

**Bedeutung von Integrin  $\beta 4$  für die  
intraperitoneale Metastasierung des Ovarialkarzinoms  
im Xenograftmodell**

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

eingereicht beim Fachbereich Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg,

vorgelegt von

**Vera Labitzky**

aus Lübeck

Hamburg, Juni 2018

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher durchgeführt und angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Udo Schumacher

Zweitgutachter: PD Dr. Hartwig Lüthen

Datum der Disputation: 14.09.2018

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Ovarialkarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Histologie .....	1
1.1.3 Risikofaktoren.....	2
1.1.4 Entstehung.....	2
1.1.5 Diagnostik und Therapie.....	4
1.1.6 Metastasierung.....	6
1.2 Integrin $\beta$ 4 im Tumorkontext .....	13
1.3 Zielsetzung der Arbeit .....	13
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1 Material .....	15
2.1.1 Organismen.....	15
2.1.2 Chemikalien .....	16
2.1.3 Assays/Kits .....	18
2.1.4 Antikörper.....	19
2.1.5 Enzyme.....	20
2.1.6 Oligonukleotide/ <i>primer</i> .....	20
2.1.7 Vektoren .....	20
2.1.8 Medien.....	20
2.1.9 Lösungen.....	21
2.1.10 Geräte .....	22
2.1.11 Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.12 Software und Statistik .....	23
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Zellbiologische Methoden .....	23
2.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	31
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	36
2.2.4 Tierexperimentelle Arbeiten .....	44
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>47</b>
3.1 Integrin- $\beta$ 4-Expression auf Ovarialkarzinomzelllinien .....	47

3.2	Validierung des stabilen ITGB4- <i>knock-downs</i> .....	48
3.3	<i>In-vitro</i> -Charakterisierung der SKOV3-Zelllinie in Bezug auf die ITGB4-Expression .....	50
3.3.1	Zellproliferation .....	50
3.3.2	Migration und Invasion.....	51
3.3.3	Kolonienformation in 3D-Kultur .....	52
3.3.4	Sphäroiden-Formation in Suspension .....	53
3.3.5	Apoptoseverhalten der adhären Zellen und Sphäroide.....	55
3.3.6	Unterschiede zwischen statischen und dynamischen E- und P-Selektinbindungen .....	56
3.4	<i>In-vivo</i> -Charakterisierung der SKOV3-Zellen in Bezug auf die ITGB4-Expression .....	58
3.4.1	Einfluss der Tumor-ITGB4-Expression auf das Überleben von SCID-Mäusen .....	59
3.4.2	Beurteilung der Tumorausbreitung im Endpunktversuch.....	60
3.5	Untersuchungen der isolierten Gewebe ( <i>ex vivo</i> ).....	63
3.5.1	Kontrolle des stabilen ITGB4- <i>knock-downs in vivo</i> .....	63
3.5.2	Tumorproliferation der i.p.-Karzinose-Tumoren.....	64
3.5.3	Apoptoseverhalten der i.p.-Karzinose-Tumoren.....	65
3.5.4	Fernmetastasen in Lunge und Knochenmark aus Überlebens- und Endpunktversuch ..	66
3.6	Die Bedeutung der Selektine.....	69
3.6.1	Einfluss von Selektin-Defizienz und ITGB4-Expression auf das Überleben .....	69
3.6.2	i.p. Karzinose in Abhängigkeit von der Selektin-Defizienz im Endpunktversuch .....	69
3.6.3	Zirkulierende Tumorzellen in Bezug auf Selektin-Defizienz und ITGB4-Expression.....	70
3.7	Transkriptomanalysen und Validierung .....	71
3.8	ITGB4-Expression an klinischem Material von Ovarialkarzinomen .....	74
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
4.1	Bedeutung der Adhäsionskaskade im intraperitonealen Xenograftmodell .....	77
4.2	Bedeutung der <i>ex-vivo</i> und <i>in-vitro</i> -Ergebnisse .....	82
4.3	Interpretation der Transkriptomanalysen .....	85
4.3.1	Integrin $\beta 4$ .....	86
4.3.2	Dickkopf-1.....	86
4.3.3	Annexin A13.....	87
4.3.4	<i>transforming growth factor, beta induced</i> .....	88
4.3.5	Cadherin-K .....	88
4.3.6	Tyrosin-Proteinphosphatase des C-Rezeptor-Typs .....	88
4.3.7	Chemokine.....	89

4.4	Patientenkollektiv.....	91
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung/Summary.....</b>	<b>93</b>
5.1	Zusammenfassung.....	93
5.2	Summary.....	94
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>i</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>iii</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
abs.	Absolut
ACTB	$\beta$ -Actin
AM	Acetomethyl
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
ANXA13	Annexin A13
AP	alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BRCA 1/2	<i>breast cancer 1/2</i>
C	Cytosin
CA125	<i>cancer antigen 125</i>
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CCL20	CC-Chemokinligand 20
CCR4	CC-Chemokinrezeptor 4
CCR6	CC-Chemokinrezeptor 6
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDH6	Cadherin 6 bzw. K-Cadherin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary cells</i>
CM	konditioniertes Medium
CTC	<i>circulating tumor cell</i> (zirkulierende Tumorzelle)
dem.	Demineralisiert
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dest.	Destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
G	Guanin
GVO	gentechnisch veränderter Organismus

HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HEK293T	<i>human embryonic kidney 293T</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSC70	<i>heatshock 70 kDa protein 8, HSPA8</i>
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IAEM	Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-1 $\alpha$	Interleukin-1 $\alpha$
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>
ITGB4	Integrin $\beta$ 4
KD	<i>knock-down</i>
Ki-67	Kiel-67
KM	Knochenmark
KO	<i>knock-out</i>
LC	<i>light cycler</i>
LUC	Luziferase
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
OSE	<i>ovarian surface epithelium</i> (Oberflächenepithel des Ovars)
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDX	<i>patient-derived xenograft</i>
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i> (Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül)
PI	Propidiumiodid
polyHEMA	Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)
PTPRC	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type C</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>quantitative real time-PCR</i>
Rag2	<i>recombination activating gene 2</i>
RGD	Aminosäuresequenz: aus Arginin, Glycin, Asparaginsäure
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subkutan
SCID	<i>severe combined immunodeficient</i>

SDF1 $\alpha$	<i>stromal cell-derived factor 1 alpha</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
select	E- und P-Selektin defizient
sh	<i>short hairpin</i>
SH2	<i>Src-homology 2</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
STIC	<i>serous tubal intraepithelial carcinoma</i>
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TGFBI	<i>transforming growth factor beta induced</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
TMA	<i>tissue micro array</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
wt	Wildtyp

# **1 Einleitung**

## **1.1 Ovarialkarzinom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Ovarialkarzinome sind die acht-häufigste Tumorerkrankung der Frau in Deutschland (Robert-Koch-Institut, 2017), sie machen 3,2 % aller Krebsneuerkrankungen aus. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ovarialkarzinom diagnostiziert wird, ist in der Altersspanne zwischen 65 und 79 Jahren am höchsten (Tumorregister München, 2017). Dennoch treten auch in den jüngeren Altersgruppen immer wieder Ovarialkarzinome auf, die dann in der Regel besser therapierbar sind als diejenigen in höheren Lebensaltern. Betrachtet man die prozentuale Sterberate, liegen die Karzinome des Ovars nach denen von Brustdrüse, Lunge, Darm und Bauchspeicheldrüse an fünfter Stelle. Die relative 5-Jahresüberlebensrate beim Ovarialkarzinom liegt bei 41 %, die 10-Jahresüberlebensrate bei 32 %. Damit haben nur acht von 28 Tumorarten eine schlechtere Überlebensrate (Robert-Koch-Institut, 2017), als Beispiele sind hier Pankreas-, Bronchial- und hepatozelluläre Karzinome zu nennen.

### **1.1.2 Histologie**

Histologisch werden maligne Ovarialtumore in vier Haupt-Gruppen eingeteilt: die Ovarialkarzinome, die die Ovarialtumore epithelialen Ursprungs darstellen, die Keimzell- und die Keimstrang-Stroma-Tumore, die aus Zellen der Keimbahn hervorgehen sowie eine vierte Gruppe mit unklarer Histogenese (Tavassoli et al., 2003).

Die Gruppe der Ovarialkarzinome wird in sechs histologische Subtypen unterteilt. Dies sind die serösen, muzinösen, seromuzinösen, endometrioiden und die klarzelligen Karzinome sowie die malignen Brenner-Tumore (Kurman et al., 2014). Zudem gibt es zu allen histologischen Subtypen Borderline-Tumoren, die sich durch niedrige Malignität mit geringem invasivem Wachstum auszeichnen. Etwa zwei Drittel der Karzinome gehören dem serösen Subtyp an und stellen damit den größten Anteil der Ovarialkarzinome dar (Prat, 2012). Ovarialkarzinome machen 90 % der malignen Ovarialtumore aus. Ferner wurden viele Zelllinien aus

Ovarialkarzinomen etabliert. Aus diesen Gründen wurden die primären Karzinome des Ovars in dieser Arbeit in den Vordergrund gestellt.

### **1.1.3 Risikofaktoren**

Zu den entscheidenden Risikofaktoren zählen besonders Mutationen wie zum Beispiel p53 und BRCA 1/2, die Neoplasien am Ovar hervorrufen können (Cancer Genome Atlas Research, 2011). Höheres Lebensalter ist ein Risikofaktor, denn wie bei vielen anderen Tumorerkrankungen auch steigt mit zunehmendem Alter das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Robert-Koch-Institut, 2017). Zu den Faktoren, die das Risiko ein Ovarialkarzinom zu entwickeln, verringern, zählen die Reduktion der Ovulationen, hervorgerufen durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva, erhöhte Anzahl von Schwangerschaften und lange Stillzeiten (Gwinn et al., 1990). Als Risiko-reduzierender Faktor wurde die Exzision von Uterus und Eileitern beschrieben, die mit einem protektiven Effekt für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms einhergeht (Chiaffarino et al., 2005; Green et al., 1997). Ein Zusammenhang von Nikotinabusus mit der Entwicklung eines Ovarialkarzinoms konnte nicht eindeutig als Risikofaktor beschrieben werden (Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian et al., 2012). Eine Ausnahme stellt eine Studie dar, die das Rauchen als erhöhten Risikofaktor, an einem muzinösen Ovarialkarzinom zu erkranken, beschreibt (Pan et al., 2004).

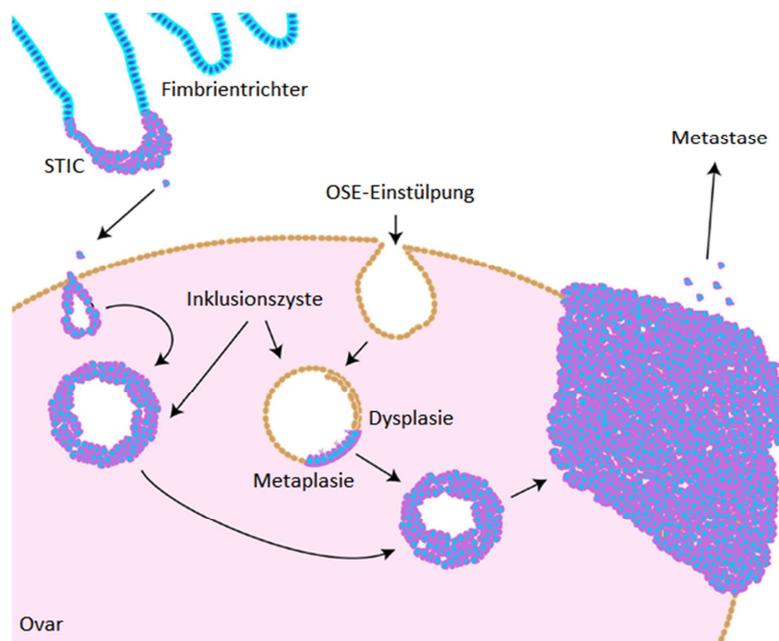
### **1.1.4 Entstehung**

Die Entstehungsorte des Ovarialkarzinoms können oftmals nicht gefunden werden, weshalb sein Ursprungsgewebe bis heute noch nicht endgültig geklärt ist und entsprechende Vorsorgeuntersuchungen noch nicht ausreichend etabliert sind. Von M. Fathalla wurde die Theorie aufgestellt, dass das Ovarialkarzinom direkt aus dem Oberflächenepithel (Peritonealepithel, Mesothel) des Ovars hervorgeht (Fathalla, 1971). Seiner Hypothese zufolge unterliegt das Epithel durch die Ovulationen einer stetigen Abfolge von Zerstörung und Reparatur, die mit erhöhter Wahrscheinlichkeit maligne Veränderungen im Epithel entstehen lässt.

Lange wurde das Mesothel als das Ursprungsepithel, aus dem sich ein Ovarialkarzinom entwickelt, angesehen. Mit der neuen WHO-Klassifikation von 2014 allerdings wurde diese

pathophysiologische Hypothese vollständig verworfen. Stattdessen werden der Fimbrientrichter und der Eileiter als Ursprungsorte vor allem für das hochdifferenzierte seröse Ovarialkarzinom angesehen (Meinhold-Heerlein et al., 2016). Basierend auf Beobachtungen der protektiven Effekte nach der Exzision von Eileitern und Uterus wird davon ausgegangen, dass Ovarialkarzinome häufig aus verändertem nicht-ovariellem Gewebe entstehen, die dann zum Ovar metastasieren. Außerdem haben verschiedene Studien belegt, dass das muzinöse Ovarialkarzinom als Metastase von Tumoren des Verdauungstraktes entstehen kann (Khunamornpong et al., 2006) und dass beim serösen Ovarialkarzinom die bedeckenden Zellen des Fimbrientrichters als Ausgangsort der malignen Veränderung anzunehmen sind (Folkins et al., 2008). Am Fimbrientrichter bilden sich häufig seröse intraepitheliale Karzinome (STIC = *serous tubal intraepithelial carcinoma*) (Abb. 1). Auch der Uterus selbst wurde als möglicher Entstehungsort des Ovarialkarzinoms bereits beschrieben (Massuger et al., 2010).

Oftmals lassen sich bei einem beidseitigen Befall der Ovarien identische genetische Muster nachweisen, was den Rückschluss auf einen gemeinsamen Entstehungsort nahelegt (Kupryjanczyk et al., 1996). So wird postuliert, dass durch die Ovulationen das Oberflächenepithel des Ovars regelmäßig durchbrochen wird und verschiedene Chemokine (z. B. SDF1 $\alpha$ ) ausgeschüttet werden. Dadurch werden maligne Zellen angezogen und ein Anwachsen dieser Zellen im Oberflächenepithel des Ovars ermöglicht (Yang-Hartwich et al., 2014) (Abb. 1). Häufig erfolgen eine Zystenbildung des fremdartigen Gewebes und die Weiterentwicklung zu einem invasiven Tumor (Kurman und Shih Ie, 2010) (Abb. 1). Weiterhin besteht immer noch die Möglichkeit einer Neubildung (Dysplasie und Metaplasie) maligner Zellen innerhalb einer aus Oberflächenepithel (OSE = *ovarian surface epithelium*) entstandenen Inklusionszyste (Ribeiro et al., 2014).



**Abb. 1: Entstehung des Ovarialkarzinoms.** Dargestellt ist die Entstehung des Ovarialkarzinoms aus einem Karzinom des Fimbrientrichters (STIC) und aus dem ovariellen Oberflächenepithel (OSE). Modifiziert nach (Ribeiro et al., 2014).

### 1.1.5 Diagnostik und Therapie

Das Ovarialkarzinom verläuft in seinen frühen Phasen oft asymptomatisch und wird daher meistens erst in späten Stadien diagnostiziert, bei denen bereits metastatische Absiedlungen im Peritonealraum vorliegen (Doubeni et al., 2016). Zu diesem Zeitpunkt dienen transvaginaler Ultraschall und der Serummarker CA125 der Diagnosestellung. Zur eigentlich wünschenswerten Früherkennung sind aber beide Methoden nicht geeignet (Henderson et al., 2018). Aus den aktuellen S3-Leitlinien zum Ovarialkarzinom (November 2017) geht hervor, dass die apparative Diagnostik nicht hinreichend entwickelt ist, um die Operabilität eines Ovarialkarzinoms präoperativ einschätzen zu können. Daher wird die Tumorausbreitung im Rahmen eines operativen Eingriffs nach klinischen Aspekten begutachtet und es werden Biopsien für die histologische Klassifikation entnommen. Die Einteilung der Ovarialkarzinome erfolgt dann nach der FIGO-Klassifikation (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) (Kurman et al., 2014). Danach werden vier sogenannte FIGO-Stadien (Tab. 1) unterschieden: Im FIGO-Stadium I ist der Tumor auf den Entstehungsort lokalisiert. Zeigt sich eine Ausbreitung im kleinen Becken, wird er in FIGO-Stadium II eingeteilt. Bei FIGO-Stadium III liegen bereits

Peritonealmetastasen vor. Sind extraperitoneale Organe betroffen, liegen Fernmetastasen vor, und es handelt sich um FIGO-Stadium IV.

**Tab. 1: FIGO-Klassifikation des Ovarial-, Tuben- sowie des primären Peritonealkarzinoms (2014).** Modifiziert nach (Meinhold-Heerlein et al., 2015).

<b>STADIUM I: Tumor begrenzt auf Ovarien und Tuben</b>	
IA	Tumor begrenzt auf ein Ovar oder Tube (Kapsel intakt), keine Tumorzellen auf der Oberfläche, keine malignen Zellen im Aszites oder Peritoneallavage
IB	Tumor begrenzt auf beide Ovarien oder Tuben (Kapsel intakt), keine Tumorzellen auf der Oberfläche, keine malignen Zellen im Aszites oder Peritoneallavage
IC: Tumor auf ein oder beide Ovarien oder Tuben begrenzt im Zusammenhang mit:	
IC1	operativer Kapselruptur
IC2	präoperativer Kapselruptur oder Tumor auf der Oberfläche von Ovarien oder Tuben
IC3	Nachweis maligner Zellen im Aszites oder Peritoneallavage
<b>STADIUM II: Tumor auf ein oder beiden Ovarien/Tuben begrenzt mit Ausbreitung im kleinen Becken oder primäres Peritonealkarzinom</b>	
IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus, Tuben und/oder Ovarien
IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
<b>STADIUM III: Tumor befällt ein oder beide Ovarien/Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder retroperitonealen Lymphknotenmetastasen</b>	
IIIA1	ausschließlich positive retroperitoneale Lymphknoten (zytologisch oder histologisch nachgewiesen)
	IIIA(i) Metastasen ≤ 10 mm
	IIIA(ii) Metastasen > 10 mm
IIIA2	mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens ± positive retroperitoneale Lymphknoten
IIIB	makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens ≤ 2 cm, ± positive retroperitoneale Lymphknoten (einschließlich Tumorausbreitung auf der Kapsel von Leber/Milz ohne Parenchyembefall des jeweiligen Organs)
IIIC	makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens > 2 cm, ± positive retroperitoneale Lymphknoten (einschließlich Tumorausbreitung auf der Kapsel von Leber/Milz ohne Parenchyembefall des jeweiligen Organs)
<b>STADIUM IV: Fernmetastasen mit Ausnahme der Peritonealmetastasen</b>	
IVA	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
IVB	Parenchymmetastasen und Metastasen in extraabdominelle Organe (eingeschlossen inguinal und extraabdominelle Lymphknotenmetastasen)

Da das Ovarialkarzinom wie oben erwähnt in den frühen Phasen oftmals asymptomatisch verläuft, zeigen sich bei der Erstdiagnose meistens bereits FIGO-Stadien der Klasse III und IV. Die 5-Jahresüberlebensrate verschlechtert sich je nach FIGO-Stadium von 87,5 % (FIGO I) über 74,1 % und 40,7 % (FIGO II und III) auf 33,3 % (FIGO IV) (Suh et al., 2013).

Die Therapie eines Ovarialkarzinoms richtet sich nach der gemeinsamen Beurteilung von Klinikern und Pathologen. Beim operativen Eingriff ist der Diagnosestellung die therapeutische Entfernung der Tumormasse direkt angeschlossen, um einen zweiten Eingriff und ein mögliches Anwachsen von freien Tumorzellen an die Operationswunde zu vermeiden (Kindermann et al.,

1995). Häufig hat der Primärtumor bei Diagnosestellung bereits in das Peritoneum gestreut und kann sich dort schnell massiv ausbreiten. Es ist daher empfehlenswert, eine Peritonealkarzinose chirurgisch vollständig zu entfernen, was bereits seit über 30 Jahren zu den besten Behandlungsmethoden des Ovarialkarzinoms zählt (Bertelsen, 1990; Bristow et al., 2002; Griffiths, 1975). Die Entfernung von möglichst viel Tumormasse hat außerdem etliche postulierte Vorteile für die Wirksamkeit von Chemotherapeutika nach dem Eingriff (Hacker, 1989):

1. Entfernung chemoresistenter Klone;
2. Entfernung schlecht vaskularisierter Tumormasse;
3. evtl. verbleibende kleine Tumormassen haben eine höhere Teilungsrate und sind besser vaskularisiert;
4. durch weniger verbleibende Tumormasse sind weniger Chemotherapie-Zyklen erforderlich und Resistenzen unterbleiben;
5. das Immunsystem wird durch den chirurgischen Eingriff angeregt.

Die postoperative Behandlung mit systemischen Chemotherapeutika (Carboplatin und Paclitaxel) wird standardmäßig in der Therapie eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine platinhaltige Chemotherapie bei Patientinnen mit FIGO-Stadium IC oder höher eine signifikante Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate und ein erhöhtes Rezidiv-freies 5-Jahres-Intervall hervorruft (Colombo et al., 2003; Trimbos et al., 2003).

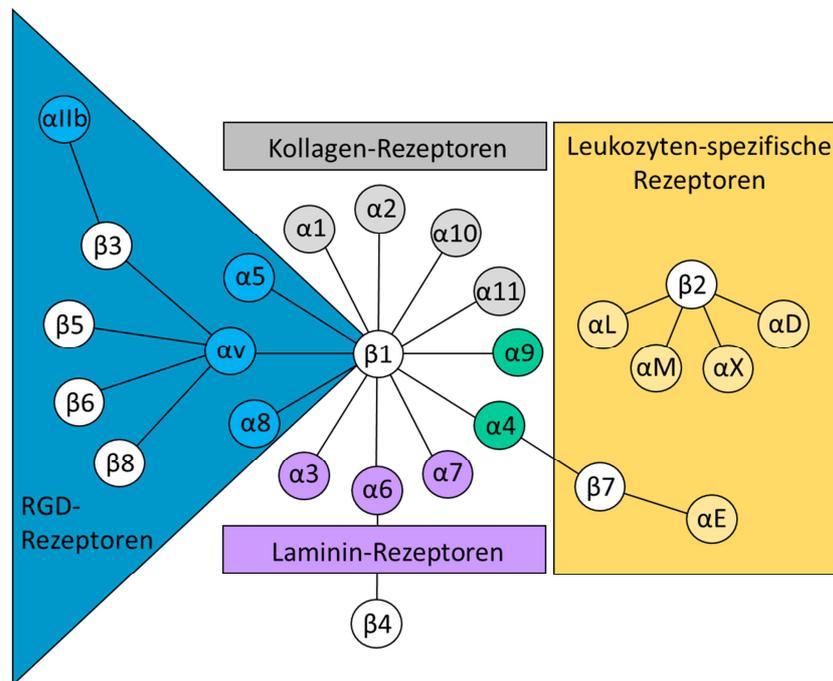
#### **1.1.6 Metastasierung**

Wie zuvor erläutert bleibt das Ovarialkarzinom nicht lokal begrenzt, sondern bildet Metastasen, wobei die massive peritoneale Metastasierung zum Tode der betroffenen Patientinnen führen kann. Bei der Entstehung von Peritonealmetastasen werden zunächst aus dem epithelialen Primärtumorverband Tumorzellen mobilisiert. Im epithelialen Zustand im Primärtumor sind Tumorzellen über Adhäsionsmoleküle in Form von Tight-Junctions und Desmosomen miteinander verbunden. Durch Herabregulierung von Adhäsionsmolekülen wie zum Beispiel E-Cadherin werden diese Zell-Zell-Verbindungen aufgelöst. Die Tumorzellen erlangen so einen mesenchymaleren Charakter und können sich aus dem Primärtumorverband lösen. Wie zuvor

beschrieben müssen die Tumorzellen beim Ovarialkarzinom, wenn sie am Fimbrientrichter entstanden sind, keine weiteren Barrieren durchbrechen, um in den Peritonealraum zu gelangen.

Durch den Zellkontaktverlust und die Einwirkungen des Umgebungsmilieus wird den Tumorzellen signalisiert, die Apoptose einzuleiten, und ein Großteil der Tumorzellen geht zugrunde. Eine spezielle Form der Apoptose ist die Anoikis (Frisch und Francis, 1994), sie wird explizit durch den Verlust von Zell-Matrix-Kontakt vermittelt. Wichtige Moleküle, die die Zell-Matrix-Kontakte vermitteln, sind die Integrine.

Bei den Integrinen handelt es sich um transmembrane Adhäsionsmoleküle mit einer einzigen Transmembrandomäne. Sie sind stets aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut, die nicht kovalent zu einem Heterodimer verbunden sind. Beim Menschen sind 18  $\alpha$ -Untereinheiten und 8  $\beta$ -Untereinheiten nachgewiesen, aus denen sich 24 bislang bekannte Heterodimere bilden können (Whittaker und Hynes, 2002). Die Einteilung der Integrin-Heterodimere orientiert sich an der Beschaffenheit der  $\alpha$ -Untereinheiten und an den Bindungspartnern der extrazellulären Matrix (Hynes, 2002) (Abb. 2). Liegt eine  $\alpha$ -I-Domäne, die die Erkennungseinheit der Liganden darstellt, vor, zählen die Integrine entweder zu den Kollagenrezeptoren ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$  und  $\alpha 11$ ) oder zu den Leukozyten-spezifischen Rezeptoren ( $\alpha E$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha M$ ,  $\alpha L$  und  $\alpha X$ ). Die  $\alpha$ -Untereinheiten, die keine  $\alpha$ -I-Domäne besitzen, werden bei Säugetieren in drei Gruppen unterteilt: die Laminin-Rezeptoren ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  und  $\alpha 7$ ), die RGD-Rezeptoren ( $\alpha III$ ,  $\alpha V$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 8$ ) sowie die Rezeptoren, die an Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie wie zum Beispiel ICAM oder VCAM binden können ( $\alpha 4$  und  $\alpha 9$ ).



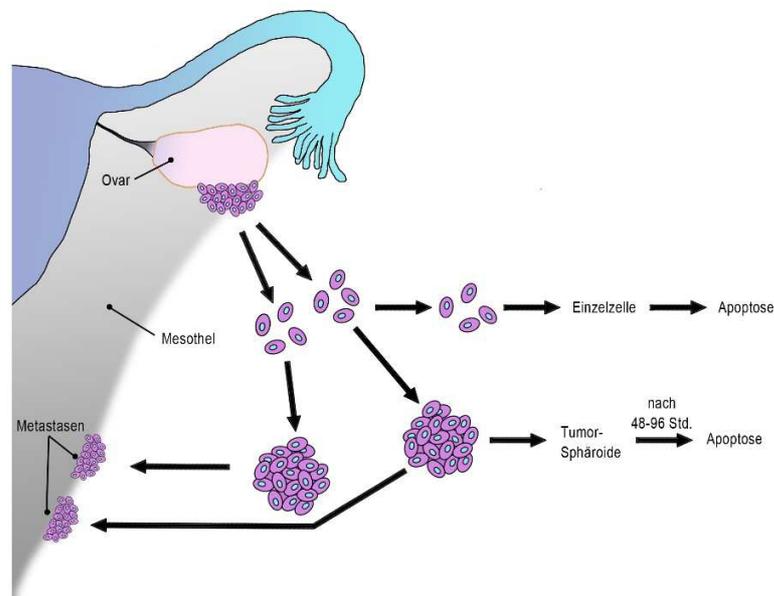
**Abb. 2: Integrin-Rezeptor-Klassen.** Dargestellt sind die RGD-Rezeptoren (blau), Kollagen-Rezeptoren (grau), Laminin-Rezeptoren (violett), Leukozyten-spezifische-Rezeptoren (gelb) und die Zelladhäsions-bindenden Integrine (grün). Modifiziert nach (Hynes, 2002).

Eine besondere Integrin-Untereinheit stellt das Integrin  $\beta 4$  (ITGB4) dar. Es unterscheidet sich strukturell durch eine längere zytoplasmatische Domäne von den anderen Integrin- $\beta$ -Untereinheiten (Hogervorst et al., 1990). Das ITGB4 bildet nur mit der  $\alpha 6$ -Untereinheit ein Heterodimer (Hynes, 2002), daher sind Aussagen über die Integrin- $\beta 4$ -Untereinheit direkt auf das Integrin-Heterodimer  $\alpha 6\beta 4$  zu transferieren.

Das ITGB4 ist ein Bestandteil von Hemidesmosomen und trägt zu einer festen Verankerung von Epithelzellen an die Basalmembran bei. Im Hemidesmosomen-Typ I bindet das Integrin  $\alpha 6\beta 4$  mit der extrazellulären Seite an die lamininreiche Basalmembran, die zytoplasmatische Domäne ist über Plektin mit Keratinfilamenten verknüpft (Nahidiazar et al., 2015; Nievers et al., 1999). Im Bereich eines Hemidesmosoms ist das Integrin  $\alpha 6\beta 4$  in Clustern angeordnet und besitzt daher eine höhere Avidität zur Basalmembran als in Form eines einzelnen Moleküls.

Das Lösen der oben erwähnten Zellkontakte ist notwendig, um den Prozess der Metastasierung in Gang zu setzen. In der Folge entwickeln die Tumorzellen Resistenzmechanismen gegen die

Anoikis, um ein Überleben in der Peritonealflüssigkeit zu ermöglichen. Das trifft allerdings nur für einen kleinen Teil der Tumorzellen zu. Ein möglicher Schutz gegen den frühzeitigen Zelltod ist die Bildung von Tumor-Sphäroiden, die durch die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten erfolgt (Ahmed et al., 2007) (Abb. 3). Tumor-Sphäroide liegen in dem Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen vor, hierbei handelt es sich um Peritonealflüssigkeit, die durch Entzündungsprozesse vermehrt sezerniert wird. Aszites ist oft reich an Tumorzellen, die in Form von Ansammlungen (Sphäroiden) vorliegen.

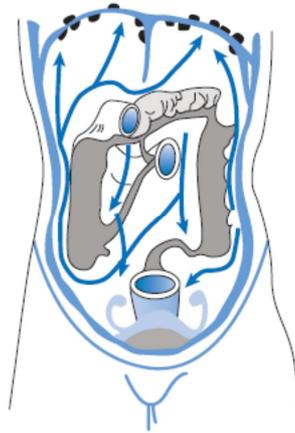


**Abb. 3: Tumoransammlungen (Sphäroide) im Peritoneum.** Dargestellt ist die Bildung von Tumor-Sphäroiden aus Einzelzellen zum Schutz vor Apoptose und die Etablierung von Metastasen am Mesothel. Modifiziert nach Ahmed et al. (2007).

Das frühzeitige Aufbauen von neuen Zell-Zell-Kontakten zeigt deutlich, dass die Tumorzellen nach dem Verlassen des Primärtumorverbandes ihren epithelialen Charakter nicht vollständig aufgeben. Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass Tumorzellen der epithelial-mesenchymalen Mischform Überlebensvorteile gegenüber denjenigen rein epithelialer bzw. mesenchymaler Form besitzen (Jolly et al., 2015).

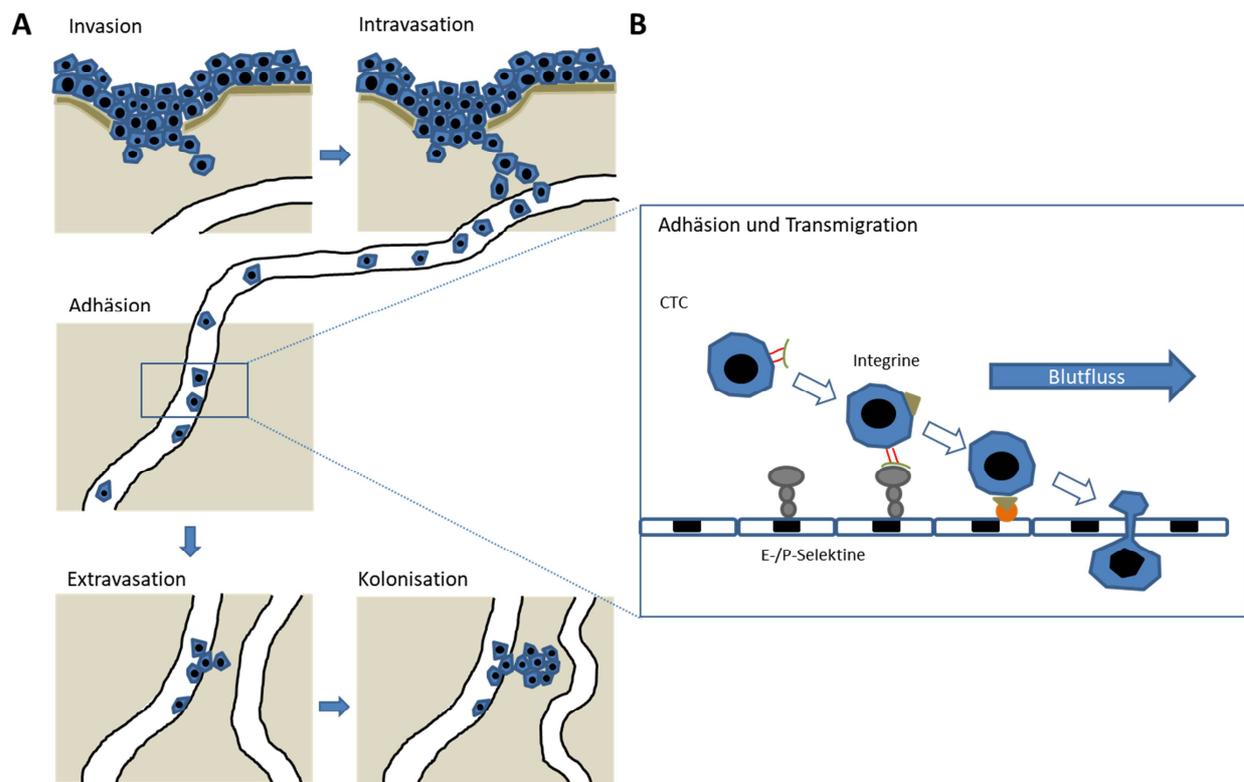
Im Verlauf der peritonealen Metastasierung erfolgt die Disseminierung der Tumorzellen entlang der peritonealen Flüssigkeitsströme, so dass zu frühen Zeitpunkten Implantationsmetastasen

am Peritoneum des Douglas-Raumes, des kleinen Beckens und im Bereich des Zwerchfells gefunden werden können (Jänicke, 2004) (Abb. 4).



**Abb. 4: Peritoneale Flüssigkeitsströme.** Die peritonealen Flüssigkeitsströme verlaufen vorwiegend cranial, folglich finden sich erste Implantationsmetastasen im Bereich des Zwerchfells (Management des Ovarialkarzinoms. Abb. 9.1, S. 120).

Der entscheidende Prozess bei der Metastasenbildung besteht allerdings in der Adhäsion der mobilisierten Tumorzellen an der epithelialen Einzelzellschicht (Mesothel) des Peritoneums. Bei der hämatogenen Metastasierung ist dieser Adhäsionsprozess bereits besser untersucht als bei der peritonealen Metastasierung. Da die hämatogene Metastasierung zu entfernten Organen wie Lunge und Leber oder ins Knochenmark beim Ovarialkarzinom nur selten auftritt (2-3 %), wird deren Ablauf im Folgenden nur kurz erläutert. Wie in Abb. 5A (Faryammanesh et al., 2014) dargestellt verläuft die hämatogene Metastasierung in mehreren Schritten. Nach der Invasion der Basallamina und Intravasation in das Blutgefäßsystem folgt der essenzielle Schritt der Adhäsion von im Blut zirkulierenden Tumorzellen (CTC) an die Gefäßwand. Zur Etablierung in entfernten Geweben extravadiieren die Tumorzellen aus dem Gefäß und siedeln sich als Metastasen an (Fidler, 2003).



**Abb. 5: Hämatogene Metastasierung.** (A) Weg der Tumorzellen vom Primärtumor über das Blutsystem zu entfernten Organen; (B) Adhäsion von Tumorzellen an das Gefäßendothel. CTC = zirkulierende Tumorzelle. Modifiziert nach (Faryammanesh et al., 2014).

Es wird angenommen, dass die Anheftung von Tumorzellen an das Endothel so erfolgt wie die Anheftung von Leukozyten an aktiviertes Endothel bei Entzündungen (Williams et al., 2011). In Abb. 5B ist der bisher bekannte Mechanismus der Adhäsion und Transmigration der Tumorzellen an das Gefäßendothel dargestellt. Auf aktiviertem Endothel werden Glykostrukturen-bindende E- und P-Selektine exprimiert (Kohler et al., 2010). Bei der Gruppe der Selektine handelt es sich um transmembrane, Kalzium-abhängige Zelladhäsionsmoleküle, die an Glykoproteine und Glykolipide binden können (Cummings und McEver, 2009). Über E- und P-Selektine können Glykostrukturen auf den Tumorzellen gebunden werden, diese Bindung ist relativ locker, so dass die Tumorzellen aus dem Blutstrom abgefangen werden und sich rollend über das Endothel bewegen. Erst durch die Selektinbindung werden die Integrine, die sich auf der Tumorzelloberfläche befinden, durch *inside-out signaling* aktiviert (Zarbock und Ley,

2008). In der aktiven Form können die Integrine eine feste Bindung an das Endothel über Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 oder VCAM-1 und Bestandteile der extrazellulären Matrix vermitteln (Barthel et al., 2013).

