.8 nach Weidle et al. (2010) zeigt den Aufbau von ALCAM.

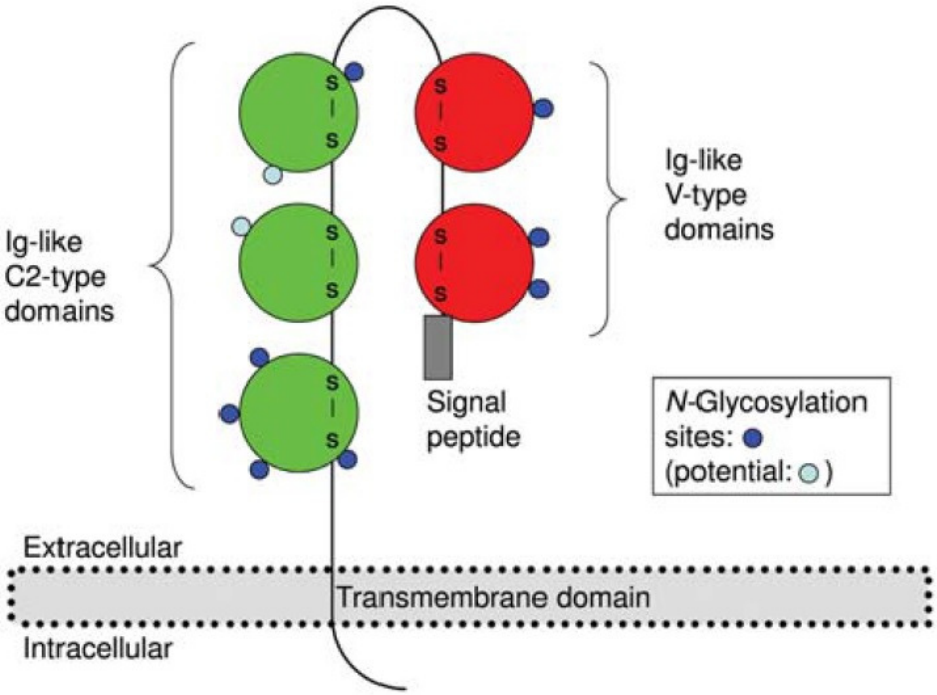

Abbildung 1.8: Aufbau von ALCAM nach Weidle et al. (2010)

1.5.2 Die Funktion von ALCAM

ALCAM kann sowohl homotypische Bindungen (zwischen ALCAM-ALCAM), als auch heterotypische Bindungen, z.B. zwischen ALCAM-CD6 (Bowen et al., 1995) oder ALCAM-L1CAM (Dippel et al., 2012), eingehen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass ALCAM durch Interaktion mit dem CD6-Rezeptor bei T-Zell-Proliferation, laut Zimmermann et al. (2005) sogar essentiell, mitwirkt. Darüber hinaus hat ALCAM eine stabilisierende Wirkung bei immunologischen Synapsen, ist an T-Zell-Aktivierung sowie bei transendothelialer Monozytenmigration (Ofori-Acquah und King, 2008) und vielen embryonalen Entwicklungsprozessen beteiligt. Auch in hoch proliferativen Geweben wird ALCAM gefunden, wie z.B. in hämatopoietischen Progenitorzellen oder im Wachstumshorn von Neuronen, wodurch ALCAM an der embryonalen Entwicklung des Encephalons mitwirkt (Swart, 2002).

1.5.3 Der prognostische Einfluss von ALCAM auf Karzinome unterschiedlicher Genese

In verschiedenen Studien wurde ALCAM in Zusammenhang mit unterschiedlichen Karzinomarten (z.B. im Melanom, Prostatakarzinom, Mammakarzinom, Kolorektalem Karzinom, Öso-

phaguskarzinom (Ofori-Acquah und King, 2008), sowie Ovarialkarzinom und Pakreastumoren etc.) untersucht, mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. In einer Studie von Kristiansen et al. (2004) z.B. wird zytoplasmatisches ALCAM zusammen mit CD24 als prognostischer Marker beim Prostatakarzinom vorgeschlagen, da Patienten mit Karzinomen, die sowohl CD24- als auch ALCAM-negativ sind, ein signifikant längeres PSA-freies Intervall zeigen (75 Monate vs. 46 Monate). Für das maligne Melanom konnten van Kempen et al. (2000) zeigen, dass ein höheres Clark Level und ein vertikaler Durchmesser von $\geq$ 1,5 mm mit einer höheren ALCAM-Expression korrelieren. In einer Studie von Mezzanzanica et al. (2008) konnte ein Unterschied zwischen zytoplasmatischem und membranständigem ALCAM festgestellt werden. Durch eine zu Beginn des Metastasierungsprozesses auftretende Internalisierung von membranständigem ALCAM steigt die Menge an zytoplasmatischem ALCAM in Ovarialtumoren mit höherem Grading. Umgekehrt kann in 67% der Ovarialkarzinom-Proben im Vergleich zu normalem Ovarialepithel ein vermindertes Auftreten von membranständigem ALCAM gemessen werden und zusätzlich ein schlechteres Overall Survival (OAS) bei Patienten mit höherer Konzentration an zytoplasmatischem ALCAM. Immunhistochemisch wurde hinsichtlich der Bedeutung von ALCAM bei Pankreaskarzinomen in einer Studie von Kahlert et al. (2009) eine positive Korrelation der Menge membranständigen ALCAMs und eines schlechteren OAS, sowie eines kürzeren, rückfallfreien Intervalls gezeigt.
Im Mausmodell konnten Wiiger et al. (2010) zeigen, dass Versuchstiere, die zuvor mit der Kolonkarzinomlinie HCT 116 behandelt worden waren, nach mehrmaliger Injektion eines ALCAM-Antikörpers (scFv173 single-chain antibody) ein geringeres Tumorwachstum zeigten, was auf einen Einfluss von ALCAM auf das Wachstum von Primärtumoren hinweist.

1.5.4 Die Bedeutung von ALCAM beim Mammakarzinom

Es wurden bereits verschiedene Studien zum Einfluss von ALCAM auf die Malignitätsentwicklung bei Brustkrebs durchgeführt, mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. Anhand immunhistochemischer Färbung wurde in einer Studie von Burkhardt et al. (2006) ein negativer Einfluss von ALCAM auf das Overall Survival und die Krankheitsprogression gemessen. Als Parameter wurde zusätzlich das rezidivfreie Intervall herangezogen. Es gab keinen Unterschied zwischen membranständigem und zytoplasmatischem ALCAM. Mit dem gleichen Antikörper, jedoch in einer anderen Konzentration und mit einer etwas anderen immunhistochemischen Methode, konnten Davies et al. (2008) in einer Studie dieses Ergebnis nicht bestätigen. Es zeigte sich, dass Tumore von Patientinnen, die Skelett-Metastasen entwickelt hatten, im Vergleich zu gesunden Patientinnen die geringste ALCAM-Expression aufwiesen und die ALCAM-RNA-Konzentration mit steigendem Grading und schlechterer Prognose abnahm. Aus der gleichen Forschungsgruppe wurde in einer Studie von King et al. (2004) eben-

falls herausgefunden, dass ALCAM einen eher positiven Effekt auf die Sterblichkeit hat, da eine geringere ALCAM-RNA-Menge mit vermehrten Metastasen, einem höheren Tumorgrad, einem schlechteren TNM-Status und einem schlechten Outcome korreliert. Tumore von Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen hatten weniger ALCAM-RNA als Tumore von Patientinnen ohne Metastasen. Jezierska et al. bestätigten dieses Ergebnis in einer Studie vom Juli 2006 und stellten die Hypothese auf, ALCAM könne als Tumorsupressor dienen. Die ALCAM/MMP-2-Relation ist signifikant niedriger in hochgradigen Tumoren, die gleichzeitig eine hohe MMP-2-Expression zeigen. Eine hohe MMP-2-Expression ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. In einer weiteren experimentellen Studie von 2006 zeigten Jezierska et al. einen Zusammenhang zwischen ALCAM und dem Vorhandensein von Östrogenen. Bei Karzinomzellen, die einen Östrogenrezeptor besitzen (z.B. MCF-7-Zellen), konnte ein Anstieg der ALCAM-Expression nach einer Behandlung mit 17-β-Estradiol und ein Abfall der ALCAM-Expression nach einer Behandlung mit einem anti-Östrogen (4-OH-TAM) gemessen werden. Bei Karzinomzellen ohne Östrogenrezeptor zeigte eine solche Behandlung keine Veränderung. Mammakarzinomzellen, die vermehrt ALCAM exprimieren, zeigten in dieser Studie weniger Apoptoseneigung. Ein Anstieg der ALCAM-Expression ging mit einer verminderten MMP-2-Expression einher und war gleichzeitig mit einer hohen Konzentration des Apoptoseinhibitors BCL-2 verbunden. Dieses Ergebnis konnte in einer Studie von Hein et al. (2010) nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich nach einer Behandlung mit dem Toxin Camtothecin eine vermehrte Apoptoseneigung bei Zellen, die mehr ALCAM exprimierten. Im Gegensatz zu anderen Studien konnte hier immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass eine hohe ALCAM-Protein-Expression beim duktalen Mammakarzinom mit einer vermehrten Metastasierung, insbesondere ins Knochenmark, und somit einer schlechteren Prognose einhergeht. Gemessen wurde an einem Kollektiv von 347 Patientinnen. Es wurde keine Unterscheidung zwischen zytoplasmatischem und membranständigem ALCAM vorgenommen. Im Hinblick auf das Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie zeigt sich ein prognostischer Vorteil für Frauen, deren Tumore eine hohe ALCAM-mRNA-Expression besitzen. Werden diese Frauen jedoch nicht chemotherapeutisch behandelt, scheint ALCAM einen eher prognostisch ungünstigen Einfluss zu haben (Ihnen et al., 2008). Bei einer weiteren Studie von Ihnen et al. (2010) wurden auf mRNA-Ebene Daten erhoben und eine Kombination von Osteopontin (OPN) und ALCAM als potentiell prognostischer Faktor in *high-risk*-Mammakarzinomen (Her2/neu- und ER-negativ) vorgeschlagen. Tumore mit einem hohen Osteopontin-Proteinlevel besitzen eine schlechte Prognose. Zusammen mit ALCAM kann nochmal zwischen diesen *high-risk*-Tumoren unterschieden werden. Die schlechteste Prognose hatten Tumore, die ER- und Her2-negativ waren und eine hohe Expression von OPN und eine geringe Expression von ALCAM zeigten. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass Tumore mit einer hohen ALCAM-Expression im Vergleich zu allen anderen Metastasen im Zuge des *homing* (gewebespezifische Metastasierung) überdurchschnittlich häufig Hautmetastasen aufweisen (Ihnen et al., 2011).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Zur Einteilung und besseren Beurteilung der Prognose, oder das Ansprechen eines Mammakarzinoms auf eine bestimmte Therapie, wird weitreichend geforscht, wobei die Bedeutung von auf molekularer Ebene wirkenden Proteinen in Zuge der personalisierten Medizin besonders eingehend betrachtet wird. Trotz der beschriebenen Bedeutung von ALCAM bei der Entwicklung und der Prognose von unterschiedlichen Tumoren konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, welchen Einfluss ALCAM als Adhäsionsmolekül auf molekularer Ebene im Metastasierungsvorgang hat. In der vorliegenden Arbeit soll daher der Einfluss des Adhäsionsmoleküls ALCAM auf die Adhäsionseigenschaften von Mammakarzinomzellen untersucht werden. Hierfür wird mit Hilfe von stabil transfizierten Zellklonen der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, welche eine unterschiedliche ALCAM-Expression aufweisen, das Adhäsionsverhalten dieser Zellen in statischen Versuchen an Proteinen der extrazellulären Matrix untersucht. Anschließend wird das Adhäsionsverhalten dieser Zellen im dynamischen Durchflussversuch an E-Selektin sowie an Endothelzellen beurteilt.

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologisches Material

2.1.1 Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Versuche mit zwei verschiedenen Adenokarzinom-Zelllinien durchgeführt, welche ursprünglich von der ATCC (*American Type Culture Collection*) zur Verfügung gestellt und 2009 zuletzt von der DSMZ Braunschweig authentifiziert wurden. Die Zellen der Zelllinie MCF-7 stammen aus dem Pleurapunktat einer 69-jährigen amerikanischen Patientin, bei der ein metastasiertes Adenokarzinom der Mamma diagnostiziert wurde. Sie sind Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptor-positiv und zeigen bei Western Blot-Versuchen eine niedrige ALCAM-Konzentration (Hein et al., 2010).
In Abbildung 2.1 sind MCF-7-Zellen in einer 100er Vergrößerung zu sehen.

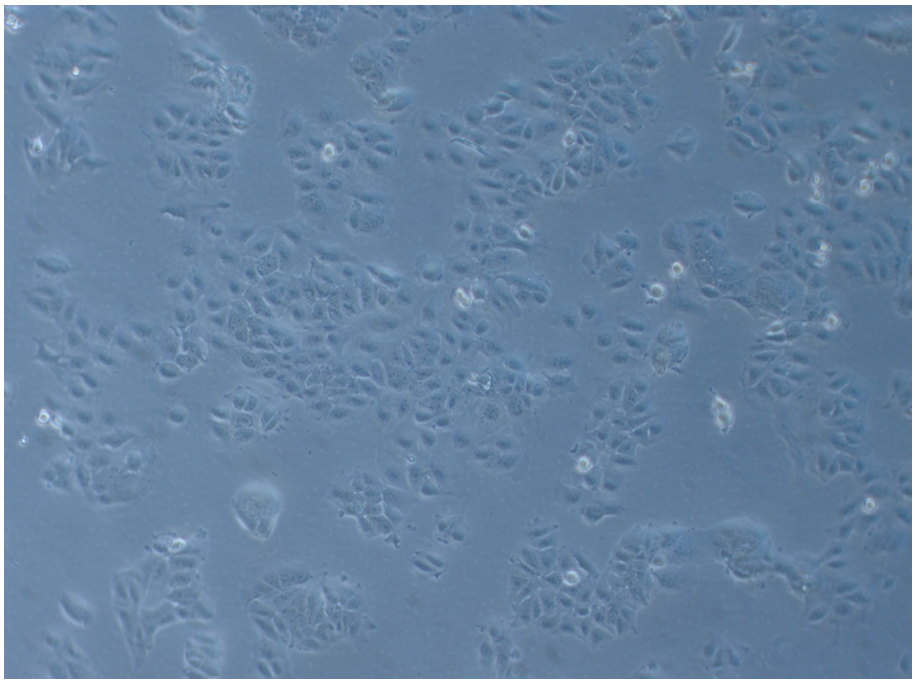

Abbildung 2.1: MCF-7-Zellen, 100er Vergrößerung

Die Zelllinie MDA-MB-231 entstammt dem Pleurapunktat einer 51-jährigen Patientin mit metastasiertem Adenokarzinom. Diese Zelllinie ist Östrogenrezeptor-negativ und zeigte in Western Blott-Versuchen hohe ALCAM-Konzentration (Hein et al., 2010). Neben den Ursprungszelllinien wurden stabil transfizierte Zellklone verwendet, welche bereits in einer vorherigen Arbeit beschrieben und für die Versuche zur Verfügung gestellt wurden (Hein et al., 2010). Um MCF-7-Zellen mit erhöhter ALCAM-Expression zu generieren, wurde der OmicsLink ORF Expressions Klon EX-H0002-M02 der Firma Gene Copoeia transfiziert, welcher die gesamte Länge des ALCAM-ORF (open reading frame) enthält. Stabil transfizierte Zellen (im folgenden MCF-7-ALC1-3 genannt) wurden mit G418 selektiert. MDA-MB-231 Zellen mit verminderter ALCAM-Expression wurden mit Hilfe eines pSilcencer 3.1-H1 puro Vektors der Firma Applied Biosystems/Ambion generiert. Stabil transfizierte Zellklone (im folgenden MDA-shALC #9 bzw. MDA-shALC #14 genannt) wurden mit Puromycin selektiert. Zur Negativ-Kontrolle (im folgenden MCF-NC bzw. MDA-NC genannt) dienten stabil mit einem Kontrollvektor EX-EGFP-MO2 (GeneCopoeia; für MCF-7) bzw. dem pSilencer 3.1-H1 puro negativ control Vektor (Ambion; für MDA-MB-231) transfizierte Zellen. Abbildung 2.2 zeigt Zellen der Linie MDA-shALC #14 in einer 100er Vergrößerung.

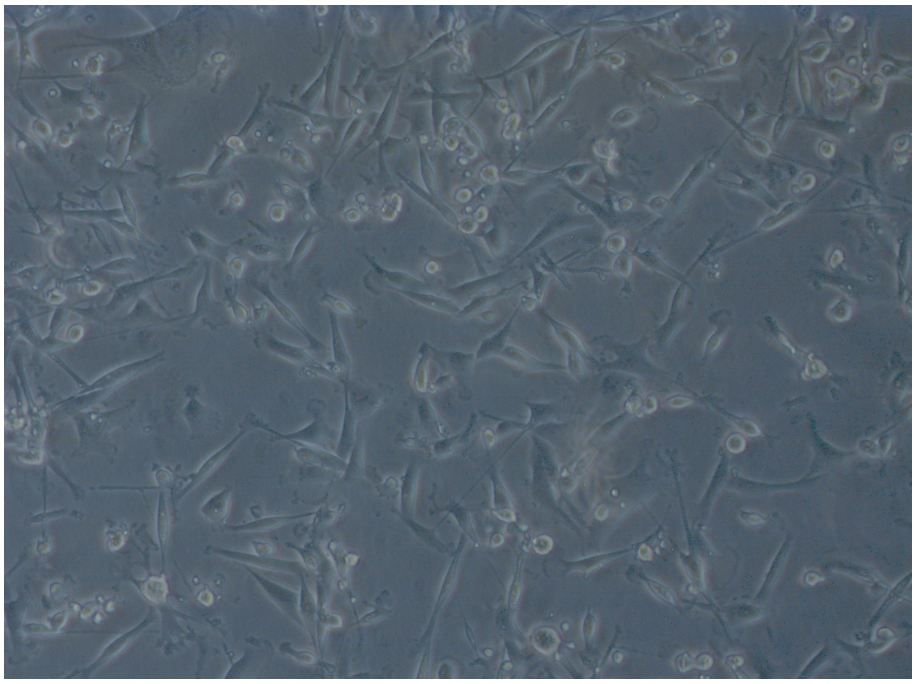

Abbildung 2.2: MDA-shALC #14, 100er Vergrößerung

Weiterhin wurden, um die Adhäsionsfähigkeit der zuvor beschriebenen Karzinomzellen an Endothelzellen zu testen, HPMEC (*Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells*) der Firma PromoCell verwendet. Abbildung 2.3 zeigt HPMEC bei einer 100er Vergrößerung.

