

# Bedeutung des Cocksackie- und Adenovirus Rezeptors (CAR) für die Metastasierung von Adenokarzinomen des Kolons

## **Dissertation**

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

vorgelegt von  
Tatjana Hoffmann M.Sc.  
aus Wilhelmshaven

Hamburg 2016

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Interdisziplinäre Endoskopie (Direktor Prof. Thomas Rösch) am Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. med. Anders angefertigt.

Gutachter: 1. Prof. Dr. med Mario Anders, Vivantes Wenckebach- Klinikum,  
Berlin  
2. Prof. Dr. Thomas Dobner, Heinrich- Pette- Institut Hamburg

Datum der Promotion: 28.4.2017

## **Inhaltsverzeichnis**

I. Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1. Das Kolonkarzinom	8
1.2. Cocksackie- und Adenovirusrezeptor	8
1.2.1. CAR während der Säugetierentwicklung	9
1.2.2. CAR- Expression im Kolonkarzinom	10
1.2.3. CAR- Expression in weiteren Tumorentitäten	10
1.3. Metastatische Kaskade	11
1.3.1. Invasion	13
1.3.2. Intravasation ins Gefäßlumen	14
1.3.3. Überleben im Blutstrom	14
1.3.4. Anhaften am Ort der Metastasierung	15
1.3.5. Extravasation	16
1.3.6. Überleben am Ort der Metastasierung und Bildung von Metastasen	17
1.4. Fragestellung und Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Materialien	19
2.1.1. Chemikalien	19
2.1.2. Antikörper	20
2.1.3. Zellen	21
2.1.4. Verbrauchsmaterial	21
2.1.5. Geräte	22
2.1.6. Puffer	23
2.2. Methoden	24
2.2.1. Zellbiologische Methoden	24
2.2.1.1. Humane Tumorzelllinien	24
2.2.1.2. Primärzellen	24
2.2.1.3. Zellkulturbedingungen	25
2.2.1.4. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer- Zählkammer	25
2.2.1.5. Zellzahlbestimmung mit CASY	25
2.2.1.6. Detektion von Mykoplasmenkontamination in der Zellkultur	25
2.2.1.7. Durchflusszytometrie	26
2.2.1.7.1. Durchflusszytometrie mit Antikörpern	26

2.2.1.7.2. Durchflusszytometrie: Nachweis von Selektinbindungsstellen	26
2.2.1.8. Zellproliferationsassay	27
2.2.1.9. Migrationsassay	27
2.2.1.10. Invasionsassay	28
2.2.1.11. Angiogenese- Versuch	28
2.2.1.11.1. Normoxischen Bedingungen	28
2.2.1.11.2. Hypoxischen Bedingungen	29
2.2.1.12. Zellflussversuche	29
2.2.1.12.1. Selektinbeschichtung	29
2.2.1.12.2. HUVECs	30
2.2.2. Tierexperimentelle Arbeiten	30
2.2.2.1. Subkutane Inokulation von humanen Tumorzellen	31
2.2.2.2. Gewebe- und Blutentnahme	31
2.2.3. Molekularbiologische Methoden	31
2.2.3.1. shRNA vermittelter Knockdown von CAR	31
2.2.3.2. Synthese shRNA tragender Plasmide	32
2.2.3.3. Lentivirale Transduktion	33
2.2.3.4. Transfektion	34
2.2.3.5. Erzeugung der Knockdown- Zelllinien	34
2.2.3.6. Isolierung von RNA aus Zellen	35
2.2.3.7. cDNA Synthese	35
2.2.3.8. ECM-Array	36
2.2.3.9. Isolierung von DNA aus Blut, Knochenmark und Zellen	36
2.2.3.10. Isolierung von DNA aus Mauslungen	36
2.2.3.11. ALU- PCR	36
2.2.3.12. RNA- Extraktion für die Next Generation Sequenzierung	37
2.2.3.12.1. RNA- Extraktion aus Tumoren	37
2.2.3.12.2. RNA- Extraktion aus Zellen	38
2.2.3.13. Herstellung der Library und Next Generation Sequenzierung	39
2.2.4. Proteinbiochemische Methoden	39
2.2.4.1. Gesamtzelllysate	39
2.2.4.2. Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte mittels Bicinchoninsäure (BCA)	39
2.2.4.3. SDS- PAGE	40
2.2.4.4. Proteintransfer	41

2.2.4.5. Westernblot	41
2.2.4.6. Gelatine- Zymografie	42
2.2.5. Histologie und Immunhistologie	42
2.2.5.1. Einbettung von Mausgewebe	42
2.2.5.2. Hämatoxin- Eosin- Färbung zur Bestimmung von Lungenmetastasen	43
2.2.5.3. Feulgen Färbung	44
2.2.5.4. Immunhistochemie	45
2.2.5.4.1. Entparaffinierung	45
2.2.5.4.2. Entwässerung und Eindeckeln	45
2.2.5.4.3. Antigen- Demaskierungsmethoden	46
2.2.5.4.4. Avidin- Biotin-Methode	47
2.2.5.4.5. <i>Catalyzed signal amplification</i> – Methode (CSA)	48
2.2.6. Statistische Analyse	49
3. Ergebnisse	50
3.1. Bedeutung von der CAR- Expression im Xenograftmodell	50
3.1.1. CAR- Expression	50
3.1.1.1. shRNA vermittelter Knockdown von CAR in humanen Kolonkarzinomzellen	50
3.1.2. Xenograftmodell: Endpunktversuch	54
3.1.3. Xenograftmodell: Überleben	57
3.1.4 Masson- Goldner- Färbung	64
3.1.5. Proliferation	65
3.1.6. Mitose und Apoptose	67
3.2. Rolle von CAR bei der Interaktion vom Primärtumor mit der extrazellulären Matrix	69
3.2.1. PCR-Array	69
3.2.2. Expression von Oberflächenproteinen auf transfizierten Zelllinien	70
3.2.2.1. Selektinliganden	70
3.2.2.2. CD44	71
3.2.2.3. Integrine	73
3.2.3. Angiogenese- Versuch	77
3.2.4. Migration	81
3.2.5. Gelatine- Zymografie	83
3.2.6. Expression von Matrixmetalloproteinasen im Xenografttumor	83
3.2.7. Invasionsassay	88
3.3. Die Rolle von CAR bei der hämatogenen Metastasierung	89

3.3.1. Flussversuche	89
3.3.1.1. Flussversuche auf Selektinbeschichtung	89
3.3.1.2. Flussversuche auf HUVECs	90
3.4. Die Rolle von CAR in Kolonkarzinomzellen	91
3.4.1. Weitere Ergebnisse der Next Generation Sequenzierung	91
4. Diskussion	95
5. Zusammenfassung	112
6. Summary	114
7. Literaturverzeichnis	116
8. Anhang	126
9. Danksagung	130
Eidesstattliche Erklärung	132

## I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	KRK	kolorektales Karzinom Deutschen Sammlung von
µg	Mikrogramm	DMSZ	Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
µl	Mikroliter	LB- Medium	lysogeny broth Medium
ANGTPL	Angiopoietin- like4	Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
BCA	Bicinchoninsäure	ml	Milliliter
BSA	bovines Serumalbumin	mm	Millimeter
bzw.	beziehungsweise	MMP	Matrixmetalloproteinase
ca.	zirka	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion	NK- Zellen	natürliche Killerzellen
CAR	Coxsackie - und Adenovirusrezeptor	P/ S	Penicillin/ Streptomycin
CHO	Chinese hamster ovary	PBS	phosphat- gepufferte Salzlösung
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	PCR	Polymerasekettenrektion
COX 2	Cyclooxygenase 2	PI	Propidiumiodid
d. h.	das heißt	PIC	Proteinase Inhibitor Cocktail
DEPC	Diethyldicarbonat	qRT- PRC	Quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium,	RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
DANN	Desoxiribonukleinsäure	rpm	Umdrehungen pro Minute
DPBS	Dulbecco's Phosphate- Buffered Saline	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition	RT	Raumtemperatur
EREG	pan-HER ligand epiregulin	SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
FACS	fluorescence- activated cell sorting	TBST	Tris Buffered Saline with Tween
FCS:	fetales Kälberserum	TF	tissue factor
HER	human epidermal growth factor receptor	TGFβ	Transforming growth factor β
HIF- 1	hypoxia- inducible transcription factor 1	U	<i>units/</i> Einheiten
HRE	hypoxia- respons elements	VEGF	Vascular endothelial growth factor
HRP	horseraddish persoxidase	vgl.	vergleiche
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	z. B.	zum Beispiel
kDa	Kilodalton	ZO- 1	Zona Occludens Protein 1

# **1. Einleitung**

## **1.1. Das Kolonkarzinom**

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist weltweit die dritthäufigste Krebsentität und die vierthäufigste Todesursache unter den Tumoren. Es erkranken rund 1,2 Millionen Menschen jährlich neu am Kolonkarzinom mit 600.000 Todesfällen pro Jahr. Das höchste Vorkommen ist in Ländern von Europa, Nordamerika und Ozeanien, wohingegen das geringste Erkrankungsrisiko in einigen Ländern Süd- und Zentralasiens und Afrika ist (Brenner *et al* 2014). Unter dem KRK werden Krebserkrankungen des Dick- und Mastdarms zusammengefasst (Robert Koch- Institut, 2012). In Deutschland ist das KRK bei Frauen und Männern die zweithäufigste Tumorerkrankung (Pox und Schmiegel 2014). 2011 erkrankten ca. 28.421 Frauen und 34.470 Männer neu am KRK (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. , 2014). Histologisch betrachtet handelt es sich bei den kolorektalen Karzinomen um Adenokarzinome. Sie entwickeln sich durch die sogenannte Adenom- Karzinom- Sequenz (Pox und Schmiegel 2014).

In vielen Ländern hat sich die Prognose von Patienten mit KRK langsam aber stetig verbessert, wobei das Stadium bei der Diagnose der wichtigste prognostische Marker ist. So liegt die relative 5- Jahres- Überlebensrate bei Patienten mit einem lokalen Stadium bei 90,1 %, bei Patienten mit regionaler Ausbreitung bei 69,2 % und bei Patienten mit entfernten Metastasen bei nur noch 11,7 % (Brenner *et al* 2014).

## **1.2. Coxsackie- und Adenovirusrezeptor**

Der Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR) wurde erstmals beschrieben als der Coxsackievirus B3 einen Detergenzien- stabilen Komplex mit einem 46 kDa großen Zelloberflächenmolekül der HeLa Zellen bildete. Durch die Verwendung eines Antikörpers gegen diesen Komplex gelang es zum ersten Mal den Coxsackie- und Adenovirusrezeptor zu beschreiben. Basierend auf der cDNA, welche für Transfektionsexperimente verwendet wurde, konnten Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz des entdeckten Proteins gezogen werden. CAR besteht aus 365 Aminosäuren, wobei 222 Aminosäuren den extrazellulären und 107 Aminosäuren den interzellulären Teil bilden, die von einer membrandurchspannenden helikalen Domäne verbunden werden. Experimente mit CHO- Zellen, die mit der cDNA für CAR transfiziert wurden, zeigten, dass das Protein als funktioneller Rezeptor für das Anheften und die Infektion durch die Coxsackieviren B3 und B4 dient, sowie die spezifische, Protein- vermittelte Anheftung der Adenoviren vermittelt, was zu dem Namen Coxsackie- und Adenovirusrezeptor führte (Bergelson *et al* 1997).

CAR wird in polarisierten epithelialen Zellen im Bereich der tight junctions exprimiert. In dieser Region assoziiert es z. B. mit dem Protein ZO- 1 und dient als Barriere für die Bewegung von Makromolekülen und Ionen, wobei es sich bei der Interaktion zwischen den einzelnen Zellen um eine homophile Interaktion zwischen zwei CAR- Molekülen handelt (Cohen *et al* 2001). Hierbei findet man CAR vor allem in gut organisierten polarisierten Epithelzellschichten, die verschiedene Körperhöhlen auskleiden, wie z. B. den Verdauungstrakt oder die Atemwege, wie in Studien in der Maus gezeigt werden konnte. Auch in anderen Zellen epithelialer Herkunft wie Podozyten in der Niere oder Hepatozyten in der Leber, d. h. Zellen, die zwar nicht mehr die charakteristisch polarisierte Struktur von Epithelien aufweisen, aber dennoch wichtige, wie oben beschriebene Barrierefunktionen erfüllen (Raschperger *et al* 2006). Zudem wurde eine Interaktion von CAR mit Proteinen beschrieben, die eine PDZ- Domäne besitzen, was der Grund für die Rolle von CAR bei der Zelladhäsion und der Regulation von Zellwachstum sein könnte (Excoffon *et al* 2004).

### **1.2.1. CAR während der Säugetierentwicklung**

CAR wurde zwar zuerst als Rezeptor für Viren entdeckt, hat primär jedoch physiologische Funktionen. So findet man CAR in den sich entwickelnden Geweben von Mausembryonen z. B. im zentralen Nervensystem, Leber, Lunge, Herz, Niere und Auge (Mirza *et al* 2005). Nach der Geburt kommt es bei Nagetieren z.B. im zentralen Nervensystem zu einer schnellen Herabregulation von CAR (Raschperger *et al* 2006). Auch bei der Entwicklung des Herzens spielt CAR eine wichtige Rolle. In den Kardiomyozyten von Ratten ist CAR vor der Geburt stark exprimiert, nimmt jedoch im erwachsenen Herzen rapide ab (Kashimura *et al* 2004).

Homozygote Nachkommen heterozygoter Mäuse, die ein funktionsunfähiges CAR- Gen haben, sterben bereits *in utero* am Tag 11,5 bis 13,5 der embryonalen Entwicklung. Es zeigte sich, dass die Tiere kleinere Ventrikellumen haben, ebenso wie nur einen atrioventikulären Kanal anstatt von zweien. Es handelt sich also um eine Verzögerung in der Entwicklung durch das funktionsunfähige homozygote CAR- Gen (Dorner *et al* 2005).

### **1.2.2. CAR- Expression im Kolonkarzinom**

Über die Expression von CAR im Kolonkarzinom ist bisher wenig publiziert worden.

Bekannt ist, dass CAR als Marker für die Dedifferenzierung von Tumoren im Kolon geeignet ist, d. h. dass CAR in den Tumoren weniger exprimiert wird, wenn man den Tumor mit dem Normalgewebe vergleicht (Korn *et al* 2006). Das Ergebnis, dass der Verlust von CAR mit einem Fortschreiten der Tumorerkrankung einher geht, wurde weiterhin bestätigt, da CAR in undifferenzierten Tumoren im Vergleich zu gut oder moderat differenzierten Tumoren herab reguliert wird (Zhang *et al* 2008).

### **1.2.3. CAR- Expression in weiteren Tumorentitäten**

Die Expression von CAR wurde schon in mehreren Tumorentitäten mit verschiedenen Methoden untersucht, da die Möglichkeit Tumore mit Hilfe von Adenoviren zu therapieren in der Klinik von großem Interesse ist und somit auch deren Hauptrezeptor CAR im Fokus des Interesses steht. Schaut man sich die Gesamtheit der Tumorentitäten an, so kann man feststellen, dass in einigen Entitäten die Expression von CAR mit zunehmender Malignität abnimmt, in anderen zunimmt.

In der Prostata kann eine Abnahme der CAR- positiven Zellen und der Färbeintensität mit zunehmendem Gleason- Score im Vergleich zum Normalgewebe beobachtet werden (Rauen *et al* 2002). Zudem wurde CAR hier als ein Marker für die Dedifferenzierung des Tumors identifiziert, d. h. je weniger differenziert der Tumor ist, desto stärker ist auch der Verlust von CAR (Korn *et al* 2006). Auch wurde in Harnblasenkarzinomen gezeigt, dass das mRNA-Signal in invasiven Tumoren im Vergleich zu oberflächlichen Tumoren verringert ist (Okegawa *et al* 2001). Dies wurde durch eine weitere Studie bestätigt, in der ein Zusammenhang zwischen der Herabregulation von CAR und dem Stadium und Grad der Erkrankung gefunden wurde, d. h. einem aggressiveren Phänotypen entspricht (Sachs *et al* 2002, Matsumoto *et al* 2005). Im Astrozytom wurde ebenfalls ein Verlust von CAR mit zunehmender Malignität beobachtet (Fuxe *et al* 2003). Auch verschiedene Nierenkrebsentitäten bestätigen den häufig beobachteten Verlust von CAR im Tumor (Okegawa *et al* 2007). Hierbei war jedoch zu beobachten, dass in allen Stadien und Graden die Expression von CAR reduziert oder sogar ganz verloren gegangen ist. Da es keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Graden und Stadien gab wird vermutet, dass der Verlust von CAR mit der frühen Karzinogenese im Zusammenhang steht (Okegawa *et al* 2007).

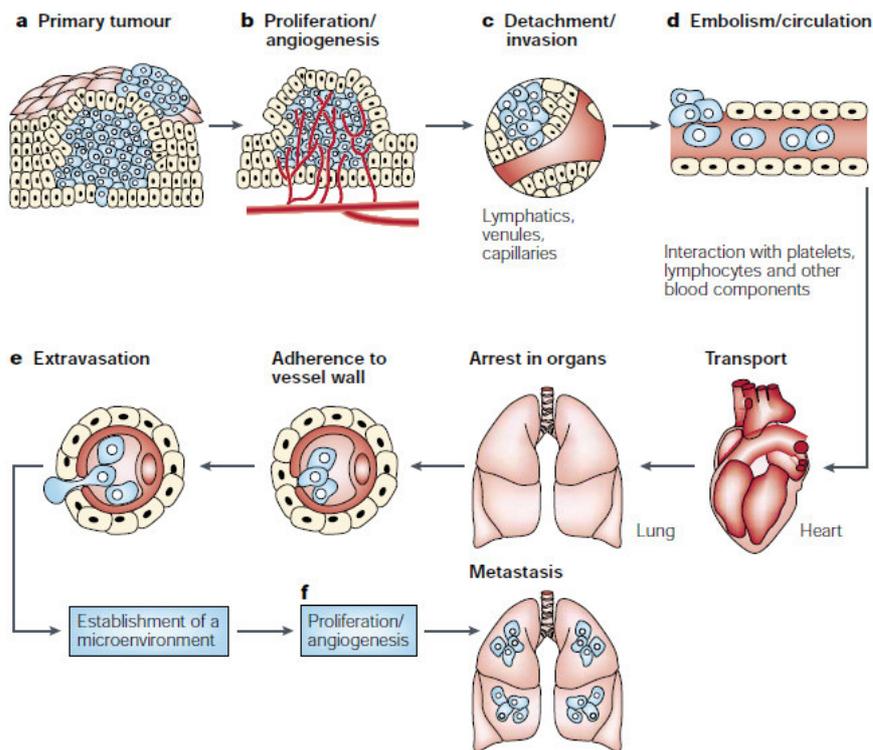
Das Endometriumkarzinom ist ein Beispiel für die Heraufregulation von CAR mit zunehmender Dedifferenzierung. Während in gut differenzierten Tumoren öfter keine CAR-Immunoreaktivität gezeigt wird verglichen mit moderat oder schlecht differenzierten Tumoren. CAR ist also sowohl klinisch relevant für die Tumordifferenzierung, als auch für den histologischen Typen und die Proliferation (Giaginis *et al* 2008). Untersuchungen am Mammakarzinom ergaben, dass die Expression von CAR in Tumorgeweben erhöht ist und mit zunehmender Dedifferenzierung zunimmt. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem erhöhten CAR- Level und einer verminderten Überlebenserwartung (Martin *et al* 2005).

Es gibt jedoch auch gegenläufige Ergebnisse, die zeigen, dass es zwischen Kontrollgeweben und Tumoren keinen signifikanten Unterschied in der Expression von membranständigem CAR gibt. Die membranständige Isoform ist jedoch in Tumoren, die gut differenziert sind, deutlich vermehrt exprimiert, im Vergleich zu dedifferenzierten Proben (Auer *et al* 2009).

Für das Ovarialkarzinom liegen ähnlich wie für das Mammakarzinom gegenläufige Befunde vor. In besser differenzierten Tumoren ist eine stärkere Immunoreaktivität für CAR zu sehen als in schlechter differenzierten Tumoren (Zeimet *et al* 2002). Zudem liegen in Tumoren mehr Transkripte von CAR vor als im normalen Gewebe. Dabei ist die höhere Expression der löslichen Isoformen 2/7, 3/7 und 4/7 mit einer fortgeschrittener Erkrankung verbunden. Patienten mit einer hohen Expression der Isoformen 3/7 und 4/7 zeigen eine geringeres Gesamtüberleben bzw. krankheitsfreies Überleben (Reimer *et al* 2007). Im Bronchialkarzinom konnte gezeigt werden, wie wichtig eine individuelle Ermittlung des CAR- Levels im Tumor ist. In vielen Plattenepithelkarzinomen werden hohe Level von CAR exprimiert, wohingegen in vielen Adenokarzinomen in der Lunge kein CAR gefunden wird (Wang *et al* 2006).

### **1.3. Metastatische Kaskade**

Das Entstehen von Metastasen bei der Tumorerkrankung ist der Hauptgrund für die Todesfälle bei dieser Art der Erkrankung. Metastasen entstehen durch eine komplexe molekulare Kaskade, die sogenannte Invasions- Metastasierungs- Kaskade (Brooks *et al* 2010). Diese besteht aus mehreren Schritten, von denen jeder erfolgslimitierend sein kann. Abbildung 1.1. (aus Fidler 2003) fasst die verschiedenen Schritte schematisch zusammen.



**Abbildung 1.1.: Ablauf der metastatischen Kaskade (aus Fidler 2003).** Dargestellt ist der schematische Ablauf der metastatischen Kaskade, angefangen bei dem Primärtumor (a), welcher vaskularisiert werden muss (b). Anschließend erfolgt das Loslösen der Tumorzellen vom Primärtumor und die Einwanderung ins Gefäßlumen (c). Durch die Zirkulation (d) gelangen die Tumorzellen an den Ort der Metastasierung, wo sie extravasieren (e) und schlussendlich durch Proliferation und späterer Angiogenese zu klinisch detektierbaren Metastasen werden (f).

Kurz zusammengefasst muss der Primärtumor ab einer bestimmten Größe zuerst die Angiogenese anregen, um ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt zu werden (vgl. Abbildung 1.1. b) (Harris *et al* 2002). Nun können sich einzelne oder auch Zellgruppen vom Tumor lösen (Valastyan und Weinberg 2011), durch die Basalmembran und extrazelluläre Matrix invadieren und schließlich in ein Gefäß eindringen (Intravasation, Abbildung 1.1. c) (Valastyan und Weinberg 2011). Nachdem die Tumorzellen im Blutstrom angekommen sind (Abbildung 1.1. d), müssen sie dort überleben (Valastyan und Weinberg 2011, Joyce und Pollard 2009) und am Ort der Metastasierung an das Gefäßendothel adhären (Valastyan und Weinberg 2011). Hier können sie schließlich aus dem Gefäß auswandern (Extravasation) (Valastyan und Weinberg 2011). Wenn die Tumorzellen am Ort der Metastasierung überleben können, haben sie nun die Chance zu proliferieren und so zu klinisch detektierbaren Makrometastasen heranzuwachsen (Abbildung 1.1. e) (Brooks *et al* 2010, Valastyan und Weinberg 2011, Fidler 2003). Auf die einzelnen Schritte der Kaskade wird im folgenden genauer eingegangen.

### 1.3.1. Invasion

Damit ein Tumor erfolgreich wachsen und schließlich invadieren kann, muss der Primärtumor zuerst über die avaskuläre Phase herauskommen, in der der Tumor ca. ein bis zwei Millimeter groß ist (Bergers und Benjamin 2003). Proliferiert der Tumor weiter, so erreicht er irgendwann eine Größe, in der er nicht mehr ausreichend über Diffusion mit Nährstoffen und Sauerstoff aus dem Blut versorgt werden kann und somit in eine "chronische Hypoxie" übergeht (Harris 2002). Es werden vom Tumor dann Substanzen abgegeben, um die Angiogenese anzuregen, wodurch er in die vaskuläre Phase übergeht (Bergers und Benjamin 2003) und wachsen kann.

Einer der Faktoren, der durch die Hypoxie aktiviert wird, ist der hypoxia- inducible transcription factor 1 (HIF- 1). Dieser kann an hypoxia- response elements (HREs) binden und so verschiedene Gene aktivieren, die z. B. für die Zellproliferation, Angiogenese, Stoffwechsel, Apoptose, Immortalisierung oder Migration verantwortlich sind (Harris 2002).

Nicht nur die Tumorzellen selber, sondern auch Zellen, die in den Tumor infiltrieren, spielen eine Rolle bei der Angiogenese, wie z. B. Leukozyten, die von proangiogenen Molekülen und inflammatorischen Cytokinen angelockt werden. So kann z. B. die Freisetzung von VEGF durch den Tumor dafür sorgen, dass neutrophile Granulozyten des Tumorstromes in den Tumor einwandern und so die Menge von MMP9 im Tumor erhöhen (Deryugina und Quigley 2015). VEGF und MMP9 sind weitere wichtige Moleküle für die Angiogenese. In Mäusen mit dem Wildtypgen für MMP9 wachsen Tumore aus SKOV3 Zellen, die stark vaskularisiert sind und schnell wachsen. Werden die Zellen jedoch in Tiere, die kein intaktes MMP9- Gen haben, injiziert, so haben die Tiere weniger Tumore und eine geringere Dichte an Tumormikrogefäßen (Huang *et al* 2002). Auch in Medulloblastomzellen wurde die Bedeutung von MMP9 verifiziert. Bei einer Inhibition von MMP9 und VEGF durch SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) kommt es zu kleineren und schlechter vaskularisierten Tumoren (Deryugina und Quigley 2015). Zudem spielt MMP9 bei der Invasion des Tumors durch Makrophagen eine Rolle. In MMP9 defizienten Tieren wird eine verminderte Invasion des Tumors durch Makrophagen beobachtet, was wiederum dazu führt, dass in dem Tumor eine geringere Konzentration an VEGF vorliegt (Huang *et al* 2002).

Für die Entstehung von Metastasen aus einem Primärtumor müssen sich Tumorzellen vom Primärtumor lösen und in Gefäßlumen eindringen können. Dies kann als Einzelzellen oder als Verbund mehrerer Zellen im Zuge einer kollektiven Invasion geschehen (Valastyan und Weinberg 2011). Damit die Tumorzellen sich von dem Primärtumor lösen können durchlaufen sie die sogenannte epitheliale- mesenchymale- Transition (EMT). Hierbei

verlieren sie ihren epithelialen Phänotyp, d. h. sie lösen ihre Adhäsionsverbindungen und ihre tight junctions (Thiery *et al* 2009). Hierdurch verlieren die Tumorzellen ihre Polarität, ihren Zusammenhalt und können nun zuerst durch die Basalmembran brechen und dann die extrazelluläre Matrix zersetzen um erfolgreich in das Stroma einzuwandern (Valastyan und Weinberg 2011).

### **1.3.2. Intravasation ins Gefäßlumen**

Intravasation ist die Einwanderung von Zellen in das Lumen von Blut- oder Lymphgefäßen. Zu dem Vorgang der Intravasation gibt es verschiedene Hypothesen. Unter anderem wird davon ausgegangen, dass sich die Endothelzellen nach Ankunft der Tumorzellen an den Gefäßen zurückziehen und so die Passage der Tumorzellen in das Gefäßlumen ermöglichen (Blood und Zetter 1990).

Die durch Angiogenese im Tumor neu entstandenen Gefäße weisen außerdem eine abnormale und funktionelle unreife Struktur auf (Carmeliet und Jain 2011). Sie sind chaotisch und haben ein erweitertes, irreguläres Lumen (Deryugina und Quigley 2015). Zudem sind die neuen Gefäße stark durchlässig, haben eine defiziente Perizytenummantelung und eine abnormale endotheliale Auskleidung (Deryugina und Quigley 2015). Wichtig für das Tumorwachstum ist jedoch lediglich, dass die Gefäße so funktionell sind, dass sie den Tumor mit Blut versorgen können, da es ohne den Blutfluss nicht zu einer Verteilung der Tumorzellen kommen kann (Deryugina und Quigley 2015).

### **1.3.3. Überleben im Blutstrom**

Sind die Tumorzellen in die Gefäße eingewandert müssen sie im Blutstrom überleben. Hier können sie durch Scherkräfte zerstört werden oder auch durch den Angriff von Zellen des Immunsystems, wie den natürlichen Killerzellen (NK- Zellen) (Valastyan und Weinberg 2011, Joyce und Pollard 2009). Zudem verlieren die Tumorzellen in der Zirkulation ihre Integrin- vermittelte Adhäsion an die extrazelluläre Matrix, eine Verbindung, die normalerweise essentiell für das Überleben von Zellen ist. Durch den Verlust des Anoikis können die Zellen trotz fehlender Adhäsion im Blutstrom überleben (Guo und Giancotti 2004).

Eine Möglichkeit der Überwachung des Immunsystems zu entgehen ist die Interaktion mit Blutplättchen, mit denen die Tumorzellen via Selektine einen Emboli bilden und so nicht mehr von den NK- Zellen detektiert werden können. Auch der Tumorzell- assoziierte tissue factor (TF), der sowohl das frühe Überleben der Mikrometastasen durch eine Fibrinogen-

abhängige Inhibierung der NK- Zellen unterstützt, als auch die Tumorzellen vor der mechanischen Zerstörung durch Scherkräfte schützt (Palumbo *et al* 2007), ist ein möglicher Überlebensmechanismus. Die auf diese beiden Arten entstandenen Tumoremboli könnten zudem auch das Verlangsamen im Blutstrom und die daraus resultierende Adhäsion vermitteln (Joyce und Pollard 2009). Die Verweildauer der Zellen im Blutstrom ist generell sehr kurz. Es wurde bereits gezeigt, dass z. B. zirkulierende Tumorzellen des Mammakarzinoms im Blut eine sehr kurze Halbwertszeit im Bereich von Stunden haben (Meng *et al* 2004).

#### **1.3.4. Anhaften am Ort der Metastasierung**

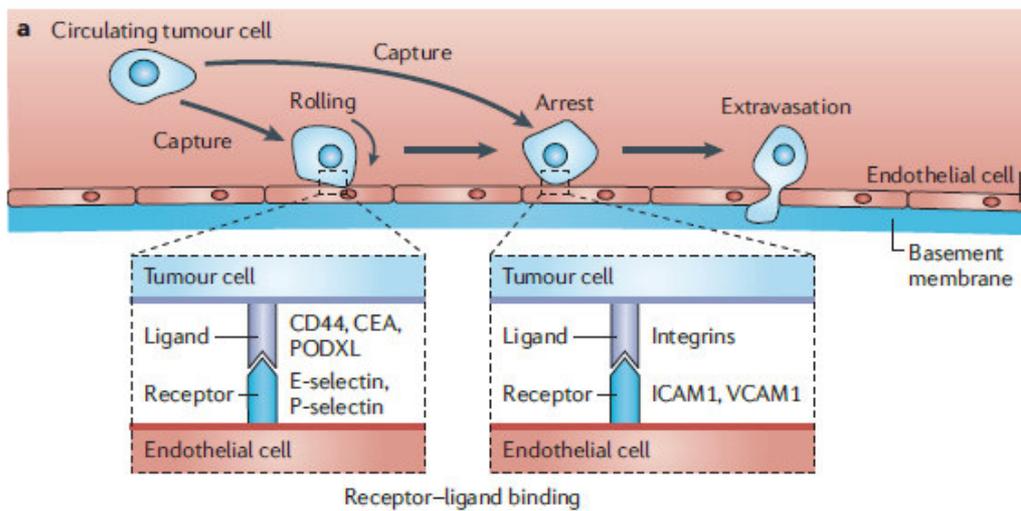
Damit die Tumorzellen, die es erfolgreich geschafft haben sich vom Primärtumor zu lösen, in ein Gefäß zu intravasieren und im Blutstrom zu überleben, eine Metastase bilden können, müssen sie zuerst im Blutstrom anhalten um dort ins umgebende Gewebe zu extravasieren.

Für die Auswanderung aus dem Gefäß gibt es zwei Hypothesen: Zum einen die Hypothese des mechanischen Abstoppens, laut der die Tumorzellen bzw. Embolie in Gefäßen stecken bleiben, die kleiner sind als ihr eigener Durchmesser (Fidler 2003, Orr *et al* 2000) oder durch ein aktives Ansteuern auf Grund von genetisch bedingten Ligand- Rezeptor Interaktionen (Fidler 2003, Valasyan *et al* 2011).

Bei dem aktiven Adhärenzen an das Endothel wird ein ähnlicher Mechanismus von den Tumorzellen verwendet wie bei der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom. Die Tumorzellen im Blutstrom kommen mit dem Endothel in Berührung und gehen hierbei zuerst über Selektine auf der Oberfläche des Endothels schwache Bindungen ein, die zu einer Verlangsamung der Tumorzellen im Blutstrom führt und somit zu einem Rollen der Tumorzellen über das Endothel (vgl. Abbildung 1.2. rolling) (Wirtz *et al* 2011, Geng *et al* 2012). Hierdurch werden weitere Moleküle herauf reguliert, wie z. B. die Integrine. Durch diese können nun die Tumorzelle fest an das Endothel heften und so weitere Schritte der Metastasierung ermöglichen (vgl. Abbildung 1.2. arrest) (Brooks *et al* 2010).

Die Rolle der Selektine für den initialen Kontakt der Tumorzellen mit dem Endothel ist hierbei von besonderer Bedeutung für die Entstehung von Metastasen. Kolonkarzinomzellen rollen in einer Selektin- abhängigen Form über vaskuläres Endothel. Zudem werden in E- und P- Selektin- defizienten Mäusen weniger Lungenmetastasen gefunden als in Kontrolltieren. Hierbei ist auffällig, dass in den Selektin- defizienten Tieren mehr Zellen im Blut zu detektieren sind (Köhler *et al* 2010). Folglich sind Selektine bzw. die Selektin- Liganden auf den Tumorzellen für die erfolgreiche Anheftung der Tumorzellen an das Endothel

unerlässlich, da ohne die Verlangsamung der Tumorzellen im Blutstrom die feste Anheftung und somit verbundene Extravasation nicht stattfinden kann.



**Abbildung 1.2.: Verlangsamen und Anheften der zirkulierenden Tumorzellen** (aus Wirtz *et al* 2011). Dargestellt ist der Ablauf des Verlangsamens und des Anhaftens der Tumorzellen am Endothel am Ort der Metastasierung mit den involvierten Molekülen. Die zirkulierenden Tumorzellen werden zuerst abgebremst (capture) und rollen über das Endothel (rolling). Dies ist eine lockere Interaktion, die durch Selektinliganden, wie z. B. CD44 auf den Tumorzellen vermittelt wird. Anschließend adhären die Tumorzellen durch Integrin-vermittelte Interaktionen fest an das Endothel (arrest) (Wirtz *et al* 2011, Strell und Entschladen 2008).

Ebenso wichtig wie die Selektine bei der Adhäsion sind die Integrine. Diese vermitteln die feste Adhäsion an das Endothel wodurch die Extravasation ermöglicht wird. So wurde z. B. Integrin  $\alpha 4$  auf vielen verschiedenen humanen Tumorzellen nachgewiesen, welches zusammen mit Integrin  $\beta 1$  oder Integrin  $\beta 7$  als Ligand für VCAM-1 und Fibronectin dienen kann (Strell und Entschladen 2008).

Eine weitere Möglichkeit die Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel zu vermitteln ist die Interaktion mit Zellen im Blut des Wirtes. So erhöht die Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten die Adhäsion der Mammakarzinomzelllinie MDA- MB- 468 an das Endothel (Strell und Entschladen 2008).

### 1.3.5. Extravasation

Nach der Anheftung an das Endothel müssen die Tumorzellen die Gefäße am Ort der Metastasierung verlassen. Dieser Vorgang heißt Extravasation. Hierbei können die Tumorzellen entweder alleine oder zusammen mit Hilfe von Zellen des Wirtes das Endothel passieren (Valastyan und Weinberg 2011).

Es gibt verschiedene Faktoren, die den Tumorzellen dabei helfen durch das Endothel am Ort der Metastasierung zu wandern. Hierbei wurden zum Beispiel pan-HER ligand epiregulin

(EREG), Cyclooxygenase 2 (COX2), sowie die MMP1 und MMP2 als notwendige Moleküle für das Durchbrechen der Lungengefäße im Mammakarzinom identifiziert (Gupta *et al* 2007). Auch das Cytokin TGF $\beta$  wurde als ein Vermittler von Lungenmetastasen identifiziert. Durch die Heraufregulation von Angiopoietin- like4 (ANGPTL4) wird das Endothel am Ort der Metastasierung hyperpermeabel, da ANGPTL4 als Antagonist auf die tight junctions und Adhärenzverbindungen im Endothel wirkt (Padua *et al* 2008).

Der aktive Teil der Extravasation der Tumorzellen wird unter anderem durch Integrine vermittelt. Hierbei ist unter anderem die Interaktion von Integrin  $\alpha\beta$ 3 mit L1- CAM zu nennen (Strell und Entschladen 2008, Voura *et al* 2001).

### **1.3.6. Überleben am Ort der Metastasierung und Bildung von Metastasen**

Haben die Tumorzellen erfolgreich das Gefäß verlassen befinden sie sich an einem Ort, deren Milieu sich vom Ort des Primärtumors unterscheidet weshalb die Tumorzellen zuerst schlecht an das neue Milieu angepasst sind (Valastyan und Weinberg 2011). Es gibt zwei Modelle, die das Überleben am Ort der Metastasierung erklären könnten. Zum einen könnte eine prämetastatische Nische entstehen, zum anderen könnte es an spezifischen Eigenschaften der diseminierten Tumorzelle liegen (Psaila und Lyden 2009). Die Zellen, die erfolgreich im Stroma des Organs, in das sie metastasiert sind, überlebt haben, können nun proliferieren, wenn sie die passenden Anpassungen für dieses Milieu haben (Chambers *et al* 2002). Die meisten Zellen am metastatischen Ort weisen eine über Wochen oder Monate verlangsamte Proliferation auf oder können als Mikrokolonien in dem Zustand einer Langzeitruhe bestehen, ohne an Tumormasse zu- oder abzunehmen (Valastyan und Weinberg 2011).

#### **1.4. Fragestellung und Zielsetzung**

Bei dem kolorektalen Karzinom handelt es sich um eine der häufigsten Krebsentitäten weltweit. Für den Behandlungserfolg ist hierbei das Vorhandensein von Metastasen ein wichtiges Merkmal (Brenner *et al* 2014)

Wichtig bei der Metastasierung ist die verminderte intrazelluläre Adhäsion, in deren Zusammenhang tight junction Proteine von besonderem Interesse sind (Anders *et al* 2009b). Ein Bestandteil dieser tight junctions ist der Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor, der in dieser Arbeit genauer untersucht werden soll. Für ihn wurde bereits eine verminderte Expression in Primärtumoren gezeigt wobei das Protein in Lebermetastasen wieder an der Zelloberfläche nachweisbar ist (Stecker *et al* 2011).

In dieser Arbeit soll in zwei wichtigen Schritten der Metastasierung die Rolle von CAR untersucht werden. Zum einen soll untersucht werden, welche Rolle CAR bei der Interaktion mit dem Primärtumor und der extrazellulären Matrix spielt, zum anderen soll die Rolle von CAR bei der hämatogenen Metastasierung geklärt werden.

Hierfür sollen, neben den klassischen Xenograftmodellen, *in vitro* Versuche genutzt werden, um einzelne Schritte der Metastasierung unabhängig von vielen, nicht kontrollierbaren Faktoren nachzuvollziehen. Hierfür werden Zellen genutzt, in denen CAR durch einen shRNA- Vektor vermindert exprimiert wird.

