

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie

Direktor: Prof. Dr. med. Udo Schumacher

## **Der Einfluss von Integrin $\beta 4$ auf die Metastasierung des humanen Magenkarzinoms im Xenograftmodell**

**Dissertation**

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

vorgelegt von:

**Vincent Henrique Ehrhardt**

aus Bielefeld

Hamburg 2018

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:  
18.09.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:**  
Prof. Dr. med. Udo Schumacher

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:**  
Prof. Dr. med. Andreas Gocht

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>2</b>
2.1.	Metastasierung .....	2
2.2.	Das humane Magenkarzinom.....	3
2.2.1.	Epidemiologie .....	3
2.2.1.	Ätiologie und Pathophysiologie .....	3
2.2.2.	Histologie .....	5
2.2.3.	Diagnostik und Therapie.....	5
2.2.4.	Metastasierungsverhalten des Magenkarzinoms .....	8
2.2.5.	Peritonealkarzinose beim Magenkarzinom.....	9
2.3.	Integrine.....	11
2.3.1.	Einleitung .....	11
2.3.2.	Aufbau .....	11
2.3.3.	Funktion von Integrin $\alpha6\beta4$ .....	12
2.3.4.	Integrin $\alpha6\beta4$ in Krebszellen.....	13
2.4.	Xenograftmodell .....	14
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
3.1.	Material.....	16
3.2.	Zellversuche (in vitro) .....	24
3.2.1.	Zelllinie .....	24
3.2.2.	Integrin $\beta4$ k.d. Etablierung.....	24
3.2.3.	Zellkultur .....	25
3.2.4.	Zentrifugation der Zellen.....	25
3.2.5.	Konditioniertes Medium .....	25
3.2.6.	Zellzählung .....	26
3.2.7.	Kryokonservierung und Rekultivierung der Zellen.....	27
3.2.8.	Durchflusszytometrie/FACS .....	27
3.2.9.	Adhäsionsassay unter Flussbedingungen.....	28
3.2.10.	Zellproliferationsassay .....	29
3.2.11.	Colony forming assay in Softagar.....	30
3.2.12.	Colony forming assay in Matrigel .....	31
3.3.	Tierversuche ( <i>in vivo</i> ) .....	32

3.3.1.	Xenograftmodell .....	32
3.3.2.	Tierhaltung.....	33
3.3.3.	Gewebeentnahme .....	34
3.3.4.	Peritonealer Krebs-Index (PCI) .....	35
3.4.	Untersuchung muriner Gewebeproben auf humane DNA.....	36
3.4.1.	Isolierung von DNA.....	36
3.4.2.	Konzentrationsbestimmung der DNA .....	36
3.4.3.	Alu-PCR.....	36
3.5.	Histologie.....	38
3.5.1.	Herstellung histologischer Schnittpräparate .....	38
3.5.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).....	39
3.5.3.	Feulgen.....	39
3.5.4.	Integrin $\beta$ 4.....	39
3.6.	Statistische Auswertung .....	40
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
4.1.	Zellkultur .....	41
4.1.1.	Durchflusszytometrie/FACS .....	41
4.1.2.	Adhäsionsversuch unter Flussbedingungen.....	43
4.1.3.	Zellproliferationsassay.....	44
4.1.4.	Colony forming assay .....	44
4.1.4.1.	Softagar.....	45
4.1.4.2.	Matrigel.....	46
4.2.	Tierversuch.....	52
4.2.1.	Peritonealer Krebs-Index (PCI) .....	52
4.2.2.	Gewicht Nadelstichkanal-Tumor.....	57
4.2.3.	Alu-PCR.....	58
4.2.3.1.	Alu-PCR Blut .....	58
4.2.3.2.	Alu-PCR Knochenmark .....	59
4.2.3.3.	Alu-PCR Lunge.....	60
4.2.3.4.	Alu-PCR Leber .....	61
4.3.	Histologie.....	62
4.3.1.	Feulgen.....	62
4.3.2.	ITGB4 Färbung.....	63
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>86</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>87</b>
<b>11.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>88</b>

## 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Obwohl das Magenkarzinom weltweit nur das fünft häufigste Karzinom ist, stellt es die zweit häufigste krebsbedingte Todesursache dar. Vor allem bei Magenkarzinomen, welche peritoneal metastasiert sind, ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patient infaust und die mittlere Überlebenszeit zumeist auf wenige Monate begrenzt.