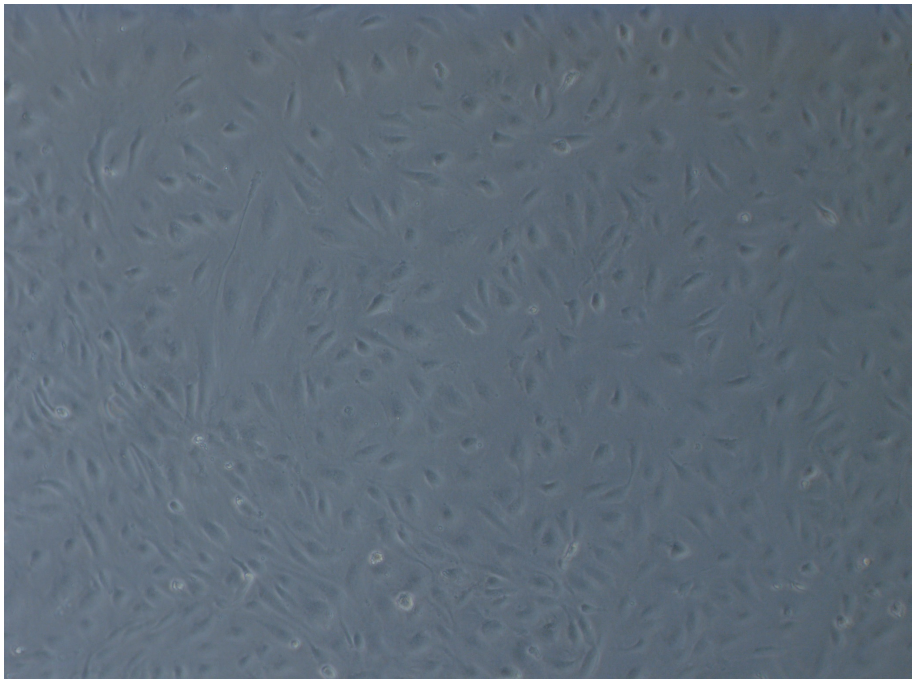

Abbildung 2.3: HPMEC, 100er Vergrößerung

2.1.2 Allgemeine Zellkultur

Um eine Kontamination der eukaryontischen Tumorzellen, z.B. durch Bakterien, zu vermeiden, wurde jede Arbeit unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden je nach Bedarf in Zellkulturflaschen der Größe T25 cm^2 oder T75 cm^2 kultiviert. Kultiviert wurden die Zellen im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und bei mit 5% CO2 angereicherter Luft. Ein Austausch des Kulturmediums fand alle zwei bis drei Tage statt.

Verwendete Kulturmedien:

Kulturmedium für MCF-7:
Dulbecco's Modified Essential Medium + L-Glutamin (DMEM)
HAM's F-12 Nutrient Mixture
Fötales Kälberserum (FCS) 10%
Penicillin/Streptomycin 1% 10000 U/ml / 10000 μg/ml (Stammlösung)
humanes Insulin 10 μg/ml

Kulturmedium für MDA-MB-231:
Dulbecco's Modified Essential Medium + L-Glutamin (DMEM)
HAM's F-12 Nutrient Mixture
Fötales Kälberserum (FCS) 10%
Penicillin/Streptomycin 1% 10000 U/ml / 10000 μg/ml (Stammlösung)

Zusammengesetzt waren die Medien der Karzinomzellen aus DMEM/HAM's F-12 (PAA Laboratories GmbH) im Verhältnis 1:1, 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO; Stammlösung: 10000 U/ml / 10000 μg/ml). Das Kulturmedium der MCF-7-Zellen enthielt zusätzlich 0,1% Insulin (Sigma-Aldrich; Stammlösung: 10 mg/ml). Das Medium der Endothelzellen setzte sich zusammen aus einem Basismedium (PromoCell) und einem Supplementmix (10%, PromoCell). Auf die Verwendung von Penicillin und Streptomycin wurde verzichtet.

Kulturmedium für Endothelzellen (HPMEC):
Endothelzellbasismedium
Supplementmix 10%

2.1.3 Passagieren der Zelllinien

Zum Passagieren einer Karzinom-Zelllinie wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-90% zunächst mit angewärmtem PBS gewaschen, daraufhin mit Trypsin/EDTA (GIBCO; 0,05%

Trypsin: 0,5 g/L; EDTA: 0,2 g/L) versetzt und bis zum Ablösen der Zellen auf einer Wärmeplatte (37°C) inkubiert. Anschließend wurden sie mit frischem, angewärmten Medium (Verhältnis Trypsin:Nährmedium: 1:10) resuspendiert und in ausreichender Verdünnung auf frische T25- bzw. T75-Kulturflaschen verteilt. Die Endothelzellen wurden ebenfalls bei einer Konfluenz von 70-90% mit angewärmtem PBS gewaschen, daraufhin jedoch mit Accumax (PAA) versetzt auf der Wärmeplatte inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit frischem angewärmten Medium (Verhältnis Accumax:Nährmedium: 1:10) resuspendiert, zentrifugiert (1100 RPM, 3 min, RT) und anschließend in der gewünschten Verdünnung auf Kulturflaschen verteilt.

2.1.4 Cryokonservierung der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden die Flaschen zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und anschließend abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit einem auf Eis gekühlten und mit 10% DMSO (Sigma-Aldrich) versetzten FCS resuspendiert und im Anschluss umgehend in Cryoröhrchen überführt. Diese wurden sofort in einer mit Isopropanol gefüllten Cryobox bei -80°C gelagert. Nach mindestens 24 Stunden wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Auftauen eines Cryoröhrchens, wurde dieses aus dem flüssigen Stickstoff genommen und möglichst rasch im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in zehn Milliliter angewärmtem Kulturmedium resuspendiert und, um das DMSO zu entfernen, zentrifugiert (1100 RPM, 7 min, RT). Nach erneuter Resuspension mit frischem Medium, wurden die Zellen in Kulturflaschen überführt und im Wärmeschrank untergebracht.

2.1.5 Zählen und Einstellen von Zellzahlen

Um für die Versuche eine möglichst gleiche Anzahl an Zellen pro Volumeneinheit zu verwenden, wurden die Zellen für jeden Versuch gezählt und auf die richtige Zahl eingestellt. Zum Zählen wurde eine Zählkammer von Neubauer verwendet. Auf die leicht angefeuchtete Oberseite der quadratischen Felder dieser Kammer wird ein geschliffenes Deckplättchen geschoben. Für das Zählen wurden die benötigten Zellen, ähnlich wie beim Passagieren, abgelöst und zehn Mikroliter dieser Zellsuspension mit zehn Mikroliter Trypanblau (0,05%) gemischt. Der Farbstoff dient zum Anfärben abgestorbener Zellen. Auf die Neubauer Zählkammer wurden je Objektträgerhälfte zehn Mikroliter angefärbter Suspension aufgetragen, welche durch Kapillarkräfte unter dem aufliegenden Deckplättchen auf dem Zählraster verteilt wurde. Lichtmikroskopisch konnte die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension durch Auszählen der Zellen und Bilden des Mittelwertes in den acht Quadraten ermittelt werden. Um die jeweils gewünschte Zellzahl in

den einzelnen Suspensionen einstellen zu können, wurde zunächst ein Verdünnungsfaktor mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{MWZellen*2*10^4/ml}$$

Anschließend wurde ausgerechnet, wie die Ausgangszellsuspension verdünnt werden muss, um die gewünschte Zellzahl zu erhalten.

$$V_{\text{gewünscht}} = \frac{\text{Ausgangsvolumen}}{\text{Verdünnungsfaktor}}$$

2.2 ELISA Adhäsions-Versuche

Paraformaldehydlösung 0,2 M 10 l:
284,2 g Na2HPO4
aqua dest.
pH 7,2-7,4

gepufferte 4% Paraformaldehydlösung 1l:
100 ml 37% Formaldehydlösung
500 ml 0,2 M Phosphatpuffer
400 ml aqua dest.

Mit den ELISA Adhäsions-Versuchen wurde die Adhäsionsfähigkeit der Tumorzellen an bestimmte Proteine der extrazellulären Matrix in statischem Versuchsaufbau untersucht. Die zu untersuchenden Proteine der extrazellulären Matrix wurden je nach gewünschter Konzentration verdünnt. Von jeder Proteinverdünnung wurden 50 μl in eine Vertiefung einer unbeschichteten 96-*Well*-Platte (Falcon) pipettiert. Je Zelllinie und Protein wurden drei Vertiefungen pro Versuch beschichtet. Als Negativ-Kontrolle dienten pro Zelllinie zwei *Wells*, welche nicht mit Protein beschichtet, ansonsten aber gleich behandelt wurden wie die restlichen. Die beschichtete 96-*Well*-Platte wurde über Nacht inkubiert, sodass sich die Proteine an den Wänden und am Boden der *Wells* absetzen konnten. Die im einzelnen getesteten Proteine sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: die für ELISA Adhäsions-Versuche verwendeten Proteine

Protein	Hersteller	Konzentration in μg/μl	Anzahl der Versuche mit MCF-7-Zellen	Anzahl der Versuche mit MDA-MB-231-Zellen
Kollagen 1	Roche	0,02	4	3
Kollagen 4	Sigma-Aldrich	0,02	5	3
Vitronektin	R&D Systems	0,02	3	2
Laminin	Sigma-Aldrich	0,1	2	2
Fibronektin	R&D Systems/ Harbor Bio-Products	0,4	2	7

Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen wie zuvor beschrieben bei 70-80% Konfluenz mit Accumax abgelöst. Nach zweimaligem Waschen der proteinbeschichteten *Wells* und der Negativ-Kontroll-*Wells* mit PBS wurden pro *Well* 100 μl Zellsuspension (eingestellt auf 100000 Zellen/100 μl) pipettiert und 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellsuspensionen abpipettiert und die *Wells* erneut mit PBS gewaschen, sodass nur noch die an den Proteinen haftenden Zellen in den *Wells* verblieben. Diese wurden 30 Minuten mit je 50 μl/ *Well* einer Paraformaldehydlösung (4%) bei Raumtemperatur fixiert. Der anschließende Färbeschritt wurde mit je 50 μl/ *Well* einer Kristall-violett-Lösung (Sigma-Aldrich) (0,1%) für 15 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Behandlung mit je 100μl einer Triton X-100-Lösung (5%) diente dem Abstoppen der Farbreaktion. Die photometrische Messung erfolgte anschließend bei einer Wellenlänge von 540 nm (Tecan SunriseTM).

2.3 Durchflussversuch

Im Durchflussversuch soll unter dynamischen Bedingungen die Situation in einer physiologischen postkapillären Venole simuliert werden. So ist es möglich unter anderem die Interaktion von Zellen mit Adhäsionsproteinen wie z.B. E-Selektin oder auch mit anderen Zellen, z.B. Endothelzellen, darzustellen. Mit Hilfe einer am Mikroskop angebrachten Kamera

kann während des Durchflussversuches genau beobachtet werden, wie Zellen mit verschiedenen Substanzen interagieren. Das benutzte Zellflussgerät wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Udo Schumacher (Institut für Anatomie, UKE Hamburg) zur Verfügung gestellt. Als Kapillarmodell wurden Kunststoff-μ-*Slides* vom Typ VI der Firma IBIDI verwendet, welche eine Kapillargröße von 0,4x3,8 mm und ein Fassungsvermögen von 30 μl haben.
Um die Interaktion der Zellen mit E-Selektin im Zellfluss zu testen, wurde rekombinantes humanes E-Selektin (R&D Systems) mit PBS auf eine Konzentration von 5 μg/ml verdünnt, und davon je 30 μl in einen μ-*Slide*-Kanal pipettiert. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde zusätzlich FCS (10%) so eingesetzt, dass eine Hälfte der μ-*Slide*-Kanäle mit E-Selektin, die andere Hälfte jedoch mit FCS beschichtet war. Um ein Absetzen der Proteine zu erreichen, wurden die μ-Slides für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Jede Zelllinie wurde pro Versuch durch eine mit E-Selektin beschichtete und eine mit FCS beschichtete Kapillare perfundiert.
Durch die Beschichtung der Kapillaren mit humanen Lungenendothelzellen kann die Physiologie eines Blutgefäßes nachgestellt und die Interaktion der malignen Zellen mit physiologischem Gewebe beobachtet werden. Für einen Durchflussversuch mit Endothelzellen wurden ca. 48 Stunden vor Versuchsbeginn ein bis zwei 80-90% konfluente T75-Kulturflaschen mit Endothelzellen mit Accumax abgelöst. Die Endothelzellen wurden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer auf 800000 Zellen/ml eingestellt und pro Kapillare 100 μl Zellsuspension einpipettiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Kulturmedium vorsichtig aus jeder Kapillare abgenommen und durch 100 μl frisches Medium ersetzt.
Am Versuchstag waren ca. 80-95% der Kapillaroberfläche mit Endothelzellen bewachsen. Vier Stunden vor Versuchsstart wurde das Medium in den Kapillaren erneut ersetzt. Hierbei wurde in eine Hälfte der Kapillaren normales Nährmedium pipettiert. Die andere Hälfte der Kapillaren wurde mit je 100 μl Medium gefüllt, welches mit TNF-α (10 ng/ml) angereichert war. Durch TNF-α Aktivierung zeigen Endothelzellen eine vermehrte Expression von Oberflächenproteinen, wie es auch in physiologischen Blutgefäßen der Fall ist. Um den Blutfluss im Venolenmodell nachzustellen, wurde eine Perfuserpumpe eingesetzt, bei der übergangslos verschiedene Geschwindigkeiten eingestellt werden können, welche zu unterschiedlichen Scherkräften in den Kapillaren führen. Am Versuchstag wurden je Tumorzelllinie ein bis zwei 80-90% konfluente T75er Kulturflaschen abgesaugt und mit Accumax gelöst. Die Suspensionen wurde mit der Neubauer Zählkammer auf 100000 Zellen/ml eingestellt. Mit Hilfe der Perfuserpumpe wurden die Kapillaren perfundiert, sodass eine bestimmte Fließgeschwindigkeit entstand (Einheit: ml/h), welcher bestimmte Scherkräfte (Einheit dyn/cm^2) zugeordnet werden können. Aufgrund der Anordnung und Form der Kapillaren konnte ein streng laminarer Fluss erzeugt werden.

Die Formel zum Umrechnen des Volumenflusses (ml/min) in Scherkräfte lautet:

$$\tau[\frac{dyn}{cm^2}] = 1{,}761\Phi[\frac{ml}{min}]$$

Alle Messungen wurden zunächst bei einer Flussrate von 16,8 ml/h und darauf folgend im gleichen Versuch bei 8,4 ml/h erhoben. Das Bild der Kapillare mit haftenden Zellen wurde 2 Minuten lang aufgezeichnet. Es wurde je Versuch und Kapillare an zwei verschiedenen Stellen gemessen. Bereits beim Versuch wurde darauf geachtet, ob und wie viele Zellen in einem bestimmten Areal im beschichteten Slide-Kanal hafteten. Das eingestellte Areal wurde im mittleren Bereich der Kapillare gesucht, da hier am ehesten laminare Strömung herrscht. Abbildungen 2.4 und 2.5 zeigen beispielhaft das Anhaften von MCF-7- bzw. MDA-MB-231-Zellen in Kapillaren mit unterschiedlicher Beschichtung jeweils bei einer Flussgeschwindigkeit von 8,4 ml/h.

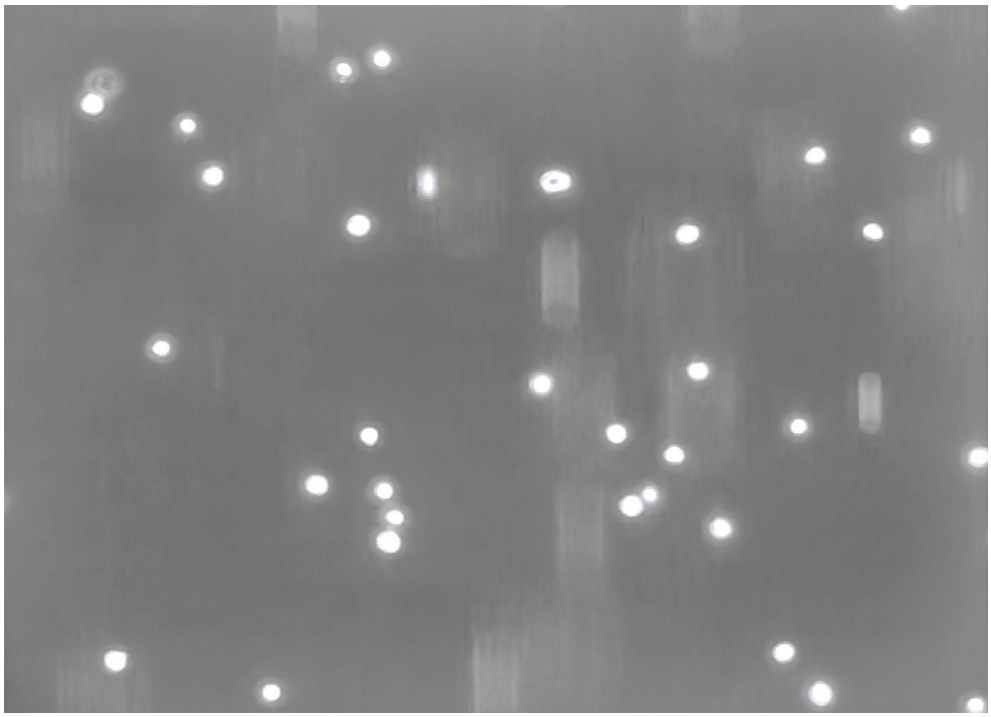

Abbildung 2.4: haftende MDA-MB-231-Zellen an einer mit E-Selektin beschichteten Kapillare

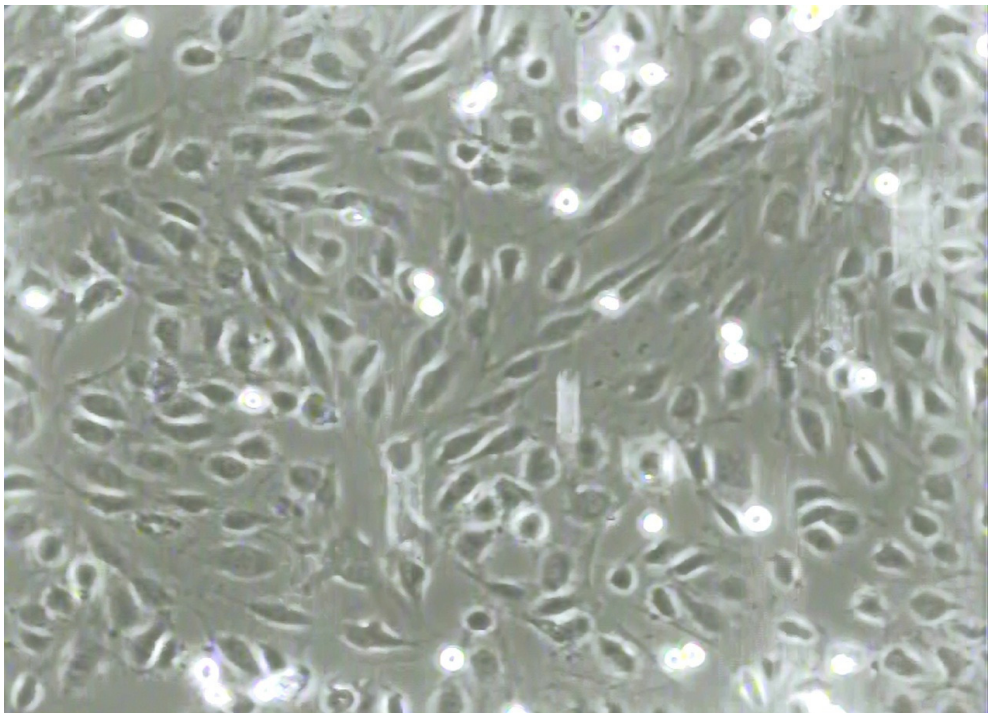

Abbildung 2.5: haftende MCF-7-Zellen an mit Endothelzellen ausgekleideter Kapillare

Zur Auswertung diente das Programm capimage (Dr. Zeintl; Heidelberg). Das Programm teilt das Blickfeld in 55 gleich große, vertikale Streifen (Kanäle) auf. Bleibt eine Zelle in einem dieser 55 Kanäle haften, leuchtet sie auf und kann so identifiziert werden. Pro Sekunde erzeugt das Programm 25 Bilder (3000 Bilder/2 min), welche in der Auswertung horizontal miteinander verknüpft werden, sodass eine haftende Zelle als hell aufleuchtende, horizontale Linie sichtbar wird.