Um die Frage nach dem Einfluss von CAR auf die Metastasierung zu klären werden Flussversuche an Endothelzellen aus der Nabelschnur mit Tumorzellen, die einen unterschiedlichen CAR- Status haben, durchgeführt. Zudem werden Migrations- und Invasionsversuche gemacht, um das migratorische und invasive Potential der Zellen zu untersuchen, da dies von Bedeutung bei der Ein- und Auswanderung von Gefäßen ist. Zudem sollen mittels Next Generation Sequenzierung der mRNA- Status von Molekülen ermittelt werden, sowie mittels Durchflusszytometrie an Zellen und Färbungen an Schnitten der Primärtumore der tatsächliche Proteinstatus ermittelt werden. Zu den relevanten Proteinen, die in dieser Arbeit untersucht werden sollen, gehören CD44 als Interaktionspartner von Hyaluronsäure, Selektinliganden und Integrine, die eine Rolle bei der hämatogenen Metastasierung spielen, sowie MMPs.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

0,05 % Trypsin-EDTA (Gibco)	Essigsäure (J.T. Baker)
10 % Ketamin WDT	FBS (für ECM-Medium) (Sciencell)
96 % Ethanol vergällt (Walter CMP GmbH & Co KG)	Fc- Fragment (R& D Systems)
99 % Ethanol vergällt (Walter CMP GmbH & Co KG)	FCS (Gibco)
Agar (Roth)	Fixierer (Kodak)
Agarose (Lonza)	Formalin (Merck)
Ampicillin (Roth)	FuGENE 6 (Promega)
Bromphenolblau (Bio- Rad)	Gelatine (Ruf)
BSA Fraktion V (GE Healthcare)	GFP- Vektor (Andrea Horst)
CaCl <sub>2</sub> (Merck)	Glycerol (Apotheke)
Casy- Ton (Schärfe System)	Glyzin (Roth)
Cell proliferation Kit II (XTT) (Roche)	Ham's F12 Medium (Gibco)
Cleaning solution (Partec)	HCl (Chemsolute)
Coomassie brilliant blue R250 (Bio Rad)	Human TNF $\alpha$ (PeproTechInc)
CSA-Kit (Dako)	Isopropanol (Merck)
Decontamination solution (Partec)	Isotone Natriumchloridlösung 0,9% (Braun)
DEPC (USB)	K5005-Kit (Dako)
DMEM (Gibco)	Kalium- Bisulfid (Merck)
DMSO (Serva)	Kristallviolett (Merck)
DPBS (Gibco)	Ligasepuffer (Biolabs)
DPBS + Mg <sup>2+</sup> + Ca <sup>2+</sup> (Gibco)	LightCycler 480 SYBRGreen I Master (Roche)
E- und P- Selektin-Chimäre (R& D Systems)	Matrigel GFR (BD Bioscience)
E. coli (Invitrogen)	Mäuse (Charles River)
ECGS (für ECM-Medium) (Sciencell)	Methanol (J.T. Baker)
ECM-Medium (Sciencell)	Meyers Hämalaunlösung (Merck)
EDTA (Sigma-Aldrich)	MgCl <sub>2</sub> (Sigma- Aldrich)
Entwickler (Kodak)	Milchpulver (Frema)
Erythrosine B (Merck)	Miniprep (Qiagen)
	MluI (Biolabs)

Venor GeM Classic (Minerva biolabs)  
NaCl (J.T. Baker)  
NaOH (Merck)  
Natrium- Bisulfid (Merck)  
Natriumazid (Sigma Aldrich)  
NP40 (Roche)  
Oligonukleotide (Eurofin)  
P/ S (für ECM-Medium) (Sciencell)  
Penicillin/ Streptomycin (Gibco)  
PIC (Calbiochem)  
Pierce BCA-Protein Assay (Thermo scientific)  
Pierce ECL western Blot Substrate (Thermo scientific)  
Ponceau- Rot  
Primer für Sequenzierung (Eurofin)  
Proteinblock (Dako)  
NE Puffer 3 (Biolabs)  
Puromycin  
QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)  
QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen)  
RNeasy Mini Kit (Qiagen)

### **2.1.2. Antikörper**

#### FACS:

Goat- anti- human Biotin (Sigma)  
Streptavidin- APC (BD)  
CD44- FITC (Diacclone)  
ITG $\alpha$ v- FITC (BioLegend)  
ITG $\beta$ 1- FITC (eBioscience)  
CD104 (ITG $\beta$ 4)- eFluor 660 (eBioscience)  
Anti- CAR, RmcB (Millipore)  
msIgG1- FITC (Miltenyi Biotec)  
msIgG2a- FITC (Miltenyi Biotec)

RPMI 1640 (Gibco)  
RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen)  
Schiffssches Reagenz (Merck)  
SDS (Fluka)  
Sedaxylan (WDT)  
Sheath Fluid (Partec)  
shRNA- Vektor (Clontech)  
SOC- Medium (Invitrogen)  
Sybrgreen (Qiagen)  
T4- Ligase (Biolabs)  
TE- Puffer (Peqlab)  
Tris (Sigma-Aldrich)  
Triton X 100 (Serva)  
Trypan- Blau (Sigma)  
Tween 20 (Sigma- Aldrich)  
Paraffin (McCormick Scientific)  
XbaI (Biolabs)  
Xylolersatz Medium (DiaTec)  
Zelldissoziationspuffer (Gibco)  
Zitronensäure Monohydrat (Merck)  
ZnCl<sub>2</sub> (Merck)  
 $\beta$ - Mercaptoethanol (Sigma)

ratIgG2b- eFluor 660 (eBioscience)

msIgG1 (Dako)

ms- IgG1 -FITC (eBioscience)

#### Westernblot:

H-300 (Santa Cruz Biotech)

beta Aktin (abcam)

Ziege- anti- Kanninchen- HRP (Santa Cruz Biotech)

Ziege- anti- Maus- HRP (Santa Cruz Biotech)

### Immunhistologie:

MMP3 (Acris)  
MMP13 (MoBiTec)  
Ki67 (Dako)  
CAR (Santa Cruz Biotech)  
Kaninchenserum (Dako)  
Maus- IgG1 (Dako)  
polyklonal Ziege- anti- Maus IgG7  
Biotinyliert (Dako)  
Schweineserum (Dako)  
Kaninchen Immunglobulin Fraktion  
(Normal)  
polyklonal Schwein- anti- Kaninchen  
(Dako)

### **2.1.3. Zellen**

DLD1 (DMSZ)  
HT29 (DMSZ)  
SW480 (DMSZ)  
HCT116 (DMSZ)  
HUVECs (PromoCell)  
CaCo2 (DMSZ)  
Colo205 (DMSZ)  
CHO (Prof. Bergelson)  
CHO- CAR (Prof. Bergelson)

### **2.1.4. Verbrauchsmaterial:**

Paraplast Plus (McCormick)  
Einbettkassetten (Engelbrecht)  
Zellkulturflaschen (Sarstedt)  
Multiwellplatten (Sarstedt)  
BD Biocoat GFR Matrigel Invasion  
Chamber (BD)  
2 ml Aspirationspipette (Falcon)

5 ml Pipette (Falcon)  
10 ml Pipette (Falcon)  
25 ml Pipette (Falcon)  
Glaspipette (Braun)  
30 ml Röhrchen (Greiner bio- one)  
50 ml Röhrchen (Sarstedt)  
7 ml Röhrchen (Thermo scientific)  
IBIDI slide angiogenese (IBIDI)  
IBIDI  $\mu$ slide VI0.4ibiTreat (IBIDI)  
Cryoröhrchen (Thermo Scientific)  
HistoBond (Marienfeld)  
Objektträger (Elka)  
Messer Mikrotom (Feather)  
PCR- Platte (Roche)  
PCR- Folie (Roche)  
Alu- PCR- Primer (Eurofin)  
Extracellular Matrix and Adhesion  
Molecules RT 2 Profiler PCR Array  
(Qiagen)  
1 ml Spritzen omnifix- F (Braun)  
20 ml Spritzen (Braun)  
G20 Sterican (Braun)  
Microlance 3 (BD)  
EDTA-Röhrchen (Sarstedt)  
Futter Rod 16-R (LASvendi)  
Blotmembran (GE Healthcare)  
Gel- blotting- Papier (Whatman  
Amersham Hyperfilm ECL (GE  
Healthcare)  
Tipone graduated, filter tip (Star lab)  
Casy- Röhrchen (Schärfe System)  
Spritzenpumpenleitung (Fresenius Kabi)  
Multipettenaufsätze (Eppendorf)

### 2.1.5. Geräte:

Brutschrank (Hera Cell, Heraeus)  
Casy (Schärfe System)  
CyFlow Cube 8 (Partec)  
FCS Express Flow 4 (De Novo Software)  
Elisa- Reader (MAX 002)  
Revelation Version 4.21 (Dy nex)  
OrisUniversal cell migration assembly kit  
(Platypus technologies)  
Axiovert 35 (Zeiss)  
Axiovisionrel 4.6 (Zeiss)  
Canon Power Shot A620 (Canon)  
Sterilbank (SteriGard, The Baker  
Company)  
Pipettus (Hirschmann Laborgeräte)  
Eppendor-Reaktionsgefäß (Sarstedt)  
Wasserbad (GFL)  
Universal 320R (HettichZentrifuge)  
Rotor 1689-A  
LabofugeA (Heraeussepatech)  
Vakuumpumpe (Vacusafe comfort,  
IBSintegra Bioscience)  
Mikrotom (Microm)  
Wasserbad (Medax)  
Heizplatte (Medax)  
Lightcycler 480 (Roche)  
LC480 release (Roche)  
Shandon Varistain 24- 4 (Thermo)  
Leica TP1020 (Leica)  
EG1160 (Leica)  
Pascal (DakoCytomation)  
Roller RM5 (Assistent)  
St5 (CAT)  
Trockenschrank (Melag)

Pipetten (Eppendorf, Labsystems, Gilson)  
WB/ SDS-Gelanlage (BioRad)  
Spannungsgerät E844 (Consort)  
PicoAZentrifuge (Thermo scientific)  
Nanodrop (Peqlab)  
Gelkammer für Agarosegele (Peqlab)  
Neubauer Zählkammer (Marienfeld)  
Multipette (Eppendorf)

### **2.1.6. Puffer**

#### FACS- Puffer:

PBS

1 % BSA

0,05 % Natriumazid

#### FACS- Puffer mit Kalzium:

PBS mit Magnesium und Kalzium

1 % BSA

0,05 % Natriumazid

#### FACS- Puffer für Sorting:

PBS

10 % FCS

#### RIPA- Puffer (Proteinisolation):

50 mM Tris HCl pH 7,4

150 mM NaCl

2 mM EDTA

1 % NP-40

0,1 % SDS

#### Lektinpuffer:

50 mM Tris

150 mM NaCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM CaCl<sub>2</sub>

#### Tank- Blot- Puffer (Westernblot):

5,82 g Tris

2,93 g Glyzin

200 ml Methanol

#### Gelpuffer:

1,5 M Tris HCl pH 8,8

0,5 M Tris HCl pH 6,8

#### 4x Probenpuffer (SDS- PAGE):

2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

1,5 ml Aqua dest.

5 ml Glycerol

0,4 g SDS

Spatelspitze Bromphenolblau

1 ml β-Mercaptoethanol

Lagerung bei -20 °C in Aliquots

#### Entwicklungspuffer:

50 mM Tris

200 mM NaCl

0,7 mg ZnCl<sub>2</sub>

5 mM CaCl<sub>2</sub>

0,02 % NaN<sub>3</sub>

pH 7,5

#### Färbelösung (SDS- PAGE/Zymografie):

40 % Methanol

10 % Essigsäure

0,2 % Coomassiebrilliantblue R250

#### Entfärbelösung:

25 % Methanol

8 % Essigsäure

#### Renaturierungspuffer (Zymografie):

2,5 % Triton-X-100 in Entwicklungspuffer

10x Elektrodenpuffer (SDS-PAGE):

250 mM Tris  
1,92 M Glyzin  
1 % SDS

TBST (Immunhistologie):

50 mM Tris  
150 mM NaCl  
0,1 % Tween- 20  
pH 7,6

TBS (Immunhistologie):

50 mM Tris  
150 mM NaCl  
pH 7,6

Citratpuffer (Vorbehandlung):

10 mM Zitronensäure- Monohydrat  
pH 6

Entwicklungscocktail (100 ml):

200 mg Natrium- Nitrit  
5 ml Aqua dest.  
200 µl Neufuchsin  
100 ml Trispuffer pH 8,24  
13- 20 mg Naphtol AS  
500 µl Dimethylformamid  
130 µl Tween 20  
40 mg Levamisol

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1. Humane Tumorzelllinien**

Um die Rolle von CAR bei der Metastasierung von kolorektalen Adenokarzinomen zu untersuchen wurden vier verschiedene humane Tumorzelllinien verwendet. Hierbei handelte es sich um DLD1 und HT29, welche in RPMI- Medium kultiviert wurden sowie SW480 und HCT116, die in DMEM high Glucose ohne Pyruvat unter den in 2.2.1.3 beschriebenen Zellkulturbedingungen kultiviert wurden.

#### **2.2.1.2. Primärzellen**

Für einige Versuche war es notwendig humane primäre Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVECs: human umbilical vein endothelial cells) zu verwenden. Diese wurden in Endothelzellmedium von ScienCell unter den in 2.2.1.3 beschriebenen Zellkulturbedingungen kultiviert.

### **2.2.1.3. Zellkulturbedingungen**

Alle Zellen wurden unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Hierfür wurden sie in Zellkulturflaschen mit entsprechendem Medium (vgl. Abschnitte 2.2.1.1. und 2.2.1.2.) mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 100 U / ml Penicillin und 100 µg / ml Streptomycin bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen bekamen zweimal wöchentlich frisches Medium. Erreichten sie eine Konfluenz von ca. 90 % wurden sie passagiert. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit DPBS (ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>) gewaschen und mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst. Die Wirkung des Trypsins wurde mit Vollmedium abgestoppt und ca. 1/14 der resuspendierten Zellen weitergezogen. War das Ablösen der Zellen über eine Enzymreaktion der Fragestellung eines Experiments nicht zuträglich wurde Zelldissoziationspuffer verwendet.

### **2.2.1.4. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer- Zählkammer**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer- Zählkammer verwendet. Hierfür wurde das Deckglas auf die Neubauer- Kammer so aufgebracht, dass die sogenannten Newtonschen Interferenzfarben zu sehen waren. 10 µl der Zellsuspension wurden unter das Deckglas pipettiert. Sollte eine lebend- tot- Differenzierung erfolgen, wurde die Zellsuspension vorher noch 1:2 mit Trypanblau versetzt, wodurch tote Zellen blau eingefärbt wurden. Je nach Zelldichte empfahl es sich eine Verdünnung herzustellen. In der 100- fach Vergrößerung des Mikroskops wurden dann alle vier Eckquadrate ausgezählt. Aus den vier Eckquadraten wurde der Mittelwert berechnet und die Zellzahl pro ml mit Hilfe folgender Formel berechnet: Mittelwert der Eckquadrate \* Verdünnung \* 10.000 = Zellen / ml.

### **2.2.1.5. Zellzahlbestimmung mit CASY**

Für die Tierexperimente wurden die Zellen mit Hilfe des CASY- (cell counting analysis system) Geräts ausgezählt. Die Zellen wurden für die Messung wie in 2.2.1.3. beschrieben abgelöst, in CASY- Ton verdünnt und mit einem entsprechend kalibrierten Programm gemessen. Eventuelle Verdünnungen mussten bei der angezeigten Zellzahl berücksichtigt werden.

### **2.2.1.6. Detektion von Mykoplasmenkontamination in der Zellkultur**

Die Detektion von Mykoplasmenkontaminationen der Zellen in der Zellkultur wurde mit dem Venor GeM Classic Kit durchgeführt. Hierfür wurde DNA mit dem Blut Kit wie in 2.2.3.9. aus den Zellen isoliert und die Detektion nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die

Visualisierung der Ergebnisse wurden jedoch 10 µl anstelle von 5 µl PCR- Produkt auf das Agarosegel aufgetragen.

### 2.2.1.7. Durchflusszytometrie

#### 2.2.1.7.1. Durchflusszytometrie mit Antikörpern

Für die Untersuchung von Oberflächenproteinen und deren Expressionsänderung nach CAR-Knockdown wurde die Durchflusszytometrie verwendet.

Für die Analyse der Oberflächenmoleküle wurden ca.  $10^6$  Zellen in FACS- Puffer mit Antikörper (Antikörperkonzentration: 1 mg / ml) aufgenommen und 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert, anschließend mit 1 ml FACS- Puffer gewaschen und bei 1.500 rpm pelletiert. War der Primärantikörper nicht fluoreszenzmarkiert, wurden die Zellen in einem passenden Sekundärantikörper resuspendiert (Konzentration: 1 µg/ ml), erneut inkubiert und gewaschen. Die verwendeten Antikörper und die passenden Isotypen sind in Tabelle 2.1. aufgelistet.

Nach erfolgter Antikörperinkubation wurden die Zellen in FACS- Puffer aufgenommen und vor der Messung mit PI versetzt um die toten Zellen erkennen zu können.

Die Messungen erfolgten am Cube8, die Auswertung mit FCS Express 4 Flow. Für die Auswertung wurden immer mindestens 10.000 Zellen gemessen.

Primärantikörper	Iso-Kontrolle	Sekundärantikörper
CD44- FITC	msIgG1- FITC	*
ITG $\alpha$ v- FITC	msIgG1- FITC	*
ITG $\beta$ 1- FITC	msIgG2a- FITC	*
ITG $\beta$ 4- 660	ratIgG2b- 660	*
RmcB	msIgG1	anti- ms- IgG1 -FITC

**Tabelle 2.1.: Antikörperliste.** Antikörperliste, mit den in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörpern und den zugehörigen Sekundärantikörpern. \*: kein Sekundärantikörper notwendig, da der Primärantikörper fluoreszenzmarkiert war.

#### 2.2.1.7.2. Durchflusszytometrie: Nachweis von Selektinbindungsstellen

Mit der Durchflusszytometrie war es nicht nur möglich direkt Proteine auf der Zelloberfläche nachzuweisen sondern auch Bindungsstellen für Proteine. In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein von Selektinbindungsstellen mit Hilfe von Selektinchimären untersucht.

Hierfür stellte man einen Selektinkomplex her, indem man 1 µl der Chimäre (1 µg / µl) mit 0,5 µl goat- anti- human- IgG- Biotin in FACS- Puffer mit Magnesium und Kalzium für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubierte. Dann fügte man 3,3 µl Streptavidin APC hinzu und

inkubierte noch einmal 30 Minuten im Dunkeln auf Eis. Ca.  $10^6$  Tumorzellen wurden für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln mit 100  $\mu$ l des Selektinkomplexes inkubiert, danach mit 1 ml FACS- Puffer gewaschen, bei 1.500 rpm pelletiert, in 2 ml FACS-Puffer aufgenommen und gemessen. Die Messung und Auswertung erfolgte analog zu 2.2.1.7.1..

#### **2.2.1.8. Zellproliferationsassay**

Um die Auswirkung des CAR- Knockdowns auf die Zellproliferation zu testen wurde der sogenannte XTT- Versuch durchgeführt. Dieser basiert auf der Reduktion von dem modifizierten Tetrazoliumsalz XXT zum gefärbten Formazan durch mitochondriale Enzyme. Dieser Schritt läuft nur in lebenden Zellen ab (Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation, Editor: Hans-Jürgen Rode, Roche 2008).

Die Zellen wurden auf 30.000 Zellen / ml verdünnt, 100  $\mu$ l Zellsuspension pro Well in die Hälfte einer 96 Napf- Platte pipettiert, wobei Reihe A als Leerwert nur mit Medium gefüllt wurde. Anschließend wurden die Zellen drei Tage im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das alte Medium abgesaugt, je 100  $\mu$ l neues Medium in die Nöpfe gegeben und 50  $\mu$ l der XTT-Mischung (bestehend aus 5 ml XTT labeling reagent, 100  $\mu$ l Electron coupling reagent) zu jedem Napf gegeben. Der Versuch wurde dann für vier bis sechs Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend bei 450 nm im Elisa- Plattenleser ausgelesen. Mit Hilfe der Absorptionwerte konnte der Wachstumsunterschied zwischen den Kontroll- und Knockdownzellen ermittelt werden.

#### **2.2.1.9. Migrationsassay**

Um die Fähigkeit der Zellen zur Migration zu untersuchen, wurde ein Platypus Cell Migration Assembly Kit verwendet. Hiermit kann untersucht werden, wie schnell es den Zellen gelingt eine freie Fläche zu bewachen.

Die Stopper des Platypus Cell Migration Assembly Kits wurden wie in der Anleitung beschrieben in 96- Napf- Platten eingesetzt. Die Tumorzellen wurden auf 500.000 bzw.  $10^6$  Zellen / ml verdünnt, 100  $\mu$ l der Zellsuspension vorsichtig in jeden Napf pipettiert und die Platte im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Stopper vorsichtig senkrecht gezogen und der Zeitpunkt  $t = 0$  bei 50- facher Vergrößerung dokumentiert. Nach weiteren 24 Stunden wurde erneut eine Aufnahme gemacht und die Bilder mit Hilfe von ImageJ (1.48v, Rasband 1997- 2016) ausgewertet.

Um zu testen ob Komponenten der extrazellulären Matrix einen Einfluss haben, wurde der Boden einer 96- Napf- Platte mit Matrigel beschichtet. Hierfür wurden Matrigel 1:80 auf ca. 110 µg / ml verdünnt. 50 µl wurden in jeden Napf gegeben und die Platte eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Näpfe mit RPMI ohne Zusätze gespült und der Versuch wie oben beschrieben durchgeführt.

#### **2.2.1.10. Invasionsassay**

Die Biocoat Matrigel Invasionskammern mit reduziertem Wachstumsfaktor wurden nach Herstellerangaben für den Versuch vorbereitet.

Kurz vor Ablauf der Rehydrierung wurden die Zellen für den Versuch vorbereitet. Hierfür wurden die Zellen auf 300.000 Zellen / ml in RPMI ohne FCS verdünnt.

Nachdem die Invasionskammer rehydriert und die Zellen vorbereitet waren wurden zuerst 1,2 ml RPMI Vollmedium als Chemotraktant in die unteren Wells gegeben. In die oberen Wells kamen 400 µl der Zellsuspension. Anschließend wurde die Platte 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubation wurde die Platte aus dem Brutschrank genommen, das Medium aus den Insertnäpfen durch Dekantieren entfernt und die Zellen im Inneren der Insertnäpfe mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Zellen wurden auf der Unterseite der Insertnäpfe mit Kristallviolett gefärbt. Hierfür gab man 500 µl Kristallviolett in jeden Napfund stellte die Insertnäpfe für 10 Minuten hinein. Anschließend wurde gründlich mit PBS gespült und nochmals das Innere der Insertnäpfe mit einem Wattestäbchen ausgewischt. Die getrockneten Insertnäpfe wurden mit einem inversen Mikroskop in der 50- fachen Vergrößerung dokumentiert werden. Anschließend wurde das Bild mit ImageJ (Rasband 1997- 2016) und dem Thresholdcolour Plug (Gabriel Landini) in ausgewertet indem man die mit Zellen bedeckte Fläche ermittelte.

#### **2.2.1.11. Angiogenese- Versuch**

##### **2.2.1.11.1. Normoxische Bedingungen**

Um den Effekt von Tumorzellen auf die Neubildung von Gefäßen zu untersuchen wurde ein Angiogenese- Versuch etabliert. Hierfür wurden HUVECs mit konditioniertem Medium von verschiedenen Knockdown- und Kontrollzellen inkubiert.

Um das Endothelzellmedium zu konditionieren wurden Tumorzellen in eine 6- Napf- Platte in ihrem jeweiligen Vollmedium ausgesät und 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und

Endothelzellmedium ohne Zusätze für 24 Stunden auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden nahm man das Medium ab, zentrifugierte eventuell im Medium befindliche Zellbestandteile bei 1.500 rpm fünf Minuten ab und setzte das Medium für den Versuch ein.

Die Angiogenese- Slides (IBIDI  $\mu$ - Slide Angiogenesis, ibiTreat) von IBIDI wurden über Nacht im Brutschrank äquilibriert und Wachstumsfaktor- reduziertes Matrigel über Nacht bei 4 °C auf Eis aufgetaut. Am nächsten Tag wurde mit kalten Pipettenspitzen 10  $\mu$ l Matrigel pro Napf in die Vertiefungen in den Angiogenese- Slides gegeben und 30 Minuten im Brutschrank auspolimerisiert.

Pro Well wurden 10.000 Zellen / 50  $\mu$ l Testmedium verwendet. Die HUVECs wurden abgelöst, gezählt und 40.000 Zellen pro Kondition in jeweils ein Eppendorf- Reaktionsgefäß gegeben, bei Raumtemperatur bei 1.500 rpm pelletiert und in 200  $\mu$ l Testmedium aufgenommen. 50 $\mu$ l der Zellsuspension wurden dann in jeden Napf gegeben und 12 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Nöpfe in der 50- fachen Vergrößerung mit Axiovision dokumentiert und mit ImageJ (Rasband 1997- 2016) und dem PlugIn Angionenesis Analyzer (Carpentier *et al* 2012) ausgewertet.

#### **2.2.1.11.2. Hypoxische Bedingungen**

Der Versuch wurden analog zu 2.2.1.11.1. durchgeführt. Jedoch erfolgte die Konditionierung des Mediums bei 5 % CO<sub>2</sub> und 1 % O<sub>2</sub>, um so hypoxische Bedingungen zu schaffen.

#### **2.2.1.12. Zellflussversuche**

Um die Fähigkeit von Tumorzellen zur Adhäsion an Endothel oder bestimmte Adhäsionsproteine zu untersuchen wurde ein Zellflussversuch verwendet. Hierbei können Tumorzellen unter annähernd physiologischen Bedingungen über mit Endothel oder an der Adhäsion beteiligte Proteine beschichtete Kanäle fließen und so die Bedingungen im Blutstrom nachgestellt werden. Hintergrund ist, dass einige Adhäsionsproteine erst unter Scherstress Bindungen eingehen werden und deswegen z. B. nicht in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden können, da es sich hierbei nicht um physiologische Bedingungen handelt.

##### **2.2.1.12.1. Selektinbeschichtung**

IBIDI- Slides (IBIDI  $\mu$ - Slide VI<sup>0.4</sup>ibiTreat) wurden mit dem Fc- Fragment bzw. der E- oder P- Selektinchimäre beschichtet. Hierfür wurde das Fc- Fragment auf 10  $\mu$ g / ml, die E- Selektinchimäre auf 5  $\mu$ g / ml und die P- Selektinchimäre auf 50  $\mu$ g / ml in PBS verdünnt

(Persönliche Mitteilung von Christine Schröder). Je 30  $\mu\text{l}$  der Lösungen wurden in den jeweiligen Kanal gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Kanäle je fünf Mal mit PBS gespült. Nach dem letzten Spülen wurde PBS im Kanal belassen. Für den Flussversuch wurden die Tumorzellen auf 100.000 Zellen / ml verdünnt. Die Zellen wurden in eine 20 ml Spritze mit einer Spritzenpumpenleitung luftblasenfrei aufgenommen und anschließend in eine Diffusorpumpe eingespannt, mit der die Flussrate exakt eingestellt werden konnte. Der IBIDI- Slide wurde unter das Mikroskop gelegt und der Schlauch mit dem jeweiligen Kanal verbunden, um die Tumorzellen bei einem definierten Scherstress von 0,25 dyn /  $\text{cm}^2$  über die mit Selektinen beschichteten Kanäle fließen lassen zu können.

Mit Hilfe einer Kamera und der CapImage Software (Dr. Zeintl, Heidelberg) konnten Filme der fließenden Tumorzellen aufgenommen und ausgewertet werden.

#### **2.2.1.12.2. HUVECs**

Die HUVECs wurden auf  $10^6$  Zellen / ml verdünnt und 30  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in jeden Kanal des IBIDI- Slides (IBIDI  $\mu$ -Slide VI<sup>0.4</sup>ibiTreat) gegeben. In jeden Napf wurden zusätzlich noch 60  $\mu\text{l}$  Medium gegeben und die Zellen 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, so dass ein konfluenter Monolayer entstehen konnte.

Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation der HUVECs mit 10 ng / ml TNF $\alpha$ . Hierfür wurde das TNF $\alpha$  (10  $\mu\text{g}$  / ml) 1:1.000 in Medium verdünnt und der Kanal mehrmals in die gleiche Richtung mit diesem durchspült, so dass das alte Medium vollständig ersetzt wurde. Die Zellen wurden 4 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Für den Flussversuch wurden die Tumorzellen auf 100.000 Zellen / ml verdünnt, in eine 20 ml Spritze mit einer Spritzenpumpenleitung luftblasenfrei aufgenommen und anschließend in eine Diffusorpumpe eingespannt, mit der die Flussrate exakt eingestellt werden konnte. Der IBIDI- Slide wurde unter das Mikroskop gelegt und der Schlauch mit dem jeweiligen Kanal verbunden, um die Tumorzellen bei einem definierten Scherstress von 0,25 dyn /  $\text{cm}^2$  über das Endothel fließen lassen zu können.

Mit Hilfe einer Kamera und der CapImage Software konnten dann Filme der fließenden Tumorzellen aufgenommen und ausgewertet werden.

#### **2.2.2. Tierexperimentelle Arbeiten**

Die Zucht der Mäuse wurde von der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf unter Standardbedingungen (21 °C; relative Luftfeuchtigkeit 50 %; 12

Stunden Tag- Nacht- Rhythmus) durchgeführt. Die Tiere wurden mit sterilem Wasser und Futter (Rod 16-R, LASvendi, Soest) versorgt und in einzeln gelüfteten Käfigen gehalten, um die Verbreitung von Pathogenen zu verhindern. Für die beiden Versuche wurden jeweils zehn weibliche und zehn männliche SCID Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C.B-17/ IcrCriscid/ scid im Alter von acht bis zwölf Wochen verwendet, insgesamt also 20 Tiere pro Versuch. Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung der Behörde (G10/ 55) durchgeführt.

#### **2.2.2.1. Subkutane Inokulation von humanen Tumorzellen**

Am Tag der Injektion wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst (vgl. 2.2.1.3.), abzentrifugiert, im CASY (vgl. 2.2.1.5.) gezählt und in RPMI ohne P/ S und FCS in einer Zellzahl von  $5 \cdot 10^6$  Zellen aufgenommen.

Die Maus wurde in einem mit Zellstoff ausgelegten Narkosegefäß mit einem Kohlenstoffdioxid/ Sauerstoff- Gemisch narkotisiert. Die Tumorzellen wurden gründlich resuspendiert und in eine Spritze aufgezogen. Das Tier wurde dann auf eine sterile Unterlage gesetzt und erhielt 200 µl Zellsuspension subkutan über die rechte Skapula injiziert.

#### **2.2.2.2. Gewebe- und Blutentnahme**

Die Maus wurde durch intraperitoneale Gabe von Ketamin/ Rompun im Überschuss in tiefe Narkose gelegt. Bei völliger Reflexfreiheit, die durch Kneifen in die Fußsohle überprüft wurde, wurde der Brustkorb mit 70 % Ethanol befeuchtet und das Herz seitlich über den linken Ventrikel zur finalen Blutentnahme punktiert. Das abgenommene Blut wurde zügig in ein EDTA- Röhrchen überführt und geschüttelt, um die Gerinnung zu hemmen. Danach konnte der Thorax eröffnet und die Lunge entnommen werden. Der linke Lungenflügel wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren, der rechte Lungenflügel für die Paraffineinbettung in 4 %- igem Formalin fixiert. Anschließend wurden Femur und Tibia des linken Beines an beiden Enden eröffnet und das Knochenmark mit 1 ml 0,9 % NaCl in ein Eppendorf- Reaktionsgefäß ausgespült. Als letztes wurden die Leber und der Tumor entnommen. Die Hälfte des großen Leberlappens und des Tumor wurden in 4 %- igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, die andere Hälfte in Stickstoff eingefroren.

### **2.2.3. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.3.1. shRNA vermittelter Knockdown von CAR**

Um die Expression von CAR in den Tumorzellen zu reduzieren, wurde der Ansatz der shRNA gewählt. Hierbei wird, ähnlich wie bei der siRNA, eine dsRNA in die Zelle eingebracht. Die

Methode der shRNA ermöglicht jedoch einen stabilen Knockdown des gewünschten Gens, da die Sequenz für die shRNA mittels eines Vektors in das Genom der Zelle integriert werden kann. Die Sequenz, die in den kommerziell erhältlichen pLVX- shRNA1 Vektor (Clontech) kloniert werden kann, enthält die siRNA- Sequenz für das gewünschte Gen, in diesem Fall CAR, sowie eine sh- Region, die die Bildung der dsRNA nach Transkription ermöglicht. Der pLVX- Vektor kann herkömmlich transfiziert sowie lentiviral transduziert werden. Zur Selektion der Zellen, die den Vektor in ihr Genom integriert haben, enthält der Vektor eine Puromycinresistenz und steht unter der Kontrolle des U6- Promotors.

### 2.2.3.2. Synthese shRNA tragender Plasmide

Zuerst musste der kommerziell erhältliche Vektor so geschnitten werden, dass er zu den designten Oligonucleotiden passte. Der Vektor lag so schon im Labor vor und wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten. Um die Oligonucleotide in den Vektor ligieren zu können, mussten diese zuerst hybridisiert werden. Hierfür wurden sie in Wasser gelöst (100 pmol /  $\mu$ l). 15  $\mu$ l des Forward- und Reversoligonukleotids (Sequenzen vgl. Anhang) wurden gemischt und im Thermoblock mit folgendem Programm hybridisiert:

Temperatur: Dauer:

95 °C 30“

72 °C 2‘

37 °C 2‘

25 °C 2‘

Die so hybridisierten Oligonucleotide wurden dann 1:100 in Wasser verdünnt und folgender Ligationsansatz zusammen pipettiert:

10,5  $\mu$ l Wasser

1,5  $\mu$ l Ligasepuffer

1  $\mu$ l Vektor

1  $\mu$ l hybridisiertes Oligonukleotid (für CAR- Knockdown bzw. scr- Sequenz)

1  $\mu$ l T4 Ligase

Diese Lösung wurde drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um die entstandenen Vektoren zu vervielfältigen wurden sie in *E.coli* transfiziert. Hierfür wurden 15  $\mu$ l Ligationsansatz zu einem Vial *E.coli* gegeben, 30 Minuten auf Eis inkubiert, 90 Sekunden bei

42 °C erwärmt und dann nochmals 10 Minuten auf Eis gestellt. Die *E.coli*- Kulturen wurden mit 200 µl SOC Medium versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert und die ganze Lösung anschließend auf eine Agar- Platte, die mit Ampicillin versetzt wurde, ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Um die Vektoren weiter zu vermehren und schließlich zu präparieren, wurde eine Kolonie von der Agar- Platte gepickt und in 4 ml LB- Medium mit 100 µg / ml Ampicillin gegeben und über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnte der Vektor mit dem QIAprep Spin Miniprepkit nach Herstellerangaben präpariert werden.

Die gelungene Ligation des Oligonucleotids in den Vektor wurde mit einem Restriktionsverdau überprüft. Hierfür wurde der folgende Ansatz zusammenpipettiert, für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt:

3 µl Plasmidpräparation

1,5 µl Puffer 3

0,5 µl MluI

0,5 µl XbaI

0,2 µl BSA

9,3 µl Wasser

Für die Überprüfung, ob die Sequenzen in den *E.coli* auch korrekt amplifiziert wurden, wurden 15 µl der DNA (Konzentration von 75 µg/ µl) mit 15 pmol Primer (tcgatctgggcaggaagagg) vermischt und kommerziell sequenziert (Eurofins). Der sequenzierte Vektor wurde dann erneut in *E.coli* transfiziert, vermehrt und mehrere der Kolonien präpariert und noch einmal zur Kontrolle verdaut. Der Vektor konnte nun zur Transfektion von Zellen genutzt werden.

### **2.2.3.3. Lentivirale Transduktion**

Für die Transduktion der Zellen mit einem Lentivirus musste zuerst der Vektor in einen Virus eingebracht werden. 15 µg des Vektors wurden in eine Packaging- Zelllinie eingebracht. Die Zellen produzierten dann den Virus, der in das Medium abgegeben wird, mit dem dann die Zellen transduziert wurden.

Für die Transduktion wurden jeweils 50.000 Zellen von HT29 und DLD1 in 500 µl Medium in einer 24- Napf- Platte ausgesät. Zu den Zellen wurde dann das Virus enthaltende Medium

in verschiedenen Mengen gegeben. Nach 2 Wochen konnten die Zellen aus dem S2- Labor in das S1- Labor überführt werden.

#### **2.2.3.4. Transfektion**

Für die Transfektion von Zellen wurden zu 94  $\mu$ l Medium ohne Zusätze 6  $\mu$ l FuGene und 1,5  $\mu$ g DNA gegeben und gründlich geschüttelt. Die Mischung wurde dann mindestens 15 Minuten, aber nicht länger als 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von den zu transfizierenden Zellen, die einen Tag vorher in 6- Napf- Platten ausgesät wurden, wurde das alte Medium abgesaugt und 1 ml Medium ohne Zusätze in den entsprechenden Napf gegeben. Anschließend wurde die Transfektionslösung tröpfchenweise in dem Napf verteilt. Die Zellen wurden dann ca. 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zu den transfizierten Zellen wurden 5 ml Vollmedium gegeben und die Zellen weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert bevor die Selektion mit 1  $\mu$ g/ ml Puromycin begonnen wurde. Die Selektion galt als abgeschlossen wenn alle Zellen der Kontrolle, d. h. Zellen die einen GFP- exprimierenden Vektor erhalten hatten, welcher keine Puromycinresistenz aufwies, abgestorben waren (freundlicherweise bereitgestellt von Andrea Horst). Die überlebenden Zellen der Transfektion wurden hochgezogen und wie in Abschnitt 2.2.3.5. beschrieben weiter gehandhabt.

#### **2.2.3.5. Erzeugung der Knockdown- Zelllinie**

Die transduzierten bzw. transfizierten und selektionierten Zelle aus 2.2.3.3. und 2.2.3.4. wurden von den 6- Napf- Platten auf T75- Flaschen umgesetzt. Bei Erreichen von 90 % Konfluenz wurden die Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (vgl. 2.2.1.7.1.) auf ihren Knockdown hin überprüft. Bei gelungenem Knockdown wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen für ein FACS vorbereitet (Vorgehen vgl. 2.2.1.7.1.; statt FACS- Puffer wurde DPBS mit 10% FCS verwendet) und die unteren 5 % für die Erzeugung der Knockdown- Zelllinien heraus sortiert. Waren die sortierten Zellen wieder 90 % konfluent, wurde die Zellen limitiert auf 20 Zellen / ml verdünnt. In jeden Napf wurden 100  $\mu$ l der Zellsuspension gegeben, so dass man in jedem Napf zwei Zellen hatte. Diese Zellen wurden dann so lange kultiviert, bis die Zellen im Napf konfluent waren und anschließend auf 24- Napf- Platten expandiert. Die 5 besten Klone wurden mittels Durchflusszytometrie (vgl. 2.2.1.7.1.) ermittelt und zu gleichen Anteilen gepoolt.

### **2.2.3.6. Isolierung von RNA aus Zellen**

Die RNA aus Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben gewonnen. Hierfür wurden die Zellen geerntet ( $5 \cdot 10^6$  bis  $5 \cdot 10^7$  Zellen), pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das nach dem zweiten Waschschrift erhaltene Pellet wurde in 350  $\mu$ l RLT, der 10  $\mu$ l  $\beta$ - Mercaptoethanol enthielt, aufgenommen und im QIAshredder homogenisiert. Danach wurden 350  $\mu$ l 70 %- iger Ethanol hinzugegeben, gut gemischt, auf eine RNeasy- Säule gegeben und bei 10.000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert. Die Säule wurde mit 350  $\mu$ l RW1 gewaschen, ein Gemisch aus 10  $\mu$ l DNaseI- Stock- Solution und 70  $\mu$ l RDD auf die Säule gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hinterher wurden 350  $\mu$ l RW1 hinzugegeben und die Säule erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 500  $\mu$ l RPE gewaschen und die Restflüssigkeit mittels eines dritten Zentrifugationsschrittes aus der Säule entfernt. Schließlich konnte die RNA mit 50  $\mu$ l RNase- freiem Wasser mittels Zentrifugation eluiert und bei  $-80$  °C gelagert werden.

### **2.2.3.7. cDNA Synthese**

Um die in 2.2.3.6. erhaltene RNA für qRT- PCR- Arrays verwenden zu können, musste man diese in cDNA umschreiben (RT<sup>2</sup> First Strand Kit, Qiagen).

Hierfür wurden 1  $\mu$ g RNA mit 2  $\mu$ l GE- Puffer in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l gemischt um so die genomische DNA zu eliminieren. Die Mischung wurde fünf Minuten bei  $45$  °C inkubiert und danach sofort für mindestens eine Minute auf Eis gestellt.

Zu dem gesamten Ansatz wurden 10  $\mu$ l RT- Cocktail gegeben und 15 Minuten bei  $42$  °C inkubiert. Nach Ablauf der 15 Minuten wurde die Reaktion gestoppt indem die Mischung für fünf Minuten auf  $95$  °C erhitzt wurde. Die so gewonnene cDNA konnte bei  $-20$  °C gelagert werden.

RT- Cocktail (pro Reaktion):

4  $\mu$ l BC3

1  $\mu$ l P2

2  $\mu$ l RE3

3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

### 2.2.3.8. ECM- Array

Um die Veränderung der Expression von extrazellulären Matrixproteinen bzw. Adhäsionsmolekülen zwischen den DLD1 pLVX scr- und DLD1 pLVX CAR- Zelllinien zu vergleichen, wurde ein Array der Firma Qiagen verwendet. Hierfür wurde pro Zelllinie der folgende Ansatz zusammen pipettiert:

1350 µl SybrGreen

1248 µl H<sub>2</sub>O

102 µl cDNA (aus 2.2.3.7.)

25 µl dieser Mischung wurden in jeden Napf der 96- Napf- Platte des Arrays gegeben und die qRT- PCR im Light Cycler 480 von Roche bei folgendem Programm durchgeführt:

Zyklen:	Temperatur:	Dauer:	
1	95 °C	10 Minuten	Hot start
45	95 °C	15 Sekunden	
	60 °C	1 Minute	Fluoreszenz- Datenerhebung

### 2.2.3.9. Isolierung von DNA aus Blut, Knochenmark und Zellen

Die Isolierung von DNA aus Blut bzw. Knochenmark oder Zellen wurde mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Pro Säule wurden 200 µl Blut oder Knochenmark bzw. 10<sup>6</sup> Zellen in 200 µl PBS verwendet. Die von der Säule eluierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3.10. Isolierung von DNA aus Mauslungen

Die Extraktion der DNA aus der Lunge erfolgte mittels des QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Die eluierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3.11. ALU- PCR

Die Proben aus den Schritten 2.2.3.9. und 2.2.3.10. wurden für die ALU- PCR verwendet, in der die Anzahl der humanen Tumorzellen vor einem Maushintergrund bestimmt werden kann. Dies erfolgte nach dem etablierten Protokoll von Nehmann *et al* (2010).

Hierfür wurde zuerst eine Standardreihe pipettiert, die aus der DNA des der Probe entsprechenden Mausgewebes und der DNA einer definierten Menge von den im Versuch

verwendeten humanen Tumorzellen besteht, z. B. Blut einer SCID Maus für die Bestimmung von zirkulierenden Tumorzellen in einer SCID Maus.

<b>Röhrchen</b>	<b>Volumen</b>	<b>Volumen Hintergrund- DNA</b>
A	12,5 µl Zellen	50 µl
B	2 µl aus A	18 µl
C	2 µl aus B	18 µl
D	2 µl aus C	18 µl
E	2 µl aus D	18 µl
F	2 µl aus E	18 µl
G	2 µl aus F	18 µl
H	0 µl	20 µl

**Tabelle 2.2.: Pipettierschema der Standardreihe für die ALU- PCR.** Angegeben sind die Volumina der DNA von einer definierten Anzahl von Zellen, die in den Versuch verwendet wurden (hier HT29) und die Volumina der Hintergrund- DNA

Für die ALU- PCR wurde das Blut unverdünnt eingesetzt, die DNA aus Lunge und Knochenmark wurde auf 30 ng / µl verdünnt. 2 µl je einer Probe bzw. eines Standards wurden in jeden Napf der PCR- Platte gegeben und mit 8 µl des Mastermixes versetzt.

Mastermix (pro Ansatz):

0,2 µl forward Primer

0,2 µl revers Primer

5 µl LCCM (aus SybrGreen)

2,6 µl a. dest.

### **2.2.3.12. RNA- Extraktion für die Next Generation Sequenzierung**

#### **2.2.3.12.1. RNA- Extraktion aus Tumoren**

Für die Homogenisierung wurden Mörser und Pistill verwendet, die zweimal autoklaviert und einmal für 2,5 Stunden auf 250 °C erhitzt wurden. Die Tumore, welche nach der Präparation in Trizol gelagert wurden, wurden aufgetaut und je einer in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser gegeben. Der Tumor wurde mit dem Pistill zerstoßen bis ein feines Puder entstand. Dann ließ man den zerstoßenen Tumor bei Raumtemperatur auftauen. Sobald das

Trizol- Tumor- Gemische aufgetaut war, wurden weitere 500 µl Trizol zugegeben, der Mörser gründlich ausgespült und alles in ein Eppendorf- Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend gab man 100 µl Chloroform hinzu, schüttelte 15 Sekunden lang kräftig und ließ die Probe fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Die Probe wurde für 15 Minuten bei 12.000 xg bei 4 °C zentrifugiert, wodurch sich drei Phasen bildeten. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt, mit 250 µl Isopropanol vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Probe für 15 Minuten bei 12.000 xg bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNA- Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol in DEPC- Wasser gewaschen und bei 12.000 xg 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vollständig abgenommen, das Pellet 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einer für die Pelletgröße angemessenen Menge DEPC- Wasser aufgenommen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

#### **2.2.3.12.2. RNA- Extraktion aus Zellen**

Die Zellen wurden in einer T75- Flasche bis zu einer ca. 90 %- igen Konfluenz hochgezogen. Das Medium wurde abgesaugt und sofort, ohne Waschschrift, 1 ml Trizol in die Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden dann 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um sie abzulösen und die Zelllyse zu beginnen.