Weitere Interaktionen von Adhäsionsmolekülen wie PECAM-1 ermöglichen einen Durchtritt der Zelle durch die Gefäßwand (Schnoor et al., 2015). Für die Tumorzellbindung an Mesothel, wie es bei der peritonealen Metastasierung der Fall ist, wird der gleiche Mechanismus vermutet wie bei der Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel der Blutgefäße. Dadurch, dass Endothel und Mesothel während der Embryonalentwicklung aus demselben Keimblatt hervorgehen, wird eine ähnliche Expression von Molekülen auf ihrer Oberfläche angenommen. Die Expression von E- und P-Selektinen auf Endothel und Mesothel wurde bereits nachgewiesen (Gebauer et al., 2013). Neben den Selektinen, die die Tumorzellbindung von Seiten des Mesothels beeinflussen, wurden verschiedene Moleküle auf den Ovarialkarzinomzellen beschrieben, die die Adhäsion an das Mesothel ermöglichen. Unter anderem sind dies CD44 (Strobel et al., 1997), MUC16/CA125 (Rump et al., 2004) und die Familie der Integrine (Burlison et al., 2004; Kishikawa et al., 1995; Lee et al., 2015).

Während der peritonealen Metastasierung der Ovarialkarzinomzellen spielt nicht allein das Mesothel eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion. Bei Untersuchungen zum Magenkarzinom konnte beobachtet werden, dass das Mesothel keine homogene Zellschicht ausbildet. Das Magenkarzinom bildet wie das Ovarialkarzinom Peritonealmetastasen aus. Die Untersuchungen ergaben, dass die Mesothelzellen, die physiologisch eine flache Zellform zeigen, im Fall der Magenkarzinompatienten eine halbkugelförmige Form aufweisen. In dieser Form lösen sich die Mesothelzellen aus der Zellschicht und die darunterliegende extrazelluläre Matrix, die viele Bindungspartner der Integrine besitzt (siehe oben), wird für die Tumorzellen direkt zugänglich (Kiyasu et al., 1981).

Wie bereits beschrieben bilden die Ovarialkarzinomzellen in der Peritonealflüssigkeit als Schutzmechanismus vor Anoikis Tumor-Sphäroide aus. Es konnte gezeigt werden, dass Tumor-Sphäroide *in vitro* schneller und fester an extrazelluläre Matrixkomponenten binden können als

adhärent kultivierte Ovarialkarzinomzellen (Yang et al., 2015). Dieses spricht für einen Vorteil der Sphäroide bei der Adhäsion an die Peritonealoberfläche im Vergleich zu Einzelzellen.

## **1.2 Integrin $\beta$ 4 im Tumorkontext**

Die Rolle des ITGB4 bei der Tumorentstehung und der Metastasierung konnte bei verschiedenen Tumorentitäten bereits beschrieben werden. Durch Induktion von benignen und malignen Hauttumoren in der Maus konnte das  $\alpha$ 6 $\beta$ 4-Integrin als Marker für maligne wachsende Plattenepithelkarzinome identifiziert werden. Zudem konnte in derselben Studie eine höhere Proliferationsrate der  $\alpha$ 6 $\beta$ 4-positiven Zellen beschrieben werden (Tennenbaum et al., 1993). Bei Untersuchungen der metastatischen Kaskade konnte im Osteosarkom (HOS) und im kolorektalen Karzinom (MC38) jeweils für stärker metastasierende Sublinien eine erhöhte ITGB4-Expression durch Expressions-Arrays nachgewiesen werden (Wan et al., 2009; Zhang et al., 2017). Im selben Modell zeigten ITGB4-*knock-down*-Varianten der stärker metastasierenden Sublinien jeweils eine verringerte Anzahl an Metastasen, diese wurden in Form von Lungenmetastasen nach i.v. Injektion von Osteosarkomzellen und Lebermetastasen nach Zellinjektion von kolorektalen Karzinomzellen in die Milz untersucht. In einer weiteren Studie konnte in einem orthotopen Metastasierungsmodell der Prostatazelllinie DU145 ebenfalls eine erhöhte Anzahl von befallenen Lymphknoten mit einer erhöhten ITGB4-Expression korreliert werden (Banyard et al., 2014). Für die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3 konnte bereits ein reduziertes s.c. Tumorwachstum nach ITGB4 und ILK-Depletion (*integrin-linked kinase*) dargestellt werden, nicht aber nach einer alleinigen Depletion von ITGB4 (Choi et al., 2012). Untersuchungen klinischen Materials in Form eines TMAs (*tissue micro array*) aus humanen, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen ergaben eine Korrelation von hoher ITGB4-Expression mit einem signifikant verkürzten Überleben (Stewart et al., 2016). In den dargestellten Fällen ist die ITGB4-Expression immer mit einer erhöhten Tumor- oder Metastasenbildung assoziiert und stellt damit einen guten Ansatzpunkt für die Untersuchungen der intraperitonealen Metastasierung des Ovarialkarzinoms dar.

## **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ovarialkarzinom hat unverändert über drei Dekaden eine schlechte Prognose und eine geringe 5-Jahres-Überlebensrate. Die Prozesse insbesondere bei der peritonealen

Metastasierung des Ovarialkarzinoms sind zurzeit noch unverstanden, so dass aktuell keine Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze vorliegt. Daher ist es wichtig, die Metastasierungsprozesse des Ovarialkarzinoms besser zu verstehen, um diese entwickeln zu können. Da die Adhäsion der Tumorzellen an das Mesothel den essenziellen Schritt in der Metastasierung darstellt, soll dieser Prozess in den Fokus der vorliegenden Arbeit gerückt werden. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass das Integrin  $\beta 4$  (ITGB4) an dem primären Tumorwachstum von Pankreastumoren und an der Metastasierung von Prostatatumoren beteiligt ist (unveröffentlichte Daten; Lange). Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Bedeutung des ITGB4 bei der peritonealen Metastasierung von Ovarialkarzinomen näher zu untersuchen. Insbesondere befasst sich diese Arbeit mit folgenden Fragestellungen:

- Kann ein *knock-down* (KD) des ITGB4 an einer Ovarialkarzinomzelllinie mit hoher ITGB4-Expression mittels shRNA generiert werden?
- Beeinflusst die ITGB4-Expression das proliferative, migratorische und invasive Verhalten *in vitro*?
- Ist es möglich, in einem Xenograftmodell Unterschiede im Überleben nach intraperitonealer (i.p.) Injektion von Ovarialkarzinomzellen unterschiedlicher ITGB4-Expression darzustellen?
- Ergeben sich durch die ITGB4-Expression der Ovarialkarzinomzellen Veränderungen der intraperitonealen Tumorausbreitung, Aszitesbildung sowie der spontanen hämatogenen Metastasierung im Xenograftmodell?
- Werden die Unterschiede der ITGB4-Expression auf den Ovarialkarzinomzellen durch Moleküle der Leukozytenadhäsionskaskade wie Selektine im Xenograftmodell beeinflusst?
- Kann eine klinische Relevanz der ITGB4-Expression auf Ovarialkarzinomen anhand eines Patientenkollektivs beschrieben werden?

Diese Fragen werden deshalb gestellt, weil deren Antworten Einblick in die zugrunde liegenden Adhäsionsmechanismen im Metastasierungsprozess von Ovarialkarzinomen geben und die beschriebenen Moleküle als mögliche therapeutische Zielstrukturen genutzt werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Organismen

##### 2.1.1.1 Kulturzellen

**Tab. 2: Humane Ovarialkarzinomzelllinien.** Dargestellt sind die verwendeten humanen Ovarialkarzinomzelllinien mit ihren Charakteristika und Kulturbedingungen.

Zelllinie	Typ	Ursprungsgewebe	Herkunft	Authentifizierung	Literatur	Kulturmedium
A2780	Ovarialkarzinom, unbehandelt	Ovar	ECACC 93112519	DSMZ 2017	ECACC 93112519 (Eva et al., 1982; Louie et al., 1986)	RPMI + 10 % FCS, 2 mM L-Glu
COV644	muzinöses Ovarialkarzinom	solider Tumor, Ovar	ECACC 07071908	DSMZ 2017	ECACC 07071908 (van den Berg-Bakker et al., 1993)	DMEM + 10 % FCS, 2 mM L-Glu, 1 mM Na-Pyruvat
OAW42	papilläres seröses Zystadenokarzinom (FIGO 1c)	Aszites nach Rezidiv	ECACC 85073102	DSMZ 2017	ECACC 85073102 (Wilson, 1984)	DMEM + 10 % FCS, 2 mM L-Glu, 1 mM Na-Pyruvat
Ovcar3	schlecht differenziertes papilläres Adenokarzinom	Aszites	D. Thormeyer, Fachklinik Hornheide	DSMZ 2013/2017	(Hamilton et al., 1983)	RPMI + 10 % FCS, 2 mM L-Glu
Ovcar8	Adenokarzinom, (800mg/m <sup>2</sup> Carboplatin)	Ovar	V. Aßmann, UKE Hamburg	DSMZ 2017	(Schilder et al., 1990)	RPMI + 10 % FCS, 2 mM L-Glu
SKOV3	seröses Zystadenokarzinom	Aszites	ATCC No. HTB-77	DSMZ 2013/2017	(Fogh et al., 1977)	McCoy's A5 + 10 % FCS, 2 mM L-Glu

##### 2.1.1.2 Verwendete Mausstämme

Es wurden zwei verschiedene immundefiziente Mausstämme verwendet: zum einen SCID-Mäuse (*severe combined immunodeficient*), die durch spontane Mutation einen Defekt in der V(D)J-Rekombination entwickelt haben und dadurch einen Mangel an T- und B-Zellen aufweisen (Bosma et al., 1983), zum anderen Rag2-Model-601-Mäuse, die durch eine Deletion des *Rag2*-Gens (recombination activating gene 2) nicht in der Lage sind, die V(D)J-Rekombination einzuleiten. Dadurch ergibt sich bei den Rag2-Model-601-Mäusen die Unfähigkeit reife T- und B-Lymphozyten zu bilden (Shinkai et al., 1992). Der Einsatz von immundefizienten Tieren ist notwendig, um eine Immunreaktion gegen das humane Fremdgewebe zu unterbinden. Aufgrund der Anfälligkeit der SCID-Mäuse Lymphome zu entwickeln, wurde im Verlauf dieser Arbeit zusätzlich das Rag2-Model-601 verwendet (Custer et al., 1985; Huang et al., 2011), da diese weniger anfällig für die Lymphom-Entwicklung sind. Für Versuche, in denen der Einfluss von Selektinen untersucht wurde, kamen SCID-Mäuse mit einer E- und P-Selektindefizienz zum Einsatz (Kohler et al., 2010).

**Tab. 3: Mauslinien.** Dargestellt sind die offiziellen Bezeichnungen der verwendeten Mauslinien.

Mauslinie	offizielle Bezeichnung
Rag2	C.129S6(B6)- <i>Rag2</i> <sup>tm1Fwa</sup> N12
SCID	CB17/lcr-Prkdc <sup>scid</sup> /lcrIcoCrI
SCID-select	CB17/lcr-Prkdc <sup>scid</sup> /lcrIcoCrI/C.129S2(B6)-Sele <sup>tm1Hyn</sup> Selp <sup>tm1Hyn</sup> /J

### 2.1.1.3 Bakterien

Zur Amplifizierung von Vektoren wurden kompetente Bakterien aus dem One Shot™ INVαF' Chemically Competent *E. coli* Kit verwendet.

### 2.1.1.4 Patientenkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste 252 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, die zwischen 1996 und 2014 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf behandelt wurden. Die Patienten unterlagen einem chirurgischen *Debulking* nach den geltenden deutschen Richtlinien (Wagner et al., 2013). Alle Patientinnen gaben ihre schriftliche Zustimmung zur Verwendung ihres Gewebes und der klinischen Unterlagen gemäß dem Untersuchungsausschuss und den Richtlinien der Ethikkommission (#200814). Die klinischen Daten wie histologische Klassifikation oder Therapieverläufe wurden detaillierten Datenbanken entnommen. Der klinische Verlauf aller Patientinnen wurde vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis Ende 2015 verfolgt. Die Gewebeproben wurden während der Operation gewonnen und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Wenn notwendig, wurde das Umgebungsgewebe von den Gewebeproben entfernt, so dass für die Proteinextraktion ungefähr 100 mg Gewebe mit mindestens 70 % Tumorzellen eingesetzt werden konnte. Das Patientenkollektiv wurde von Prof. Dr. Karin Milde-Langosch (Gynäkologische Forschung, UKE) zur Verfügung gestellt und analysiert.

### 2.1.2 Chemikalien

**Tab. 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien**

Substanz	Hersteller
2-Hydroxyethylagarose	Sigma, Steinheim, D
2-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim, D
2-Propanol	Sigma, Steinheim, D
2-Propanol reinst	Chemsolute, Renningen, D
Acrylamid 40 % (37,5:1)	Merck KGaA, Darmstadt, D

Albumin Standard	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, D
Antibody Diluent	Dako, Santa Clara, CA, USA
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen, D
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Bovine Serum Albumin Fraction V pH 7,0	GE Healthcare, Pasching, D
Bromphenolblau	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Calcein-AM	BD Biosciences, Heidelberg, D
Chloroform	J.T. Baker, Deventer, NL
Diethyl Pyrocarbonate	USB, Cleveland, OH, USA
Difco™ Agar Nobel	BD Biosciences, Sparks, MD, USA
Di-Natrium Hydrogen Phosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Eosin (Erythrosin B)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol 96 %	Chemsolute, Renningen, D
Ethanol 99 %	Chemsolute, Renningen, D
Ethanol absolut	Chemsolute, Renningen, D
Ethidium Bromide	Promega, Madison, WI, USA
Eukitt®	O. Kindler GmbH, Freiburg, D
Formaldehydlösung 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Heat Inactivated FBS 10500	gibco®, Paisley, GB
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun, Melsungen, D
Ketamin 10 %	WDT, Garbsen, D
LB-Agar (Lennox)	Roth, Karlsruhe, D
LB-Medium (Luria/Miller)	Roth, Karlsruhe, D
Light Cycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim, D
Matrigel® Basement Membrane Matrix, Growth Factor Reduced	Corning®, Bedford, MA, USA
Methanol	J.T. Baker, Deventer, NL
Meyers Hämalaulösung (Hämatoxylin)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natrium Dihydrogen Phosphat Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma, Steinheim, D
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventer, NL
Nonidet P40	Roche, Mannheim, D
Paraplast Plus (Paraffin)	McCormick Scientific, Richmond, IL, USA
peqGOLD TriFast™	peqlab, Erlangen, D
Poly-(2-Hydroxyethyl-Methacrylate)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Ponceau S	Sigma, Steinheim, D
Propidiumiodid	Sigma, St. Louis, MO, USA

Protein Inhibitor Cocktail	Calbiochem, Darmstadt, D
Puromycin Dihydrochloride from <i>Streptomyces alboniger</i>	Sigma, Steinheim, D
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, D
Sedaxylan® 20 mg/ml (Xylazin)	WDT, Garbsen, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka, Steinheim, D
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Target Retrieved Solution 10x (S1699) pH 6	Dako, Santa Clara, CA, USA
TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Titriplex® III (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Tricine	Roth, Karlsruhe, D
Trizma-Base	Sigma, St. Louis, MO, USA
TWEEN 20	Sigma, Steinheim, D
Universal-Agarose "SeaKem®LE"	Axon, Kaiserslautern, D
Water, PCR Grade	Roche, Indianapolis, IN, USA
Xylolersatzmedium	DiaTec, Bamberg, D

### 2.1.3 Assays/Kits

Tab. 5: Verwendete Kits

Kit-Bezeichnung	Hersteller
Bioanalyzer Kit-Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Gene Chip WT PLUS Reagent Kit	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
HTS FluoroBlok™ Multiwell Insert System	Corning®, Bedford, MA, USA
Human CCL2/MCP-1 DuoSet ELISA	R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA
Human CCL20 (MIP3α) ELISA MAX Deluxe Set	BioLegend, San Diego, CA, USA
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim, D
miRNeasy® Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, D
One Shot™ INVαF' Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe, D
peq GOLD Blood DNA Mini Kit Plus	peqLab, Erlangen, D
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit	peqLab, Erlangen, D
Permanent AP Red Kit	Zytomed, Berlin, D
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, D
Super Signal® West Pico	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Tumor Invasion System	Corning®, Bedford, MA, USA
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Venor® GeM Classic, Mykoplasmen Detektionskit	Biochrom AG, Berlin, D

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Durchflusszytometrische Analysen

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde der Integrin- $\beta$ 4-(CD104)-Klon-439-9B Fluoreszenz (eFluor<sup>®</sup>660) gekoppelte Antikörper von eBioscience GmbH (Frankfurt a. M., D) verwendet. Zum Nachweis der Selektinbindung wurden rekombinante humane Fc-Selektin-Chimären eingesetzt, die durch biotinylierte Sekundärantikörper und Allophycocyanin-(APC)-markierte Streptavidin-Moleküle (eBioscience GmbH, Frankfurt a. M., D) zu Clustern zusammengefügt wurden (modifiziert nach Kannagi et al. (2009))

**Tab. 6: Selektincluster-Komponenten.** Auflistung der verwendeten Selektinchimären und Sekundärantikörper zur Erstellung eines Selektinclusters.

Chimäre/Antikörper	Hersteller
Anti-Human IgG-Biotin Antibody, produced in goat	Sigma, Steinheim, D
Recombinant Human E-Selectin/Fc Chimera	R&D Systems <sup>®</sup> , Minneapolis, MN, USA
Recombinant Human IgG1 Fc	R&D Systems <sup>®</sup> , Minneapolis, MN, USA
Recombinant Human P-Selectin/Fc Chimera	R&D Systems <sup>®</sup> , Minneapolis, MN, USA
Recombinant Murine E-Selectin/Fc Chimera	R&D Systems <sup>®</sup> , Minneapolis, MN, USA
Recombinant Murine P-Selectin/Fc Chimera	R&D Systems <sup>®</sup> , Minneapolis, MN, USA

### 2.1.4.2 Western Blot

**Tab. 7: Western-Blot-Antikörper.** Auflistung der für den Western Blot eingesetzten Primärantikörper.

Antigen	Spezies	Hersteller
Annexin A13 (H-1)	Maus monoklonal IgG1	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
HSC70 (B-6)	Maus monoklonal IgG2a	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Integrin $\beta$ 4 (H-1)	Maus monoklonal IgG1	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
K-Cadherin/CDH6	Kaninchen polyklonal	abcam, Cambridge, GB
pH2A.X [EP854(2)Y]	Kaninchen polyklonal IgG1	abcam, Cambridge, GB
$\beta$ -Actin (C-4)	Maus monoklonal IgG1	Santa Cruz, Dallas, TX, USA

Als Sekundärantikörper wurden die HRP-markierten m-IgGk, Ziege Anti-Maus IgG und Ziege Anti-Kaninchen IgG von Santa Cruz verwendet.

### 2.1.5 Enzyme

Tab. 8: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
BamHI	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
EcoRI	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
MluI	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
XbaI	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA

### 2.1.6 Oligonukleotide/primer

Zur Generierung der shRNA-(*short hairpin* RNA)-pLVX-Vektoren wurden Oligo-Sequenzen verwendet, die die Information zur Ausbildung von shRNA gegen Integrin- $\beta$ 4-mRNA besitzen (Tab. 9). Die Oligo-Sequenzen beinhalten mRNA-erkennende Sequenzen (19 bp, in Tab. 9 unterstrichen) und Sequenzen, die für die *Loop*-Region der shRNA kodieren (9 bp, in Tab. 9 fett hervorgehoben). Die Sequenzen der Alu-PCR-*primer* sind ebenfalls in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: DNA-Sequenzen. Oligomere zur Generierung von shITGB4-pLVX-Vektoren und Primer der Alu-PCR.

	DNA-Sequenz
ITGB4 top	5'-gatccGCGAGAAGCTTCACACCTATTTCAAGAGAATAGGTGTGAAGCTTCTCGTTTTTACGCGTg-3'
ITGB4 bottom	5'-aattcACGCGTAAAAACGAGAAGCTTCACACCTAITCTCTTGAAATAGGTGTGAAGCTTCTCGCg-3'
Alu-forward	5'-TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA-3'
Alu-reverse	5'-GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT-3'

### 2.1.7 Vektoren

Zur Generierung von *knock-down*-Zellen wurden pLVX-shRNA1-Vektoren der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F) verwendet. Der shLUC-Kontrollvektor entstammte dem Lenti-X-Expression System Kit der Firma Clontech.

### 2.1.8 Medien

Tab. 10: Verwendete Zellkulturmedien

Medium/Puffer/Lösung	Hersteller
0,05 % Trypsin-EDTA	gibco®, Paisley, GB
Cryo Safe I Medium	c·c·pro, Oberdorla, D
DMEM	Lonza, Verviers, B

DPBS (1x)	gibco <sup>®</sup> , Paisley, GB
HBSS	gibco <sup>®</sup> , Paisley, GB
L-Glutamine 200 mM	gibco <sup>®</sup> , Paisley, GB
McCoy's 5A Medium	gibco <sup>®</sup> , Paisley, GB
Penicillin/Streptomycin	gibco <sup>®</sup> , Grand Island, NY, USA
RPMI 1640	gibco <sup>®</sup> , Paisley, GB
Sodium Pyruvat 100 mM	gibco <sup>®</sup> , Paisley; GB

### 2.1.9 Lösungen

**Tab. 11: Angesetzte Puffer/Lösungen.** Dargestellt sind die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen.

<b>Pufferbezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
0,2 M Na-Phosphatpuffer	160 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O, 20 mM NaH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O
Agarose-Gel	1,8 % in TBE-Puffer
Anodenpuffer	200 mM Trizma-Base, pH 8,9
DEPC-Wasser	0,0001 % Diethyl Pyrocarbonate in Aqua dest.
FACS-Puffer	1 % BSA, 0,05 % NaN <sub>3</sub> in DPBS
Formalin (Phosphat-gepuffert)	3,7 % Formalin in 0,1 M Na-Phosphatpuffer
Gelpuffer	300 mM Trizma-Base, 0,3 % SDS, pH 8,45
Kathodenpuffer	100 mM Trizma-Base, 100 mM Tricine, 1 % SDS, pH 8,25
NaN <sub>3</sub> Stamm	10 % NaN <sub>3</sub> in DPBS
Narkosemittel	12 mg/ml Ketamin, 0,16 % Xylazin in 0,9 % NaCl
Pcb2-Ladepuffer	0,05 M Tris, 0,3 M Saccharose, 1 M 2-Mercaptoethanol, 4 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau, pH 6,8
Propidiumiodid-Lösung	500 µg/ml Propidiumiodid in DPBS
Puromycin-Stammlösung	1 mg/ml Puromycin in DPBS
RIPA-Puffer	65 mM Tris, 154 mM NaCl, 1 % Nonidet P40, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, 1 % PIC, pH 7,4
Sammelgel	24,8 % Gelpuffer, 12 % Acrylamid (40 %)
Softagar-Stammlösung	2 % 2-Hydroxyethylagarose in DPBS
TBE-Puffer	90 mM Trizma-Base, 90 mM Borsäure, 2,5 mM Titriplex <sup>®</sup> III (EDTA) pH 8,0
TBS-T	20 mM Trizma-Base, 140 mM NaCl, 0,05 % TWEEN 20
Transferpuffer	100 mM Trizma-Base, 190 mM Glycin
Trenngel	33 % Gelpuffer, 25 % Acrylamid (40 %), 13 % Glycin

### 2.1.10 Geräte

Zur Durchführung der beschriebenen Arbeiten wurden Standardlaborgeräte von Heraeus, Hettich, Eppendorf und BioRad verwendet. Die Spezialgeräte sind in Tab. 12 aufgelistet.

Tab. 12: Eingesetzte Geräte

Gerät	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Aqua Purificator G7749	Miele, Gütersloh, D
Azure Biosystems, Geldokumentation	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
CoolCell® Einfrierbox	Biocision, San Rafael, CA, USA
CyFlow® Cube 8	Partec, Görlitz, D
DIAS Microplate Reader (MAX 002)	Dynex Technologies, Guernsey, GB
FACS Aria-Fusion	BD Biosciences, Heidelberg, D
Fusion Solo 3S	peqLab, Erlangen, D
Incubating Mini Shaker	VWR, Radnor, PA, USA
Leica EG 1160	Leica, Nussloch, D
Leica TP 1020	Leica, Nussloch, D
LightCycler® 480 II	Roche, Mannheim, D
Mikrotom MICROM HM30	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
NanoDrop	peqLab, Erlangen, D
Shandon Varistain 24-4	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
TECAN	GENios, Grödig, A
Thermo Block	Haep Labor Consult, Bovenden, D
Tissue Lyser II	QIAGEN GmbH, Hilden, D

### 2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien im Bereich der Zellkultur wurden ausschließlich über die Hersteller Sarstedt (Nümbrecht, D), Thermo Scientific (Rockford, MA, USA) und Greiner bio-one (Kremsmünster, A) bezogen. Weitere Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 13 gelistet.

Tab. 13: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
μ-Slide VI <sup>0.4</sup>	ibidi GmbH, Martinsried, D
BD Microlance™3 G26	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD Plastipak™ 20 ml Luer-Lok™	BD Biosciences, Heidelberg, D
Einbettungskassetten	Engelbrecht, Edermünde, D
GeneChip® Human Transcriptom Array 2.0	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Immobilon-P	Merck KGaA, Darmstadt, D

Injectomat Line	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 white	Roche, Mannheim, D
LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche, Mannheim, D
Mikrotom-Einmalklingen	Feather, Osaka, J
Omnifix® Tuberkulin	B. Braun, Melsungen, D
Sterican 20G	B. Braun, Melsungen, D
Sterile Skalpellklingen	Bayha, Tuttlingen, D

## 2.1.12 Software und Statistik

Tab. 14: Verwendete Software

Software	Hersteller
IBM SPSS Statistics 23	IBM
FCS Express 4	DeNovo Software
CapImage Software	Dr. Zeintl, Heidelberg, D
AxioVision Rel. 4.7.2	Carl Zeiss
GraphPad Prism (Version 5.03)	GraphPad Software

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Standardkulturbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden unter Standardkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Feuchtinkubator mit 100 % Luftfeuchtigkeit in T25 bis T175 Kulturflaschen kultiviert. Im Abstand von 2-3 Tagen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-80 % abgelöst und in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 weiter kultiviert. Dazu wurden je nach Zelllinie verschiedene Zellkulturmedien verwendet (Tab. 2). Bei gentechnisch veränderten Organismen (GVO) wurde den Medien 500 ng/ml Puromycin zur Selektion hinzugefügt.

#### 2.2.1.2 Subkultivierung

Zur Subkultivierung adhärenter Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit DPBS gewaschen, um Serumbestandteile zu entfernen. Das Lösen der Zellkontakte erfolgte durch Trypsinierung mittels 0,05 % Trypsin-EDTA für etwa 5 Minuten bei 37 °C. Die Reaktion

wurde mit dem 3-fachen Volumen an serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellen in geeigneter Zelldichte erneut ausgesät.

### **2.2.1.3 Kryokonservierung und Revitalisierung**

Zum Erhalt der Zelllinien in frühen Passagen wurden die Zellen einer zu 70-80 % bewachsenen T75-Flasche nach Trypsinierung pelletiert und in 3 ml CryoSafe I-Medium aufgenommen, das Frostschutzzusätze enthält und kryoprotektiv wirkt. Aliquots von je 1 ml wurden in Kryoröhrchen mit Hilfe der CoolCell®-Einfrierbox bei -80 °C kryokonserviert. Nach 24 Stunden Lagerung wurden die Zellen in Tieftemperaturtanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zur Revitalisierung wurden kryokonservierte Zellen unter Sicht im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und unter sterilen Bedingungen in 5 ml 37 °C warmes Kulturmedium in eine T25-Flasche überführt und bei Standardkulturbedingungen inkubiert.

### **2.2.1.4 Zellzahlbestimmung**

Für Versuche mit definierter Zelldichte wurde die Zellkonzentration mittels Neubauer-Zählkammer (3 x 3 Großquadrate mit je 1 mm<sup>2</sup> Fläche und 0,1 mm Tiefe) bestimmt. Nach Auflegen eines Deckgläschens wurde die Kammer luftblasenfrei mit einer nach Abschnitt 2.2.1.2 generierten Zellsuspension befüllt. Zellen, die sich in den äußeren vier Großquadranten befanden, wurden gezählt und mit der nachfolgend dargestellten Berechnung wurde die Konzentration in Zellen pro ml ermittelt (Formel 1). Im Falle einer sehr konzentrierten Suspension wurde eine Verdünnung von 1:10 in DPBS vorgenommen.

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{\text{gezählte Zellen} * 1000 \mu\text{l}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} * \text{Kammertiefe(mm)} * \text{Verdünnung} * \text{ml}} = \frac{X * 1000 \mu\text{l}}{4 \text{ mm}^2 * 0,1 \text{ mm} * \frac{1}{Y} * \text{ml}} = \frac{X * Y * 2500}{\text{ml}}$$

**Formel 1: Berechnung der Konzentration einer Zellsuspension mittels Neubauerkammer.** X= gezählte Zellen; Y= Verdünnungsfaktor.

### **2.2.1.5 Konditionierte Medien**

Konditionierte Medien wurden durch die Kultivierung von 70 % konfluent gewachsenen Zellen mit serumfreiem Medium über 48 Stunden gewonnen. Die so gewonnenen Medien wurden bei 210 g für 5 Minuten zentrifugiert, anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Für den Einsatz in Kolonieformations-Assays, wurden die Medien 1:2 mit Vollmedium versetzt, so dass eine Endkonzentration von 5 % FCS in den konditionierten Medien vorlag.

### **2.2.1.6 3D-Kolonieformations-Assay**

Zur Nachstellung der Bedingungen *in vivo*, bei denen Zellen im 3D-Raum wachsen, wurden verschiedene Methoden etabliert, die nachfolgend beschrieben werden. Die 3D-Kultivierung erfolgte in gelartigen Medien wie Matrigel und Softagar sowie in Flüssigmedien nach Anti-Haftbeschichtung (polyHEMA).

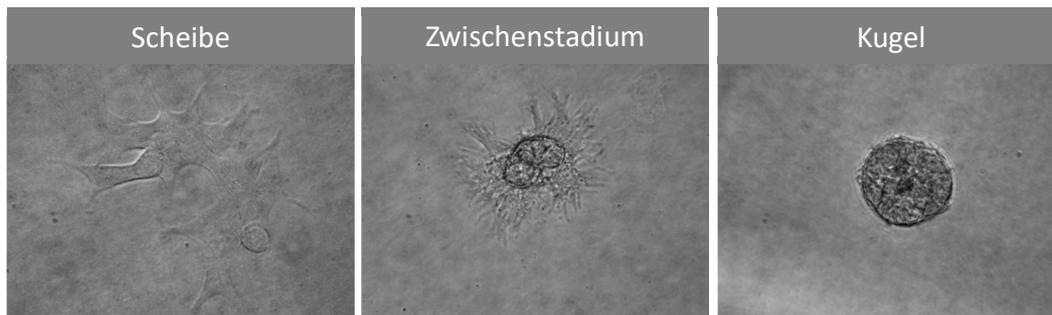
#### **2.2.1.6.1 Matrigel**

Für die Versuche wurde das BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix Cat. 354234 (Lot 3052502, Protein-Konzentration 9,9 mg/ml) verwendet. Matrigel besteht aus einer Anreicherung von Basalmembranproteinen, die aus den EHS-Maus-Sarkomen (Engelbreth-Holm-Swarm) isoliert wurden und reich an extrazellulärer Matrix sind. Es schließt Proteine wie Laminin, Kollagen IV und Heparansulfat-Proteoglykane ein. Matrigel ist bei Temperaturen zwischen 2 °C und 6 °C flüssig, bereits ab 10 °C geliert es. Daher ist darauf zu achten, dass das Auftauen des Matrigels und das anschließende Arbeiten damit bei 4 °C erfolgen.

Die gelartige Konsistenz des Matrigels ermöglicht ein Wachstum der Zellen im Raum, womit die Etablierung von Zellen in bestehendem Gewebe nachgestellt werden kann.

Eine Zellsuspension von 1200 Zellen/ml Kulturmedium wurde mit gleichem Volumen an Matrigel versetzt. Je 50 µl dieser Lösung wurden pro Napf in eine bei 37 °C vorgewärmten 96-Napf-Platte pipettiert, so dass sich pro Napf 30 Zellen im Matrigel befanden. Zum Aushärten wurde die Platte für 30 Minuten in den Feuchtinkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % Luftfeuchtigkeit) gestellt und anschließend mit 200 µl Medium pro Napf überschichtet. Nach 10 Tagen erfolgte ein Wechsel des Mediums. Die Auswertung erfolgte am 12. Tag, wobei Form und Anzahl der gebildeten Kolonien mikroskopisch erfasst wurden.

Die gebildeten Kolonien zeigten verschiedene Formen, die wie folgt definiert wurden: 1) Scheiben, welche Zellen darstellen, die Kontakt zum Boden erlangen konnten und adhärent wuchsen, 2) Kugeln, die klar abgegrenzte Zellanhäufungen im Matrigel darstellen und 3) Zwischenstadien, die Kugeln mit Zellausläufern zeigen (siehe Abb. 6).



**Abb. 6: Kolonienformation in Matrigel.** Dargestellt sind die Stadien Scheibe, Zwischenstadium und Kugel, die im Matrigel unterschieden werden konnten.

#### 2.2.1.6.2 Softagar

Softagar (2-Hydroxyethylagarose) ist wie das Matrigel gelartig, besitzt aber keine Zusätze wie zum Beispiel extrazelluläre Matrixproteine und wird erst bei 40 °C flüssig. Daher wurden die für den Assay verwendeten Medien bei 42 °C im Wasserbad und die verwendeten Platten und Pipettenspitzen bei 37 °C vorgewärmt.

Für den Assay wurde aus der Softagar-Stammlösung mit Kulturmedium ein 0,8 %iger Agar hergestellt. Die Näpfe einer 24-Napf-Platte wurden mit je 250 µl Softagar beschichtet, um die Bildung von scheibenförmigen Kolonien (Abb. 6) zu verhindern. Die Polymerisation des Agars erfolgte für 30 Minuten bei 4 °C. Auf diese Agarschicht wurden jeweils 250 µl einer weiteren 0,3 %igen zellhaltigen Softagarschicht (500 Zellen/ml Softagar) gegeben. Nach 20-minütiger Polymerisation bei 4 °C erfolgte die Inkubation für 14 Tage unter Standardkulturbedingungen, wobei am 3. Tag 1 ml Kulturmedium pro Napf hinzugefügt wurde und das Kulturmedium alle 5-7 Tage gewechselt wurde.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch, wobei jeder Napf mäanderförmig in allen Ebenen betrachtet wurde. Die Kolonien wurden mit Hilfe einer Kamera und der AxioVision-Software (Zeiss) visuell erfasst, im Live-Bild wurde deren Durchmesser bestimmt.

#### 2.2.1.6.3 polyHEMA

Durch die Beschichtung von Zellkulturoberflächen mit polyHEMA (Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate)) bilden Zellen mit adhärentem Wachstumsverhalten im Medium frei bewegliche Kolonien. So kann *in vitro* die Bildung von Tumor-Sphäroiden in der peritonealen Flüssigkeit

(Aszites) nachgestellt werden. Der besondere Vorteil dieser 3D-Wachstumsmethode ist, dass die Zellen direkt für weitere Untersuchungen genutzt werden können.

Zur Beschichtung wurde eine 12 mg polyHEMA/ml-Lösung in 95 %igem Ethanol verwendet. Je nach Plattenart wurden verschiedene Volumina eingesetzt: bei der 96-Napf-Platte 60 µl pro Napf, für die T75er Flasche 4 ml. Zum Verdampfen des Ethanols wurden die Platten für mindestens 48 Stunden im Heizschrank (37 °C bei normaler Atmosphäre) inkubiert. Die so hergestellten Platten konnten bis zum Einsatz für 3 Wochen bei 4 °C gelagert werden.

100 µl einer Zellsuspension mit  $1 \cdot 10^4$  Zellen/ml wurden pro Napf einer mit polyHEMA beschichteten 96-Napf-Platte ausgesät. Unter Standardkulturbedingungen über einen Inkubationszeitraum von 6 Tagen wurde alle 2-3 Tage 50 µl frisches Kulturmedium hinzugefügt. Bei den Ansätzen in den T75er Flaschen wurden 10 ml einer Zellsuspension mit  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Hier erfolgte die Inkubation für drei Tage. Die Kolonien wurden mikroskopisch beurteilt, fotografiert und mit Hilfe der AxioVision-Software (Zeiss) wurde deren Durchmesser bestimmt. Im Anschluss wurden die Kolonien vereinigt und für immunhistologische Untersuchungen in Agar eingebettet (Abschnitt 2.2.1.12). Nur die Ansätze der T75er Flaschen wurden für die Proteinisolation (Abschnitt 2.2.3.2.1) weiterverwendet.

### **2.2.1.7 Herstellung lentiviraler Zellkulturüberstände und Transduktion**

Die Herstellung der Viren und die Transduktion der Ovarialkarzinomzellen erfordern S2-Laborbedingungen. Beides wurde von der Arbeitsgruppe Fehse/Rieken am UKE durchgeführt (Schwankhaus et al., 2014; Weber et al., 2010; Weber et al., 2012).

Zur Virussyntese wurden HEK293T-Zellen mit Hilfe von Kalzium-Phosphaten mit Plasmiden transfiziert, die die Informationen der Virusbestandteile wie zum Beispiel Hülle, Genom oder Kapsel tragen. Die Viren mit den shLUC- und shITGB4-Vektoren (Abschnitt 2.1.7) konnten aus dem jeweiligen Zellüberstand durch Filtration gewonnen werden und wurden bei -80 °C gelagert. Zur Transduktion der Ovarialkarzinomzellen (SKOV3/COV644) wurden verschiedene Volumina eingesetzt. Nach Selektion der transduzierten Zellen durch Puromycin wurde die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch gemessen.

Da der transduzierte Vektor nicht alle Bestandteile zur Virus-Synthese besitzt, konnten die weiteren Arbeiten mit den gentechnisch veränderten Ovarialkarzinomzellen in den S1-Laboren der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt werden. Die erzeugten Zellen werden im Folgenden Kontrollzellen und shITGB4-Zellen genannt.

### **2.2.1.8 Durchflusszytometrie**

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden Zellen durch ein Kapillarsystem geleitet. Durch Lichteinstrahlung können Größe und Granularität der Zellen erfasst werden. Die Darstellung Fluoreszenz-markierter Zellen erfolgt durch die Detektion emittierten Lichts nach Anregung mit verschiedenen Lasern. In dieser Arbeit wurde der CyFlow® Cube 8 von Partec zur Messung und das FACS-(*fluorescence-activated cell sorting*)-Aria-Fusion zur Sortierung der Zellen verwendet. Die Auswertungen erfolgten mit Hilfe der FCS-Express-Software von DeNovo.