2.4 Western Blot-Verfahren

2.4.1 Proteinextraktion aus Zellen

Lyse-Puffer:
RIPA-Puffer
Proteaseinhibitor (Sigma Verdünnung 1:100)
Phosphataseinhibitor (Calbiochem Verdünnung 1:50)

RIPA-Puffer:
Tris-HCL (7,5 mg/ml pH 7,4)
NaCl (9 mg/ml)
102,51% 100 mM EDTA
aqua dest.

Alle Arbeitsschritte für die Proteinextraktion fanden auf Eis statt. Zunächst wurde eine ausreichende Menge Lysepuffer hergestellt. Je eine konfluente T75-Kulturflasche wurde mit einem Milliliter Lysepuffer benetzt und die Kulturflasche in eine mit Eis gefüllte Schale gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden geschabt. Die dadurch entstandene Suspension aus Zelltrümmern und Lyse-Puffer wurde in ein 1,5 ml-Eppendorf Gefäß überführt, 30 Minuten auf Eis gelagert und währenddessen mehrmals auf dem Vortex homogenisiert. Das Eppendorf Gefäß wurde fünf Minuten bei 13000RPM zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung der extrahierten Proteine

Die Konzentrationsbestimmung fand mit Hilfe der Bicinchoninsäure-Methode (BCA-Methode) statt. Dabei reagieren zweiwertige Kupferionen mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen. Mit der Bicinchoninsäure zusammen zeigt sich ein violetter Farbstoff, welcher bei 562 nm Wellenlänge photometrisch gemessen werden kann. Anhand einer vorher durch BSA-Proteinstandards hergestellten Eichgerade bekannter Konzentrationen konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.4.3 Western Blot-Versuch

Rezepte:

10 x Anodenpuffer 1 l:
242,28 g Tris (Trizma-Base)
aqua dest.
HCL
pH 8,9

Anodenpuffer für die Anodenkammer 4 l:
400 ml 10 x Anodenpuffer
aqua dest.

10 x Kathodenpuffer 1 l:
121,14 g Tris (Trizma-Base)
179,2 g Tricine
aqua dest.
HCL
pH 8,25

Kathodenpuffer für die Kathodenkammer 250 ml:
25 ml 10 x Kathodenpuffer
2,5 ml 10% SDS
aqua dest

10% SDS-Lösung 100 ml:
10 g Sodiumdodecylsulfat-Natriumsalz
aqua dest.

3 x Gelpuffer 500 ml:
181,7 g Tris (Trizma-Base) 3M
aqua dest.
HCL
pH 8,45
15 ml SDS (10%)

0,5 M Trispuffer pH 6,8 10 ml:
6,05 g Tris
aqua dest.
HCL
pH 6,8

Pcsb1-Proteinpuffer 100 ml:
10 ml 0,5 M Trispuffer pH 6,8
10 ml 10% SDS
10 g Saccharose
aqua dest.

Pcsb2-Gellade-Denaturierungspuffer 10 ml:
1 g Saccharose
1 ml 0,5 M Trispuffer pH 6,8
4 ml 10
1-2 mg Bromphenolblau
3,5 ml aqua dest.
1,5 ml beta-Mercaptoethanol

10% Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) 10 ml:
1 g Ammoniumpersulfat
10 ml aqua dest.

10 x Transferpuffer 1 l:
121,41 g Tris (Trizma Base)
144,89 g Glycerin
aqua dest.

Transferpuffer für die Blotting-Kammer 5,5 l:
450 ml 10 x Transferpuffer
aqua dest.

10 x TBS 1 l:
24,22 g Tris (Trizma-Base)
80,06 g NaCL
aqua dest.
HCL
pH 7,6

10 % TWEEN 20 50 ml:
5 g TWEEN 20
aqua dest.

TBST-Waschpuffer 1 l:
100 ml 10 x TBS
5 ml 10% TWEEN 20
aqua dest.

Trenngel:
2 g 87% Glycerin
5 ml 3 x Gelpuffer mit SDS
3,75 ml 40% AA/BAA
4,25 ml aqua dest.
75 μl APS 10%
7,5 μl TEMED

Sammelgel:
0,75 ml 40% AA/BAA
1,55 ml 3 x Gelpuffer mit SDS
3,95 ml aqua dest.
75 μl APS 10%
7,5 μl TEMED

Blockingreagenz 5% 100 ml:
5 g Milchpulver
100 ml TBST

Blockingreagenz 1,5% 100 ml:
1,5 g Milchpulver
100 ml TBST

Das Western Blot-Verfahren wird dafür benutzt, Proteine nach ihrer Größe und Ladung auf einer SDS-*page* aufzutragen und anschließend beim eigentlichen Blotten auf einer Membran zu detektieren. Im ersten Arbeitsschritt wurde ein Polyacrylamidgel aus einem zehn-prozentigen Trenngel und einem zwölf-prozentigen Sammelgel mit zehn Taschen zusammengesetzt. Anschließend wurden die aus der Proteinextraktion vorbereiteten Proteine mit Pbsb1 und Pbsb2 auf 20 μl eingestellt und in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Nachdem das Gel in die Westernblotkammer überführt worden war, wurde diese mit zwei verschiedenen Elektrolytlösungen (einem Kathodenpuffer und einem Anodenpuffer) getrennt voneinander befüllt. Durch Anlegen einer Spannung wurden die Proteine der Zellextrakte nun entsprechend ihrer Größe und Ladung im Gel aufgetrennt (150 V). Zum Abschätzen der Größe der einzelnen Proteine, wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker (Thermo Scientific 10 kDa-260 kDa) aufgetragen. Im nächsten Arbeitsschritt, dem Blotting, wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, sodass sie im Anschluss daran detektiert werden konnten. Hierzu wurde die Membran zunächst in Methanol hydratisiert, dann in destilliertem Wasser gespült, in Transferpuffer geschwenkt und anschließend luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt. Befestigt zwischen in Transferpuffer geschwenktem Blottingpapier und Schwämmen wurde das Gel mit aufliegender Membran in eine Blottingkammer gestellt, welche mit Transferpuffer gefüllt wurde.
Um unspezifischen Bindungen vorzubeugen, wurde die für den nächsten Tag benötigte Blottingmembran in Blockreagenz 5% bei 4°C gelagert. Zur Proteindetektion wurde ein Immunoblot durchgeführt, wobei bestimmte Primär-Antikörper spezifisch an den auf der Membran haftenden Proteinen binden. Diese Primär-Antikörper können in einem zweiten Schritt mit einem an den Fc-Teil des Primär-Antikörpers bindenden Sekundär-Antikörper detektiert werden. Als Primär-Antikörper wurde ein monoklonaler Mausantikörper gegen humanes ALCAM (Novocast; 1:4000) eingesetzt. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran nach einer Stunde Inkubation mit dem Primär-Antikörper mehrmals mit TBST gewaschen. Anschließend wurde der Sekundär-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology; anti-mouse; 1:8000) mit auf die Membran gegeben. Beide Antikörper wurden mit 1,5% Blockingreagenz verdünnt. Nach Inkubation von einer Stunde wurde der mehrmalige Waschvorgang mit TBST wieder-

holt. Die Detektion fand im Anschluss mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion statt, wobei freigesetztes Licht auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Für diesen Vorgang wurde das Chemilumineszenz-Kit Super Signal von Pierce benutzt, von dem die beiden vorhandenen Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran aufgetragen wurden. Nach fünf-minütiger Inkubation wurde die Membran mit einer Folie umhüllt und in eine Röntgenfilmkassette überführt. In einer Dunkelkammer wurde auf die Membran in der Kassette ein Röntgenfilm gelegt, die Kassette verschlossen und, abhängig von der erwarteten Intensität der Lichtreaktion, mehrere Sekunden gewartet, bis der Film belichtet war. Abschließend wurde der Film maschinell entwickelt.

2.4.4 Reblot-Verfahren

Um sicher zu gehen, dass die Proteinproben, welche auf die verschiedenen Geltaschen aufgetragen wurden, gleiche Proteinmengen enthielten, wurde ein Reblot durchgeführt. Hierfür wurden zunächst von der zuvor mit anti-ALCAM detektierten Membran die Primär- und Sekundär-Antikörper entfernt. Dazu wurde die Membran im ersten Schritt mit einer 1:10 verdünnten *Reblot plus mild solution* von Millipore und anschließend zwei mal mit Blockingreagenz (5% Milchpulver in TBST) gewaschen. Daraufhin konnte eine zweite Detektion stattfinden, wobei ebenfalls mit einem Primär- und einem Sekundär-Antikörper gearbeitet wurde. Als Primär-Antikörper wurde ein monoklonaler Mausantikörper gegen HSC 70 (Santacruz; 1:100000) eingesetzt. Bei dem Sekundär-Antikörper handelte es sich erneut um einen gegen Maus-IgG gerichteten Ziegenantikörper (Santacruz 1:8000).

2.5 Durchflusszytometrie

<u>FACS-Puffer 2 500 ml:</u>
2,5 ml Na-Acid (10%)
500 ml PBS (Mg+/Ca+)
5 g FCS

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, um Zellen anhand ihrer Form, Struktur oder Färbung zu analysieren. Hierfür werden in einem Versuch meist mehrere Tausend Zellen über eine feine Glaskapillare in ein Durchflusszytometer gesaugt und an einem Laserstrahl vorbei geführt. Das dabei an den Zellen gebrochene Licht wird von dem Gerät detektiert, ausgewertet und in sogenannten Dot-Plot-Diagrammen grafisch dargestellt. In dieser Diagrammform entspricht ein Punkt jeweils einer Zelle. Bei den Dot-Plot-Diagrammen wird das Licht, welches seitlich im 90° Winkel von den Zellen gestreut wird (Side Scatter, SCC), gegen das Licht, welches in einem flachen Winkel streut (Forward Scatter, FSC) aufgetragen. Die Intensität

von FSC ist hierbei abhängig von der Größe einer Zelle, während das SCC abhängig ist von der Granularität, Größe und äußeren Form einer Zelle. Zusätzlich zu den bereits genannten Eigenschaften kann eine Zelle, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, anhand der Intensität der Fluoreszenz detektiert werden. Ist dieser Fluoreszenzfarbstoff an einen Antikörper gebunden, erlaubt diese Methode den quantitativen Nachweis bestimmter zellulärer Oberflächenproteine. Hierfür wird zunächst ein oberflächlich gelegenes Protein spezifisch mit einem Primär-Antikörper gebunden. An diesen bindet in einem zweiten Schritt ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehener Sekundär-Antikörper. Durch den Einsatz verschiedener Filter am FACS-Gerät können unterschiedlich farbig fluoreszierende Sekundär-Antikörper eingesetzt werden. Nachfolgend kann eine quantitative Aussage über den Proteingehalt der Zellen getroffen werden, indem man z.B. in Form eines Histogramms die Zellzahl gegen die Intensität der Fluoreszenz graphisch aufträgt. Untersucht wurden die Zellen der Linie MDA-MB-231, jeweils die Ursprungs-Zelllinien, die Negativ-Kontrolle (MDA-NC), sowie die bereits beschriebenen Zellklone (MDA-shALC # 9, MDA-shALC # 14). Als sekundärer Fluoreszenz-Antikörper wurde ein polyklonaler anti-mouse Ziegenantikörper gekoppelt mit FITC (Fluorescein Isothiocyanate) (DAKO; 1:100) eingesetzt. Bei jedem Versuch wurde ebenfalls eine Isotypkontrolle mitgeführt, um das Ausmaß unspezifischer Bindungen an die untersuchten Zellen zu zeigen. Um zwischen dem Anteil an vitalen und nicht vitalen Zellen zu unterscheiden, wurde jede Probe vor der Messung mit Propidiumiodid angefärbt. Dieser Farbstoff wird stärker von nicht vitalen Zellen aufgenommen, sodass eine größere Farbintensität bei diesen Zellen gemessen werden kann. So gelingt es, die beiden Zellsorten getrennt voneinander zu betrachten. Untersucht wurden in dieser Arbeit das Vorhandensein der Kohlenhydratstrukturen Sialyl-Lewis X (Cd 15-s, E-Selektin-Ligand) und Sialyl-Lewis A (CA 19-9, E- und P-Selektin Ligand) sowie ALCAM. Tabelle 2.2 zeigt einen Überblick der verwendeten Antikörper.

Tabelle 2.2: Verwendete FACS-Antikörper

Primär-Ak	Hersteller	Sekundär-Ak	Fluorochrom	Isotyp
CD15s 0,2μg/ml	B&D Systems	Goat anti-mouse	FITC 1:100	Mouse-IgM 1:100
CA19-9 0,2μg/ml	Abcam	Goat anti-mouse	FITC 1:100	Mouse-IgM 1:100
ALCAM 0,5μg/ml	R&D Systems	Goat anti-mouse	FITC 1:100	Mouse-IgG1 0,5g/ml

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, mit Accumax gelöst, auf 200000 Zellen/ Facs-

Röhrchen eingestellt und zentrifugiert. Nach wiederholtem Waschen mit jeweils 500 μl PBS und erneutem Zentrifugieren, wurden die Zellen 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C mit dem Primär-Antikörper inkubiert. Anschließend wurden erneut 500 μl PBS je Röhrchen hinzugefügt und zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes inkubierten die Zellen, ähnlich wie beim Primär-Antikörper, 20 Minuten lang im Dunkeln bei 4°C mit dem Sekundär-Antikörper und wurden gleichzeitig mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gefärbt. Nach erneutem Waschen mit PBS und Hinzufügen von fünf Mikroliter Propidiumbromid fanden die Messungen statt. Gemessen wurde am Durchflusszytometer FACS Calibur System der Firma Becton Dickinson. Die Auswertung fand mit dem Programm Cell Quest Pro (Becton Dickinson) statt.

2.6 Statistische Auswertung

Von allen ELISA Adhäsions-Versuchen und Durchflussversuchen wurden überwiegend mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung fand mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Version 21) statt. Alle Versuche wurden mittels Oneway-Anova, einem Signifikanz-Wert von 0,05 und einem 95%-Intervall ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl der Zelllinien

In einer vorangegangenen Arbeit wurden MCF-7-Zellen stabil mit ALCAM transfiziert und charakterisiert (Hein et al., 2010). Diese Zellen (MCF-7-ALC1-3) zeigten im Western Blot-Versuch reproduzierbar eine Hochregulierung von ALCAM. Ebenso wurden MDA-MB-231-Zellen mit Hilfe von shRNA stabil transfiziert, sodass eine Herabregulierung von ALCAM stattfand (MDA-shALC #9 ; MDA-shALC #14). Als Negativ-Kontrolle dienten stabil mit einem Kontrollvektor transfizierte Zellen (MCF-NC und MDA-NC). Diese transfizierten Zellen wurden für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Eine erneute Kontrolle des ALCAM-Expressionsverhältnisses wurde mittels Western Blot durchgeführt. Hierbei zeigte sich das erwartete Ergebnis. Der Klon MCF-7-ALC1-3 sowie die Linien MDA-MB-231 und MDA-NC zeigen im Western Blot eine höhere ALCAM-Konzentration im Vergleich zu den anderen Zelllinien (Siehe Abbildung 3.1).

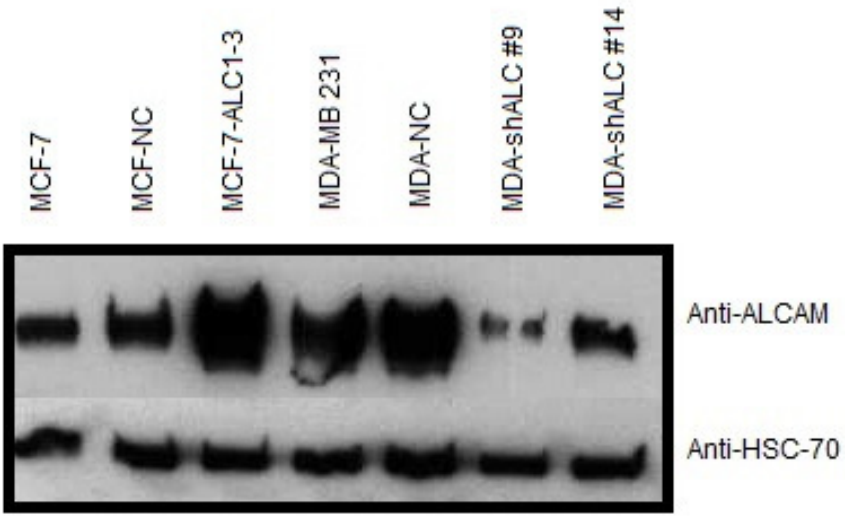

Abbildung 3.1: Western Blot-Analyse zu ALCAM

3.2 ELISA Adhäsions-Versuche

Die extrazelluläre Matrix spielt für die Physiologie eines Gewebes eine große Rolle. Proteine der extrazellulären Matrix wirken unterstützend bei der Formgebung einer Zelle bzw. eines Gewebes. Darüber hinaus sind sie an der Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen beteiligt und wirken über verschiedene Signalkaskaden auf das Überleben und die Differenzierung einer Zelle (Joyce und Pollard, 2009). Der Kontakt zwischen Karzinomzellen und Proteinen der extrazellulären Matrix ist auch bei der Metastasierung wichtig. Sowohl bei der Invasion ins Gefäßbett, als auch bei der Evasion aus dem Gefäßbett interagiert eine Karzinomzelle mit der sie umgebenden Matrix. Hierbei ist insbesondere die Degradierung dieser Matrix durch Matrixmetalloproteinasen (z.B. MMP-2) von Bedeutung für die Metastasierung (van Lunter et al., 2005). Mit den ELISA Adhäsions-Versuchen wurde das Adhäsionsverhalten der verschiedenen Zelllinien an Proteinen der extrazellulären Matrix unter statischen Bedingungen untersucht. Um festzustellen, ob es einen Unterschied im Adhäsionsverhalten der Zellen gibt, wurden die gemessenen Extinktionswerte der Zellklone mit den Extinktionswerten der jeweiligen Negativ-Kontrolle verglichen. Untersucht wurde das Adhäsionsverhalten an Kollagen 1, Kollagen 4, Vitronektin und Laminin. Zusätzlich wurde das Adhäsionsverhalten von MDA-MB-231-Zellen an Fibronektin ermittelt. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm.

3.2.1 Keine signifikanten Unterschiede im Adhäsionsverhalten von MCF-7-Zellen an Proteinen der Extrazellulärmatrix

Im ELISA-Versuch mit Zellen der Linie MCF-7 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Adhäsionsverhalten der Ursprungslinie, der Negativ-Kontrolle (MCF-NC) und des Klons (MCF-7-ALC1-3) mit vermehrter ALCAM-Expression. Auch eine Tendenz zu einem stärkeren oder schwächeren Haften der Zellklone konnte nicht festgestellt werden. Die Abbildungen 3.2, 3.3, 3.4 und 3.5 zeigen die Extinktion beim Adhäsions-Versuch der MCF-7-Zellen an Kollagen 1 [0,02 μg/μl], Kollagen 4 [0,02 μg/μl], Vitronektin [0,02 μg/μl] und Laminin [0,1 μg/μl].