Die Flasche wurde gut mit dem enthaltenen Trizol ausgespült, die Zellsuspension gründlich resuspendiert und die Proben bis zur weiteren Verabreichung bei -80 °C gelagert. Dies hat den Vorteil, dass die Zellen so weiter mechanisch zerstört werden (einfrieren und auftauen). Nach dem Auftauen gab man 220 µl Chloroform hinzu, schüttelte 15 Sekunden lang kräftig und ließ die Probe dann fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Die Probe wurde für 15 Minuten bei 12.000 xg bei 4 °C zentrifugiert, wodurch sich drei Phasen voneinander trennten. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt, mit 750 µl Isopropanol vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die die Probe für 15 Minuten bei 12.000 xg bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNA- Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol in DEPC- Wasser gewaschen und bei 12.000 xg 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vollständig abgenommen, das Pellet 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einer für die Pelletgröße angemessenen Menge DEPC- Wasser aufgenommen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

### **2.2.3.13. Herstellung der Genlibrary und Next Generation Sequenzierung**

Vor der Sequenzierung wurde die Qualität der RNA aus den Schritten 2.2.3.12.1. und 2.2.3.12.2. mit Hilfe eines BioAnalyzerNano RNA Chip (Agilent) bestimmt. Die Extraktion der mRNA erfolgte für jede Probe aus 1 µg der Gesamt- RNA. Aus dieser wurde die Library mit dem NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB) nach Herstellerangaben präpariert. Größe und Qualität der Library wurden mit dem BioAnalyzer High Sensitivity DNA Chip (Agilent) überprüft. Die auf 2 nM verdünnten Libraries wurden auf dem IlluminaHiSeq 2500 Multiplex sequenziert. Für jede Probe wurden zwischen 44 und 65 Millionen single- Reads mit einer Länge von 51 bp generiert. Die Reads wurden mit TopHat (Version 2.0.13, Trapnell *et al* 2009)) gemappt, die Reads pro Gen mit HTSeq (Version 0.6.0, Anders *et al* 2015) gezählt und die differentielle Expression mit DESeq2 (Version 1.4.5, Love *et al* 2014) bestimmt. Die GO- Term- Analyse wurde mit dem Online-Tool WebGestalt (Zhang *et al* 2005) durchgeführt. Gene wurden als signifikant differentiell exprimiert angenommen bei einem  $p_{adj} < 0,1$ .

## **2.2.4. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.4.1. Gesamtzelllysate**

Das Medium wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, noch einmal mit PBS gewaschen und das Pellet anschließend in RIPA- Puffer, der mit PIC versetzt war, aufgenommen und mehrfach durch eine G21- Nadel in eine Spritze aufgenommen um die Zellen mechanisch zu zerstören. Die Menge des RIPA- Puffers war hierbei von der Größe des Pellets abhängig. Die Zellsuspension zentrifugierte man dann bei 4 °C und 20.000 xg 30 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

### **2.2.4.2. Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte mittels Bicinchoninsäure (BCA)**

Die Proben aus 2.2.4.1. wurden 1:100 und 1:200 in RIPA / PIC verdünnt. 25 µl einer Standardreihe (vgl. Tabelle 2.3.) wurden jeweils im Dreifachansatz in eine 96- Napf- Platte pipettiert, ebenso wie je 25 µl der 1:100 und 1:200 Verdünnung der Proben. Alle Näpfe wurden dann mit 200 µl des Arbeitsreagenz versetzt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte die Absorption bei 550 nm im Plattenreader ausgelesen und hieraus die Konzentration der Proben bestimmt werden.

Röhrchen	Volumen Wasser	Volumen und BSA Quelle	Finale BSA-Konzentration
A	180 µl	20 µl vom BSA- Stock	200 µg / ml
B	92,5 µl	7,5 µl vom BSA- Stock	150 µg / ml
C	100 µl	100 µl aus Röhrchen A	100 µg / ml
D	100 µl	100 µl aus Röhrchen C	50 µg / ml
E	90 µl	90 µl aus Röhrchen D	25 µg / ml
F	70 µl	70 µl aus Röhrchen E	12,5 µg / ml
G	60 µl	40 µl aus Röhrchen F	5 µg / ml
H	100 µl	0 µl	0 µg / ml

**Tabelle 2.3.: Pipettierschema der Standardreihe.** Dargestellt ist das Pipettierschema für die Standardreihe der Konzentrationsbestimmung mittels BCA. Zusätzlich ist die Endkonzentration vom BSA in dem jeweiligen Röhrchen angegeben.

### 2.2.4.3. SDS- PAGE

Für den Westernblot wurden die Proteine zuerst elektrophoretisch nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Konzentration der Trenngele wurde passend zur Größe des zu untersuchenden Proteins gewählt. Die Gele für die diskontinuierliche SDS- PAGE (Ornstein, 1964; Davis, 1964), die abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins einen Acrylamidgehalt zwischen 7 % und 12 % aufwiesen, wurden in Gelkammern von Biorad gegossen. Die genaue Zusammensetzung der Trenngele und des Sammelgels kann Tabelle 2.4. entnommen werden. Die Gele wurden mit den mit Probenpuffer versetzten Proben befüllt und zuerst 15 Minuten bei 60 V in das Gel einlaufen gelassen und dann bei einer konstanten Spannung von 150 V 50 Minuten lang aufgetrennt.

	Sammelgel 5%	Trenngel 7%	Trenngel 10%
Wasser	2,85	5,1	4,1
Acrylamid	0,85	2,3	3,3
Puffer pH 6,8	1,25		
Puffer pH 8,8		2,5	2,5
SDS	0,05	0,1	0,1
APS 20%	0,02	0,05	0,05
TEMED	0,005	0,005	0,005

**Tabelle 2.4.: Zusammensetzung der Acrylamidgele für jeweils 2 Gele.** Alle Angaben sind in ml.

#### **2.2.4.4. Proteintransfer**

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen war es notwendig die in der SDS- PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen, auf der dann mittels Antikörper der spezifische Nachweis des Proteins erfolgen konnte. Hierfür wurde das Gel nach der Elektrophorese aus der Gelkammer entnommen und das "Sandwich" für den Blot zusammengebaut: Die Nitrozellulosemembran (Protran BA85, Whatman) wurde auf ein Whatman- Papier (GB003, Whatmann) gelegt, auf die Membran das Gel und alles durch ein weiteres Whatman- Papier (GB003, Whatmann) abgeschlossen. Dann konnte das "Sandwich" in die Tank- Blot- Kammer eingebaut werden und die Proteine 40 Minuten bei konstanten 100 V geblottet werden. Nach dem Blot wurde die Membran mit Ponceau- Rot gefärbt um den Proteintransfer zu überprüfen. Das Ponceau- Rot wurde anschließend mit Leitungswasser abgespült.

#### **2.2.4.5. Westernblot**

Der spezifische Nachweis von CAR erfolgte mit dem spezifischen Antikörper H- 300.  $\beta$ - Aktin diente dabei als Ladekontrolle. Nach der Färbung mit Ponceau- Rot (vgl. 2.2.4.4.) wurde die Membran je nach Antikörper mit 4 % Magermilchpulver (CAR) oder BSA ( $\beta$ - Aktin) in 0,05 % TBST für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Rollen blockiert. Danach wurde der Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in Blockierlösung auf die Membran gegeben (Verdünnungen: CAR: 1:750,  $\beta$ - Aktin 1:2000). Die Membran wurde am nächsten Tag dreimal mit TBST gewaschen. Danach konnte die Membran mit dem HRP- gekoppelten Sekundärantikörper (CAR: anti- Kaninchen,  $\beta$ - Aktin: anti- Maus, Verdünnungen jeweils 1:1000 in TBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBST konnte der Blot in der Dunkelkammer entwickelt werden.

Für die Entwicklung legte man den Blot in einer Röntgenkassette auf eine Folie, gab das Chemilumineszenzsubstrat auf den Blot und deckte ihn mit einer weiteren Folie ab. Danach wurde der Röntgenfilm auf den Blot gelegt und belichtet. Nach der Belichtung wurde der Film in den Entwickler gelegt, die Entwicklung mit 2 %- iger Essigsäure gestoppt und der Film fixiert.

#### **2.2.4.6. Gelatine- Zymografie**

Um die Aktivität von Matrixmetalloproteinasen nachzuweisen wurde eine sogenannte Gelatine- Zymografie durchgeführt. Diese wurde aus Current Protocols in Protein Science (2003) entnommen, welche von Linda Troeberg and Hideaki Nagase beigesteuert wurde. Hierfür wurden Zellen ausgesät und zwei bis drei Tage kultiviert. Anschließend wurde das FCS- haltige Medium abgesaugt und frisches Medium für 24 Stunden konditioniert.

Für die Zymografie selber wurde ein SDS- Gel mit 1 mg/ ml Gelatine im Trenngel gegossen. Hierfür wurde ein Gel analog zu 2.2.4.3. vorbereitet, jedoch ein Teil des Wassers durch Gelatine ersetzt. Das konditionierte Medium wurde 1:2 mit nicht- reduzierendem Probenpuffer versetzt und die Proben aufs Gel gegeben. Der Gellauf erfolgte 45 Minuten bei 150 V, wobei die Gelkammer in einem Gefäß mit Eis stand. Nach dem Gellauf wurde das Gel eine Stunde mit Renaturierungspuffer gewaschen. Der Puffer wurde alle 20 Minuten gewechselt. Das Gel wurde dann für 18 Stunden in Entwicklungspuffer bei 37 °C entwickelt, anschließend mit Färbelösung für 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und ca. 2 Stunden entfärbt bis helle Banden zu sehen waren. Hier haben MMPs die Proteine der Gelatine im Gel zersetzt.

### **2.2.5. Histologie und Immunhistologie**

#### **2.2.5.1. Einbettung von Mausgewebe**

Das in 2.2.2.2. entnommene Gewebe wurde zuerst über Nacht in 4 % gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in 0,1 M Phosphatpuffer gelagert. Die Einbettung des Gewebes erfolgte größtenteils automatisch in einem Einbettautomaten mit dem unten stehenden Programm. Danach konnten die Gewebe in entsprechenden Formen mit Paraffin ausgegossen werden. Die Paraffin- Blöcke konnten dann mit einem Mikrotom geschnitten und für weitere Versuche verwendet werden.

Schritt:	Dauer:
50 % Isopropanol	90 Minuten
70 % Isopropanol	30 Minuten
70 % Isopropanol	90 Minuten
90 % Isopropanol	60 Minuten
90 % Isopropanol	120 Minuten
90 % Isopropanol	120 Minuten
100 % Isopropanol	210 Minuten
100 % Isopropanol	210 Minuten
100 % Isopropanol	210 Minuten
flüssiges Paraffin	5 Stunden
flüssiges Paraffin	5 Stunden

#### **2.2.5.2. Hämatoxilin- Eosin- Färbung zur Bestimmung von Lungenmetastasen**

Um die Zell- und Gewebestrukturen in der Mauslunge sichtbar zu machen wurden die Lungen mit der Hämatoxilin- Eosin- Färbung in einem Färbeautomaten angefärbt. Das Protokoll für die HE- Färbung bzw. die vorher erfolgende Rehydrierung des Gewebes gestaltete sich wie folgt:

Lösung:	Dauer:
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Ethanol absolut	3 Minuten
Ethanol absolut	5 Minuten
96 % Ethanol	5 Minuten
70 % Ethanol	5 Minuten
50 % Ethanol	5 Minuten
Aqua dest.	2 Minuten
Aqua dest.	2 Minuten
Hämalaun	3 Minuten
Aqua dest.	2 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
Eosin	3 Minuten
Aqua dest.	30 Sekunden

70 % Ethanol	15 Sekunden
96 % Ethanol	30 Sekunden
96 % Ethanol	30 Sekunden
Ethanol absolut	5 Minuten
Ethanol absolut	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten

Die Auszählung der Lungenmetastasen erfolgte nach dem etablierten Protokoll von Jojović und Schumacher (2000). Hierfür wurden die Metastasen in 10 Lungenschnitten aus dem Mittelfeld der Zehner- Serie in der 200- fachen Vergrößerung ausgezählt. Die Anzahl der Metastasen in der Lunge berechnete sich dann mit Hilfe der folgenden Formel:

$(MW \text{ (Summe Mets 10 Schnitte)} * \text{Anzahl aller Schnitte}) - 20\% \text{ MW (Summe Mets 10 Schnitte)}$

### 2.2.5.3. Feulgen- Färbung

Um die DNA in den Zellkernen zu färben und somit Mitose und Apoptose besser auszählen zu können, wurden die Schnitte der Tumore mit der Feulgen- Färbung gefärbt. Die Färbung erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

Arbeitsschritt:	Dauer:
Entparaffinieren	
Spülen Aqua dest.	2- 3 Minuten
1 molare HCl, RT	1 Minute
1 molare HCl 60 °C WB	4 Minuten
1 molare HCl, RT	1 Minute
Spülen Aqua dest.	2- 3 Minuten
Schiff'sches Reagenz	30 Minuten
SO <sub>2</sub> - Wasser in 3 Küvetten	je 2 Minuten
Leitungswasser (fließend)	5 Minuten
Spülen Aqua dest.	2- 3 Minuten
aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol	
Eindeckeln mit Eukitt	

Das SO<sub>2</sub>- Wasser wurde aus 200 ml Leitungswasser gemischt mit 10 ml 10 % -iger Kalium oder Natrium- Bisulfid- Lösung und 10 ml 1 n HCl kurz vor dem Gebrauch hergestellt.

Die Mitosen und Apoptosen wurden dann in der 200- fachen Vergrößerung des Mikroskops mit Hilfe eines Rasters ausgezählt.

#### **2.2.5.4. Immunhistochemie**

Ziel der Immunhistochemie ist der Nachweis von Proteinen direkt in histologischen Gewebeschnitten. Dies wird mit Hilfe von Antikörpern erreicht, die spezifisch gegen das zu untersuchende Protein, also ihr Antigenepitop, gerichtet sind. Die Sekundärantikörper sind hierbei mit einem Enzym gekoppelt, welches dann sein jeweiliges Substrat in einer zuerst farblosen Substrat- Chromogen- Lösung in ein farbiges Produkt spalten kann.

Um die Proteine zu detektieren gibt es verschiedene Methoden, wie z. B. die Avidin- Biotin- Methode oder das CSA- Kit.

##### **2.2.5.4.1. Entparaffinierung**

Durch Xylol wurde das Paraffin vom Gewebe aufgelöst. Anschließend wurde das Gewebe in einer absteigender Ethanolreihe rehydriert, die in Wasser endete. Die Schnitte konnten danach für die entsprechenden Immunhistologischen Untersuchungen verwendet werden.

Lösung:	Dauer:
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Ethanol absolut	3 Minuten
Ethanol absolut	5 Minuten
96 % Ethanol	5 Minuten
70 % Ethanol	5 Minuten
50 % Ethanol	5 Minuten
Aqua dest.	2 Minuten
Aqua dest.	2 Minuten

##### **2.2.5.4.2. Entwässerung und Eindeckeln**

Um die Färbungen haltbar zu machen wurden die gefärbten Schnitte nach folgendem Protokoll im Färbeautomaten entwässert um anschließend mit Eukit eingedeckelt werden zu können.

70 % Ethanol	15 Sekunden
96 % Ethanol	30 Sekunden
96 % Ethanol	30 Sekunden
Ethanol absolut	5 Minuten
Ethanol absolut	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten

Danach konnten die Schnitte mit Eukit eingedeckelt werden. Hierfür wurde ein Tropfen Eukit auf das Deckgläschen gegeben und luftblasenfrei auf den Schnitt aufgebracht. Nach dem die eingedeckelten Schnitte getrocknet waren konnten sie in Kästen für histologische Schnitte gelagert werden.

#### 2.2.5.4.3. Antigen- Demaskierungsmethoden

Fixiert man Gewebe in Formalin und bettet sie in Paraffin ein, kommt es zum Teil zur Maskierung der Antigenepitope der Proteine, d. h. einer Konformationsänderung der Proteine. Der entsprechende Antikörper kann dann nicht mehr an sein Zielprotein binden. Um die Epitope wieder zugänglich zu machen muss eine sogenannte Antigen- Demaskierung, für die es verschiedene Wege gibt, erfolgen.

Die folgende Tabelle 2.5. gibt die Vorbehandlungen und Entwicklungsmethoden an, bzw. Tabelle 2.6. die Antikörper, deren Verdünnungen und die Blockierlösungen.

Färbung	Vorbehandlung	Entwicklungsmethode
CAR	1. Vorbehandlung: 0,05 % in Lektinpuffer; 37 °C, 10 Minuten, Wasserbad 2. Vorbehandlung: S1699, 99 °C, 20 Minuten, Steamer,	Entwicklungscocktail
MMP3	EDTA, 60 °C, über Nacht, Wasserbad	Entwicklungscocktail
MMP13	Citratpuffer, 60 °C, über Nacht, Wasserbad	Entwicklungscocktail
Ki67	S1699, 85 °C, über Nacht, Wasserbad	Permanent red

**Tabelle 2.5.: Vorbehandlungen und Entwicklungsmethoden der immunhistochemischen Färbungen.** Dargestellt sind die verschiedenen immunhistochemischen Färbungen, die Details der Vorbehandlungen und die Entwicklungsmethode.

Färbung (Methode)	Blockierlösung	Primärantikörper (Verdünnung)	Sekundärantikörper (Verdünnung)	Isokontrolle (Verdünnung)
CAR (ABC-Methode)	Schweineserum (1:10)	H- 300 (1:50)	Schwein- anti- Kaninchen (1:200)	Kaninchen neg. Kontrolle (1:74600)
MMP3 (CSA)	vgl. CSA	MMP3 (1:500)	*	msIgG1 (1:250)
MMP13 (CSA)	vgl. CSA	MMP13 (1:500)	*	msIgG1 (1:100)
Ki67 (ABC-Methode)	Kaninchenserum	Ki67 (1:38)	Ziege- anti- Maus	msIgG1 (1:91)

**Tabelle 2.6.: Antikörperliste immunhistochemische Färbungen.** Angegeben sind die jeweiligen Primär- und Sekundärantikörper (\*: kein Sekundärantikörper verwendet) sowie die Blockierlösungen. Bei der Färbung nach der CSA- Methode wurden die im Kit mitgelieferten Lösungen verwendet (vgl. 2.2.5.4.4.). In Klammern wurden die jeweiligen Verdünnungen angegeben.

#### 2.2.5.4.4. Avidin- Biotin-Methode

Die Avidin- Biotin- Komplex- Methode (ABC- Methode) ist eine häufig verwendete Methode in der Immunhistochemie, die auf der sehr hohen Affinität von Avidin zu Biotin basiert und eine hohe Sensitivität aufweist. Aus der hohen Affinität von Avidin zu Biotin resultiert außerdem eine sehr hohe Spezifität der Bindung.

Der generelle Ablauf der Färbung gestaltete sich wie folgt:

Arbeitsschritt:	Dauer:
Entparaffinieren (vgl. 2.2.5.4.1.)	
Vorbehandlung (vgl. Tabelle 2.5.)	
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
Blockieren mit Serum (nur bei CAR-Färbung)	30 Minuten RT
Abkippen des Serums	
Primärantikörper/ Isokontrolle	ü.N. oder 1 Stunde RT
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
Sekundärantikörper	30 Minuten RT
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
ABC- AP- Komplex	30 Minuten RT
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
Entwicklung (vgl. Tabelle 2.5.)	
Leitungswasser (fließend)	5 Minuten
Aqua dest.	2 Minuten

Gegenfärbung mit Hämalaun	5 Sekunden
Leitungswasser (fließend)	5 Minuten
Aqua dest.	2 Minuten
Entwässern (vgl. 2.2.5.4.2)	
Eindeckeln mit Eukit (vgl. 2.2.5.4.2)	

#### **2.2.5.4.5. Catalyzed signal amplification– Methode (CSA)**

Die *Catalyzed signal amplification*– Methode (CSA) von Dako basiert auf der ABC-Methode, wobei nach der Inkubation mit dem Streptavidin– Biotin- Komplex ein Amplifikationsreagenz nachgeschaltet wird, wodurch eine weitere Verstärkung des Signals erreicht wird.

Der generelle Ablauf der Färbung gestaltet sich wie folgt:

Arbeitsschritt:	Dauer:
Entparaffinieren (vgl. 2.2.5.4.1.)	
Vorbehandlung (vgl. Tabelle 2.5.)	
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
Avidin- Block	15 Minuten
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
Biotin-Block	15 Minuten
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
Protein-Block	15 Minuten
Abklopfen	
Primärantikörper	ü. N. oder 1 Stunde RT
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
Link- Antikörper	15 Minuten
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
Streptavidin-Biotin-Komplex	
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
TNB- Verstärkung	15 Minuten
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
Streptavidin- AP	15 Minuten
Waschen (2x TBS- T, 1x TBS)	je 5 Minuten
Entwicklung (vgl. Tabelle 2.5.)	

Leitungswasser (fließend)	5 Minuten
Aqua dest.	2 Minuten
Gegenfärbung mit Hämalaun	5 Sekunden
Leitungswasser (fließend)	5 Minuten
Aqua dest.	2 Minuten
Entwässern (vgl. 2.2.5.4.2)	
Eindeckeln (vgl. 2.2.5.4.2)	

### **2.2.6. Statistische Analyse**

Die Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPadPrism (Version 5.03). Ob die erhobenen Daten signifikant verschieden waren wurde mit einem ungepaarten T- Test bei normalverteilten Daten getestet bzw. mit dem Man- Whitney- U- Test bei nicht normalverteilten Daten, und als statistisch signifikant betrachtet, wenn der p- Wert kleiner als 0,05 war.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Bedeutung der CAR- Expression im Xenograftmodell

##### 3.1.1. CAR- Expression

Zu Beginn der Arbeit wurden verschiedene Tumorzelllinien auf ihren CAR- Expressionsstatus geprüft. Hierfür wurde von allen Zellen ein Gesamtzelllysat hergestellt und im Westernblot überprüft (vgl. Abbildung 3.1.).

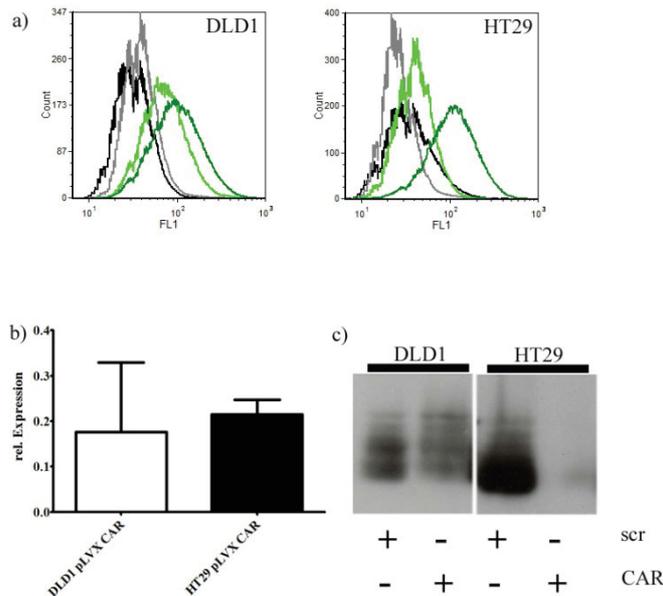


**Abbildung 3.1.: CAR in verschiedenen Tumorzelllinien.** Nachweis von CAR im Gesamtzelllysat von Tumorzelllinien, sowie die Positivkontrolle (CAR- exprimierende CHO- Zellen) als auch die Negativkontrolle (CHO- Zellen). Durchgeführt wurde ein Westernblot in einem 10 % SDS- Gel. Deutlich zu sehen ist die Expression von CAR in der Positivkontrolle (CHO +) sowie die fehlende Expression in der Negativkontrolle (CHO -). Die Zellen unterscheiden sich stark in der Expression von CAR.

Der Unterschied in der CAR Expression in verschiedenen Tumorzellen im Westernblot ist zwischen den HCT116- Zellen mit hoher Expression und den Colo205- Zellen mit geringer CAR- Expression sehr deutlich zu erkennen. Für die folgenden Experimente wurden DLD1-, HCT116-, HT29- und SW480- Zellen mit einer mittleren CAR- Expression gewählt.

##### 3.1.1.1. shRNA vermittelter Knockdown von CAR in humanen Kolonkarzinomzellen

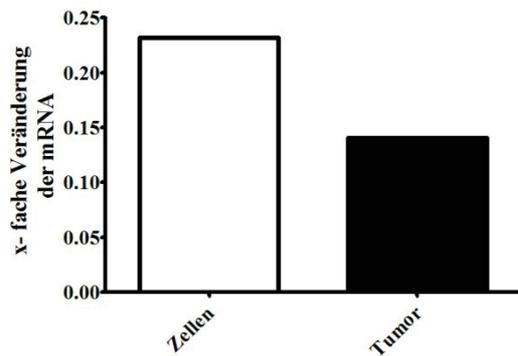
Um die Auswirkung der CAR- Expression auf die verschiedenen Schritte der Metastasierung zu untersuchen, wurden Tumorzellen mittels shRNA so verändert, dass sie weniger CAR exprimieren. Der Erfolg wurde einerseits mittels Durchflusszytometrie untersucht, wobei hierbei nur das auf der Oberfläche vorhandene CAR erfasst wird und andererseits mittels Westernblot um den Gesamt- CAR- Level zu erfassen (vgl. Abbildung 3.2.).



**Abbildung 3.2.: CAR Expression verschiedener humaner Kolonkarzinomzellen nach CAR- Knockdown.**  
a) Histogramme der Durchflusszytometrie der zwei verschiedenen Knockdownzelllinien (schwarz: Isotyp der Kontrollzelllinie mit pLVX scr- Vektor, grau: Isotyp der Knockdownzelllinie mit pLVX CAR- Vektor, dunkelgrün: CAR- Signal der Kontrollzelllinie, hellgrün: CAR- Signal der Knockdownzelllinie). Aufgetragen wurde die Anzahl der Zellen (Counts) gegen den Fluoreszenzkanal. Deutlich zu sehen ist eine Verschiebung der Kurven nach links, d. h. eine Reduktion der CAR- Expression auf der Oberfläche. b) Quantitative Auswertung des CAR- Signals der Durchflusszytometrie. Aufgetragen wurde die relative Expression der Knockdownzelllinie im Verhältnis zur Kontrollzelllinie. Auch hier ist zu sehen, dass die Expression bei den Zellen auf ca. 20 % der Kontrollzellen reduziert werden konnte. c) Westernblot Analyse der Gesamtexpression von CAR. Auch hier ist in den DLD1- Zellen eine Reduktion der CAR- Expression nach CAR- Knockdown zu detektieren. In den HT29- Zellen ist die CAR- Expression auf ein kaum detektierbares Level nach CAR- Knockdown reduziert.

Alle Zelllinien weisen in der Durchflusszytometrie ein deutliches Signal für CAR auf der Zelloberfläche auf. Nach Transfektion des pLVX CAR- Vektors reduziert sich die Oberflächenexpression bei allen Zelllinien. Bei den DLD1- Zellen konnte die Expression auf 18 % der Expression der Kontrollzellen reduziert werden, bei den HT29- Zellen auf 22 % (vgl. Abbildung 3.2. b)).

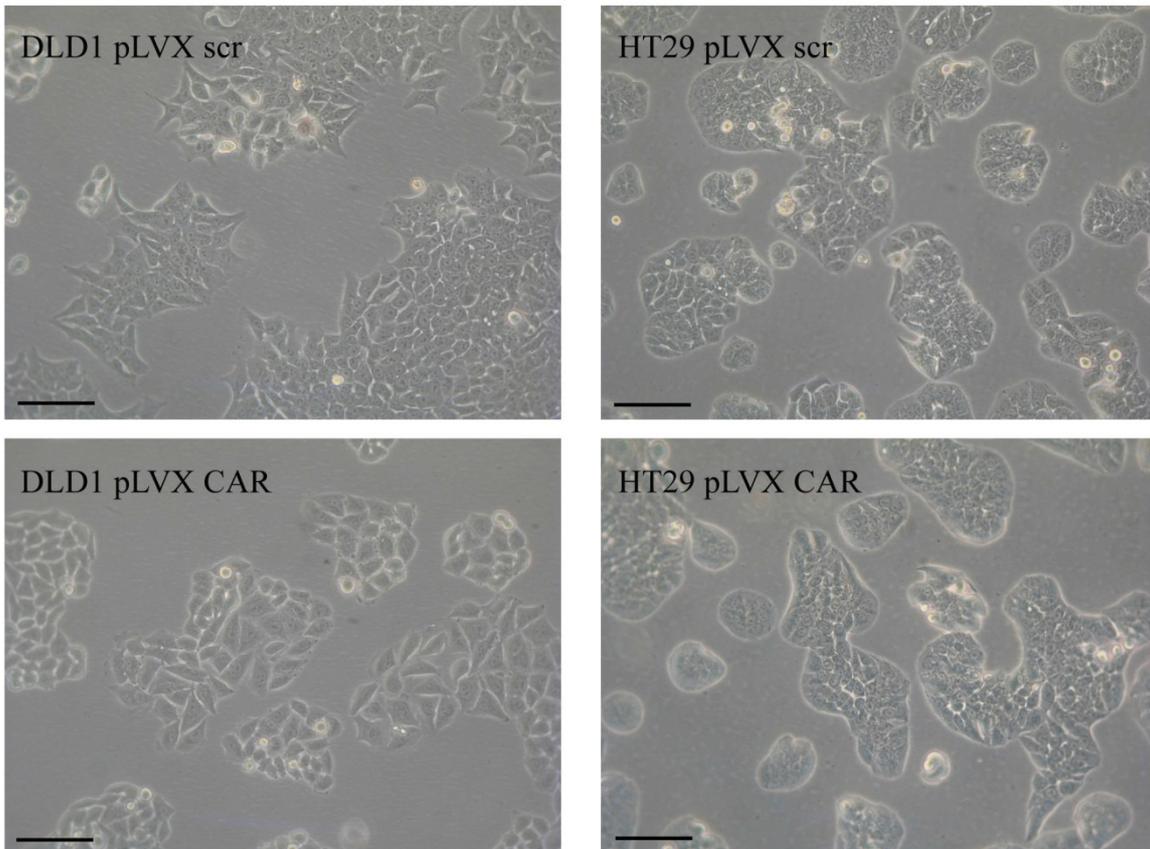
Auch die Untersuchung im Westernblot, bei der man sowohl CAR aus der Zellmembran als auch zytoplasmatisch vorliegende Isoformen darstellt, zeigt eine Herabregulation von CAR (vgl. Abbildung 3.2. c)). Die DLD1- Zellen, welche in den Kontrollzellen (vgl. Abbildung 3.1.) eine eher mittlere Expression von CAR im Westernblot zeigen, haben nach dem Knockdown einen reduzierten Level. Bei den HT29- Zellen, welche relativ viel CAR in den Kontrollzellen exprimieren (vgl. Abbildung 3.1.), kann die CAR- Expression auf ein im Westernblot kaum noch detektierbares Level gesenkt werden.



**Abbildung 3.3.: Ergebnis des Next Generation Sequenzierung für CAR mRNA.** Dargestellt ist in weiß die x-fache Veränderung der CAR mRNA der HT29 pLVX CAR- Zellen im Vergleich zu den HT29 pLVX scr- Zellen, in schwarz die Veränderung der CAR mRNA in den HT29pLVXCAR- Tumoren im Vergleich zu den HT29 pLVX scr- Tumoren. In den Zellen ist in den HT29 pLVX CAR- Zellen 77 % weniger CAR mRNA detektierbar als in den Kontrollzellen. Bei den Tumoren, die aus den Knockdownzellen gewachsen sind, ist sogar 85 % weniger CAR mRNA in den Tumoren.

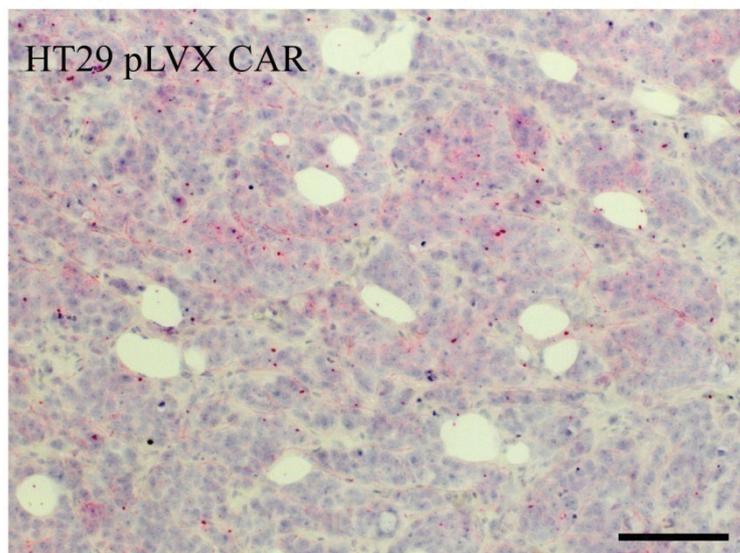
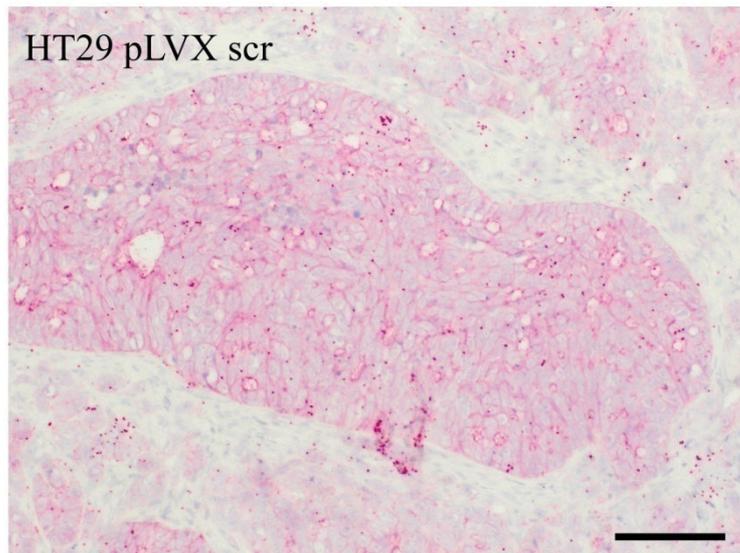
Die Ergebnisse wurden zudem noch auf der Ebene der mRNA in der Next Generation Sequenzierung überprüft (vgl. Abbildung 3.3.). Auch auf hier ist der Knockdown von nachweisbar. Bei den HT29 pLVX CAR- Zellen ist die mRNA um 77 % im Vergleich zu den HT29 pLVX scr- Zellen reduziert. In den Xenografttumoren ist die CAR mRNA in den Tumoren, die aus den Knockdownzellen gewachsen sind, sogar um 85 % im Vergleich zu den Tumoren, die aus den Kontrollzellen gewachsen sind, reduziert. Sowohl bei den Zellen, als auch bei den Tumoren handelt es sich um signifikant regulierte Gene ( $p_{adj} = 1,4 * 10^{-27}$  bzw.  $p_{adj} = 4,0 * 10^{-43}$ ).

Die Parentalzellen der HT29- und DLD1- Zellen haben laut Literatur (ATCC) einen epithelialen Phänotypen. Sowohl die Kontrollzellen als auch die Knockdownzellen wachsen pflastersteinartig, was dem typischen Wachstum von epithelialen Zellen entspricht (vgl. Abbildung 3.4.)).



**Abbildung 3.4.: Morphologie der humanen Kolonkarzinomzellen.** Dargestellt sind Phasenkontrastaufnahmen der Zelllinien in 200- facher Vergrößerung, die mit dem pLVX scr- bzw. pLVX CAR- Vektor transduziert wurden. Die Größe des Maßstabsbalkens beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

Explantiert man die Tumore, die subkutan in Mäusen aus den HT29 pLVX scr- und HT29 pLVX CAR- Zellen gewachsen sind und färbt diese mit einem Antikörper gegen CAR, so sieht man, dass der Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den Knockdownzellen auch *in vivo* erhalten bleibt. In den Tumoren der HT29 pLVX scr- Zellen kann man eine deutliche Färbung sehen, welches in einigen Regionen ein netzförmiges Muster bildet. Lediglich zu den Rändern des Tumors hin nimmt dieses zum Teil ab. Dieses Färbemuster ist so in den Knockdowntumoren nicht zu sehen (vgl. Abbildung 3.5.).



**Abbildung 3.5.: CAR- Expression in explantierten Xenografttumoren.** Dargestellt sind 200- fache Vergrößerungen der Schnitte von HT29 pLVX scr- und HT29 pLVX CAR- Tumoren. Deutlich zu sehen ist die Färbung in den Kontrolltumoren, die in den Knockdowntumoren meist nicht mehr vorhanden ist. Die Größe des Maßstabalkens beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

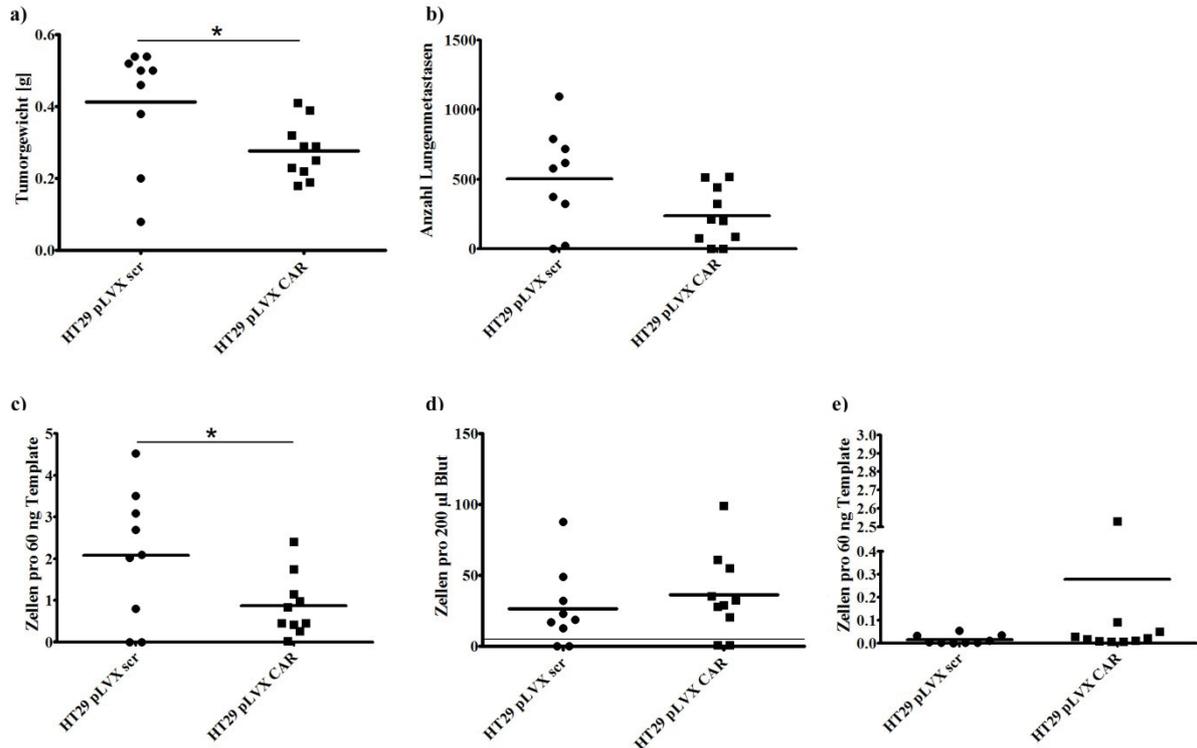
### 3.1.2. Xenograftmodell: Endpunktversuch

Im ersten Tierversuch handelte es sich um einen Endpunktversuch, d. h. dass alle Tiere getötet wurden sobald das erste Tier ein Abbruchkriterium erreicht hat. In diesem Fall handelt es sich um einen Ulcus nach 3 Wochen. Sieht man sich das Tumorwachstum zum Zeitpunkt der Tötung der Mäuse an, so sind die HT29 pLVX scr- Tumore signifikant ( $p = 0,032$ ) größer als die der Mäuse, welche die Knockdownzellen erhalten haben (vgl. Abbildung 3.6. a)). Die Tumore der Kontrollgruppe wiegen im Schnitt 0,41 g, die der Knockdowngruppe 0,28 g.

Um die Anzahl von Zellen im Blut, Knochenmark und in der Lunge zu bestimmen wurde eine ALU- PCR durchgeführt (vgl. Abbildung 3.6. c)- e)), mit der humane Zellen auf Grund dieser humanspezifischen ALU-Sequenz im Maushintergrund detektiert werden können. In der Lunge sind in der PCR mehr Zellen ( $p = 0,0431$ ) in der Kontrollzellgruppe nachweisbar als in den Tieren, die die Knockdownzellen bekommen haben. Die Tiere, die die HT29 pLVX scr- Zellen bekommen haben, haben im Schnitt 2,08 Zellen pro 60 ng Template in der Lunge, die Tiere, die HT29 pLVX CAR- Zellen bekommen haben, nur 0,8745 Zellen pro 60 ng Template. Die Nachweisgrenze lag bei 0,01 Zellen pro 60 ng Template. Bei den HT29 pLVX scr- Zellen lag in zwei Tieren die Anzahl der Zellen bei 0, also unterhalb der Nachweisgrenze. Untersucht man den kontralateralen Lungenflügel als HE- Schnitt, so findet man keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl der Metastasen beider Versuchsgruppen. Die Tiere mit den HT29 pLVX scr- Tumoren haben im Schnitt 502 Metastasen in der Lunge, wohingegen die Tiere mit den HT29 pLVX CAR- Tumoren 236,8 Metastasen haben ( $p = 0,0603$ ). Das Ergebnis der ALU- PCR der Lungen lässt sich somit in der HE- Färbung der Lungen nur tendenziell bestätigen. Hier ist jedoch zu beachten, dass im HE- Schnitt Metastasen gezählt werden, in der PCR aber einzelne Tumorzellen.