#### *2.2.1.8.1 Markierung für die Durchflusszytometrie*

Adhärenente Zellen wurden abgelöst (Abschnitt 2.2.1.2) und einmal mit 1x DPBS gewaschen. Etwa  $1 \cdot 10^5$  Zellen wurden in 100  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und mit 10 ng Antikörper für 15 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Im Falle der Selektin-Cluster wurde je 1  $\mu$ l Selektin-Chimäre mit 0,5  $\mu$ l Anti-human Fc-IgG und 1  $\mu$ l Streptavidin in FACS-Puffer für 10 Minuten inkubiert und für die Zellmarkierung eingesetzt. Für die Messung am CyFlow® Cube 8 wurden die markierten Zellen in 2 ml FACS-Puffer in FACS-Röhrchen überführt. Direkt vor der Messung erfolgte eine Färbung mit Propidiumiodid (1  $\mu$ l, 500  $\mu$ g/ml), das in permeabilisierte Zellen eindringt und eine Darstellung toter Zellen ermöglicht.

#### *2.2.1.8.2 Etablierung der KD-Zelllinie*

Zur Etablierung einer *knock-down*-Zelllinie wurde das entsprechende Zielmolekül auf den transduzierten Zellen (Abschnitt 2.2.1.7) Fluoreszenz-markiert und mit Hilfe von FACS-Aria-Fusion durchflusszytometrisch analysiert und sortiert. Um klonale Effekte zu vermeiden, wurden je 20 Zellen mit geringer Expression des Zielproteins pro Napf einer 96-Napf-Platte in 100  $\mu$ l Medium ausgesät.

### **2.2.1.9 Ermittlung von Wachstumskurven**

Um eine Aussage über die Proliferation bei *knock-down*- und Kontrollzellen geben zu können wurden einfache Zählversuche durchgeführt. In Näpfe einer 6-Napf-Platte wurden Zellen dünn ausgesät ( $1 \cdot 10^4$  Zellen in 5 ml Medium), die Zelldichte wurde so gewählt, dass sie innerhalb der Anlaufphase (Latenzphase) einer Wachstumskurve liegt. Über 8 Tage (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen täglich aus je einem Napf abgelöst und ausgezählt, so dass eine Wachstumskurve erstellt werden konnte.

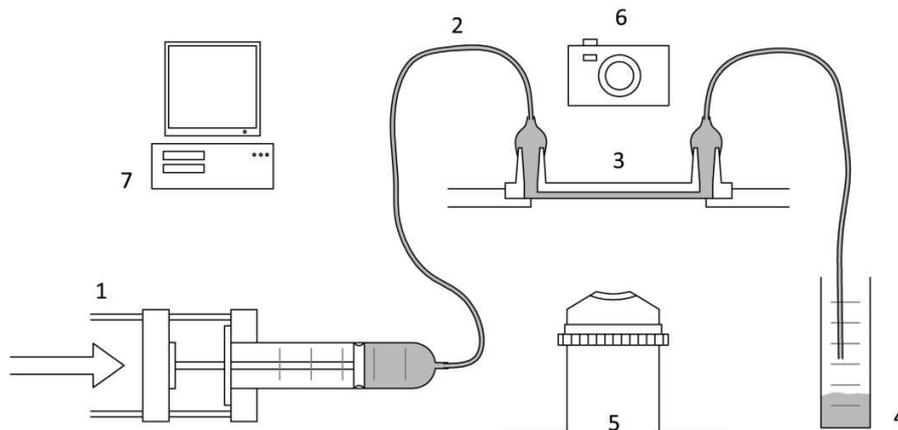
### **2.2.1.10 Migrations- und Invasions-Assay**

Zur Untersuchung der Zellmobilität wurden Migrations- und Invasions-Assays mit Hilfe des Fluoroblocksystems durchgeführt. Hierzu wurden 24-Napf-Platten verwendet, in die Kammern mit einer lichtundurchlässigen Membran der Porengröße 8 µm eingehängt werden. Die Kammern für den Invasions-Assay sind zusätzlich mit einer BD Matrigel™ Matrix beschichtet. Die Kammern wurden mit  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen in 400 µl serumfreiem Medium versetzt, so dass sich eine Zellschicht bilden konnte. In die Näpfe der 24-Napf-Platte wurden 1200 µl Kulturmedium mit 10 % FCS gegeben, damit die Zellen einen Anreiz erhalten durch die Membran zu wandern. Die so vorbereiteten Platten wurden für etwa 20 Stunden bei Standardkulturbedingungen (Abschnitt 2.2.1.1) inkubiert. Gewanderte Zellen blieben an der Unterseite der Membran haften, die nicht gewanderten Zellen blieben auf der oberen Seite der lichtundurchlässigen Membran. Zur Detektion der Zellen erfolgte eine Färbung mit Calcein-AM für 1 Stunde bei Standardkulturbedingungen. Dafür wurde das Medium aus der 24-Napf-Platte entfernt und durch 500 µl einer Lösung von 4 µg Calcein-AM pro ml HBSS-Medium ersetzt. Sobald das Calcein-AM von Zellen aufgenommen wird, erfolgt eine Abspaltung der Acetoxymethylgruppen durch Esterasen und das Calcein kann, an Calcium gebunden, photometrisch detektiert werden. Die Messung erfolgte mit dem TECAN-Reader bei einer Wellenlänge von 485/535 nm. Auf Grund der lichtundurchlässigen Membran wurden nur die Signale der migrierten Zellen detektiert.

### **2.2.1.11 Zellflussversuche**

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften von Zellen unter dynamischen Bedingungen wurde ein Zellflussversuch durchgeführt. Tumorzellen wurden durch ein Schlauchsystem mit konstanter Flussrate über eine beschichtete Flusskammer geleitet. An drei unterschiedlichen

Blickfeldern wurde für jeweils 1 Minute das Flussverhalten der Tumorzellen mit einer Kamera aufgenommen und durch die CapImage-Software zur Auswertung umgeschrieben. In den Versuchen für diese Arbeit sollte die Bindungseigenschaft der Tumorzellen an Selektine untersucht werden.



**Abb. 7: Versuchsaufbau Zellfluss.** Spritzenpumpe mit Spritze (1), Schlauchsystem (2), ibidiTreat-Mehrkanal-Kammer (3), Abfallbehälter (4), Objektiv (5), Kamera (6), Auswertungsstation (7).

#### 2.2.1.11.1 Vorbehandlung der Flusskammern

Es wurden ibidiTreat-Mehrkanal-Kammern verwendet, die eine spezielle Beschichtung für Adhäsionsversuche mit Zellen aufweisen. In diese wurden 60 µl einer 1:100-Verdünnung der rekombinanten Fc-gekoppelten Selektine in 1x DPBS gegeben und für 1 Stunde bei 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> ein Anhaften der Selektine an die beschichtete Oberfläche ermöglicht. Es wurden E- und P-Selektin-Fusionsproteine verwendet, als Kontrolle diente ein rekombinantes humanes Fc-Fragment. Vor der Messung wurden die Kanäle mit DPBS aufgefüllt, um beim Anschließen der Schläuche die Bildung von Luftblasen zu vermeiden.

#### 2.2.1.11.2 Vorbereitung der Zellen

Die zu untersuchenden Zellen wurden bei ca. 80 % Konfluenz mit Trypsin abgelöst und auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro ml Medium eingestellt. Je nach Anzahl der zu untersuchenden Kanäle wurden 5-10 ml Zellsuspension luftblasenfrei in ein Schlauchsystem mit Spritze, die während des Flussversuchs als Injektionsinstrument diente, aufgezogen.

### **2.2.1.12 Zellen in Agar**

Kultivierte Zellen, an denen immunhistologische Färbungen vorgenommen werden sollen, müssen vor der Einbettung in Paraffin zunächst (im fixierten Zustand) in Agar eingebettet werden, damit sie als Pellet im Paraffinblock angeschnitten werden können. Dazu wurden adhärent wachsende Zellen mit 1x DPBS gewaschen und mit einem Zellschaber vom Flaschenboden mechanisch gelöst. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 210 g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 3,7 % Formalin in 1x DPBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend folgten zwei Waschschrirte mit 1x DPBS. Die Proben wurden teils direkt weiterverarbeitet, teils bis zu 7 Tage bei 4 °C in 1x DPBS gelagert. Ebenso wurde mit dem gewonnenen, fixierten Knochenmark aus den Tierversuchen (Abschnitt 2.2.4.2) und der i.p.-Lavage verfahren.

Der 2 %ige Difco™ Agar Nobel wurde zum Lösen in der Mikrowelle aufgeköcht, auf 58 °C abgekühlt und bei ca. 55 °C im Wasserbad flüssig gehalten. Die Zellen wurden erneut bei 210 g zur Pelletierung 5 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 200 µl 2 %igem Difco™ Agar Nobel resuspendiert. Direkt im Anschluss wurde der Agar bei 12000 U/Minute zentrifugiert, um die Zellen als Pellet im Agar zu immobilisieren. Nachdem der Agar ausgehärtet war (15 Minuten bei 4 °C), wurde der Agarzylinder mit Hilfe einer G1-Kanüle aus dem Reaktionsgefäß entfernt und der zellfreie Anteil mit Hilfe eines Skalpell abgeschnitten. Das in Agar eingebettete Zellpellet wurde in dieser Form in Einbettungskassetten überführt und in Paraffin eingebettet (Abschnitt 2.2.3.1.1).

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Erstellung von Vektoren**

Die Oligonukleotidsequenzen, die für die jeweilige shRNA kodieren, wurden so gewählt, dass sie zu einer Doppelstrang-DNA mit 5'-Überhang AATT zusammengelagert werden können (*Annealing*). Für das *Annealing* wurden je 2 µM der *forward* und *reverse* Oligosequenzen in 50 µl PCR-Grade-Wasser 30 Sekunden lang bei 95 °C erwärmt und stufenweise für je 2 Minuten bei 72 °C, 37 °C und 25 °C abgekühlt. Die Lagerung erfolgte anschließend bei 4 °C. Der pLVX-shRNA1-Vektor wurde durch eine Restriktion mit *Bam*HI und *Eco*RI linearisiert. Die

zusammengelagerten Oligosequenzen und der linearisierte Vektor wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert. Kompetente *E. coli* wurden mit dem erstellten Vektor durch Hitzeschock transformiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem One Shot™ INVαF' Chemically Competent *E. coli* Kit. Zur Amplifizierung wurden einzelne Kolonien in 4 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Die DNA der amplifizierten Kolonien wurde mit Hilfe des QIAprep®Spin Miniprep Kits isoliert und zur Kontrolle der Insertion des Oligonukleotids in den Vektor ein Kontroll-Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Mlu*I durchgeführt. Der gewünschte Vektor sollte im Agarose-Gel zwei Banden der Größe 6900 bp und 1200 bp darstellen.

### **2.2.2.2 Isolierung von DNA**

Das aus den Tierversuchen (Abschnitt 2.2.4.2) gewonnene Material soll hinsichtlich der Anwesenheit von humanen Tumorzellen untersucht werden. Dafür wurde DNA aus Blut, Knochenmark und Lunge isoliert, um mit Hilfe des Nachweises von humanen Alu-Sequenzen auf die Anzahl von Tumorzellen pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen des Ausgangsgewebes zu schließen und eine Aussage über die Fernmetastasen treffen zu können. Die Aufreinigung von genomischer DNA bediente sich der Bindungseigenschaften von Silikamembran-Säulen. Die Gewebeproben wurden zunächst unter denaturierenden Bedingungen lysiert und auf die Säulen geladen. Die DNA bindet an die Silikamembran, so dass in verschiedenen Waschschrritten Kontaminationen wie Proteine und Zellmembranen entfernt werden konnten. In einem Elutionsschritt wurde die gebundene DNA mobilisiert und isoliert.

Die Gewebeproben aus Knochenmark und Lunge wurden zunächst unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Dazu wurde die linke Lungenhälfte mit Hilfe des Tissue Lyser II in 150 µl DPBS homogenisiert und das Knochenmark pellettiert und in 200 µl DPBS aufgenommen. Die Lysierung erfolgte mit dem peqGOLD Tissue DNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers zum Sonderprotokoll für eukaryotische Zellen. Für die in dem Kit anschließende DNA-Isolierung wurden 100 µl des Lungengewebes und 200 µl des Knochenmarks eingesetzt.

Die DNA-Isolierung aus 200 µl Vollblut und kultivierten Zellen ( $1 \cdot 10^6$  Zellen in 200 µl DPBS) erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde das peqGOLD Blood DNA Mini Kit Plus verwendet. Die DNA-Elution erfolgte in einem Volumen von 200 µl.

### **2.2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Nanodrops aus 2 µl DNA bestimmt.

### **2.2.2.4 Alu-PCR**

Zur Ermittlung von humaner DNA in muriner Lunge, murinem Knochenmark und murinem Blut wurde aus der isolierten genomischen DNA eine PCR auf humane Alu-Sequenzen durchgeführt. Bei den Alu-Sequenzen handelt es sich um repetitive, stark im humanen Genom verbreitete DNA-Sequenzen. Mit Hilfe einer Standardreihe der humanen Tumorzellen in einer qRT-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*) lässt sich die Menge an humanem Material bestimmen und eine Aussage über disseminierte Tumorzellen im Xenograft-Mausmodell treffen (Nehmann et al., 2010; Schneider et al., 2002).

Als Standardreihe diente eine Verdünnungsreihe in 10er Verdünnungsschritten der isolierten DNA von 2000 bis 0,002 humanen Zellen in muriner *Background*-DNA. Die Anfangsverdünnung setzte sich aus 12,5 µl SKOV3 DNA ( $1 \cdot 10^6$  Zellen/200µl) in 50 µl muriner *Background*-DNA zusammen.

Die PCR wurde pro Napf, wie in Tab. 15 dargestellt, angesetzt und nach dem Protokoll in Tab. 16 durchgeführt.

**Tab. 15: Ansatz der Alu-PCR.** Angabe der Substanzen, die für eine Alu-PCR zusammen pipettiert werden.

<b>Volumen</b>	<b>Substanz</b>
0,2 µl	<i>Reverse</i> Primer
0,2 µl	<i>Forward</i> Primer
2,6 µl	Aqua dest.
5 µl	LC SYBR green
2 µl	Probe bzw. Standard

Tab. 16: Ablauf des Alu-PCR-Programms

Programmpunkt	Temperatur (T)(°C)	Zeit (Sek.)	$\Delta T/\text{Zeit}$ (°C/Sek.)	Zyklus
Vorinkubation	95	300	4,4	1
Amplifikation	95	10	4,4	40
	67	10	2,2	
	72	10	4,4	
Schmelzkurve	95	5	4,4	1
	65	60	2,2	
	97	fortlaufend	0,11	
Kühlung	40	30	2,2	1

### 2.2.2.5 Mykoplasmen-Detektion

Während der Kultivierung von Tumorzellen kann es zu einer Verunreinigung durch Mykoplasmen kommen, was zu einem veränderten Verhalten der kultivierten Zellen führen kann. Daher wurden die Zellen nach dem Revitalisieren und vor dem Einsatz in *in-vivo*-Versuchen auf die Anwesenheit von Mykoplasmen mittels PCR untersucht. Mit Hilfe des peqGOLD Blood DNA Mini Kit Plus wurde die DNA aus  $1 \cdot 10^5$  Zellen isoliert. Die Darstellung von Mykoplasmen-DNA erfolgte nach Herstellerangaben des Venor®GeM Classic Detektionskits.

### 2.2.2.6 Nachweis von E- und P-Selektindefizienzen

Zur Genotypisierung der E- und P-Selektin-defizienten Mäuse (KO) wurde eine PCR aus Schwanzbiopsiematerial durchgeführt, modifiziert nach Frenette et al. (1996). Die DNA-Isolierung aus den Biopsien erfolgte nach Angaben des peqGOLD Tissue DNA Mini Kits.

Das PCR-Programm bestand aus 30 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden, Primerhybridisierung bei 58 °C für 30 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 40 Sekunden. Zu Beginn erfolgte eine Denaturierung bei 95 °C für 3 Minuten und nach dem Durchlauf von 30 Zyklen erfolgte eine Inkubation bei 72 °C für 3 Minuten mit anschließender Abkühlung auf 4 °C.

Nach Auftrennung in einem Ethidiumbromid beinhaltenden, 1,8 %igen Agarosegel konnten die amplifizierten Sequenzen als Banden unter UV-Licht mit der Geldokumentation (Azure Biosystems) dargestellt werden. Im Falle des P-Selektins ließen sich Banden von 322 bp (wt) und

479 bp (KO) darstellen. Das E-Selektin konnte anhand der Banden von 664 bp (wt) und 315 bp (KO) beurteilt werden. Ein reiner KO von E- und P-Selektinen zeigte in der E-Selektin-PCR eine Bande bei 315 bp und in der P-Selektin-PCR eine Bande von 479 bp.

#### **2.2.2.7 Isolierung von RNA**

Aus dem in Trizol (peqGOLD TriFast™) eingefrorenen Tumormaterial wurde für Genexpressionsanalysen RNA isoliert. Dazu wurde die Gewebeprobe in flüssigen Stickstoff gegeben und mittels Mörser und Pistill pulverisiert. Während des Auftauens wurden 1100 µl Trizol hinzugefügt und die Probe in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 160 µl Chloroform wurde die Probe 3 Minuten unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 14 °C und 8000 g erfolgte eine Phasentrennung, bei der die RNA in wässriger Phase (oben) und die DNA und Proteine in der Phenol-Chloroformphase (Trizol, unten) zu finden sind. Die RNA-haltige Phase wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 400 µl Isopropanol inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und 8000 g wurde der Überstand abgenommen, und es erfolgte ein Waschschriff mit 500 µl 70 %igem Ethanol (5 Minuten, 4 °C, 5000 g). Nach Lufttrocknung wurde das Pellet in 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen, zur Aufreinigung wurden 525 µl 100 %iges Ethanol hinzugegeben. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben des miRNeasy® Mini Kits. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### **2.2.2.8 Kontrolle der RNA-Qualität**

Der Standard für die RNA-Qualität ist die RIN (*RNA integrity number*). Diese wurde nach Herstellerangaben am Bioanalyzer mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit ermittelt.

#### **2.2.2.9 Transkriptom-Array**

Vorbereitend wurde aus der RNA eine cDNA synthetisiert, die zusätzlich fragmentiert und markiert wurde. Dies erfolgte mit dem GeneChip® WT PLUS Reagent Kit aus 500 ng Gesamt-RNA nach den Herstellerangaben (Affymetrix Manual P/N 703174). Die Wasch-, Färbe- und Detektionsschritte der DNA-Hybridisation auf dem GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0

erfolgte nach Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific). Die Datenaufbereitung erfolgte mit der Affymetrix Software (Irizarry et al., 2003).

Die Analysen wurden von D. Maltseva am Bioclinicum Research Center in Moskau durchgeführt und die Daten in Form von Excel-Tabellen zur Verfügung gestellt.

## **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.3.1 Histologie und Immunhistologie**

#### *2.2.3.1.1 Paraffineinbettung*

Nach der Fixierung in 3,7 %igem phosphat-gepuffertem Formalin über 24 Stunden, erfolgte zunächst eine Entwässerung des Gewebes, um es für die Aufnahme von Paraffin vorzubereiten. Dieser Vorgang wurde im Gewebeautomaten (Leica TP 1020) durchgeführt und erfolgte in einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe mit anschließender Durchdringung mit Paraffin (Tab. 17). Die Entwässerung dauerte insgesamt 29 Stunden.

**Tab. 17: Entwässerungsprotokoll**

<b>Lösung</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Inkubationstemperatur</b>
50 % Isopropanol	90 Minuten	RT
70 % Isopropanol	30 Minuten	RT
70 % Isopropanol	90 Minuten	RT
90 % Isopropanol	60 Minuten	RT
90 % Isopropanol	120 Minuten	RT
90 % Isopropanol	120 Minuten	RT
abs. Isopropanol	210 Minuten	RT
abs. Isopropanol	210 Minuten	RT
abs. Isopropanol	210 Minuten	RT
flüssiges Paraffin	5 Stunden	63 °C
flüssiges Paraffin	5 Stunden	63 °C

Die paraffindurchtränkten Gewebestücke wurden bei 63 °C in Metallformen mit Paraffin überführt. Zur Kennzeichnung wurde die beschriftete Seite der Kassette auf dem Block eingegossen. Das Abkühlen des Blockes erfolgte auf einer -5 °C kalten Kühlplatte. Die an der Ausgießvorrichtung (Leica EG 1160) erstellten Paraffin-Gewebeblöcke konnten nun aus den Metallformen gelöst und am Mikrotom geschnitten werden.

#### 2.2.3.1.2 *Schneiden*

Aus den Gewebeblöcken wurden mit Einmalklingen Schnitte mit einer Dicke von 4 µm am Mikrotom angefertigt. Die Schnitte wurden in Wasser mit Raumtemperatur vorgestreckt und anschließend in 37 °C warmem Wasser vor dem Aufziehen auf Glasobjektträger gestreckt. Die so erstellten Schnitte wurden über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C auf den Glasobjektträgern fixiert.

#### 2.2.3.1.3 *Entparaffinieren*

Da die späteren Färbungen auf wässriger Basis durchgeführt werden, müssen die Schnitte zuvor entparaffiniert werden. Dafür durchliefen sie auf Metallständern im Färbeautomaten (Shandon Varistain 24-4) eine absteigende Ethanol-Reihe. Die Gesamtzeit für diesen Vorgang betrug 37 Minuten (Tab. 18).

**Tab. 18: Entparaffinierungsprotokoll**

<b>Lösung</b>	<b>Inkubationszeit</b>
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
abs. Ethanol	3 Minuten
abs. Ethanol	5 Minuten
96 % Ethanol	5 Minuten
70 % Ethanol	5 Minuten
50 % Ethanol	5 Minuten
Aqua dem.	2 Minuten
Aqua dem.	2 Minuten

Die Entparaffinierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die nach der Entparaffinierung in Aqua dem. gelagerten Schnitte standen nun für wässrige Färbungen zur Verfügung.

#### 2.2.3.1.4 *Immunhistologische Färbungen*

Die Reihenfolge der Färbeschritte erfolgte für die verschiedenen immunhistologischen Färbungen jeweils nach dem gleichen Muster. Die entsprechenden Reagenzien und Antikörper sind in Tab. 19 aufgeführt. Die entparaffinierten Schnitte wurden unter Hitzezufuhr mit speziellen Puffern zur Freilegung der Epitope behandelt. Nach Abkühlung auf Eis wurden die Schnitte gewaschen. Dies erfolgte für 2x 5 Minuten in TBS-T und 1x 5 Minuten in TBS. Um

Hintergrundsignale zu vermeiden, erfolgte bei einigen Färbungen eine Blockierung mit Serum für 30 Minuten. Die eingesetzten Antikörper wurden mit Antikörperdiluent verdünnt und der Primärantikörper zeitgleich mit der Isotypen-Kontrolle für 1 Stunde inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Isotypen-Kontrollen getrennt von den übrigen Schnitten gewaschen. Die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper erfolgte für 30 Minuten. Durch anschließende Waschschriffe wurden die nicht gebundenen Antikörper entfernt. Eine Inkubation für 30 Minuten mit dem ABC-AP-Komplex (ABC-Kit) ermöglichte die Markierung der gebundenen Antikörper mit alkalischer Phosphatase (AP). Nach weiteren Waschschriffen erfolgte die Entwicklung mit dem Permanent AP Red Kit. Dabei wird ein Substrat durch die alkalische Phosphatase zu einem roten Chromogen umgesetzt. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation in Leitungswasser für 3 Minuten gestoppt und kurz mit Aqua dem. gespült. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte durch eine etwa 5-sekündige Inkubation in Hämatoxylin nach Mayer mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser. In Tab. 19 sind Abweichungen und spezielle Antikörper der verschiedenen immunhistologischen Färbungen aufgelistet.

**Tab. 19: Chronologie der immunhistologischen Färbungen** mit Angaben zu durchgeführten Prozessen und verwendeten Antikörpern und Substanzen.

Färbung	Vorbehandlung	Blockierung	Primärantikörper	Isotypen-Kontrolle	Sekundärantikörper	Entwicklung
<b>DKK1</b>	S1699 pH 6, 2x 4 Minuten Mikrowelle	keine	Ziege Anti-Mensch Dkk1, biotinyliert; (R&D) 1:20	keine	“Streptavidin Alkaline Phosphatase (ABC-AP Kit)”	Dako REAL™ Detection System (Dako)
<b>ITGB4</b>	S1699 pH 6, 2x 4 Minuten Mikrowelle	Kaninchenserum (Dako, 68 g/l) 1:10	Ratte Anti-Mensch Integrin β 4 (439-9B) (abcam, 0,5 mg/ml) 1:25	Ratte IgG2b (Antigenix America) 1:10	Kaninchen Anti-Ratte (Dako) 1:200 in TBS	Permanent Red AP Kit (Zytomed)
<b>Ki-67</b>	S1699 pH 6, 16 Stunden 85 °C Wasserbad	Ziegenserum (Dako) 1:10	Maus Anti-Mensch Ki-67 (M7240); (Dako 35 mg/l) 1:32	Maus IgG1 (Dako 100 mg/l) 1:91	Ziege Anti-Maus (Dako 0,77 g/l) 1:200 in TBS	Permanent Red AP Kit (Zytomed)
<b>mCD45</b>	S1699 pH 6, 2x 4 Minuten Mikrowelle	keine	Ratte Anti-Maus CD45 (30-F11) (BD Biosciences) 1:25	Ratte IgG2b (BioLegend) 1:400	Kaninchen Anti-Rat (Jackson Immuno Research) 1:100 in TBS	Permanent Red AP Kit (Zytomed)
<b>pH2A.X</b>	S1699 pH 6, 10 Minuten 121 °C Drucktopf	keine	Kaninchen Anti-Mensch pH2A.X [EP854(2)Y] (abcam) 1:672	Kaninchen Ig (Dako) 1:266000	Schwein Anti-Kaninchen (Dako 0,51 g/l) 1:200 in TBS	Permanent Red AP Kit (Zytomed)

### 2.2.3.1.5 Entwässerung

Zur Erhaltung des Färbeergebnisses erfolgte das Eindecken mit Eukitt, einem Xylol-haltigen hydrophoben Aushärtemedium. Dazu müssen die Schnitte nach der Färbung in der

aufsteigenden Ethanol-Reihe entwässert werden. Die Gesamtdauer für diesen Vorgang im Färbeautomaten betrug 26 Minuten, 75 Sekunden.

**Tab. 20: Entwässerungsprotokoll gefärbter Schnitte**

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

In Xylol stehen die Schnitte zum Eindecken mit Deckgläschen zur Verfügung.

#### *2.2.3.1.6 Eindecken*

Die gefärbten und entwässerten Schnitte wurden mit Hilfe von Deckgläschen und dem Eindeckmedium Eukitt fixiert: Jeweils ein Tropfen Eukitt wurde mit Hilfe eines Glasstabes auf den Schnitt getropft, dann ein Deckgläschen aufgelegt. Mögliche Luftblasen wurden vorsichtig durch leichten Druck auf das Deckgläschen entfernt und überschüssiges Eukitt anschließend vorsichtig abgewischt.

#### *2.2.3.1.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer*

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung werden Zellkerne durch das Hämatoxylin blau/violett und das Zytoplasma durch das Eosin rosa angefärbt. Im Gegensatz zu den immunhistologischen Färbungen werden bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung keine speziellen Proteine angefärbt, sie dient vielmehr zur Übersicht des gefärbten Gewebes.

**Tab. 21: Hämatoxylin-Eosin-Färbeprotokoll**

<b>Lösung</b>	<b>Inkubationszeit</b>
Hämatoxylin	3 Minuten
Aqua dem.	2 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
Eosin	3 Minuten

Nach der Färbung sollen die Schnitte zügig entwässert werden, da ein längeres Verbleiben in Aqua dem. ein Auswaschen des Eosins zur Folge hätte.

#### *2.2.3.1.8 Auswertung der Färbungen*

##### *2.2.3.1.8.1 Auswertung von Lungenmetastasen*

Zur Auswertung von Lungenmetastasen wurden rechte Lungenhälften zunächst zerteilt, zufällig angeordnet in Paraffin eingebettet und die Blöcke dann bei einer Schnittdicke von 5 µm am Mikrotom geschnitten. Jeder 10. Schnitt wurde für mögliche Färbungen auf Deckgläschen aufgezogen. Eine Serie von 10 Schnitten aus dem mittleren Bereich der Lunge wurde Hämatoxylin-Eosin gefärbt und mikroskopisch betrachtet, dabei wurden die Metastasen pro Schnitt gezählt. Um auf die Gesamtanzahl der Metastasen in der rechten Lungenhälfte schließen zu können, wurde folgende Formel verwendet (Jojovic und Schumacher, 2000):

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

**Formel 2: Berechnung der Lungenmetastasen**  $X$  = Lungenmetastasen gesamt;  $\bar{x}_{10}$  = Mittelwert der 10 gezählten Schnitte;  $z$  = Gesamtanzahl der Schnitte

Da nur 10 Schnitte aus dem mittleren Bereich der Lunge gezählt wurden, muss ein Korrektionswert von 20% beachtet werden.

##### *2.2.3.1.8.2 Auswertung immunhistologische Färbungen*

Für die kernständigen Färbungen wie Ki-67 und pH2A.X wurden an 5 verschiedenen Blickfeldern jeweils die positiv gefärbten Zellen auf 100 Zellen gezählt. Aus den prozentualen Anteilen der positiv gefärbten Zellen pro Blickfeld wurde ein Mittelwert errechnet.

#### **2.2.3.2 Western Blot**

##### *2.2.3.2.1 Gewinnung von Proteinen*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteine für die Western-Blot-Analyse aus kultivierten Zellen und Tumormaterial gewonnen. Zellen, deren Konfluenz 80 % betrug, wurden mit 1x DPBS gespült und in 1 ml 1x DPBS mit Hilfe eines Zellschabers mechanisch abgelöst. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C und 210 g wurde das Pellet in 200 µl RIPA-Puffer

aufgenommen, 15 Sekunden aufgewirbelt und 3- bis 4-mal durch eine Spritze mit einer Kanüle der Größe 20G gezogen. Nach 15 Minuten auf Eis wurde mehrfach aufgewirbelt und eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 35000 g durchgeführt. Dabei werden die Zellen anhand des Puffers aufgeschlossen und durch das Zentrifugieren die Zellmembranbestandteile und Organellen von den freien Proteinen getrennt. Die im Überstand enthaltenen extrahierten Proteine wurden in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Tumore wurden direkt nach der Entnahme in Kryoröhrchen mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Proteinextraktion wurden die Tumore direkt in Stickstoff gegeben und mit Mörser und Pistill unter Zugabe von 200 µl RIPA-Puffer zu Pulver zermahlen. Nach Auftauen des zermahlenden Tumors wurden erneut 200 µl RIPA-Puffer hinzugefügt und diese Suspension in ein neues Kryoröhrchen überführt. Die Probe wurde in Stickstoff eingefroren und über Nacht bei -80 °C gelagert. Zur Proteinisolierung wurden die Proben bei 4 °C aufgetaut, in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt, 15 Sekunden lang aufgewirbelt und für 30 Minuten bei 4 °C und 35000 g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### *2.2.3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung*

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits von Thermo Scientific entsprechend den Herstellerangaben auf einer 96-Napf-Platte bestimmt. Die Reaktionslösung enthält Kupfersulfat in alkalischer Lösung und Bicinchoninsäure (BCA). In alkalischer Lösung werden die Kupferionen durch Peptidbindungen der Proteine von zweiwertigen zu einwertigen Ionen reduziert. Die einwertigen Kupferionen gehen mit Bicinchoninsäure einen Komplex ein, was zu einem Farbumschlag zu Violett führt. Dieser kann nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C bei 562 nm photometrisch bestimmt werden. Eine BSA-Standardreihe (bovines Serumalbumin) im Bereich von 5-200 µl/ml in sieben Schritten und je zwei Verdünnungen (1:100 und 1:200) der zu bestimmenden Proben wurden in Triplikaten untersucht.

#### *2.2.3.2.3 Probenvorbereitung*

Zur Detektion der Proteine mittels Western Blot wurden 30 ng Gesamtprotein auf ein SDS-Gel (Sodiumdodecylsulfat) aufgetragen. Die Proben wurden, je nach Taschengröße, auf identische Volumina mit RIPA-Puffer eingestellt. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch die Zugabe von jeweils einem Volumen Pcb2-Ladepuffer und der Erhitzung auf 95 °C für 5 Minuten. Im Ladepuffer enthaltenes  $\beta$ -Mercaptoethanol ist in der Lage, Disulfidbrücken innerhalb von Proteinen aufzubrechen und damit Tertiärstrukturen von Proteinen zu lösen. Das SDS lagert sich den Proteinen an und verleiht ihnen eine negative Ladung. Die wiederum führt zur Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen und zu Abstoßungsprozessen, die die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufheben. In dieser Form werden die Proben auf das SDS-Gel aufgetragen. Vom Marker wurden 7-10  $\mu$ l geladen. Um ein gerades Laufen der Proben zu gewährleisten, wurde der Marker mit Pcb2-Ladepuffer versetzt. Es wurden Standard-Gelelektrophorese-Kammern von Hoefer der Größe 18 x 16 cm und von BioRad der Größe 8,6 x 6,7 cm verwendet.

#### *2.2.3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

Die Proteine wurden mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), bestehend aus 4,8 %igem Sammelgel und 10 %igem Trenngel, aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld anhand der negativen Ladung nach molekularer Größe. Dafür wurden je nach System 60 V über 15 Stunden oder 140 V für 1 Stunde, 15 Minuten angelegt.

#### *2.2.3.2.5 Proteintransfer auf PVDF-Membran*

Zum Transfer der Proteine auf eine Methanol-aktivierte Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran (Immobilon-P) wurde das Tank-Blot-Verfahren angewendet. Der Transfer erfolgte bei 290 mA für 4,5 Stunden bei Raumtemperatur.

#### *2.2.3.2.6 Immobilisierung der Proteine*

Zur Fixierung der Proteine wurde die Membran nach dem Transfer in Methanol äquilibriert und vollständig getrocknet. Vor der weiteren Verwendung wurde die Membran erneut mit Methanol aktiviert und konnte nach kurzem Spülen in Aqua dem. für die Blockierung oder eine Färbung mit Ponceau S weiterverwendet werden.

#### *2.2.3.2.7 Proteinfärbung mit Ponceau S*

Zur Darstellung des Gesamtproteins besteht die Möglichkeit, eine Färbung der Membran mit Ponceau S durchzuführen. Durch die Ponceau-Färbung kann ein erfolgreicher Transfer der Proteine dargestellt werden.

Die Methanol-aktivierte Membran wurde hierzu nach dem Proteintransfer für 4 Minuten mit dem Ponceau-S-Reagenz bei Raumtemperatur gefärbt. Die Proteinbanden erschienen nach Entfärben mit Aqua dem. rot. Das Färbeergebnis wurde zur Dokumentation mit der Fusion-Solo-3S-Kamera fotografiert. Die Membran konnte anschließend für die Färbung mit Antikörpern eingesetzt werden.

#### *2.2.3.2.8 Blockierung freier Bindungsstellen*

Zur Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran erfolgte eine Inkubation mit 5 %igem Blockierungsreagenz für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

#### *2.2.3.2.9 Immunodetektion membrantransferierter Proteine*

Zur Darstellung ausgewählter Proteine erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte bei 4 °C über Nacht in 5 %igem Blockierungsreagenz. Nicht gebundene Antikörper wurden in 3 Waschschritten für je 10 Minuten mit TBS-T entfernt. Durch einen HRP-markierten (*horseradish peroxidase*) Sekundärantikörper kann die Bindung des Primärantikörpers durch Umsetzung eines Chemilumineszenz-Substrates in Form von Lichtemission dargestellt werden. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 1,5 %igem Blockierungsreagenz in einer Verdünnung von 1:4000. Überschüssige Antikörper wurden durch 4maliges Waschen für jeweils 10 Minuten entfernt, eine Inkubation der Membran mit Chemilumineszenz-Substrat erfolgte für 5 Minuten. Die Detektion erfolgte digital mit der Fusion-Solo-3S-Kamera.

### **2.2.3.3 ELISA**

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) auf CCL2 und CCL20 wurde nach Herstellerangaben des Human CCL2/MCP-1 DuoSet ELISA Kits und Human CCL20 (MIP3 $\alpha$ ) ELISA MAX Deluxe Set Kits von M.Sc. Sandra Frau Hanika durchgeführt (Institut für Anatomie und

Experimentelle Morphologie, UKE). Die Zellsate wurden wie in Abschnitt 2.2.3.2.1 beschrieben erstellt. Die Zellüberstände wurden ebenso wie die konditionierten Medien gewonnen (Abschnitt 2.2.1.5).

#### **2.2.4 Tierexperimentelle Arbeiten**

Die Tierversuche wurden in den Versuchstiereinrichtungen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) nach Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt. Die Tierhaltung erfolgte in Pathogen-freier Umgebung bei 21 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 50 % und mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden. Die Tiere wurden in individuell ventilierten Käfigen gehalten sowie mit Trockenfutter und autoklaviertem Leitungswasser *ad libitum* versorgt. Die Tierversuche wurden durch den Antrag G15/69 von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt.

Für *in-vivo*-Untersuchungen wurden Xenograft-Modelle verwendet, wobei humane Tumorzellen in einen murinen Organismus injiziert wurden.

##### **2.2.4.1 Injektion der Zellen**

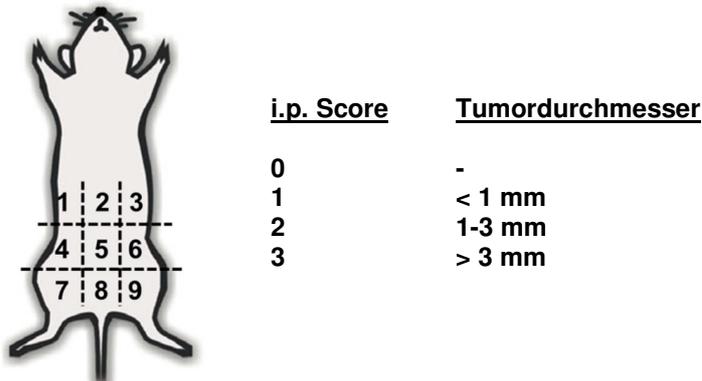
Durch die i.p. Tumorzellinjektion von  $1 \cdot 10^6$  Zellen in 200 µl FCS-freiem Medium soll die Bildung von entzündlicher Peritonealflüssigkeit (Aszites) und einer intraperitonealen Karzinose hervorgerufen werden, was die häufigste Metastasierungsform beim Ovarialkarzinom darstellt.