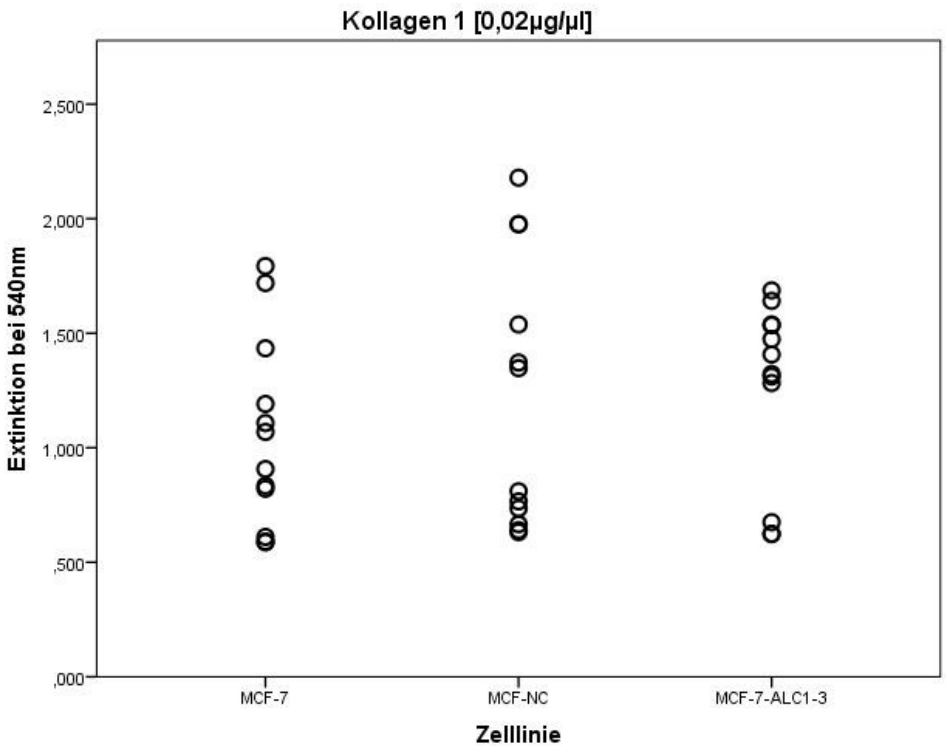

Abbildung 3.2: Extinktion gemessen bei 540 nm beim ELISA Adhäsions-Versuch von MCF-Zellen an Kollagen 1

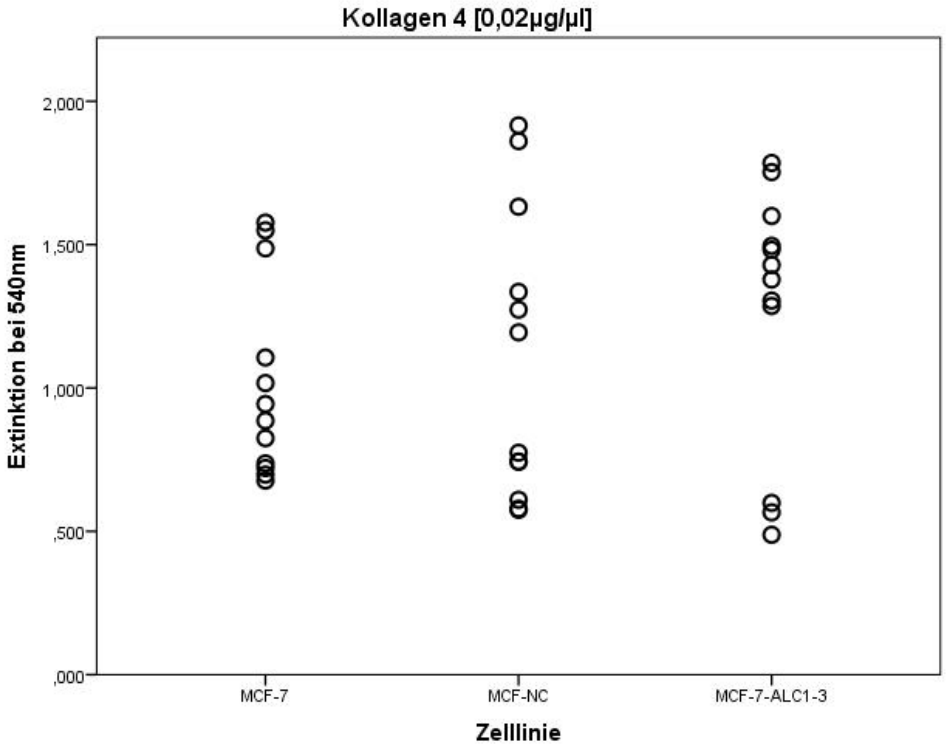

Abbildung 3.3: Extinktion gemessen bei 540 nm beim ELISA Adhäsions-Versuch von MCF-Zellen an Kollagen 4

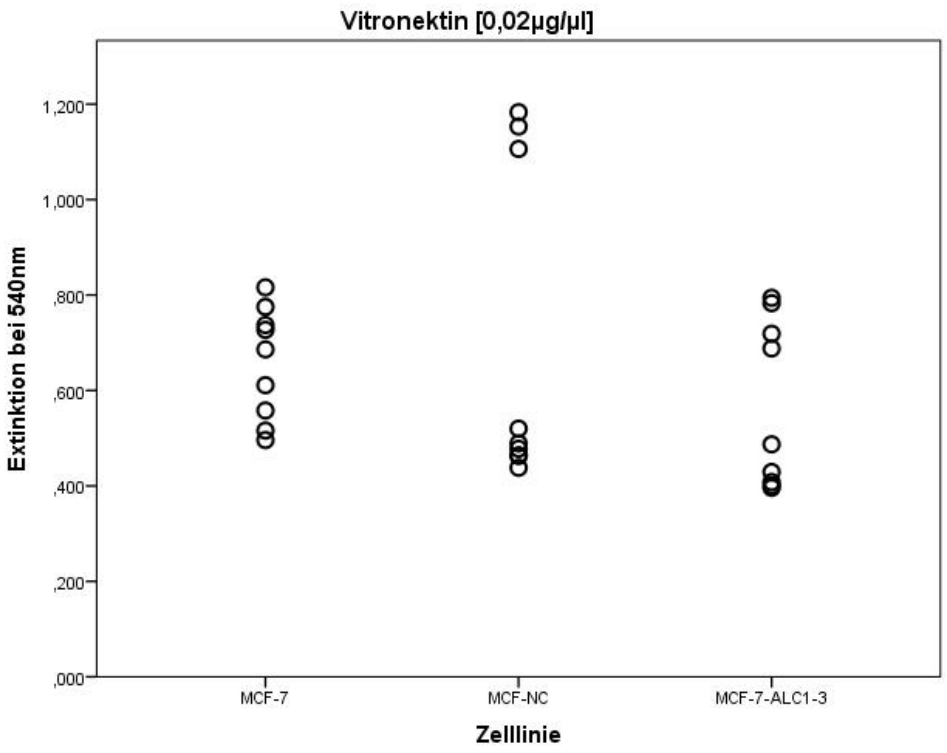

Abbildung 3.4: Extinktion gemessen bei 540 nm beim ELISA Adhäsions-Versuch von MCF-Zellen an Vitronektin

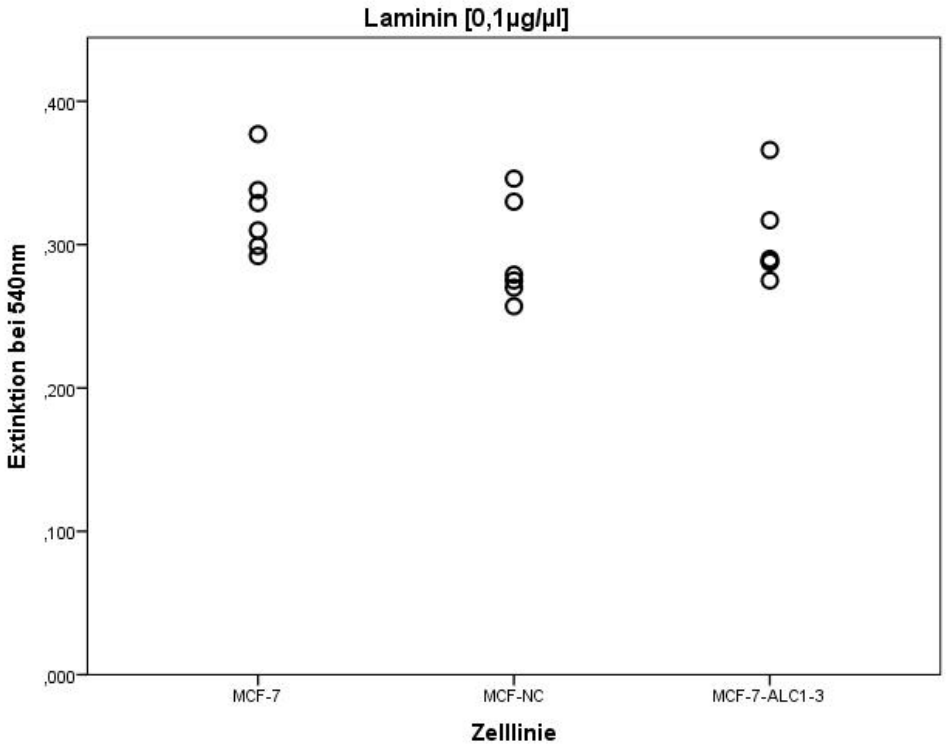

Abbildung 3.5: Extinktion gemessen bei 540 nm beim ELISA Adhäsions-Versuch von MCF-Zellen an Laminin

3.2.2 Unterschiede im Adhäsionsverhalten von Zellen der Linie MDA-MB-231 an Proteinen der Extrazellulärmatrix

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der ELISA-Versuche mit MCF-7-Zellen zeigten sich bei den Versuchen mit Zellen der Linie MDA-MB-231 statistisch signifikante Unterschiede im Adhäsionsverhalten an Proteinen der extrazellulären Matrix. Im Versuch mit Kollagen 1 hafteten sowohl der Klon MDA-shALC #14 (p=0,0002) als auch der Klon MDA-shALC #9 (p=0,032) im Vergleich mit der als Referenz gewählten Negativ-Kontrolle MDA-NC signifikant stärker. Signifikante Abweichungen sind in den folgenden Abbildungen mit einem Sternchen markiert. In Abbildung 3.6 ist die Extinktion bei dem Adhäsionsversuch von MDA-Zellen an Kollagen 1 [0,02 μg/μl] zu sehen. Tabelle 3.1 zeigt die relative Extinktion, gemessen beim Adhäsions-Versuch an Kollagen 1, gemittelt aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

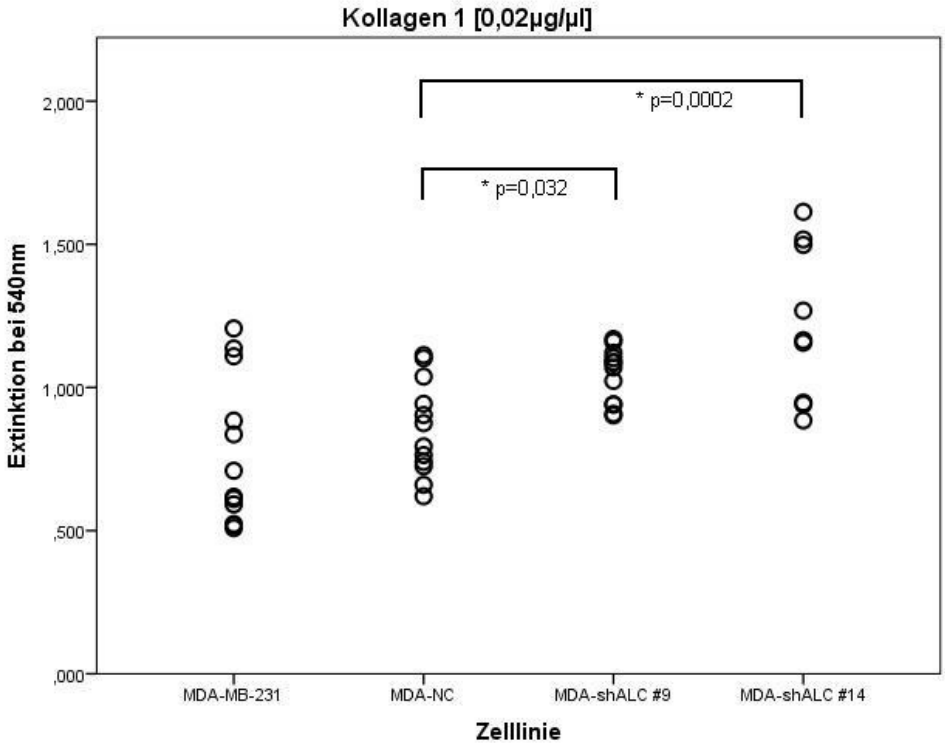

Abbildung 3.6: Extinktion gemessen bei 540 nm beim ELISA Adhäsions-Versuch von MDA-MB-Zellen an Kollagen 1

Tabelle 3.1: Relative Extinktion der MDA-Zellklone gemittelt aus drei unabhängigen Versuchen beim ELISA Adhäsions-Versuch an Kollagen 1 [0,2 μg/μl]

Zelllinie	Relative Anhaftung der Klone (in Prozent)	Standardabweichung (in Prozent)
MDA-NC	100	0
MDA-shALC #9	115,87	9,27
MDA-shALC #14	148,37	62,79

Im Versuch mit Kollagen 4 zeigte sich kein statistisch signifkanter Unterschied zwischen Zellen der Linien MDA-shALC #14, MDA-shALC #9 und MDA-NC. In Abbildung 3.7 ist die Extinktion beim Versuch von MDA-Zellen an Kollagen 4 [0,02 μg/μl] gezeigt.

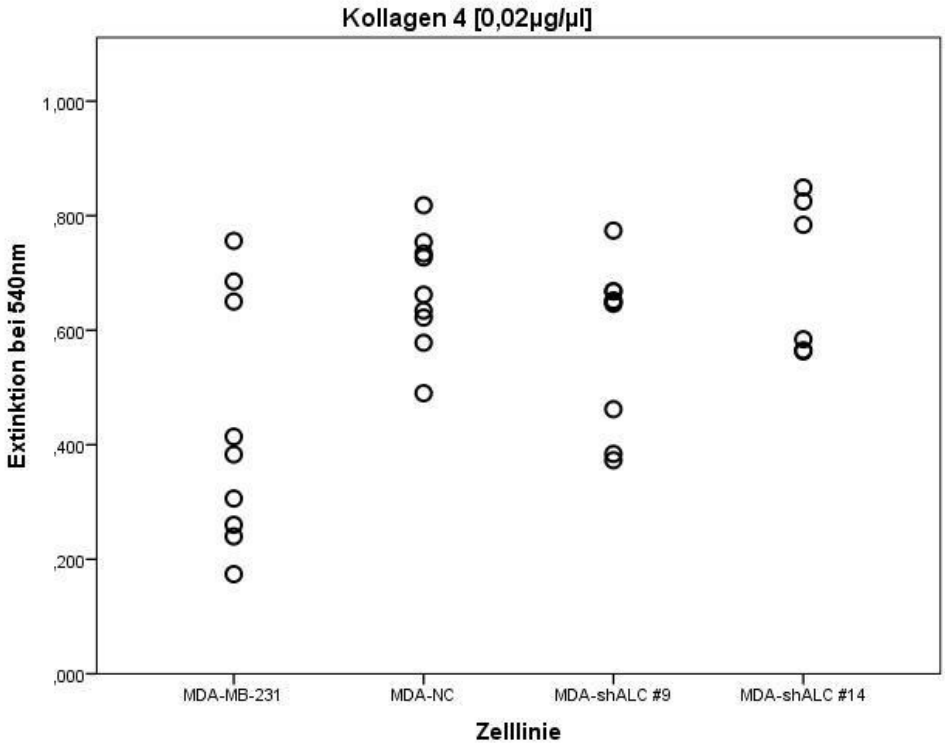

Abbildung 3.7: Extinktion gemessen bei 540 nm beim ELISA Adhäsions-Versuch von MDA-MB-Zellen an Kollagen 4

Unerwarteterweise zeigte der Versuch an Vitronektin eine Signifikanz hinsichtlich des Bindungsverhaltens beider Klone, wobei der Klon MDA-shALC #9 ($p<0{,}001$) signifikant häufiger, der Klon MDA-shALC #14 ($p=0{,}0002$) im Vergleich mit Zellen der Linie MDA-NC signifikant

seltener gebunden hat. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 3.8 grafisch dargestellt. Beim Versuch an Laminin zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Bindungsverhalten von Zellen der Linie MDA-shALC #9 (p=0,018) und Zellen der Linie MDA-NC. Zellen der Linie MDA-shALC #9 hafteten häufiger an Laminin. Dieser Unterschied lässt sich nicht für Zellen der Linie MDA-shALC #14 und der Negativ-Kontrolle feststellen, wobei beachtet werden muss, dass die Ergebnisse zwischen den einzelnen Versuchen stark variierten. Abbildung 3.9 zeigt die Extinktion beim Adhäsions-Versuch von MDA-Zellen an Laminin [0,1 μg/μl]. In den Tabellen 3.2 und 3.3 sind die relativen Extinktionen der Versuche an Vitronektin und Laminin zu sehen.