Im Blutstrom gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die Tiere, die die HT29 pLVX scr- Zellen injiziert bekommen hatten, haben 26,74 Zellen pro 200  $\mu$ l Blut, die mit HT29 pLVX CAR- Zellen injizierten Tiere 36,27 Zellen ( $p = 0,2362$ ). Die Nachweisgrenze lag bei 5 Zellen pro 200  $\mu$ l Blut. In jeder Versuchsgruppelagen jeweils 2 Proben unterhalb dieser Nachweisgrenze.

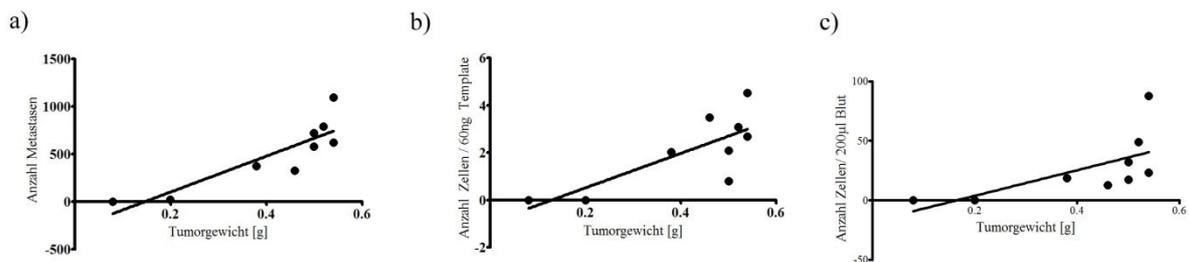
Auch im Knochenmark gibt es keine signifikanten Unterschiede. Die Nachweisgrenze lag hier bei einer Zelle. Jeweils zwei Proben der pLVX scr- und pLVX CAR- Zellen lagen unterhalb dieser Nachweisgrenze.



**Abbildung 3.6.: Ergebnisse des Endpunktversuchs.** Aufgetragen wurden a) das Tumorgewicht in Gramm, b) die Anzahl der Metastasen im rechten Lungenflügel im HE- Schnitt, c) die Anzahl der nachweisbaren Zellen pro 60 ng Template in dem linken Lungenflügel bzw. e) in dem Knochenmark, sowie d) die Anzahl nachweisbarer Zellen in 200 µl Blut in der ALU- PCR. Die Tiere, die die Knockdownzellen injiziert bekommen entwickeln signifikant kleinere Tumore und weisen signifikant weniger Tumorzellen in der Lunge auf. Der schwarze Balken entspricht dem Mittelwert, die schwarze Linie gibt die Nachweisgrenze an. \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Die Kontrolltiere haben 0,02 Zellen pro 60 ng Template im Knochenmark, wohingegen die Tiere, welche die Knockdowntumore trugen, 0,28 Zellen pro 60 ng Template aufweisen ( $p = 0,1128$ ). Die Nachweisgrenze lag bei 0,002 Zellen, d. h. dass alles über 0,005 Zellen nicht vom Hintergrund unterscheidbar ist. Fünf Proben der pLVX scr- Tumore liegen unterhalb dieser Nachweisgrenze.

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen Tumorgöße und der Anzahl der Metastasen in der Lunge bzw. zirkulierenden Tumorzellen gibt, wurden die jeweiligen Befunde miteinander korreliert. Die signifikanten Korrelationen sind in Abbildung 3.7. dargestellt.

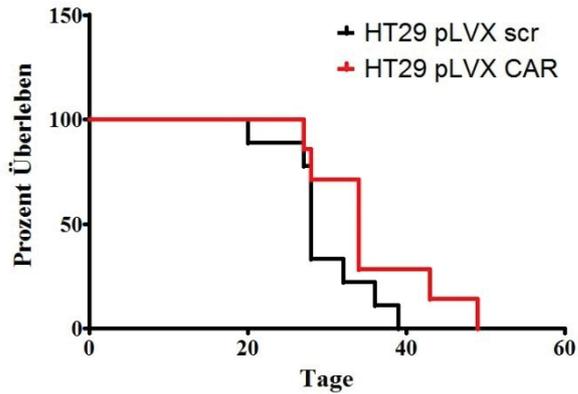


**Abbildung 3.7.: Korrelation verschiedener Parameter des Tierversuchs.** Abgebildet wurden die signifikanten Korrelationen der verschiedenen Parameter mit dem Tumorgewicht. Signifikant korrelieren nur a) die Metastasen im HE- Schnitt, b) die Zellen in der ALU- PCR der Lunge und c) die zirkulierenden Tumorzellen im Blut mit dem Tumorgewicht in der der Kontrollzellgruppe.

Bei der Korrelation von Anzahl der Metastasen im HE- Schnitt bzw. der Anzahl der Zellen in der ALU- PCR pro 60 ng Template besteht eine positive Korrelation bei den Tieren, deren Primärtumor aus den Kontrollzellen gewachsen ist, d. h. je höher das Tumorgewicht ist, desto mehr Metastasen bzw. Zellen wurden in der Lunge gefunden ( $p = 0,0024$  bzw.  $p = 0,0157$ ), (vgl. Abbildung 3.7. a) und b)). Bei den zirkulierenden Tumorzellen pro 200  $\mu$ l Blut, die in der ALU- PCR nachgewiesen wurden, besteht bei den HT29 pLVX scr- Tumoren eine positive Korrelation mit dem Tumorgewicht ( $p = 0,0061$ ) (vgl. Abbildung 3.7. c)). Zusammenfassend sind also nur die zirkulierenden Tumorzellen und die Anzahl der Metastasen in der Lunge bzw. die Anzahl der Zellen in der Lunge bei den HT29 pLVX scr- Tumoren signifikant mit dem Tumorgewicht korreliert.

### 3.1.3. Xenograftmodell: Überleben

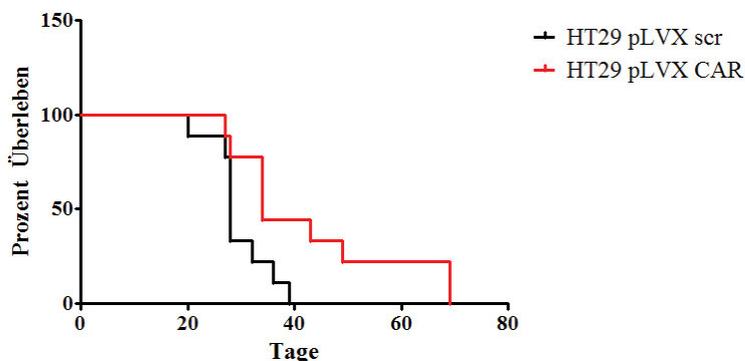
Bei dem ersten Tierversuch handelte es sich um einen Endpunktversuch, bei dem alle Tiere an dem Tag getötet wurden, an dem das erste Tier eines der Abbruchkriterien erreicht hat. Hierdurch konnten Wachstumsunterschiede zwischen den Primärtumoren der beiden Zelllinien untersucht werden und auch die Geschwindigkeit der Metastasierung. Da aber auch die Auswirkung auf das Überleben durch den CAR- Knockdown von Interesse war, wurde ein Tierversuch mit Überlebenskurve durchgeführt. Hierdurch konnte erreicht werden, dass alle Tumore in etwa die gleiche Größe erreichten. Hierdurch konnte zudem die Auswirkung des CAR- Knockdowns auf die Metastasierung unabhängig von der Tumorgröße untersucht werden. Da in diesem Versuch zwei Tiere kein Tumorwachstum aufwiesen, wurde zuerst eine Überlebenskurve mit den Tieren gemacht, die einen Tumor trugen.



**Abbildung 3.8.: Überlebenskurve.** Dargestellt ist das Überleben in Prozent gegen die Dauer des Überlebens in Tagen. Die rote Kurve beschreibt das Überleben der Tiere, die die Knockdownzellen injiziert bekommen haben, die schwarze Linie beschreibt das Überleben der Tiere mit den Kontrollzellen. Die Tiere, denen die Kontrolltumore wuchsen, überleben im Schnitt 28 Tage, wohingegen die Tiere mit den Knockdowntumoren mit 34 Tage länger überleben wobei dieser Unterschied nicht signifikant ist ( $p = 0,1086$ ).

In der Überlebenskurve (vgl. Abbildung 3.8.) kann man sehen, dass das erste Tier der Kontrollgruppe 20 Tage nach der Injektion getötet wurde, das letzte 39 Tage nach Injektion. Bei den Tieren, die die Knockdownzellen injiziert bekommen haben, wurde das erste Tier 27 Tage nach der Injektion getötet, das letzte Tier 49 Tage. Die meisten Tiere erreichen das Abbruchkriterium der Ulzeration. Im Durchschnitt überleben die Tiere mit den Kontrollzellen 28 Tage, die Tiere mit den Knockdownzellen 34 Tage. Dieser Unterschied ist nicht signifikant ( $p = 0,1086$ ).

Um die Auswirkung des fehlenden Tumorwachstums auf das Überleben der Tiere zu untersuchen, wurden die beiden Tiere ohne Tumor in einer zweiten Überlebenskurve mit berücksichtigt (vgl. Abbildung 3.9.). Hierbei wurde der Tag, an dem sie getötet wurden, als Tag des Erreichen des Abbruchkriteriums angenommen.

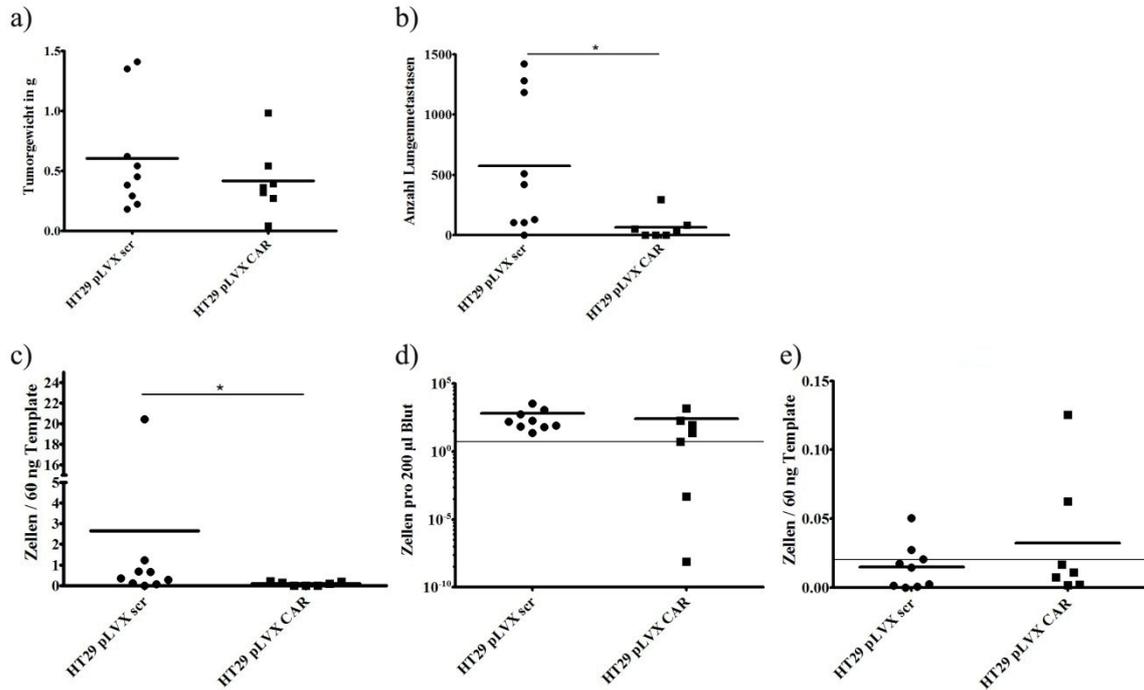


**Abbildung 3.9.: Überlebenskurve 2.** Dargestellt ist die Überlebenskurve des Tierversuchs, wobei hier die zwei Tiere ohne Tumorwachstum mit einbezogen wurden. Deutlich zu sehen ist, dass die Tiere, die die Knockdownzellen injiziert bekommen haben nun signifikant länger überleben als die Tiere der Kontrollgruppe ( $p = 0,0205$ ).

Berücksichtigt man die Tiere ohne Tumorwachstum, so ändert sich an der durchschnittlichen Überlebensdauer der Tiere der Versuchsgruppen nichts. Die Tiere, deren Primärtumore durch die Injektion von HT29 pLVX scr- Zellen entstanden sind, überleben durchschnittlich 28 Tage, die Tiere, deren Primärtumore durch die Injektion von HT29 pLVX CAR- Zellen entstanden ist, 34 Tage. Durch die zwei Tiere ohne Tumorwachstum in der Knockdowngruppe ist das Überleben der Tiere, die die Knockdownzellen injiziert bekommen haben, signifikant länger als das der Tiere, die die Kontrollzellen injiziert bekommen hatten ( $p = 0,0205$ ). Im Durchschnitt liegt das Tumorgewicht zum Abbruchzeitpunkt in der Gruppe, die die HT29 pLVX scr- Zellen injiziert bekommen hat, bei 0,60 g, bei den Tieren, die die HT29 pLVX CAR- Zellen bekommen haben, bei 0,41 g (vgl. Abbildung 3.10.a)). Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ( $p = 0,3594$ ).

In den HE- gefärbten Schnitten der Lungenflügel sind in den Lungen der Tiere, die die Kontrolltumore trugen, im Mittel 573,2 Metastasen zu finden, in denen der Tiere mit Tumoren der Knockdownzellen statistisch signifikant ( $p = 0,0359$ ) weniger Metastasen, mit im Schnitt 64,71 Metastasen pro Lungenflügel (vgl. Abbildung 3.10.b)). Die ALU- PCR des kontralateralen Lungenflügels bestätigt diesen Befund. In der Gruppe der HT29 pLVX scr- Tumore sind in der Lunge 2,64 Zellen pro 60 ng Template zu finden, in der Gruppe der HT29 pLVX CAR- Tumore nur 0,09 Zellen pro 60 ng Template. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ( $p = 0,0442$ ). Die Nachweisgrenze liegt bei 0,02 Zellen pro 60 ng Template. Bei den HT29 pLVX scr- Zellen liegt in einem Tier die Anzahl der Zellen unter dieser Nachweisgrenze, bei den HT29 pLVX CAR- Zellen liegen die Ergebnisse von drei Tieren unterhalb dieser Nachweisgrenze (vgl. Abbildung 3.10.c)).

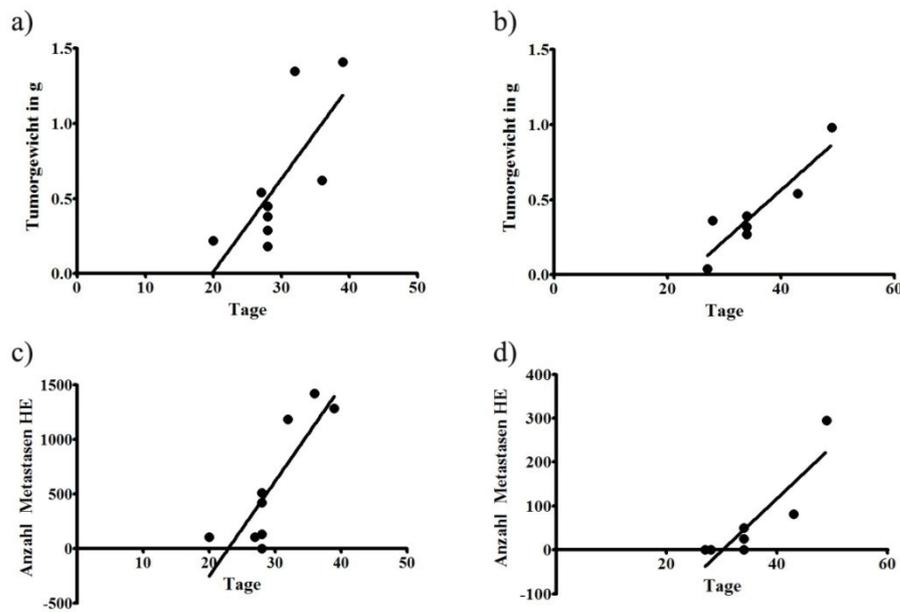
Im Blutstrom findet man bei den Tieren, die die Kontrolltumore trugen, im Mittel 636,3 Zellen in 200  $\mu$ l Blut, bei den Tieren mit den CAR- Knockdowntumoren 257,8 Zellen pro 200  $\mu$ l Blut. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ( $p = 0,178$ ). Die Nachweisgrenze der ALU- PCR liegt hier bei fünf Zellen pro 200  $\mu$ l Blut. Bei den HT29 pLVX scr- Zellen liegen die Ergebnisse aller Tiere über dieser Nachweisgrenze, bei den HT29 pLVX CAR- Zellen liegen die Ergebnisse von zwei Tieren unterhalb dieser Nachweisgrenze (vgl. Abbildung. 3.10.d))



**Abbildung 3.10.: Ergebnisse des Tierversuchs Überleben.** Dargestellt ist a) die Tumorgröße, b) die Anzahl der Metastasen im HE- Schnitt, c) die Anzahl der Zellen in 60 µg Template in der Lunge und e) dem Knochenmark, sowie d) die Anzahl der humanen Zellen in 200 µl Blut. Die rote Linie der PCR Ergebnisse (c-e)) stellt die jeweilige Nachweisgrenze dar. Das Tumorgewicht der beiden Versuchsgruppen ist nicht signifikant verschieden, jedoch sind sowohl in der PCR als auch in der HE- Schnitten in der Knockdowngruppe weniger Metastasen in der Lunge zu finden. Im Blut unterscheidet sich die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen nicht signifikant. Im Knochenmark sind in der Knockdowngruppe mehr Tumorzellen zu finden. Dies ist jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,6065$ ). Der schwarze Balken entspricht dem Mittelwert, die schwarze Linie gibt die Nachweisgrenze an. \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

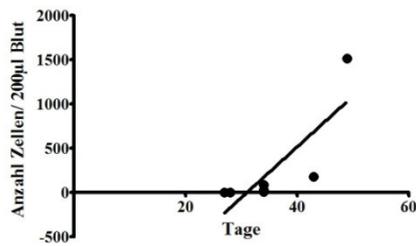
Im Knochenmark (vgl. Abbildung 3.10.e)) sind kaum Zellen zu finden. Bei den HT29 pLVX scr- Tumor- tragenden Tieren sind im Knochenmark 0,01 Zellen pro 60 ng Template zu finden, bei den Tieren, die die HT29 pLVX CAR- Tumore trugen, sind es 0,03 Zellen pro 60 ng Template. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,6065$ ). Die Nachweisgrenze bei der ALU- PCR des Knochenmarks liegt bei 0,02 Zellen pro 60 ng. Bei den HT29 pLVX scr- Zellen liegen bei sechs Tieren die Anzahl der Zellen unter dieser Nachweisgrenze, bei den HT29 pLVX CAR- Zellen liegen die Ergebnisse von fünf Tieren unterhalb dieser Nachweisgrenze.

Um den Zusammenhang zwischen Wachstumsdauer, Tumorgröße, Anzahl der Metastasen und zirkulierender Tumorzellen zu analysieren wurden deren Daten korreliert. Da die Wachstumsdauer einen Einfluss darauf haben könnte, wie viele Zellen in die Blutbahn disemminieren und sich schließlich am Ort der Metastasierung absiedeln können, wurden diese Daten miteinander korreliert.



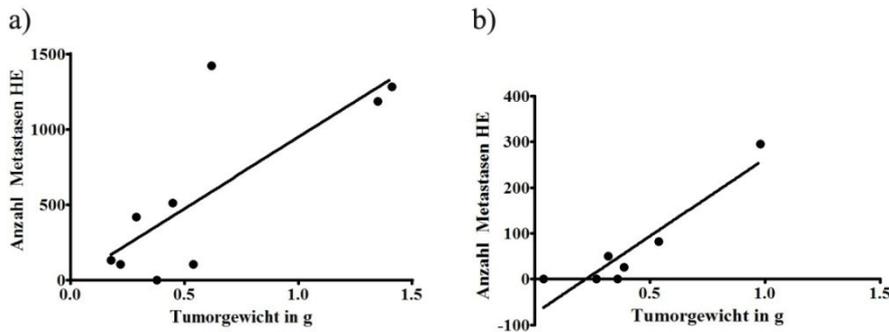
**Abbildung 3.11.: Korrelationen der Wachstumsdauer.** Dargestellt sind die Korrelationen von Tumorgröße (a) und b)) und der Anzahl der Metastasen, die im HE- Schnitt nachgewiesen werden können (c) und d)). Sowohl die Tumorgröße als auch die Anzahl der Metastasen korreliert signifikant mit der Wachstumsdauer der Tumore in beiden Versuchsgruppen. Die Abbildungen a) und c) stellen hierbei die Ergebnisse für die Kontrolltiere dar, b) und d) für die Tiere mit den Knockdownzellen.

Die Tumorgröße korreliert sowohl bei den Tieren, die die Kontrollzellen injiziert bekommen haben, als auch bei den Tieren, die die Knockdownzellen injiziert bekommen haben, signifikant mit der Wachstumsdauer der Tumore, d. h. je länger der Tumor wächst, desto größer wird er ( $p = 0,0228$  bzw.  $p = 0,0044$ ). Auch die Anzahl der Metastasen, die im HE-Schnitt sichtbar sind, korreliert sowohl bei den Tieren, die die Kontrolltumore trugen, als auch bei den Tieren mit den Knockdowntumoren positiv mit der Wachstumsdauer, d. h. je länger der Tumor wächst, desto mehr Metastasen sind in der Lunge zu finden ( $p = 0,0041$  bzw.  $p = 0,0081$ ) (vgl. Abbildung 3.11.).



**Abbildung 3.12.: Korrelationen der Wachstumsdauer 2.** Korrelation der Wachstumsdauer mit der Anzahl der Zellen im Blut. Dargestellt ist die Korrelation der Anzahl der Zellen im Blut, die in der ALU- PCR nachgewiesen werden können, mit der Wachstumsdauer der Tumore. Diese ist bei den Tieren, die die Knockdownzellen injiziert bekommen hatten, signifikant.

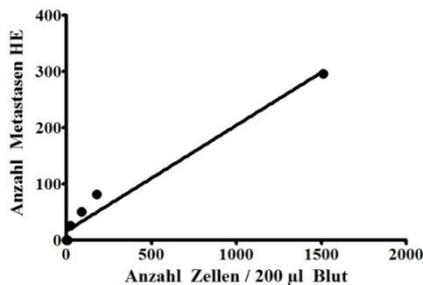
Die Anzahl der Zellen, die im Blutstrom überleben, korreliert bei den Knockdownzellen signifikant mit der Wachstumsdauer des Tumors ( $p = 0,0067$ ) (vgl. Abbildung 3.12.). Da auch die Tumorgöße Einfluss auf zirkulierende Tumorzellen und Metastasen haben könnte, wurden diese Parameter ebenfalls korreliert.



**Abbildung 3.13.: Korrelation des Tumorgewichts.** Dargestellt ist die Anzahl der Metastasen im HE- Schnitt gegen das Tumorgewicht. Dies ist sowohl in a) den Kontrolltieren als auch in b) den Tieren der Knockdowngruppe signifikant positiv korreliert.

Die Anzahl der Metastasen, die in den HE- Schnitten der Lungen auftreten, korreliert positiv mit der Größe des Tumors (vgl. Abbildung 3.13.), d. h. je größer der Tumor ist, desto mehr Metastasen sind in der Lunge zu finden. Dieser Zusammenhang ist sowohl für die Kontrollgruppe, als auch für die Tiere, die die Knockdownzellen injiziert bekamen statistisch signifikant ( $p = 0,0148$  bzw.  $p = 0,0028$ ). Nicht nur die Größe des Tumors, sondern auch die Anzahl der Tumorzellen, die im Blut zirkulieren, kann eine Auswirkung auf die Entstehung von Metastasen haben. Deswegen wurde die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen mit der

Anzahl der Metastasen im HE- Schnitt, bzw. der Anzahl der in der ALU- PCR nachweisbaren Zellen in der Lunge und dem Knochenmark korreliert.

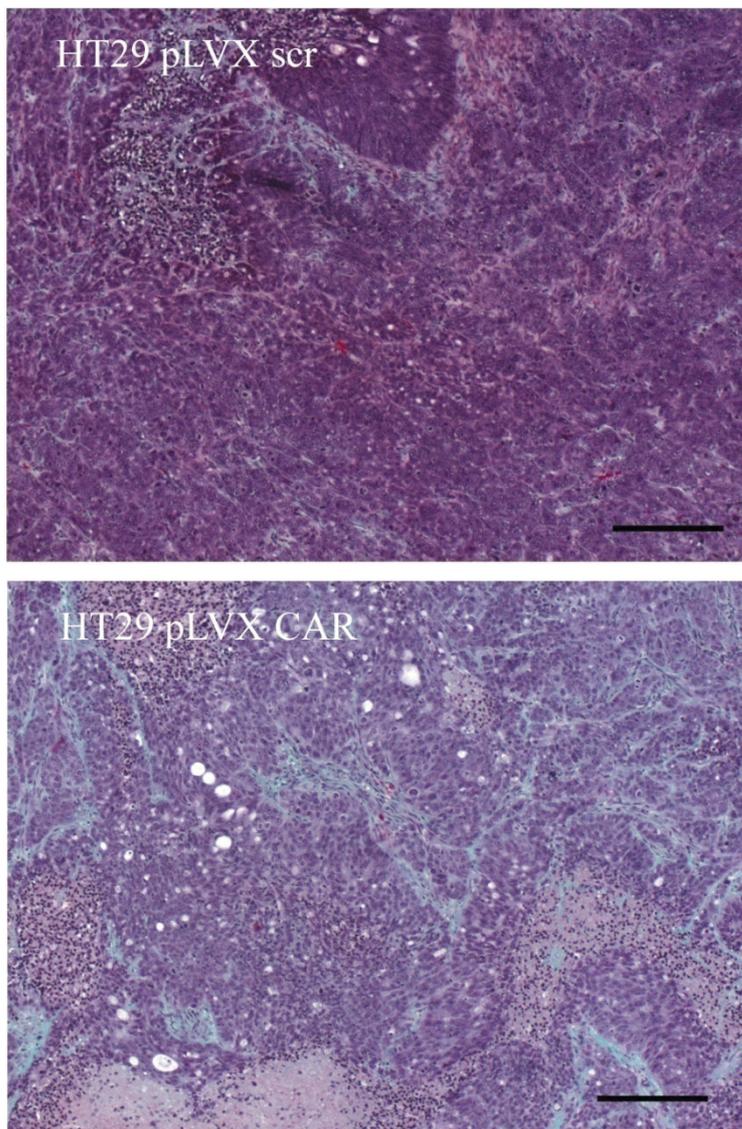


**Abbildung 3.14.: Korrelation der Tumorzellen im Blut.** Dargestellt ist die Anzahl der Metastasen im HE- Schnitt gegen die Anzahl der Zellen im Blut der Tiere, die die Knockdownzellen injiziert bekommen haben. Es besteht ein signifikanter, positiver Zusammenhang bei den Tieren, die die Knockdownzellen injiziert bekommen haben.

Die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen, die in der ALU- PCR im Blut nachgewiesen werden, korreliert bei den Tieren, die die HT29 pLVX CAR- Zellen injiziert bekommen haben positiv mit den Metastasen (vgl. Abbildung 3.14.), die im HE- Schnitt gefunden werden, d. h. je mehr Tumorzellen im Blut der Tiere zirkulieren, desto mehr Metastasen sind im HE- Schnitt zu finden ( $p = 0,0028$ ).

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Überleben der Tiere unabhängig von der CAR- Expression in den Zellen ist, wenn man die Tiere ohne Tumor nicht berücksichtigt, da sie nicht als erkrankt gewertet werden konnten. Auch hat die CAR- Expression keinen Einfluss auf das Wachstum des Tumors. Allerdings nimmt mit dem CAR- Knockdown in den injizierten Zellen die Anzahl der Lungenmetastasen ab, obwohl die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen sich nicht unterscheidet. Auch die Absiedlung der Tumorzellen im Knochenmark unterscheidet sich nicht zwischen den beiden Versuchsgruppen. In beiden Versuchsgruppen kann man einen Zusammenhang zwischen der Dauer des Tumorwachstums und der Tumorgöße bzw. der Anzahl der Metastasen in der Lungen nachweisen. Auch lässt sich eine Tendenz zu mehr zirkulierenden Tumorzellen mit zunehmender Wachstumsdauer in der Knockdowngruppe erkennen. Die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen hat einen Einfluss auf die Anzahl der Metastasen im HE- Schnitt. Zudem ist die Anzahl der Metastasen in der Lunge abhängig von dem Tumorgewicht.

### 3.1.4. Masson- Goldner- Färbung



**Abbildung 3.15.: Masson- Goldner- Färbung der HT29- Tumore.** Dargestellt sind Aufnahmen jeweils eines Schnittes des HT29 pLVX scr- und HT29 pLVX CAR- Tumors. Man sieht in beiden Tumoren geringe Anteile an Kollagen (grün). Es gibt jedoch keinen Unterschied zwischen den Kontroll- und Knockdowntumoren. Die Länge des Maßstabs beträgt 200  $\mu$ m.

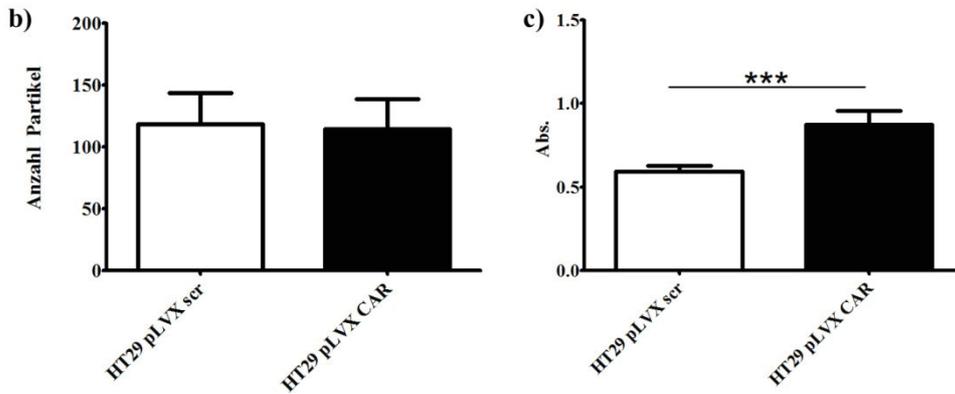
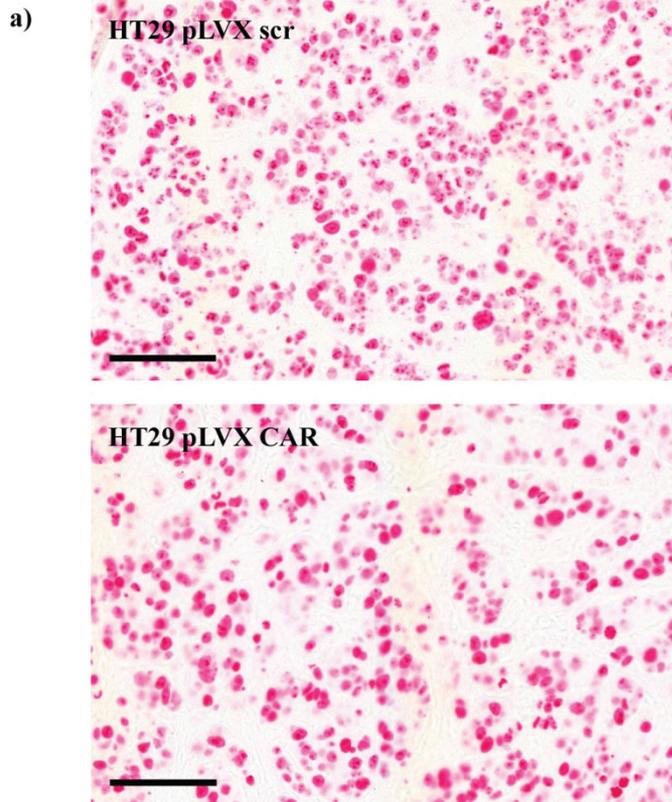
Schaut man sich die nach Masson- Goldner gefärbten Tumore an, sieht man, dass sowohl in den Knockdowntumoren als auch in den Kontrolltumoren hauptsächlich Zellen zu sehen sind, zwischen denen dünne, grün angefärbte Kollagenfasern sichtbar sind (vgl. Abbildung 3.15.). Der Knockdown hat keine Auswirkung auf die bindegewebige Struktur des Tumors.

### 3.1.5. Proliferation

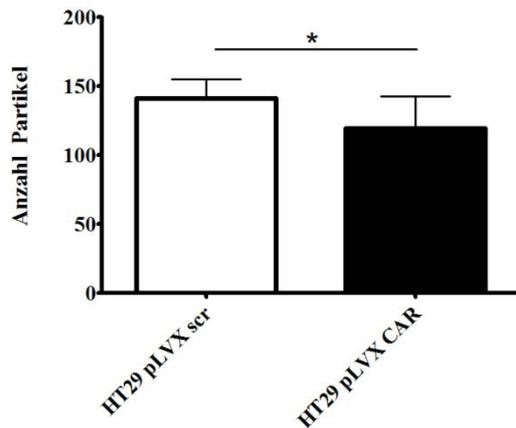
Um die Auswirkung des Knockdowns von CAR auf das Zellwachstum *in vitro* zu untersuchen wurde ein XTT- Versuch durchgeführt. Zudem wurde die Zellproliferation *in vivo* mittels des Proliferationsmarkers Ki67 an Xenografttumoren aus dem Endpunktversuch nachgewiesen (vgl. Abbildung 3.16.).

Misst man die Proliferation der HT29- Zelllinien *in vitro* im XXT- Versuch, so liegt die Absorption der HT29 pLVX scr- Zellen im Mittel bei 0,6, die der HT29 pLVX CAR- Zellen bei 1,04. Dies ist eine Zunahme der Proliferation auf 170 % der Kontrollzellen durch den CAR- Knockdown. Injiziert man die Zellen in Mäuse, entnimmt die entstandenen Tumore und färbt Paraffinschnitte dieser Tumore mit einem Antikörper gegen Ki67, so sieht man, dass im Endpunktversuch bei den HT29 pLVX scr- Zellen im Mittel 118,7 Zellen Ki67 positiv sind, bei den HT29 pLVX CAR- Zellen 114,2. Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,75$ ).

Bei dem Versuch mit der Überlebenskurve sieht man, dass es in den Tumoren der HT29 pLVX scr- und HT29 pLVX CAR- Zellen mit 140,8 bzw. 119,5 Ki67 positiven Zellen statistisch signifikanten Unterschied gibt ( $p = 0,0381$ ) von proliferierenden Zellen gibt (vgl. Abbildung 3.17.).



**Abbildung 3.16.: Proliferation von HT29- Zellen *in vivo* und *in vitro*.** a) Ausschnitt aus je einem Ki67 gefärbten Schnitt eines Xenograftumors aus HT29 pLVX scr- und HT29 pLVX CAR- Zellen (Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m). b) Quantitative Auswertung der Ki67- Färbung an Xenograftumoren. c) *In vitro* Proliferation der HT29 pLVX scr- und HT29 pLVX CAR- Zellen mittels XTT- Untersuchung. *In vitro* nimmt die Proliferation der Zellen nach CAR- Knockdown zu, *in vivo* ist jedoch kein Unterschied zu sehen. \*: p = 0,01 bis p = 0,05; \*\*: p = 0,001 bis p = 0,01; \*\*\*: p <0,001



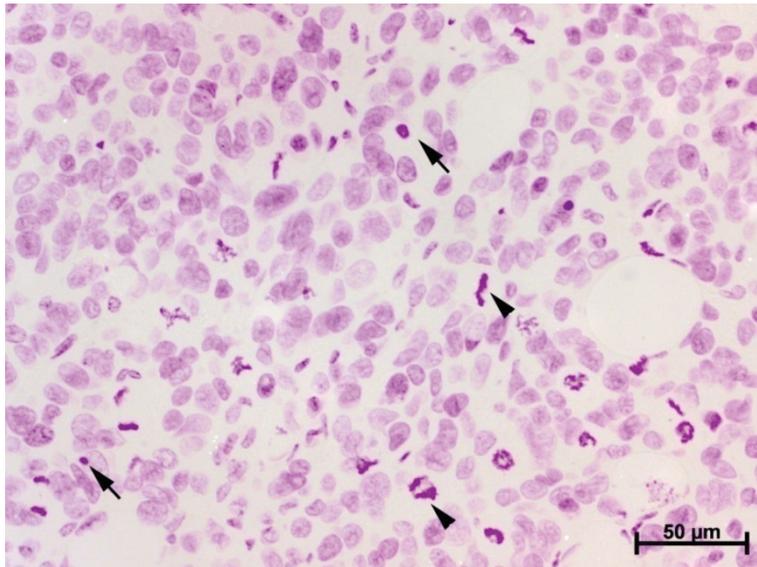
**Abbildung 3.17.: Proliferation *ex vivo* der HT29- Tumore.** Dargestellt ist die Auswertung der Ki67 positiven Zellen in den explantierten Tumoren des Überlebensversuchs. Die HT29 pLVX scr Tumore weisen signifikant mehr proliferierende Zellen auf als die Knockdowntumore.

### 3.1.6. Mitose und Apoptose

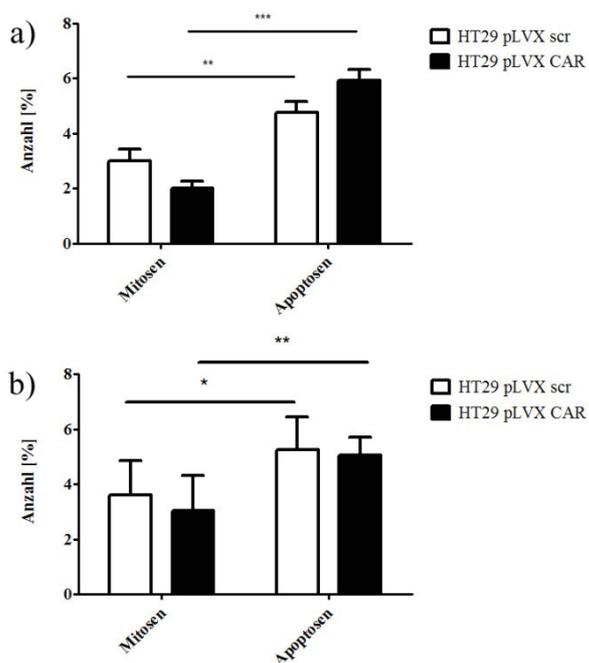
Um die unterschiedlichen Befunde aus der Ki67- Färbung (vgl. Abbildungen 3.16. und 3.17.), die keinen Unterschied zwischen der Proliferation in den Tumoren der Kontroll- und der Knockdowngruppe im Endpunktversuch sehr wohl jedoch in dem Versuch mit dem Überleben erkennen ließen, zu klären, wurden die Tumore mit Feulgen gefärbt, wodurch sich die typischerweise in Tumoren zusammen auftretenden Mitosen und Apoptosen (vgl. Abbildung 3.18.) unterscheiden lassen.

Wie man in Abbildung 3.19. deutlich sehen kann, gibt es in beiden Tierversuchen zwischen den Mitosen und Apoptosen keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Im Endpunktversuch liegt der Anteil der Mitosen bei den Kontrollzellen bei 3 %, bei den Knockdownzellen bei 2,02 % ( $p = 0,0573$ ), der apoptotische Anteil liegt bei 4,75 % bzw. 5,9 % ( $p = 0,0572$ ). Im Versuch mit der Überlebenskurve liegt der Anteil der mitotischen Zellen mit 3,62 % bei den Tumoren der Kontrollzellen und bei 3,05 % in den Tumoren der Knockdownzellen ( $p = 0,3821$ ) bzw. 5,25 % und 5,05 % apoptotische Zellen ( $p = 0,7017$ ) leicht höher als beim Endpunktversuch.

Vergleicht man jedoch die Mitosen und Apoptosen in den Gruppen, so sieht man, dass es signifikant mehr apoptotische Zellen als mitotische Zellen gibt (Endpunktversuch: HT29 pLVX scr- Tumore  $p = 0,0090$ ; HT29 pLVX CAR- Tumore  $p = > 0,0001$ ; Überleben: HT29 pLVX scr- Tumore  $p = 0,0272$ ; HT29 pLVX CAR- Tumore  $p = 0,0145$ ).



**Abbildung 3.18.: Feulgen- Färbung eines Xenografttumors.** Abgebildet ist die Feulgen- Färbung eines HT29 pLVX CAR- Xenografttumors. Die Pfeilköpfe weisen auf Mitosen, die Pfeile auf Apoptosen, welche typischer Weise nebeneinander im Tumor vorkommen.

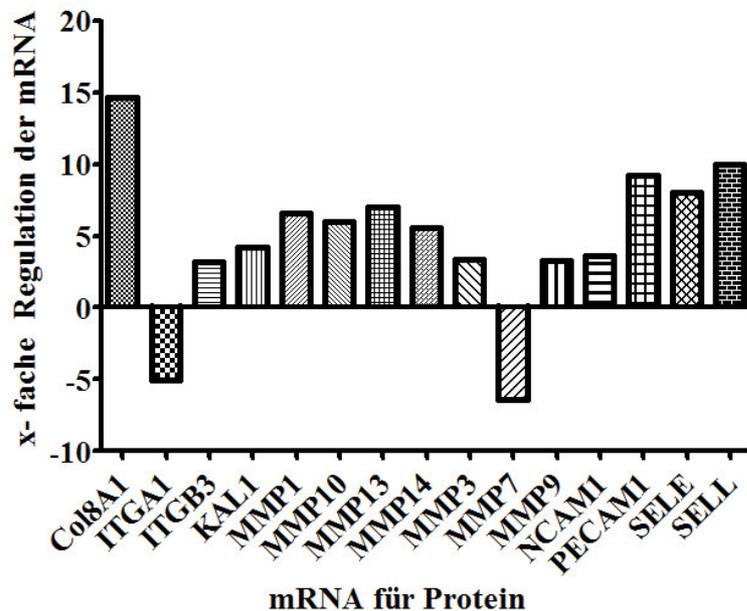


**Abbildung 3.19.: Auswertung der Feulgen-Färbung aufgeteilt nach Mitosen und Apoptosen.** Dargestellt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der Mitosen und Apoptosen in den Tumoren der beiden Versuchsgruppen. a) zeigt die Verteilung der Mitosen und Apoptosen für den Endpunktversuch, b) für den Versuch mit Überlebenskurve. Auffällig ist, dass es immer mehr Apoptosen als Mitosen gibt, der CAR-Knockdown jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl der Mitosen bzw. Apoptosen hat. \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

## 3.2. Die Rolle von CAR bei der Interaktion vom Primärtumor mit der extrazellulären Matrix

### 3.2.1. PCR-Array

Da davon auszugehen war, dass eine erzwungene Veränderung des CAR- Niveaus Auswirkungen auf verschiedene Zelladhäsionsproteine hat, wurde ein PCR Array von Qiagen durchgeführt, um sich einen Überblick über mögliche veränderte Adhäsionsmoleküle zu verschaffen. Hierfür wurden die DLD1 pLVX scr- Zellen als Nullwert genommen und die Veränderungen der DLD1 pLVX CAR- Zellen im Verhältnis zu den Kontrollzellen ermittelt.