##### **2.2.4.2 Gewebe- und Blutentnahme**

Die Versuchsabbruchkriterien waren Anzeichen von Aszites, Gewichtsverlust und allgemein auffällige Symptome wie stelziges Laufen, Absondern von der Gruppe und aufgestelltes, struppiges Fell. Den betroffenen Tieren wurde eine tödliche Dosis Narkosemittel (150-200 µl pro 10 g Körpergewicht) i.p. injiziert. Bei negativem Zwischenzehenreflex wurden die Tiere kardial punktiert, um Blut für weitere Analysen zu gewinnen. Die Lagerung des Blutes erfolgte bei 4 °C in EDTA-Röhrchen. Um ein Ableben der Tiere zu garantieren, wurde im Anschluss eine zervikale Dislokation durchgeführt.

Zur Entnahme der Organe wurde zunächst das Fell auf der ventralen Seite entfernt, so dass die Organe durch das Bauchfell erkennbar waren. Die Beurteilung eines starken Aszites wurde in

diesem Status erhoben. Zur Beurteilung schwächerer, zellreicher Aszites und zur Entnahme der Organe wurde das Bauchfell durch Inzision eröffnet. Zur Erhebung des i.p. Scores wurde der intraperitoneale Raum in 9 Segmente unterteilt (Abb. 8) und die Anteile der makroskopisch sichtbaren i.p. Karzinose begutachtet.



**Abb. 8: Aufteilung des Peritonealraums.** Dargestellt ist die Segmentierung des Peritonealraums zur Erhebung des i.p. Scores modifiziert nach (Cho et al., 2014; Sugarbaker, 1999).

Pro Segment wurden je nach Tumorgröße und -anzahl bis zu 3 Scoringpunkte vergeben. Ein Tumor mit Durchmesser < 1 mm erhielt 1 Scoringpunkt. Stellte sich ein Tumordurchmesser > 3 mm dar, wurden 3 Punkte vergeben. Tumoren mit einem Durchmesser zwischen 1 mm und 3 mm wurden mit 2 Punkten betitelt. Traten in einem Segment zwei Tumoren < 1 mm auf, wurden 2 Scoringpunkte vergeben. Nach der Beurteilung wurde durch das Zwerchfell das Herz-Lungen-Paket entnommen. Die linke Lungenhälfte wurde für die Alu-PCR in Kryoröhrchen in Stickstoff eingefroren, die rechte Lungenhälfte für die mikroskopische Beurteilung der Metastasenanzahl zur Einbettung in Agar und Paraffin in Formalin fixiert (Abschnitt 2.2.1.12). Anschließend wurden Organe wie Leber, Darmpaket und Ovarien mit Tuben für die Fixierung in Formalin und die spätere Einbettung in Paraffin entnommen. Proben der i.p. Karzinose und des Einstichtumors wurden zur Gewinnung von Proteinen und RNA in Kryoröhrchen in Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Den Proben für die RNA-Isolierung wurden 500 µl Trizol zugegeben, zusätzlich wurden Anteile zur mikroskopischen Beurteilung in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus Unter- und Oberschenkeln wurde Knochenmark gewonnen, das durch Ausspülen mit NaCl zur Gewinnung von DNA für die Alu-PCR-Analyse (rechte Schenkel) und

durch Ausspülen mit Formalin zur Fixierung und späterer Einbettung in Agar und Paraffin (linke Schenkel) diene.

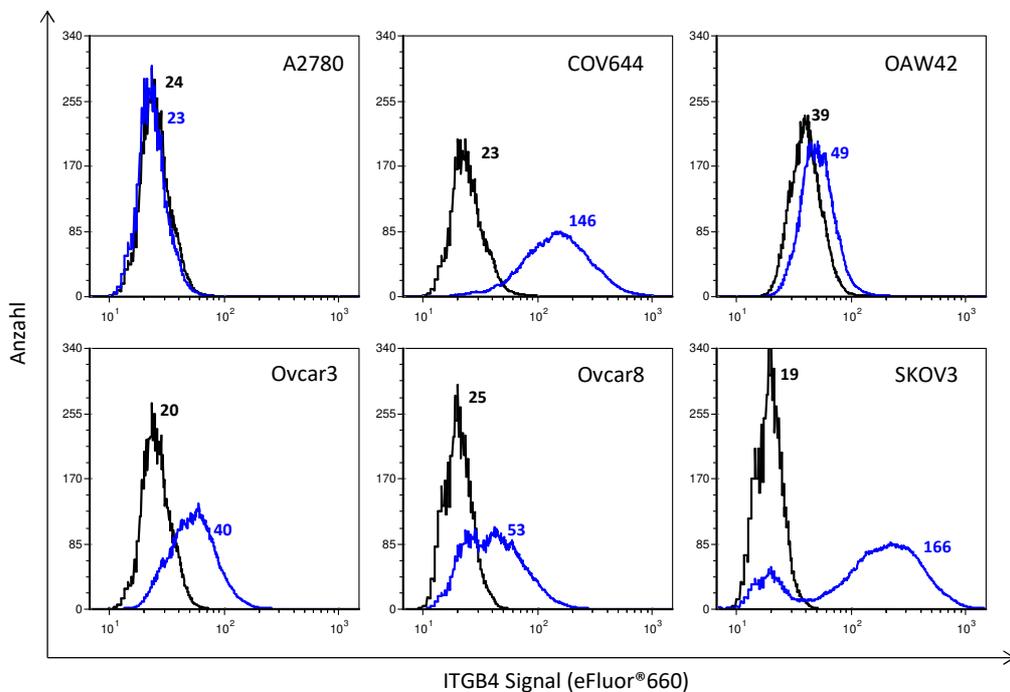
Zur Gewinnung der Tumorzellansammlungen aus der Peritonealflüssigkeit (i.p. Lavage) wurde der Thorax von oben ohne Schädigung des Zwerchfells eröffnet, um nach Entnahme des Herz-Lungen-Pakets eine i.p. Lavage am intakten Peritoneum durchführen zu können. Es wurden 5 ml 1x DPBS i.p. injiziert und leicht einmassiert, um freie Zellen und locker anhaftende Zellen in Suspension zu bekommen. Die Aszites-Zellen wurden pelletiert, für 20 Minuten in Formalin fixiert und nach der Anleitung zu Zellen in Agar (Abschnitt 2.2.1.12) aufbereitet.

Zur Formalin-Fixierung wurde in allen Fällen 3,7 % Phosphat-gepuffertes Formalin verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Integrin-β4-Expression auf Ovarialkarzinomzelllinien

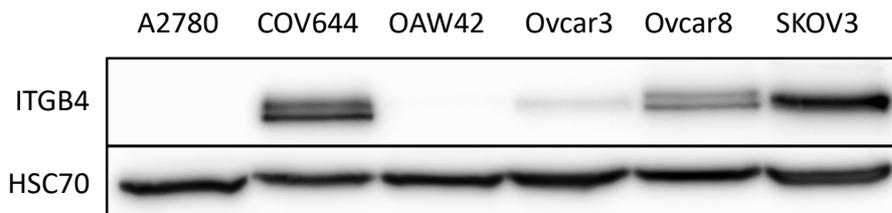
Das Integrin-β4-(ITGB4)-Expressionsniveau wurde auf folgenden Ovarialkarzinomzelllinien durchflusszytometrisch bestimmt: A2780, COV644, OAW42, Ovar3, Ovar8 und SKOV3. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl SKOV3 (mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) = 147) als auch COV644 (MFI = 123) hohe ITGB4-Expressionen aufweisen, während Ovar3 (MFI = 20) und Ovar8 (MFI = 28) eine geringe Expression zeigen. Auf A2780 (MFI = 1) und OAW42 (MFI = 10) konnte keine ITGB4-Expression nachgewiesen werden (Abb. 9).



**Abb. 9: ITGB4-Oberflächenexpressionsniveau verschiedener humaner Ovarialkarzinomzelllinien.**  $3 \cdot 10^5$  Zellen der Ovarialkarzinomzelllinien A2780, COV644, OAW42, Ovar3, Ovar8 und SKOV3 wurden nach Färbung mit Anti-ITGB4 (eFluor®660) durchflusszytometrisch untersucht. Darstellung aus vier voneinander unabhängigen Messungen. Tote Zellen wurden mit PI (Propidiumiodid) angefärbt und wurden in die Auswertung nicht miteinbezogen. blau = ITGB4 schwarz = Isotyp-Kontrolle.

Die analysierten Ovarialkarzinomzelllinien zeigten ein heterogenes Muster des ITGB4-Oberflächenexpressionsniveaus.

Proteinbiochemische Analysen mittels Western Blot (Abb. 10), bei dem das gesamte ITGB4 der Zelle nachgewiesen werden kann, bestätigten die durchflusszytometrischen Untersuchungen. Dementsprechend zeigten SKOV3 und COV644 hohe ITGB4-Expressionslevel, während für die anderen Zelllinien eine geringere oder keine Expression detektierbar war.

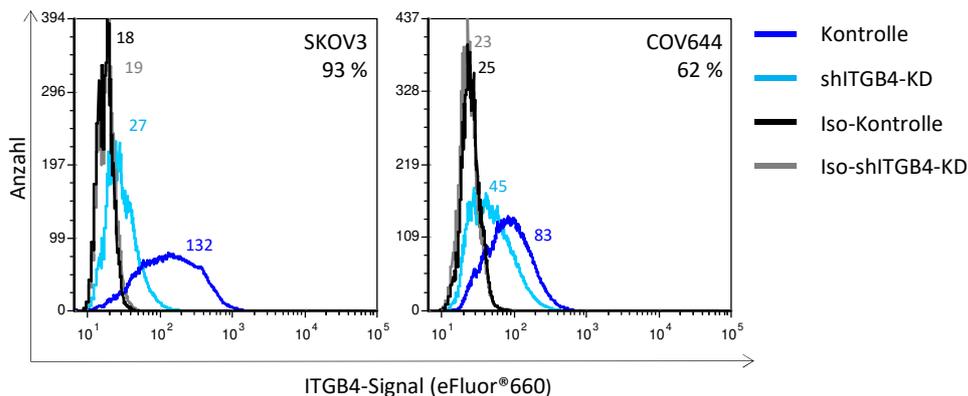


**Abb. 10: ITGB4-Expressionsniveau verschiedener humaner Ovarialkarzinomzelllinien.** 30 µg Gesamtprotein der Ovarialkarzinomzelllinien A2780, COV644, OAW42, Ovar3, Ovar8 und SKOV3 wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot die ITGB4-Expression nachgewiesen. Darstellung aus zwei voneinander unabhängigen Färbungen. Als Ladekontrolle diente HSC70 (*heatshock 70 kDa protein 8*; HSPA8); ITGB4 = 140 kDa, HSC70 = 70kDa.

Es konnte gezeigt werden, dass bei den analysierten Ovarialkarzinomzelllinien die Gesamt-ITGB4-Expression mit der ITGB4-Oberflächenexpression korreliert. Wegen der höheren ITGB4-Expression wurden die Zelllinien COV644 und SKOV3 für die weiteren Versuche verwendet.

### 3.2 Validierung des stabilen ITGB4-knock-downs

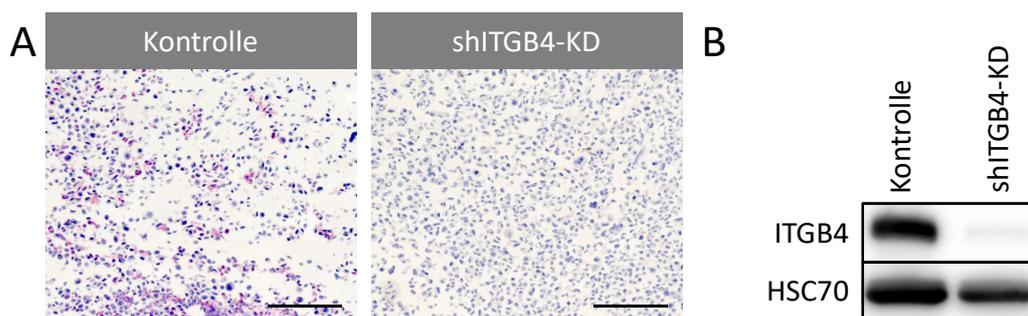
Mit Hilfe lentiviraler Transduktion wurden aus den beiden Zelllinien der stärksten ITGB4-Expression (COV644 und SKOV3) jeweils Kontrollzellen und ein stabiler ITGB4-knock-down (shITGB4-KD) etabliert (Methoden 2.2.1.7). Aus den anschließenden durchflusszytometrischen Analysen ging hervor, dass im Falle der SKOV3-Zellen eine Reduktion von 93 % des ITGB4 auf der Oberfläche der shITGB4-KD-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen erreicht werden konnte. Für die COV644-Zellen ließ sich eine Reduktion von lediglich 62 % erzielen (Abb. 11).



**Abb. 11: Analyse des ITGB4-knock-downs auf SKOV3- und COV644-Zellen.**  $3 \cdot 10^5$  Zellen der Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen von SKOV3 und COV644 wurden nach Färbung mit Anti-ITGB4 (eFluor®660) durchflusszytometrisch untersucht. Darstellung aus drei voneinander unabhängigen Messungen. Tote Zellen wurden mit PI (Propidiumiodid) angefärbt und wurden in die Auswertung nicht miteinbezogen.

Im Vergleich zu den COV644-Zellen konnte auf den SKOV3-Zellen ein effektiverer und stabiler ITGB4-knock-down erzielt werden. Daher wurden nur die SKOV3-Zellen für weitere Funktionsklärung des ITGB4 in dieser Arbeit verwendet.

Die Stabilität des KDs wurde neben den durchflusszytometrischen Analysen zusätzlich in regelmäßigen Abständen mit proteinbiochemischen Methoden wie immunhistologischen Färbungen (Abb. 12A) und Western Blot (Abb. 12B) kontrolliert.



**Abb. 12: Analyse des ITGB4-knock-downs mittels Immunhistologie und Western Blot.** (A) Darstellung des ITGB4 durch immunhistologische Färbungen von SKOV3-Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen (zuvor in Paraffin eingebettet). Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 200  $\mu$ m. (B) 30  $\mu$ g Gesamtprotein von SKOV3-Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen wurde elektrophoretisch aufgetrennt und durch Western Blot die ITGB4-Expression ermittelt. Als Ladekontrolle diente HSC70. ITGB4 = 140kDa, HSC70 = 70kDa.

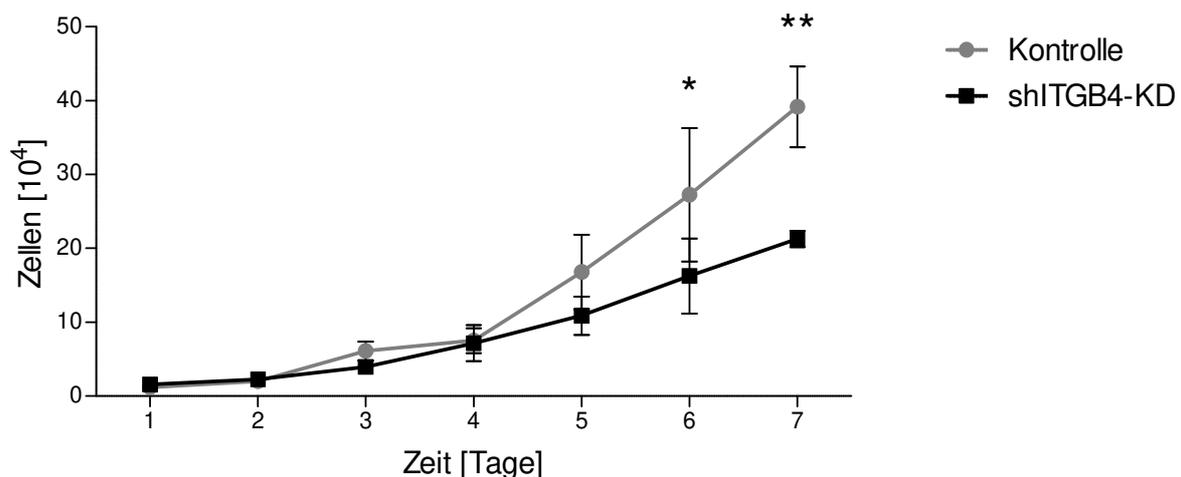
Der SKOV3-shITGB4-KD war über den Zeitraum der Analysen stabil und wurde in *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimenten genauer untersucht.

### 3.3 *In-vitro*-Charakterisierung der SKOV3-Zelllinie in Bezug auf die ITGB4-Expression

#### 3.3.1 Zellproliferation

Eine Manipulation von Tumorzellen wie die Depletion des Oberflächenmoleküls ITGB4 kann zu abweichendem proliferierendem Verhalten von dem der Kontrollzelllinie führen. Die Proliferation wurde daher durch tägliche Zellzahlbestimmung untersucht. In diesem Versuchsansatz wurde eine geringe Zellzahl zur Aussaat gewählt, die in der Anlaufphase (Latenzphase) einer zellulären Wachstumskurve liegt.

Es wurden die Kontrollzellen und die shITGB4-KD-Zellen der SKOV3-Zelllinien miteinander verglichen (Abb. 13). In der Latenzphase war die Proliferation in beiden Zelllinien noch sehr ähnlich (Tag 2: Kontrolle  $2 \cdot 10^4$  Zellen, shITGB4-KD  $2,2 \cdot 10^4$  Zellen). Danach vermehrten sich die Kontrollzellen schneller, bis nach 6 Tagen ein signifikanter Unterschied vorlag (Kontrolle  $2,7 \cdot 10^5$  Zellen, shITGB4-KD  $1,6 \cdot 10^5$  Zellen). An Tag 7 zeigten die Kontrollzellen eine Konfluenz von 90 %, und der Versuch wurde an dieser Stelle beendet, um ein Überwachsen der Zellen nicht in die Auswertung mit einzubeziehen.

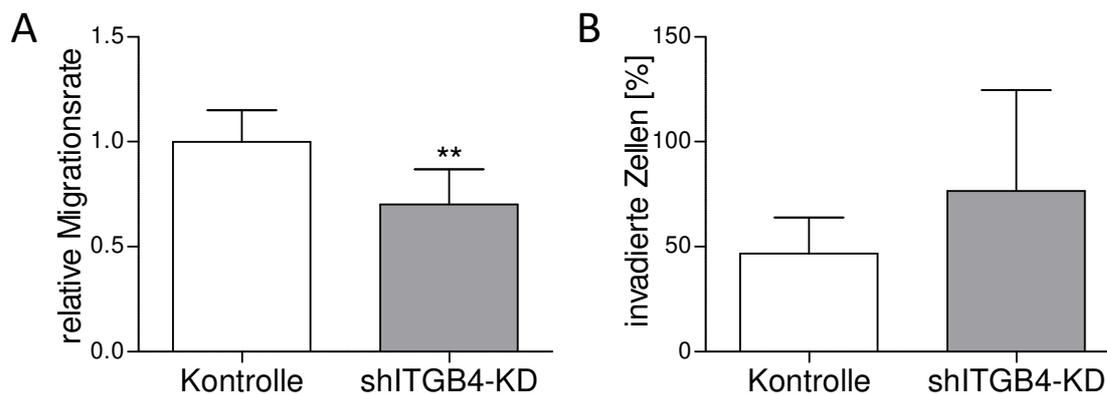


**Abb. 13: Proliferation über die Zeit.** Nach Aussaat von jeweils  $1 \cdot 10^4$  Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen pro Napf einer 6-Napf-Platte wurde alle 24 Stunden die Zellzahl bestimmt; n = min. 3 bis max. 5; \* p = 0,0446; \*\* p = 0,0052.

Es konnte ein signifikanter Wachstumsvorteil der Kontrollzellen ab Tag 6 gegenüber dem Wachstum der shITGB4-KD-Zellen nachgewiesen werden (Tag 6:  $p = 0,0446$ ; Tag 7:  $p = 0,0052$ ).

### 3.3.2 Migration und Invasion

Die migratorischen und invasiven Eigenschaften der shITGB4-KD-Zellen wurden im Vergleich mit denen der Kontrollzellen mit Hilfe des Transwell-Systems (Methoden 2.2.1.10) untersucht (Abb. 14). Für die shITGB4-KD-Zellen wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen eine um 30 % geringere Migrationsrate festgestellt ( $p = 0,0012$  t-Test). 47 % der Kontrollzellen zeigten ein invasives Verhalten, das bei 77 % der shITGB4-KD-Zellen nachgewiesen werden konnte. Bei fünf voneinander unabhängigen Ansätzen ergab sich kein signifikanter Unterschied im invasiven Verhalten von Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen ( $p = 0,2282$  t-Test).



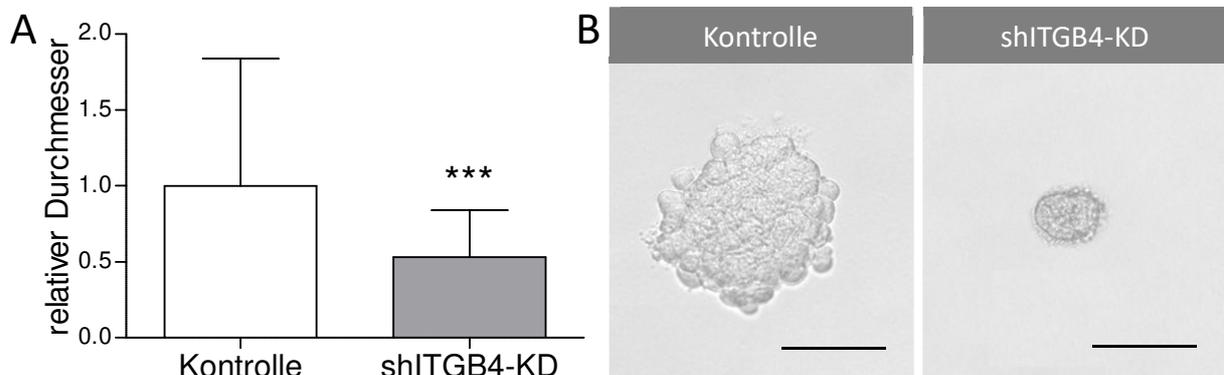
**Abb. 14: Migratorisches und invasives Verhalten *in vitro*.** Dargestellt sind die mittels Fluoroblocksystem analysierten Daten zu (A) Migration und (B) Invasion von SKOV3-Kontroll- und sh-ITGB4-KD-Zellen. Es wurden fünf voneinander unabhängige Ansätze mit je 4 Messungen durchgeführt; \*\*  $p = 0,0012$ .

Generell konnte gezeigt werden, dass die SKOV3-Zellen migrieren und invadieren. Die SKOV3-Zellen geringer ITGB4-Expression zeigten eine geringere Migrationsrate im Vergleich zu den Kontrollzellen.

### 3.3.3 Kolonienformation in 3D-Kultur

Die Entstehung solider Tumoren *in vivo* ermöglicht unter anderem ein dreidimensionales Tumorwachstum. Die Dreidimensionalität kann *in vitro* mit Hilfe der Verwendung gelartiger Medien wie zum Beispiel Soft-Agar und Matrigel nachgestellt werden. Diese Methoden (Abschnitt 2.2.1.6) wurden angewandt, um *in vitro* die Bildung von Kolonien der SKOV3-Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen zu untersuchen.

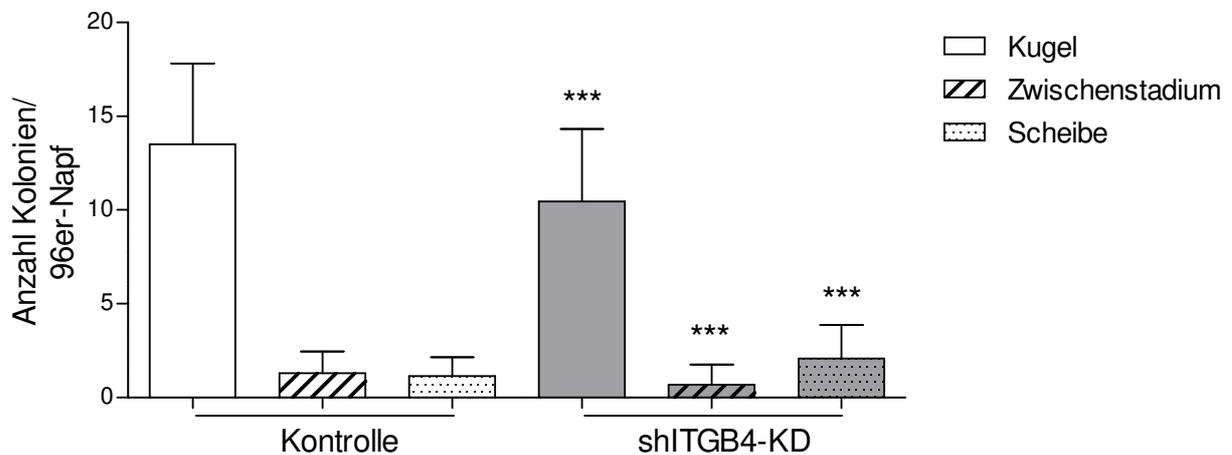
Im Soft-Agar-Assay wurden die Kolonien anhand des Durchmessers beurteilt. Wie Abb. 15A zu entnehmen ist, bilden die shITGB4-KD-Zellen signifikant (1,9-mal) kleinere Kolonien aus als die Kontrollzellen ( $p = 0,001$  t-Test).



**Abb. 15: Analyse der Soft-Agar-Kolonien.** Nach der Entwicklung von Kolonien in Soft-Agar über 14 Tage aus SKOV3-Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen, wurde der Durchmesser ermittelt. (A) Abgebildet sind die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Durchführungen mit je 8 Ansätzen. Die jeweiligen Messungen wurden auf die Ergebnisse der Kontrollzellen normiert; \*\*\*  $p < 0,0001$ . (B) Exemplarische Darstellung der Soft-Agar-Kolonien. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 100  $\mu\text{m}$ .

Da das Matrigel durch die darin enthaltenen extrazellulären Matrix-Komponenten ein physiologischeres System darstellt als Soft-Agar, wurde die Bildung der Kolonien in Matrigel unter den Aspekten Morphologie und Anzahl untersucht (Abb. 16). Dabei konnte gezeigt werden, dass die shITGB4-KD-Zellen unabhängig von ihrer Morphologie statistisch weniger Kolonien (13 Kolonien/Napf) bildeten als die Kontrollzellen (16 Kolonien/Napf). Bei der Betrachtung der morphologisch unterschiedlichen Kolonien (Kugel, Zwischenstadium und Scheibe; Abschnitt 2.2.1.6.1) fiel auf, dass die shITGB4-KD-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen mehr adhärente scheibenförmige Kolonien ausbildeten (2,0 zu 1,3 Kolonien im

Mittel). Die Kugel- und Zwischenstadium-Kolonien wurden zu geringerer Anzahl von den shITGB4-KD-Zellen ausgebildet ( $p < 0,0001$  t-Test).

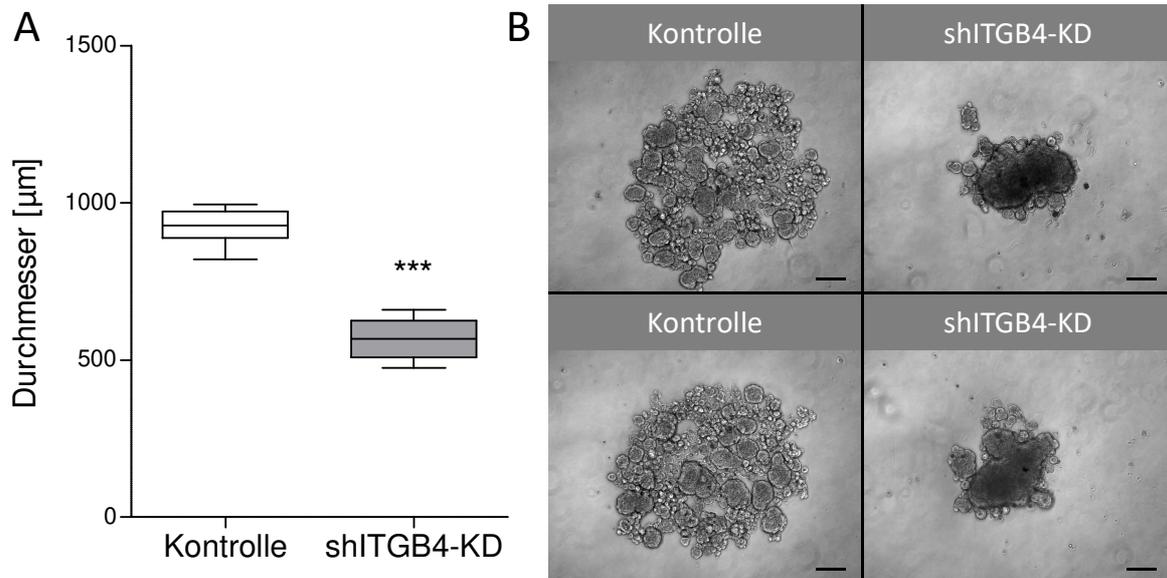


**Abb. 16: Analyse der Matrigel-Kolonien.** Nach der Entwicklung von Kolonien im Matrigel über 12 Tage aus SKOV3-Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen wurde in drei voneinander unabhängigen Ansätzen die Anzahl der morphologisch unterschiedlichen Kolonien pro 96er-Napf ermittelt; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Die *in-vitro*-Analysen zur 3D-Kolonienformation zeigten, dass die ITGB4-Expression auf den SKOV3-Zellen die Bildung von Kolonien in Anzahl und Größe fördert.

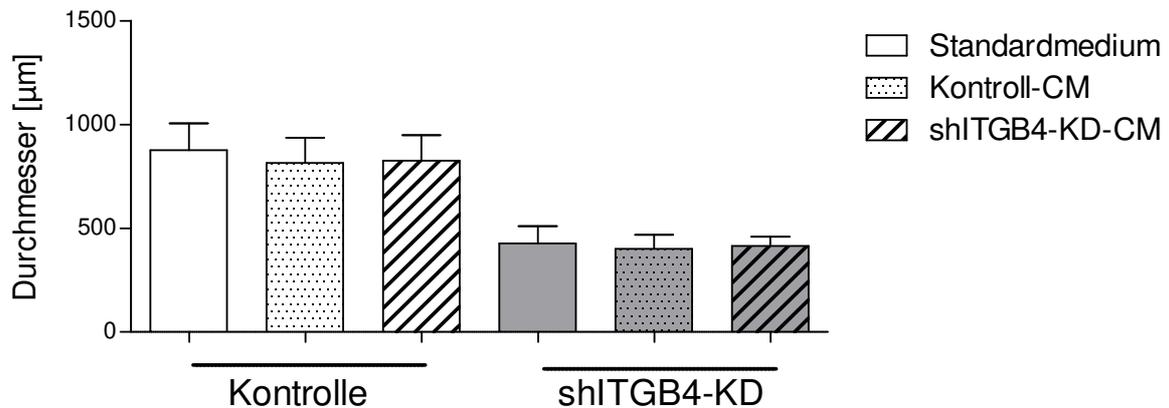
### 3.3.4 Sphäroiden-Formation in Suspension

Einzelne Tumorzellen bilden im Peritonealraum Sphäroide. Um die Sphäroide *in vitro* nachzustellen, wurde die Adhäsion von Tumorzellen an die Zellkulturoberfläche mittels Beschichtung mit polyHEMA inhibiert, was in flüssigem Medium das Wachstum von Sphäroiden induziert. Es konnte beobachtet werden, dass die von shITGB4-KD-Zellen gebildeten Sphäroide signifikant kleiner (564  $\mu\text{m}$  Durchmesser) waren als die der Kontrollzellen (925  $\mu\text{m}$  Durchmesser) (Abb. 17).



**Abb. 17: Analyse der *in-vitro*-Sphäroide.** Das Wachstum von  $1 \cdot 10^3$  Zellen pro polyHEMA-beschichtetem-96er-Napf wurde über 6 Tage beobachtet. (A) Der Durchmesser der entstandenen Sphäroide wurde ermittelt;  $p < 0,0001$ . (B) Repräsentative Darstellung der jeweiligen Sphäroide. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 200 µm.

Zellen produzieren selbst verschiedene wachstumsfördernde Faktoren und geben diese ins Medium ab. Um den Einfluss dieser Faktoren auf die Bildung von Tumor-Sphäroiden zu untersuchen, wurden die shITGB4-KD-Zellen und die Kontrollzellen jeweils mit konditionierten Medien (CM) kultiviert. Ein Einfluss dieser konditionierten Medien auf die Koloniengröße der aus shITGB4-KD- und Kontrollzellen generierten Tumor-Sphäroide konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 18).

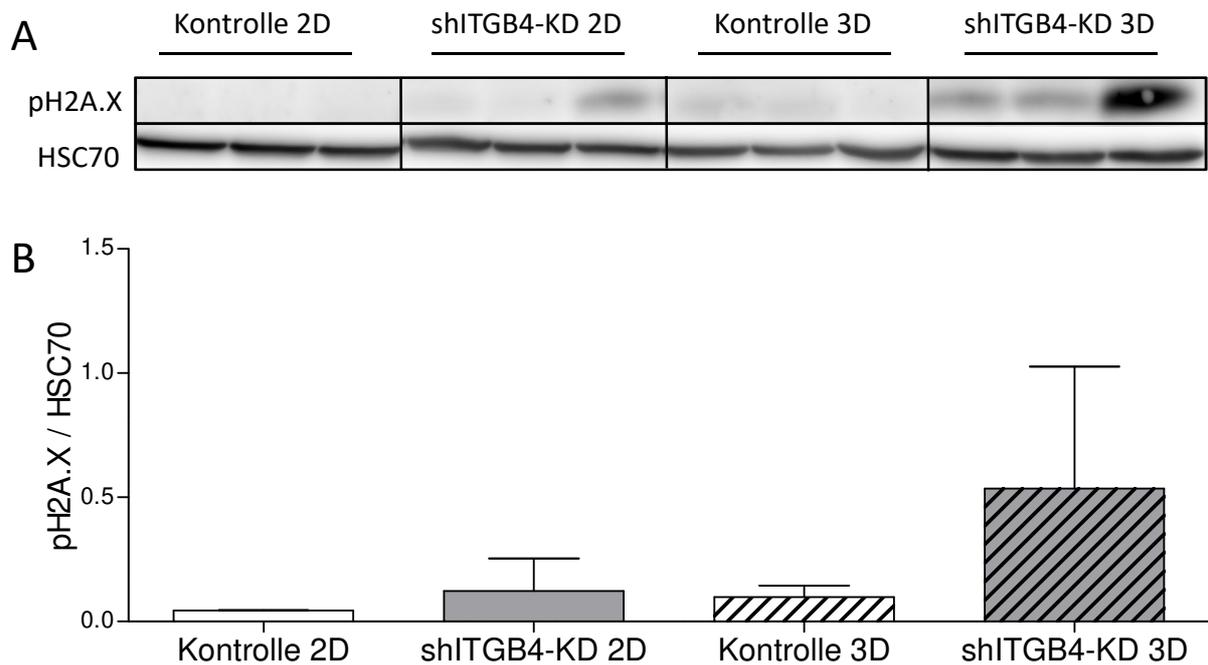


**Abb. 18: Sphäroiden-Bildung in konditionierten Medien.** Das Wachstum von  $1 \cdot 10^3$  Zellen in Standardmedium oder konditioniertem Medium (CM) pro polyHEMA beschichtetem 96er-Napf wurde über 6 Tage beobachtet. Die Daten wurden aus drei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen mit jeweils 6 Messungen pro Gruppe erhoben.

In Suspension sind die SKOV3-Zellen in der Lage Sphäroide zu bilden. Die Kontrollzellen mit höherer ITGB4-Expression waren in der Lage größere Sphäroide zu bilden als die shITGB4-KD-Zellen. Die Größe der Sphäroide konnte durch die Kultivierung in konditionierten Medien nicht beeinflusst werden.

### 3.3.5 Apoptoseverhalten der ahärenten Zellen und Sphäroide

Die Apoptose wurde anhand von p<sub>H2A.X</sub> durch das Western-Blot-Verfahren analysiert. Dazu wurden kultivierte Zellen aus Standardkulturbedingungen (adhärent, 2D) und polyHEMA-beschichteten Flaschen (Sphäroide, 3D) untersucht (Abb. 19). Die unter 2D-Bedingungen kultivierten Zellen sollen dabei die soliden Tumoren darstellen, die unter 3D-Bedingungen kultivierten Zellen die Tumor-Sphäroide im Peritonealraum. Die shITGB4-KD-Zellen zeigten in 2D und 3D erhöhte p<sub>H2A.X</sub>-Level im Vergleich zu denen der Kontrollzellen (2D: 3-fach; 3D: 5-fach), wobei die Kultivierung von Kontroll- bzw. shITGB4-KD-Zellen in 3D jeweils erhöhte Expressionslevel zeigten (Kontrolle: 2-fach; shITGB4-KD 4-fach).