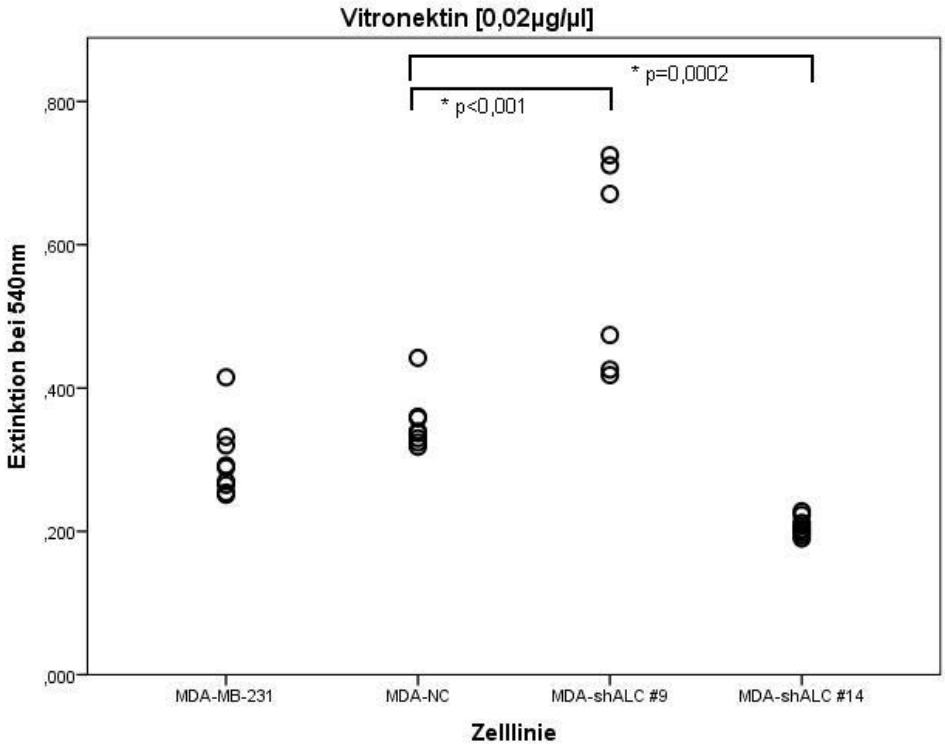

Abbildung 3.8: Extinktion gemessen bei 540 nm beim ELISA Adhäsions-Versuch von MDA-MB-Zellen an Vitronektin

Tabelle 3.2: Relative Extinktion der MDA-Zellklone gemittelt aus drei unabhängigen Versuchen beim ELISA Adhäsions-Versuch an Vitronektin [0,2 μg/μl]

Zelllinie	Relative Anhaftung der Klone (in Prozent)	Standardabweichung (in Prozent)
MDA-NC	100	0
MDA-shALC #9	136,14	59,06
MDA-shALC #14	58,85	0,91

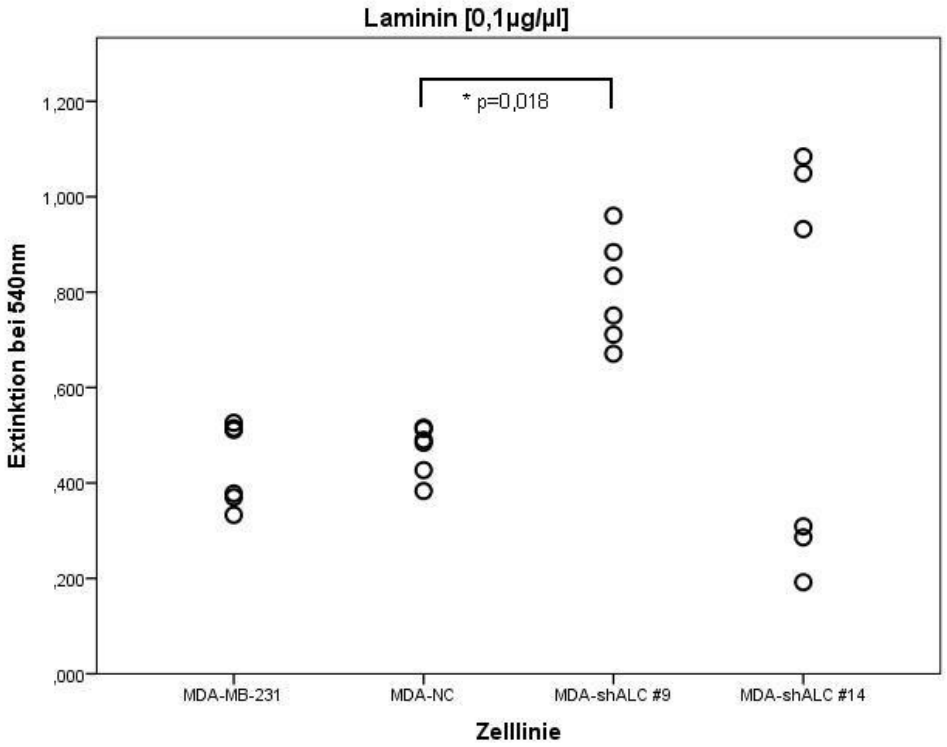

Abbildung 3.9: Extinktion gemessen bei 540 nm beim ELISA Adhäsions-Versuch von MDA-MB-Zellen an Laminin

Tabelle 3.3: Relative Extinktion der MDA-Zellklone gemittelt aus zwei unabhängigen Versuchen beim ELISA Adhäsions-Versuch an Laminin [0,2 μg/μl]

Zelllinie	Relative Anhaftung der Klone (in Prozent)	Standardabweichung (in Prozent)
MDA-NC	100	0
MDA-shALC #9	171	47,15
MDA-shALC #14	126,88	99,83

An Fibronektin zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Bindungsverhalten der einzelnen MDA-Zelllinien (siehe Abbildung 3.10).

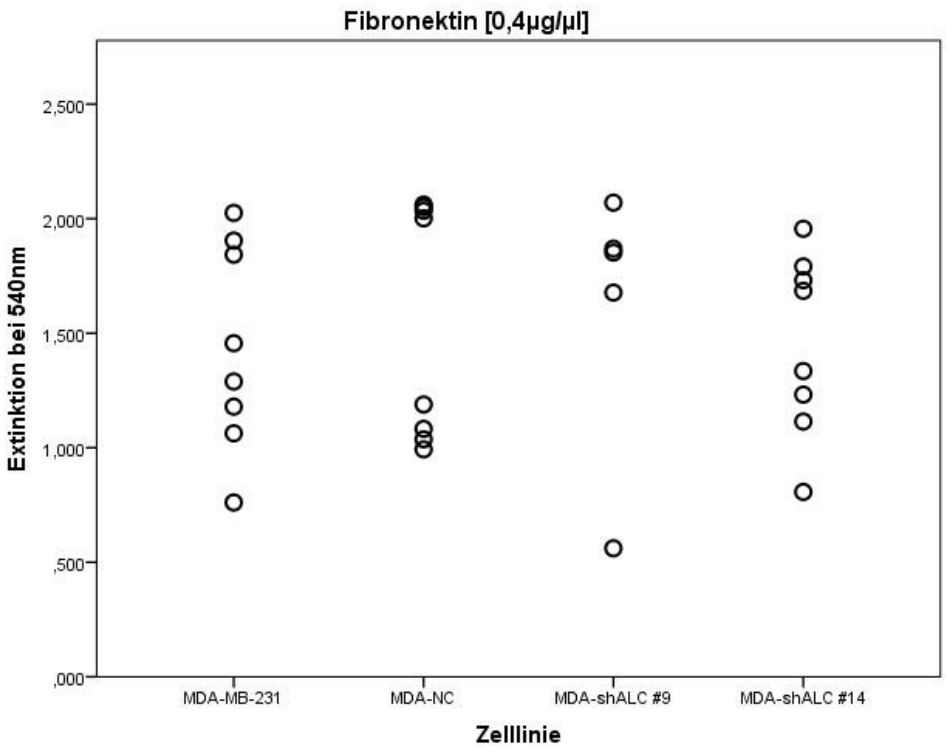

Abbildung 3.10: Extinktion gemessen bei 540 nm beim ELISA Adhäsions-Versuch von MDA-MB-Zellen an Fibronektin

Die vorliegenden Daten der ELISA Adhäsions-Versuche sprechen für eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit von MDA-MB-231-Zellen mit verminderter ALCAM-Expression an Proteinen der extrazellulären Matrix.

3.3 Durchflussversuche

Im Gegensatz zum statischen Versuchsaufbau der ELISA Adhäsions-Versuche wurde in den Durchflussversuchen das Adhäsionsverhalten der Zellklone mit unterschiedlicher ALCAM-Expression unter dynamischen Bedingungen beobachtet. Die ausgewählte Flussgeschwindigkeit erzeugte Scherkräfte von 15 bzw. 30 dyn/cm^2, was einem Fluss, der in einer Kapillare, bzw. in einer postkapillären Venole herrscht, entspricht (Papaioannou und Stefanadis, 2005). Für die Extravasation von Karzinomzellen aus dem Blutfluss heraus findet zunächst eine lockere und reversible Adhäsion an auf Endothelzellen exprimiertem E-Selektin statt, welche die Flussgeschwindigkeit der Karzinomzellen vermindert. Im Folgenden wird über verschiedene Adhäsionsmoleküle, unter anderem Integrine und Ig-CAMs, eine stärkere Bindung zwischen dem Endothel und einer Karzinomzelle hergestellt. Unter dem Einfluss des Zytokins TNF-α, was z.B. bei Entzündungsprozessen sezerniert wird, findet eine physiologische Aktivierung von Endothelzellen statt, welche dadurch eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. E-Selektin, auf der Oberfläche aufweisen. Die höchste Expression dieser Moleküle kann zwei bis sechs Stunden nach einer Aktivierung mit TNF-α gemessen werden (Barthel et al., 2007). In den Durchflussversuchen wurden die eingesetzten humanen Lungenendothelzellen vor dem Versuch für vier Stunden mit TNF-α aktiviert.
Untersucht wurde zunächst das Adhäsionsverhalten der verschiedenen Zellen an E-Selektin und darauf folgend in weiteren Versuchen das Adhäsionsverhalten an aktivierten Endothelzellen. Als Negativ-Kontrolle dieser Versuche dienten einerseits (bei den Versuchen mit E-Selektin) mit FCS beschichtete Kapillaren und andererseits (bei den Versuchen mit Endothelzellen) mit Endothelzellen ausgekleidete Kapillaren, welche nicht mit TNF-α aktiviert wurden. Die Daten dieser Negativ-Kontrolle zeigten keine oder eine sehr geringe Anzahl an haftenden Zellen an FCS und an nicht aktivierten Endothelzellen und sind im Folgenden nicht aufgeführt. Gemessen wurde pro Versuch über einen Zeitraum von zwei Minuten. Bei den Versuchen mit Endothelzellen wurde pro Versuchaufbau hintereinander an zwei verschiedenen Stellen in der Kapillare gemessen.

3.3.1 Keine signifikanten Unterschiede im Adhäsionsverhalten von MCF-7-Zellen an E-Selektin und Endothelzellen im dynamischen Flussmodell

Sowohl bei einer Flussgeschwindigkeit von 16,8 ml/h als auch bei einer Flussgeschwindigkeit von 8,4 ml/h zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Adhäsionsverhalten der einzelnen MCF-7-Zelllinien. Abbildungen 3.11 und 3.12 zeigen die Anzahl der haftenden Zellen an E-Selektin [5 μg/ml] bei einer Geschwindigkeit von 16,8 ml/h und einer Geschwindigkeit von 8,4 ml/h.

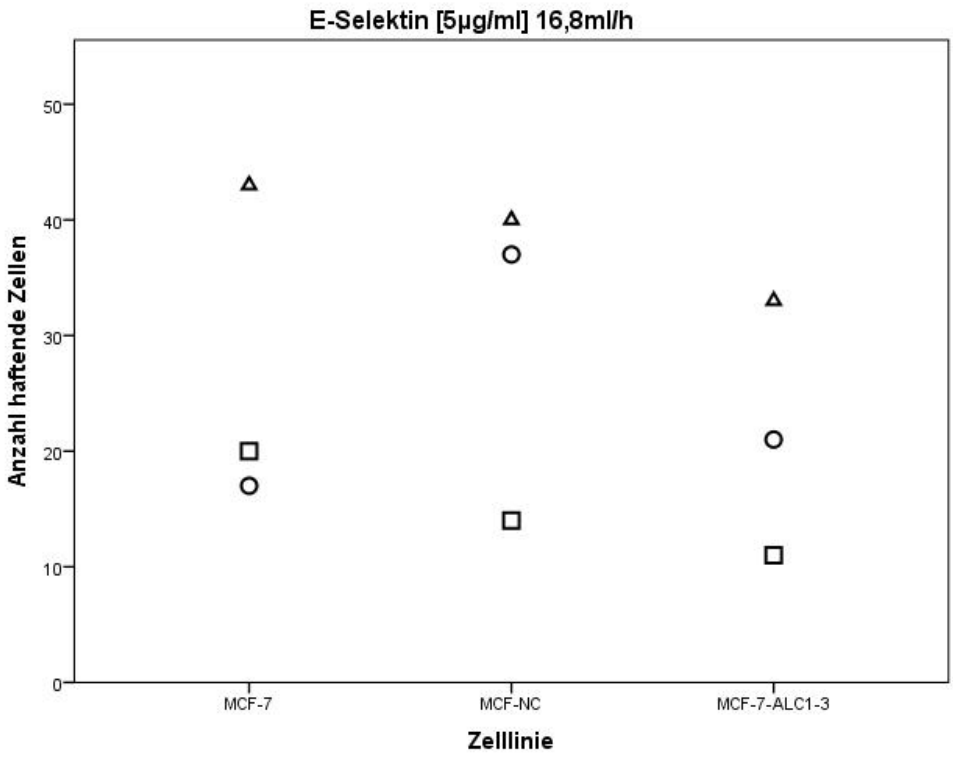

Abbildung 3.11: Anzahl der haftenden Zellen beim Durchflussversuch von MCF-Zellen an E-Selektin bei einer Flussgeschwindigkeit von 16,8 ml/h; die verschiedenen Symbole geben die Werte der zusammengehörenden Versuche wieder.

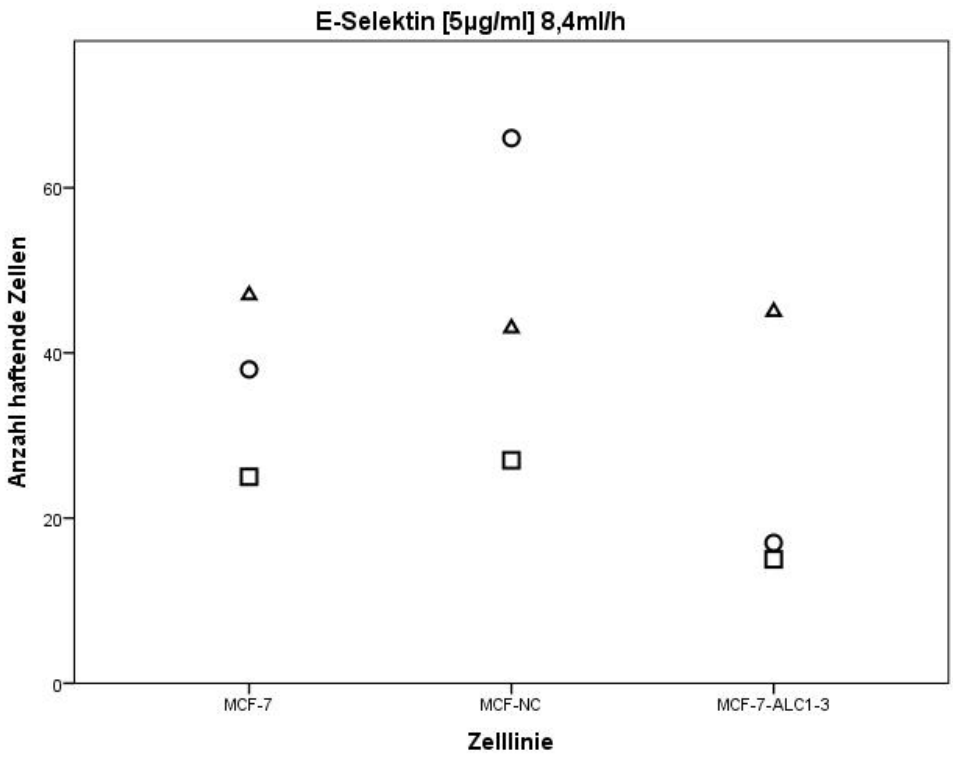

Abbildung 3.12: Anzahl der haftenden Zellen beim Durchflussversuch von MCF-Zellen an E-Selektin bei einer Flussgeschwindigkeit von 8,4 ml/h; die verschiedenen Symbole geben die Werte der zusammengehörenden Versuche wieder.

Beim Durchflussversuch der Zelllinie MCF-7 an aktivierten Endothelzellen zeigte sich ebenfalls weder bei einer Geschwindigkeit von 16,8 ml/h noch bei einer Geschwindigkeit von 8,4 ml/h ein signifikanter Unterschied zwischen dem Bindungsverhalten von MCF-7-ALC1-3 und der Negativ-Kontrolle MCF-NC. Grafisch dargestellt sind diese Ergebnisse in den Abbildungen 3.13 (bei einer Geschwindigkeit von 16,8 ml/h) und 3.14 (bei einer Geschwindigkeit von 8,4 ml/h). In den folgenden Grafiken symbolisiert das Rautensymbol den Umstand, dass bei verschiedenen Versuchen eine gleiche Anzahl von haftenden Zellen gezählt wurde.

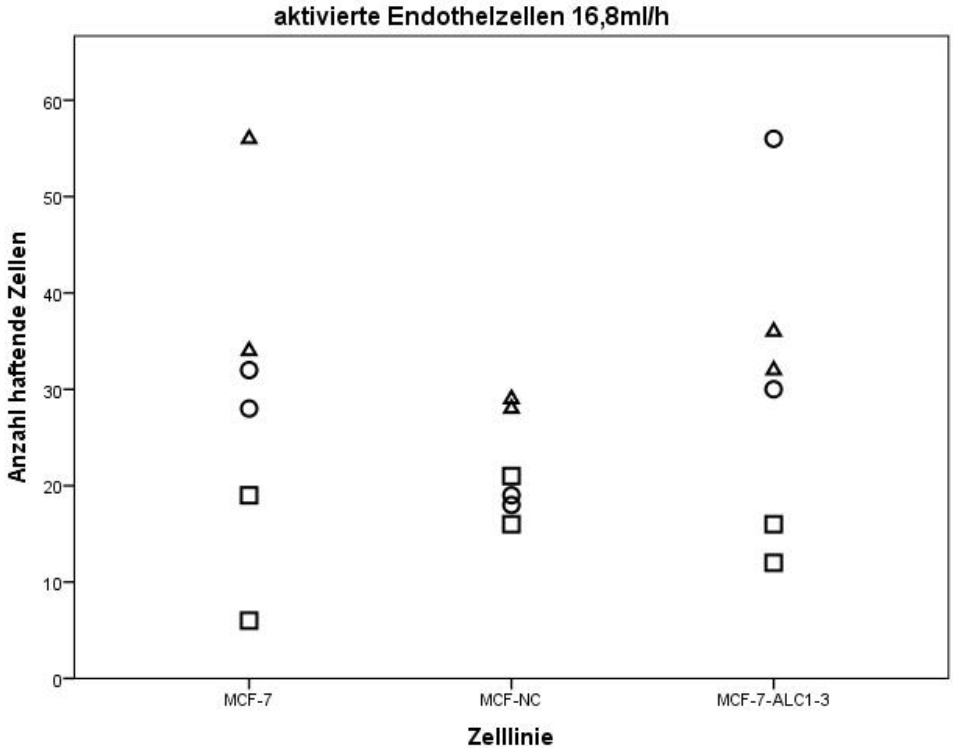

Abbildung 3.13: Anzahl der haftenden Zellen beim Durchflussversuch von MCF-Zellen an aktivierten Endothelzellen bei einer Flussgeschwindigkeit von 16,8 ml/h; die verschiedenen Symbole geben die Werte der zusammengehörenden Versuche wieder.

Abbildung 3.14: Anzahl der haftenden Zellen beim Durchflussversuch von MCF-Zellen an aktivierten Endothelzellen bei einer Flussgeschwindigkeit von 8,4 ml/h; die verschiedenen Symbole geben die Werte der zusammengehörenden Versuche wieder.

3.3.2 Zellen der Linie MDA-MB-231 zeigen signifikante Unterschiede im Adhäsionsverhalten an E-Selektin und Endothelzellen im dynamischen Flussversuch

Bei einer Geschwindigkeit von 16,8 ml/h war ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl haftender MDA-shALC #14 Zellen, die eine geringe ALCAM-Expression aufweisen, und MDA-NC Zellen zu sehen (p=0,038). Demnach hafteten Zellen der Linie MDA-shALC #14 signifikant seltener an E-Selektin. MDA-shALC #9 zeigte keinen signifikanten Unterschied im Adhäsionsverhalten verglichen mit Zellen der Linie MDA-NC, jedoch eine Tendenz dazu, ebenfalls seltener an E-Selektin zu haften. Abbildung 3.15 zeigt das unterschiedliche Bindungsverhalten der MDA-Zellen an E-Selektin [5 μg/ml] bei einer Geschwindigkeit von 16,8 ml/h. Tabelle 3.4 gibt das bei diesem Versuch gemessene relative Anhaften, welches aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt wurde, wieder.