**Abbildung 3.20.: Ergebnis des ECM- Arrays von Qiagen.** Dargestellt ist die Veränderung der Expression (y-Achse) gegen die Proteine, die mindestens 3- fach herauf oder herunterreguliert sind. Zu sehen ist eine Zunahme der meisten Adhäsionsproteine bzw. extrazellulären Matrixproteine. Lediglich Integrin  $\alpha 1$  und MMP7 nehmen ab.

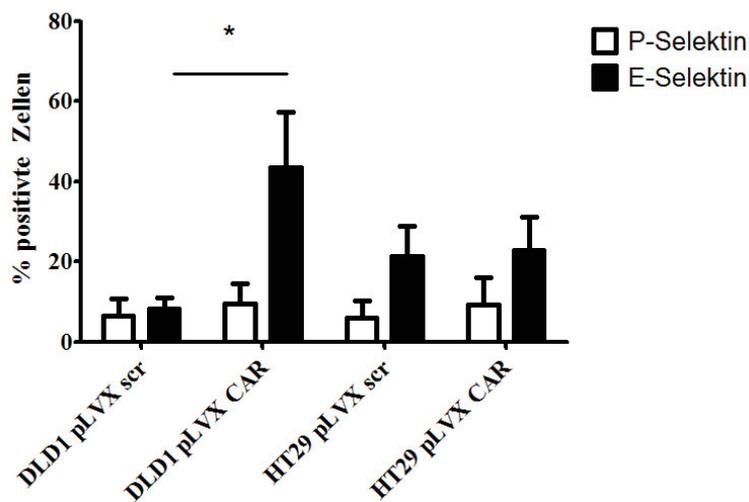
Die Analyse der extrazellulären Matrixproteine, bzw. der Adhäsionsmoleküle mit dem Array in den DLD1- Zellen zeigt eine Vielzahl von Proteinen, deren RNA mindestens dreifach herauf- oder herabreguliert werden, nachdem CAR durch die Transduktion mit dem Vektor herabreguliert wurde. Hierbei nimmt vor allem die Expression von Matrixmetalloproteinasen um das drei bis siebenfache zu, aber auch Integrin  $\beta 3$ , sowie E- Selektin werden drei- bzw. achtfach stärker exprimiert. MMP7 und Integrin  $\alpha 1$  werden fünf- bzw. sechsfach herab reguliert (vgl. Abbildung 3.20.).

### 3.2.2. Expression von Oberflächenproteinen auf transfizierten Zelllinien

Da die Oberflächenproteine auf den Tumorzellen eine große Bedeutung bei der Metastasierung im Zuge der Anheftung ans Endothel als auch für die Signalweiterleitung haben, wurden Proteine, die bekanntlich bei der Adhäsionskaskade eine große Rolle spielen, in der Durchflusszytometrie bestimmt.

#### 3.2.2.1. Selektinliganden

Selektine spielen vor allem bei der initialen Bindung von Tumorzellen an das Endothel eine Rolle und vermitteln die lockere Adhäsion, das sogenannte Tethering. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie soll überprüft werden, ob es eine Regulation der Selektinliganden auf der Zelloberfläche gibt.



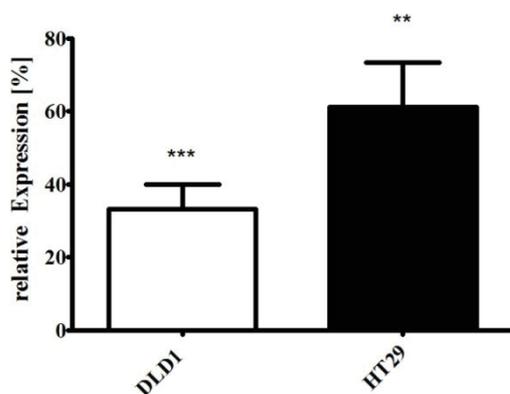
**Abbildung 3.21.: Anzahl für Selektinliganden- positive Zellen.** Die P- Selektin- Chimäre wird von allen Zellen kaum gebunden, wohingegen die E- Selektin- Chimäre von allen, mit Ausnahme der DLD1 pLVX scr- Zellen, etwas häufiger gebunden wird. Signifikant heraufreguliert ist die E- Selektinbindung bei den DLD1 pLVX CAR- Zellen im Vergleich zu den DLD1 pLVX scr- Zellen ( $p = 0,0127$ ). \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Deutlich zu sehen ist, dass P- Selektin nur von einer kleinen Subpopulation von Zellen gebunden wird (vgl. Abbildung 3.21.). Bei den DLD1 pLVX scr- Zellen binden nur 6,6 % der Zellen P- Selektin, nach CAR- Knockdown 9,5 % der Zellen ( $p = 0,4860$ ). Auch bei den HT29 pLVX scr- Zellen binden nur 6,0 % der Zellen P- Selektin, bei den HT29 pLVX CAR- Zellen sind es nur 9,3 % ( $p = 0,5222$ ). Der CAR- Knockdown hat also keinen Einfluss auf die Expression von P- Selektinliganden. Bei E- Selektin zeigt sich für HT29- Zellen ein ähnliches Bild: Bei den HT29 pLVX scr- Zellen binden 21,3 % der Zellen E- Selektin, bei den Knockdownzellen 22,8 % ( $p = 0,8231$ ).

Bei den DLD1- Zellen zeigt sich jedoch ein Einfluss des CAR- Knockdowns auf die Bindungsfähigkeit von E- Selektin. Hier liegt der Anteil der Zellen, die E- Selektin binden können, bei den Kontrollzellen bei 8,4 % und bei den Knockdownzellen bei 43,4 %, ist also nach CAR- Knockdown deutlich höher ( $p = 0,0127$ ).

### 3.2.2.2. CD44

CD44 spielt als Ligand von Hyaluronsäure eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit der Extrazellulären Matrix.



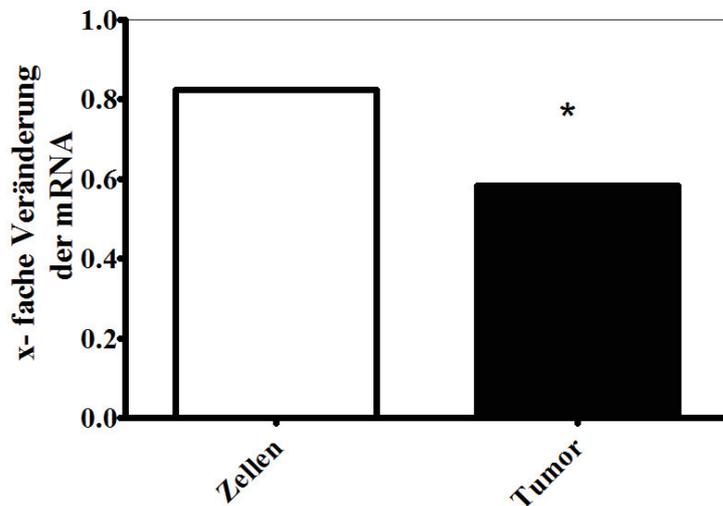
**Abbildung 3.22.: Relative Expression von CD44 auf der Oberfläche von Tumorzellen nach CAR-Knockdown.** Dargestellt ist die relative Expression von CD44 auf der Oberfläche von den Knockdownzellen relativ zu den Kontrollzellen (100 %) aus drei verschiedenen Messungen. Sowohl in DLD1- Zellen als auch in HT29- Zellen nimmt die Oberflächenexpression von CD44 nach CAR- Knockdown signifikant ab ( $p = 0,00006$  bzw.  $p = 0,005$ ). \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Nach CAR- Knockdown nimmt die CD44- Oberflächenexpression (vgl. Abbildung 3.22.) in DLD1- Zellen um 67 % signifikant ab ( $p = 0,00006$ ). Auch in HT29- Zellen wird die Oberflächenexpression von CD44 signifikant um 39 % im Vergleich zu den Kontrollzellen herabreguliert ( $p = 0,005$ ).

Die Ergebnisse wurden zudem noch auf mRNA- Ebene in der Next Generation Sequenzierung überprüft (vgl. Abbildung 3.23.). Die Herabregulation von CD44 ist also sowohl auf Ebene der mRNA als auch auf Proteinebene nachweisbar.

Die Ergebnisse der Next Generation Sequenzierung zeigen, dass die CD44 mRNA in den CAR- Knockdownzellen um 18 % im Vergleich mit den HT29 pLVX scr- Zellen reduziert ist. Auch im Tumor beobachtet man in den Tumoren, die aus den HT29 pLVX CAR- Zellen wuchsen, eine Reduktion der mRNA für CD44 um 42 % im Vergleich zu den Tumoren, die aus den HT29 pLVX scr- Zellen gewachsen sind. Die Regulation ist hierbei bei den Zellen

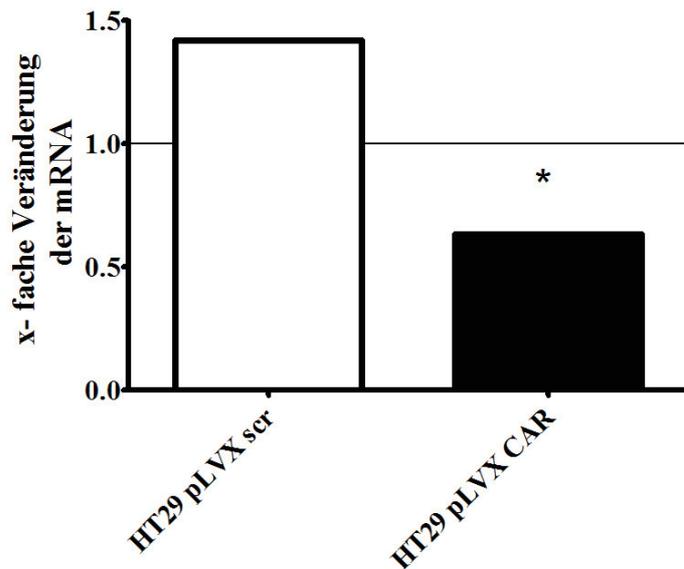
nicht signifikant ( $p_{adj} = 0,33$ ). In den Tumoren handelt es sich um statistisch unterschiedlich exprimierte mRNA ( $p_{adj} = 6,0 * 10^{-5}$ ).



**Abbildung 3.23.: Ergebnis des Next Generation Sequenzierung für CD44- mRNA.** Dargestellt ist in weiß die x- fache Veränderung der CD44- mRNA der HT29 pLVX CAR- Zellen im Vergleich zu den HT29 pLVX scr- Zellen, in schwarz die Veränderung der CD44- mRNA in den HT29 pLVX CAR- Tumoren im Vergleich zu den HT29 pLVX scr- Tumoren. In den Zellen ist in den HT29 pLVX CAR- Zellen 18 % weniger CAR mRNA detektierbar als in den Kontrollzellen, bei den Tumoren sogar 42 % weniger CAR in den Tumoren, die aus den Knockdownzellen gewachsen sind. \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Da die Zellen in der Zellkultur in einem Monolayer wachsen und nicht wie *in vivo* dreidimensional und mit der natürlichen Umgebung, wurde zudem die Veränderung der mRNA der Zellen mit der mRNA der entsprechenden Tumore verglichen (vgl. Abbildung 3.24.).

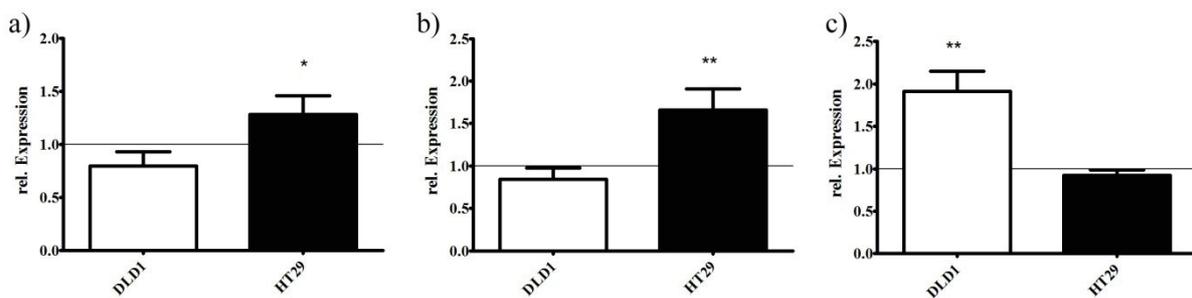
In den HT29 pLVX scr- Zellen wird, nachdem sie als Tumor aus den SCID- Mäusen entnommen wurden, die mRNA von CD44 auf das 1,4- fache des Niveaus in den HT29 pLVX scr- Zellen der Zellkultur heraufreguliert. Diese Regulation ist jedoch nicht signifikant ( $p_{adj} = 0,13$ ). Bei den HT29 pLVX CAR- Tumoren ist die mRNA im Vergleich zu den HT29 pLVX- Zellen der Zellkultur statistisch signifikant herabreguliert auf 63 % des Niveaus der Knockdownzellen ( $p_{adj} = 0,002$ ).



**Abbildung 3.24.: Ergebnis der Next Generation Sequenzierung der mRNA von CD44.** In weiß ist der Vergleich der regulierten mRNA für die Tumore, die aus den HT29 pLVX scr- Zellen entstanden sind im Vergleich mit den Zellen der Zellkultur, in schwarz der Vergleich der Knockdowntumore mit den Knockdownzellen. In den Tumoren der HT29 pLVX scr- Zellen ist die mRNA für CD44 im Vergleich zu den Zellen heraufreguliert, bei den Knockdowntumoren, im Vergleich zu den HT29 pLVX CAR- Zellen, herabreguliert. Die Regulation ist bei den Knockdowngruppen signifikant (padj = 0,002). \*: p = 0,01 bis p = 0,05; \*\*: p = 0,001 bis p = 0,01; \*\*\*: p <0,001.

### 3.2.2.3. Integrine

Als Vermittler der festeren Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel spielen Integrine eine wichtige funktionelle Rolle bei der Metastasierung.



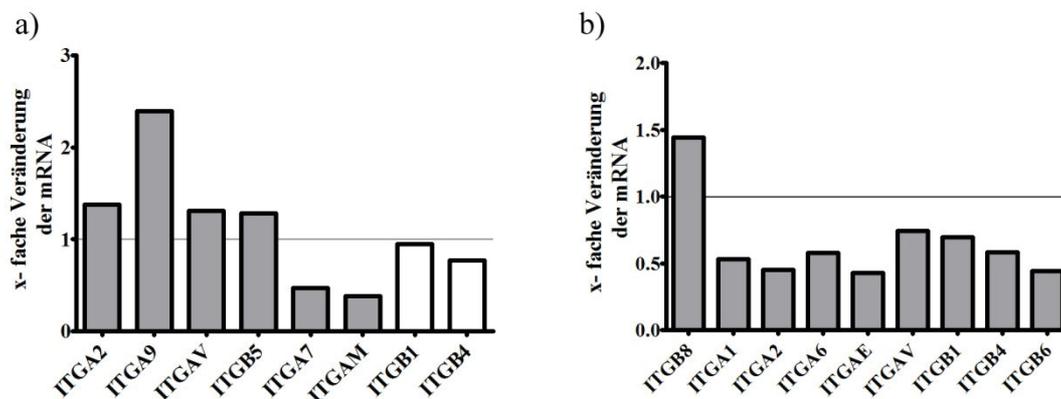
**Abbildung 3.25.: Expression von Integrinen auf den Tumorzelllinien.** Dargestellt ist die relative Expression der Integrine a)  $\alpha v$ , b)  $\beta 1$  und c)  $\beta 4$  in den pLVX CAR- Zellen in Relation zu den pLVX scr- Zellen. Die Expression der Integrine  $\alpha v$  und  $\beta 1$  nimmt in den HT29- Zellen nach CAR- Knockdown zu. Hierbei ist nur Integrin  $\beta 1$  signifikant heraufreguliert. Die Expression von Integrin  $\beta 4$  ist jedoch nur in den DLD1- Zellen signifikant heraufreguliert. Die schwarze Linie entspricht der zugrunde gelegten Expression der pLVX scr- Zellen, die auf 1 gesetzt wurde. \*: p = 0,01 bis p = 0,05; \*\*: p = 0,001 bis p = 0,01; \*\*\*: p <0,001.

Nach CAR- Knockdown nimmt die Expression von Integrin  $\alpha v$  in DLD1- Zellen leicht auf 80 % der Expression in den Kontrollzellen ab (p = 0,058). Bei den HT29- Zellen wird die

Expression von Integrin  $\alpha v$  nach CAR Knockdown um 20 % heraufreguliert ( $p = 0,39$ ). Die Expression von Integrin  $\beta 1$  nimmt in den DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown leicht, aber nicht signifikant auf 84 % der Expression der Kontrollzellen ab ( $p = 0,11$ ). In den HT29- Zellen erhöht sich die Expression von Integrin  $\beta 1$  nach CAR- Knockdown signifikant auf 166 % der Kontrollzellen ( $p = 0,009$ ). Bei Integrin  $\beta 4$  bietet sich das gegenteilige Bild von Integrin  $\beta 1$ . Hier nimmt die Expression bei den DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown signifikant auf 191 % der Expression der Kontrollzellen zu ( $p = 0,002$ ). Bei den HT29- Zellen lässt sich hingegen nur eine geringe Reduktion der Expression auf 92 % der Expression der Kontrollzellen feststellen ( $p = 0,09$ ) (vgl. Abbildung 3.25.).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die HT29- Zellen nach CAR- Knockdown Integrin  $\beta 1$  und Integrin  $\alpha v$  heraufregulieren, die DLD1- Zellen Integrin  $\beta 4$ .

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden per Next Generation Sequenzierung überprüft (vgl. Abbildung 3.26.) und um signifikant differentiell regulierte mRNAs von Integrinen erweitert, die nicht in der Durchflusszytometrie gemessen wurden.



**Abbildung 3.26.: Ergebnis der Next Generation Sequenzierung für Integrin- mRNA.** Dargestellt sind in a) regulierte Gene der HT29 pLVX CAR- Zellen im Vergleich zu den HT29 pLVX scr- Zellen, in b) die Regulation in den aus HT29 pLVX CAR- Zellen entstandenen Tumoren im Vergleich zu den Tumoren, die aus den HT29 pLVX scr- Zellen gewachsen sind. In grau sind die signifikant unterschiedlich exprimierten mRNAs dargestellt, in weiß nicht signifikant unterschiedlich exprimierte mRNAs. In den Zellen sind die mRNAs von Integrin  $\alpha 2$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha v$  und  $\beta 5$  signifikant heraufreguliert und mRNA von Integrin  $\alpha 7$  und  $\alpha M$  signifikant herabreguliert. Integrin  $\beta 1$  und  $4$  sind nicht signifikant differentiell herabreguliert. Bei den Tumoren ist die mRNA von Integrin  $\beta 8$  signifikant heraufreguliert. Die mRNA der Integrine  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha E$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  und  $\beta 6$  sind signifikant herabreguliert. Die Linie entspricht der zugrunde gelegten Expression der pLVX scr- Zellen, die auf 1 gesetzt wurde.

In den HT29 pLVX CAR- Zellen waren im Vergleich zu den HT29 pLVX scr- Zellen mehrere mRNAs für Integrine signifikant differentiell reguliert. Die mRNA von Integrin  $\alpha 2$

ist in den HT29 pLVX CAR- Zellen signifikant auf 140 % der mRNA aus den HT29 pLVX scr- Zellen erhöht (padj = 0,07). Auch bei Integrin  $\alpha 9$  lässt sich eine signifikante Heraufregulation der mRNA auf 240 % der Kontrollzellen beobachten (padj = 0,004). Ähnlich verhält sich die signifikante Heraufregulation der mRNA von Integrin  $\alpha v$  und Integrin  $\beta 5$  auf jeweils 130 % der Kontrollzellen (padj = 0,08 bzw. padj = 0,07). Im Gegensatz zu den mRNAs dieser Integrine sind die mRNAs der Integrine  $\alpha 7$  und  $\alpha M$  signifikant um 50 % bzw. 60 % der mRNA der Kontrollzellen signifikant reduziert (padj = 0,02 bzw. padj = 0,01). Die Ergebnisse für die differentielle Regulation für die in der Durchflusszytometrie ebenfalls gemessenen Proteinlevel waren in der Next Generation Sequenzierung nicht signifikant. Die mRNA für Integrin  $\beta 1$  war um 10 % in den HT29 pLVX CAR- Zellen im Vergleich zu den HT29 pLVX scr- Zellen reduziert (padj = 0,87), die mRNA von Integrin  $\beta 4$  um 20 % (padj = 0,18). Die Next Generation Sequenzierung stützt also die Heraufregulation von Integrin  $\alpha v$  auf Proteinlevel in der Durchflusszytometrie. Integrin  $\beta 1$  ist nach CAR- Knockdown auf Proteinebene signifikant heraufreguliert. Auf mRNA- Ebene lässt sich eine tendenzielle, wenn auch nicht signifikante Verringerung der mRNA verzeichnen.

Bei Integrin  $\beta 4$  ist auf der Proteinebene nach CAR- Knockdown eine leichte, aber nicht statistisch signifikante Verringerung zu sehen, welche auch auf mRNA- Ebene zu sehen ist, die aber ebenfalls keine statistische Signifikanz erreicht.

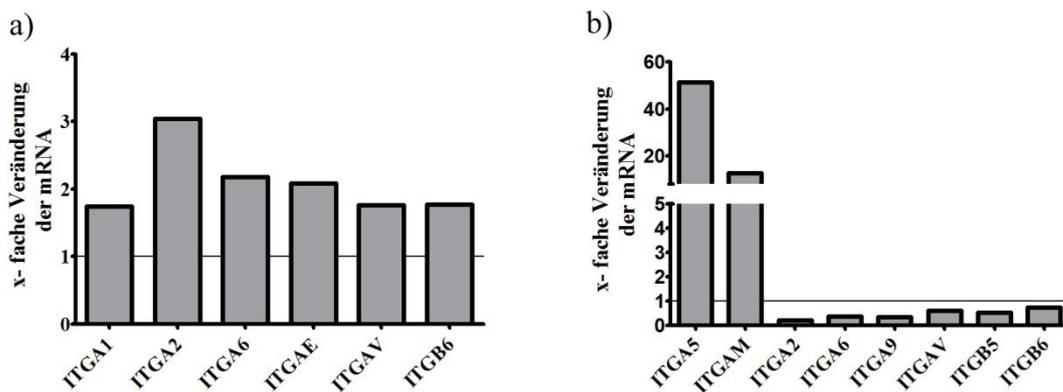
Neben den Zellen wurden auch Tumore, die aus den Kontroll- bzw. Knockdownzellen im Xenograftmodell entstanden sind, in der Next Generation Sequenzierung verwendet, um die Regulation *in vivo* zu analysieren (vgl. Abbildung 3.27.). Hierbei zeigt sich bei der Regulation der mRNA in den Tumoren ein ganz anderes Bild der signifikant differentiell exprimierten mRNAs. In den Tumoren ist nur die mRNA von Integrin  $\beta 8$  signifikant auf 140 % der Kontrolltumore herauf reguliert (padj = 0,07). Die mRNA von Integrin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha E$  und  $\beta 6$  sind signifikant um 50 % bzw. 40 %, 60 % und 60 % der mRNA in den Kontrolltumoren reduziert. Diese signifikant differentiell regulierten Integrin mRNAs sind in den HT29- Zellen nicht unter den signifikant differentiell regulierten mRNAs zu finden. Die mRNA von Integrin  $\alpha 2$ , welche in den Zellen heraufreguliert ist, ist in den Knockdowntumoren signifikant um 50 % des Levels der Kontrolltumore herabreguliert (padj =  $3,8 * 10^8$ ). Auch die mRNA von Integrin  $\alpha v$ , welche in den HT29- Zellen nach CAR Knockdown signifikant heraufreguliert ist, ist in den Tumoren, die aus den Knockdownzellen gewachsen sind, signifikant herabreguliert (padj = 0,04).

Integrin  $\beta 1$  und  $\beta 4$  sind in den HT29- Zellen auf mRNA Ebene um 10 % bzw. 20 % des Levels der Kontrollzellen reduziert, was nicht signifikant ist. In den Kontrolltumoren sind

Integrin  $\beta 1$  und  $\beta 4$  um 30 % bzw. 40 % auf mRNA- Ebene im Vergleich zu den Kontrolltumoren signifikant reduziert (padj = 0,01 bzw. padj = 0,0002).

Den in der Zellkultur wachsende Zellen fehlt die Möglichkeit des dreidimensionalen Wachstums. Deswegen ist es interessant, auch die differentiell regulierte mRNA von Zellen aus der Zellkultur mit denen aus dem Tumor zu vergleichen.

Wachsen die HT29 pLVX scr- Zellen subkutan in SCID- Mäusen, so ist auffällig, dass die mRNA der Integrine, die signifikant differentiell reguliert sind, alle heraufreguliert sind (vgl. Abbildung 3.27. a)). Die mRNA der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  ist in den Kontrolltumoren im Vergleich zu den Kontrollzellen um das 1,74- fache bzw. das dreifache erhöht (padj = 0,07 bzw. padj =  $5,9 \cdot 10^{-9}$ ). Auch die mRNA der Integrine  $\alpha 6$  und  $\alpha E$  ist verdoppelt (padj =  $8,3 \cdot 10^{-6}$  bzw. padj = 0,04). Zudem ist die mRNA der Integrine  $\alpha v$  und  $\beta 6$  um das jeweils um das 1,7- fache erhöht (padj = 0,003 bzw. padj = 0,01).



**Abbildung 3.27.: Ergebnisse der Next Generation Sequenzierung für die mRNA der Integrine.** Dargestellt sind die signifikant differentiell regulierten mRNAs von Integrienen in den Primärtumoren in der Maus verglichen mit den in der Kultur gewachsenen Zellen. Als Nullwert wurden jeweils die in der Kultur gewachsenen Zellen verwendet. a) zeigt die differentiell regulierten mRNAs in den Kontrollgruppen, b) die regulierten mRNAs in den Knockdowngruppen. Zu sehen ist, dass bei der Kontrollgruppe, im Vergleich zu den Zellen, in den Tumoren die mRNA der Integrine, die signifikant differentiell reguliert sind, heraufreguliert ist. Bei den Knockdowngruppen ist in den Tumoren die mRNA der Integrine, bis auf Integrin  $\alpha 5$  und  $\alpha M$ , welche stark vermehrt exprimiert werden, herabreguliert. Die Linie entspricht der zugrunde gelegten Expression der pLVX scr- Zellen, die auf 1 gesetzt wurde.

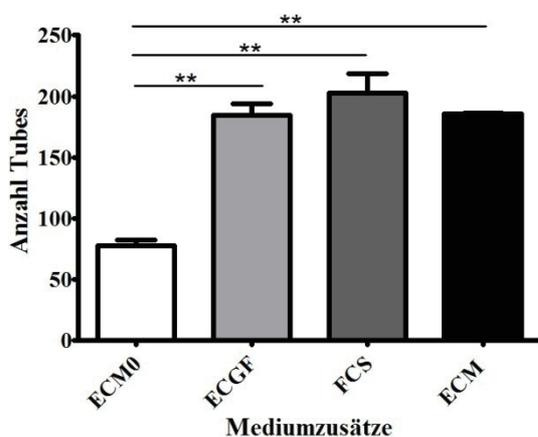
Im Gegensatz zu den Kontrollzellen ist in den Knockdownzellen, nachdem sie in SCID- Mäusen in einer dreidimensionalen Umgebung gewachsen sind, nur bei zwei Integrienen eine Heraufregulation der mRNA zu sehen. Alle anderen signifikant differentiell regulierten mRNAs sind herabreguliert (vgl. Abbildung 3.27. b)). Die mRNA der Integrine  $\alpha 5$  und  $\alpha M$  ist

nach Wachstum im Tier in den Knockdowntumoren im Vergleich zu den Knockdownzellen sehr stark heraufreguliert. Die mRNA von Integrin  $\alpha 5$  ist um das 51- fache erhöht (padj=  $3,8 * 10^{-15}$ ), die mRNA von Integrin  $\alpha M$  um das 12,5- fache (padj =  $1,9 * 10^{-15}$ ). Die mRNA der Integrine  $\alpha 9$  und  $\beta 5$  ist im Vergleich zu den Knockdownzellen im Knockdowntumor um 65 % bzw. 46 % reduziert (padj = 0,004 bzw. padj =  $1,6 * 10^{-10}$ ). Die mRNA der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  und  $\beta 6$ , die bei den Kontrolltumoren im Vergleich zu den Kontrollzellen heraufreguliert waren, ist in den Knockdowntumoren im Vergleich zu den Knockdownzellen um 78 %, bzw. 62 %, 38 % und 26 % signifikant reduziert (padj =  $3 * 10^{-22}$  bzw. padj =  $2,7 * 10^{-25}$  bzw. padj = 0,0003 bzw. padj = 0,07).

Zusammenfassend regulieren die Kontrollzellen im dreidimensionalen Wachstum die mRNA der Integrine also eher herauf-, wohingegen die Knockdownzellen die Integrine eher herabregulieren. Auffällig ist, dass die mRNA der Integrine, die in den Tumoren der Kontrollzellen heraufreguliert sind, in den Knockdownzellen herabreguliert sind.

### 3.2.3. Angiogenese- Versuch

Um zu testen, ob Zellen Faktoren sezernieren, die eine Neubildung von Gefäßen fördern, wurden Angiogenese- Versuche mit HUVECs durchgeführt.

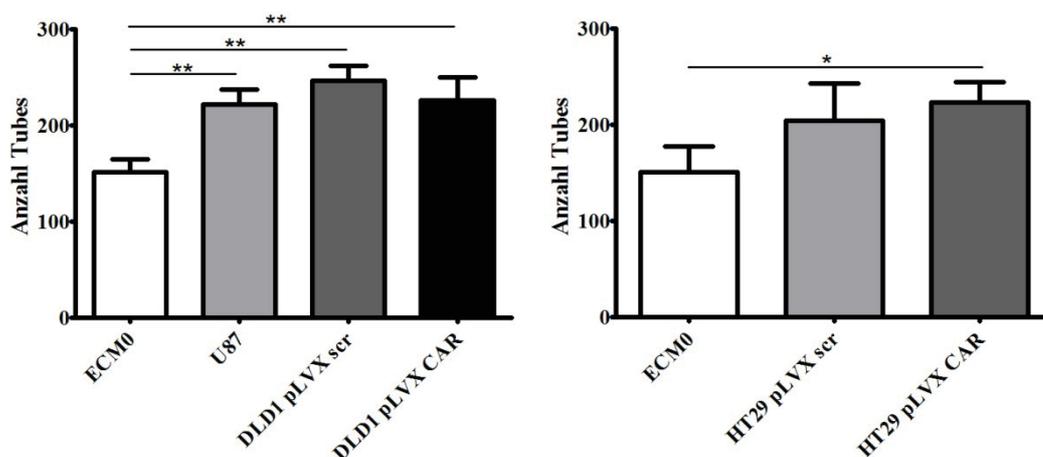


**Abbildung 3.28.: Einfluss verschiedener Mediumzusätze auf die Angiogenese.** Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der Tubes, die HUVECs bilden, wenn man den Versuch mit ECM- Medium ohne Zusätze (ECM0), nur mit ECGF oder FCS oder mit ECGF und FCS (ECM) durchführt. Sowohl ECGF, als auch FCS oder Vollmedium stimulieren die Bildung der Tubes. Deswegen wurde als Nullwert ECM- Medium ohne Zusätze gewählt (ECM0). \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Deutlich zu sehen ist, dass sowohl ECGF ( $p = 0,0047$ ) oder FCS ( $p = 0,0091$ ), die dem Medium zugesetzt wurden, als auch eine Mischung aus FCS und ECGF zu Vollmedium ( $p = 0,0011$ ) (ECM) kombiniert, die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen von HUVECs fördern

(vgl. Abbildung 3.28.). Deswegen wurde bei allen weiteren Versuchen ECM- Medium ohne Zusätze verwendet.

Humane U87- Gliomzellen sezernieren YKL - 40, ein Protein, das die Neubildung von Gefäßen fördert (vgl. Salamon *et al* 2014). Sie wurden zur Kontrolle verwendet. Ihr Mediumüberstand erhöht die Anzahl der Tubes, die von HUVECs gebildet wurden, von 151 im ECM0- Medium auf 221,3 Gefäße ( $p = 0,004$ ). Auch der Überstand der DLD1 pLVX scr- und DLD1 pLVX CAR- Zellen erhöht die Anzahl der Tubes signifikant auf 246 bzw. 225,6 ( $p = 0,0013$  bzw.  $p = 0,0095$ ).



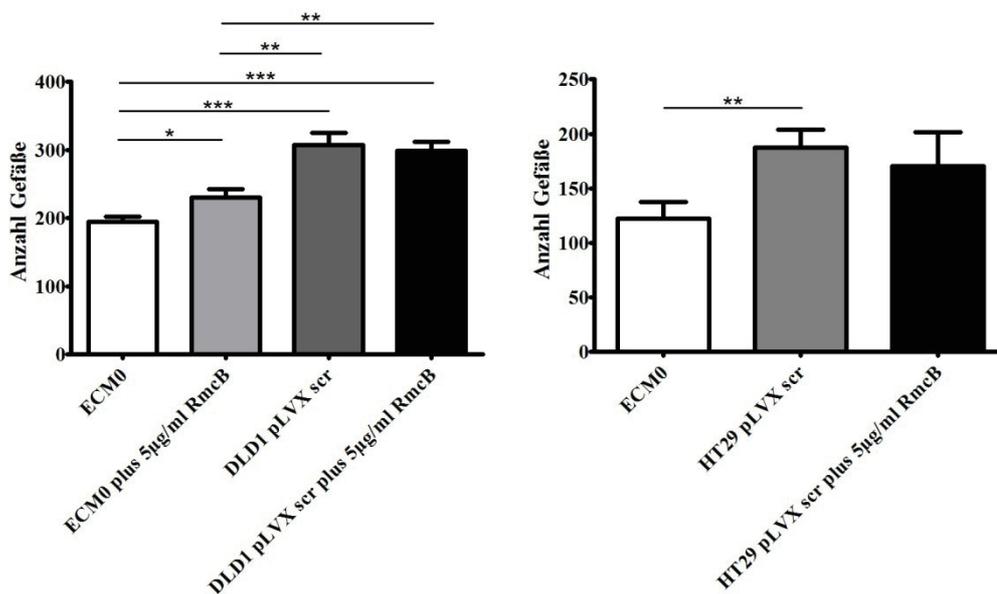
**Abbildung 3.29.: Angiogenese- Versuch mit Überständen von DLD1- und HT29- Zellen.** Dargestellt ist der Angiogenese- Versuch mit Überständen der DLD1 pLVX scr- bzw. DLD1 pLVX CAR- Zellen sowie U87- Zellen als Kontrolle bzw. HT29 pLVX scr- und HT29 pLVX CAR- Zellen. U87- Zellen dienten als Kontrolle, da sie Faktoren abgeben, die die Bildung von Tubes stimulieren sollen. Auch die Überstände der DLD1 pLVX scr- und DLD1 pLVX CAR- Zellen erhöht die Anzahl der Tubes signifikant, ebenso wie der Überstand der HT29 pLVX CAR- Zellen. Es können also alle Zelllinien, bis auf die HT29 pLVX scr- Zellen die Bildung von Tubes signifikant steigern. \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Der Überstand von HT29 pLVX scr- Zellen erhöht die Anzahl der Tubes nicht signifikant von im Mittel 151 in der ECM0 Kontrolle auf 204,3 ( $p = 0,12$ ). Der Überstand von den Knockdownzellen erhöht die Bildung von Tubes jedoch signifikant auf 223,3 ( $p = 0,0215$ ).

Weder in den DLD1- Zellen noch in den HT29- Zellen hat der CAR- Knockdown jedoch einen Einfluss auf die Fähigkeit die Angiogenese anzuregen ( $p = 0,2877$  bzw.  $p = 0,4972$ ), Zusammenfassend erhöht der Überstand aller Zellen die Bildung der Tubes, wobei dies bei den HT29 pLVX scr- Zellen nicht signifikant ist (vgl. Abbildung 3.29.).

Um auszuschließen, dass die beobachteten Resultate an dem Knockdown von CAR durch shRNA bedingt sind, wurde zusätzlich CAR mittels blockierendem RmcB- Antikörper auf den pLVX scr- Zellen zu verringern (vgl. Abbildung 3.30.). Deutlich zu sehen ist der Effekt

des blockierenden Antikörpers RmcB auf die Bildung der Tubes. Hier steigert sich die Anzahl der Tubes signifikant von im Mittel 195 in der ECM0- Kontrolle auf 230,6 Tubes ( $p = 0,0109$ ). Der Überstand der DLD1 pLVX scr- Zellen stimuliert die Tubebildung auf durchschnittlich 307 Tubes ( $p = 0,0005$ ). Auch die DLD1 pLVX scr- Zellen, in deren Medium beim konditionieren  $5 \mu\text{g} / \text{ml}$  RmcB- Antikörper gegeben wurde, stimulieren die Tubebildung auf 230,6 Tubes ( $p = 0,0003$ ). Die Wirkung des blockierenden Antikörpers zeigt also einen ähnlichen Effekt wie der Knockdown von CAR durch das shRNA- Konstrukt.



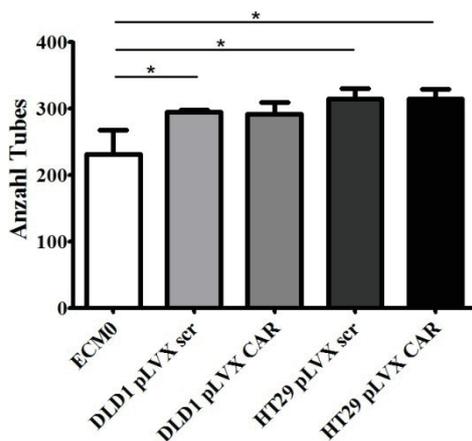
**Abbildung 3.30.: Angiogenese Versuch mit DLD1- Mediumüberstand und RmcB- Blockade.** Dargestellt ist der Versuch der Angiogenese mit HUVECs, welche mit ECM0- Medium plus dem blockierenden Antikörper RmcB inkubiert wurden, sowie mit Mediumüberstand der Kontrollzellen in ECM- Medium bzw. konditioniertes Medium der Kontrollzellen, bei denen im Medium während der Konditionierung  $5 \mu\text{g} / \text{ml}$  RmcB- Antikörper zugesetzt war. Der RmcB- Antikörper erhöht die Anzahl der Tubes signifikant, ebenso wie die Überstände der DLD1 pLVX scr- Zellen, die mit bzw. ohne RmcB- Antikörper im Medium konditioniert wurden. Zudem erhöhen die Überstände der DLD1 pLVX scr- Zellen mit und ohne RmcB- Antikörper im Medium die Anzahl der gebildeten Tubes signifikant mehr als der RmcB- Antikörper im ECM0- Medium. Die HT29- Zellen erhöhen ebenfalls im Vergleich zu dem ECM0- Medium die Anzahl der Tubes signifikant. Jedoch kann man keinen signifikanten Unterschied bei den HT29- oder DLD1 pLVX scr- Zellen mit oder ohne RmcB- Antikörper im Medium feststellen. \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Die Anregung der Tubebildung im Vergleich zu dem Medium, dem der RmcB- Antikörper beigemischt wurde ist jedoch nicht so stark, wie der Überstand der DLD1 pLVX scr- Zellen alleine oder mit dem RmcB- Antikörper zusammen ( $p = 0,0035$  bzw.  $p = 0,0029$ )

Auch bei den HT29- Zellen kann man eine Zunahme der Tubebildung beobachten. So steigt die Anzahl der Tubes von 122 in der ECM0 Kontrolle auf 187,3 wenn HUVECs mit dem

Überstand der HT29 pLVX scr- Zellen inkubiert wurden ( $p = 0,0074$ ). Auch der Überstand von HT29 pLVX scr- Zellen, welcher in Gegenwart von  $5 \mu\text{g/ml}$  RmcB konditioniert wurde, erhöht die Tubebildung auf 170,6 Tubes ( $p = 0,0721$ ). Es gibt jedoch keinen Unterschied zwischen der Inkubation der HUVECs mit Überstand in An- oder Abwesenheit des Antikörpers. Der Unterschied bei den DLD1- Zellen bzw. den HT29- Zellen mit und ohne RmcB- Antikörper im Medium ist jedoch nicht signifikant ( $p = 0,5546$  bzw.  $p = 0,4558$ ).

Da Tumore erst ab einer bestimmten Größe nicht mehr durch Diffusion mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden können, wurde getestet, ob die Tumorzellen erst unter hypoxischen Bedingungen Unterschiede in der Sekretion von Angiogenese fördernden Faktoren zeigen.