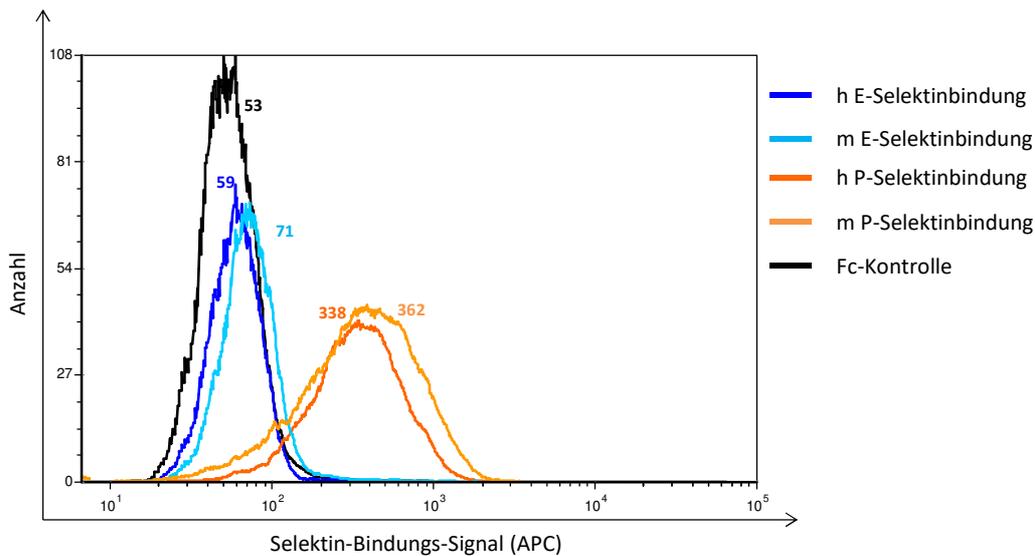


**Abb. 19: Apoptose-Rate mittels pH2A.X an 2D- und 3D-Kultur *in vitro*.** (A) 30 µg Gesamtprotein der unter 2D- oder 3D- (polyHEMA)-Bedingungen gewachsenen SKOV3-Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Western Blot wurde die pH2A.X-Expression dargestellt. Als Ladekontrolle diente HSC70. ITGB4 = 140 kDa, HSC70 = 70 kDa. (B) Die Banden wurden mit der VisionCap Software quantifiziert und im Verhältnis zur Ladekontrolle dargestellt.

Es konnte kein signifikanter Unterschied der verschiedenen kultivierten Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen hinsichtlich des apoptotischen Verhaltens dargestellt werden. Allerdings konnte eine Tendenz beobachtet werden, dass ITGB4-depletierte Zellen verstärkt in Apoptose gehen.

### 3.3.6 Unterschiede zwischen statischen und dynamischen E- und P-Selektinbindungen

Das Bindungsverhalten der SKOV3-Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen für Selektine wurde in zwei verschiedenen Varianten untersucht, statisch und dynamisch. Zunächst wurde die Bindung unter statischen Bedingungen mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung ermittelt (Abb. 20). Dabei wies die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3 eine starke Affinität zu humanem (MFI = 285) und murinem P-Selektin (MFI = 309), eine schwache Affinität zu murinem E-Selektin (MFI = 18) und keine nennenswerten zu humanem E-Selektin (MFI = 6) auf.

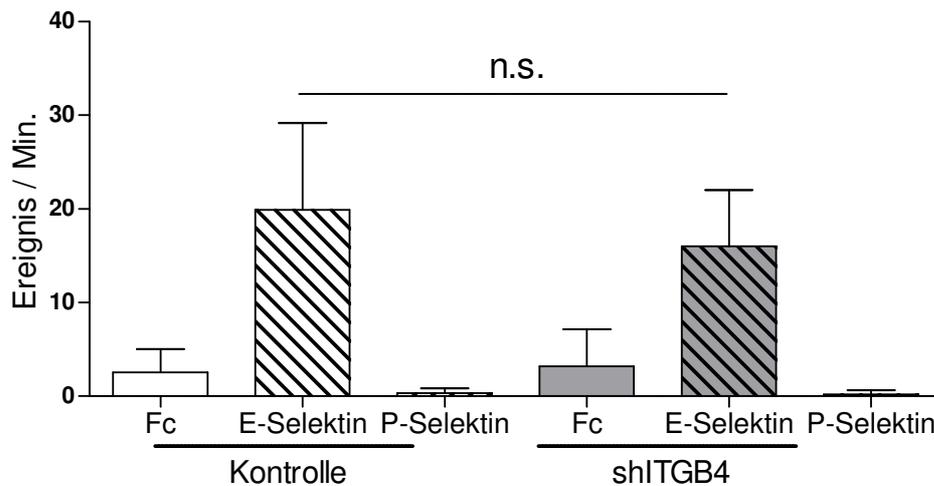


**Abb. 20: Statische Selektin-Bindung.** Die statischen Bindungen von E- und P-Selektin wurden durchflusszytometrisch an der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3 untersucht.

Im Vergleich zu den SKOV3-Zellen änderten sich die statischen Bindungseigenschaften der Kontroll- und shITGB4-Zellen an die E- und P-Selektine nicht (nicht abgebildet).

Die dynamischen Bindungseigenschaften wurden unter Flussbedingungen, bei denen die Tumorzellen über immobilisierte Selektine geleitet wurden, gemessen (Methodenteil 2.2.1.11). Hier konnte gezeigt werden, dass die Kontroll- und shITGB4-SKOV3-Zellen in der Lage waren deutlich humanes E-Selektin zu binden. Abzüglich der an die Fc-Kontrolle gebundenen Zellen ergaben sich für die Bindung an humanes E-Selektin bei den Kontrollzellen 20,2 Ereignisse/Minute und bei den shITGB4-KD-Zellen 21,0 Ereignisse/Minute. Diese Ergebnisse unterscheiden sich nicht signifikant. Eine Bindung an humanes P-Selektin blieb aus (Abb. 21).

Die Bindung von SKOV3-Zellen an humanes E-Selektin ließ keine feste, irreversible Bindung zu und kann mit der Rollbewegung von Leukozyten an der Gefäßwand vor einer festen Bindung verglichen werden.



**Abb. 21: Dynamische Selektin-Bindung.** Dargestellt sind die unter dynamischen Bedingungen an Fc-Kontrolle und humanes E- bzw. P-Selektin gebundenen Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen pro Minute; n.s. = nicht signifikant.

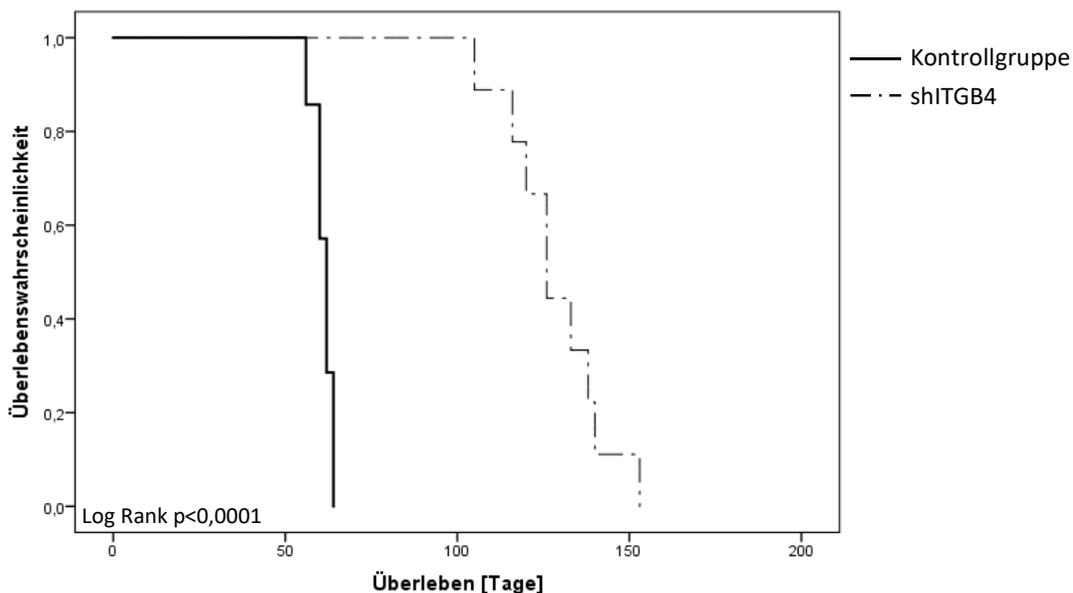
In beiden Versuchsansätzen (dem statischen und dem dynamischen) konnte kein signifikant unterschiedliches Bindungsverhalten der Kontroll- und der shITGB4-KD-Zellen an die jeweiligen Selektine dargestellt werden. Wobei die SKOV3-Zellen statisch vor allem Bindungen an P-Selektin und dynamisch an E-Selektin zeigten.

### 3.4 *In-vivo*-Charakterisierung der SKOV3-Zellen in Bezug auf die ITGB4-Expression

*In vivo* sollte der Einfluss von ITGB4-Depletion auf das Tumorwachstum und die Metastasierung in Bezug auf das Ovarialkarzinom untersucht werden. Dazu wurden jeweils  $1 \cdot 10^6$ -SKOV3-Kontroll- bzw. shITGB4-KD-Zellen in SCID-Mäuse (*severe combined immunodeficient*) und Rag2-Model-601-Mäuse in einem Volumen von 200  $\mu$ l serumfreiem Medium intraperitoneal (i.p.) injiziert, um die frühe intraperitoneale Ausbreitung und die Aszitesbildung beim Ovarialkarzinom nachzustellen. Bei der i.p. Injektion verbleiben einige Tumorzellen im Einstichkanal in der Subcutis. Die an dieser Stelle etablierten Tumoren werden als Einstichtumoren bezeichnet. Es wurden pro Mauslinie zwei Gruppen durch Injektion von Kontroll- bzw. shITGB4-KD-SKOV3-Zellen erzeugt. Diese werden im Folgenden als Kontrollgruppe und als shITGB4 bezeichnet. Im Falle der injizierten Rag2-Model-601-Mäuse wird Rag2 vorangestellt (z.B.: Rag2-Kontrollgruppe/Rag2-shITGB4).

### 3.4.1 Einfluss der Tumor-ITGB4-Expression auf das Überleben von SCID-Mäusen

In einem Überlebensversuch sollte die Lebensdauer der Tumor-injizierten Tiere beobachtet werden. Dabei wurden Tiere, die Aszites zeigten oder sich in einem allgemein kritischen Zustand befanden, aus dem Versuch genommen (Abbruchkriterien 2.2.4.2). Der Versuch wurde mit SCID-Mäusen durchgeführt. Diese entwickelten spontan auftretende Lymphome, so dass nicht alle Tiere in die Auswertung miteinbezogen werden konnten und die effektive Gruppengröße bei 7 (Kontrollgruppe) und 9 (shITGB4) Tieren lag. Tiere der Kontrollgruppe zeigten eine Überlebensdauer zwischen 56 und 64 Tagen ( $\bar{x} = 61$ ), während die shITGB4-Tiere zwischen 105 und 153 Tage ( $\bar{x} = 129$ ) überlebten (Abb. 22). Der Überlebensvorteil der shITGB4-Tiere ist statistisch signifikant ( $p < 0,001$ , LogRank (Mantel-Cox)).



**Abb. 22: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier (SCID).** Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der SCID-Mäuse (Kontrollgruppe und shITGB4) über die Zeit in Tagen. Abbruchkriterium war primär die Aszitesbildung.

Die Injektion von ITGB4-depletierten SKOV3-Zellen in SCID-Mäuse führte zu einem verlängerten Überleben im Vergleich zu SCID-Mäusen, die mit Kontrollzellen injiziert wurden. Trotz ihrer

längeren Lebenserwartung blieb ein Tumorwachstum aber nicht aus, und alle Tiere entwickelten eine i.p. Karzinose.

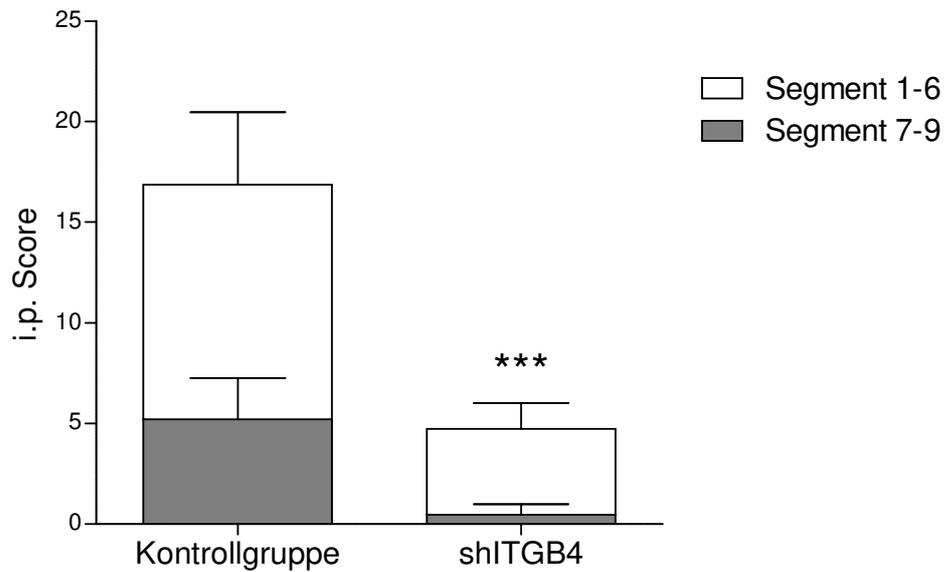
### **3.4.2 Beurteilung der Tumorausbreitung im Endpunktversuch**

Um die Ausbreitung der Tumoren im Peritonealraum ohne den Zeitfaktor direkt beurteilen zu können, wurde der oben beschriebene Versuch als Endpunktversuch wiederholt. Dafür wurden alle Tiere zum gleichen Zeitpunkt nach der Injektion aus dem Versuch genommen und der Versuch beendet. Zu diesem Zeitpunkt hatten die ersten Tiere der Kontrollgruppe einen Aszites entwickelt, was als Abbruchkriterium festgelegt wurde. Es wurden verschiedene Zellansammlungen untersucht: die ans Peritoneum anhaftenden soliden Tumore (i.p. Karzinose), die entstandenen Einstichtumoren und die frei in der peritonealen Flüssigkeit flotierenden Sphäroide.

#### **3.4.2.1 Intraperitoneale Karzinose an SCID-Mäusen**

In einem Endpunktversuch wurden SCID-Mäuse 57 Tage nach der Injektion hinsichtlich ihrer gebildeten i.p. Karzinose untersucht. Die Gruppengrößen lagen bei 14 (Kontrollgruppe) bzw. 15 Tieren (shITGB4). Zur Beurteilung der i.p. Karzinose wurde der i.p. Score ermittelt (Methodenteil Abb. 8). Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$  t-Test) zwischen den beiden Gruppen (Abb. 23). Jeweils im Mittel ließen sich ein i.p. Score von 14,7 in der Kontrollgruppe und ein i.p. Score von 3,4 bei den shITGB4-Tieren darstellen.

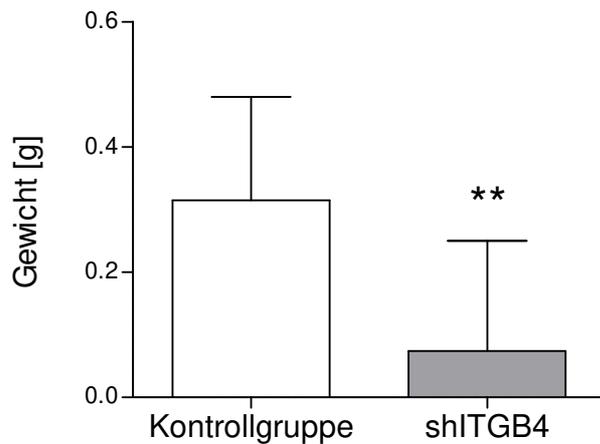
Für genauere Analysen wurde die unterschiedliche Verteilung der Tumoren in den verschiedenen Segmenten des Peritoneums (Abb. 8) hinzugezogen. Dabei ließ sich darstellen, dass bei einer leichten i.p. Karzinose vermehrt (90 %) die oberen zwei Drittel (Segmente 1-6), die das Zwerchfell und die Leber einschließen, von Tumoren befallen waren (Abb. 23). Bei einer starken i.p. Karzinose, wie sie bei der Kontrollgruppe zu beobachten war, ließen sich nur 69 % der Tumoren in den oberen zwei Dritteln darstellen.



**Abb. 23: Verteilung der i.p. Karzinose.** An Tag 57 nach Injektion wurde die intraperitoneale Verbreitung der i.p. Karzinose anhand des i.p. Scores ermittelt. Die Segmente 1-6 decken den Bereich von Zwerchfell und Leber ab, die Segmente 7-9 das kleine Becken; \*\*\*  $p < 0,0001$  bezogen auf den i.p. Score der Segmente 1-9.

### 3.4.2.2 Einstichtumoren an SCID-Mäusen

Zusätzlich zu der i.p. Karzinose entwickelten 90% der oben beschriebenen SCID-Mäuse bis zum Tag 57 nach Injektion Einstichtumoren, das sind Tumoren, die sich im Einstichkanal s.c. bei i.p. Injektion etablieren. Bei den übrigen Tieren (10 %) konnte kein Tumor am Einstichkanal nachgewiesen werden. Das durchschnittliche Gewicht der Einstichtumoren in der shITGB4-Gruppe lag bei 0,07 g, während die Einstichtumoren in der Kontrollgruppe im Mittel 0,32 g betragen ( $p = 0,0022$ ) (Abb. 24).

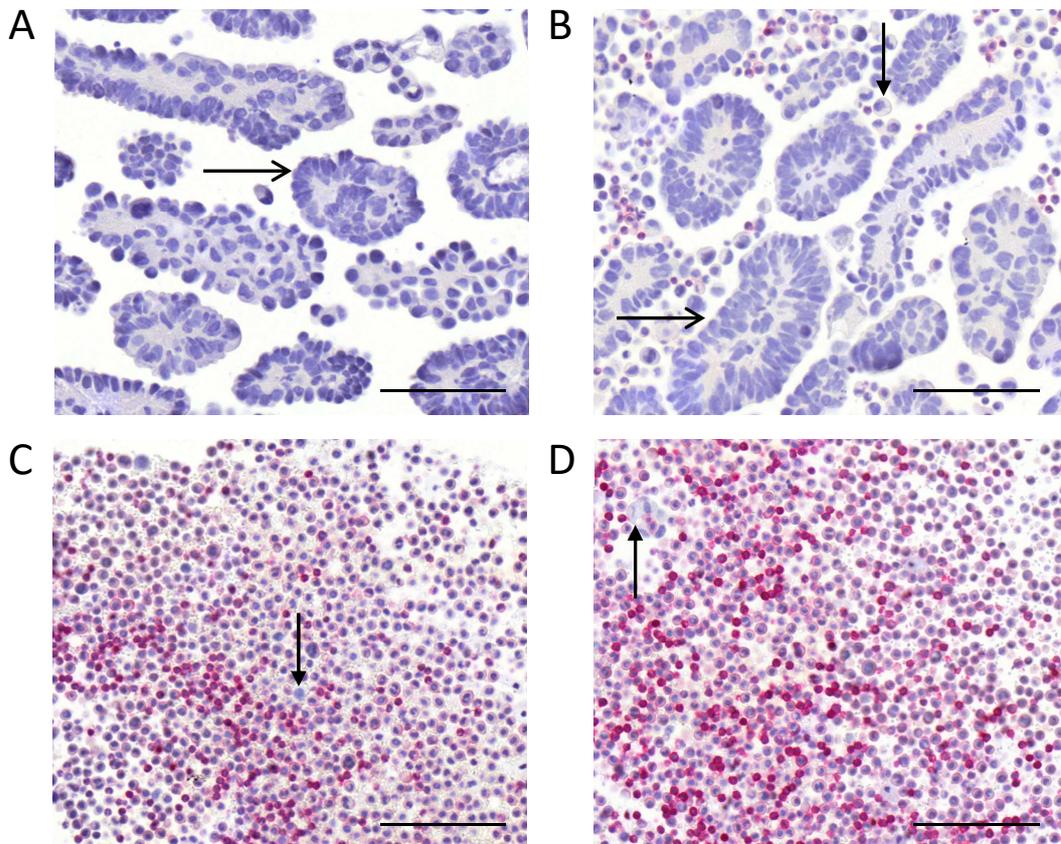


**Abb. 24: Gewicht der Einstichtumoren.** Dargestellt sind die Tumorgewichte in g der Tumoren aus Kontroll- und shITGB4-Gruppe, die am Einstichort 57 Tage nach der Injektion entstanden sind; \*\* p = 0,0022.

### 3.4.2.3 Tumor-Sphäroide an Rag2-Model-601-Mäusen

Neben den soliden Tumoren der i.p. Karzinose gibt es frei im Peritoneum vorliegende Tumorzellen, die sich zu sogenannten Sphäroiden formieren. Die peritoneale Flüssigkeit häuft sich im Rahmen einer Tumorbelastung oder einer Entzündung an und wird als Aszites beschrieben. Der Aszites enthält neben der peritonealen Flüssigkeit Tumorzellen, Sphäroide und Entzündungszellen, zudem kann die Flüssigkeit blutig sein.

Zur Darstellung der Tumor-Sphäroide wurde an Rag2-Model-601-Mäusen an Tag 49 nach Tumorzellinjektion eine Ausspülung des Peritonealraums (i.p. Lavage) durchgeführt. Die Gruppengröße bestand pro Gruppe (Rag2-Kontrollgruppe, Rag2-shITGB4) aus 8 Tieren. Der zelluläre Anteil wurde für immunhistologische Färbungen aufbereitet und ist für die Rag2-Kontrollgruppe und die Rag2-shITGB4-Gruppe dargestellt (Abb. 25). Deutlich ist zu erkennen, dass in der Kontrollgruppe große Tumor-Sphäroide gebildet wurden (Abb. 25A+B), wohingegen in der Rag2-shITGB4-Gruppe nur einzelne Tumorzellen und viele Leukozyten (CD45-positiv) nachgewiesen werden konnten (Abb. 25C+D). CD45-positive Zellen fehlten in der Kontrollgruppe fast vollständig.



**Abb. 25: Intraperitoneale Lavage.** Dargestellt ist die murine CD45-Färbung (Leukozyten rötlich) des zellulären Anteils der i.p. Lavage an Tag 49 nach Injektion. Gezeigt sind repräsentative Fälle der (A+B) Rag2-Kontroll- und (C+D) Rag2-shITGB4-Gruppe. Offene Pfeilspitzen markieren Tumor-Sphäroide, geschlossene Pfeilspitzen Tumor-Einzelzellen. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 100 μm.

Aus den Endpunktversuchen geht hervor, dass die shITGB4- im Vergleich zur Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt weniger i.p. Karzinose, kleinere Einstichtumoren und weniger Tumor-Sphäroide ausgebildet hatten.

### 3.5 Untersuchungen der isolierten Gewebe (*ex vivo*)

#### 3.5.1 Kontrolle des stabilen ITGB4-*knock-downs in vivo*

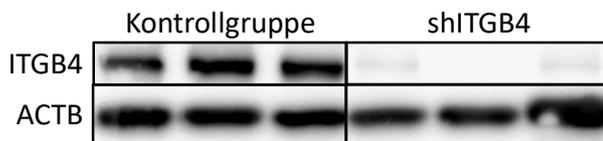
Um eine fundierte Aussage über die *in-vivo*-Versuche machen zu können, wurde untersucht, ob der ITGB4-*knock-down* über den Versuchszeitraum stabil geblieben ist. Die Kontrolle hierzu erfolgte an den gewonnenen Tumormaterialien mittels Western-Blot-Analysen (Abb. 26A/B) und immunhistologischer Färbung (Abb. 26C). Sowohl im Überlebensversuch (bis zu 153 Tage)

als auch im Endpunktversuch (über 57 Tage) ließ sich die Stabilität der shITGB4-KD-Zellen bestätigen. Im Überlebensversuch besteht der KD noch zu 71 %, im Endpunktversuch zu 95 %.

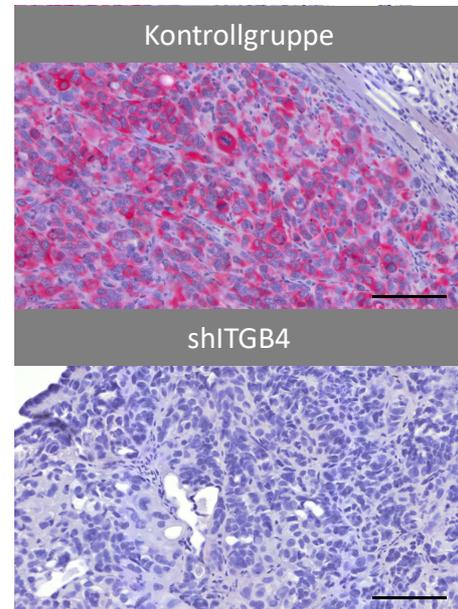
### A Überlebensversuch



### B Endpunktversuch



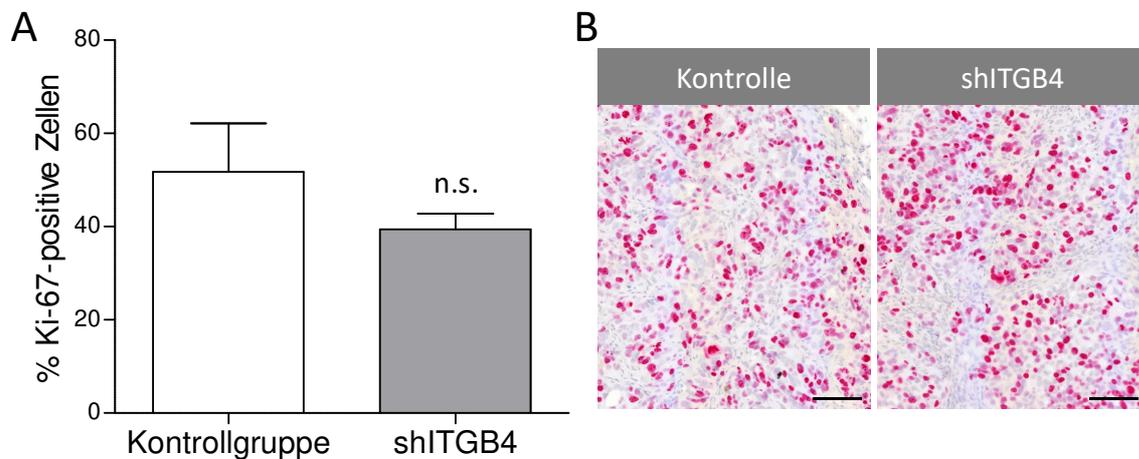
### C



**Abb. 26: Stabiler ITGB4-knock-down der i.p.-Karzinose-Tumoren.** Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis der ITGB4-Färbung an Tumoren der Kontroll- und shITGB4-Gruppe (SCID-Mäuse). (A+B) 30 µg Gesamtprotein der Tumoren wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot die ITGB4-Expression dargestellt. Als Ladekontrolle diente ACTB (β-Actin); ITGB4 = 140 kDa, ACTB = 42kDa. (A) Überlebensversuch; (B) Tumoren 57 Tage nach Injektion; (C) immunhistologische Färbungen an ausgewählten Tumoren des Überlebensversuchs. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 100 µm.

### 3.5.2 Tumorproliferation der i.p.-Karzinose-Tumoren

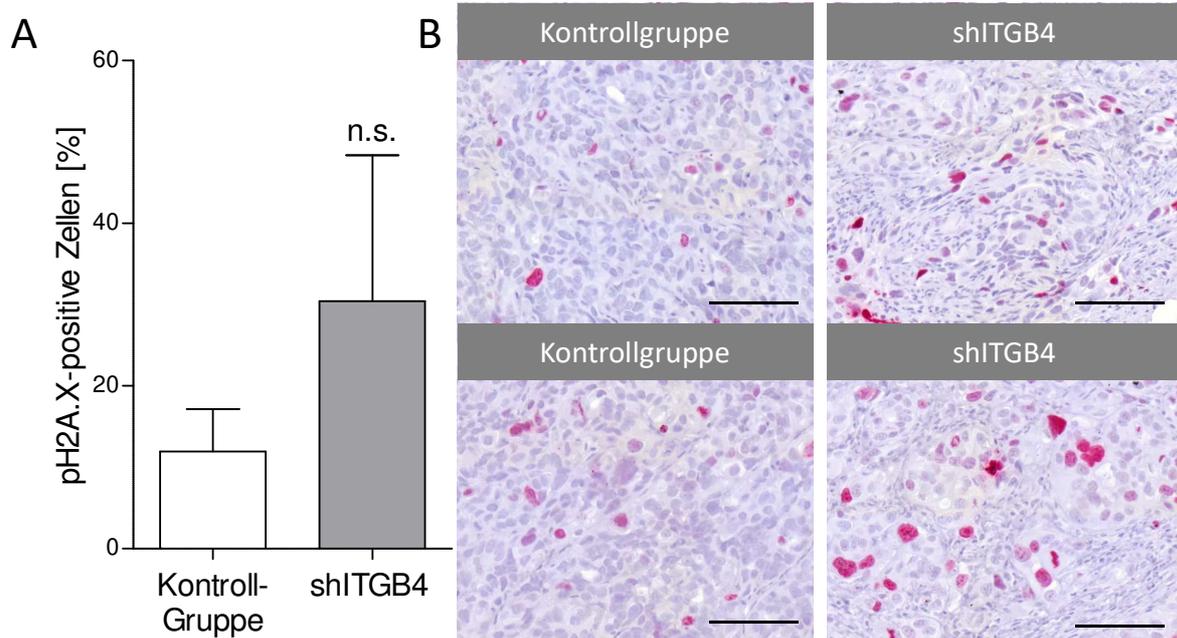
Um das proliferative Verhalten der generierten Tumoren zu untersuchen, wurden sie immunhistologisch auf Ki-67 gefärbt. Als Basis dienten Tumoren aus dem Überlebensversuch, die so lange wachsen konnten, bis das Abbruchkriterium erreicht wurde. Bei der Beurteilung konnte keine abweichende Proliferationsrate der Tumoren aus der Kontrollgruppe und denen aus der shITGB4-Gruppe dargestellt werden (Abb. 27A). Die Kontrollgruppe zeigte 52 % Ki-67-positive Zellen, die shITGB4-Gruppe nur 39 %. In Abb. 27B sind die immunhistologischen Färbungen auf Ki-67 der jeweiligen Tumoren abgebildet.



**Abb. 27: Tumorproliferation *ex vivo* mittels Ki-67.** An den Tumoren des Überlebensversuchs der Kontroll- und shITGB4-Gruppe (SCID-Mäuse) wurde immunhistologisch Ki-67 gefärbt. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki-67-positiven Zellen der Tumoren. Es wurden für fünf Blickfelder jeweils 100 Zellen ausgezählt; n.s. = nicht signifikant. (B) Repräsentative Darstellung der Ki-67 gefärbten Tumoren. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.5.3 Apoptoseverhalten der i.p.-Karzinose-Tumoren

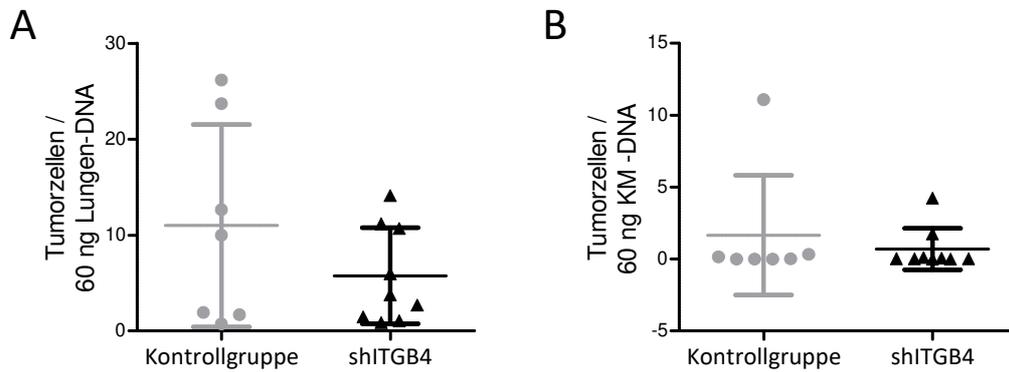
Um die langsamere Ausbreitung der Tumoren aus der shITGB4-Gruppe erklären zu können, wurde untersucht, ob die shITGB4-KD-Zellen *in vivo* eine höhere Bereitschaft zeigen in Apoptose zu gehen als die Kontrollzellen. Zur Darstellung apoptotischer Zellen wurde der Histon-Antikörper pH2A.X verwendet. pH2A.X ist ein Marker für DNA-Doppel-Strangbruch, wie es in den anfänglichen Schritten der Apoptose der Fall ist. Dabei erfolgte die Darstellung von pH2A.X *ex vivo* an Tumoren aus dem Überlebensversuch. Nach immunhistologischen Färbungen der Tumoren konnte kein signifikanter Unterschied in der pH2A.X-Expression zwischen der Kontrollgruppe und der shITGB4-Gruppe gezeigt werden. Allerdings ließ sich eine Tendenz zu einer höheren Apoptose-Rate in der shITGB4-Gruppe erkennen (Abb. 28A). Dargestellt ist der prozentuale Anteil an pH2A.X-positiven Zellen (Kontrolle 12 %; shITGB4 30 %).



**Abb. 28: Apoptose-Rate mittels pH2A.X *ex vivo*.** An den Tumoren des Überlebensversuchs der Kontroll- und shITGB4-Gruppe (SCID-Mäuse) wurde immunhistologisch pH2A.X gefärbt. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der pH2A.X-positiven Zellen der Tumoren. Es wurden für fünf Blickfelder jeweils 100 Zellen beurteilt; n.s. = nicht signifikant. (B) Repräsentative Darstellung der pH2A.X-gefärbten Tumoren. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 100  $\mu$ m.

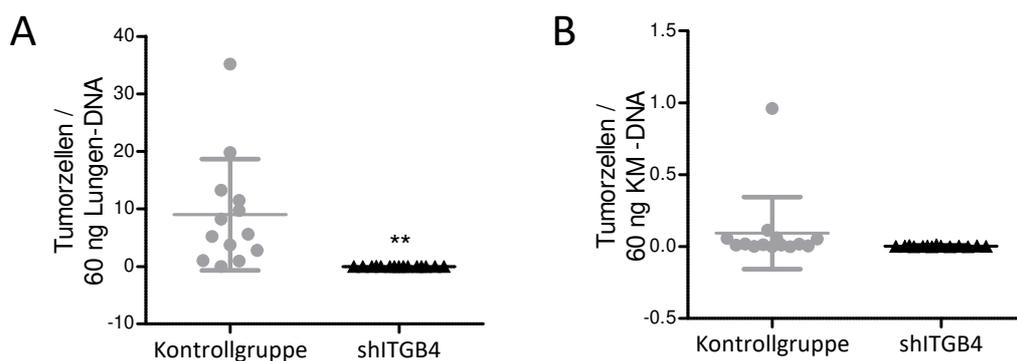
### 3.5.4 Fernmetastasen in Lunge und Knochenmark aus Überlebens- und Endpunktversuch

Zur Analyse von Fernmetastasen wurde die DNA aus Lunge und Knochenmark isoliert, um mittels spezifischer Primer humane Alu-Sequenzen und damit die Anwesenheit von humanem Material nachzuweisen. Wird die Fernmetastasierung in Abhängigkeit von der Zeit (wie im Überlebensversuch) betrachtet, zeigte die Kontrollgruppe im Mittel 10,98 Tumorzellen pro 60 ng muriner Lungen-DNA, die shITGB4-Gruppe hingegen nur etwa die Hälfte (5,76 Tumorzellen pro 60 ng muriner Lungen-DNA). Durch die heterogene Verteilung der Lungenmetastasen innerhalb der jeweiligen Gruppe ist die Lungenmetastasen-Anzahl pro Gruppe nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 29A). Deutlich weniger Tumorzellen ließen sich im Knochenmark nachweisen: 1,65 Tumorzellen (Kontrollgruppe) und 0,69 Tumorzellen (shITGB4) pro 60 ng muriner Knochenmark-DNA (Abb. 29B).



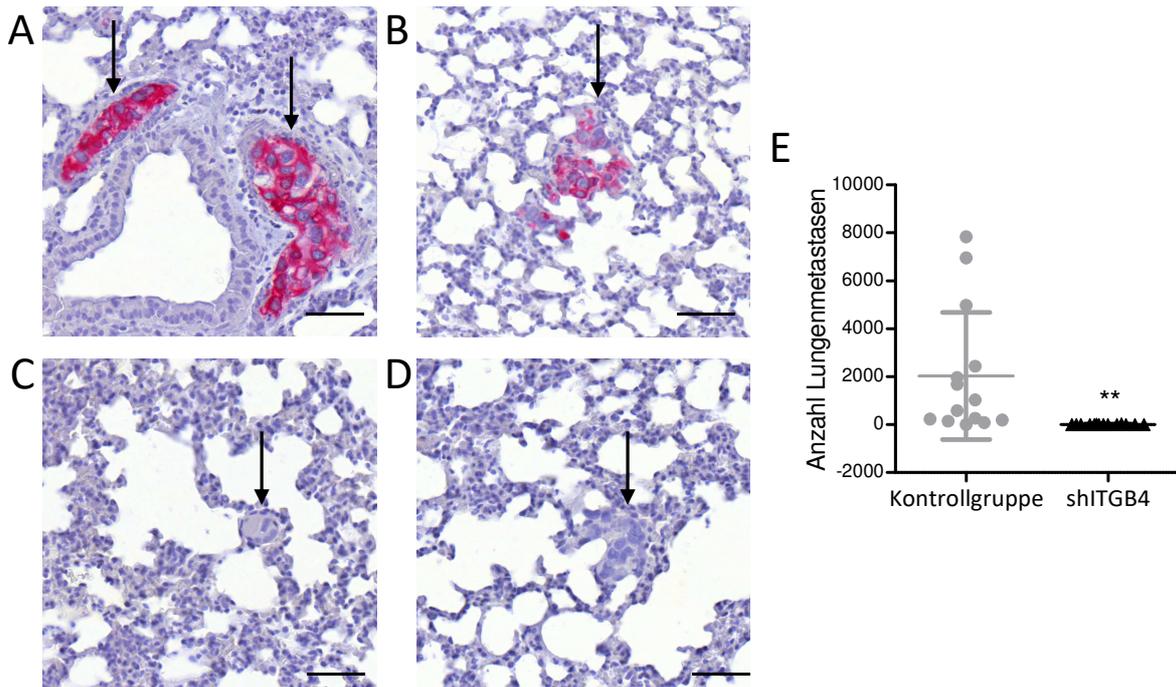
**Abb. 29: Fernmetastasen in Lunge und Knochenmark (Überlebensversuch).** Die Metastasierung der SKOV3-Zellen wurde in der Lunge und im Knochenmark mit Hilfe der Alu-PCR bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede dargestellt werden, auch nicht nach Einbeziehung der Überlebenszeit.