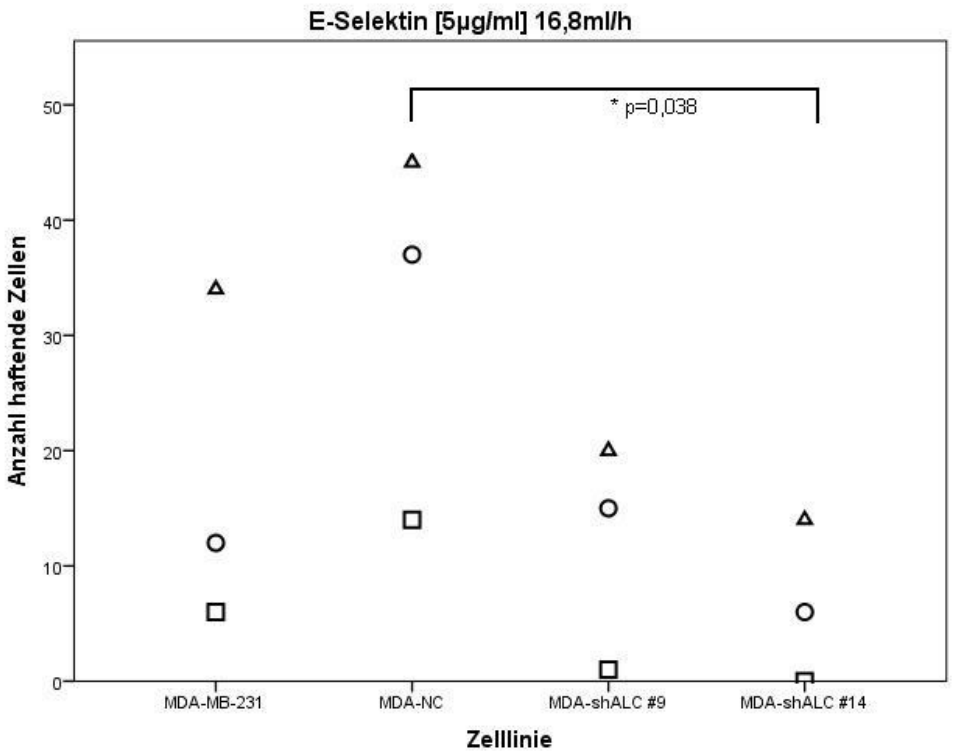

Abbildung 3.15: Anzahl der haftenden Zellen beim Durchflussversuch von MDA-MB-Zellen an E-Selektin bei einer Flussgeschwindigkeit von 16,8 ml/h; die verschiedenen Symbole geben die Werte der zusammengehörenden Versuche wieder.

Tabelle 3.4: Relatives Anhaften der MDA-MB-Zellklone gemittelt aus drei unabhängigen Versuchen beim Durchflussversuch an E-Selektin [5 μg/ml] bei einer Flussgeschwindigkeit von 16,8 ml/h

Zelllinie	Relative Anhaftung der Klone (in Prozent)	Standardabweichung (in Prozent)
MDA-NC	100	0
MDA-shALC #9	30,71	20,5
MDA-shALC #14	17,07	17,51

Bei dem gleichen Versuchsaufbau mit reduzierter Geschwindigkeit (bei 8,4 ml/h) war kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien zu erkennen. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

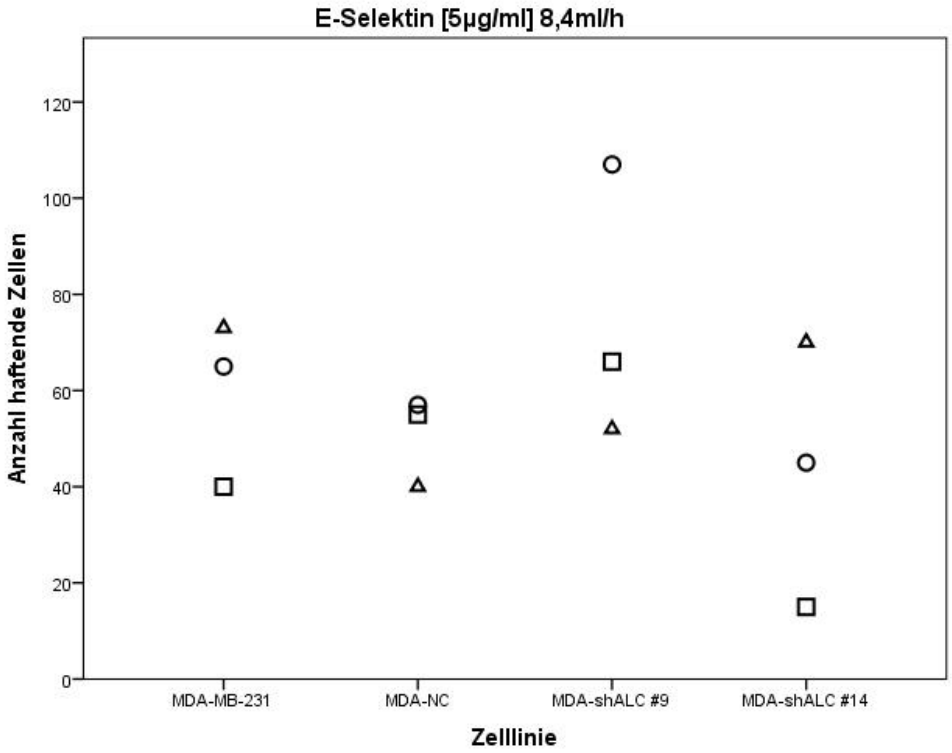

Abbildung 3.16: Anzahl der haftenden Zellen beim Durchflussversuch von MDA-MB-Zellen an E-Selektin bei einer Flussgeschwindigkeit von 8,4 ml/h; die verschiedenen Symbole geben die Werte der zusammengehörenden Versuche wieder.

An aktivierten Endothelzellen zeigte sich bei einer Geschwindigkeit von 16,8 ml/h kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Bindungsverhaltens der verschiedenen MDA-MB-231 Zelllinien. Tendenziell haben beide Klone mit reduzierter ALCAM-Expression jedoch etwas seltener an den aktivierten Endothelzellen gehaftet (Siehe Abbildung 3.17).

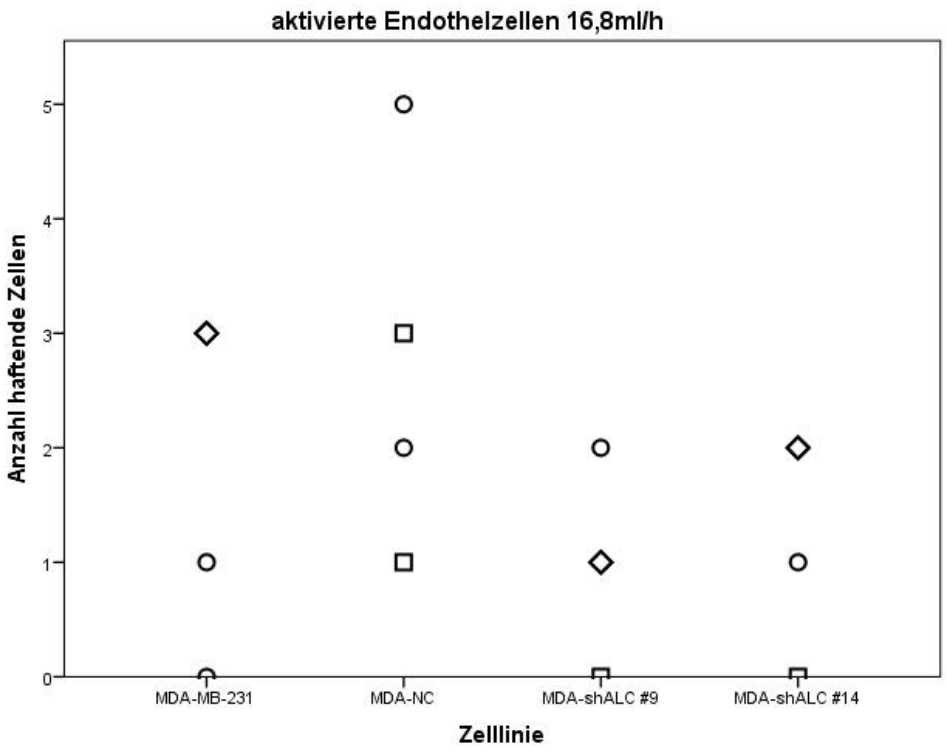

Abbildung 3.17: Anzahl der haftenden Zellen beim Durchflussversuch von MDA-MB-Zellen an aktivierten Endothelzellen bei einer Flussgeschwindigkeit von 16,8 ml/h; die verschiedenen Symbole geben die Werte der zusammengehörenden Versuche wieder.

Bei einer reduzierten Geschwindigkeit von 8,4 ml/h hafteten beide Klone signifikant seltener (MDA-shALC #9 (p=0,002) und MDA-shALC #14 (p=0,017)) an den aktivierten Endothelzellen als die Negativ-Kontrolle MDA-NC (siehe Abbildung 3.18). Tabelle 3.5 zeigt das relative Anhaften gemessen beim Versuch an aktivierten Endothelzellen mit einer Flussgeschwindigkeit von 8,4 ml/h.

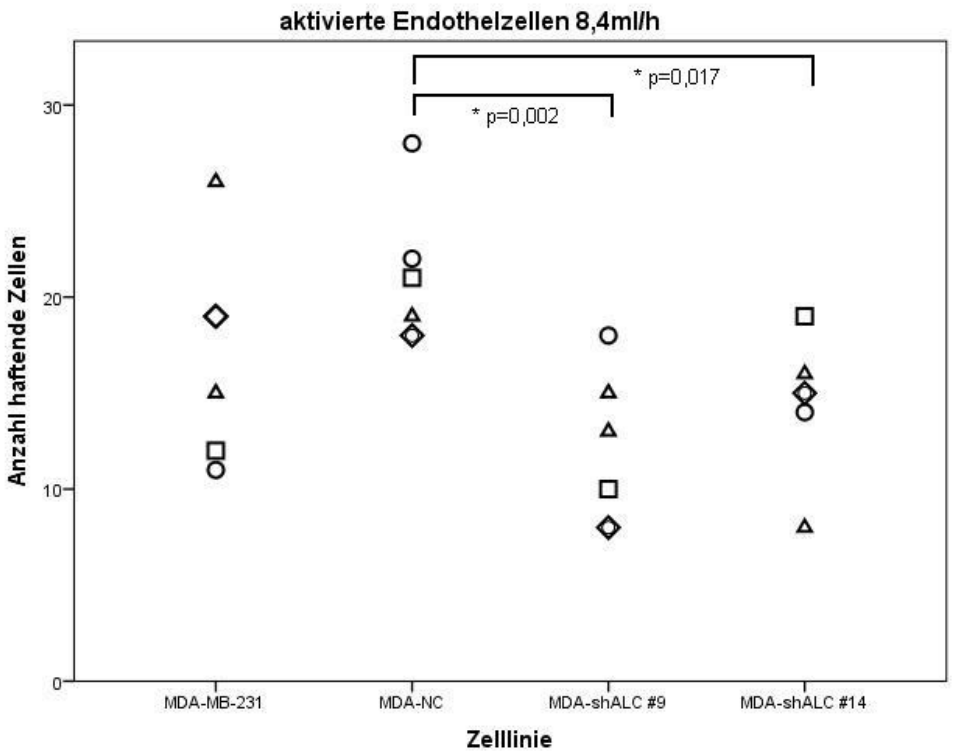

Abbildung 3.18: Anzahl der haftenden Zellen beim Durchflussversuch von MDA-MB-Zellen an aktivierten Endothelzellen bei einer Flussgeschwindigkeit von 8,4 ml/h; die verschiedenen Symbole geben die Werte der zusammengehörenden Versuche wieder.

Tabelle 3.5: Relatives Anhaften der Zellklone gemittelt aus drei unabhängigen Versuchen beim Durchflussversuch an aktivierten Endothelzellen bei einer Flussgeschwindigkeit von 8,4 ml/h

Zelllinie	Relative Anhaftung der Klone (in Prozent)	Standardabweichung (in Prozent)
MDA-NC	100	0
MDA-shALC #9	57,94	15,63
MDA-shALC #14	70,01	15,25

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen unter dynamischen Bedingungen am ehesten ein reduziertes Bindungsverhalten von MDA-MB-231-Zellen, welche vermindert ALCAM exprimieren.

3.4 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der FACS-Versuche wurden die verschiedenen MDA-MB-231-Zelllinien hinsichtlich der Expression von ALCAM sowie den Kohlenhydrat-Strukturen Sialyl-Lewis X (CD15-s) und Sialyl-Lewis A (CA19-9) untersucht. Liganden, welche Kohlenhydrat-Strukturen wie Sialyl-Lewis X oder Sialyl-Lewis A aufweisen, scheinen häufiger an Selektine (z.B. E-Selektin) zu binden als nicht glykosylierte Strukturen (Barthel et al., 2007). Die FACS-Versuche zeigten eine unterschiedliche ALCAM-Expression und bestätigten die Ergebnisse der Western Blot-Versuche. MDA-MB-231 und MDA-NC zeigten eine höhere ALCAM-Expression. Dieses Ergebnis ist exemplarisch anhand der Negativ-Kontrolle und der Linie MDA-shALC #9 in Abbildung 3.19 zu sehen. Die Linie MDA-shALC #14 zeigte eine vergleichbare Herabregulierung von ALCAM im FACS-Versuch wie die Linie MDA-shALC #9.

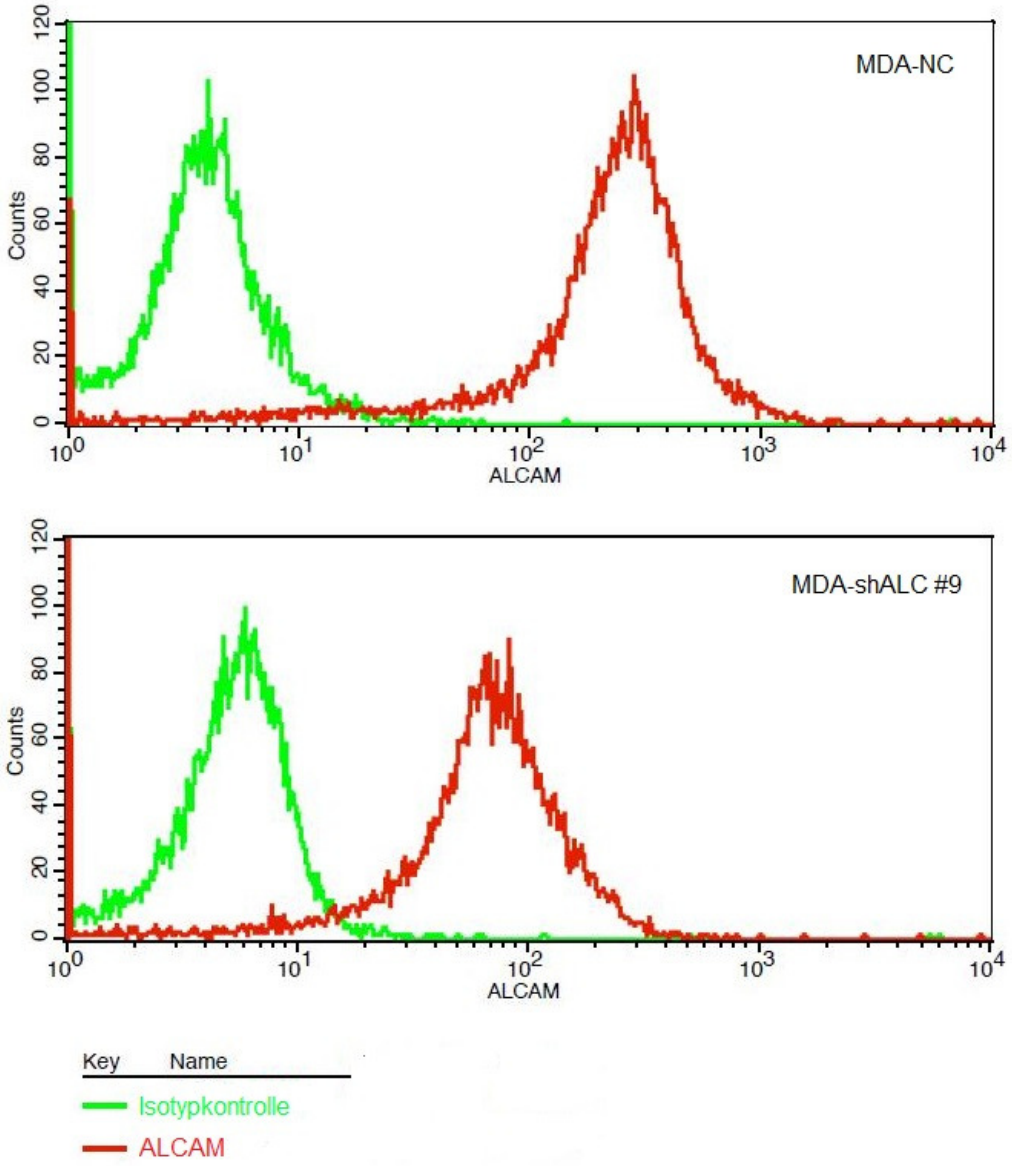

Abbildung 3.19: Im FACS-Versuch gemessene ALCAM-Expression exemplarisch bei MDA-NC (obere Grafik) und MDA-shALC #9 (untere Grafik)

Bei keiner der MDA-Zelllinien konnte eine Kohlenhydrat-Struktur vom Typ Sialyl-Lewis X (CD15s) festgestellt werden. Kohlenhydrat-Strukturen vom Typ Sialyl-Lewis A (CA19-9) wurden ausschließlich auf Zellen der Ursprungslinie MDA-MB-231, sowie MDA-shALC #9 gefunden, wobei dieses Ergebnis für MDA-MB-231 nicht reproduzierbar war. Abbildung 3.20 zeigt exemplarisch die gemessenen Werte von CA19-9, CD15s und dem Isotyp IgM bei Zellen der Linien MDA-NC und MDA-shALC #9. Bei Zellen der Linie MDA-shALCM #14 wurde reproduzierbar keine Expression von CA19-9 bzw. CD15s gefunden.