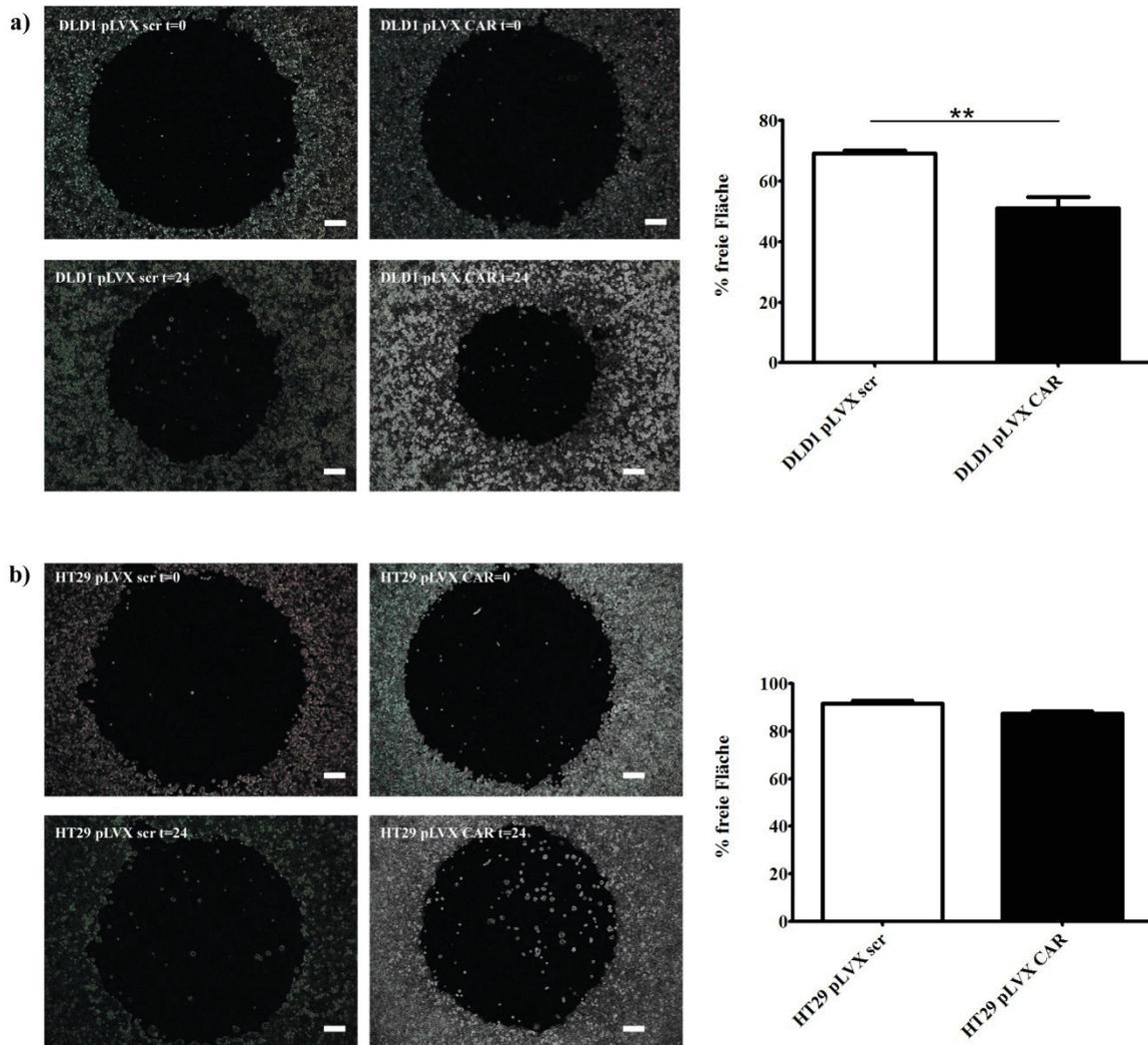


**Abbildung 3.31.: Angiogenese- Versuch unter hypoxischen Bedingungen.** Dargestellt ist der Angiogenese-Versuch mit HUVECs, die mit Medium von DLD1- bzw. HT29- Zellen inkubiert wurden, welches unter hypoxischen Bedingungen konditioniert wurde. Deutlich zu sehen ist die Zunahme der Anzahl der Tubes in allen Ansätzen, die bei den DLD1 pLVX scr-, HT29 pLVX scr- und HT29 pLVX CAR- Zellen signifikant ist. Es kommt also nicht nur unter normoxischen Bedingungen zu einer vermehrten Bildung von Tubes, sondern auch unter hypoxischen. \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Auch unter hypoxischen Bedingungen zeigen sich zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede (vgl. Abbildung 3.31.). In der Kontrolle mit ECM Medium sind 231,3 Tubes zu finden. Die DLD1 pLVX scr- Zellen erhöhen die Anzahl der Tubes signifikant auf 294,6 ( $p = 0,0395$ ), die DLD1 pLVX CAR- nicht signifikant auf 291,6 ( $p = 0,059$ ) Tubes. Die HT29 pLVX scr- Zellen erhöhen die Anzahl an Tubes statistisch signifikant auf 314,3 ( $p = 0,0221$ ) bzw. 314,3 ( $p = 0,0215$ ) bei den HT29 pLVX CAR- Zellen. Es zeigt sich also auch unter hypoxischen Bedingungen, dass Angiogenese induziert werden kann, wobei sich die Kontroll- und Knockdowngruppen der DLD1- und HT29- Zellen auch hier nicht voneinander unterscheiden ( $p = 0,7779$  bzw.  $p = 1$ ).

### 3.2.4. Migration

Um die Mobilität der Zellen zu testen wurde ein vertikales Migrationsassay durchgeführt. Hierbei wurde ermittelt, wie viel Fläche die Zellen nach 24 Stunden geschlossen haben.



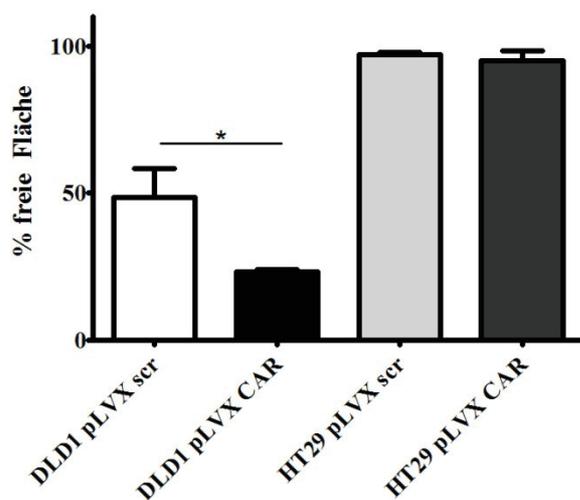
**Abbildung 3.32.: Vertikale Migration von Tumorzellen.** Gezeigt ist die Migration von a) DLD1- und b) HT29- Zellen im Migrationsversuch mit dem Platypus- Migrationssystem. Zu sehen sind jeweils die Kontrollzellen und die CAR- Knockdownzellen zum Zeitpunkt an dem der Stopfen gezogen wurde (t = 0) und nach 24 Stunden (t = 24). Zudem wurde die verbliebene freie Fläche ermittelt und grafisch dargestellt. Die Größe des Maßstabalkens beträgt 200  $\mu$ m. Deutlich zu sehen ist die erhöhte Migration der DLD1- Zellen nach CAR-Knockdown. Auch die HT29- Zellen migrieren etwas schneller nach CAR- Knockdown, haben jedoch generell ein geringeres migratorisches Potential als die DLD1- Zellen. \*: p = 0,01 bis p = 0,05; \*\*: p = 0,001 bis p = 0,01; \*\*\*: p <0,001.

Die DLD1 pLVX CAR- Zellen migrieren deutlich schneller als die Kontrolltransfektanten. Nach 24 Stunden haben die Zellen mit verringerter CAR- Expression fast 20 % mehr Fläche geschlossen als die Zellen, die einen normalen CAR- Level haben (p = 0,001). So ist bei den

DLD1 pLVX scr- Zellen noch 69 % der ursprünglichen freien Fläche unbewachsen, während es bei den DLD1 pLVX CAR- Zellen nur noch 51 % sind (vgl. 3.32a)).

Die HT29- Zellen migrieren im Vergleich zu den DLD1- Zellen kaum. Nach 24 Stunden sind knapp 8,5 % der ursprünglich freien Fläche von den HT29 pLVX scr- Zellen geschlossen worden. Die HT29 pLVX CAR- Zellen haben 12,5 % der zu Beginn freien Fläche geschlossen (vgl. Abbildung 3.32b)). Hierbei handelt es sich um einen deutlich geringeren Unterschied zwischen der Kontroll- und der Knockdowntransfektante als bei den DLD1- Zellen, jedoch ist auch dies ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0124$ ). Zusammenfassend kann man also sagen, dass die DLD1- Zellen insgesamt ein höheres migratorisches Potential aufweisen, als die HT29- Zellen, das durch den Knockdown von CAR noch weiter verstärkt wird.

Um Bedingungen zu schaffen, die näher an der *in vivo* Situation sind, wurden Näpfe einer 96-Napf-Platte mit Komponenten der extrazellulären Matrix beschichtet.

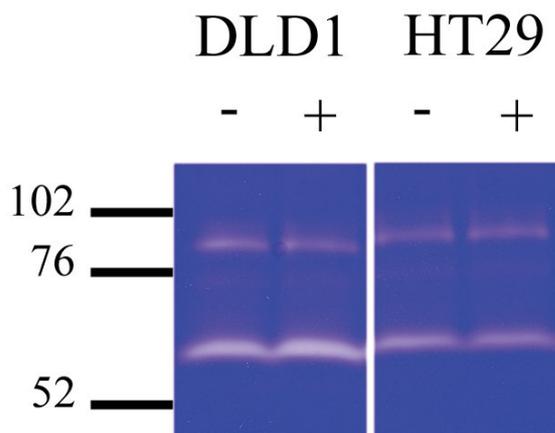


**Abbildung 3.33.: Migration von HT29- und DLD1- Zellen auf Matrigel.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der freien Fläche in einem 96er- Napf, der mit Komponenten der extrazellulären Matrix beschichtet wurde, nach 24 Stunden. Die DLD1- Zellen haben nach dem CAR- Knockdown eine erhöhte Mobilität, die HT29- Zellen wandern kaum. \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Nach der Beschichtung mit extrazelluläre Matrixproteinen haben die DLD1 pLVX scr- Zellen ca. 52 % Prozent der Fläche erschlossen, die DLD1 pLVX CAR- Zellen sogar 77 %. Die DLD1 pLVX CAR- Zellen migrieren somit signifikant schneller ( $p = 0,01$ ) als die Kontrollzellen. Die HT29 migrieren auch hier deutlich langsamer. Die HT29 pLVX scr- Zellen haben ca. 3 % geschlossen, die HT29 pLVX CAR- Zellen 5 %. An dem migratorischen Verhalten hat sich also durch den CAR- Knockdown in diesen Zellen auf Extrazellulärkomponenten nichts verändert ( $p = 0,33$ ) (vgl. Abbildung 3.33).

### 3.2.5. Gelatine- Zymografie

Um die Aktivität von Matrix Metalloproteinasen (Gelatinasen) MMP2 und MMP9 nachzuweisen, wurde eine Gelatine- Zymografie durchgeführt. Hierbei hinterlassen auch die Pro- Formen der Metalloproteinasen als Zeichen ihrer enzymatischen Aktivität helle proteinfreie Bereiche in Gelatine- haltigen SDS-Gelen.



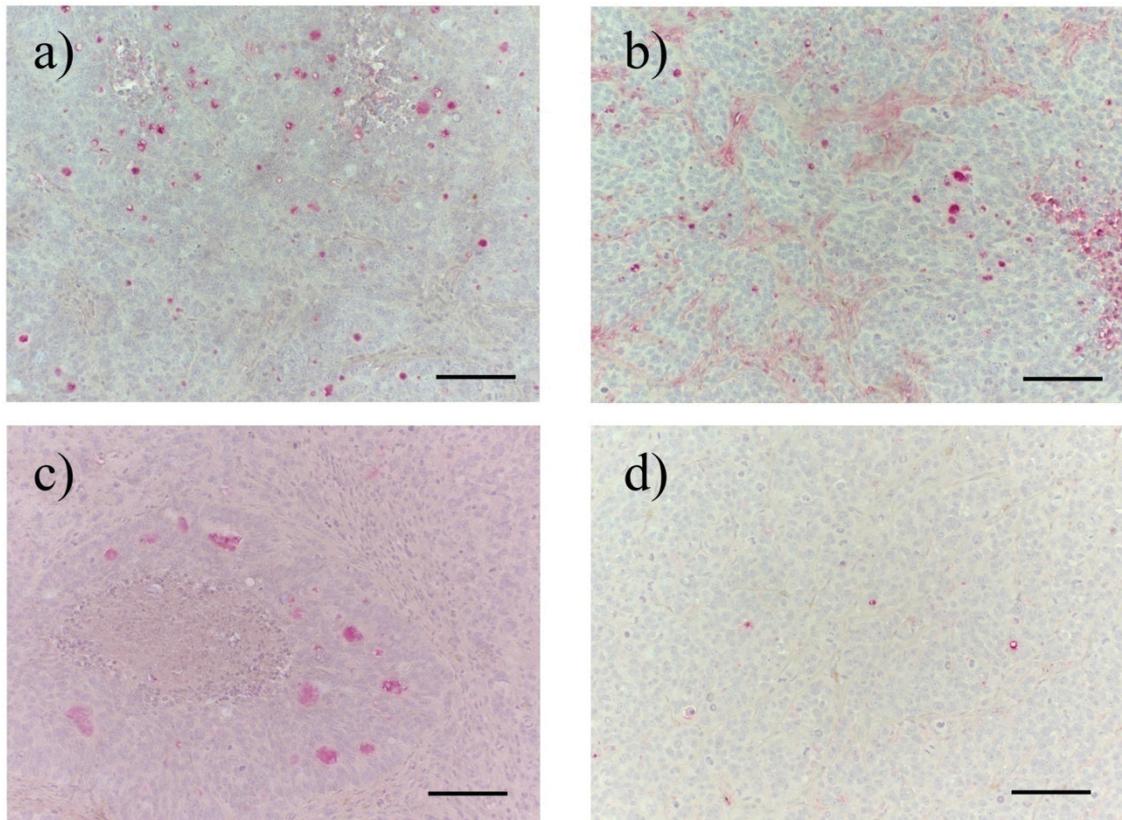
**Abbildung 3.34.: Gelatine- Zymografie.** Abgebildet ist das Coomassie- gefärbte SDS- Gel (10%) nach dem Verdau durch Matrixmetalloproteinasen. Hierbei wurden die Mediumüberstände von DLD1- und HT29- Kontrollzellen (-) und CAR- Knockdown- Zellen (+) aufgetragen. Die Banden liegen bei ca. 90 kDa und 60 kDa. Die Zahlen geben die Größe des Standards in kDa an.

Trägt man konditioniertes Medium, welches FCS enthielt, auf ein Gelatine- haltiges SDS- Gel auf, so sind zwei sehr deutliche Banden bei ca. 90 kDa und 60 kDa zu sehen (vgl. Abbildung 3.34). Zwischen den Kontroll- und Knockdownzellen gibt es jedoch keinen Unterschied in der Aktivität von MMPs. Die Bande bei ca. 90 kDa entspricht dem Molekulargewicht von proMMP9 (Molekulargewicht 92 kDa, vgl. Troeberg und Nagase 2003), die Bande bei ca 60 kDa dem von MMP2 (Molekulargewicht 68 kDa, vgl. Troeberg und Nagase 2003).

### 3.2.6. Expression von Matrixmetalloproteinasen im Xenografttumor

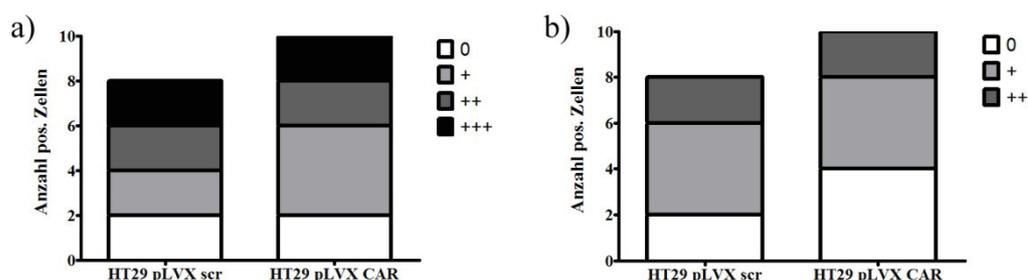
Um die tatsächliche Expression von Matrixmetalloproteinasen *in vivo* im Xenografttumor zu untersuchen, wurden MMP3 und MMP13 an den Tumoren gefärbt.

In Abbildung 3.35. sind Bilder von den HT29 pLVX scr- und HT29 pLVX CAR- Tumoren zu sehen, die mit einem Antikörper gegen MMP3 oder MMP13 gefärbt wurden. Zu sehen ist, dass in allen Färbungen einzelne Tumorzellen positiv sind. Es gibt auch Färbungen innerhalb von Gefäßen (vgl. Abbildung 3.35. b)) oder kleineren gefäßähnlichen Hohlräumen (vgl. Abbildung 3.35. d)). Die Ergebnisse für die einzelnen Tumore sind in Abbildung 3.36. zusammengefasst.



**Abbildung 3.35.: Expression von MMPs in HT29- Xenografttumoren.** In a) ist die Färbung von MMP3 in einem Schnitt eines HT29 pLVX scr- Primärtumors zu sehen, in b) die Färbung eines HT29 pLVX CAR- Primärtumorschnitts. In Abbildung c) sieht man die Färbung für MMP13 in einem Schnitt eines HT29 pLVX scr- Primärtumor zu sehen und in d) die Färbung in einem Schnitt eines HT29 pLVX CAR- Primärtumors. Die Größe des Maßstabs beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 3.36. vergleicht die Anzahl der Tumore, die negativ (0), nur wenige einzelne positive Zellen im ganzen Schnitt (+), mittelmäßig viele positive Zellen, d. h. einzelne, aber ohne groß suchen zu müssen im Schnitt verteilte positive Zellen (++) oder viele positive Zellen (+++) haben.



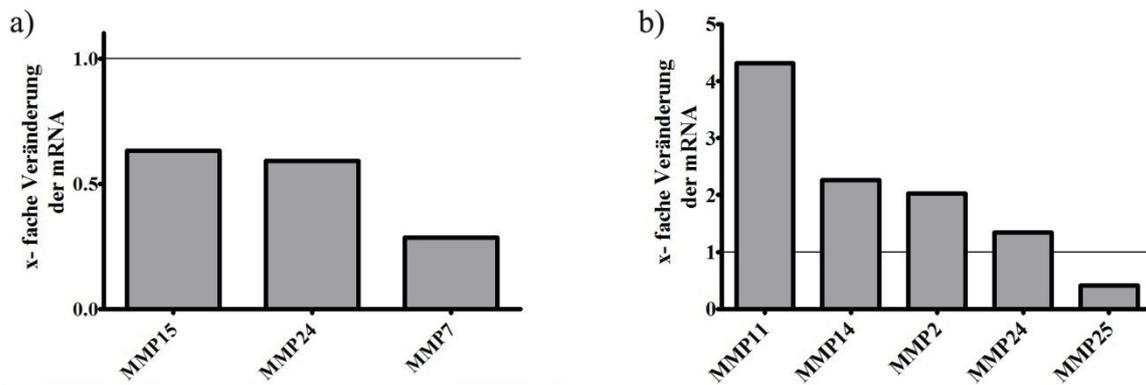
**Abbildung 3.36.: Auswertung der MMP Expression.** a) zeigt die Expression von MMP3, b) von MMP13 in den Schnitten der HT29- Tumore. Hierbei wurden jeweils die Anzahl der positiven Zellen in den HT29 pLVX scr- und HT29 pLVX CAR- Primärtumoren verglichen. Es wurde differenziert zwischen negativen Primärtumoren (0), wenigen einzelnen positiven Zellen (+), mittelmäßig vielen positiven Zellen (++) oder vielen positiven Zellen (+++). Die Abbildungen zeigen deutlich, dass zwischen den Knockdown- und Kontrollprimärtumoren kein Unterschied zu sehen ist, da die Anzahl der positiven Zellen sowohl bei MMP3 und MMP13 innerhalb einer Versuchsgruppe heterogen ist.

Abbildung 3.36. a) stellt die Anzahl der positiven Zellen in der MMP3- Färbung dar. Sowohl in den HT29 pLVX scr- als auch in der HT29 pLVX CAR- Tumoren gibt es jeweils zwei negative Tumore. Auch die mittelmäßig positiven Tumore, bei denen über den Schnitt einige positive Zellen zu finden sind bzw. die mit vielen positiven Zellen, sind mit jeweils zwei Schnitten in den Versuchsgruppen gleich häufig vertreten. Lediglich die Anzahl der Schnitte, in denen nur ganz vereinzelt positive Zellen zu finden sind, unterscheiden sich. Bei HT29 pLVX scr gehören hierzu zwei Tumore, bei HT29 pLVX CAR vier Tumore. Jedoch liegen bei HT29 pLVX scr auch nur acht auswertbare Tumore vor, bei HT29 pLVX CAR jedoch zehn. Es ist also zwischen den Versuchsgruppen kein Unterschied in der Expression von MMP3 zu sehen.

Bei der Expression von MMP13 (vgl. Abbildung 3.36 b)) sieht man, dass es keine Tumore gibt, die relativ viel MMP13 exprimieren. Auch hier sind in der HT29 pLVX scr- Versuchsgruppe acht Tumore, in der HT29 pLVX CAR- Gruppe zehn Tumore auswertbar. Die Anzahl der Tumore, die mittelmäßig viele Zellen haben, sowie die Tumore, die nur ganz vereinzelt positive Zellen haben, liegt bei beiden Versuchsgruppen bei zwei bzw. vier. Bei den HT29 pLVX scr sind zwei Tumore negativ, bei den HT29 pLVX CAR vier. Es ist auch hier kein Unterschied in der Expression zu sehen. Die Expression von MMPs wurde zudem auf mRNA- Ebene in den Tumoren, als auch in den HT29- Zellen, analysiert (vgl. Abbildung 3.37.).

Von den MMPs sind in den HT29- Zellen nach CAR- Knockdown nur MMP15, MMP24 und MMP7 signifikant differentiell reguliert. Hierbei handelt es sich um eine signifikante

Reduktion der mRNA in den Zellen nach CAR- Knockdown um 37 % bzw. 41 % und 72 % im Vergleich zu den Kontrollzellen ( $p_{adj} = 0,0004$  bzw.  $p_{adj} = 8,3 * 10^{-6}$  bzw.  $p_{adj} = 4,2 * 10^{-7}$ ). Für MMP7 wurde schon in den DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown beim ECM-Array unter 3.2.1. eine Herabregulation der RNA um das Fünffache der Kontrollzellen beobachtet.



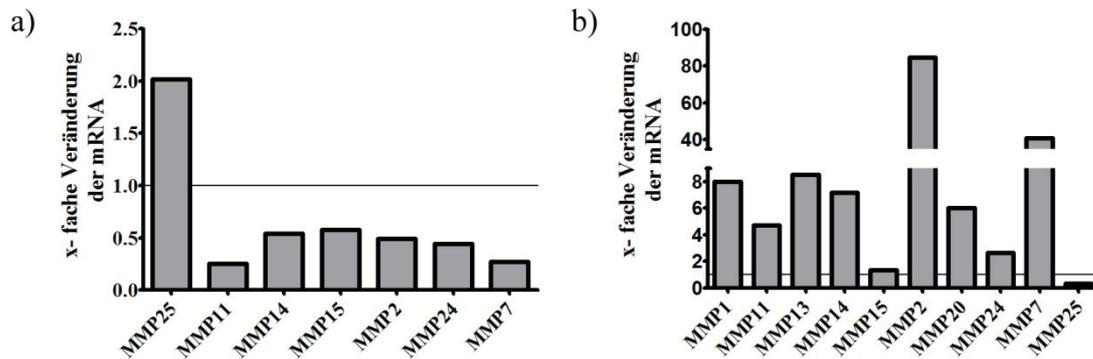
**Abbildung 3.37.: Ergebnis der Next Generation Sequenzierung für mRNA der MMPs.** Dargestellt ist das Ergebnis der signifikant differentiell regulierten mRNA von MMPs a) in den HT29 pLVX CAR- Zellen im Vergleich zu den HT29 pLVX scr- Zellen und b) den Tumoren, die durch die Injektion von HT29 pLVX CAR- Zellen im Vergleich zu den Tumoren der HT29 pLVX scr- Zellen. In den HT29- Zellen werden MMP15, MMP24 und MMP7 nach CAR- Knockdown auf mRNA- Ebene signifikant herabreguliert. In den Tumoren hingegen werden MMP 11, MMP14, MMP2 und MMP 24 signifikant heraufreguliert, MMP25 signifikant herabreguliert. Die Linie entspricht der zugrunde gelegten Expression der pLVX scr- Zellen, die auf 1 gesetzt wurde.

*In vivo* zeigt sich in den Tumoren eine ganz andere Regulation der MMPs im Vergleich zu den Zellen (vgl. Abbildung 3.37b)). Hier sind mehr MMPs signifikant differentiell reguliert, wobei es sich hier oftmals um eine Heraufregulation handelt. Die mRNA von den MMP11, MMP14 und MMP2, welche in den HT29- Zellen nicht als signifikant reguliert auftauchen, sind in den Tumoren der Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrolltumoren signifikant um das 4,3- fache bzw. 2,3- fache und zweifache heraufreguliert ( $p_{adj} = 2,9 * 10^{-7}$  bzw.  $1,4 * 10^{-5}$  und  $p_{adj} = 0,01$ ).

MMP24 ist auf mRNA- Ebene in den HT29- Zellen signifikant nach CAR- Knockdown reduziert. In den Tumoren hingegen ist die mRNA von MMP24 signifikant um das 1,3- fache der Kontrolltumore ( $p_{adj} = 0,03$ ) heraufreguliert. MMP25 mRNA liegt in den Tumoren nach CAR- Knockdown um 60 % weniger vor als in den Kontrolltumoren ( $p_{adj} = 0,01$ ). Der CAR- Knockdown hat also in den Zellen eine andere Auswirkung als in den Tumoren *in vivo*. Während in den Zellen die signifikant regulierten MMPs herabreguliert werden stellt man bei

den Tumoren fest, dass nach CAR- Knockdown auf mRNA- Ebene die signifikant differentiell regulierten MMPs heraufreguliert sind.

Da Zellen in der Zellkultur als Monolayer wachsen und somit weder dreidimensional wachsen noch eine Umgebung haben, wie sie *in vivo* vorliegt, wurde zudem noch verglichen, wie sich die Regulation der mRNA zwischen den Zellen und dem entsprechenden Tumor verändert (vgl. Abbildung 3.38.).



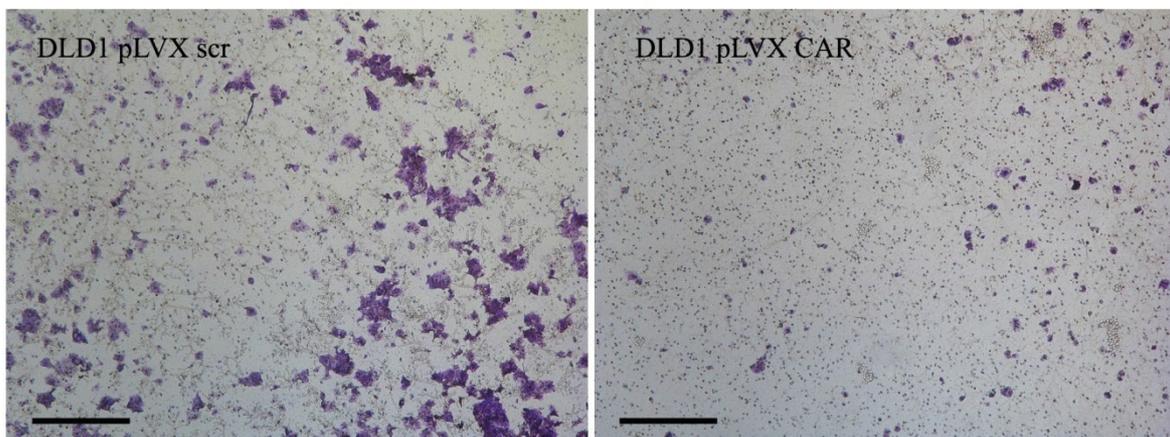
**Abbildung 3.38.: Ergebnisse der Next Generation Sequenzierung für die mRNA der MMPs.** Dargestellt sind die signifikant differentiell regulierten MMPs in den in der Maus gewachsenen Primärtumoren verglichen mit den entsprechenden in der Kultur gewachsenen Zellen. Als Nullwert wurden die jeweiligen in der Kultur gewachsenen Zellen verwendet. a) zeigt die differentiell exprimierten mRNAs der MMPs der Kontrollgruppe, b) der CAR- Knockdowngruppe. Bei den Tumoren der Kontrollgruppe sind die meisten mRNAs der MMPs im Vergleich zu den Kontrollzellen herabreguliert, bei den CAR- Knockdowntumoren findet eine Heraufregulation der mRNA der MMPs statt.

Die Tumore, die aus den HT29 pLVX scr- Zellen entstanden sind, regulieren signifikant differentiell viele mRNAs für MMPs im Vergleich zu den in der Kultur gewachsenen Zellen herab. Einzig die mRNA für MMP25 wird um das doppelte heraufreguliert ( $p_{adj} = 0,08$ ). Die mRNAs der MMPs 11, 14 und 15 werden um 75 %, 46 % bzw. 42 % im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert ( $p_{adj} = 0,00001$  bzw.  $p_{adj} = 0,03$  bzw.  $p_{adj} = 0,004$ ). Auch die mRNA der MMPs 2, 24 und 7 werden signifikant weniger exprimiert ( $p_{adj} = 0,09$  bzw.  $p_{adj} = 6,5 \cdot 10^{-7}$  bzw.  $p_{adj} = 0,00002$ ). Bei den Tumoren der HT29 pLVX CAR- Zellen, die *in vivo* als Tumor wuchsen, ist eine Heraufregulation der meisten mRNAs für MMPs im Vergleich zu den in Kultur gewachsenen Zellen zu sehen. Die mRNAs für MMP 1, 13 und 20 werden signifikant im Primärtumor um das achtfache, 8,5- fache bzw. sechsfache mehr exprimiert als in den Knockdownzellen, welche in Kultur gewachsen sind ( $p_{adj} = 0,00057$  bzw.  $p_{adj} = 3,4 \cdot 10^{-8}$  bzw.  $p_{adj} = 0,004$ ). Auch die mRNA für MMP7 wird im Tumor um das 41- fache mehr exprimiert als in den Kontrollzellen aus der Zellkultur ( $p_{adj} = 3,1 \cdot 10^{-59}$ ).

Die mRNA für MMP25, welche in den Kontrollzellen heraufreguliert wird, wenn sie als Primärtumor wachsen, wird in den Knockdowntumoren signifikant um 70 % weniger exprimiert als in den Knockdownzellen aus der Zellkultur (padj = 0,01). Die mRNAs der MMPs 11, 14, 15, 2 und 24, welche im Vergleich zu den Kontrollzellen, die in der Zellkultur gewachsen sind, in den Kontrolltumoren vermindert exprimiert werden, werden bei den Knockdownzellen, die *in vivo* als Primärtumor wuchsen, im Vergleich zu den Zellen aus der Zellkultur, heraufreguliert. Die RNA für MMP11 wird um das 4,7- fache vermehrt exprimiert (padj =  $6,8 * 10^{-9}$ ), die von MMP14 um das siebenfache (padj =  $1,09 * 10^{-46}$ ), von MMP15 um das 1,5- fache (padj = 0,04), von MMP2 um das 84,5- fache (padj =  $5,9 * 10^{-41}$ ) und MMP24 um das 2,6- fache (padj =  $5,5 * 10^{-17}$ ). Zusammenfassend werden in den Kontrollzellen, wenn sie *in vivo* wachsen, die mRNA für MMPs herabreguliert, während die mRNA der MMPs in den Knockdownzellen, die in der Maus als Tumor wachsen, unter diesen Bedingungen heraufreguliert werden.

### 3.2.7. Invasionsassay

Um die Invasivität der Tumorzellen zu testen wurde ein vertikaler Invasionsassay mit einer wachstumsfaktorreduzierenden Matrigelbeschichtung durchgeführt.



**Abbildung 3.39.: Vertikales Invasionsassay.** Dargestellt ist eine mikroskopische Aufnahme der Unterseite des Einsatzes des Invasionsassays. Deutlich zu sehen ist das höhere invasive Potential der DLD1 pLVX scr- Zellen im Vergleich zu den DLD1 pLVX CAR- Zellen. Die Größe des Maßstabalkens beträgt 500 µm.

Wie in Abbildung 3.39. dargestellt, können die DLD1 pLVX scr- Zellen gut durch das Matrigel und die Membran invadieren. Bei den DLD1 pLVX CAR- Zellen sind nach 48 Stunden deutlich weniger Zellen durch die mit Matrigel beschichtete Membran invadiert.

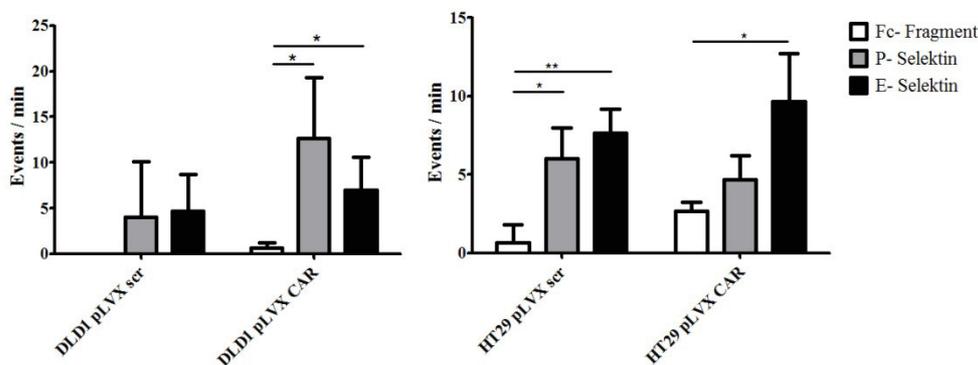
Da HT29- Zellen keine deutliche Migration (vgl. Abbildung 3.32.) zeigen und bei einem ersten Test auch keine Invasion zeigten, wurden sie für diesen Versuch nicht verwendet.

### 3.3. Die Rolle von CAR bei der hämatogenen Metastasierung

#### 3.3.1. Flussversuche

##### 3.3.1.1. Flussversuche auf Selektinbeschichtung

Um die Fähigkeit der Zellen zu untersuchen, an Selektine auf dem Endothel zu adhären und somit die feste Adhäsion ans Endothel zu ermöglichen, wurden IBIDI- Slides (IBIDI  $\mu$ slide VI 0.4 ibiTreat) mit Selektinen beschichtet.



**Abbildung 3.40.: Flussversuch auf Selektinbeschichtung mit DLD1- und HT29- Zellen.** Dargestellt sind die Anheftungen pro Minute auf der jeweiligen Selektinbeschichtung bzw. der Kontrolle (Fc- Fragment). Die Signifikanzen sind jeweils im Bezug auf das Fc- Fragment angegeben. Deutlich zu sehen ist, dass die DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown besser an E- und P- Selektin binden können als die Kontrollzellen. Die HT29- Zellen haften generell besser an den Selektinen, als am Fc- Fragment. \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

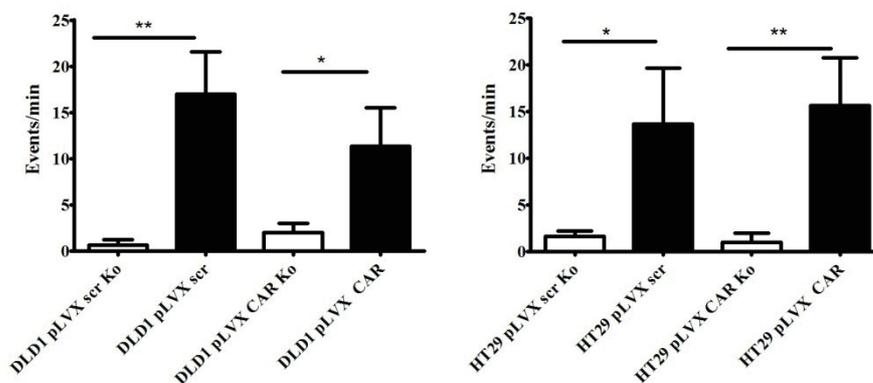
DLD1- Zellen haften kaum an dem Fc- Fragment an. Lässt man DLD1 pLVX scr- Zellen über P- oder E- Selektin fließen, so hat man im Schnitt vier bzw. 4,66 Anheftungen pro Minute, also keine signifikante Zunahme der Anheftungen im Vergleich zum Fc- Fragment ( $p = 0,318$  bzw.  $p = 0,116$ ). Bei DLD1 pLVX CAR- Zellen jedoch haften im Mittel 12,66 Zellen an P- Selektin ( $p = 0,036$ ) und sieben Zellen an E-Selektin ( $p = 0,039$ ). Der Knockdown von CAR hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit der Zellen an E- oder P- Selektin, wenn man die Adhäsion an das jeweilige Selektin zwischen den Kontroll- und Knockdownzellen vergleicht ( $p = 0,497$  bzw.  $p = 0,171$ ).

Bei HT29- Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild für die Adhäsion an Selektine. Die HT29 pLVX scr- und HT29 pLVX CAR- Zellen haften mit 0,66 Zellen bzw. 2,66 Zellen pro Minute etwas stärker an das Fc- Fragment als die DLD1- Zellen. Die Adhäsion der HT29 pLVX scr-

Zellen an P- Selektin mit sechs Zellen pro Minute bzw. an E- Selektin mit 7,6 Zellen pro Minute ist signifikant höher ( $p = 0,003$  bzw.  $p = 0,016$ ) als an das Fc- Fragment. Auch HT29 pLVX CAR- Zellen haften mit 9,66 Zellen pro Minute signifikant besser an E- Selektin ( $p = 0,017$ ) als an das Fc- Fragment. Die Adhäsion an P- Selektin unterscheidet sich mit 4,66 Zellen pro Minute jedoch nicht signifikant ( $p = 0,101$ ) von der Adhäsion an das Fc- Fragment.

### 3.3.1.2. Flussversuche auf HUVECs

Um die Adhäsion von Tumorzellen in Blutgefäßen zu simulieren wurden die IBIDI- Slides (IBIDI  $\mu$ slide VI 0.4 ibiTreat) mit Endothel beschichtet um dies zu simulieren.



**Abbildung 3.41.: Flussversuch auf HUVECs.** Dargestellt ist der Flussversuch der verschiedenen Knockdownzelllinien auf HUVECs. Hierbei wurden die Anheftungen pro Minute an stimuliertem Endothel als auch die Events an unstimuliertem Endothel (Ko) aufgetragen. Deutlich zu sehen ist, dass alle Zellen besser an stimulierte HUVECs (schwarz) als an unstimulierte HUVECs (weiß) haften. \*:  $p = 0,01$  bis  $p = 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,001$  bis  $p = 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Von HT29- Zellen ist bekannt, dass sie an stimuliertem Endothel signifikant besser haften als an unstimuliertem Endothel. In diesem Versuch dienten daher die HT29 pLVX scr- Zellen als Kontrollen, da die Kontrolltransfektanten sich verhalten sollten wie die Parentalzellen. Bei den Kontrolltransfektanten haften unter Kontrollbedingungen, d. h. auf unstimuliertem Endothel im Schnitt 1,6 Zellen pro Minute, auf stimuliertem Endothel sind es mit 13,6 Zellen pro Minute signifikant mehr Zellen ( $p = 0,0265$ ). Die HT29 pLVX CAR- Zellen haften ebenfalls kaum an unstimuliertem Endothel, mit einer Anhaftung pro Minute. An stimuliertem Endothel haften sie mit 15,6 Zellen pro Minute signifikant ( $p = 0,0083$ ) stärker als an unstimuliertem Endothel. Die HT29- Kontrollzellen und die Knockdownzellen unterscheiden

sich jedoch nicht in ihrer Fähigkeit an stimuliertem Endothel zu haften ( $p = 0,6843$ ) (vgl. Abbildung 3.41.).

Bei den DLD1- Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild. Sowohl die Kontrollzellen (0,6 Anhaftungen pro Minute) als auch die Knockdownzellen (zwei Anhaftungen pro Minute) haften kaum an unstimuliertem Endothel. Bei beiden Zelllinien ist nach Stimulation des Endothels eine Zunahme der Adhäsion pro Minuten zu verzeichnen. So adhären bei den Kontrollzellen 17 Zellen pro Minute ( $p = 0,0036$ ), bei den Knockdownzellen 11,3 Zellen pro Minute ( $p = 0,0195$ ) (vgl. Abbildung 3.41.). Auch hier gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen, was ihre Adhäsion an stimuliertes Endothel betrifft.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die stimulation der HUVECs dazu führt, dass die Tumorzellen besser an das Endothel anhaften können, jedoch kein Einfluss des CAR-Status der Tumorzellen feststellbar ist.

### **3.4. Die Rolle von CAR in Kolonkarzinomzellen**

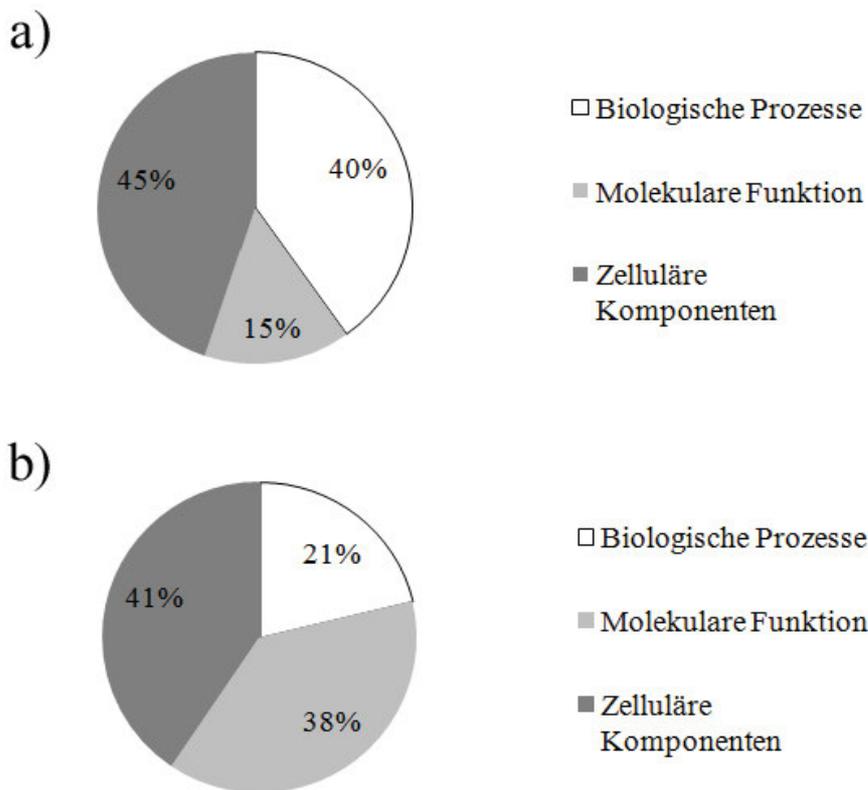
#### **3.4.1. Weitere Ergebnisse der Next Generation Sequenzierung**

Um die Ergebnisse der Next Generation Sequenzierung zusammenfassend darzustellen, wurden die Ergebnisse für die drei Kategorien der GO- terms- Analyse als Tortendiagramm aufgetragen. Bei den Kategorien handelt es sich um mRNAs, die an biologischen Prozessen beteiligt sind, sowie an molekularen Funktionen und zellulären Komponenten.