Nach Betrachtung der Alu-PCR-Analyse nach 57 Tagen (zeitunabhängig), konnten in der shITGB4-Gruppe nur wenige Fernmetastasen in Lunge und Knochenmark nachgewiesen werden. Dabei war die Anzahl an Lungenmetastasen in der shITGB4-Gruppe (0,003 Tumorzellen pro 60 ng muriner Lungen-DNA) im Vergleich zur Kontrollgruppe (9,00 Tumorzellen pro 60 ng muriner Lungen-DNA) signifikant reduziert (Abb. 30A). Im Knochenmark ließ sich kein signifikanter Unterschied darstellen: 0,095 Tumorzellen (Kontrollgruppe) gegenüber 0,003 Tumorzellen (shITGB4) pro 60 ng muriner Knochenmark-DNA (Abb. 30B).



**Abb. 30: Fernmetastasen in Lunge und Knochenmark an Tag 57 nach Injektion.** Die Metastasierung der SKOV3-Zellen wurde in der Lunge und im Knochenmark mit Hilfe der Alu-PCR bestimmt. In der Lunge konnte eine signifikant reduzierte Anzahl an ausgewanderten Zellen nach Injektion der shITGB4-KD-Zellen beobachtet werden; \*\*  $p = 0,0013$ .

Zum Nachweis, dass es sich bei den Alu-PCR-Ergebnissen der Lunge (linke Lungenhälfte) um intakte Zellen (Fernmetastasen) handelt, wurde zusätzlich die rechte Lungenhälfte mikroskopisch analysiert. Durch die morphologische Betrachtung konnten stromale und intravasale Lungenmetastasen voneinander unterschieden werden (Abb. 31). Die Auszählungen dieser Lungenmetastasen stimmten mit den Ergebnissen der Alu-PCR überein.



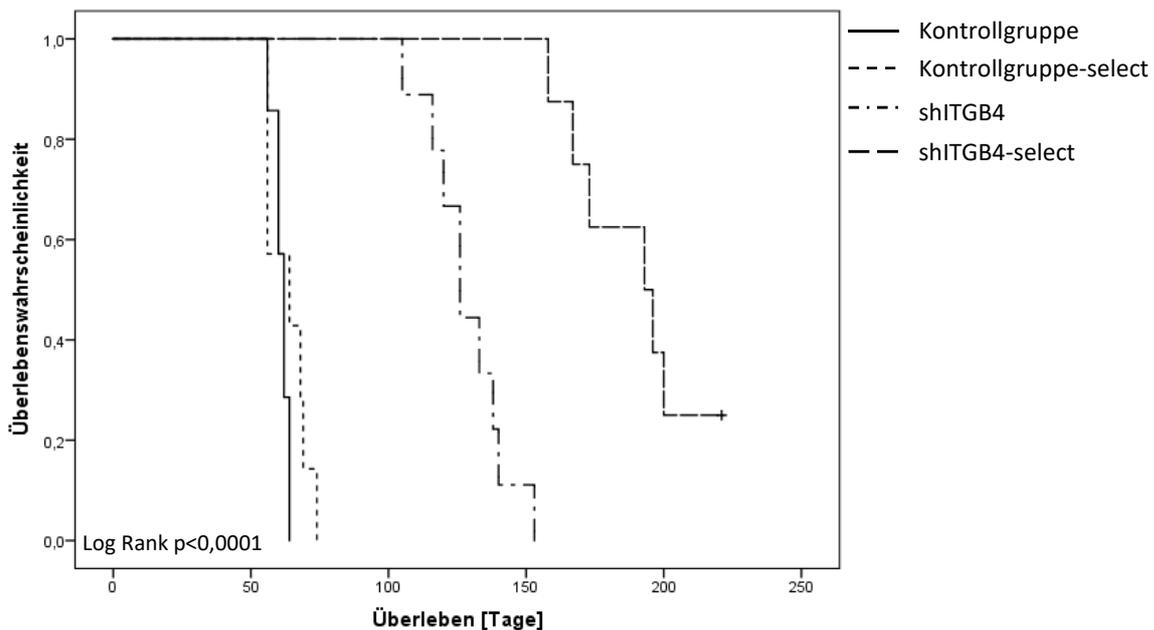
**Abb. 31: Lungenmetastasen.** Dargestellt sind ITGB4 immunhistologische Färbungen von (A+C) intravasalen und (B+D) stromalen Lungenmetastasen der (A+B) Kontrollgruppe und der (C+D) shITGB4-Gruppe. Die Pfeile markieren die Metastasen. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 50  $\mu$ m. In (E) ist die mikroskopische Auszählung der Lungenmetastasen dargestellt; \*\*  $p = 0,0083$ .

Durch die ITGB4-Färbung an den Lungenschnitten konnte gezeigt werden, dass der KD der shITGB4-Gruppe auch während des Metastasierungsprozesses stabil blieb.

### 3.6 Die Bedeutung der Selektine

#### 3.6.1 Einfluss von Selektin-Defizienz und ITGB4-Expression auf das Überleben

Bei der Untersuchung des Überlebensverhaltens von E- und P-Selektin-defizienten SCID-Mäusen (SCID-select) im Vergleich zu dem von Wildtyp-SCID-Mäusen nach Injektion von Kontrollzellen und shITGB4-KD-Zellen lässt sich ein deutlicher Überlebensvorteil der kombinierten Gruppe (shITGB4-KD-Zellen auf SCID-select = shITGB4-select) darstellen. Tiere, die in dieser Gruppe Tumoren entwickelten, lebten im Durchschnitt 181 Tage. Nach 220 Tagen wurde der Versuch beendet. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten zwei Tiere keine i.p. Karzinose oder Einstichtumoren entwickelt (Abb. 32).

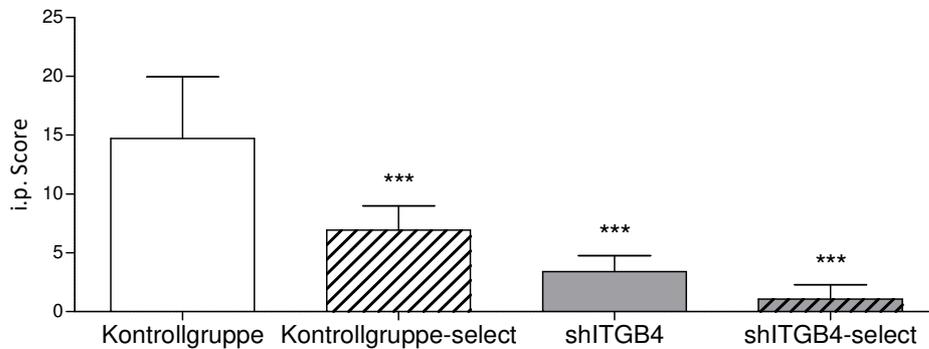


**Abb. 32: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier (SCID/SCID-select).** Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der SCID-Mäuse und Selektin-defizienten SCID-Mäuse (select), mit Kontroll- bzw. shITGB4-KD-Zellen injiziert, über die Zeit in Tagen. Abbruchkriterium war primär die Aszitesbildung.

#### 3.6.2 i.p. Karzinose in Abhängigkeit von der Selektin-Defizienz im Endpunktversuch

Neben dem längeren Überleben konnte eine geringere Entwicklung von i.p. Karzinose nach 57 Tagen in den E- und P-Selektin-defizienten Tieren (Kontrollgruppe-select: i.p. Score 6,9;

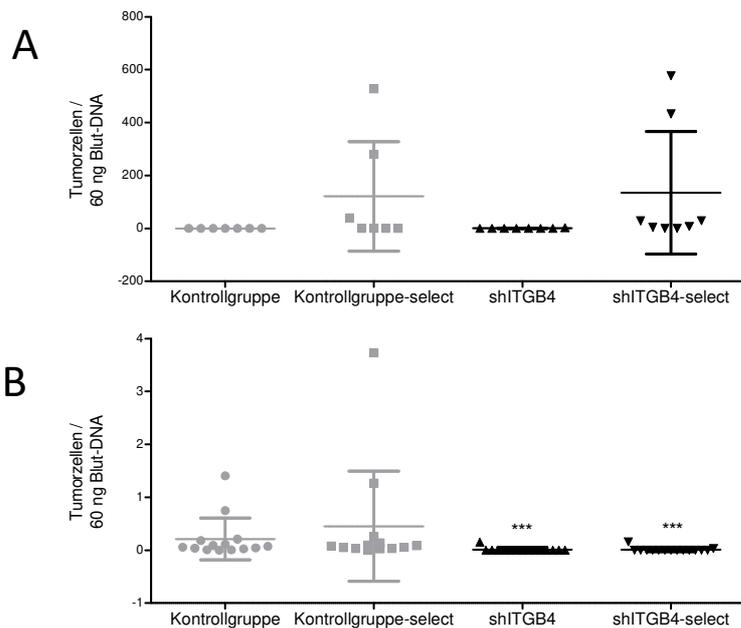
shITGB4-select: i.p. Score 1,1) im Vergleich zu der in den Wildtyp-Tieren (Kontrollgruppe: i.p. Score 14,7; shITGB4: i.p. Score 3,4) ermittelt werden (Abb. 33).



**Abb. 33: Verteilung der i.p. Karzinose.** An Tag 57 nach Injektion wurde die intraperitoneale Verbreitung der i.p. Karzinose anhand des i.p. Scores in den vier Gruppen ermittelt. Kontrollzellen und shITGB4-KD-Zellen wurden Wildtyp-SCID- und Selektin-defizienten SCID-Mäusen injiziert; \*\*\*p < 0,0001.

### 3.6.3 Zirkulierende Tumorzellen in Bezug auf Selektin-Defizienz und ITGB4-Expression

Bei der Untersuchung des murinen Blutes mittels Alu-PCR konnten in den Selektin-defizienten Mäusen tendenziell mehr humane Zellen im Blut gefunden werden als bei den Wildtyp-Mäusen. Bei der Entwicklung von i.p-Karzinose über die Zeit (Überlebensversuch) fanden sich nach Injektion von Kontrollzellen im Blut der Selektin-defizienten Mäuse 121,1-Zellen/60 ng Blut-DNA, bei den Wildtyp-Mäusen ließen sich nur 0,03-Zellen/60 ng Blut-DNA darstellen. Ähnlich sieht der Befund für die shITGB4-KD-Zellen aus, die sich im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (0,47-Zellen/60 ng Blut-DNA) vermehrt im Blut der Selektin-defizienten Mäuse nachweisen ließen (134,8-Zellen/60 ng Blut-DNA). Das lässt darauf schließen, dass die Tumorzellen eine Bindung zu den Selektinen aufbauen können und diese als Passage nutzen, um aus den Gefäßen auszutreten (Abb. 34). Im Überlebensversuch ist in den Selektin-defizienten Tieren im Vergleich von Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen gleich viel humanes DNA-Material im Blut zu finden.



**Abb. 34: Zirkulierende Tumorzellen im Blut *in vivo*.** Dargestellt sind die aus Alu-PCR ermittelten Tumorzellen in den vier untersuchten Gruppen aus (A) dem Überlebensversuch und (B) dem Endpunktversuch. \*\*\* $p < 0,0001$  (Mann-Whitney-U-Test).

Die Verteilung der Tumorzellen im Blut zum gleichen Zeitpunkt (Tag 57) zeigt, dass die Kontrollzellen wie im Überlebensversuch vermehrt in den Selektin-defizienten Mäusen nachgewiesen werden können (Kontrollgruppe: 0,21-Zellen/60 ng Blut-DNA; Kontrollgruppe-select: 0,45-Zellen/60 ng Blut-DNA). In den shITGB4-Gruppen lassen sich unabhängig von der Selektin-Defizienz nur geringe Mengen an humanem DNA-Material nachweisen (shITGB4: 0,01-Zellen/60 ng Blut-DNA; shITGB4-select: 0,01-Zellen/60 ng Blut-DNA). Dieses könnte im Zusammenhang mit der geringen intraperitonealen Tumorlast stehen.

### 3.7 Transkriptomanalysen und Validierung

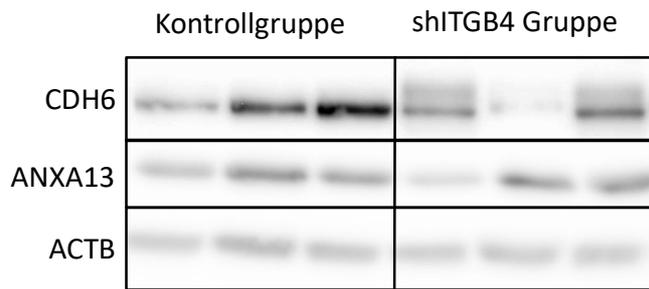
Die Tumoren aus dem Überlebensversuch der Wildtyp-SCID-Mäuse dienten als Ausgangsmaterial für eine Transkriptomexpressions-Analyse. Pro Gruppe (Kontrollgruppe und shITGB4) wurden 3 Tumoren analysiert, wobei eine der Proben den Qualitätsanforderungen nicht genügte, so dass in der Kontrollgruppe nur 2 Tumoren untersucht werden konnten. Daher erfolgte eine Signifikanzprüfung durch ANOVA  $p$ -Werte. Die ermittelten Signalintensitäten lassen den Rückschluss darauf zu, um welchen Faktor (*fold change, linear*) sich die Gruppen in

ihrem Transkriptom unterscheiden. Um dabei die große Datenmenge einzugrenzen, wurden nur kodierende Gene betrachtet, die sich mindestens um den Faktor 2 signifikant unterschieden. So konnten 86 Gene, die in der shITGB4-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht waren, und 107 Gene, die erniedrigt waren, gefunden werden. In Tab. 22 sind die jeweils 15 am stärksten veränderten Gene dargestellt.

**Tab. 22: Liste der regulierten Gene.** Dargestellt sind die unterschiedlich regulierten Gene zwischen shITGB4-Gruppe und Kontrollgruppe. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe sind die Gene in der shITGB4-Gruppe um den jeweiligen Faktor erhöht bzw. erniedrigt.

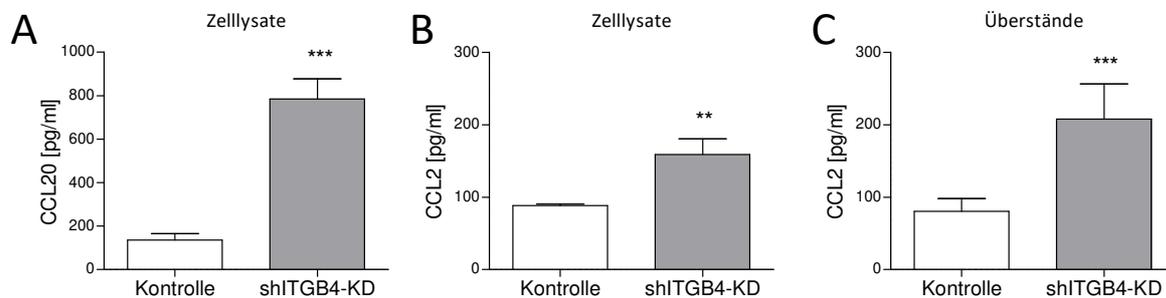
erhöht			erniedrigt		
Faktor	Gensymbol	Beschreibung	Faktor	Gensymbol	Beschreibung
249,53	CCL2	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	-7,86	LOC100133920	<i>uncharacterized LOC100133920</i>
33,71	PTPRC	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>	-7,21	HAVCR1	<i>hepatitis A virus cellular receptor 1</i>
27,87	CCL20	<i>chemokine (C-C motif) ligand 20</i>	-7,17	TGFBI	<i>transforming growth factor, beta-induced, 68kDa</i>
21,16	BCAT1	<i>branched chain amino-acid transaminase 1, cytosolic</i>	-6,83	HMGA2	<i>high mobility group AT-hook 2</i>
18,31	COL1A2	<i>collagen, type I, alpha 2</i>	-5,63	LOC286297	<i>uncharacterized LOC286297</i>
12,56	MSTN	<i>myostatin</i>	-5,53	LOC100133920	<i>uncharacterized LOC100133920</i>
10,90	SBSPON	<i>somatomedin B and thrombospondin type 1 domain containing</i>	-5,08	SYT14	<i>synaptotagmin XIV</i>
10,18	ACSL5	<i>acyl-CoA synthetase long-chain family member 5</i>	-5,06	LOC100505817	<i>uncharacterized LOC100505817</i>
10,14	TOX	<i>thymocyte selection-associated high mobility group box</i>	-5,00	STRA8	<i>stimulated by retinoic acid 8</i>
8,89	CDH6	<i>cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)</i>	-4,80	ITGB4	<i>integrin beta 4</i>
7,00	TPK1	<i>thiamin pyrophosphokinase 1</i>	-4,54	SLC44A2	<i>solute carrier family 44 (choline transporter), member 2</i>
6,89	PROL1	<i>proline rich, lacrimal 1</i>	-4,42	DKK1	<i>dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i>
6,46	SCGB2A1	<i>secretoglobin, family 2A, member 1</i>	-4,36	ANGPT2	<i>angiotensin 2</i>
5,75	ANXA13	<i>annexin A13</i>	-4,20	RPSAP52	<i>ribosomal protein SA pseudogene 52</i>
5,06	TECRL	<i>trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like</i>	-4,05	ADAMTSL3	<i>ADAMTS like 3</i>

Die Validierung der Transkriptom-Analysen erfolgte auf Proteinebene durch verschiedene Methoden. Die Expressionsunterschiede zwischen Tumoren der Kontroll- und shITGB4-Gruppe in den Molekülen ANXA13 (Faktor 5,75) und CDH6 (Faktor 8,89) wurden per Western Blot validiert. Die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse konnten allerdings nicht bestätigt werden (Abb. 35).



**Abb. 35: Validierung der CDH6- und ANXA13-Genexpressionsdaten.** 30 µg Gesamtprotein der Tumorslysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot die CDH6- und ANXA13-Expression dargestellt. Als Ladekontrolle diente ACTB; CDH6 = 130 kDa, ANXA13 = 36 kDa, ACTB = 42 kDa.

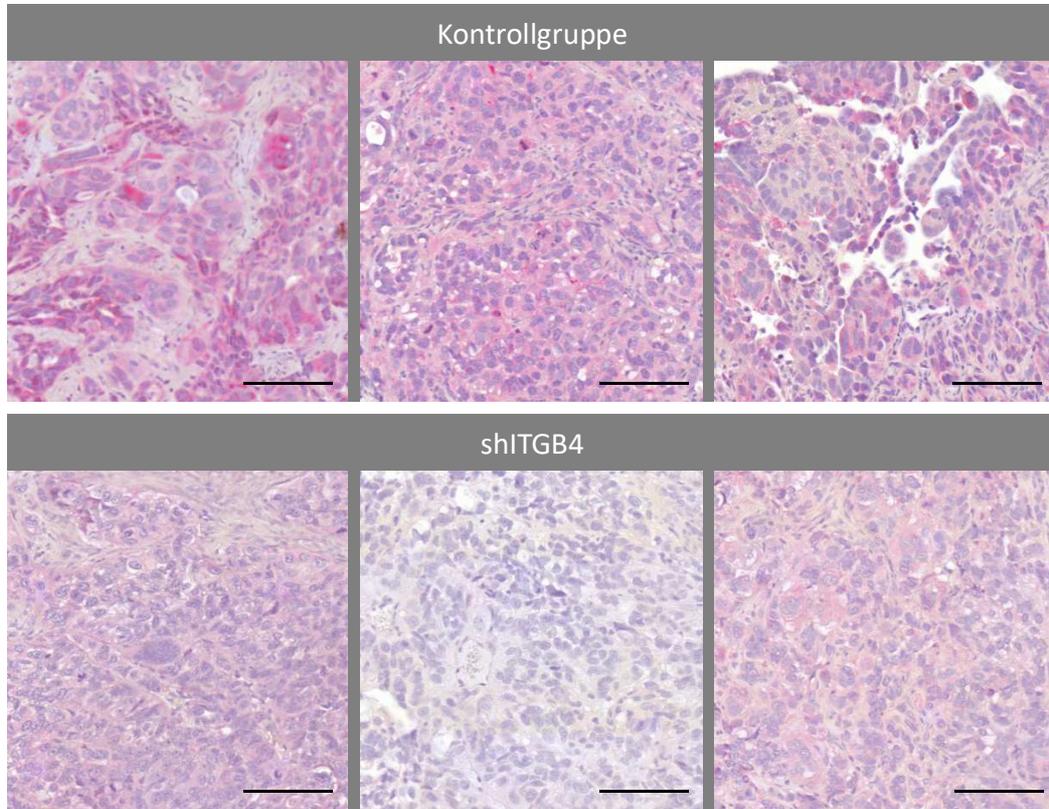
Die Produktion von CCL2 (Faktor 249,53) und CCL20 (Faktor 27,87) wurde anhand eines ELISAs aus den Lysaten und Zellkulturüberständen *in vitro* untersucht. Es ist deutlich zu erkennen, dass die shITGB4-KD-Zellen mehr CCL2 und CCL20 produzieren als die Kontrollzellen hoher ITGB4-Expression (Abb. 36). Die Messung der CCL20-Konzentration in den Überständen lag unter der Nachweisgrenze des ELISAs und ist nicht abgebildet.



**Abb. 36: Validierung der CCL2- und CCL20-Genexpressionsdaten.** Die Konzentrationen an CCL2 und CCL20 wurden mittels ELISA gemessen (M.Sc. S. Hanika, IAEM, UKE). Dargestellt sind die CCL20-Konzentrationen aus den Lysaten von  $4 \cdot 10^5$  Zellen der Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen (A). Die CCL2-Konzentrationen aus den Lysaten von  $9 \cdot 10^5$  Zellen der Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen sind in (B) dargestellt. Die Messung erfolgte einmal in Doppelbestimmung von biologischen Triplikaten. Die Konzentration an CCL2 im Überstand ist in (C) dargestellt und wurde einmal anhand von zwei verschiedenen Verdünnungen in Doppelbestimmung von biologischen Triplikaten durchgeführt. \*\* p = 0,0052; \*\*\* p < 0,0005.

Zudem konnten die Unterschiede der DKK1-Expression (*dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1*) zwischen Kontrollgruppe und shITGB4-Gruppe durch immunhistologische Färbungen

dargestellt werden. Die Tumoren der shITGB4-Gruppe zeigen eine niedrigere DKK1-Expression (Abb. 37).



**Abb. 37: Validierung der DKK1-Genexpressionsdaten.** An Tumoren der Kontroll- und shITGB4-Gruppe wurde DKK1 immunhistologisch dargestellt. Pro Gruppe sind Tumoren aus drei unterschiedlichen Tieren dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.8 ITGB4-Expression an klinischem Material von Ovarialkarzinomen

Zur Festigung der *in vitro* und tierexperimentell erhobenen Daten wurde humanes Tumormaterial eines Patientenkollektivs ( $n = 252$ ) untersucht. Für die Analysen wurden die primären Ovarialkarzinome betrachtet, Rezidive, Borderline- und benigne Tumoren wurden ausgeschlossen ( $n = 219$ ). Die Untersuchung der ITGB4-Expression erfolgte auf Proteinebene aus Tumorlysaten durch eine Western-Blot-Analyse. Die ITGB4-Expression wurde durch den Quotienten aus ITGB4 und GAPDH ermittelt. Neben den Tumorproben ohne ITGB4-Expression lag die höchste ITGB4-Expression bei 1,80 Einheiten ( $\bar{x} = 0,25$  Einheiten). Für die Einteilung der Gruppen mit geringer und hoher ITGB4-Expression wurde der *cut-off* nach dem 3. Quartil

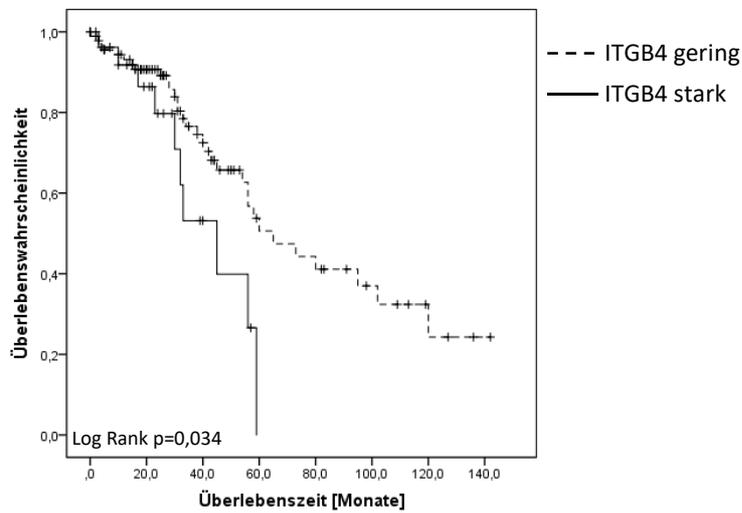
gesetzt, so dass die Gruppe der geringen ITGB4-Expression 75 % (n = 165) und die Gruppe der hohen ITGB4-Expression 25 % (n = 54) der Fälle einschloss (Tab. 23). Die *cut-off*-Grenze der ITGB4-Expressions-Einheiten lag daher bei 0,40.

**Tab. 23: Ovarialkarzinom Patientenkollektiv**

	Kohorte	geringe ITGB4-Expression	hohe ITGB4-Expression	p-Wert
<b>Anzahl</b>	219 (100 %)	165 (75,3 %)	54 (24,7 %)	
<b>Alter</b>				n.s.
Median	62	62	63	
Umfang	21-90	21-90	26-81	
<b>Grading</b>				n.s.
G1	12 (5,5 %)	8 (3,7 %)	4 (1,8 %)	
G2	49 (22,4 %)	38 (17,4 %)	11 (5,0 %)	
G3	152 (69,4 %)	114 (52,1 %)	38 (17,4 %)	
<b>FIGO (1988)</b>				n.s.
I/II	14 (6,4 %)	11 (5,0 %)	3 (1,4 %)	
III	154 (70,3 %)	118 (53,9 %)	36 (16,4 %)	
IV	43 (19,6 %)	29 (13,2 %)	14 (6,4 %)	
<b>Lymphknotenbefall</b>				n.s.
vorhanden	130 (59,4 %)	100 (45,7 %)	30 (13,7 %)	
nicht vorhanden	50 (22,8 %)	39 (17,8 %)	11 (5,0 %)	
<b>Fernmetastasen</b>				n.s.
vorhanden	46 (21,0 %)	32 (14,6 %)	14 (6,4 %)	
nicht vorhanden	146 (66,7 %)	113 (51,6 %)	33 (15,1 %)	
<b>Histologie</b>				n.s.
seröser Typ	188 (85,8 %)	140 (63,9 %)	48 (21,9 %)	
nicht-seröser Typ	31 (14,2 %)	25 (11,4 %)	6 (2,7 %)	
<b>OP-Ergebnis</b>				n.s.
tumorfrei	142 (64,8 %)	109 (49,8 %)	33 (15,1 %)	
Rest < 1 cm	41 (18,7 %)	30 (13,7 %)	11 (5,0 %)	
Rest > 1 cm	25 (11,4 %)	16 (7,3 %)	9 (4,1 %)	

Die folgenden Parameter Alter, Grading, FIGO-Stadium, Lymphknotenbefall, Fernmetastasen, Histologie und OP-Ergebnis wurden zur statistischen Analyse herangezogen. Anhand des Chi-Quadrat-Testes nach Pearson konnten hinsichtlich der ITGB4-Expression bei den erhobenen Parametern keine signifikanten Korrelationen gefunden werden (Tab. 23). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom, die makroskopisch tumorfrei operiert wurden (n = 121), die Gesamt-Überlebenszeit geschätzt nach Kaplan-Meier signifikant

verlängert bei niedriger ITGB4-Expression. Bei hoher ITGB4-Expression ist sie dagegen erniedrigt (Lok Rank (Mantel-Cox)  $p = 0.034$ ) (Abb. 38).



**Abb. 38: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier (Patientenkollektiv).** Dargestellt ist die Überlebensrate über die Zeit in Monaten der makroskopisch tumorfrei operierten Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom in Bezug auf starke bzw. geringe ITGB4-Expression. LogRank (Mantel-Cox)  $p = 0,034$ ; *Cut-off* 0,040.

## 4 Diskussion

Unter den gynäkologischen Erkrankungen zählt das Ovarialkarzinom zu denjenigen mit der schlechtesten Prognose. Seit den 1990er Jahren liegt die 5-Jahres-Überlebensrate des Ovarialkarzinoms in Deutschland konstant bei etwa 40% (Daten des Robert-Koch-Instituts). Das zeigt, dass in den zurückliegenden Jahrzehnten keine Therapien entwickelt werden konnten, die die Prognose des Ovarialkarzinoms effektiv verbesserten. Daher besteht die Notwendigkeit, die Prozesse der malignen Progression von Ovarialkarzinomen genauer zu verstehen, um aus diesem Verständnis neue Ansatzpunkte für Therapien zu entwickeln.

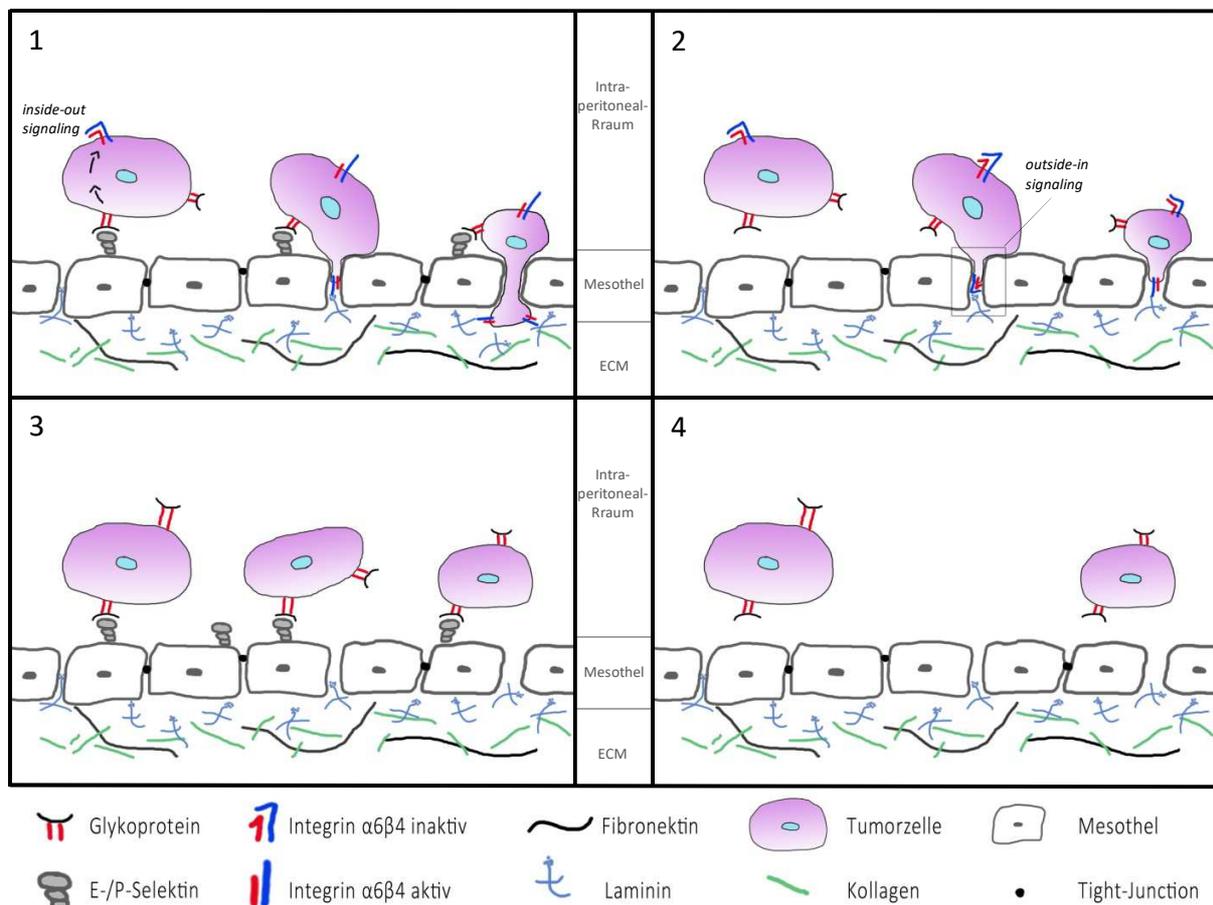
### 4.1 Bedeutung der Adhäsionskaskade im intraperitonealen Xenograftmodell

Aus den Versuchen zu dieser Arbeit geht hervor, dass das Modell der Leukozyten-Adhäsionskaskade für die intraperitoneale und hämatogene Ovarialkarzinomausbreitung in Hinblick auf Integrin  $\beta 4$  (ITGB4) und E-/P-Selektine von entscheidender Bedeutung ist. Im Xenograftmodell wurde das Zusammenspiel der Adhäsionsmoleküle wie die E- und P-Selektine auf Seiten des Wirts (Endothel und Mesothel), sowie das ITGB4 auf Seiten der Tumorzellen untersucht. In der Leukozytenadhäsionskaskade, deren Modell für die Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel angenommen wird (Williams et al., 2011), sind die Bindungen an Selektine und Integrine hintereinander geschaltete Schritte. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach Injektion von ITGB4-depletierten Zellen das mittlere Überleben von Selektin-defizienten SCID-Mäusen bei 181 Tagen und das von Wildtyp-SCID-Mäusen bei 129 Tagen lag ( $p = 0,0001$ ). Die Injektion von SKOV3-Kontrollzellen führte zu einer Überlebensdauer von 61 Tagen bei den Wildtyp-SCID-Mäusen und 63 Tagen bei Selektin-defizienten SCID-Mäusen. Diese Ergebnisse deuteten auf einen synergistischen Effekt von Selektin-Defizienz und ITGB4-Depletion hin.

Die Selektinbindung findet während des Adhäsionsvorgangs von Tumorzellen an das Endothel oder Mesothel vor der Integrinbindung statt. Das E-Selektin wird hauptsächlich erst nach der Ausschüttung von Entzündungsfaktoren wie zum Beispiel  $IL-1\alpha$  oder  $TNF\alpha$  auf dem Endothel exprimiert (Bevilacqua et al., 1987). Für das Mesothel konnte die E-Selektin Expression durch die Inkubation mit  $IL-1\beta$  hervorgerufen werden (Klein et al., 1995). Entzündungsreaktionen werden

unter anderem durch Tumorerkrankungen selbst hervorgerufen (Rakoff-Nahoum, 2006), so wird während einer Tumorerkrankung vermehrt Selektin auf Endothel und Mesothel exprimiert. Zusätzlich konnte aber auch eine konstitutive Expression der Selektine auf dem Endothel von Haut- und Knochengefäße sowie auf Mesothelzellen beschrieben werden (Gebauer et al., 2013; Keelan et al., 1994; Schweitzer et al., 1996). So können Selektine als Bindungspartner auch ohne vorliegende Entzündung zur Verfügung stehen. E- und P-Selektine können Bindungen zu Glykoproteinen bzw. Glykolipiden auf der Tumorzelloberfläche eingehen (Cummings und McEver, 2009). Diese Bindungen sind nicht fest, sodass die Tumorzellen über die Endothel- bzw. Mesotheloberfläche rollen (Mayadas et al., 1993) (Abb. 39 3). Erst durch die Bindung an Selektine wird eine Aktivierung der Integrine auf der Zelloberfläche durch *inside-out signaling* ermöglicht (Zarbock und Ley, 2008) (Abb. 39 1). Im Falle der Leukozyten sind dieses vor allem die Integrine der Leukozyten-spezifischen Rezeptoren, die die  $\beta$ 2- und  $\beta$ 7-Integrinuntereinheiten beinhalten (Hynes, 2002). Die Leukozyten-spezifischen Untereinheiten fehlen auf vielen Tumorzellen, sowie auf den in dieser Arbeit untersuchten SKOV3 Ovarialkarzinomzellen (Daten nicht abgebildet). Es wurde daher das ITGB4 in den Fokus der Untersuchungen gestellt. Im Gegensatz zu den Leukozyten-spezifischen Integrinen, die an Rezeptoren wie ICAM und VCAM binden, geht das ITGB4 hauptsächlich Bindungen zu dem in der extrazellulären Matrix vorkommenden Laminin ein (Humphries et al., 2006). Die Auswirkungen des Zusammenspiels von Selektinen und Integrinen im Intraperitonealraum konnten in dieser Arbeit durch die Menge an i.p. Karzinose im Xenograftmodell in einem Endpunktversuch dargestellt werden. Die Wildtyp-Mäuse zeigten nach Injektion mit SKOV3-Kontrollzellen die größte i.p. Karzinose (i.p. Score 14,7), danach folgten die Selektin-defizienten Mäuse mit Kontrollzell-Injektion (i.p. Score 6,9) und Wildtyp-Mäuse, denen shITGB4-KD-Zellen injiziert wurden (i.p. Score 3,4). In der Gruppe der Selektin-defizienten Mäuse mit Injektion von shITGB4-KD-Zellen konnte kaum noch i.p. Karzinose dargestellt werden (i.p. Score 1,1). Dieser Versuch zeigt im Gegensatz zu dem oben erwähnten Überlebensversuch eine Reduktion der i.p. Karzinose in den Selektin-defizienten Mäusen mit Kontrollzellinjektion. Eine deutliche Abnahme der i.p. Karzinose wird aber erst durch den Einsatz von ITGB4 depletierten SKOV3-Zellen sichtbar. Es muss dementsprechend also eine Selektin-unabhängige Bindungsmöglichkeit für das ITGB4 geben (Abb. 39 2). Wie zuvor beschrieben, geht das ITGB4 Bindungen mit Lamininen ein,

die Bestandteile der extrazellulären Matrix sind. Im Falle von intraperitonealen Tumoren bildet das Mesothel keine homogene Einzelschicht mehr aus (Cortan et al., 1968; Birbeck und Wheatley, 1965; Kiyasu et al., 1981). Zell-Zell-Kontakte wie Tight-Junctions werden aufgelöst und führen zum Abrunden der Mesothelzellen, sodass stellenweise für die Tumorzellen ein direkter Kontakt zur extrazellulären Matrix geboten wird. Da die Integrinaktivierung neben dem *inside-out signaling* auch durch ein *outside-in signaling* induziert werden kann (Wang et al., 2010) (Abb. 39 2), ist also eine Selektin-unabhängige ITGB4-Bindung an die Laminine der extrazelluläre Matrix möglich. Durch den ungleichen peritonealen Flüssigkeitsstrom können die Tumorzellen in einigen peritonealen Arealen ohne Bindung an Selektine dem Mesothel direkt locker aufliegen (Jänicke, 2004).