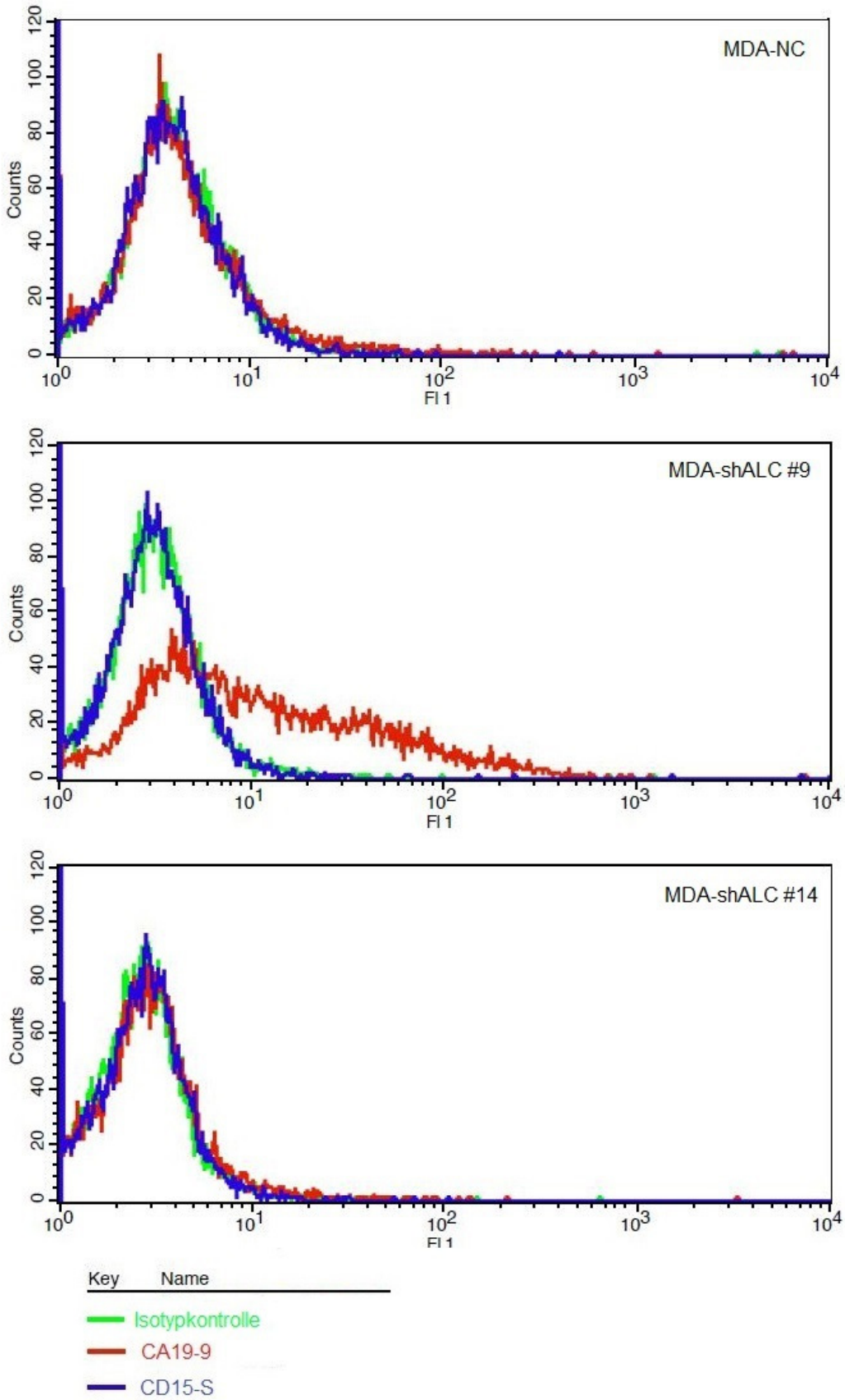

Abbildung 3.20: Im FACS-Versuch gemessene Expression der Glykosylierungen CA19-9 und CD15s exemplarisch bei MDA-NC (obere Grafik), MDA-shALC #9 (mittlere Grafik) und MDA-shALC #14 (untere Graphik)

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss des Adhäsionsmoleküls ALCAM auf die Adhäsionseigenschaften von Mammakarzinomzellen

Obwohl bisher in verschiedenen Arbeiten eine Beteiligung von ALCAM an der Entwicklung und dem Verhalten verschiedener Karzinome gezeigt werden konnte, ist noch nicht abschließend geklärt worden, welche Rolle es in seiner Eigenschaft als Adhäsionsmolekül hinsichtlich der Metastasierung einnimmt.
Adhäsionsmoleküle spielen in der Entwicklung eines Karzinoms eine entscheidende Rolle. Im Primärtumor adhärieren Karzinomzellen nicht nur aneinander, sondern stellen auch durch Adhäsion eine Verbindung zu dem sie umgebenden Gewebe her. Im Zuge der hämatogenen Metastasierung spielt die Adhäsion einer Karzinomzelle insbesondere dann eine Rolle, wenn diese, ausgehend von der Blutbahn, an den das Gefäßbett auskleidenden Endothelzellen haftet.
In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Adhäsionsmoleküls ALCAM auf die Adhäsionsfähigkeit von Mammakarzinomzellen untersucht. Hierfür wurden Zellklone der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 verwendet, die eine erhöhte (MCF-7-ALC1-3) bzw. verminderte (MDA-shALC #9; MDA-shALC #14) ALCAM-Expression aufweisen. Die unterschiedliche ALCAM-Expression konnte im Western Blot reproduzierbar nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.1).
Die Adhäsionsfähigkeit der verschiedenen Zellen wurde zunächst mit Hilfe von statischen ELISA Adhäsions-Versuchen an Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) untersucht. Hierbei wurden die Proteine Kollagen 1, Kollagen 4, Vitronektin, Laminin und Fibronektin betrachtet. Daraufhin wurde in einem dynamischen Flussmodell die Adhäsionsfähigkeit der Zellen am Protein E-Selektin sowie an Endothelzellen untersucht. Hierfür wurde im Modell eine Blutkapillare mit Hilfe von Kunststoff-*μ-slides* nachgestellt. Diese Kapillaren wurden entweder mit E-Selektin oder mit Endothelzellen beschichtet. Mit Hilfe einer Pumpe wurde im Versuchsaufbau ein Fluss erzeugt und dadurch eine Karzinom-Zellsuspension durch das Modell perfundiert. Die Anzahl der haftenden Zellen wurde während des Perfusionsvorganges mittels Kameraaufzeichnung dokumentiert.

4.2 Der Einfluss von ALCAM auf das Adhäsionsverhalten von Karzinomzellen an Proteinen der extrazellulären Matrix

Proteine der extrazellulären Matrix haben innerhalb eines Gewebeverbandes viele Funktionen. Sie sind an der Kommunikation von unterschiedlichen Zellen und Zelltypen beteiligt, helfen bei der Stabilisierung eines Gewebes und wirken als Teil von Signalkaskaden unterstützend auf das Überleben und die Differenzierung von Zellen ein (Joyce und Pollard, 2009). Damit eine Karzinomzelle bei der Invasion und der Evasion aus dem Gefäßbett einer Kapillare über die Basalmembran von Endothelzellen gelangen kann, muss sie zunächst mit der extrazellulären Matrix dieser barrierebildenden Zellen interagieren.
Im ELISA-Versuch wurde beurteilt, wie gut die unterschiedlichen Zelllinien an den ECM-Proteine Kollagen 1, Kollagen 4, Vitronektin, Laminin und Fibronektin haften. Es wurde kein Unterschied im Adhäsionsverhalten der verschiedenen MCF-7-Zellen an Proteinen der extrazellulären Matrix gefunden. Allerdings konnte ein signifikanter Unterschied im Adhäsions-Versuch an Kollagen 1 zwischen MDA-NC-Zellen und den beiden Klonen mit verminderter ALCAM-Expression MDA-shALC#9 bzw. MDA-shALC #14 beobachtet werden. Beide Klone hafteten stärker an Kollagen 1. Bei den Adhäsions-Versuchen an Kollagen 4 zeigte sich kein unterschiedliches Adhäsionsverhalten zwischen den einzelnen MDA-Zelllinien. Überraschend wurde bei dem Adhäsions-Versuch an Vitronektin ein signifikanter Unterschied für beide Klone im Vergleich zur Negativ-Kontrolle gefunden, jedoch haftete der Klon MDA-shALC #9 signifikant stärker und der Klon MDA-shALC #14 signifikant schwächer an Vitronektin. Dieses Ergebnis ist nicht mit einem Einfluss von ALCAM zu erklären. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede kann im Transfektionsvorgang gesehen werden, bei dem auf DNA Ebene mit Hilfe eines silencer-Plasmids die Expression von ALCAM reguliert wurde. Je nachdem, an welcher Lokalisation im Genom der Zellen dieses Plasmid integriert wurde, könnten möglicherweise für die Bindung an Vitronektin wichtige Sequenzen unterschiedlich beeinflusst worden sein. Bei dem Adhäsions-Versuch an Laminin wurde ein Unterschied zwischen dem Adhäsionsverhalten von Zellen der Linie MDA-shALC #9 und der Negativ-Kontrolle MDA-NC gefunden. Die Zellen des Klons MDA-shALC #9 hafteten signifikant stärker an Laminin. Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Klon MDA-shALC #14 und der Negativ-Kontrolle gefunden, wobei zwischen den einzelnen Versuchen beim Klon MDA-shALC #14 sehr unterschiedliche Extinktionswerte gemessen wurden (siehe Abbildung 3.9). Auch bei dem Adhäsionsversuch an Fibronektin ließ sich kein Unterschied zwischen den Zelllinien ermitteln. Insgesamt jedoch scheint eine geringere ALCAM-Expression zu einer erhöhten Adhäsionsfähigkeit der MDA-MB-231-Zellen an Proteinen der extrazellulären Matrix zu führen.
Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde als ER-negativ, PR-negativ und nur gering Her2/neu-

exprimierend charakterisiert (Subik et al., 2010). In eine Studie von Ihnen et al. (2010) wurden Patientinnen, die an einem Mammakarzinom erkrankt waren und keine Chemotherapie erhalten hatten in vier verschiedene Gruppen aufgeteilt. Diese Gruppen unterschieden sich in ihrer Her2/neu-Expression, der ER-Expression der Osteopontin-Expression sowie der ALCAM-Expression. Es zeigte sich, dass Patientinnen, die an einem Tumor erkrankt waren, welcher die Eigenschaften einer geringen Her2/neu-Expression, ER-Negativität, einer hohen Osteopontin-Expression und einer niedrigen ALCAM-Expression aufwies, eine schlechtere Prognose hatten als Patientinnen, deren Tumore die gleichen Eigenschaften, jedoch eine hohe ALCAM-Expression aufwiesen. Die schlechtere Prognose wurde anhand eines verkürzten rückfallfreien Intervalls und eines verkürzten *Overall Survival* gemessen. Ein Zusammenhang zwischen diesen Beobachtungen und den Ergebnissen der ELISA Adhäsions-Versuche der vorliegenden Arbeit ist möglich. Dadurch, dass MDA-shALC #9 und MDA-shALC #14 Zellen mit vermindert exprimiertem ALCAM besser an Proteinen der extrazellulären Matrix hafteten, kann vermutet werden, dass das Herabregulieren von ALCAM möglicherweise zu einer schneller stattfindenden Metastasierung führt.

4.3 Der Einfluss von ALCAM auf das Adhäsionsverhalten von Karzinomzellen im dynamischen Flussmodell an E-Selektin und humanen Endothelzellen

Um aus dem Blutfluss heraus an Endothelzellen zu haften, ist bei Karzinomzellen, ähnlich wie bei Zellen des Immunsystems, eine erste Interaktion mit E-Selektin nötig (Sundd et al., 2011). Diese durch die auf die Zellen wirkenden Scherkräfte beeinflusste Interaktion wird als *tethering* bezeichnet und stellt zunächst eine lockere und reversible Verbindung zwischen Endothelzelle und Karzinomzelle her, sodass letztere verlangsamt wird. Das *tethering* der Karzinomzellen konnte beim Durchflussversuch an E-Selektin während der Kameraaufzeichnung verfolgt werden, indem Zellen, die im Blickfeld des Mikroskops hafteten, zumeist nicht fest hängen blieben, sondern über die Fläche zu rollen schienen. Im Vergleich dazu wurde während des Adhäsions-Versuchs an mit Endothelzellen ausgkleideten Kapillaren deutlich weniger *tethering* beobachtet. Die erste Interaktion mit E-Selektin findet bei der Adhäsion von Zellen an Endothelzellen gefolgt von einer festeren Bindung statt, welche hauptsächlich über Integrine und Ig-CAMS vermittelt wird (Schröder et al., 2010). Bei den Versuchen an Endothelzellen wurde weniger *tethering* beobachtet, da es hier nachfolgend auf die Bindung zwischen E-Selektin und den Karzinomzellen auch zu festeren Bindungen kommen konnte. Bei diesen Versuchen wurde nicht zwischen *tethering* und festem Haften einer Zelle unterschieden. Die Durchflussversuche wurden bei zwei verschiedenen Geschwindigkeiten durchgeführt, die beide den Fluss in einer

Kapillare bzw. einer postkapillären Venole nachstellten.
Wenn es zur Metastasierung bzw. zur Evasion einer Karzinomzelle aus dem Gefäßbett kommt, so findet dieser Schritt meist aufgrund des geringen Durchmessers des Gefäßes in einer postkapillären Venole statt, da hier eine Karzinomzelle am ehesten haften kann. Jedoch ist zu beachten, dass bei Fernmetastasen nicht nur mechanische Faktoren eine Rolle für die Lokalisation der Metastasierung spielen, sondern dass auch Eigenschaften, die sich je nach Organ unterscheiden, z.B. die Zusammensetzung von Proteinen auf der Oberfläche der Endothelzellen, wichtig sind (Fidler, 2003). Aufgrund dessen sind Metastasen mancher Karzinome häufiger in bestimmten Organen zu finden als im Rest des Körpers. Dieser Umstand wird als *homing*, als organspezifische Metastasierung bezeichnet. Metastasen des Mammakarzinoms sind z.B. häufig in Knochen, Lunge, Pleura und Gehirn zu finden. Die Durchflussversuche in der vorliegenden Arbeit wurden durchgehend an humanen Lungenendothelzellen durchgeführt. Im Durchflussversuch mit MCF-7-Zellen war weder bei den Versuchen mit E-Selektin noch bei den Versuchen mit Endothelzellen ein signifikanter Unterschied zwischen dem Klon MCF-7-ALC1-3, welcher verstärkt ALCAM exprimiert, und der Negativ-Kontrolle MCF-NC nachzuweisen. Die Adhäsions-Versuche mit MDA-MB-231 Zellen an E-Selektin zeigten bei einer Flussgeschwindigkeit von 16,8 ml/h ein statistisch signifikant selteneres Haften von Zellen der Linie MDA-shALC #14 und ebenfalls eine Tendenz zu einem selteneren Haften von Zellen der Linie MDA-shALC #9 an E-Selektin im Vergleich zur Negativ-Kontrolle MDA-NC. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 8,4 ml/h konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien festgestellt werden. Möglicherweise sind die Ergebnisse der Durchflussversuche an E-Selektin bei einer Geschwindigkeit von 16,8 ml/h klarer, da hier die für die Adhäsion an E-Selektin unterstützenden Scherkräfte größer sind.
Für die Versuche an Endothelzellen wurden diese mit Hilfe des Zytokins TNF-α aktiviert, welches großen Einfluss auf die Entwicklung, Proliferation, und Reaktion einer Zelle auf die Umwelt hat (Hehlgans und Pfeffer, 2005). Eine maximale Expression von E-Selektin ist bei einer Aktivierung mit TNF-α nach zwei bis sechs Stunden erreicht (Barthel et al., 2007), was vermuten lässt, dass auch andere für die Adhäsion wichtige Moleküle in diesem Zeitfenster vermehrt exprimiert werden. Bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit dauerte die Aktivierung mit TNF-α insgesamt vier Stunden. Endothelzellen, welche nicht mit TNF-α aktiviert wurden, dienten als Negativ-Kontrolle für diesen Versuch. An ihnen hafteten keine bzw. im Vergleich mit den Versuchen an aktivierten Endothelzellen weniger Karzinomzellen. Bei dem Adhäsions-Versuch zwischen aktivierten Endothelzellen und MDA-MB-231-Zellen zeigte sich bei einer Geschwindigkeit von 8,4 ml/h ein signifikant selteneres Haften beider Zellklone (MDA-shALC #9 und MDA-shALC #14) und bei einer Geschwindigkeit von 16,8 ml/h eine Tendenz zu einem selteneren Haften beider Zellklone im Vergleich mit der Negativ-Kontrolle MDA-NC. Demnach lässt sich bei MDA-MB-231 Zellen eine Tendenz dahingehend sehen, dass Zellen mit verminderter ALCAM-Expression eine reduzierte Adhäsionsfähigkeit im physiologischen Blut-

fluss sowohl initial an E-Selektin, als auch an Endothelzellen haben. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch erneut, dass die Adhäsion an Endothelzellen nicht von einem einzelnen Protein ausgeht, sondern ein Zusammenspiel verschiedener Bindungspartner ist.
Neben dem insbesondere auf aktivierten Endothelzellen gefundenem E-Selektin dient auch ALCAM als Bindungspartner für ALCAM-exprimierende Zellen. In einer Arbeit von Dippel et al. (2012) wurde nachgewiesen, dass ALCAM unabhängig von der Aktivierung auf Endothelzellen exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde herausgefunden, dass L1-CAM ein Bindungspartner für eine heterotypische Bindung zwischen ALCAM und L1-CAM ist. Ausgehend von der Beobachtung, welche bei Weidle et al. (2010) beschrieben wurde, dass ALCAM homotypische Bindungen mit ALCAM eingehen kann, ist zu vermuten, dass auch eine homotypische Interaktion von ALCAM auf Endothelzellen sowie Tumorzellen stattfindet. Diese Vermutung passt ebenfalls zu der Beobachtung, dass Zellen, welche vermehrt ALCAM exprimieren, besser an Endothelzellen haften.
Als Ligand für E-Selektin dienen, wie in einer Arbeit von Barthel et al. (2007) zusammengefasst, viele verschiedene Oberflächenstrukturen, wie z.B. CD43, HCELL (hematopoietic cell E- and L-selectin-Ligand; eine glycosylierte Form von CD44), E-Selektin-Ligand-1, CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigene, eine glycosylierte Form vom P-Selektin Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1)) und verschiedene Glykolipide. Was viele dieser Strukturen gemeinsam haben, ist eine Glykosylierung, häufig mit der Kohlenhydrat-Struktur Sialyl-Lewis X, worüber die Interaktion zwischen E-Selektin und dem Liganden stattfindet. Um glykosylierte Bindungspartnern auf den MDA-MB-231-Karzinomzellen zu finden, wurde mittels FACS-Analyse nach den Kohlenhydrat-Strukturen Sialyl-Lewis X und Sialyl-Lewis A, gesucht. Selektine binden häufiger an glykosylierte Liganden von Karzinomzellen, was mit einer schlechteren Prognose bei Karzinomen mit einer hohen Expression von glykosylierten Liganden einhergeht (Barthel et al., 2007). Die Zellen zeigten keine Sialyl-Lewis X Glykosylierung und eine möglicherweise erhöhte Sialyl-Lewis A Glykosylierung bei den Linien MDA-MB-231 und MDA-shALC #9. Dieses Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar und schien nicht mit einer ALCAM-Expression im Zusammenhang zu stehen.
Im Zellflussversuch wurde beobachtet, dass Zellen beider Zelllinien häufig stark aneinander haftende Zellverbände bildeten, welche als solche und nicht als einzelne Zellen unter der Kamera gesehen wurden. Ein möglicher Einfluss von ALCAM in seiner Funktion als Adhäsionsmolekül auf die Bildung solcher Zellverbände wurde bereits von Wong et al. (2012) beschrieben. Durch diesen Zusammenhalt von Karzinomzellen in Zellverbänden gibt es einen Teil von Zellen im Inneren dieses Verbandes, der einen gewissen Schutz vor dem Erkennen und dem nachfolgenden Abbau durch das Immunsystem genießt, sodass diese Zellen im Zuge der Metastasierung leichter in die Peripherie gelangen und Tochtergeschwulste bilden können. In einer Publikation von King et al. (2010) wurde im Tiermodell unter dem Mikroskop beobachtet, wie viele Karzinomzellen an Endothelzellen in einer Rattenlunge hafteten. Als Karzinom-Zelllinie diente unter

anderem die Zelllinie MDA-MB-231. Um den Einfluss von ALCAM zu untersuchen, wurde hierbei verglichen, ob der Einsatz eines blockierenden Antikörpers gegen ALCAM einen Unterschied im Adhäsionsverhalten hervorruft. Ein signifikant selteneres Binden konnte beim Einsatz des anti-ALCAM Antikörpers festgestellt werden, jedoch nur bei der Adhäsion von Metastasenverbänden, nicht aber beim Adhäsionsverhalten einzelner Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Adhäsion von einzelnen Zellen untersucht. Das grundlegende Ergebnis, dass Zellen mit einer verminderten ALCAM-Expression eine verminderte Adhäsionsfähigkeit zeigen, wurde bestätigt, jedoch konnte dieses Ergebnis, im Gegensatz zu der Arbeit von King et al., bei einzelnen Karzinomzellen gezeigt werden.

Beim Vorgang der Metastasierung ist einer der ersten Schritte das Ablösen von Tumorzellen aus dem Primärtumor. Dieses Ablösen ist assoziiert mit einer Reduktion von Adhäsionsmolekülen, was zu einer geringeren interzellulären Adhäsion führt (Joyce und Pollard, 2009). Auch hier könnte eine verminderte ALCAM-Expression eine Rolle spielen.