Unterzieht man die Ergebnisse der Next Generation Sequenzierung einer GO- term- Analyse, welche die Unterteilung der differentiell regulierten mRNAs in den HT29 pLVX scr- Zellen im Vergleich zu den HT29 pLVX CAR- Zellen in drei Kategorien ermöglicht, so findet man insgesamt 1582 differentiell regulierte Gene, wobei hier keine Unterteilung in herauf- oder herabreguliert erfolgt. 45 % (710 Gene) sind für die zellulären Komponenten zuständig, wie z. B. Gene der extrazellulären Matrix oder Membrangene. 40 % (635 Gene) hiervon sind für biologische Prozesse relevant, wie zum Beispiel Entwicklungsprozesse wie die Organentwicklung. 15 % (237 Gene) fallen in die Kategorie der molekularen Funktion. Hierzu zählen z. B. Gene für die Bindung von Proteinen oder Gene mit Aktivität der Enzymregulation (vgl. Abbildung 3.42. a)).

Schaut man sich nun den Vergleich bei den Tumoren (vgl. Abbildung 3.42 b)) an, die aus den Zellen entstanden sind, die in Abbildung 3.42 a) verglichen wurden, wird deutlich, dass die Regulation der Gene sich *in vivo* von der *in vitro* Situation unterscheidet. Hier werden insgesamt 3441 Gene reguliert, wenn man die HT29 pLVX scr- Tumore mit den HT29 pLVX

CAR- Tumoren vergleicht, d. h. mehr als doppelt so viele Gene wie *in vitro*. 41 % (1395 Gene) fallen hierbei in die Kategorie der zellulären Komponenten. 38 % der regulierten Gene (1315 Gene) gehören zu den Genen der molekularen Funktion, 21 % (731 Gene) gehören zu Genen, die die biologischen Prozesse steuern.



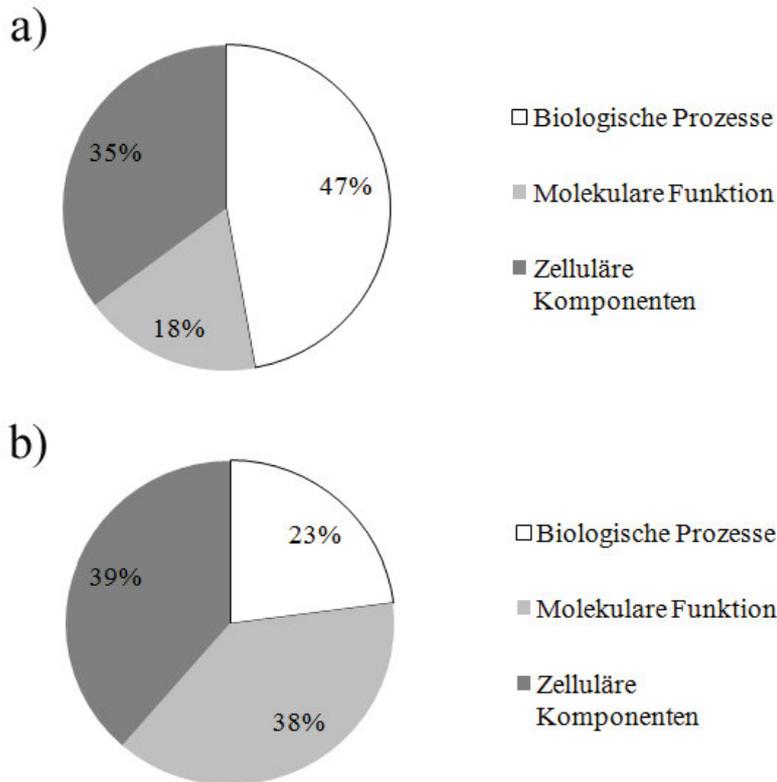
**Abbildung 3.42.: Ergebnisse der GO- term- Analyse für die HT29- Zellen bzw. Primärtumore.** Dargestellt ist der Vergleich der regulierten Gene a) der HT29 pLVX scr- Zellen mit den HT29 pLVX CAR- Zellen, sowie b) der Kontroll- und Knockdownprimärtumore eingeteilt in die Kategorien biologische Prozesse, molekulare Funktion und zelluläre Komponenten. Deutlich zu sehen ist in beiden Fällen die starke Regulation der Gene für zelluläre Komponenten, sowie bei den Zellen nach CAR- Knockdown der Gene für biologische Prozesse bzw. bei den Tumoren die starke Regulation der molekularen Funktion.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* werden durch den CAR- Knockdown also vor allem Gene der zellulären Komponenten beeinflusst. *In vitro* sind zudem ähnlich stark Gene der biologischen Funktion reguliert. *In vivo* jedoch sind Gene der molekularen Funktion ähnlich stark wie die der zellulären Komponenten reguliert.

Zudem ist es auch interessant die Zellen auch hier *in vitro* und *in vivo* zu vergleichen.

Injiziert man die Kontrollzellen subkutan in Mäuse und vergleicht anschließend die Genexpression auf Ebene der mRNA zwischen den Zellen aus der Zellkultur und den

entsprechenden Primärtumoren, so findet man 1024 regulierte Gene. 47 % (483 Gene) davon gehören zu den Genen, die die biologische Funktion der Zellen steuern. 35 % (360 Gene) der regulierten Gene fallen in die Kategorie der zellulären Komponenten. Nur 18 % (181 Gene) der Gene sind Gene, die die molekulare Funktion regulieren (vgl. Abbildung 3.43. a)).



**Abbildung 3.43.: Ergebnis der GO- term- Analyse von dem Vergleich der HT29- Zellen *in vitro* versus *in vivo*.** Dargestellt ist in a) der Vergleich der regulierten Gene der HT29 pLVX scr- Zellen aus der Zellkultur mit dem HT29 pLVX scr- Primärtumor aus der Maus, in b) der Vergleich der regulierten Gene der HT29 pLVX CAR- Zellen aus der Zellkultur mit dem Primärtumor, der aus diesen gewachsen ist, eingeteilt in die Kategorien biologische Prozesse, molekulare Funktion und zelluläre Komponenten. Deutlich zu sehen ist, dass bei den HT29 pLVX scr- Tumoren, im Vergleich zu den Zellen, die Gene für biologische Prozesse vermehrt exprimiert werden, bei den Knockdowntumoren, im Vergleich zu den Knockdownzellen, sowohl Gene der molekularen Funktion als auch der zellulären Komponenten vermehrt reguliert werden.

Bei den HT29 pLVX CAR- Zellen zeigt sich ein etwas anderes Bild, wenn man die ursprünglichen, in der Zellkultur gewachsenen Zellen mit den Primärtumoren vergleicht. Hier sind 5698 Gene reguliert. 39 % (2197 Gene) der Gene gehören zu den Genen der zellulären Komponenten. 38 % (2193 Gene) gehören zu den Genen, die molekulare Funktionen regulieren. Nur 23 % (1308 Gene) der Gene gehören zu den Genen, die biologische Prozesse kontrollieren (vgl. Abbildung 3.43. b)).

Insgesamt ist also zu sehen, dass die Kontrollzellen, wenn man die Zellen aus der Zellkultur mit den daraus entstandenen Primärtumoren in der Maus vergleicht, ihre Gene *in vivo* anders regulieren als die Knockdownzellen. Während bei den Kontrollzellen vor allem die Gene reguliert werden, die für biologische Prozesse benötigt werden, sind bei den Knockdownzellen die Gene für die molekularen Funktionen und zellulären Komponenten annähernd gleich stark reguliert.

## 4. Diskussion

Die variierende Expression von CAR in verschiedenen Tumorzelllinien einer Tumorentität sind für verschiedene Tumorzelllinien beschrieben. So unterscheiden sich die verschiedenen Tumorzelllinien von Melanomen, Gliomen, Harnblasenkarzinomen, Kolonkarzinomen und Harnblasenkarzinomen (Hemmi *et al* 1998, Miller *et al* 1998, Asaoka *et al* 2000, Li *et al* 1999, Anders *et al* 2009b, Stecker *et al* 2011, Okegawa *et al* 2000) in ihrer CAR- Expression. In der Kolonkarzinomzelllinie DLD1 wurde zudem beobachtet, dass die Tumorzellen nach dem Knockdown von CAR kleiner und runder waren als die Kontrollzellen (Stecker *et al* 2009). Im Westernblot ist auch hier die unterschiedlich starke Expression von CAR in den verschiedenen Tumorzelllinien deutlich zu sehen. Nach dem Knockdown von CAR ist jedoch in den DLD1- und HT29- Zellen kein Unterschied in der Morphologie der Zellen zu erkennen.

Bei CAR handelt es sich um ein Protein, das nicht nur ein tight junction Protein ist, sondern auch um ein Protein, dem eine Beteiligung an Signalwegen in der Zelle zugeschrieben wird. So führen zum Beispiel hohe CAR- Level zu einer hohen basalen Aktivität von p44/ 42 MAPK (Farmer *et al* 2009). Von daher ist es auch von Interesse, zu ermitteln ob andere Proteine, die an der Interaktion des Primärtumor mit den Zellen beteiligt sein können, von der Manipulation des CAR- Levels in den Zellen betroffen sind. Ein interessantes Zielprotein, welches eine Rolle beim Zellwachstum, der Differenzierung und dem Zellüberleben, sowie bei der Migration (Cherciu *et al* 2014) und der Invasion (Cho *et al* 2012) spielt ist CD44. Bisher scheint der Zusammenhang zwischen dem CAR- Status von Tumorzellen und CD44 nicht untersucht worden zu sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD44 signifikant um 39 % auf der Zelloberfläche der HT29- Zellen abnimmt, wenn man CAR herabreguliert. Auch in einer zweiten Zelllinie, den DLD1- Zellen, kann nach CAR- Knockdown eine signifikante Verminderung um 67 % der Oberflächenexpression von CD44 nachgewiesen werden. Auf mRNA- Ebene konnte nach CAR- Knockdown in HT29- Zellen eine leichte, aber nicht signifikante Herabregulation um 18 % nachgewiesen werden. In den Tumoren, die aus den subkutan injizierten HT29- Zellen entstanden sind, kann nach CAR- Knockdown eine signifikante Reduktion der mRNA um 42 % von CD44 nachgewiesen werden. *In vivo* ist der Effekt des CAR- Knockdowns auf die Expression von CD44 also ausgeprägter als *in vitro*.

Vergleicht man die HT29 pLVX scr- Tumore mit den HT29 pLVX scr- Zellen, so wird in den Tumoren die CD44 mRNA um das 1,4- fache heraufreguliert. Diese Heraufregulation erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die HT29 pLVX CAR- Zellen regulieren die

mRNA für CD44 signifikant herab, wenn sie *in vivo* wachsen. Der Knockdown von CAR könnte also den Zellen einen Anpassungsnachteil *in vivo* verschaffen, da nach dem CAR-Knockdown ihre mRNA für CD44 stärker herabreguliert wird. Weniger CD44 könnte eine schlechtere Interaktion mit der Hyaluronsäure in der ECM bedeuten, was evtl. eine Erklärung für die Abnahme der Metastasen nach CAR- Knockdown sein könnte.

Damit Zellen erfolgreich Metastasen bilden können, müssen sie nicht nur mit der ECM interagieren, sondern auch durch sie hindurch migrieren und invadieren (Guan 2015). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Migration von DLD1- Zellen nach CAR-Knockdown deutlich zunimmt. So bewachsen DLD1 pLVX scr- Zellen 31 % der ehemals freien Fläche, während DLD1 pLVX CAR- Zellen sogar 49 % der Fläche im horizontalen Migrationsassay bewachsen. Bei HT29- Zellen war kaum ein migratorisches Potential zu sehen, welches auch nach CAR- Knockdown kaum zunahm. Die Invasion der DLD1- Zellen nimmt nach CAR- Knockdown deutlich ab (vgl. Abbildung 3.39.). Der Einfluss von CAR sowohl auf die Migration als auch auf die Invasion von Tumorzellen wurde bereits in verschiedenen Zelllinien untersucht. So konnte in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 nachgewiesen werden, dass es nach der ektopten Expression von CAR zu einer verminderten Zellmigration auf abnehmbaren Chamberslides auf Objektträgern kommt. Auch in Transwells stellt man fest, dass die Migration fast komplett inhibiert wird, wenn man CAR herunterreguliert (Brüning und Runnebaum 2004). Dieses Resultat konnte von mehreren Gruppen in verschiedenen Tumorzelllinien bestätigt werden. In den Mausmelanomzellen B16 wurde die verminderte Migration nach ektopter CAR- Expression nachgewiesen (Yamashita *et al* 2007), ebenso wie in der Gliomzelllinie U87, in der CAR ektopt exprimiert wurde. (Fok *et al* 2007). In der Ösophaguskarzinomzelllinie OE33 nahm die Migration der Zellen nach CAR-Knockdown signifikant zu (Anders *et al* 2009a). Auch in Rhabdomyosarkomzellen konnte nach ektopter CAR- Expression eine reduzierte Zellmigration gezeigt werden (Majhen *et al* 2011). Für die Kolonkarzinomzelllinie AGS konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass der Knockdown von CAR zu einer verstärkten Migration führt (Anders *et al* 2009b). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich also mit in der Literatur beschriebenen hemmenden Eigenschaft von CAR auf die Migration.

Auch die Auswirkung von CAR auf die Invasion wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben. In der Gliomzelllinie U87- MG wurde mittels eines *in vitro* Sphäroid- Modells die Migration und Invasion beschrieben. Nach der Heraufregulation von CAR entfernen die Zellen sich deutlich weniger weit von dem Hauptteil der Zellen als in der Kontrollgruppe (Huang *et al* 2005). Auch in der Ösophaguskarzinomzelllinie OE33, AGS und der

Kolonkarzinomzelllinie DLD1, bei der CAR durch einen blockierenden Antikörper gegen CAR blockiert wurde, wurde die Zunahme der Invasion *in vitro* nach CAR- Knockdown beschrieben (Anders *et al* 2009b, Anders *et al* 2009a, Stecker *et al* 2011). Dieser Befund steht im Kontrast zu den in der vorliegenden Arbeit erzielten *in vitro* Resultaten, da hier die DLD1-Zellen nach CAR- Knockdown weniger invadieren. Der Unterschied zur Arbeit von Stecker *et al* (2011) liegt hierbei darin, dass in dem Versuch von Stecker *et al* (2011) CAR auf der Oberfläche mit dem RmcB- Antikörper blockiert wurde, in der vorliegenden Arbeit jedoch die Knockdownzellen verwendet wurden. Ob dies eine Erklärung für das beobachtete Phänomen sein könnte, müsste mit einem weiteren Versuch geklärt werden. Der Knockdown in den HT29- Zellen hat in der vorliegenden Arbeit jedoch zu einer verminderten Metastasierung *in vivo* geführt, bestätigt also die *in vitro* Resultate.

Die Migration von Tumorzellen ist nicht komplett unabhängig von anderen Zellen, die in einem Tumor vorkommen. So wurde beispielsweise beschrieben, dass Makrophagen eine Rolle bei der vermehren Migration von Tumorzellen zuzusprechen ist und sich dies auf die Invasion und somit Metastasierung auswirken kann (Wyckoff *et al* 2004). Im Mammakarzinom konnte z. B. gezeigt werden, dass EGF, welcher von Tumor- assoziierten Makrophagen sezerniert wird, die Invasion und Migration von benachbarten Tumorzellen erhöhen kann (Joyce und Pollard 2009). In dem vorliegenden horizontalen Migrationsassay wurden jedoch nur Tumorzellen verwendet. Da HT29- Zellen *in vitro* kaum migrieren, im Xenograftmodell jedoch sehr wohl in der Lage sind, Metastasen zu bilden, also folglich auch migrieren und invadieren können, kann man davon ausgehen, dass im Gegensatz zu den DLD1- Zellen die HT29- Zellen abhängiger von Tumor infiltrierenden Wirtszellen sein könnten.

Bei der Migration und Invasion spielt jedoch nicht nur der CAR- Status eine Rolle, sondern auch der von CD44. CD44 wurde, wie oben erläutert, nach CAR- Knockdown in den in dieser Arbeit in HT29- Zellen um 39 % weniger auf der Oberfläche exprimiert, in den DLD1- Zellen sogar 67 % weniger. Die mRNA für CD44 nimmt nach CAR- Knockdown in der Next Generation Sequenzierung in den Zellen nicht signifikant um 18 %, in den Primärtumoren jedoch statistisch signifikant um 42 % ab. Auch wurde gezeigt, dass DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown stärker migrieren, aber weniger invadieren. In SW480 Kolonkarzinomzellen wurde gezeigt, dass die Zellen weniger stark migrieren und invadieren, wenn man CD44 herabreguliert (Cho *et al* 2012). Das Ergebnis der Reduktion der Invasion durch die Verringerung von CD44 stimmt in der vorliegenden Arbeit also mit der Literatur überein. Auch die Tatsache, dass Tiere, bei denen Primärtumore aus den Knockdownzellen

wuchsen, weniger Lungenmetastasen aufweisen, passt zu dem in der Literatur beschriebenen, weniger aggressiven Phänotypen *in vitro* (Cho *et al* 2012). Jedoch steht die erhöhte *in vitro* Migration, die in dieser Arbeit beobachtet wurde, im Gegensatz zu den Befunden von Cho *et al* (2012).

Wenn man die vorliegenden *in vitro* Ergebnisse der Migration und Invasion ansieht, fällt auf, dass die HT29- Zellen, welche im Tierversuch verwendet wurden, in den *in vitro* Versuchen weder invadieren, noch migrieren, im Tierversuch jedoch sehr wohl Metastasen bilden können. An dieser Stelle sind also die *in vitro* Versuche nicht direkt auf das Tiermodell übertragbar. Auf die Problematik der Übertragbarkeit von *in vivo* Befunden auf das Tiermodell bzw. der Ergebnisse des Tiermodells auf die Klinik wird später kurz eingegangen. Jedoch stimmen die Ergebnisse der Invasion bei den DLD1- Zellen mit der Reduktion der Invasion nach CAR- Knockdown mit der verminderten Metastasierung in die Lunge der HT29- Zellen nach CAR- Knockdown überein. Man muss jedoch bedenken, dass es sich hierbei zwar auch um Kolonkarzinomzellen handelt, jedoch um eine andere Zelllinie.

Neben der CD44- Expression spielen auch die MMPs eine Rolle bei der Invasion. Zellen, die sich vom Tumorverband gelöst haben, müssen die extrazelluläre Matrix enzymatisch auflösen, um erfolgreich in die Gefäße einwandern und am Ort der Metastasierung wieder auswandern zu können (Guan 2015). Da in dem ECM- Array auf mRNA- Ebene in den DLD1- Zellen eine Heraufregulation der RNA der MMPs 1, 10, 13, 14, 3 und 9, sowie eine Herabregulation der RNA für MMP7 nach dem Knockdown von CAR nachgewiesen werden kann, wurde eine Gelatine- Zymografie durchgeführt, bei der die Aktivität von MMP2 und MMP9, zwei MMPs, die entweder im ECM- Array oder der Next Generation Sequenzierung bereits auffällig reguliert waren, untersucht werden konnte. Hier wird sowohl bei den HT29- Zellen, als auch bei den DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown jedoch keine Veränderung der Aktivität von MMP2 und MMP9 beobachtet. Dieser Befund deckt sich mit der Literatur, in der bei U87- Zellen, in denen CAR heraufreguliert wurde, in der Gelatine- Zymografie keine Veränderung in der Aktivität von MMP2 und MMP9 detektiert werden konnte (Huang *et al* 2005).

Um die Ergebnisse des Arrays weiter zu stützen, wurde die mRNA in der Next Generation Sequenzierung in den HT29- Zellen weiter untersucht. Hier kann ebenfalls eine verminderte mRNA für MMP7 nach dem Knockdown von CAR nachgewiesen werden. Zudem wird eine Verminderung der mRNA von MMP15 und MMP24 beobachtet.

Da MMPs wichtig für die Degradation der extrazellulären Matrix und somit der Einwanderung in Gefäße sind, wurde in vertikalen Invasionsassays durch Matrigel die

Invasion nachgestellt. Hierbei invadierten die DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown weniger stark als die Kontrollzellen. Über den Zusammenhang zwischen der CAR- Expression in Zellen bzw. Tumoren und der Expression von MMPs wurde bisher nur, wie oben beschrieben, die Auswirkung der CAR- Expression auf die Invasion und Migration beschrieben (Anders *et al* 2009a, Anders *et al* 2009b). Hierbei wurde gezeigt, dass die Verminderung der CAR- Expression zu einer erhöhten Invasion von OE33- (Anders *et al* 2009a) und AGS- Zellen führt (Anders *et al* 2009b), der genaue Mechanismus wurde aber nicht untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit, d. h. die verminderte Invasion nach CAR- Knockdown bei den DLD1- Zellen stehen also im Gegensatz zu den Befunden von Anders *et al* (2009a) und Anders *et al* (2009b).

Analysiert man die Tumore in Bezug auf die MMP- Expression, so sind nach CAR- Knockdown die mRNAs für MMP11, 14, 2 und 24 heraufreguliert, die mRNA für MMP25 herabreguliert. MMP1 mRNA findet sich in dem ECM- Array als eine der heraufregulierten RNAs in den DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown wieder. Dies würde zu der erhöhten Migration passen, wenngleich in dem Versuch in dieser Arbeit MMP1 von den Tumorzellen selber gebildet werden muss. In der Next Generation Sequenzierung ist MMP1 nicht unter den signifikant regulierten mRNAs vertreten, wenn man die HT29- Zellen bzw. Tumore mit und ohne CAR- Knockdown vergleicht. Vergleicht man jedoch die Zellen der Knockdowngruppe mit den aus den Knockdownzellen entstandenen Tumoren, so ist die mRNA für MMP1 in den Tumoren heraufreguliert. Dieser Befund steht aber im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit *in vivo* beobachteten weniger aggressiven Phänotypen, da in den Tieren, die die Kontrollzellen bekommen haben signifikant mehr Zellen in der Lunge nachweisbar sind als die Tiere, die die Knockdownzellen injiziert bekommen haben.

Auch MMP14 hat eine Beteiligung an der Zellmigration. So führt die Manipulation von MMP14 zu einer weniger effizienten Migration (Friedl und Wolf 2008). MMP14 ist in dem ECM- Array der DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown ebenfalls heraufreguliert. Dies passt ebenfalls zum höheren migratorischen Potential der DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown. Auch in den Tumoren, die aus den HT29 pLVX CAR- Zellen entstanden sind, ist die mRNA von MMP14 signifikant heraufreguliert. Jedoch sind in den Tieren mit den Knockdowntumoren weniger Metastasen in der Lunge zu finden. Der Unterschied der Befunde zwischen dem ECM- Array und der Next Generation Sequenzierung können daran liegen, dass im ECM- Array die DLD1- Zellen verwendet wurden, bei der Next Generation Sequenzierung allerdings die HT29- Zellen, die auch im Tierexperiment genommen wurden. Wie später beschrieben (vgl. Seite 109), gab es zwischen den beiden Zelllinien schon andere

gegensätzliche Ergebnisse in dieser Arbeit, wie z. B. bei der Regulation der Expression von Integrin  $\beta 1$  und Integrin  $\beta 4$  nach CAR- Knockdown.

In der Next Generation Sequenzierung war die mRNA für MMP1, wenn man die Knockdownzellen mit Knockdowntumoren vergleicht heraufreguliert, jedoch waren weniger Lungenmetastasen in den Tieren mit den Knockdownzellen zu finden. Außerdem war in der Next Generation Sequenzierung MMP14 in Knockdowntumoren verglichen mit den Kontrolltumoren heraufreguliert. Die Divergenz der Befunde könnte damit erklärt werden, dass es sich hierbei vielleicht nicht um die MMPs handelt, die in diesem Versuch *in vivo* wirklich wichtig für die Metastasierung waren bzw. es vielleicht noch andere Mechanismen gab, die sich nicht über die Expression der MMPs selber widerspiegeln lassen.

Auf Proteinebene wurden zudem MMP3 und MMP13, zwei im ECM- Array auffällig regulierte MMPs, in Schnitten der Tumore gefärbt. Es lässt sich jedoch kein Unterschied in der MMP3- und MMP13- Expression zwischen den beiden Versuchsgruppen erkennen. Dieser Unterschied zwischen Array und Tumorfärbung könnte daran liegen, dass es sich bei den Arrays um die DLD1- Zellen handelt, bei den Tumoren jedoch um die HT29 Zellen. Die mRNA für MMP13 war in der Next Generation Sequenzierung im Vergleich Knockdownzellen gegen Knockdowntumore signifikant herauf reguliert. Die Differenzen hier können sich auf das später (vgl. Seite 110) beschriebene Phänomen der Übertragbarkeit mRNA- auf Proteinebene handeln. Die Tatsache, dass weder MMP3 noch MMP13 auf Proteinebene unterschiedlich exprimiert werden, könnte darauf hindeuten, dass es sich hierbei nicht um die für die Metastasierung wichtigen MMPs handelt.

Tumorzellen müssen in Gefäße einwandern um zum Ort der Metastasierung zu gelangen. Hierfür müssen sie sowohl fähig sein, mit der extrazellulären Matrix zu interagieren als auch diese aufzulösen (Guan 2015). Zudem können Tumore ab einer gewissen Größe nicht mehr per Diffusion mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Daher ist die Anregung der Angiogenese notwendig. Hierbei werden von Tumorzellen Faktoren sezerniert, die Endothelzellen dazu anregen in die Richtung der Tumore neue Gefäße zu bilden (Mathonnet *et al* 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl HT29- als auch DLD1- Zellen *in vitro* die Bildung von Tubes anregen, jedoch konnte kein Einfluss des CAR- Knockdowns auf die Bildung der Tubes festgestellt werden. So können DLD1 pLVX scr- Zellen die Anzahl der Tubes signifikant von 151 Tubes auf 246 Tubes erhöhen, die DLD1 pLVX CAR- Zellen auf 225,6. Die HT29 pLVX scr- Zellen erhöhen die Anzahl der Tubes nicht signifikant auf 204,3, bzw. die HT29 pLVX CAR- Zellen die Anzahl signifikant auf Zellen auf 223,3.

Für die Angiogenese sind verschiedene Moleküle wie z. B. MMP7 und MMP9 wichtig, zwei MMPs, die beide im ECM- Array mindestens 3- fach auf RNA- Ebene reguliert waren. Es konnte gezeigt werden, dass die Verminderung der Expression von MMP7 zu einer Abnahme der Angiogenese im *in vitro* Versuch mit HUVECs führt (Zhang *et al* 2012). Zudem handelt es sich bei MMP9 um einen angiogenen Faktor sowie eine funktionelle Komponente des Angiogenese- Schalters im Tumor (Bhoopathi *et al* 2010, Bergers *et al* 2000, Coussens *et al* 2000). Dies gründet möglicherweise auf der Erhöhung der Verfügbarkeit von VEGF (Bergers *et al* 2000). In Mäusen, denen MMP9 fehlt, ist die Angiogenese und somit das ganze Tumorstadium verzögert. MMP9 kann folglich Proliferation und Angiogenese stimulieren, indem es die Bioverfügbarkeit von angiogenen Wachstumsfaktoren erhöht (Coussens *et al* 2000). Mögliche Lieferanten von MMP9 sind Zellen des Tumorstadiums (Belotti *et al* 2008), wie neutrophile Granulozyten, Mastzellen oder Makrophagen (Coussens *et al* 2000). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass diese Zellen MMP9 *in vivo* zur Verfügung stellen (Coussens *et al* 2000). In dem Angiogeneseversuch war jedoch nur das Medium verwendet worden, das mit den Tumorzellen konditioniert wurde. Es wäre möglich, dass sich Auswirkungen auf die Angiogenese durch den CAR- Knockdown in diesem experimentellen Aufbau nicht nachweisen lassen, da sie indirekt sein könnten. Es wäre möglich, dass eventuelle Faktoren, die die Angiogenese beeinflussen können, nicht direkt von den Tumorzellen abgegeben werden und direkt auf die Endothelzellen wirken, sondern als Wirkungsort andere Zellen des Tumorstadiums haben, die dann wiederum die Angiogenese beeinflussen. So spielen zum Beispiel auch Zellen aus dem Knochenmark eine Rolle bei der pathologischen Angiogenese (Mathonnet *et al* 2014).

Sind die Zellen in die Blutbahn gelangt und haben dort überlebt, so müssen sie im Blutstrom erst einmal langsamer werden, danach fest an das Endothel adhären und anschließend in das umgebende Gewebe auswandern (Strell und Entschladen 2008). In dieser Arbeit wurde die Adhäsion an Endothel mit einer HUVEC- Beschichtung in Flussversuchen untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass sowohl die DLD1- Zellen als auch die HT29- Zellen an mit TNF $\alpha$  stimuliertes Endothel binden können. Bei HT29 pLVX scr- Zellen haften 1,6 Zellen pro Minute an unstimuliertes Endothel, bei den Knockdownzellen eine Zelle. Nach Stimulation erhöht sich die Anheftung auf 13,6 Zellen pro Minute bei den HT29 pLVX scr- Zellen bzw. 15,6 Zellen pro Minute bei den HT29 pLVX CAR- Zellen. Ein ähnliches Bild zeigen die DLD1- Zellen. Hier haften bei den Kontrollzellen auf unstimuliertem Endothel 0,6 Zellen bzw. zwei Zellen pro Minute. Nach der Stimulation erhöht sich die Anheftung auf 17

bzw. 11,3 Zellen pro Minute. Jedoch war keine Auswirkung des CAR- Knockdowns festzustellen.

Über den Zusammenhang von CAR und der Adhäsion an Endothel ist noch nicht viel bekannt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass es bei einer forcierten Expression von CAR in Rhabdomyosarkomzellen zu einer verminderten Adhäsion an Fibronectin und Vitronectin kommt (Majhen *et al* 2011). Hierbei handelt es sich um statische Versuche. Einige Moleküle, die wichtig für die Anheftung sind, entfalten jedoch erst unter Scherkräften ihre Wirkung, die in einem statischen Versuch so nicht nachgestellt werden kann (Geng *et al* 2012).

Für die Adhäsion ans Endothel gibt es das Modell der Adhäsionskaskade, bei der die Selektine die erste schwache Interaktion, das Rollen, mit dem Endothel vermitteln (Strell und Entschladen 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl HT29- als auch DLD1- Zellen nur in Subpopulationen E- und P- Selektin binden können. So binden bei den DLD1- Zellen in der Kontrolle 6,6 % der Zellen P- Selektin, nach CAR Knockdown 9,5 %. Bei den HT29- Zellen sieht es ähnlich aus. Hier binden bei den Kontrollzellen 6,0 % der Zellen P- Selektin, nach CAR- Knockdown sind es 9,3 %. Der CAR- Knockdown hat also keinen Einfluss auf die Bindung von P- Selektin. Bei E- Selektin sieht es bei den HT29- Zellen ähnlich aus. Hier binden in den Kontrollzellen 21,3 % der Zellen E- Selektin, nach CAR- Knockdown 22,8 %. Lediglich bei den DLD1- Zellen konnte nach CAR- Knockdown eine signifikante Zunahme des Anteils der E-Selektin- bindenden Zellen beobachtet werden. So erhöhte sich der Anteil von 8,4 % bei den Kontrollzellen auf 43,4 % bei den Knockdownzellen. Da aber die Bindung von Selektinen in der Durchflusszytometrie nicht der physiologischen Umgebung entspricht, wurden Flussversuche auf Selektinbeschichtungen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Zellen in der Regel signifikant besser an den Selektinen als an den Fc- Fragmenten haften, jedoch war hier kein Einfluss des CAR- Knockdowns auf die Adhäsion nachweisbar. Die Anheftung von DLD1- Zellen erhöht sich nach CAR- Knockdown an P- Selektin von 4 Anheftungen auf 12,66 bzw. von 4,66 auf 7 Zellen pro Minute bei E- Selektin. Bei HT29- Zellen reduziert sich die Anheftung an P- Selektin nach CAR- Knockdown von 6 Zellen pro Minute auf 4,66, bei E- Selektin erhöht sie sich von 7,6 Zellen pro Minute auf 9,66 Zellen pro Minute.

Der Unterschied in der Anzahl der Lungenmetastasen ist nicht durch einen Unterschied der Selektin- Liganden- Expression zu erklären, da die Zellen gleich gut im Flussversuch an die HUVECs und die Selektine anheften können. Die feste Adhäsion sowie das Durchwandern der Tumorzellen wird durch Integrine vermittelt (Strell und Entschladen 2008). Von daher wurde ein möglicher Einfluss des CAR- Knockdowns auf diese Proteine untersucht. In dieser

Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Zellkultur Integrin  $\alpha v$  und Integrin  $\beta 1$  in HT29-Zellen nach CAR Knockdown 20 % bzw. 66 % mehr auf der Zelloberfläche nachweisbar sind, bzw. von Integrin  $\beta 4$  nur noch 92 % der Oberflächenexpression der Kontrollzellen nach CAR- Knockdown vorhanden ist. Die Expression von Integrin  $\beta 4$  auf der Zelloberfläche war bei den DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown auf 191 % erhöht. Integrin  $\alpha v$  und Integrin  $\beta 1$  werden jedoch nach CAR- Knockdown vermindert exprimiert, d. h. es sind nur noch 80 % bzw. 84 % der Oberflächenexpression nach CAR- Knockdown nachweisbar.

In klinischen Proben von invasiven Harnblasenkarzinomen wurde gezeigt, dass die erhöhte Expression von Integrin  $\alpha v$  mit einer gleichzeitig verringerten Expression von CAR einhergeht (Sachs *et al* 2002). In B16- Zellen wurde gezeigt, dass die forcierte Expression von CAR zu einer Suppression der Integrine  $\alpha v$ ,  $\alpha 4$ ,  $\beta 3$  und  $\beta 1$  auf mRNA- Ebene führt (Yamashita *et al* 2007). Zwischen mehreren verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien konnte kein Unterschied in der Expression von CAR nachgewiesen werden. Alle Zelllinien exprimierten CAR, wobei bei der PC3- Zelllinie eine reduzierte CAR- Expression nachgewiesen wurde. Jedoch exprimierten alle Zelllinien Integrin  $\alpha v\beta 5$  (Pandha *et al* 2003). Dieses Ergebnis wurde in Melanomzelllinien bestätigt. Während von fünfzehn verschiedenen Zelllinien nur vier CAR exprimieren, exprimieren jedoch bis auf zwei Zelllinien alle entweder Integrin  $\alpha v\beta 5$  oder Integrin  $\alpha v\beta 3$  oder sogar beide Integrine (Hemmi *et al* 1998). In Rhabdomyosarkomzellen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CAR zu keiner Veränderung der mRNA- Level der Integrine  $\alpha v$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  und  $\beta 5$  führt. Auch auf Proteinebene konnte keine Veränderung der Integrine  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  nach forcierter CAR- Expression nachgewiesen werden. Die Heterodimere der Integrine  $\alpha v\beta 3$  und  $\alpha v\beta 5$  sind jedoch nach CAR- Überexpression vermindert exprimiert, ebenso wie die Gesamtexpression von Integrin  $\alpha v$  (Majhen *et al* 2011). Die Ergebnisse in der Literatur sind also für jede Zelllinie und Tumorentität unterschiedlich, decken sich daher also auch nur teilweise mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen. In den HT29- Zellen stimmt die Herabregulation von Integrin  $\alpha v$  und Integrin  $\beta 1$  mRNA nach CAR- Heraufregulation (Yamashita *et al* 2007) auf Proteinebene überein, da in dieser Arbeit nach CAR- Knockdown diese Integrine vermehrt auf der Oberfläche nachweisbar sind. Gleichzeitig muss man beachten, dass es sich bei den Ergebnissen von Yamashita *et al* (2007) um mRNA Ergebnisse handelt, es sich bei den obigen Ergebnissen der HT29- Zellen in dieser Arbeit jedoch um die tatsächlich auf der Oberfläche vorhandenen Proteine handelt.

In der Next Generation Sequenzierung, in der die mRNA untersucht wurde, wurde in den HT29- Zellen eine Heraufregulation von Integrin  $\alpha v$  auf 130 % des Levels der Kontrollzellen

nach CAR- Knockdown festgestellt, aber eine leichte Herabregulation von Integrin  $\beta 1$  um 10 %. Auch dies stimmt mit den von Yamashita *et al* (2007) beschriebenen Befunden überein.

Dass in Rhabdomyosarkomzellen Integrine  $\alpha v$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  und  $\beta 5$  durch eine Überexpression von CAR nicht beeinflusst wurden (Majhen *et al* 2011), kann in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Zumindest Integrin  $\alpha v$  ist in der Next Generation Sequenzierung signifikant reguliert worden. Das Ergebnis der Durchflusszytometrie bezüglich Integrin  $\alpha v$  passt jedoch zumindest tendenziell zu der Beobachtung, dass nach CAR- Überexpression Integrin  $\alpha v$  vermindert exprimiert wird (Majhen *et al* 2011). In dieser Arbeit wird Integrin  $\alpha v$  nach CAR- Knockdown tendenziell, aber nicht signifikant mehr in den HT29- Zellen auf der Oberfläche exprimiert.

In der Klinik wurde in Proben von Patienten bereits gezeigt, dass CAR als Marker für die Dedifferenzierung von Tumoren geeignet ist und der Verlust von CAR gleichbedeutend mit dem Fortschreiten der Erkrankung, d. h. der Bildung von Metastasen, ist (Korn *et al* 2006, Zhang *et al* 2008). Deswegen wurden in dieser Arbeit humane Kolonkarzinomzellen genetisch dahingehend verändert, dass sie weniger CAR exprimieren. Um möglichst viele Schritte der Metastasierung möglichst nah an der klinischen Situation nachvollziehen zu können wurden Xenograftmodell verwendet.

Xenograftmodelle erlauben, dass viele Schritte von humanen Tumorzellen im Tier nachvollzogen werden können. Jedoch wird hierbei nicht die spontane Entartung von normalen Zellen zu Tumorzellen abgebildet. Durch die subkutane Injektion der Zellen müssen sich zunächst Tumore entwickeln, deren Zellen dann in Gefäße invadieren können. Die Zellen müssen im Blutstrom überleben, am Ort der Metastasierung an das Endothel anheften und in das umgebende Gewebe auswandern um so schließlich Metastasen bilden zu können (Valastyan und Weinberg 2011).

Um diesen komplexen Prozess nachvollziehen zu können wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Ansätze von Tierversuchen durchgeführt. Zuerst wurde ein Endpunktversuch durchgeführt um die Auswirkung des CAR- Knockdowns auf das Tumorstadium zu beobachten. Anschließend wurde ein Xenograftversuch mit Überlebenskurve durchgeführt um zum einen die Auswirkung des CAR- Knockdowns auf das Überleben der Tiere zu untersuchen und zum anderen gleiche Tumorstadien für weitere Analysen zu erreichen.

Bei dem Endpunktversuch wurden alle Tiere zum gleichen Zeitpunkt getötet. Es zeigte sich, dass bei subkutaner Injektion von HT29- Zellen nach CAR- Knockdown signifikant kleinere Primärtumore entstehen. So wiegen die Tumore in der Kontrollgruppe im Durchschnitt 0,41

g, die in der Knockdowngruppe 0,28 g. Im Blut ist kein Unterschied der Anzahl der Tumorzellen zwischen den beiden Versuchsgruppen zu messen. Die Tiere der Kontrollgruppe haben im Durchschnitt 26,74 Zellen pro 200 µl Blut, die der Kontrollgruppe 36,27 Zellen pro 200 µl Blut. Zudem sind signifikant mehr Tumorzellen in der ALU- PCR des Lungenflügels nachweisbar. Dieser Befund wird durch die Untersuchung der HE- Schnitte des kontralateralen Lungenflügels bestätigt. In der Kontrollgruppe sind 2,08 Zellen pro 60 ng Template bzw. 502 Metastasen, in der Knockdowngruppe 0,8745 Zellen pro 60 ng Template bzw. 236,8 Metastasen zu finden.

Das verminderte Tumorumfang nach CAR- Knockdown im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde bereits für Bronchialkarzinomzellen beobachtet (Veena *et al* 2009). Jedoch finden sich in der Literatur wesentlich mehr Hinweise darauf, dass die Überexpression von CAR zu einem verminderten Tumorumfang führt. Somit sind die Daten in dieser Arbeit zum großen Teil gegenläufig zu den meisten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen sowohl in Kolonkarzinomzellen als auch in Zellen anderer Tumorentitäten.

Das verminderte Tumorumfang nach Heraufregulation von CAR wurde bereits für die Prostatazelllinie PC3 beschrieben (Okegawa *et al* 2000). Auch in den Gliomzelllinien U- 118 MG (Kim *et al* 2003), U87- Zellen (Huang *et al* 2005) und der Mausmelanomzelllinie B16 (Yamashita *et al* 2007) werden nach Heraufregulation von CAR kleinere Tumore beobachtet als in den Kontrollgruppen. In der Kolonkarzinomzelllinie SW480 wurde ebenfalls nach ektopter CAR- Expression ein reduziertes Tumorumfang beschrieben (Stecker *et al* 2011). In Xenograftmodellen mit Gliomzellen zeigte sich, dass Zellen, die keine CAR- Expression zeigen, deutlich schneller in Nacktmäusen anwachsen als die CAR- positiven Tumore (Fuxe *et al* 2003).

Bei dem Xenograftversuch mit der Überlebenskurve wurde die Auswirkung des CAR- Knockdowns auf das Überleben der Tiere untersucht. Zwei Tiere hatten nach der Injektion der Knockdownzellen kein Tumorumfang. Bei allen anderen Tieren hat sich ein Tumor entwickelt. Die beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich jedoch nicht signifikant in ihrem Tumorgewicht. Die Tumore der Kontrollgruppe waren im Schnitt 0,60 g schwer, die der Knockdowngruppe 0,41 g. Vermindertem Anwachsen nach CAR- Knockdown wurde im Tiermodell bereits für Bronchialkarzinomzellen beschrieben (Qin *et al* 2004, Veena *et al* 2009). Es wäre also möglich, dass die Zellen in den beiden Tieren, die in dieser Arbeit kein Tumorumfang aufweisen, auf Grund des CAR- Knockdowns nicht erfolgreich im Tier anwachsen konnten. Es ist jedoch auffällig, dass dies bei beiden Tierversuchen, die durchgeführt wurden, lediglich bei einem Versuch dazu kam, dass Zellen nicht angewachsen

sind. Veena *et al* (2009) haben jedoch die Ergebnisse von Qin *et al* (2004) reproduzieren können und hatten in jedem Versuch Tiere, bei denen die Zellen nicht angewachsen sind. Es wurde beschrieben, dass bei einem von fünf Tieren, bei denen sich zuerst kein Tumor entwickelt hat, 12 Wochen nach der Injektion doch noch ein tastbarer Tumor entwickelt hat. Die Tiere, die die Kontrollzellen injiziert bekommen hatte, d. h. die Zellen, die CAR exprimierten, wurden spätestens 52 Tage nach der Injektion der Tumorzellen getötet (Qin *et al* 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere, die keinen Tumor hatten, nach 69 Tagen getötet. Es wäre also möglich, dass sich auch hier noch ein Tumor hätte entwickeln können, wenn der CAR- Knockdown ein verzögertes Anwachsen zur Folge haben kann. Lässt man die Tiere ohne Tumor bei der Kaplan- Meyer- Kurve unberücksichtigt, so war kein Unterschied im Überleben der Tiere mit Kontrollzellen, die im Mittel 28 Tage überlebten, oder Knockdownzellen, mit denen die Tiere im Mittel 34 Tage überlebten, zu verzeichnen. Berücksichtigt man die Tiere ohne Tumor jedoch, so überleben die Tiere, die die Knockdownzellen injiziert bekommen haben signifikant länger als die Kontrolltiere. Klinische Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem Verlust von CAR in Tumoren des Kolons im Vergleich zu normalem Gewebe (Reeh *et al* 2013) zeigten, dass der Verlust von CAR mit einem verringerten Überleben der Patienten einher geht (Anders *et al* 2009b). Diese Daten stehen im Gegensatz zu den Daten aus dem Tierversuch. Dies könnte auf ein Problem der Übertragbarkeit von Daten aus Mausmodellen in die Klinik hinweisen, auf welches später (vgl Seite 110) kurz eingegangen wird.