**Abb. 39: Schematische Darstellung der intraperitonealen Tumorzelladhäsion** 1) Kontrollgruppe: Kontrollzellen in Kontrolltieren, 2) Kontrollgruppe-select: Kontrollzellen in Selektin-defizienten Tieren (select), 3) shITGB4: shITGB4-KD-Zellen in Kontrolltieren, 4) shITGB4-select: shITGB4-KD-Zellen in select-Tieren. Grafische Darstellung von Anne Schierloh.

Im dargestellt Modell würde dieses bedeuten, dass in den Selektin-defizienten Mäusen keine Integrinaktivierung durch die Bindung an Selektine erfolgen kann. Die Integrinbindung kann bei Fehlen von Selektinen durch direkten Kontakt möglicher Bindungspartner (z.B. Laminin) in der extrazellulären Matrix erfolgen kann. Daher ist eine deutliche Auswirkung auf das Überleben erst nach Depletion von ITGB4 auf den Tumorzellen in Selektin-defizienten Mäusen sichtbar (Abb. 39 4). Im Falle von Tumorzellen mit ITGB4-Expression in Selektin-defizienten Mäusen kann die Fehlende Selektinbindung kompensiert werden, was durch das nahezu unveränderte Überleben und die Bildung von Tumoren in allen untersuchten Tieren im Vergleich zu den Selektin-kompetenten Mäusen gezeigt werden konnte.

Die E- und P-Selektinbindungen unter Flussbedingungen zeigten *in vitro* keinen Unterschied zwischen den Kontroll- und shITGB4-KD-SKOV3-Zellen. Dieses Ergebnis hebt die Notwendigkeit hervor, die Adhäsions-Prozesse in ihrer physiologischen Umgebung zu beobachten. Daher wurden in dieser Arbeit *in-vivo*-Versuche an Xenograftmodellen durchgeführt.

Es ist bekannt, dass das Umgebungsmilieu des Tumors den Metastasierungsprozess wesentlich beeinflusst (Joyce und Pollard, 2009). Diesen Einfluss *in vitro* abzubilden wird fortlaufend optimiert. Neben den geläufigen 2D- und 3D-statischen *in-vitro*-Systemen wurden bereits verschiedene dynamische *in-vitro*-Systeme (*cancer-on-chip*) entwickelt. In den *cancer-on-chip*-Systemen sind Teilaspekte des Tumor-Umgebungsmilieus wie lösliche Faktoren, extrazelluläre Matrix oder zelluläre Interaktion nachgestellt und lassen Untersuchungen der Tumorzellen in einer simulierten Umgebung zu (Sleeboom et al., 2018). Es liegen allerdings nur wenige dynamische Versuchsansätze vor, in denen diese Teilaspekte miteinander kombiniert werden. So wurden zum Beispiel nur Teilschritte der Metastasierung wie die Extravasation betrachtet (Jeon et al., 2015). Da aber die Zusammenwirkung aller genannten Aspekte wichtig für die Abbildung des pathophysiologischen Metastasierungsprozesses ist, wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung des Ovarialkarzinoms ein Maus-Xenograftmodell verwendet. Die Tumorzellinjektion wurde, wie es in vielen Studien beschrieben, intraperitoneal gewählt, um das erste Stadium der Ovarialkarzinometastasierung, die i.p. Karzinose, darzustellen (Abubaker et

al., 2013; Lee et al., 2016; Westrom et al., 2018). Von einer orthotopen Injektion zur Etablierung eines Modells zur spontanen intraperitonealen Metastasierung wurde aus verschiedenen Gründen abgesehen: 1) Der Entstehungsort des Ovarialkarzinoms ist noch nicht vollständig geklärt, Beobachtungen zeigen unter anderem mögliche Entstehungsorte am Fimbrientrichter (Folkins et al., 2008; Meinhold-Heerlein et al., 2016). 2) Im murinen Organismus ist das Ovar im Gegensatz zu dem im menschlichen Organismus von einer Kapsel umgeben (Ng und Barker, 2015), so dass nach orthotoper Injektion im murinen Modell mehrere Membranen durchbrochen werden müssten. Die Initiierung einer i.p. Karzinose kann daher als gutes Modell zur Untersuchung von Adhäsions- und Etablierungsfähigkeit der Ovarialkarzinomzellen im Peritoneum in Abhängigkeit von Selektinen und ITGB4 angenommen werden.

Neben der Selektin- und Integrinbindung müssen allerdings weitere Faktoren für das Tumorstadium wichtig sein, da nur in 2 von 8 Selektin-defizienten Mäusen nach Injektion von SKOV3-Zellen mit ITGB4-Depletion eine Tumoretablierung ausblieb. So könnten verschiedene Moleküle wie CD44 oder MUC16/CA125 (Rump et al., 2004; Strobel et al., 1997), die nicht an der eigentlichen Adhäsionskaskade beteiligt sind, ebenfalls die Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen an das Mesothel hervorrufen. Durch die Selektin- und Integrin-unabhängige Adhäsion der Tumorzellen an das Mesothel würde eine alternative Bindung vorhanden sein und ein weiteres Wachstum der injizierten Tumorzellen könnte erfolgen.

Die SKOV3-Zellen mit dem Kontrollvektor zeigten keinen Unterschied in der Überlebensdauer von Wildtyp- oder Selektin-defizienten Mäusen, obwohl dieses mit den Wildtyp-SKOV3-Zellen am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie bereits wiederholt gezeigt werden konnte (unveröffentlichte Daten, Stürken). In oben dargestellten Endpunktversuch zur Untersuchung der i.p.-Karzinose ist eine deutliche Abnahme der i.p.-Karzinose durch SKOV3-Kontrollzellen in Selektin-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen sichtbar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich die SKOV3-Kontrollzellen nicht anders als die SKOV3-Wildtyp-Zellen verhalten. Für den Überlebensversuch würde dieses bedeuten, dass zu viele Mäuse durch Lymphomentwicklung (Custer et al., 1985) aus dem Versuch ausgeschieden sind, um geringe Wachstumsunterschiede darzustellen.

## 4.2 Bedeutung der *ex-vivo* und *in-vitro*-Ergebnisse

In 2D-Kultivierung konnte ein signifikanter Proliferationsunterschied zwischen Kontroll- und shITGB4-KD-SKOV3-Zellen nach dünner Aussaat beobachtet werden. Da das ITGB4 über Hemidesmosomen einen Kontakt zum Zellkulturboden vermittelt (Riddelle et al., 1991), könnte ein Verlust dieser Bindung bei den shITGB4-KD-Zellen zu einer erhöhten Apoptoserate führen. Dieses wurde im Western Blot mit dem p $\text{H}2\text{A.X}$ -Marker untersucht. Während der Apoptose wird die DNA fragmentiert, so dass der eigentlich für die Darstellung von DNA-Doppelstrangbruch eingesetzte Marker p $\text{H}2\text{A.X}$  verwendet wurde (Mukherjee et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die shITGB4-KD-Zellen in 2D-Kultivierung etwas apoptotischer waren als die Kontrollzellen. Der signifikante Proliferationsunterschied lässt sich dadurch aber nicht vollständig erklären. Ein weiterer Faktor, der zu einer verminderten Proliferationsrate beitragen könnte, ist eine verlängerte Zellzyklusphase der shITGB4-KD-Zellen. Zum Beispiel konnte ein Verbleiben von Osteosarkomzellen in der G $2$ /M Phase im Zusammenhang mit Integrin  $\beta 3\alpha$  gebracht werden (Chang et al., 2008). Die *ex-vivo*-Untersuchungen zur Proliferations- (Ki-67) und Apoptose-Rate erfolgten an dem Material aus den Überlebensversuchen und zeigten keine Unterschiede, da sich die Tumoren bis zur stationären Phase der Wachstumskurve entwickeln konnten. Für Analysen aus dem Endpunktversuch stand auf Grund der geringen i.p. Karzinose nach Injektion mit shITGB4-KD-Zellen nicht genügend Material zur Verfügung.

Bei der Verteilung der soliden Tumoransammlungen im Intraoperitonealraum (i.p. Karzinose) aus den SKOV3-Xenograftmodellen fällt auf, dass die Bereiche am Zwerchfell und unterhalb der Leber früher als andere Areale betroffen sind. Bei der humanen i.p. Karzinose konnte diese Verteilung bereits beobachtet werden und in Zusammenhang mit den cranial verlaufenden peritonealen Flüssigkeitsströmen gebracht werden (Jänicke, 2004). Neben der induzierten i.p. Karzinose wurden bei 90 % der Tiere Tumoren subkutan im Bereich des Einstichkanals gebildet. Die Untersuchungen ergaben, dass diese Einstichtumoren in der Kontrollgruppe signifikant größer als in der shITGB4-Gruppe waren. Die Einstichtumoren stellen nicht den Primärtumor dar, die Tumorzellen konnten sich in diesem Fall entlang der Nadelstich-Verletzung etablieren. Die Etablierung von Tumorzellen entlang einer Operationswunde wurde zuvor bereits beschrieben (Kindermann et al., 1995; Stuelten et al., 2013). Hier besteht ein besseres

Anwachsen im Mausbindegewebe der Zellen hoher ITGB4-Expression. *In-vitro*-Untersuchungen zur 3D-Kolonienformation wurden in den gelartigen Medien Softagar und Matrigel durchgeführt. Matrigel besitzt im Gegensatz zu Softagar Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen IV, Laminin und Heparansulfat-Proteoglykane und stellt damit physiologische Bedingungen dar. Mit dem Laminin wird in diesem Fall ein spezifischer Bindungspartner des ITGB4 geliefert (Humphries et al., 2006). Es wurde festgestellt, dass die ITGB4-depletierten Zellen in beiden Medien weniger und kleinere Kolonien bildeten als die Kontrollzellen hoher ITGB4-Expression. Die Apoptoserate in 3D-Kultivierung ist in den shITGB4-KD-Zellen nur tendenziell erhöht und erklärt daher die Bildung kleinerer Kolonien nicht hinreichend. Als mögliche Ursache für die Ausbildung weniger und kleinere Kolonien steht die geringere Proliferationsrate der ITGB4-depletierten Zellen im Vordergrund.

In den Xenograftmäusen konnte eine weitere Tumorzell-Ansammlung in der peritonealen Flüssigkeit gefunden werden. Die Tumor-Sphäroide wurden nach Injektion mit Kontrollzellen deutlich ausgebildet, in ihrer Umgebung fanden sich kaum Immunzellen (Ergebnisse Abb. 25). Demgegenüber zeigten die Tiere nach shITGB4-KD-Zell-Injektion zum gleichen Zeitpunkt kaum Tumor-Sphäroide, dafür aber eine hohe Ansammlung von Immunzellen (CD45 positiv) in der peritonealen Flüssigkeit. Die Immunzellen in den SCID-Mäusen können Granulozyten, Makrophagen oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sein, diese Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und sind in der Lage, Tumorzellen als fremd zu erkennen und zu eliminieren (Hagerling et al., 2015). Das höhere Vorkommen von Immunzellen in der peritonealen Flüssigkeit der Tiere mit shITGB4-KD-Zellinjektion kann durch die erhöhte Produktion von Chemokinen der shITGB4-KD-Zellen verursacht sein. CCL2 gehört zu den Chemokinen, welche gezielt Monozyten und NK-Zellen anlocken und konnte in ELISA Messungen vermehrt in den shITGB4-Zellen nachgewiesen werden (Ergebnisse Abb. 36), nicht aber in den Kontrollzellen, aus denen im Mausmodell intraperitoneale Zellansammlungen mit deutlich weniger Immunzellen gefunden werden konnten. Eine Erklärung dafür, dass in der intraperitonealen Flüssigkeit der shITGB4-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe kaum Tumor-Sphäroide gefunden wurden, könnte das *in-vitro*-Ergebnis der Kolonienformation in Matrigel liefern. In diesem Versuch konnte dargestellt werden, dass die shITGB4-KD-Zellen im

Vergleich zu den Kontrollzellen weniger kugelförmige, allerdings vermehrt adhärenz Kolonien (scheibenförmig) bilden. Im frühen Stadium könnten in der shITGB4-Gruppe daher weniger Tumor-Sphäroide in der peritonealen Flüssigkeit vorliegen und im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt an Mesothel adhärenz Zellen gefunden werden. Die Bildung von kleineren Sphäroiden der shITGB4-KD-Zellen im Vergleich zu denen von Kontrollzellen konnte *in vitro* auch in flüssigen Medien nach Beschichtung mit polyHEMA dargestellt werden. Die Größe der Kolonien konnte durch die Inkubation mit konditionierten Medien nicht beeinflusst werden. Die bestätigte Produktion von CCL2 und CCL20 der ITGB4-depletierten Zellen (Ergebnisse Abb. 36) hat daher keinen Einfluss auf die Größe der Kolonienformation, könnte aber in Zusammenhang mit der Immunzellfiltration stehen.

Es konnte dargestellt werden, dass die SKOV3-Zellen *in vitro* migratorische und invasive Eigenschaften besitzen. Dabei zeigten die ITGB4-depletierten Zellen eine geringere Migrationsrate als die Kontrollzellen.

Durch die Umstrukturierung von Zytoskelettkomponenten können Zellausläufer wie Filopodien und Lamellipodien gebildet werden. Diese bilden fokale Adhäsionen aus in denen Zytoskelett und extrazelluläre Matrix über membranständige Adhäsionsmoleküle aneinander gebunden werden (Ridley et al., 2003). Integrine sind maßgeblich an den fokalen Adhäsionen beteiligt, so dass angenommen werden kann, dass das Fehlen von ITGB4 auf der Zelloberfläche zu einer geringeren Migrationsrate beiträgt. Zusätzlich wird die Migration durch chemotaktische Faktoren wie zum Beispiel Chemokine beeinflusst. Durch die autokrine Sezernierung von CCL19 bei dendritischen Zellen konnte eine Migration in Richtung von CCL21 verhindert werden (Hansen et al., 2016). Für die shITGB4-KD-Zellen konnte in dieser Arbeit eine höhere Sezernierung von CCL20 im Vergleich zu derjenigen der Kontrollzellen gezeigt werden. Möglicherweise ist daher eine Migration zu anderen Orten für die shITGB4-KD-Zellen nicht weiter notwendig. Beim humanen Ovarialkarzinom können neben der i.p. Karzinose in 2-3 % der Fälle Fernmetastasen in Lunge und Leber beobachtet werden (Management des Ovarialkarzinoms, Seite 121). Um eine hämatogene Metastasierung in der Maus zu nachzuweisen, wurden Blut, Lunge und Knochenmark durch eine PCR auf humane Alu-Sequenzen untersucht. In Blut und Knochenmark konnten nur sehr wenige bzw. keine humanen

Alu-Sequenzen detektiert werden. In der Lunge hingegen zeigten sich höhere Werte, als in Blut und Knochenmark. Da durch den Nachweis von humanen Alu-Sequenzen in murinem Gewebe nicht per se davon ausgegangen werden kann, dass es sich um intakte Tumorzellen handelt, wurden die Lungen mikroskopisch auf Metastasen analysiert. Bei mikroskopischer Betrachtung konnte gezeigt werden, dass im Überlebensversuch nur 4 von 15 Tieren weniger als 300 Metastasen in der Lunge aufwiesen, davon gehörten 3 in die Gruppe der Tiere mit Tumoren geringer ITGB4-Expression. Die Wahrscheinlichkeit Lungenmetastasen zu bilden lag bei der untersuchten SKOV3 Ovarialkarzinomzelllinie folglich höher als die für den Menschen angenommenen Wahrscheinlichkeit Lungenmetastasen zu bilden. Möglicherweise kann die höhere Lungenmetastasenrate aber auch die fehlende Immunkompetenz der SCID-Mäuse bedingt sein. Beim Endpunktversuch konnte beobachtet werden, dass die Anzahl der Lungenmetastasen in der Kontrollgruppe signifikant höher lag als die in der shITGB4-Gruppe. Die ITGB4-depletierten Zellen brauchen folglich länger, um sich in der Lunge etablieren zu können. Es konnte nun vermutet werden, dass von den shITGB4-KD-Zellen diejenigen mit einer restlichen ITGB4-Expression Metastasen in der Lunge bilden konnten. Diese Vermutung aber wurde durch eine immunhistologische ITGB4-Färbung der Lungenmetastasen widerlegt: Der shITGB4-KD blieb in den Lungenmetastasen stabil. Dieser Umstand lässt vermuten, dass der Verlust an ITGB4 allein nicht für die hämatogene Metastasierung in die Lunge verantwortlich ist.

Die spontane hämatogene Metastasierung ist bereits an Xenograftmodellen für s.c. injizierte Primärtumoren gezeigt worden (Kohler et al., 2010; Lange et al., 2014; Schwankhaus et al., 2014). Daher muss davon ausgegangen werden, dass in dem beschriebenen Modell eine hämatogene Metastasierung von den s.c. Einstichtumoren ausgehen kann. Hierzu wäre eine Anbindung an das Gefäßsystem durch Angiogenese oder starke Infiltration des Bindegewebes erforderlich. Da auch bei Abwesenheit von Einstichtumoren eine Metastasierung in die Lunge beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass die i.p. Karzinose selbst einen großen Anteil zu der hämatogenen Metastasierung beiträgt.

### **4.3 Interpretation der Transkriptomanalysen**

Durch die Depletion von ITGB4 auf den SKOV3-Ovarialkarzinomzellen konnte ein Rückgang der i.p. Karzinose und Lungenmetastasierung im Xenograftmodell beschrieben werden. Ob diese

Beobachtungen allein auf die Reduktion der ITGB4-Expression zurückzuführen sind oder Expressionen weiterer Gene durch die ITGB4-Depletion beeinflusst werden, wurde anhand einer Transkriptomanalyse auf RNA-Ebene untersucht. Im Abschnitt 3 „Ergebnisse“ ist eine Auflistung der 30 am stärksten regulierten Gene aufgeführt, von denen einige im Folgenden näher beschrieben werden. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Transkriptomanalysen zwar die Unterschiede der Kontroll- und shITGB4-Tumoren auf RNA-Ebene widerspiegeln, funktionell wirksam sind allerdings Proteine. Daher ist eine Validierung der Ergebnisse auf Proteinebene notwendig. Ist der Genexpressionsunterschied auf Proteinebene nicht nachweisbar, liegen möglicherweise zusätzlich Translationsunterschiede zwischen den Kontroll- und shITGB4-KD-Zellen vor, so dass der Genexpressionsunterschied auf Proteinebene ausgeglichen wird.

#### **4.3.1 Integrin $\beta$ 4**

Zunächst konnte die Stabilität des shITGB4-KD in den Tumoren durch die Transkriptomanalysen bestätigt werden (Faktor -4,80). Durch die stabile Transfektion von ITGB4-shRNA in den shITGB4-KD-Zellen wird die ITGB4-mRNA abgebaut und ist daher im Vergleich zu dem Material aus den Kontrolltumoren in geringerem Maß vorhanden. Eine Validierung erfolgte an Tumormaterial durch einen Western Blot (Ergebnisse Abb. 26).

#### **4.3.2 Dickkopf-1**

Die Genexpression von Dickkopf-1 (DKK1) ist in den ITGB4-depletierten Tumoren im Vergleich zu der in den Kontrolltumoren um den Faktor -4,42 verringert. Dieses Ergebnis konnte durch immunhistologische Färbungen *ex vivo* validiert werden. Dabei wurden diejenigen Tumoren immunhistologisch gefärbt, die auch zur Transkriptomanalyse verwendet wurden. Es ist darauf hinzuweisen, dass nach den Färbungen in einem Fall aus der shITGB4-Gruppe keine DKK1-Expression nachgewiesen werden konnte, während alle anderen Fälle eine homogene DKK1-Expression zeigten. Die Tumoren der Kontrollgruppe wiesen einen vergleichsweise höheren Anteil an stark DKK1-positiven Zellen auf. Möglicherweise stellt der Tumor ohne DKK1-Expression eine Ausnahme dar, und der Unterschied der DKK1-Expression aus den Transkriptom-Analysen zwischen den Gruppen muss als geringer angesehen werden.

Bei DKK1 (*Dickkopf-1*) handelt es sich um ein sekretiertes Protein, das inhibitorisch auf den kanonischen,  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg wirkt (Glinka et al., 1998). Über den kanonischen Wnt-Signalweg wird  $\beta$ -Catenin positiv reguliert, dieses wirkt im Kern als Transkriptionsfaktor für Cyclin D1 (Tetsu und McCormick, 1999). Bezogen auf den kanonischen Wnt-Signalweg würde eine erhöhte Expression von DKK1 mit einer geringeren Proliferationsrate einhergehen und wurde daher zunächst als Tumorsuppressor angesehen (Gonzalez-Sancho et al., 2005; Qiao et al., 2008). In zahlreichen klinischen Studien an verschiedenen Tumorentitäten konnte allerdings eine erhöhte DKK1-Expression bzw. ein erhöhter DKK1-Serumspiegel mit einer schlechteren Prognose und einem verkürzten Gesamtüberleben korreliert werden (Han et al., 2015; Rachner et al., 2014; Wang und Zhang, 2011). Damit sprechen die klinischen Beobachtungen gegen die alleinige Funktion des DKK1 als Tumorsuppressor. In verschiedenen experimentellen Untersuchungen konnte sogar die Tumor-fördernde Eigenschaft des DKK1 bestätigt werden (Gregory et al., 2003; Li et al., 2011). Neuere Studien bestätigen bereits alternative, Wnt-unabhängige Signalwege für das DKK1 (Kimura et al., 2016; Tao et al., 2013). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die proliferativen und migratorischen Eigenschaften der shITGB4-KD-Zellen im Vergleich zu denen der Kontrollzellen verringert sind, muss davon ausgegangen werden, dass DKK1 in dem beschriebenen Modell andere Signalwege als den kanonischen Wnt-Signalweg beeinflusst.

#### **4.3.3 Annexin A13**

Die Regulationsunterschiede des Annexin A13 (ANXA13) zwischen den shITGB4- und Kontrolltumoren sind eher gering. Im Transkriptom-Array wurden 5,8-mal höhere ANXA13 Expressionen in den shITGB4-Tumoren im Vergleich zu denen in Kontrolltumoren ermittelt. ANXA13 gehört zu den sezernierten Proteinen und kann bei Anwesenheit von Kalzium Bindungen zu Glykolipiden in der Zellmembran eingehen (Turnay et al., 2005). Annexine sind in der Lage Ionen-Kanäle in der Zellmembran auszubilden (Rojas et al., 1992). Studien am kolorektalen Karzinom zeigen, dass eine erhöhte ANXA13-Expression mit der Bildung von Lymphknotenmetastasen und einem schlechteren Überleben korreliert (Jiang et al., 2017). Es könnte daher angenommen werden, dass die shITGB4-KD-Zellen versuchen, ANXA13 vermehrt zu produzieren, um den Wachstumsnachteil durch fehlendes ITGB4 zu kompensieren. Allerdings

konnte eine unterschiedliche ANXA13 Regulation zwischen Kontroll- und shITGB4-Tumoren auf Proteinebene nicht dargestellt werden (Ergebnisse Abb. 35).

#### **4.3.4 transforming growth factor, beta induced**

Weitere Daten des Transkriptom-Arrays weisen darauf hin, dass TGFBI (*transforming growth factor, beta-induced, 68kDa*) in den ITGB4-depletierten Zellen um den Faktor 7,17 geringer exprimiert wird. Bei dem TGFBI handelt es sich um ein Protein, das von Zellen sezerniert wird und über RGD-Sequenzen Bindungen zu Kollagen und weiteren Vertretern der extrazellulären Matrix eingehen kann. Folglich würde es wichtige Bindungsstellen der Integrine besetzen und ein Adhären von Zellen an die extrazelluläre Matrix verhindern. Die Fähigkeit von CHO-Zellen (*Chinese hamster ovary*) in Nacktmäusen Tumoren hervorzurufen, konnte durch die Expression von TGFBI vermindert werden (Skonier et al., 1994). Es ist daher nicht verwunderlich, dass laut Transkriptom-Array-Daten die ITGB4-depletierten Zellen weniger TGFBI produzieren als die Kontrollzellen, um die Blockierung möglicher Integrinbindungsstellen zu reduzieren.

#### **4.3.5 Cadherin-K**

Die Hochregulierung des Zelladhäsionsmoleküls Cadherin-K (CDH6) in den shITGB4-Tumoren um den Faktor 8,9 kann als eine Kompensation des ITGB4-Verlustes angesehen werden. CDH6 vermittelt homophile Zell-Zell-Kontakte (Shimoyama et al., 1995) und besitzt eine RGD-Binde-Domäne (Dunne et al., 2012), die auch bei einer Gruppe von Integrinen vorkommt (Hynes, 2002). Der Tumorfördernde Effekt des CDH6 konnte bereits durch den Einsatz von blockierenden Antikörpern bei Ovarialkarzinomen im PDX-Modell (*patient derived xenograft*) gezeigt werden (Bialucha et al., 2017), die ihrerseits ein Tumorwachstum verminderten. Wie bereits erwähnt korreliert eine unterschiedliche Genregulation auf mRNA Ebene nicht unbedingt mit einer Veränderung in der Proteinexpression. Eine höhere Genexpression von CDH6 bei shITGB4-Tumoren konnte in diesem Fall durch Western-Blot-Analysen nicht bestätigt werden (Ergebnisse, Abb. 35) und ist daher in der Auswirkung nicht von Bedeutung.

#### **4.3.6 Tyrosin-Proteinphosphatase des C-Rezeptor-Typs**

Die Genexpression der Tyrosin-Proteinphosphatase des C-Rezeptor-Typs (PTPRC) ist in den Tumoren niedriger ITGB4-Expression um den Faktor 33,71 erhöht. Die PTPRC entspricht dem

CD45-Antigen, das allgemein als Leukozytenmarker gebräuchlich ist. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass eine Hochregulierung von PTPRC bei Ovarialkarzinomzellen beobachtet werden konnte, die sich nach einer Cisplatinbehandlung wieder etablieren konnten (Ricci et al., 2017). Dass die ITGB4-depletierten Zellen gerade die Expression von PTPRC hochregulieren, könnte auch mit der Signalfunktion der zytoplasmatischen Domäne zusammenhängen. Das ITGB4 besitzt im zytoplasmatischen Bereich einen Tyrosinrest (Y1494), der eine SH2-Bindungsdomäne (*Src-homology2*) darstellt. An diese Bindungsdomäne können Tyrosinphosphatasen wie SHP-2 gebunden werden, die wiederum die Aktivierung von Src auslösen (Merdek et al., 2007). Auch PTPRC (CD45) kann Src aktivieren (Ashwell und D'Oro, 1999). Über die Aktivierung von Src können zum Beispiel Vorgänge wie Zellwachstum und Zelladhäsionen reguliert werden (Frame, 2002). Der Verlust der Src-Aktivierung über ITGB4 könnte also von den shITGB4-KD-Zellen durch die Expression von PTPRC kompensiert werden.

#### **4.3.7 Chemokine**

Auffällig sind die Transkriptom-Ergebnisse, die ein stark erhöhtes Vorkommen an den Chemokinen CCL2 und CCL20 in den shITGB4-Tumoren zeigen (CCL20 250-fach, CCL2 28-fach). Chemokine gehören zu der Gruppe der Zytokine, die die Wanderung von Zellen (Chemotaxis) vermitteln (Pan et al., 1997). Chemokine vermitteln in membrangebundener Form die Bindung von Leukozyten an das Endothel, in löslicher Form ermöglichen sie die transendotheliale Migration der Leukozyten (Patel et al., 2001).

##### **4.3.7.1 CCL2**

CCL2, auch als MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) bezeichnet, wird unter anderem von Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen und Monozyten produziert. Durch CCL2 wird das migratorische Verhalten von Monozyten, NK-Zellen und T-Lymphozyten reguliert (Deshmane et al., 2009). CCL2 wird über die CCR2- und CCR4-Rezeptoren gebunden. Bindungspartner stellen daher die CCR4-Rezeptor-tragenden zytotoxischen T-Zellen dar. In einem migratorischen Versuchsansatz mit CCL2-produzierenden Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass zytotoxische T-Zellen in die Tumorzellbereiche gelangen, dies geht mit einem Zelluntergang der Tumorzellen einher (Zhang et al., 2006). Andere Studien aber zeigten, dass aus dem Anlocken von regulativen T-Zellen über CCL2 die Suppression der zytotoxischen T-Zellen resultiert und

damit das Tumorwachstum gefördert wird (Nishikawa und Sakaguchi, 2010). Da gezeigt werden konnte, dass die hämatogene Metastasierung der Tumorzellen von der CCL2-Anwesenheit profitiert, wurden verschiedene CCL2-Inhibitoren für die Behandlung entwickelt (Lim et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde die Tumorausbreitung von Ovarialkarzinomzellen am Modell von immundefizienten Mäusen untersucht. Der Einfluss des CCL2 ist daher in einem T- und B-Zell-unabhängigen Kontext zu betrachten. Die Einwanderung von Makrophagen in das Tumorgewebe, wie es in immundefizienten Mäusen möglich ist, wird stets als Tumor-fördernder Aspekt angesehen (Pollard, 2004). Als Beispiel soll hier eine Studie erwähnt werden, in der die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 in immundefizienten SCID-Mäusen untersucht wurde. Durch die Gabe von CCL2-inhibierenden Antikörpern konnte im Xenograftmodell eine geringere Infiltration von Makrophagen im Tumorgewebe und parallel eine Reduktion der Tumormasse beobachtet werden (Fujimoto et al., 2009). Somit spräche die erhöhte Regulation von CCL2 in den shITGB4-Tumoren für einen kompensatorischen Mechanismus, der die Etablierung der Tumorzellen, nach erschwerter Adhäsion durch den ITGB4-Verlust, unterstützt.

#### **4.3.7.2 CCL20**

Das Chemokin CCL20 wird vorwiegend von Tumor-assoziierten Makrophagen sezerniert und lockt Zellen mit CCR6-Rezeptor wie regulative T-Zellen an (Liu et al., 2011). An humanen hepatozellulären Karzinomen konnte die CCL20-Expression von Tumorzellen mit dem Vorkommen regulativer T-Zellen und einer schlechteren Überlebensprognose bereits assoziiert werden (Chen et al., 2011). Unabhängig von der Immunkompetenz konnte die Produktion von CCL20 *in vitro* auch in Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231) beobachtet werden. In immundefizienten Nacktmäusen konnte nach Gabe von Anti-CCL20-Antikörpern die Bildung von Knochenmetastasen nach intrakardialer Injektion von MDA-MB-231-Zellen verringert werden (Lee et al., 2017). Demnach ist der erhöhte CCL20-Expressions-Level in den untersuchten ITGB4-depletierten Zellen als möglicher kompensatorischer Mechanismus anzusehen.

Durch ELISAs konnte in den shITGB4-KD-Zellen eine höhere Konzentration an CCL2 und CCL20 nachgewiesen werden und somit die Transkriptom-Array Daten bestätigt werden (Ergebnisse Abb. 36).

#### **4.4 Patientenkollektiv**

Das vorliegende Ovarialkarzinom-Patientenkollektiv umfasst 252 Fälle an primären Ovarialkarzinomen, Rezidiven, Borderline- und benignen Tumoren. Die benignen und die Borderline-Tumoren sind nicht bis gering invasiv und haben daher bessere Prognosen als die primären Ovarialkarzinome (Prat, 2017). In den Fällen der Rezidive können sich Tumorzellklone etabliert haben, die Resistenzmechanismen entwickeln, sie stellen damit ein anderes Bild als die Primärtumoren dar. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit nur die primären Ovarialkarzinome (n = 219) des Patientenkollektivs betrachtet.

Anhand von Western-Blot-Analysen wurde die ITGB4-Expression des humanen Tumormaterials bestimmt. Zur Unterscheidung zwischen hoher und geringer ITGB4-Expression wurden zwei Gruppen gebildet. Der cut-off wurde nach dem 3. Quartil gesetzt, so dass die Gruppe mit geringer ITGB4-Expression 75 % (n = 165) und die Gruppe mit hoher ITGB4-Expression 25 % (n = 54) der Fälle ausmachte. Da bei den einzelnen Parametern Grading, FIGO-Stadium, Lymphknotenbefall, Fernmetastasen, Histologie und OP-Ergebnis keine signifikanten Abweichungen festgestellt werden konnte, wurden verschiedene Untergruppen betrachtet und miteinander kombiniert. Dabei zeigte sich, dass die ITGB4-Expression in der Gruppe der tumorfrei operierten Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom mit einer signifikant kürzeren Überlebensdauer assoziiert ist. Dies verdeutlicht, dass nicht alle histologischen Subgruppen durch die gleichen Parameter beeinflusst werden. Es ist zu erwähnen, dass für die unterschiedlichen histologischen Subtypen beim Ovarialkarzinom bereits unterschiedliche Entstehungsorte beschrieben wurden. Für den serösen Typ kommen die Fimbrientrichter, für den muzinösen Typ das Kolon in Betracht (Folkins et al., 2008; Khunamornpong et al., 2006). In Kombination mit den makroskopisch tumorfrei operierten Fällen wird deutlich, dass das ITGB4 eine Rolle in der frühen Phase des Ovarialkarzinoms spielt, bei fortgeschrittenen, nicht operablen Stadien aber keinen Einfluss mehr hat. Der gezielte Einsatz von möglichen Therapeutika gegen ITGB4 wäre somit nur für eine bestimmte Patientengruppe von Belang.

Bei einer systemischen Verabreichung von Therapeutika könnte es zu erheblichen Nebenwirkungen kommen, wenn man bedenkt, dass das ITGB4 eine sehr wichtige Rolle bei der Zellverankerung durch Hemidesmosomen spielt (Nievers et al., 1999). Eine lokal angewendete

Therapie hingegen würde hier voraussichtlich zu einem effektiveren Ergebnis führen. Die lokale Anwendung von Chemotherapeutika beim Ovarialkarzinom im Rahmen einer Ausspülung des Peritonealraums im Anschluss an die *Debulking*-OP wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht (Ryu et al., 2004; Tentes et al., 2012; Yoshida et al., 2005). Da in vielen dieser Studien nur kleine oder sehr heterogene Kollektive bis Phase-II-Studien betrachtet wurden, wird in den S3-Leitlinien von einem intraperitonealen Chemotherapeutika-Einsatz außerhalb von kontrollierten Studien abgeraten (S3-Leitlinie). Eine aktuell veröffentlichte Phase-III-Studie mit einem Kollektiv von 245 Patientinnen zeigt eine Verlängerung der Rezidiv-freien Zeit von 10,7 auf 14,2 Monate und des Gesamtüberlebens von 33,9 auf 45,7 Monate nach einer zusätzlichen Behandlung mit einer hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC) (van Driel et al., 2018). Diese Ergebnisse wecken die Hoffnung, dass Therapeutika wie ITGB4-Inhibitoren auch lokal beim Ovarialkarzinom zum Einsatz kommen können. Dafür müsste ein Testverfahren entwickelt werden, mittels dessen das OP-Material in einem Schnelltest auf die ITGB4-Expression untersucht werden kann, da die bislang üblichen Nachweismethoden auf Proteinebene wie immunhistologische Färbung und Western Blot zu zeitaufwendig sind. Allerdings sollte die lokale Behandlung ITGB4-negativer Tumoren vermieden werden, da das Verfahren bis zu 2 Stunden längere OP-Zeiten bedingt (Grimmig et al., 2017; Kajdi et al., 2014) und nicht effektiv wäre. Ebenso sollte eine zweite OP von Patientinnen mit ITGB4-positiven Tumoren vermieden werden, da ein Ansiedeln der Tumorzellen an die OP-Wunde sehr wahrscheinlich ist (Kindermann et al., 1995).

## 5 Zusammenfassung/Summary

### 5.1 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom zählt mit einer 5-Jahresüberlebensrate unter 41 % zu den gynäkologischen Krebserkrankungen schlechtester Prognose. Wobei die intraperitoneale Metastasierung im Vordergrund der Ovarialkarzinomerkrankung steht. Um neue Therapieansätze zu ermöglichen, ist es daher notwendig, die maligne Progression des Ovarialkarzinoms genauer zu verstehen. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Adhäsionseigenschaften der Ovarialkarzinomzellen gelegt, da die Adhäsion einen entscheidenden Schritt bei der Etablierung von Metastasen darstellt. Es konnte dargestellt werden, dass das Zusammenspiel der an der Leukozytenadhäsionskaskade beteiligten Moleküle wie Selektine und Integrine entscheidend für die intraperitoneale Tumorausbreitung der serösen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3 im Xenograftmodell ist. Es wurden gezielt E- und P-Selektine betrachtet, da diese auf Endothel und Mesothel exprimiert werden. Bei den Integrinen wurde das Integrin- $\beta$ 4 (ITGB4) gewählt, da die erhöhte Expression von ITGB4 auf Prostata- und Pankreaskarzinome bereits mit einer schlechteren Prognose beschrieben werden konnte. Durch die Kombination von E- und P-Selektin-Defizienz auf den Tieren und einer ITGB4-Depletion der intraperitoneal injizierten SKOV3-Ovarialkarzinomzellen konnte ein deutlich verlängertes Überleben von 181 Tagen im Vergleich zu den Selektin kompetenten Tieren mit Injektion derselben Zellen beobachtet werden (129 Tage). In 2 von 8 Tieren ließ sich nach 220 Tagen kein Tumorwachstum nachweisen, was die Wichtigkeit des Zusammenspiels von ITGB4 und E- und P-Selektin unterstreicht. Durch *in vitro* Versuche konnte dargestellt werden, dass die ITGB4-depletierten SKOV3 Zellen kleinere Kolonien ausbilden und eine geringere Migrationsrate besitzen. Diese Ergebnisse werden durch das Xenograftmodell widerspiegelt. Transkriptomanalysen wiesen auf kompensatorische Mechanismen der ITGB4-depletierten Tumoren durch erhöhte Chemokin-Expression (CCL2 und CCL20) hin. Analysen eines humanen Ovarialkarzinom-Patientenkollektivs zeigten ebenfalls ein Überlebensvorteil bei geringer ITGB4-Expression in der Patientinnen-Gruppe mit makroskopisch tumorfrei operierten serösen Ovarialkarzinomen. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass das Integrin  $\beta$ 4 eine entscheidende Rolle bei den serösen Ovarialkarzinomen hat und als möglicher Ansatz zur Entwicklung neuer Therapeutika genutzt werden kann.