Bei der Frage, welche Zellen metastasieren können, spielen mehrere Faktoren eine Rolle. Von allen Zellen, die sich aus einem Primärtumor lösen, bilden nur etwa 0,01% eine Metastase (Fidler, 2003). Faktoren wie Anoikis, durch den Verlust von Zell-Matrix-Kontakt getriggerte Apoptose, mechanisch destruierende Scherkräfte im Blutfluss und immunologische Reaktionen reduzieren die Anzahl der freigesetzten Tumorzellen (Wong et al., 2012).

Das Potential einer Zelle zu metastasieren hängt unter anderem von ihrer Apoptoseneigung, ihrer Motilität und ihrer Invasivität ab. In einer Studie von Hein et al. (2010) konnte gezeigt werden, dass Zellen, die vermehrt ALCAM exprimieren, eine reduzierte Motilität, eine erhöhte Apoptoseneigung sowie ein erhöhtes Invasionspotential besitzen. Die erhöhte Adhäsionsfähigkeit, welche sich bei den Durchflussversuchen der vorliegenden Arbeit im Versuch mit MDA-MB-231-Zellen zeigte, lässt sich gut mit einem erhöhten Invasionspotential dieser Zellen vereinbaren. Die Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-NC, welche viel ALCAM exprimieren, hafteten im Durchflussversuch häufiger sowohl an E-Selektin als auch an Endothelzellen. In der Studie von Hein et al. (2010) wurde zusätzlich immunhistochemisch eine Korrelation zwischen einer hohen ALCAM-Konzentration und einem verkürzten rückfallfreien Intervall und *Overall Survival* gezeigt, die möglicherweise auf die erhöhte Invasivität, welche durch eine hohe ALCAM-Expression ausgelöst wird, zurückzuführen ist. Die erhöhte Apoptoseneigung von Karzinomzellen, welche mit einer hohen ALCAM-Expression korreliert, könnte für das Ansprechen von ALCAM-positiven Karzinomen auf eine Chemotherapie mit verantwortlich sein. In einer Studie von Ihnen et al. (2008) zeigte sich bei chemotherapeutisch behandelten Patientinnen, welche Tumore mit einer hohen ALCAM-mRNA-Expression aufwiesen im Vergleich zu Patientinnen mit der gleichen Behandlung, deren Tumore jedoch eine niedrige ALCAM-mRNA-Expression zeigten ein längeres DFS und OAS.

4.4 Unterschiede bei der Adhäsion an Proteine der extrazellulären Matrix und an Endothelzellen

Im ELISA-Versuch hafteten die Klone MDA-shALC #9 und MDA-shALC #14, welche eine geringere ALCAM-Expression aufweisen, tendenziell stärker an Proteinen der extrazellulären Matrix. Die gleichen Klone hafteten im Durchflussversuch schwächer an E-Selektin bzw. an Endothelzellen. Untersucht wurden in beiden Versuchen unterschiedliche Liganden. Der Mechanismus, mit dem Karzinomzellen an Proteine der extrazellulären Matrix binden, unterscheidet sich stark von der Adhäsion an Endothelzellen.
Im ELISA Adhäsions-Versuch wurde das Bindungsverhalten der Zellen unter statischen Bedingungen untersucht, welche modellhaft sind und nur geringe Ähnlichkeit zu den physiologischen Bedingungen im Körper eines Menschen aufweisen. In der Adhäsionskaskade bei einer Metastasierung spielen Ig-CAMs eher später eine Rolle, wenn es darum geht, den initialen Kontakt an Endothelzellen unter dem Einfluss von Scherkräften zu stabilisieren (Schröder et al., 2010). Unter statischen Bedingungen kommt dieser Eigenschaft keine besondere Bedeutung zu und hat keinen Einfluss auf die Anzahl der haftenden Zellen, da die Adhäsion hier nicht durch Scherkräfte beeinflusst wird. Im Durchflussversuch hingegen wurden dynamische Bedingungen geschaffen, welche, obwohl immer noch modellhaft, eine größere Ähnlichkeit zur Physiologie eines Körpers darstellen. Alle Versuche, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, fanden unter in vitro Bedingungen statt. Aufbauend auf den Ergebnissen der Versuche mit MDA-MB-231-Zellen könnte in vivo, im Mausmodell, untersucht werden, ob sich der beobachtete Unterschied zwischen den Zellen mit unterschiedlicher ALCAM-Expression bestätigen lässt.

4.5 Unterschiedliche Ergebnisse zwischen den Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7

Zellen der Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 weisen unterschiedliche Eigenschaften auf. Die Zelllinie MDA-MB-231 vom basalen Subtyp, also mit fehlender ER- und PR-Expression sowie schlechterer Differenzierung wurde in der Literatur als aggressiv und metastasierend beschrieben, während die ER-positive Zelllinie MCF-7 weniger aggressiv auftritt (Subik et al., 2010). Die verschiedenen Zellklone wurden in einer Arbeit von Hein et al. (2010) etabliert und charakterisiert. Um Unterschiede der Zellen auf molekularer Ebene festzustellen, wurden *microarray* Daten erhoben. Darin zeigte sich, dass die Zellen teilweise eine sehr unterschiedliche Expression von bestimmten Genen aufweisen. So war beispielsweise bei Zellen der Linien MDA-shALC #9 und MDA-shALC #14 gleichzeitig mit der ALCAM-Expression auch die Expression anderer Adhäsionsmoleküle wie CEACAM6 oder L1-CAM herabreguliert. Dass L1-CAM als Adhäsionsmolekül die Adhäsionsfähigkeit von Mammakarzinomzellen verstärkt, wurde bereits in einer Arbeit von Dippel et al. (2012) herausgefunden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Bedeutung von ALCAM hinsichtlich der Adhäsionsfähigkeit einer Karzinomzelle sehr zelltypabhängig ist, da zwar bei Zellen der Linie MCF-7 keine signifikanten Unterschiede im Adhäsionsverhalten festzustellen waren, jedoch sehr wohl bei Zellen der Linie MDA-MB-231.

Um eine prognostische Relevanz von ALCAM abschließend zu klären, sollte ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit insbesondere für MDA-MB-Zellen ein Zusammenhang zwischen dem Zusammenspiel von ALCAM mit anderen Adhäsionsmolekülen untersucht werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Adhäsionsmoleküls ALCAM auf das Adhäsionsverhalten von Mammakarzinomzellen untersucht.
Ein relevanter prognostischer Einfluss von ALCAM konnte in verschiedenen Studien nicht nur beim Mammkarzinom, sondern auch bei vielen anderen Karzinomarten gezeigt werden.
Adhäsionsmoleküle spielen bei mehreren Schritten der Entstehung und der Metastasierung eines Karzinoms eine wichtige Rolle. Moleküle der Ig-Superfamilie, zu welcher ALCAM gehört, stabilisieren im Zuge der Metastasierung die Verbindung zwischen Endothelzellen und Karzinomzellen, wobei die Extravasation einer Karzinomzelle aus dem Gefäßbett Ähnlichkeiten mit der Leukozytenemigration zeigt. Für die Versuche wurden zwei verschiedene Mammakarzinomzelllinien (MCF-7 und MDA-MB-231) sowie deren Zellklone verwendet, welche nach stabiler Transfektion eine unterschiedliche ALCAM-Expression aufwiesen.
Untersucht wurde zum einen das Adhäsionsverhalten der Karzinomzellen im statischen ELISA-Versuch an Proteinen der extrazellulären Matrix und zum anderen im dynamischen Durchfluss-Versuch an E-Selektin sowie an Endothelzellen.
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Bedeutung von ALCAM sehr zelltypabhängig ist. Während für Zellen der Linie MCF-7 kein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten festgestellt wurde, zeigten sich an Proteinen der extrazellulären Matrix eine tendenziell erhöhte Adhäsionsfähigkeit von MDA-MB-Zellen mit verminderter ALCAM-Expression. Im Durchflussversuch führte eine verminderte ALCAM-Expression zur Reduktion der Adhäsionsfähigkeit bei MDA-MB-Zellen sowohl an E-Selektin als auch an Endothelzellen.
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bedeutung von ALCAM auf die Adhäsionsfähigkeit von Mammakarzinomzellen nicht abschließend geklärt werden konnte. Aufbauend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sollten Versuche durchgeführt werden, um beispielsweise ein Zusammenspiel verschiedener Adhäsionsmoleküle hinsichtlich der Bedeutung für den Metastasierungsvorgang und einer prognostischen Relevanz zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

Aumüller G., Aust G., Doll A., Engele J., Kirsch J., Mense S., Reißig D., Salvetter J., Schmidt W., Schmitz F., Schulte E., Spanel-Borowski K., Wolff W., Wurzinger L. J. & Zilch H.-G. (2010) *Duale Reihe Anatomie* Thieme-Verlag, 2. Auflage, S.1176.

Barthel S. R., Gavino J. D., Descheny L. &. Dimitroff C. J. (2007) Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 11:1473-1491.

Bowen M. A., Patel D. D., Li X., Modrell B., Malacko A. R., Wang W., Marquardt H., Neubauer M., Pesando J. M., Francke U., Haynes B. F. & Aruffo A. (1995) Cloning, Mapping and Characterization of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM), a CD6 Ligand *The Journal of Experimental Medicine* 181:2213-2220.

Burkhardt M., Mayordomo E., Winzer K-J., Fritzsche F., Gansukh T., Pahl S., Weichert W., Denkert C., Guski H., Dietel M. &. Kristiansen G. (2006) *Journal of Clinical Pathology* 59:403-409.

Breckwoldt M., Kaufmann M. & Pfleiderer A. (2007) Maligne Tumore der Mamma; *Gynäkologie und Geburtshilfe* Thieme-Verlag, 5. Auflage, S.241-261.

Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C. &. Mantovani A. (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability *Carcinogenesis* 30.7:1073-1081.

Davies S.R., Dent C., Watkins G., King J.A., Mokbel K. &. Jiang W.G (2008) *Oncology Reports* 19:555-561.

Dippel V., Milde-Langosch K., Wicklein D., Schumacher U., Altevogt P., Oliveira-Ferrer L., Janicke F. & Schröder C. (2012) Influence of L1-CAM expression of breast cancer cells on adhesion to endothelial cells *Journal of cancer research and clinical oncology* 1:107-121.

Fidler, Isaiah J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited *Nat Rev Cancer* 6:453-458.

Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2006) Gesundheit in Deutschland [Online im Internet] URL:*http://www.gbe-bund.de/gbe10/owards.prc_show_pdf?p_id=10416&p_sprache=d&p_uid=gast&p_aid=53126506&p_lfd_nr=1* [Stand: 23.12.2013, 21:20].

Glinskii O.V., Huxley V.H., Glinsky G.V., Pienta K. J., Raz A. & Glinsky V.V. (2005) Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs *Neoplasia* 7:522-527.

Goldhirsch A., Wood W. C., Coates A. S., Gelber R. D., Thurlimann B. &. Senn H.-J (2011) Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 *Annals of Oncology* 8:1736-1747.

Hanahan D. & Weinberg R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer *Cell* 100:57-70.

Hehlgans T. & Pfeffer K. (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games *Immunology* 1:1-20.

Hein S., Müller V., Köhler N., Wikman H., Krenkel S., Streichert T., Schweizer M., Riethdorf S., Assmann V., Ihnen M., Beck K., Issa R., Jänicke F., Pantel K. &. Milde-Langosch K. (2010) Biologic role of activated leukocyte cell adhesion molecule overexpression in breast cancer cell lines and clinical tumor tissue *Breast Cancer Res Treat* 2:347-360.

Ihnen M., Müller V., Wirtz R. M., Schröder C., Krenkel S., Witzel I., Lisboa B. W., Jänicke F. &. Milde-Langosch K. (2008) Predictive impact of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) in breast cancer *Breast Cancer Res Treat* 3:419-427.

Ihnen M., Wirtz R. M., Kalogeras K. T., Milde-Langosch K., Schmidt M., Witzel I., Eleftheraki A. G., Papadimitriou C., Jänicke F., Briassoulis E., Pectasides D., Rody A., Fountzilas G. &. Müller V. (2010) Combination of osteopontin and activated leukocyte cell adhesion molecule as potent prognostic discriminators in HER2- and ER-negative breast cancer *Br J Cancer* 7:1048-1056.

Ihnen M., Kilic E., Kohler N., Loning T., Witzel I., Hagel C., Holler S., Kersten J. F., Müller V., Janicke F. &. Milde-Langosch K. (2011) Protein expression analysis of ALCAM and CEACAM6 in breast cancer metastases reveals significantly increased ALCAM expression in metastases of the skin *Journal of Clinical Pathology* 2:146-152.

Jezierska A., Matysiak W. &. Motyl T. (2006) ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy *Med Sci Monit* 7:263-273.

Jezierska A., Olszewski W.P., Pietruszkiewicz J., Olszewski W., Matysiak W. &. Motyl T. (2006b) Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) is associated with suppression of breast cancer cells invasion *Med Sci Monit* 8:245-256.

Joyce J.A. & Pollard J. W. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis *Nat Rev Cancer* 4:239-252.

Kahlert C., Weber H., Mogler C., Bergmann F., Schirmacher P., Kenngott H. G., Matterne U., Mollberg N., Rahbari N. N., Hinz U., Koch M., Aigner M. &. Weitz J. (2009) Increased expression of ALCAM/CD166 in pancreatic cancer is an independent prognostic marker for poor survival and early tumour relapse *Br J Cancer* 3:457-464.

King J.A., Ofori-Acquah S.F., Stevens T., Al-Mehdi A-B., Fodstad O. &. Jiang W.G (2004) Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator *Breast Cancer Res Treat* 6:478-487.

King J.A., Tan F., Mbeunkui F., Chambers Z., Cantrell S., Chen H., Alvarez D., Shevde L.A &. Ofori-Acquah S.F (2010) Mechanisms of transcriptional regulation and prognostic significance of activated leukocyte cell adhesion molecule in cancer *Molecular Cancer* 9:266.

Kristiansen g., Pilarsky C., Wissmann C., Kaiser S., Bruemmendorf T., Roepcke S., Dahl E., Hinzmann B., Specht T., Pervan J., Stephan C., Loening S., Dietel M. & Rosenthal A. (2004) Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival textitJournal of Pathology 105:359-376.

Mezzanzanica D., Fabbi M., Bagnoli M., Staurengo S., Losa M., Balladore E., Alberti P., Lusa L., Ditto A., Ferrini S., Pierotti M. A., Barbareschi M., Pilotti S. &. Canevari S. (2008) Subcellular Localization of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule Is a Molecular Predictor of Survival in Ovarian Carcinoma Patients *Clinical Cancer Research* 6:1726-1733.

Ofori-Acquah S.F. & King J.A. (2008) Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer *Translational Research* 3:122-128.

Papaioannou T.G. & Stefanadis C. (2005) Vascular Wall Shear Stress: Basic Principles and Methods *Hellenic Journal of Cardiology* 46:9-15.

Robert Koch Institut (2012) Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe: Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert KochInstituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. [Online im Internet] URL:*http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/ GBE-DownloadsB/KID2012.pdf?__blob=publicationFile* [Stand: 23.12.13 21:08].

Schröder C., Schumacher U., Müller V., Wirtz R. M., Streichert T., Richter U., Wicklein D. &. Milde-Langosch K. (2010) The transcription factor Fra-2 promotes mammary tumour progression by changing the adhesive properties of breast cancer cells *European Journal of Cancer* 46:1650-1660.

Subik K., Lee J-F., Baxter L., Strzepek T., Costello D., Crowley P., Xing L., Hung M-C., Bonfiglio T., Hicks D.G &. Tang P. (2010) The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines *Breast Cancer (Auckl)* 4:35-41.

Sundd P., Pospieszalska M.K., Cheung L.S-L., Konstantopoulos K. &. Ley K. (2011) Biomechanics of leukocyte rolling *Biorheology* 48(1):1-35.

Swart G.W.M. (2002) Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): Developmental and mechanist aspects of cell clustering and cell migration *European Journal of Cell Biology* 81:313-321.

van Kempen L.C.L.T., den Oord J.J., Muijen G.N.P., Weidle U.H., Bloemers H.P.J &. Swart G.W.M (2000) Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule/CD166, a Marker of Tumor Progression in Primary Malignant Melanoma of the Skin *American Journal of Pathology* 156(3):769-774.

van Lunter P. C., Kilsdonk J.W.J., Beek H., Cornelissen I.M.H.A., Bergers M., Willems P.H.G.M., Muijen G.N.P &. Swart G.W.M (2005) Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a Novel Actor in Invasive Growth, Controls Matrix Metalloproteinase Activity *Cancer Research* 19:8801-8808.

Weidle U.H., Eggle D., Klostermann S. &. Swart G.W.M (2010) ALCAM/CD166: Cancer-related Issues *Cancer Genomics & Proteomics* 7:231-244.

Whelan T.J., Pignol J-P., Levine M. N., Julian J. A., MacKenzie R., Parpia S., Shelley W., Grimard L., Bowen J., Lukka H., Perera F., Fyles A., Schneider K., Gulavita S. &. Freeman C. (2010) Long-Term Results of Hypofractionated Radiation Therapy for Breast Cancer *N Engl J Med* 6:513-520.

Wiiger M.T., Gehrken H.B., Fodstad Ø., Mælandsmo G. M. &. Andersson Y. (2010) A novel human recombinant single-chain antibody targeting CD166/ALCAM inhibits cancer cell invasion in vitro and in vivo tumour growth *Cancer Immunol Immunother* 11:1665-1674.

Wong C.W., Dye D. E. &. Coombe D. R. (2012) The Role of Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules in Cancer Metastasis *International Journal of Cell Biology* 5:1-9.

World Health Organization WHO | Breast cancer: prevention and control [Online im Internet] URL: *http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html* [Stand: 23.04.2013 14:32].

Zimmerman A.W., Joosten B., Torensma R., Parnes J.R., Leeuwen F.N. &. Figdor C.G. (2005) Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells *Blood* 8:3212-3220.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Leuten bedanken, die mir während der Dissertation geholfen und beigestanden haben.
Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Dr. rer. nat. habil Karin Milde-Langosch, welche mir die Arbeit erst ermöglicht hat und zu der ich stets mit Problemen welcher Art auch immer kommen konnte.
Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Leticia Oliveira-Ferrer möchte ich dafür danken, dass sie mir geholfen hat auch die stressigen und aufreibenden Momente während der Laborarbeit zu überstehen.
Ebenso gilt mein Dank Kathrin Eylmann und Maila Rossberg, die mir jeder Zeit fachkundig zur Seite gestanden haben.
Dem Team der Anatomie II am Uniklinikum Eppendorf möchte ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und fachliche Unterstützung danken.
Auch ein großes Dankeschön an Janine und Philipp, die mich dazu gebracht haben die Dissertation zu vervollständigen.
Danke an alle Freunde und Freundinnen, welche hier unterwähnt bleiben aber für mein Durchhaltevermögen ebenso wichtig waren.
Abschließend möchte ich meiner Mutter Heidi danken, weil sie für mich da ist und meinem Vater Michael diese Arbeit widmen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Judith Andrea Overhoff
Geburtsdatum	13.09.1989
Geburtsort	Aachen

Schulische Ausbildung

1995-1999	Gemeinschaftsgrundschule Geilenkirchen
1999-2008	Bischöfliches Gymnasium St. Ursula Geilenkirchen Abschluss: Abitur

Universitäre Ausbildung

seit 10.2008	Universität Hamburg, Studium Humanmedizin
09.2010	1.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 07.2011	Dissertation im Gynäkologischen Forschungslabor am Uniklinikum Hamburg
04.2014	2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....