Dadurch, dass die Tiere des Versuchs mit der Überlebenskurve erst bei Erreichen eines Abbruchkriteriums getötet wurden, was hier meist die Exulzeration des Tumors war, sind die Tumore gleich groß. In der Lunge sind, trotz gleicher Tumorgroße, in der Kontrollgruppe mit 2,64 Zellen pro 60 ng Template mehr Tumorzellen zu finden als in der Knockdowngruppe, die nur 0,09 Zellen pro 60 ng Template in der Lunge aufweisen. Dieser Befund wird durch die Untersuchung der HE- Schnitte des kontralateralen Lungenflügels bestätigt. In der Gruppe, die die Knockdownzellen injiziert bekommen hatten, sind durchschnittlich 573,2 Metastasen zu finden, in der Gruppe mit den Knockdownzellen nur 64,71 Metastasen. Im Endpunktversuch waren die Tumore in der Kontrollgruppe mit 0,41 g größer als die der Knockdowngruppe mit 0,28 g. Auch hier sind in der Lunge mehr Zellen in der Kontrollgruppe (2,08 Zellen pro 60 ng Template) als in der Knockdowngruppe (0,8745 Zellen pro 60 ng Template) zu finden. Dies hätte aber ohne den Endpunktversuch auf die größere Tumormasse zurückzuführen sein können. Auf Grund der Resultate aus dem Versuch mit der Überlebenskurve kann man aber sagen, dass CAR unabhängig von der Tumorgroße einen

Einfluss auf die Metastasierung in die Lunge zu haben scheint bzw. CAR ein Faktor ist, der die Metastasierung in die Lunge beeinflusst.

In B16- Mausmelanomzellen wurde CAR heraufreguliert, die Zellen in die Schwanzvene von Mäusen injiziert und die auf der Oberfläche sichtbaren Lungenmetastasen gezählt. Die Zellen, die eine erhöhte CAR- Expression haben, haben weniger Metastasen in der Lunge gebildet. Auch die murine Kolonkarzinomzelllinie CT26 führt zu dem gleichen Ergebnis (Yamashita *et al* 2007). In SW480 Kolonkarzinomzellen wurde CAR mittels siRNA herabreguliert und in die Milz von Mäusen injiziert. Während bei den Tieren, die die Knockdownzellen erhielten, in allen Fällen Metastasen in der Milz sichtbar sind, waren lediglich in einem Tier (14 %) der Kontrollgruppe Metastasen in der Milz zu sehen. Hierbei ist die Anzahl der Metastasen im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht (Stecker *et al* 2011). Diese Ansätze bilden jedoch nicht die ganze metastatische Kaskade ab, da die Entwicklung des Primärtumors, die Vaskularisierung und die Dissemination in den Blutstrom hierbei nicht abgebildet werden.

Die Ergebnisse der oben genannten Studien stehen im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Lungenmetastasen. So weisen die Tiere im Endpunktversuch in der Kontrollgruppe mit 2,08 Zellen pro 60 ng Template bzw. 502 Metastasen mehr Zellen bzw. Metastasen auf als die Tiere, die die Knockdownzellen erhalten haben. Bei letzteren sind nur 0,8745 Zellen pro 60 ng Template zu finden bzw. 236,8 Metastasen. Auch im Tierversuch mit der Überlebenskurve ist dieses Ergebnis zu beobachten. Die Tiere der Kontrollgruppe haben 2,64 Zellen pro 60 ng Template in der Lunge bzw. 573,2 Metastasen, wohingegen die Tiere, die die Knockdownzellen injiziert bekommen haben, nur 0,09 Zellen pro 60 ng Template bzw. 64,71 Metastasen in der Lunge haben. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die oben genannte Tatsache sein, dass die Zellen in den Versuchen direkt in den Blutstrom bzw. die Milz injiziert wurden und somit die Entwicklung des Primärtumors und die Dissemination in den Blutstrom nicht durchlaufen werden muss. Hiermit fallen zwei der limitierenden Schritte in der metastatischen Kaskade weg.

Die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen unterscheidet sich statistisch nicht signifikant zwischen den beiden Versuchsgruppen in beiden Tierversuchen. Im Endpunktversuch sind in der Kontrollgruppe mit 26,74 Zellen pro 200 µl Blut tendenziell weniger Zellen zu finden als in den Knockdowntieren, die 36,27 Zellen pro 200 µl haben. Im Versuch mit der Überlebenskurve ist die Tendenz der Zellen im Blut umgekehrt. Hier haben die Tiere in der Kontrollgruppe mit 636,3 Zellen mehr Zellen im Blut als die Knockdowngruppe mit 257,8 Zellen. Die Anzahl der Zellen im Blut kann also alleine keine Erklärung für die verringerte Zahl an Zellen bzw. Metastasen in den Lungen der Knockdowntiere im Vergleich zu den

Kontrolltieren sein. Zudem könnte man vermuten, dass CAR keinen Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen im Blut hat, da sich die Anzahl der Zellen im Blut in den Gruppen nicht unterscheidet. Um diesen Punkt abschließend zu klären, müsste man jedoch ermitteln, wie viele Zellen wirklich in den Blutstrom abgegeben werden und wie viele hier überleben können.

Der Knockdown von CAR hat keinen Einfluss auf die Struktur des Tumors bezüglich des Bindegewebes, wie es die Masson- Goldner- Färbung ergab. In der Literatur ist bezüglich der Auswirkung des CAR- Status auf die Struktur des Bindegewebes in Xenograftmodellen nichts bekannt.

Da das Tumorwachstum nach CAR- Knockdown in den HT29- Zellen im Endpunktversuch signifikant reduziert ist, wurde untersucht, ob dieses Ergebnis an der Proliferation der Tumorzellen liegt. Ebenfalls wurde in den Tumoren die Anzahl der mitotischen und apoptotischen Zellen ermittelt, da unter Umständen der kleinere Tumor auch an einer vermehrten Apoptose liegen könnte. *In vivo* ist in dem Endpunktversuch kein Unterschied der Proliferation in der Ki67- Färbung zu sehen. Die Tumore, die aus den Kontrollzellen gewachsen sind, haben im Schnitt 118,7 Ki67- positive Zellen, die aus den Knockdownzellen entstandenen 114,2 ( $p = 0,75$ ). In dem Versuch mit der Überlebenskurve sind jedoch in den Kontrolltumoren mehr proliferierende Zellen zu sehen, d. h. in den Tumoren, die aus den Kontrollzellen gewachsen sind, waren 140,8 Ki67- positive Zellen zu finden, 119,5 Ki67- positive Zellen in denen, die aus den Knockdownzellen entstanden sind. Die Ki67- Befunde aus beiden *in vivo*- Versuchen stehen also im Gegensatz zu den *in vitro* Befunden dieser Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass HT29- Zellen nach CAR- Knockdown 70 % stärker proliferieren als die Kontrollzellen. Hierbei ist zu bedenken, dass es sich bei dem *in vitro* XTT- Versuch um einen Versuch handelt, in dem nur die HT29- Zellen verwendet wurden, in dem Tumor jedoch potentiell Wirtszellen sein könnten, die einen Beitrag zum Wachstum leisten (Mathonnet *et al* 2014). Die Auswirkung von CAR auf die Proliferation verschiedener Zelllinien wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Bei der Prostatakarzinomzelllinie PC3 wurde gezeigt, dass eine Heraufregulation von CAR zu einem verminderten Tumorwachstum führt, das auf eine verminderte Zellproliferation zurückzuführen ist (Okegawa *et al* 2000). Auch in den Blasenkarzinomzellen T24 wurde ein wachstumshemmender Effekt der CAR- Überexpression beschrieben (Okegawa *et al* 2001). Umgekehrt führt die Herabregulation von CAR in 253J- und RT4- Zellen sowie den Ösophaguskarzinomzelllinien OE19 und OE33 zu einer Zunahme des Zellwachstums (Okegawa *et al* 2001, Anders *et al* 2009a). Auch in den Kolonkarzinomzelllinien AGS, DLD1

und HCT116 kann nach CAR- Knockdown eine erhöhte Zellproliferation nachgewiesen werden (Anders *et al* 2009b, Stecker *et al* 2011). Diese Befunde decken sich mit den *in vitro* Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Zusätzlich gibt es auch noch gegenläufige Befunde. In der Plattenepithelkarzinomzelllinie HSC2 konnte gezeigt werden, dass die Verringerung der CAR- Expression zu einer reduzierten Proliferation führt (Saito *et al* 2014). Es gibt jedoch auch Arbeitsgruppen, die beschreiben, dass CAR keinen Einfluss auf das Zellwachstum hat. In der Mausmelanomzelllinie B16 sowie in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 und den Nicht- Kleinzelligen- Lungenkarzinomzellen NCI- H1703 sind keine Auswirkungen von einer CAR- Überexpression auf das Zellwachstum zu beobachten (Yamashita *et al* 2007, Brüning und Runnebaum 2004, Qin *et al* 2004).

Es ist bereits postuliert worden, dass es sich bei der unterschiedlichen CAR- Expression zwischen verschiedenen Tumorentitäten um ein entitätenspezifisches Phänomen handelt (Reeh *et al* 2013). Auf Grund der Befunde in dieser Arbeit, dass die HT29- Zellen sich zum Teil gegenläufig zu den DLD1- Zellen verhalten, d. h. dass sich in den DLD1- Zellen zum Beispiel an der Expression von Integrin  $\beta 1$  nichts nach CAR- Knockdown ändert, in den HT29- Zellen dieses aber signifikant heraufreguliert wird, wohingegen die DLD1- Zellen nach CAR- Knockdown Integrin  $\beta 4$  signifikant heraufregulieren, hier aber bei den HT29- Zellen nichts passiert, könnte man davon ausgehen, dass die Auswirkungen des CAR- Knockdowns vielleicht sogar zelllinienspezifisch sein könnten.

Sowohl im Endpunktversuch als auch bei dem Überlebensversuch ist in den Tumoren histologisch zu erkennen, dass die Anzahl der apoptotischen Zellen die der mitotischen übersteigt. So liegt bei dem Endpunktversuch die Anzahl der apoptotischen Zellen in der Kontrollgruppe bei 3 %, in der Knockdowngruppe bei 2,02 %, die der mitotischen Zellen in der Kontrollgruppe bei 4,75 %, in der Knockdowngruppe bei 5,9 %. Der CAR- Status der Tumore hat jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl der mitotischen oder apoptotischen Zellen. An SW480-, DLD1- und HCT116- Zellen konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von CAR zu einer signifikant höheren Aktivität von Caspase 3/7 führt, d. h. dass sie anfälliger für Apoptose sind (Stecker *et al* 2011). Dies deckt sich nicht mit den *in vivo* Befunden dieser Arbeit, in der der CAR- Status keinen Einfluss auf die Apoptoserate im Tumor hat.

Die Next Generation Sequenzierung wurde an den Tumorzellen aus der Zellkultur sowie den Tumoren durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass der Vergleich der Tumorzellen mit den entsprechenden Primärtumoren immer die Wirtszellen, die in den Tumor eingewandert sein können, mit einschließt. Dies kann ein Grund für Unterschiede in diesem Vergleich sein. Hierbei ist jedoch die Situation im Primärtumor eine, die der physiologischen entspricht, da

die Zellen aus der Zellkultur eben keine Interaktionen eingehen können, die es unter realen physiologischen Bedingungen gibt. Außerdem gibt es oft Unterschiede zwischen der Menge bzw. der Veränderung der mRNA in den Zellen nach CAR- Knockdown und der tatsächlichen, in der Durchflusszytometrie beobachteten Proteinexpression. Dies kann unter Umständen an der Regulation der Translation liegen. Hierbei handelt es sich um einen Mechanismus, der dafür sorgen kann, dass die Menge von aktiven Protein in der Zelle reguliert wird. So kann zum Beispiel die Menge der an die mRNA gebundenen Ribosomen einen Einfluss darauf haben, wie viel Proteinmoleküle aus einem mRNA- Molekül entstehen. Auch posttranslationale Modifikationen können die Funktion des Proteins beeinflussen (Purves *et al* 2006).

In Versuchen, in denen die Adhäsion von Tumorzellen an Endothel untersucht werden soll, werden häufig HUVECs verwendet. Hierbei liegt das Problem darin, dass es sich um Endothelzellen aus der Nabelschnur handelt, die Interaktionen bei der Tumorentstehung aber meist in der Mikrovaskulatur stattfinden. Die HUVECs unterscheiden sich jedoch phänotypisch von den Endothelzellen der anatomischen Lokalisationen der tatsächlichen Metastasen (Orr *et al* 2000). HUVECs ähneln demnach nach der *in vitro* Stimulation mit proinflammatorischen Faktoren der Makrovaskulatur *in vivo* im Hinblick auf die Expression von E- Selektin, I-CAM1 und VCAM (Müller *et al* 2002) und somit nicht der Mikrovaskulatur, dem Entstehungsort der Metastasen.

Ein weiterer Punkt, warum *in vitro* Versuche nicht immer die Ergebnisse aus Xenograftmodellen erklären können, ist die Tatsache, dass in Xenograftmodellen immer noch ein gewisser Teil von Zellen aus dem Tumorstamm einen Beitrag zur Tumormasse leisten. So sind zum Beispiel Makrophagen an der Migration beteiligt (Wyckoff *et al* 2004), die *in vitro* unter Umständen nicht mit im Versuch verwendet werden oder werden können. Auch bei der Invasion oder Angiogenese spielen Faktoren, die von Zellen aus dem Tumorstamm sezerniert werden (Belotti *et al* 2008), wie z. B. MMP9 (Coussens *et al* 2000), eine Rolle, die aber zum Beispiel in den in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* Versuchen nicht mit verwendet wurden. Die Übertragung von Ergebnissen aus dem Labor, genauer gesagt den Xenograftmodellen auf die Klinik und somit den Menschen, ist nicht immer eins zu eins möglich. So werden bei den traditionellen Xenograftmodellen immer kultivierte Tumorzellen verwendet, die an verschiedenen Stellen des Tieres inokuliert werden, wie z. B. subkutan. Hier müssen sich die Tumorzellen zuerst einmal zu Knoten zusammenfinden und wachsen. Im Gegensatz zu diesem künstlich geschaffenen Tumor entstehen Tumore *de novo* und stammen von einer ehemals normalen Zelle in einer natürlichen Mikroumgebung. Am besten sind deswegen

spontane Tumormodelle (Bergers und Benjamin 2003). Diese haben aber wiederum den Nachteil der Expression von nicht- humanen Proteinen.

Außerdem werden in Xenograftmodellen humane, genetisch veränderte Zellen in einen fremden Organismus injiziert. Zudem sind die Tiere immundefizient, um die fremden Zellen nicht grundsätzlich abzustoßen, d. h. es fehlt in den Versuchen an einer wichtigen Komponente der realen Situation (van Marion *et al* 2016).

## 5. Zusammenfassung

Der Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR) wurde zuerst als funktioneller Rezeptor für das Anheften der Coxsackieviren B3 und B4 sowie für Adenoviren charakterisiert, was zu der Namensgebung führte. CAR hat jedoch als tight junction Protein auch physiologische Funktionen. Zudem ist seine verminderte Expression im Kolonkarzinom mit der malignen Progression der Erkrankung verknüpft.

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche Auswirkung der CAR- Knockdown auf die Metastasierung des kolorektalen Adenokarzinoms hat. Hierfür wurden humane Kolonkarzinomzellen mit Hilfe eines shRNA- Vektors so verändert, dass sie weniger CAR exprimieren als ihre Parentalzelllinien. Mit HT29- bzw. DLD1- Zellen wurden sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* Versuche durchgeführt. Hierbei sollten sowohl in der Durchflusszytometrie Proteine und deren Veränderungen durch den CAR- Knockdown direkt nachgewiesen, als auch mittels der Next Generation Sequenzierung die Veränderungen interessanter Zielproteine auf mRNA- Ebene untersucht werden. Zudem sollte auf funktioneller Ebene geklärt werden, welchen Einfluss die CAR- Expression auf die Proliferation, Angiogenese, Migration und Invasion hat. Die untersuchten Zellen wurden dann in Xenograftmodellen auf ihre Fähigkeit Metastasen zu bilden untersucht. Zudem wurden Proteine direkt durch histologische Färbungen an Schnitten von Tumoren der Xenograftversuche nachgewiesen um auch hier den Einfluss der CAR- Expression zu untersuchen.

In Zellproliferationstests (XTT) konnten die humanen Kolonkarzinomzellen HT29, welche in den Tierversuchen eingesetzt wurden, deutlich schneller proliferieren, wenn sie eine geringere CAR- Expression zeigten. Zudem konnte die Regulation von MMPs auf mRNA- Ebene und Integrinen auf mRNA- und Proteinebene durch den CAR- Knockdown gezeigt werden. Bezüglich der Expression von Selektinliganden hat sich nur in der humanen Kolonkarzinomzelllinie DLD1 die Fähigkeit E- Selektin zu binden signifikant durch den Knockdown erhöht. In Flussversuchen konnte jedoch kein signifikanter Einfluss auf die Adhäsion an Selektine nach CAR- Knockdown gezeigt werden, welcher auch auf humanen Endothelzellen (HUVECs) nicht zu beobachten war.

Die Xenograftmodelle zeigten, dass durch die verminderte Expression von CAR kleinere Tumore entstehen, die weniger Lungenmetastasen sowohl im Endpunktversuch, als auch im Versuch mit der Überlebenskurve, bilden. Schließt man die Tiere, die keinen Tumor ausgebildet haben, von der Analyse aus, so ergibt sich kein Überlebensvorteil durch eine vermehrte oder verminderte Expression von CAR. Jedoch scheint der Knockdown von CAR das Tumorwachstum zu verlangsamen bzw. das Anwachsen der Zellen ganz zu unterbinden.

Das unterschiedliche Tumorwachstum im Endpunktversuch konnte nicht auf eine Veränderung des Verhältnisses von Apoptose zu Mitose im Tumor zurückgeführt werden. Zudem hat diese Arbeit gezeigt, wie schwer *in vivo* Befunde mit den *in vitro* Ergebnissen in Einklang zu bringen sind. So metastasieren HT29- Zellen im Xenograftmodell, weisen aber unter Laborbedingungen kaum migratorisches Potential auf. Schlussendlich bleibt auch das Problem der Übertragbarkeit der Tierversuche in die Klinik bzw. auf den Menschen zu klären. Die Tiere, die einen Tumor trugen, hatten keinen Überlebensvorteil durch eine erhöhte CAR-Expression, hatten aber durch den Knockdown weniger Metastasen, welche der eigentliche Grund der Letalität einer Krebserkrankung sind.

## 6. Summary

The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) has first been characterized as receptor for the coxsackievirus B3 and B4 as well as the adenoviruses giving it its name. CAR is not only a virus receptor but functions as a tight junction protein as well. Furthermore its decreased expression in colorectal carcinoma correlates with cancer progression.

This thesis investigates the influence of a knockdown of CAR on metastasis formation in colorectal adenocarcinoma. For this purpose the CAR- expression in human colon cancer cells has been genetically manipulated with an shRNA- vector so that the cells express less CAR than the parental cells. With HT29- and DLD1- cells *in vivo* as well as *in vitro* experiments were carried out. By using flow cytometry assays proteins and the potential change of their expression caused by the knockdown of CAR should be investigated directly as well as the change in mRNA of interesting target proteins by using next generation sequencing. Furthermore it should be investigated on a functional level which influence the knockdown of CAR has on proliferation, angiogenesis, migration and invasion. Additionally proteins were directly stained on tumor sections of the xenograft experiments to directly investigate the influence of CAR- expression.

In XXT- assays human HT29- colon cancer cells, also used in the xenograft models, showed an increased proliferation after CAR- knockdown. Additionally a regulation of MMPs and integrins was seen on mRNA- and protein- level. Concerning the expression of selectin- ligands only in human DLD1- colon cancer cells the ability to bind to E- selectin has been increased by decreasing CAR- expression. In flow- adhesion- assays no significant influence of the decrease of CAR has been found neither on selectins alone nor on human endothelial cells (HUVECs). In general this thesis showed that it is cell line- dependent which proteins will be regulated due to the decrease of CAR and how it exactly affects the cells.

In xenograft models smaller tumors were observed by reducing the CAR- expression in cells as well as reduced lung metastases in both, the end point and the survival experiments and no benefit for the survival could be found if one excludes the animals without tumor growth. Yet the CAR- knockdown slowed down the growth of the cells or even inhibit the engraftment. The difference in tumor growth in the end point experiment cannot be attributed to a changed proportion of apoptosis to mitosis in the tumor itself since no effect of the CAR knockdown on the number of proliferating or dying cells was observed.

Furthermore this thesis showed how difficult it is to correlate *in vivo* findings to the *in vitro* results. HT29- cells metastasize in the animal model but they do not show any migratory potential *in vitro*. Finally there is the problem of translating the findings from the animal

experiments to the real life situation in humans. The animals had no advantage of survival having a higher CAR- expression and yet the animals injected with the knockdown cells had less lung metastases which are the actual reason for cancer being lethal.

## 7. Literaturverzeichnis:

Anders M, Rösch T, Küster K, Becker I, Hofler H, Stein HJ et al. Expression and function of the coxsackie and adenovirus receptor in Barrett's esophagus and associated neoplasia. *Cancer Gene Ther* 2009a

Anders M, Vieth M, Rocken C, Ebert M, Pross M, Gretschel S et al. Loss of the coxsackie and adenovirus receptor contributes to gastric cancer progression. *Br J Cancer* 2009b

Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015

Asaoka K, Tada M, Sawamura Y, Ikeda J, Abe H. Dependence of efficient adenoviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the Coxsackievirus and adenovirus receptor. *J Neurosurg* 2000

Auer D, Reimer D, Porto V, Fleischer M, Roessler J, Wiedemair A et al. Expression of coxsackie-adenovirus receptor is related to estrogen sensitivity in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009

Belotti D, Calcagno C, Garofalo A, Caronia D, Riccardi E, Giavazzi R et al. Vascular endothelial growth factor stimulates organ-specific host matrix metalloproteinase-9 expression and ovarian cancer invasion. *Mol Cancer Res* 2008

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000

Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003

Bhoopathi P, Chetty C, Gujrati M, Dinh DH, Rao JS, Lakka SS. The role of MMP-9 in the anti-angiogenic effect of secreted protein acidic and rich in cysteine. *Br J Cancer* 2010

Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1990

Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet* 2014

Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* 2010

Bruning A, Runnebaum IB. The coxsackie adenovirus receptor inhibits cancer cell migration. *Exp Cell Res* 2004

Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2011

Carpentier G, Martinelli M, Courty J and Cascone I. Angiogenesis Analyzer for ImageJ. 4th ImageJ User and Developer Conference proceedings. Mondorf-les-Bains, Luxembourg. ISBN: 2-919941-18-6 : 198-201, 2012.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002

Cherciu I, Barbalan A, Pirici D, Margaritescu C, Saftoiu A. Stem cells, colorectal cancer and cancer stem cell markers correlations. *Curr Health Sci J* 2014

Cho SH, Park YS, Kim HJ, Kim CH, Lim SW, Huh JW et al. CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion. *Int J Oncol* 2012

Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001

Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000

Davis BJ. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1964

Deryugina EI, Quigley JP. Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biol* 2015

Dorner AA, Wegmann F, Butz S, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Mack A et al. Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J Cell Sci* 2005

Excoffon KJ, Hruska-Hageman A, Klotz M, Traver GL, Zabner J. A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and growth. *J Cell Sci* 2004

Farmer C, Morton PE, Snippe M, Santis G, Parsons M. Coxsackie adenovirus receptor (CAR) regulates integrin function through activation of p44/42 MAPK. *Exp Cell Res* 2009

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003

Fok PT, Huang KC, Holland PC, Nalbantoglu J. The Coxsackie and adenovirus receptor binds microtubules and plays a role in cell migration. *J Biol Chem* 2007

Friedl P, Wolf K. Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res* 2008

Fuxe J, Liu L, Malin S, Philipson L, Collins VP, Pettersson RF. Expression of the coxsackie and adenovirus receptor in human astrocytic tumors and xenografts. *Int J Cancer* 2003

Geng Y, Marshall JR, King MR. Glycomechanics of the metastatic cascade: tumor cell-endothelial cell interactions in the circulation. *Ann Biomed Eng* 2012

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.: [www.gekid.de](http://www.gekid.de) (2014)

Giaginis CT, Zarros AC, Papaefthymiou MA, Papadopouli AE, Sfiniadakis IK, Theocharis SE. Coxsackievirus and adenovirus receptor expression in human endometrial adenocarcinoma: possible clinical implications. *World J Surg Oncol* 2008

Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B* 2015

Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004

Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C et al. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 2007

Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002

Hemmi S, Geertsen R, Mezzacasa A, Peter I, Dummer R. The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum Gene Ther* 1998

Huang KC, Altinoz M, Wosik K, Larochele N, Koty Z, Zhu L et al. Impact of the coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on glioma cell growth and invasion: requirement for the C-terminal domain. *Int J Cancer* 2005

Huang S, Van AM, Tedjarati S, McCarty M, Wu W, Langley R et al. Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J Natl Cancer Inst* 2002

Jojobic M, Schumacher U. Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into SCID mice. *Cancer Lett* 2000.

Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009

Kashimura T, Kodama M, Hotta Y, Hosoya J, Yoshida K, Ozawa T et al. Spatiotemporal changes of coxsackievirus and adenovirus receptor in rat hearts during postnatal development and in cultured cardiomyocytes of neonatal rat. *Virchows Arch* 2004

Kim M, Sumerel LA, Belousova N, Lyons GR, Carey DE, Krasnykh V et al. The coxsackievirus and adenovirus receptor acts as a tumour suppressor in malignant glioma cells. *Br J Cancer* 2003

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

Korn WM, Macal M, Christian C, Lacher MD, McMillan A, Rauen KA et al. Expression of the coxsackievirus- and adenovirus receptor in gastrointestinal cancer correlates with tumor differentiation. *Cancer Gene Ther* 2006

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970

Landini, Gabriel. Threshold Colour plugin (<http://imagej.1557.x6.nabble.com/Threshold-Colour-plugin-update-td3685734.html>)

Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Hall MC, Sagalowsky AI, Tseng CP et al. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res* 1999

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014

Majhen D, Stojanovic N, Speljko T, Brozovic A, De ZT, Osmak M et al. Increased expression of the coxsackie and adenovirus receptor downregulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin expression and reduces cell adhesion and migration. *Life Sci* 2011

Martin TA, Watkins G, Jiang WG. The Coxsackie-adenovirus receptor has elevated expression in human breast cancer. *Clin Exp Med* 2005

Mathonnet M, Perraud A, Christou N, Akil H, Melin C, Battu S et al. Hallmarks in colorectal cancer: angiogenesis and cancer stem-like cells. *World J Gastroenterol* 2014

Matsumoto K, Shariat SF, Ayala GE, Rauen KA, Lerner SP. Loss of coxsackie and adenovirus receptor expression is associated with features of aggressive bladder cancer. *Urology* 2005

Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004

Miller CR, Buchsbaum DJ, Reynolds PN, Douglas JT, Gillespie GY, Mayo MS et al. Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res* 1998

Mirza M, Raschperger E, Philipson L, Pettersson RF, Sollerbrant K. The cell surface protein coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) directly associates with the Ligand-of-Numb Protein-X2 (LNX2). *Exp Cell Res* 2005

Muller AM, Hermanns MI, Cronen C, Kirkpatrick CJ. Comparative study of adhesion molecule expression in cultured human macro- and microvascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 2002

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

Okegawa T, Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Zhou J, Hsieh JT. The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. *Cancer Res* 2000

Okegawa T, Pong RC, Li Y, Bergelson JM, Sagalowsky AI, Hsieh JT. The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res* 2001

Okegawa T, Sayne JR, Nutahara K, Pong RC, Saboorian H, Kabbani W et al. A histone deacetylase inhibitor enhances adenoviral infection of renal cancer cells. *J Urol* 2007

Ornstein L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann N Y Acad Sci* 1964

Orr FW, Wang HH, Lafrenie RM, Scherbarth S, Nance DM. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol* 2000

Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR et al. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* 2008

Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood* 2007

Pandha HS, Stockwin LH, Eaton J, Clarke IA, Dagleish AG, Todryk SM et al. Cocksackie B and adenovirus receptor, integrin and major histocompatibility complex class I expression in human prostate cancer cell lines: implications for gene therapy strategies. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2003

Pox CP, Schmiegel W. [Colorectal cancer]. *Dtsch Med Wochenschr* 2014

Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 2009

Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC: *Biologie* 7. Auflage. Spektrum, Heidelberg 2006

Qin M, Escudero B, Dohadwala M, Sharma S, Batra RK. A novel role for the coxsackie adenovirus receptor in mediating tumor formation by lung cancer cells. *Cancer Res* 2004

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016

Raschperger E, Thyberg J, Pettersson S, Philipson L, Fuxe J, Pettersson RF. The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis. *Exp Cell Res* 2006

Rauen KA, Sudilovsky D, Le JL, Chew KL, Hann B, Weinberg V et al. Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy. *Cancer Res* 2002

Reeh M, Bockhorn M, Gorgens D, Vieth M, Hoffmann T, Simon R et al. Presence of the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) in human neoplasms: a multitumour array analysis. *Br J Cancer* 2013

Reimer D, Steppan I, Wiedemair A, Concin N, Hofstetter G, Marth C et al. Soluble isoforms but not the transmembrane form of coxsackie-adenovirus receptor are of clinical relevance in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2007

Robert-Koch-Institut: [www.rki.de](http://www.rki.de) (2012)

Sachs MD, Rauen KA, Ramamurthy M, Dodson JL, De Marzo AM, Putzi MJ et al. Integrin alpha(v) and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder cancer. *Urology* 2002

Saito K, Sakaguchi M, Iioka H, Matsui M, Nakanishi H, Huh NH et al. Coxsackie and adenovirus receptor is a critical regulator for the survival and growth of oral squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2014

Salamon J, Hoffmann T, Elies E, Peldschus K, Johansen JS, Luers G et al. Antibody directed against human YKL-40 increases tumor volume in a human melanoma xenograft model in scid mice. *PLoS One* 2014

Sollerbrant K, Raschperger E, Mirza M, Engstrom U, Philipson L, Ljungdahl PO et al. The Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) forms a complex with the PDZ domain-containing protein ligand-of-numb protein-X (LNX). *J Biol Chem* 2003

Stecker K, Koschel A, Wiedenmann B, Anders M. Loss of Coxsackie and adenovirus receptor downregulates alpha-catenin expression. *Br J Cancer* 2009

Stecker K, Vieth M, Koschel A, Wiedenmann B, Rocken C, Anders M. Impact of the coxsackievirus and adenovirus receptor on the adenoma-carcinoma sequence of colon cancer. *Br J Cancer* 2011

Strell C, Entschladen F. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun Signal* 2008

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009

Tomko RP, Johansson CB, Totrov M, Abagyan R, Frisen J, Philipson L. Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res* 2000

Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009; 25(9):1105-1111.

Troeberg L, Nagase H. Zymography of metalloproteinases. *Curr Protoc Protein Sci* 2004

Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011

van Marion DM, Domanska UM, Timmer-Bosscha H, Walenkamp AM. Studying cancer metastasis: Existing models, challenges and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016

Veena MS, Qin M, Andersson A, Sharma S, Batra RK. CAR mediates efficient tumor engraftment of mesenchymal type lung cancer cells. *Lab Invest* 2009

Voura EB, Ramjeesingh RA, Montgomery AM, Siu CH. Involvement of integrin alpha(v)beta(3) and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell* 2001

Wang Y, Wang S, Bao Y, Ni C, Guan N, Zhao J et al. Coxsackievirus and adenovirus receptor expression in non-malignant lung tissues and clinical lung cancers. *J Mol Histol* 2006

Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011

Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 2004

Yamashita M, Ino A, Kawabata K, Sakurai F, Mizuguchi H. Expression of coxsackie and adenovirus receptor reduces the lung metastatic potential of murine tumor cells. *Int J Cancer* 2007

Zeimet AG, Muller-Holzner E, Schuler A, Hartung G, Berger J, Hermann M et al. Determination of molecules regulating gene delivery using adenoviral vectors in ovarian carcinomas. *Gene Ther* 2002

Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res* 2005

Zhang JL, Chen GW, Liu YC, Wang PY, Wang X, Wan YL et al. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) suppresses angiogenesis by down-regulating the expression of VEGF and MMP-7 in gastric cancer. *PLoS One* 2012

Zhang NH, Song LB, Wu XJ, Li RP, Zeng MS, Zhu XF et al. Proteasome inhibitor MG-132 modifies coxsackie and adenovirus receptor expression in colon cancer cell line lovo. *Cell Cycle* 2008

## 8. Anhang

### 8.1. Daten der ALU- PCR

Tier-ID	Zelllinie	Tumorgewicht in g	Metastasen HE
387-1-13	HT29 pLVX scr	0,54	1094,4
387-3-13	HT29 pLVX scr	0,08	0
387-4-13	HT29 pLVX scr	0,2	20,8
387-5-13	HT29 pLVX scr	0,54	618,64
388-1-13	HT29 pLVX scr	0,52	789,6
388-2-13	HT29 pLVX scr	0,5	717,6
388-3-13	HT29 pLVX scr	0,5	577,92
388-4-13	HT29 pLVX scr	0,38	374,4
388-5-13	HT29 pLVX scr	0,46	324,8
385-1-13	HT29 pLVX CAR	0,25	200
385-2-13	HT29 pLVX CAR	0,19	75,2
385-3-13	HT29 pLVX CAR	0,39	441,6
385-4-13	HT29 pLVX CAR	0,23	0
385-5-13	HT29 pLVX CAR	0,22	0
386-1-13	HT29 pLVX CAR	0,41	324
386-2-13	HT29 pLVX CAR	0,18	516,8
386-3-13	HT29 pLVX CAR	0,32	513,6
386-4-13	HT29 pLVX CAR	0,29	210,56
386-5-13	HT29 pLVX CAR	0,29	86,4

**Tabelle 8.1. Endpunktversuch Teil 1:** Dargestellt ist die ID der Tiere, sowie die injizierte Zelllinie, das Tumorgewicht in g und die im HE- Schnitt gezählten Metastasen.

Tier-ID	Knochenmark	Blut	Lunge
387-1-13	0,004732773	23	2,69
387-3-13	0,001201798	0	0
387-4-13	0,003399025	0	0
387-5-13	0,035046729	87,7	4,52
388-1-13	0,00249	49,05	3,09
388-2-13	0,0535	32,25	2,09
388-3-13	0,00191526	17,25	0,807
388-4-13	0,011090819	18,7	2,026
388-5-13	0,032321053	12,685	3,5
385-1-13	2,53	29,00	1,153
385-2-13	0,0076	35,50	0,0269
385-3-13	0,090801843	61,20	1,746
385-4-13	0,00862	55,00	0,983
385-5-13	0,011457182	99,25	0,842
386-1-13	0,02107	27,85	0,415
386-2-13	0,049859155	0,8805	0,45
386-3-13	0,0281	20,5	2,41
386-4-13	0,016739677	32,65	0,46
386-5-13	0,00706	0,8735	0,259

**Tabelle 8.2. Endpunktversuch Teil 2.** Dargestellt sind die Ergebnisse der PCR der jeweiligen Tiere. Angegeben sind die Zellen pro 60 ng Template im Knochenmark und in der Lunge, sowie pro 200µl Blut.

Tier ID:	Zelllinie	Tumorgewicht in g	Metastasen HE
438-1-14	HT29 pLVX CAR	0,04	0
443-1-14	HT29 pLVX CAR	0,36	0
454-1-14	HT29 pLVX CAR	0,32	50,56
454-2-14	HT29 pLVX CAR	0,39	25,6
455-1-14	HT29 pLVX CAR	0,27	0
475-1-14	HT29 pLVX CAR	0,54	81,6
497-1-14	HT29 pLVX CAR	0,98	295,2
530-1-14	HT29 pLVX CAR	0	0
530-2-14	HT29 pLVX CAR	0	0
432-1-14	HT29 pLVX scr	0,22	105,6
441-1-14	HT29 pLVX scr	0,29	420
441-2-14	HT29 pLVX scr	0,38	0
442-1-14	HT29 pLVX scr	0,45	511,2
442-2-14	HT29 pLVX scr	0,18	131,2
446-1-14	HT29 pLVX scr	1,35	1184
463-1-14	HT29 pLVX scr	0,62	1420,8
467-1-14	HT29 pLVX scr	1,41	1280
437-1-14	HT29 pLVX scr	0,54	105,6

**Tabelle 8.3. Überleben Teil 1.** Dargestellt ist die ID der Tiere, sowie die injizierte Zelllinie, das Tumorgewicht in g und die im HE- Schnitt gezählten Metastasen.

Tier ID:	Lunge	Blut	Knochenmark
438-1-14	0	0,0004645	0,01089
443-1-14	0,1298	7,5437E-09	0,016617
454-1-14	3,43E-08	87,85	0,001984
454-2-14	0	24,1011	0,0625
455-1-14	0,1948	5	0,1253
475-1-14	0,0969	177,5	0,00176
497-1-14	0,1934	1510	0,00752
530-1-14	0	1,685	0
530-2-14	0	370,5	0
432-1-14	0,0627	23,05	0,0012997
441-1-14	4,7843E-25	181,5	0,00073
441-2-14	20,43	79,45	0,01716
442-1-14	0,36	538,5	0,050256
442-2-14	0,271	66,65	0,01456
446-1-14	0,675	1155	5,92E-05
463-1-14	0,655	61,25	0,0205
467-1-14	1,233	3470	0,0274
437-1-14	0,1107	154	0,002246

**Tabelle 8.4. Überleben Teil 2.** Dargestellt sind die Ergebnisse der PCR der jeweiligen Tiere. Angegeben sind die Zellen pro 60 ng Template im Knochenmark und in der Lunge, sowie pro 200µl Blut.

## 8.2. Sequenzen

Die Sequenzen für die CAR- Knockdownsequenz bzw. den scr- Kontrollvektor wurden analog zu den Sequenzen von Anders *et al* 2009b gewählt und werden in 5' -> 3' Richtung angegeben.

pLVX CAR forward:

gatccGCCAAGTACCAAGTGAAGACTTCAAGAGAGTCTTCACTTGGTACTTGGTTTT  
TTACGCGTg

pLVX CAR reverse:

aattcACGCGTAAAAACCAAGTACCAAGTGAAGACTCTCTTGAAGTCTTCACTTGG  
TACTTGGCg

pVX scr forward:

gatccGCACAAAAGTATCGCGCAAGTTCAAGAGACTTGCGCGATACTTTTGTGTTTT  
TTACGCGTg

pLVX scr reverse:

aattcACGCGTAAAAACACAAAAGTATCGCGCAAGTCTCTTGAAGTCTTCACTTGGCGGATA  
TTTTGTGCg

## **9. Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Mario Anders für die Bereitstellung des Themas, durch die es mir ermöglicht wurde eine externe Doktorarbeit am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher, der mich am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie aufgenommen hat, mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in der histologischen Analyse meiner Schnitte unterwiesen hat.

Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner für die Übernahme des Zweitbetreuers und die herzliche Aufnahme in die Meetings seiner Arbeitsgruppe sowie der regen Diskussion meiner Ergebnisse in meinen Vorträgen.

Auch Frau Jennifer Schröder- Schwarz möchte ich für die herzliche Aufnahme danken. Zudem möchte ich ihr für die Hilfe bei der Eingewöhnung im Labor und in Hamburg danken, sowie für die hervorragende Einarbeitung und Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt zudem dem gesamten Team der Anatomie und Experimentellen Morphologie, die mir in den vier Jahren sowohl privat als auch beruflich immer zur Seite standen und mich in die verschiedenen Methoden eingearbeitet haben.

Besonderer Dank gilt hierbei Herrn Dr. Daniel Wicklein und Herrn Jr. Prof. Dr. Tobias Lange PhD für die Hilfe bei der Auswertung meiner Daten, der Unterstützung bei den Anfängen der Durchflusszytometrie und reger Diskussionen. Auch Frau Susanne Feldhaus und Herr Tobias Gosau möchte ich herzlich für die Hilfe bei den Tierversuchen danken. Frau Christine Knies und Frau Renate Gehrke danke ich für die Anleitung in der Zellkultur, sowie Frau Tjandrawati Cöllen und Frau Maike Märker für die Anleitungen bei der Anfertigung der histologischen Schnitte und den immunhistologischen Färbungen. Ganz besonderer Dank gilt auch Frau Hanna Maar, die mir in vielen Bereichen helfend zur Seite stand.

Auch Frau Estefania Rodriguez- Burgos möchte ich herzlich für die Hilfe bei der Fehlersuche bei meinem Westernblot danken.

Frau Jasmin Wellbrock gilt der Dank bei den ersten Entwürfen für die Angiogenese-Versuche.

Des weiteren möchte ich Herrn Kristoffer Rieken für die Transduktion der Zellen, sowie Herrn Düsedau für da sortieren der Knockdown- Zellen.

Frau Daniela Indenbirken gilt mein Dank für die Durchführung der Next Generation Sequenzierung und Herr Michael Spohn für die Analyse der Daten.

Auch möchte ich meiner Familie danken, die immer an mich geglaubt hat, dass ich eines Tages diese Arbeit fertig stellen würde, sowie meinem Verlobten Niklas Buhk, der mir bei der Fertigstellung unmittelbar zur Seite stand.

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Oldenburg, Juli 2016

Tatjana Hoffmann