## 5.2 Summary

In Germany, ovarian cancer is the second most common cause of death in women with gynecologic malignancies. The 5-year survival rate is about 41 %. The early intraperitoneal metastasis comes to the fore in ovarian cancer diseases. Therefore, it is of major importance to research this tumor entity for better understanding the underlying processes and to identify possible therapeutic targets. This thesis focuses on the adhesion properties of ovarian cancer cells, as adhesion is a crucial step during the formation of intraperitoneal metastases. It could be shown that the interaction of molecules present in the leukocyte adhesion cascade like selectins and integrins are crucial for the intraperitoneal tumor spreading of the SKOV3 ovarian cancer cell line in the described xenograft model as well. The focus was on E- and P- selectins, because they are expressed by endothelial and mesothelial tissues. In case of the integrins ITGB4 was chosen, because high expression of ITGB4 in prostate and pancreatic cancer was described with worse prognosis earlier. By combination of E- and P-selectin deficiency in mice and the ITGB4 depletion of intraperitoneal injected SKOV3 ovarian cancer cells a clear prolonged overall survival could be shown (181 days) in comparison to the selectin competent mice injected with the ITGB4 depleted SKOV3 cells (129 days). After 220 days 2 mice of 8 did not show any tumor progression, this stresses the importance of the interaction of ITGB4 and E- and P-selectins. *In vitro* experiments showed smaller colony formation under different conditions and slower migration rates of the ITGB4 depleted cells. These results reflected the *in vivo* xenograft analyses. Transcription-arrays showed compensative mechanisms of the ITGB4 depleted cells by upregulation of chemokines (CCL2 and CCL20). Analysis of a human patient collective with ovarian cancer also indicates a longer survival in patients with low tumoral ITGB4 expression in the group of patients with serous ovarian cancer and surgery done with no macroscopic tumor remaining. These results stress the key role of ITGB4 in the establishment of serous ovarian cancer and ITGB4 is proposed to be a feasible target for development of novel therapeutic strategies.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abubaker K., Latifi A., Luwor R., Nazaretian S., Zhu H., Quinn M. A., Thompson E. W., Findlay J. K., Ahmed N. (2013) Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden. *Mol Cancer* **12**, 24
- Affymetrix® Expression Console™ Software 1.4 User Manual (2014)  
[http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression\\_console\\_userguide.pdf](http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_console_userguide.pdf)  
[abgerufen am 18.04.2018]
- Ahmed N., Thompson E. W., Quinn M. A. (2007) Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *Journal of cellular physiology* **213**(3), 581-588
- Ashwell J. D., D'Oro U. (1999) CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different. *Immunology today* **20**(9), 412-416
- Banyard J., Chung I., Migliozi M., Phan D. T., Wilson A. M., Zetter B. R., Bielenberg D. R. (2014) Identification of genes regulating migration and invasion using a new model of metastatic prostate cancer. *BMC cancer* **14**, 387
- Barthel S. R., Hays D. L., Yazawa E. M., Opperman M., Walley K. C., Nimrichter L., Burdick M. M., Gillard B. M., Moser M. T., Pantel K., Foster B. A., Pienta K. J., Dimitroff C. J. (2013) Definition of molecular determinants of prostate cancer cell bone extravasation. *Cancer research* **73**(2), 942-952
- Bertelsen K. (1990) Tumor reduction surgery and long-term survival in advanced ovarian cancer: a DACOVA study. *Gynecologic oncology* **38**(2), 203-209
- Bevilacqua M. P., Pober J. S., Mendrick D. L., Cotran R. S., Gimbrone M. A., Jr. (1987) Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**(24), 9238-9242
- Bialucha C. U., Collins S. D., Li X., Saxena P., Zhang X., Durr C., Lafont B., Prieur P., Shim Y., Mosher R., Lee D., Ostrom L., Hu T., Bilic S., Rajlic I. L., Capka V., Jiang W., Wagner J. P., Elliott G., Veloso A., Piel J. C., Flaherty M. M., Mansfield K. G., Meseck E. K., Rubic-Schneider T., London A. S., Tschantz W. R., Kurz M., Nguyen D., Bourret A., Meyer M. J., Faris J. E., Janatpour M. J., Chan V. W., Yoder N. C., Catcott K. C., McShea M. A., Sun X., Gao H., Williams J., Hofmann F., Engelman J. A., Ettenberg S. A., Sellers W. R., Lees E. (2017) Discovery and Optimization of HKT288, a Cadherin-6-Targeting ADC for the Treatment of Ovarian and Renal Cancers. *Cancer discovery* **7**(9), 1030-1045
- Birbeck M. S., Wheatley D. N. (1965) An Electron Microscopic Study of the Invasion of Ascites Tumor Cells into the Abdominal Wall. *Cancer research* **25**, 490-497

- Bosma G. C., Custer R. P., Bosma M. J. (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**(5900), 527-530
- Bristow R. E., Tomacruz R. S., Armstrong D. K., Trimble E. L., Montz F. J. (2002) Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**(5), 1248-1259
- Burleson K. M., Casey R. C., Skubitz K. M., Pambuccian S. E., Oegema T. R., Jr., Skubitz A. P. (2004) Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecologic oncology* **93**(1), 170-181
- Cancer Genome Atlas Research N. (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**(7353), 609-615
- Chang S. F., Chang C. A., Lee D. Y., Lee P. L., Yeh Y. M., Yeh C. R., Cheng C. K., Chien S., Chiu J. J. (2008) Tumor cell cycle arrest induced by shear stress: Roles of integrins and Smad. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(10), 3927-3932
- Chen K. J., Lin S. Z., Zhou L., Xie H. Y., Zhou W. H., Taki-Eldin A., Zheng S. S. (2011) Selective recruitment of regulatory T cell through CCR6-CCL20 in hepatocellular carcinoma fosters tumor progression and predicts poor prognosis. *PLoS one* **6**(9), e24671
- Chiapparino F., Parazzini F., Decarli A., Franceschi S., Talamini R., Montella M., La Vecchia C. (2005) Hysterectomy with or without unilateral oophorectomy and risk of ovarian cancer. *Gynecologic oncology* **97**(2), 318-322
- Cho H., Cho C. S., Indig G. L., Lavasanifar A., Vakili M. R., Kwon G. S. (2014) Polymeric micelles for apoptosis-targeted optical imaging of cancer and intraoperative surgical guidance. *PLoS one* **9**(2), e89968
- Choi Y. P., Kim B. G., Gao M. Q., Kang S., Cho N. H. (2012) Targeting ILK and beta4 integrin abrogates the invasive potential of ovarian cancer. *Biochemical and biophysical research communications* **427**(3), 642-648
- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian C., Beral V., Gaitskell K., Hermon C., Moser K., Reeves G., Peto R. (2012) Ovarian cancer and smoking: individual participant meta-analysis including 28,114 women with ovarian cancer from 51 epidemiological studies. *The Lancet Oncology* **13**(9), 946-956

- Colombo N., Guthrie D., Chiari S., Parmar M., Qian W., Swart A. M., Torri V., Williams C., Lissoni A., Bonazzi C., International Collaborative Ovarian Neoplasm c. (2003) International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1: a randomized trial of adjuvant chemotherapy in women with early-stage ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **95**(2), 125-132
- Cortan R. S., Karnovsky M. J., Ultrastructural studies on the permeability of the mesothelium to horseradish peroxidase. (1968). *Journal of Cell Biology* **37**(1), 123-137
- Cummings R. D., McEver R. P. (2009) C-type Lectins. In *Essentials of Glycobiology*, nd, Varki A., Cummings R. D., Esko J. D., Freeze H. H., Stanley P., Bertozzi C. R., Hart G. W., Etzler M. E. (eds). Cold Spring Harbor (NY)
- Custer R. P., Bosma G. C., Bosma M. J. (1985) Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. *The American journal of pathology* **120**(3), 464-477
- Deshmane S. L., Kremlev S., Amini S., Sawaya B. E. (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **29**(6), 313-326
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (2016) Leitlinienprogramm Onkologie. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Ovarialkarzinom.61.0.html> [abgerufen am 29.03.2018]
- Doubeni C. A., Doubeni A. R., Myers A. E. (2016) Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *American family physician* **93**(11), 937-944
- Dunne E., Spring C. M., Reheman A., Jin W., Berndt M. C., Newman D. K., Newman P. J., Ni H., Kenny D. (2012) Cadherin 6 has a functional role in platelet aggregation and thrombus formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**(7), 1724-1731
- Eva A., Robbins K. C., Andersen P. R., Srinivasan A., Tronick S. R., Reddy E. P., Ellmore N. W., Galen A. T., Lautenberger J. A., Papas T. S., Westin E. H., Wong-Staal F., Gallo R. C., Aaronson S. A. (1982) Cellular genes analogous to retroviral onc genes are transcribed in human tumour cells. *Nature* **295**(5845), 116-119
- Faryammanesh R., Lange T., Magbanua E., Haas S., Meyer C., Wicklein D., Schumacher U., Hahn U. (2014) SDA, a DNA aptamer inhibiting E- and P-selectin mediated adhesion of cancer and leukemia cells, the first and pivotal step in transendothelial migration during metastasis formation. *PLoS one* **9**(4), e93173
- Fathalla M. F. (1971) Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* **2**(7716), 163

- Fidler I. J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews Cancer* **3**(6), 453-458
- Fogh J., Fogh J. M., Orfeo T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* **59**(1), 221-226
- Folkins A. K., Jarboe E. A., Saleemuddin A., Lee Y., Callahan M. J., Drapkin R., Garber J. E., Muto M. G., Tworoger S., Crum C. P. (2008) A candidate precursor to pelvic serous cancer (p53 signature) and its prevalence in ovaries and fallopian tubes from women with BRCA mutations. *Gynecologic oncology* **109**(2), 168-173
- Frame M. C. (2002) Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochimica et biophysica acta* **1602**(2), 114-130
- Frenette P. S., Mayadas T. N., Rayburn H., Hynes R. O., Wagner D. D. (1996) Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* **84**(4), 563-574
- Frisch S. M., Francis H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology* **124**(4), 619-626
- Fujimoto H., Sangai T., Ishii G., Ikehara A., Nagashima T., Miyazaki M., Ochiai A. (2009) Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. *International journal of cancer* **125**(6), 1276-1284
- Gebauer F., Wicklein D., Stubke K., Nehmann N., Schmidt A., Salamon J., Peldschus K., Nentwich M. F., Adam G., Tolstonog G., Bockhorn M., Izbicki J. R., Wagener C., Schumacher U. (2013) Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp<sup>-/-</sup>/rag2<sup>-/-</sup> mice. *Gut* **62**(5), 741-750
- Glinka A., Wu W., Delius H., Monaghan A. P., Blumenstock C., Niehrs C. (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**(6665), 357-362
- Gonzalez-Sancho J. M., Aguilera O., Garcia J. M., Pendas-Franco N., Pena C., Cal S., Garcia de Herreros A., Bonilla F., Munoz A. (2005) The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* **24**(6), 1098-1103
- Green A., Purdie D., Bain C., Siskind V., Russell P., Quinn M., Ward B. (1997) Tubal sterilisation, hysterectomy and decreased risk of ovarian cancer. Survey of Women's Health Study Group. *International journal of cancer* **71**(6), 948-951

- Gregory C. A., Singh H., Perry A. S., Prockop D. J. (2003) The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *The Journal of biological chemistry* **278**(30), 28067-28078
- Griffiths C. T. (1975) Surgical resection of tumor bulk in the primary treatment of ovarian carcinoma. *National Cancer Institute monograph* **42**, 101-104
- Grimmig T., Moll E. M., Kloos K., Thumm R., Moench R., Callies S., Kreckel J., Vetterlein M., Pelz J., Polat B., Tripathi S., Rehder R., Ribas C. M., Chandraker A., Germer C. T., Waaga-Gasser A. M., Gasser M. (2017) Upregulated Heat Shock Proteins After Hyperthermic Chemotherapy Point to Induced Cell Survival Mechanisms in Affected Tumor Cells From Peritoneal Carcinomatosis. *Cancer growth and metastasis* **10**, 1179064417730559
- Gwinn M. L., Lee N. C., Rhodes P. H., Layde P. M., Rubin G. L. (1990) Pregnancy, breast feeding, and oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. *Journal of clinical epidemiology* **43**(6), 559-568
- Hacker N. F. (1989) Controversial aspects of cytoreductive surgery in epithelial ovarian cancer. *Bailliere's clinical obstetrics and gynaecology* **3**(1), 49-57
- Hagerling C., Casbon A. J., Werb Z. (2015) Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends in cell biology* **25**(4), 214-220
- Hamilton T. C., Young R. C., McKoy W. M., Grotzinger K. R., Green J. A., Chu E. W., Whang-Peng J., Rogan A. M., Green W. R., Ozols R. F. (1983) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer research* **43**(11), 5379-5389
- Han S. X., Zhou X., Sui X., He C. C., Cai M. J., Ma J. L., Zhang Y. Y., Zhou C. Y., Ma C. X., Varela-Ramirez A., Zhu Q. (2015) Serum dickkopf-1 is a novel serological biomarker for the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Oncotarget* **6**(23), 19907-19917
- Hansen M., Met O., Larsen N. B., Rosenkilde M. M., Andersen M. H., Svane I. M., Hjorto G. M. (2016) Autocrine CCL19 blocks dendritic cell migration toward weak gradients of CCL21. *Cytotherapy* **18**(9), 1187-1196
- Henderson J. T., Webber E. M., Sawaya G. F. (2018) Screening for Ovarian Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *Jama* **319**(6), 595-606

- Hogervorst F., Kuikman I., von dem Borne A. E., Sonnenberg A. (1990) Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *The EMBO journal* **9**(3), 765-770
- Huang P., Westmoreland S. V., Jain R. K., Fukumura D. (2011) Spontaneous nonthymic tumors in SCID mice. *Comparative medicine* **61**(3), 227-234
- Humphries J. D., Byron A., Humphries M. J. (2006) Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science* **119**(Pt 19), 3901-3903
- Hynes R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**(6), 673-687
- Irizarry R. A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y. D., Antonellis K. J., Scherf U., Speed T. P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**(2), 249-264
- Jänicke F. (2004) Operative Therapie des Ovarialkarzinoms. *Gynäkologe* **37**, 916–928
- Jeon J. S., Bersini S., Gilardi M., Dubini G., Charest J. L., Moretti M., Kamm R. D. (2015) Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**(1), 214-219
- Jiang G., Wang P., Wang W., Li W., Dai L., Chen K. (2017) Annexin A13 promotes tumor cell invasion in vitro and is associated with metastasis in human colorectal cancer. *Oncotarget* **8**(13), 21663-21673
- Jojovic M., Schumacher U. (2000) Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into SCID mice. *Cancer letters* **152**(2), 151-156
- Jolly M. K., Boareto M., Huang B., Jia D., Lu M., Ben-Jacob E., Onuchic J. N., Levine H. (2015) Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Frontiers in oncology* **5**, 155
- Joyce J. A., Pollard J. W. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews Cancer* **9**(4), 239-252
- Kajdi M. E., Beck-Schimmer B., Held U., Kofmehl R., Lehmann K., Ganter M. T. (2014) Anaesthesia in patients undergoing cytoreductive surgery with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: retrospective analysis of a single centre three-year experience. *World journal of surgical oncology* **12**, 136

- Kannagi R., Ohmori K., Kimura N. (2009) Anti-oligosaccharide antibodies as tools for studying sulfated sialoglycoconjugate ligands for siglecs and selectins. *Glycoconjugate journal* **26**(8), 923-928
- Keelan E. T., Licence S. T., Peters A. M., Binns R. M., Haskard D. O. (1994) Characterization of E-selectin expression in vivo with use of a radiolabeled monoclonal antibody. *The American journal of physiology* **266**(1 Pt 2), H278-290
- Khunamornpong S., Suprasert P., Pojchamarnwiputh S., Na Chiangmai W., Settakorn J., Siriaunkgul S. (2006) Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas of the ovary: Evaluation of the diagnostic approach using tumor size and laterality. *Gynecologic oncology* **101**(1), 152-157
- Kimura H., Fumoto K., Shojima K., Nojima S., Osugi Y., Tomihara H., Eguchi H., Shintani Y., Endo H., Inoue M., Doki Y., Okumura M., Morii E., Kikuchi A. (2016) CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and is involved in tumor progression. *The Journal of clinical investigation* **126**(7), 2689-2705
- Kindermann G., Maassen V., Kuhn W. (1995) [Laparoscopic preliminary surgery of ovarian malignancies. Experiences from 127 German gynecologic clinics]. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **55**(12), 687-694
- Kishikawa T., Sakamoto M., Ino Y., Kubushiro K., Nozawa S., Hirohashi S. (1995) Two distinct patterns of peritoneal involvement shown by in vitro and in vivo ovarian cancer dissemination models. *Invasion & metastasis* **15**(1-2), 11-21
- Kiyasu Y., Kaneshima S., Koga S. (1981) Morphogenesis of peritoneal metastasis in human gastric cancer. *Cancer research* **41**(3), 1236-1239
- Klein C. L., Bittinger F., Skarke C. C., Wagner M., Kohler H., Walgenbach S., Kirkpatrick C. J. (1995) Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* **63**(4), 204-212
- Kohler S., Ullrich S., Richter U., Schumacher U. (2010) 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. *British journal of cancer* **102**(3), 602-609
- Kreienberg R., du Bois A., Pfisterer J., Schindelmann S., Schmalfeldt B. (Hrsg.) (2009) Management des Ovarialkarzinoms. Heiderlberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg

- Kupryjanczyk J., Thor A. D., Beauchamp R., Poremba C., Scully R. E., Yandell D. W. (1996) Ovarian, peritoneal, and endometrial serous carcinoma: clonal origin of multifocal disease. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **9**(3), 166-173
- Kurman R. J., Shih Ie M. (2010) The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *The American journal of surgical pathology* **34**(3), 433-443
- Kurman R. J., Carcangiu M. L., Herrington C. S. et al. (2014) WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. In: WHO Classification of Tumours. 4. Aufl., Lyon: WHO Press
- Lange T., Kupfernagel M., Wicklein D., Gebauer F., Maar H., Brugge K., Muller I., Simon R., Schlomm T., Sauter G., Schumacher U. (2014) Aberrant presentation of HPA-reactive carbohydrates implies Selectin-independent metastasis formation in human prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**(7), 1791-1802
- Lee J. G., Ahn J. H., Jin Kim T., Ho Lee J., Choi J. H. (2015) Mutant p53 promotes ovarian cancer cell adhesion to mesothelial cells via integrin beta4 and Akt signals. *Scientific reports* **5**, 12642
- Lee S. K., Park K. K., Kim H. J., Park J., Son S. H., Kim K. R., Chung W. Y. (2017) Human antigen R-regulated CCL20 contributes to osteolytic breast cancer bone metastasis. *Scientific reports* **7**(1), 9610
- Lee Y. J., Wu C. C., Li J. W., Ou C. C., Hsu S. C., Tseng H. H., Kao M. C., Liu J. Y. (2016) A rational approach for cancer stem-like cell isolation and characterization using CD44 and prominin-1(CD133) as selection markers. *Oncotarget* **7**(48), 78499-78515
- Li S., Qin X., Liu B., Sun L., Zhang X., Li Z., Shan B., You J., Zhou Q. (2011) Dickkopf-1 is involved in invasive growth of esophageal cancer cells. *Journal of molecular histology* **42**(6), 491-498
- Lim S. Y., Yuzhalin A. E., Gordon-Weeks A. N., Muschel R. J. (2016) Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget* **7**(19), 28697-28710
- Liu J., Zhang N., Li Q., Zhang W., Ke F., Leng Q., Wang H., Chen J., Wang H. (2011) Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. *PLoS one* **6**(4), e19495
- Louie K. G., Hamilton T. C., Winker M. A., Behrens B. C., Tsuruo T., Klecker R. W., Jr., McKoy W. M., Grotzinger K. R., Myers C. E., Young R. C., et al. (1986) Adriamycin accumulation and metabolism in adriamycin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines. *Biochemical pharmacology* **35**(3), 467-472

- Massuger L., Roelofsen T., Ham M., Bulten J. (2010) The origin of serous ovarian cancer may be found in the uterus: a novel hypothesis. *Medical hypotheses* **74**(5), 859-861
- Mayadas T. N., Johnson R. C., Rayburn H., Hynes R. O., Wagner D. D. (1993) Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* **74**(3), 541-554
- Meinhold-Heerlein I., Fotopoulou C., Harter P., Kurzeder C., Mustea A., Wimberger P., Hauptmann S., Sehouli J. (2016) The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Archives of gynecology and obstetrics* **293**(4), 695-700
- Meinhold-Heerlein I., Fotopoulou C., Harter P., Kurzeder C., Mustea A., Wimberger P., Hauptmann S., Sehouli J., Kommission Ovar of the A. G. O. (2015) Statement by the Kommission Ovar of the AGO: The New FIGO and WHO Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **75**(10), 1021-1027
- Merdek K. D., Yang X., Taglienti C. A., Shaw L. M., Mercurio A. M. (2007) Intrinsic signaling functions of the beta4 integrin intracellular domain. *The Journal of biological chemistry* **282**(41), 30322-30330
- Mukherjee B., Kessinger C., Kobayashi J., Chen B. P., Chen D. J., Chatterjee A., Burma S. (2006) DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA repair* **5**(5), 575-590
- Nahidiazar L., Kreft M., van den Broek B., Secades P., Manders E. M., Sonnenberg A., Jalink K. (2015) The molecular architecture of hemidesmosomes, as revealed with super-resolution microscopy. *Journal of cell science* **128**(20), 3714-3719
- Nehmann N., Wicklein D., Schumacher U., Muller R. (2010) 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 histochemica* **112**(5), 489-496
- Ng A., Barker N. (2015) Ovary and fimbrial stem cells: biology, niche and cancer origins. *Nature reviews Molecular cell biology* **16**(10), 625-638
- Nievers M. G., Schaapveld R. Q., Sonnenberg A. (1999) Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **18**(1), 5-17
- Nishikawa H., Sakaguchi S. (2010) Regulatory T cells in tumor immunity. *International journal of cancer* **127**(4), 759-767

- Pan S. Y., Ugnat A. M., Mao Y., Wen S. W., Johnson K. C., Canadian Cancer Registries Epidemiology Research G. (2004) Association of cigarette smoking with the risk of ovarian cancer. *International journal of cancer* **111**(1), 124-130
- Pan Y., Lloyd C., Zhou H., Dolich S., Deeds J., Gonzalo J. A., Vath J., Gosselin M., Ma J., Dussault B., Woolf E., Alperin G., Culpepper J., Gutierrez-Ramos J. C., Gearing D. (1997) Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* **387**(6633), 611-617
- Patel D. D., Koopmann W., Imai T., Whichard L. P., Yoshie O., Krangel M. S. (2001) Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients. *Clinical immunology* **99**(1), 43-52
- Pollard J. W. (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer* **4**(1), 71-78
- Prat J. (2012) Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **460**(3), 237-249
- Prat J. (2017) Pathology of borderline and invasive cancers. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* **41**, 15-30
- Qiao L., Xu Z. L., Zhao T. J., Ye L. H., Zhang X. D. (2008) Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer letters* **269**(1), 67-77
- Rachner T. D., Thiele S., Gobel A., Browne A., Fuessel S., Erdmann K., Wirth M. P., Frohner M., Todenhofer T., Muders M. H., Kieslinger M., Rauner M., Hofbauer L. C. (2014) High serum levels of Dickkopf-1 are associated with a poor prognosis in prostate cancer patients. *BMC cancer* **14**, 649
- Rakoff-Nahoum S. (2006) Why cancer and inflammation? *The Yale journal of biology and medicine* **79**(3-4), 123-130
- Ribeiro J. R., Lovasco L. A., Vanderhyden B. C., Freiman R. N. (2014) Targeting TBP-Associated Factors in Ovarian Cancer. *Frontiers in oncology* **4**, 45
- Ricci F., Fratelli M., Guffanti F., Porcu L., Spriano F., Dell'Anna T., Fruscio R., Damia G. (2017) Patient-derived ovarian cancer xenografts re-growing after a cisplatin treatment are less responsive to a second drug re-challenge: a new experimental setting to study response to therapy. *Oncotarget* **8**(5), 7441-7451

- Riddelle K. S., Green K. J., Jones J. C. (1991) Formation of hemidesmosomes in vitro by a transformed rat bladder cell line. *The Journal of cell biology* **112**(1), 159-168
- Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R. A., Ginsberg M. H., Borisy G., Parsons J. T., Horwitz A. R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**(5651), 1704-1709
- Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (2017) Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe
- Rojas E., Arispe N., Haigler H. T., Burns A. L., Pollard H. B. (1992) Identification of annexins as calcium channels in biological membranes. *Bone and mineral* **17**(2), 214-218
- Rump A., Morikawa Y., Tanaka M., Minami S., Umesaki N., Takeuchi M., Miyajima A. (2004) Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *The Journal of biological chemistry* **279**(10), 9190-9198
- Ryu K. S., Kim J. H., Ko H. S., Kim J. W., Ahn W. S., Park Y. G., Kim S. J., Lee J. M. (2004) Effects of intraperitoneal hyperthermic chemotherapy in ovarian cancer. *Gynecologic oncology* **94**(2), 325-332
- Schilder R. J., Hall L., Monks A., Handel L. M., Fornace A. J., Jr., Ozols R. F., Fojo A. T., Hamilton T. C. (1990) Metallothionein gene expression and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. *International journal of cancer* **45**(3), 416-422
- Schneider T., Osl F., Friess T., Stockinger H., Scheuer W. V. (2002) Quantification of human Alu sequences by real-time PCR--an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clinical & experimental metastasis* **19**(7), 571-582
- Schnoor M., Alcaide P., Voisin M. B., van Buul J. D. (2015) Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation. *Mediators of inflammation* **2015**, 946509
- Schwankhaus N., Gathmann C., Wicklein D., Riecken K., Schumacher U., Valentiner U. (2014) Cell adhesion molecules in metastatic neuroblastoma models. *Clinical & experimental metastasis* **31**(4), 483-496
- Schweitzer K. M., Drager A. M., van der Valk P., Thijsen S. F., Zevenbergen A., Theijssmeijer A. P., van der Schoot C. E., Langenhuijsen M. M. (1996) Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *The American journal of pathology* **148**(1), 165-175

- Shimoyama Y., Gotoh M., Terasaki T., Kitajima M., Hirohashi S. (1995) Isolation and sequence analysis of human cadherin-6 complementary DNA for the full coding sequence and its expression in human carcinoma cells. *Cancer research* **55**(10), 2206-2211
- Shinkai Y., Rathbun G., Lam K. P., Oltz E. M., Stewart V., Mendelsohn M., Charron J., Datta M., Young F., Stall A. M., et al. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**(5), 855-867
- Skonier J., Bennett K., Rothwell V., Kosowski S., Plowman G., Wallace P., Edelhoff S., Disteché C., Neubauer M., Marquardt H., et al. (1994) beta ig-h3: a transforming growth factor-beta-responsive gene encoding a secreted protein that inhibits cell attachment in vitro and suppresses the growth of CHO cells in nude mice. *DNA and cell biology* **13**(6), 571-584
- Sleeboom J. J. F., Eslami Amirabadi H., Nair P., Sahlgren C. M., den Toonder J. M. J. (2018) Metastasis in context: modeling the tumor microenvironment with cancer-on-a-chip approaches. *Disease models & mechanisms* **11**(3)
- Stewart R. L., West D., Wang C., Weiss H. L., Gal T., Durbin E. B., O'Connor W., Chen M., O'Connor K. L. (2016) Elevated integrin alpha6beta4 expression is associated with venous invasion and decreased overall survival in non-small cell lung cancer. *Human pathology* **54**, 174-183
- Strobel T., Swanson L., Cannistra S. A. (1997) In vivo inhibition of CD44 limits intra-abdominal spread of a human ovarian cancer xenograft in nude mice: a novel role for CD44 in the process of peritoneal implantation. *Cancer research* **57**(7), 1228-1232
- Stuelten C. H., Cervoni-Curet F. N., Busch J. I., Sutton E., Webster J. D., Kavalukas S. L., Wakefield L. M., Barbul A., Niederhuber J. E. (2013) SDF-1alpha mediates wound-promoted tumor growth in a syngeneic orthotopic mouse model of breast cancer. *PLoS one* **8**(4), e60919
- Sugarbaker P. H. (1999) Management of peritoneal-surface malignancy: the surgeon's role. *Langenbeck's archives of surgery* **384**(6), 576-587
- Suh D. H., Kim T. H., Kim J. W., Kim S. Y., Kim H. S., Lee T. S., Chung H. H., Kim Y. B., Park N. H., Song Y. S. (2013) Improvements to the FIGO staging for ovarian cancer: reconsideration of lymphatic spread and intraoperative tumor rupture. *Journal of gynecologic oncology* **24**(4), 352-358
- Tao Y. M., Liu Z., Liu H. L. (2013) Dickkopf-1 (DKK1) promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **45**(3), 251-257

- Tavassoli F. A., Devilee P. (Hrsg.) (2003) World Health Organization classification of tumours. Pathology & genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press
- Tennenbaum T., Weiner A. K., Belanger A. J., Glick A. B., Hennings H., Yuspa S. H. (1993) The suprabasal expression of alpha 6 beta 4 integrin is associated with a high risk for malignant progression in mouse skin carcinogenesis. *Cancer research* **53**(20), 4803-4810
- Tentes A. A., Kakolyris S., Kyziridis D., Karamveri C. (2012) Cytoreductive surgery combined with hyperthermic intraperitoneal intraoperative chemotherapy in the treatment of advanced epithelial ovarian cancer. *Journal of oncology* **2012**, 358341
- Tetsu O., McCormick F. (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**(6726), 422-426
- Trimbos J. B., Vergote I., Bolis G., Vermorken J. B., Mangioni C., Madronal C., Franchi M., Tateo S., Zanetta G., Scarfone G., Giurgea L., Timmers P., Coens C., Pecorelli S., Research E.-A. c. E. O. f., Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian N. (2003) Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *Journal of the National Cancer Institute* **95**(2), 113-125
- Turnay J., Lecona E., Fernandez-Lizarbe S., Guzman-Aranguez A., Fernandez M. P., Olmo N., Lizarbe M. A. (2005) Structure-function relationship in annexin A13, the founder member of the vertebrate family of annexins. *The Biochemical journal* **389**(Pt 3), 899-911
- Tumorregister München (2017) Ovarialtumor – Inzidenz und Mortalität [aktualisiert: 26.06.2017]. [http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC56\\_\\_G-ICD-10-C56-Ovarialtumor-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf](http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC56__G-ICD-10-C56-Ovarialtumor-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf) [abgerufen am 18.04.2018]
- van den Berg-Bakker C. A., Hagemeyer A., Franken-Postma E. M., Smit V. T., Kuppen P. J., van Ravenswaay Claasen H. H., Cornelisse C. J., Schrier P. I. (1993) Establishment and characterization of 7 ovarian carcinoma cell lines and one granulosa tumor cell line: growth features and cytogenetics. *International journal of cancer* **53**(4), 613-620
- van Driel W. J., Koole S. N., Sikorska K., Schagen van Leeuwen J. H., Schreuder H. W. R., Hermans R. H. M., de Hingh I., van der Velden J., Arts H. J., Massuger L., Aalbers A. G. J., Verwaal V. J., Kieffer J. M., Van de Vijver K. K., van Tinteren H., Aaronson N. K., Sonke G. S. (2018) Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *The New England journal of medicine* **378**(3), 230-240

- Wagner U., Harter P., Hilpert F., Mahner S., Reuss A., du Bois A., Petru E., Meier W., Ortner P., König K., Lindel K., Grab D., Piso P., Ortmann O., Runnebaum I., Pfisterer J., Luftner D., Frickhofen N., Grunwald F., Maier B. O., Diebold J., Hauptmann S., Kommos F., Emons G., Radeleff B., Gebhardt M., Arnold N., Calaminus G., Weisse I., Weis J., Sehouli J., Fink D., Burges A., Hasenburg A., Eggert C. (2013) S3-Guideline on Diagnostics, Therapy and Follow-up of Malignant Ovarian Tumours: Short version 1.0 - AWMF registration number: 032/035OL, June 2013. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **73**(9), 874-889
- Wan X., Kim S. Y., Guenther L. M., Mendoza A., Briggs J., Yeung C., Currier D., Zhang H., Mackall C., Li W. J., Tuan R. S., Deyrup A. T., Khanna C., Helman L. (2009) Beta4 integrin promotes osteosarcoma metastasis and interacts with ezrin. *Oncogene* **28**(38), 3401-3411
- Wang S., Zhang S. (2011) Dickkopf-1 is frequently overexpressed in ovarian serous carcinoma and involved in tumor invasion. *Clinical & experimental metastasis* **28**(6), 581-591
- Wang W., Fu G., Luo B. H. (2010) Dissociation of the alpha-subunit Calf-2 domain and the beta-subunit I-EGF4 domain in integrin activation and signaling. *Biochemistry* **49**(47), 10158-10165
- Weber K., Mock U., Petrowitz B., Bartsch U., Fehse B. (2010) Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene therapy* **17**(4), 511-520
- Weber K., Thomaschewski M., Benten D., Fehse B. (2012) RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking. *Nature protocols* **7**(5), 839-849
- Westrom S., Bonsdorff T. B., Bruland O. S., Larsen R. H. (2018) Therapeutic Effect of alpha-Emitting (224)Ra-Labeled Calcium Carbonate Microparticles in Mice with Intraperitoneal Ovarian Cancer. *Transl Oncol* **11**(2), 259-267
- Whittaker C. A., Hynes R. O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Molecular biology of the cell* **13**(10), 3369-3387
- Williams M. R., Azcutia V., Newton G., Alcaide P., Luscinskas F. W. (2011) Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends in immunology* **32**(10), 461-469
- Wilson A. P. (1984) Characterization of a cell line derived from the ascites of a patient with papillary serous cystadenocarcinoma of the ovary. *Journal of the National Cancer Institute* **72**(3), 513-521
- Yang-Hartwich Y., Gurrea-Soteras M., Sumi N., Joo W. D., Holmberg J. C., Craveiro V., Alvero A. B., Mor G. (2014) Ovulation and extra-ovarian origin of ovarian cancer. *Scientific reports* **4**, 6116

- Yang Z., Liu Y., Wei X., Zhou X., Gong C., Zhang T., Jin P., Xu S., Ma D., Gao Q. (2015) Co-targeting EGFR and Autophagy Impairs Ovarian Cancer Cell Survival during Detachment from the ECM. *Current cancer drug targets* **15**(3), 215-226
- Yoshida Y., Sasaki H., Kurokawa T., Kawahara K., Shukunami K., Katayama K., Yamaguchi A., Kotsuji F. (2005) Efficacy of intraperitoneal continuous hyperthermic chemotherapy as consolidation therapy in patients with advanced epithelial ovarian cancer: a long-term follow-up. *Oncology reports* **13**(1), 121-125
- Zarbock A., Ley K. (2008) Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *The American journal of pathology* **172**(1), 1-7
- Zhang T., Somasundaram R., Berencsi K., Caputo L., Gimotty P., Rani P., Guerry D., Swoboda R., Herlyn D. (2006) Migration of cytotoxic T lymphocytes toward melanoma cells in three-dimensional organotypic culture is dependent on CCL2 and CCR4. *European journal of immunology* **36**(2), 457-467
- Zhang W., Zhang B., Vu T., Yuan G., Zhang B., Chen X., Manne U., Datta P. K. (2017) Molecular characterization of pro-metastatic functions of beta4-integrin in colorectal cancer. *Oncotarget* **8**(54), 92333-92345

## **Danksagung**

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mich während der Zeit der Doktorarbeit begleitet haben und mir zur Seite gestanden haben.

Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher möchte ich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Doktorarbeit danken.

Herrn PD. Hartwig Lüthen möchte ich für die Bereitschaft danken, das schriftliche Gutachten als Vertreter der MIN-Fakultät zu übernehmen.

Besonders möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie Tobias Lange, Christine Stürken, Ursula Valentiner und Daniel Wicklein für den regen Austausch, die fachliche Expertise, die Vermittlung hilfreicher Kontakte, vor allem aber für die stets offenen Ohren bedanken.

Dr. habil. Karin Milde-Langosch danke ich für die Bereitstellung des Patientenkollektivs, und allen Mitgliedern des Gynäkologischen Forschungsinstituts für das freundliche Entgegenkommen, sowie die gute Zusammenarbeit in Projekten neben der Doktorarbeit.

Für die Übernahme der S2-Arbeiten möchte ich Herrn Dr. Kristoffer Riecken herzlichst danken, sowie Herrn Arne Düsedau für die Unterstützung bei der Zellsortierung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Timur Samatov und Diana Maltseva für die Durchführung der Transkriptom-Arrays und die Bereitstellung der Daten.

Sandra Hanika danke ich nicht nur für die Validierung der CCL2 und CCL20 Ergebnisse, sondern auch für die guten methodischen Ratschläge und die Tipps zur schriftlichen Ausarbeitung.

Bei den zahlreichen guten Seelen des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie möchte ich mich ganz besonders für die Einarbeitung und Hilfe in allen Laborbereichen bedanken: Anna, mit der ich die Western Blot Odyssee gemeistert habe. Christine, bei der man mit den molekularbiologischen Problemen immer an der richtigen Quelle war. Hanna, der Superman in der Zellkultur, vielen Dank für die zahlreichen gemeinsamen Stunden in der großen Zelle. Jenny, die Färbe- und Back-Fee, die so ziemlich alles mit Top-Ergebnissen etablieren kann.

Maike, Renate und Tjandra, die fleißigen Schneiderlein, die für jedes Gewebe einen Trick kennen, es ohne Falten zu schneiden. Susanne und Frau Makowski, die immer eine Lösung für die organisatorischen Angelegenheiten gefunden haben. Tobi und Sabrina (aus der Tierhaltung), auf deren Erfahrung im Umgang mit den Mäusen ich nicht hätte verzichten können. Euch allen ganz vielen Dank, vor allem aber für die gute Zusammenarbeit und Stimmung am Institut.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und Morton von Herzen danken. Ohne euch, ohne eure Unterstützung in welcher Form auch immer wäre ich nicht da, wo ich heute stehe! Vielen Dank an Ralf, Morton und Anne, die sich mit der schriftliche Ausarbeitung der Doktorarbeit auseinandergesetzt haben. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt!

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Bedeutung von Integrin  $\beta 4$  für die intraperitoneale Metastasierung des Ovarialkarzinoms im Xenograftmodell“ selbst verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Hilfen als die angegebenen verwendet zu haben. Ich versichere, dass die Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg,

---

(Vera Labitzky)