Mit dem Fokus auf den Mechanismen der intraperitonealen Metastasierung waren die Adhäsions- und Invasioneigenschaften von Magenkarzinomzellen für uns von großer Relevanz. So finden sich in der Leukozytenadhäsionskaskade, welche den Ablauf der Migration von Leukozyten aus dem Blut in benachbartes Gewebe beschreibt, Parallelen zu den Mechanismen, welche Tumorzellen bei der Metastasierung nutzen. Hierbei bilden Selektine den Startpunkt des Adhäsionsprozesses, der von Integrinen fortgesetzt und modelliert wird.

In diesem Zusammenhang konnte in vorherigen Tierversuchen mit E- und P-Selektindefizienten Mäusen beobachtet werden, dass Zellen gastrointestinaler Tumoren weniger in der Lage waren hämatogen bzw. peritoneal zu metastasieren, als in Mäusen, die diese Selektine normal exprimierten – und auch beim Magenkarzinom konnte dies in Bezug auf die peritoneale Metastasierung beobachtet werden.

Des Weiteren zeigten andere Tumorentitäten epithelialen Ursprungs, dass das Transmembranprotein Integrin  $\beta 4$  mitunter eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung spielen kann. So wurde nachgewiesen, dass in einigen epithelialen Tumoren die Expression dieses Proteins im Vergleich zum Ursprungsgewebe gesteigert ist. Diese Überexpression kann über verschiedene intrazelluläre Signalwege die Proliferation, die Invasivität, die Metastasierung und das Überleben der Tumorzellen und somit die Letalität dieser Erkrankung steigern (Stewart und O'Connor 2016).

So entstand die Hypothese, dass Magenkarzinomzellen, die nur geringe Mengen Integrin  $\beta 4$  exprimieren an Malignität und Metastasierungstendenz verlieren und dass dieser Effekt in Mäusen, welche keine E- und P-Selektine besitzen, verstärkt werden kann.

Die Auswirkungen des Integrin  $\beta 4$ -Knockdowns auf das Wachstum der Magenkarzinom-Zelllinie GC5830 *in vitro* und der Effekt auf die peritoneale Metastasierung im Xenograftmodell (*in vivo*) bei Selektin exprimierenden und defizienten Mäusen galt es herauszufinden.

## 2. Einleitung

### 2.1. Metastasierung

Als Metastasierung wird der Prozess beschrieben, bei dem sich Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors lösen und an anderen Stellen des Körpers neue Kolonien ausbilden.

Wo gut begrenzte Primärtumoren durch eine chirurgische Resektion oder eine Chirurgie gut heilbar sein können, entziehen sich Metastasen hingegen häufig diesen Therapiemöglichkeiten. Dies erklärt auch, warum mehr als 90% aller tumorbedingten Todesfälle auf Metastasen zurückzuführen sind (Valastyan und Weinberg 2011).

Bereits 1889 lieferte der englische Pathologe Stephan Paget mit seiner Seed-and-Soil-Hypothese (Samen und Boden) ein Erklärungsmodell für den Vorgang der Metastasierung. Paget war aufgefallen, dass es eine Diskrepanz der relativen Blutversorgung und der Häufigkeit von Metastasen in bestimmten Organen gab – offensichtlich war nicht nur die Blutversorgung, sondern vor allem die Gewebeeigenschaften bestimmter Organe entscheidend für die Metastasierung. Er schloss daraus, dass sich Metastasen nur ausbildeten, wenn die Tumorzellen (Samen/Seed) kompatibel mit dem Organ der Metastasierung (Boden/Soil) waren (Fidler 2003).

Heute, über 100 Jahre später, sind die Schritte, die eine Tumorzelle bewältigen muss um eine Fernmetastase zu bilden, besser verstanden. Die Metastasierungskaskade, die aus den Forschungsergebnissen der letzten Jahrzehnte entwickelt werden konnte, ist insgesamt auch heute noch mit der Hypothese Pagets vereinbar.

Epithelien sind über eine Basalmembran sowohl mit der darunterliegenden Extrazellulärmatrix verbunden, als auch von ihr separiert. Sie haben keinen direkten Kontakt zu Blut- oder Lymphgefäßen und werden via Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Daher haben maligne veränderte Zellen, die die Basalmembran noch nicht penetriert haben, tendenziell keine Möglichkeit zu metastasieren. Karzinomen, also malignen Tumoren epithelialen Ursprungs, die etwa 80% der Krebserkrankungen ausmachen (Lambert et al. 2016) müssen daher eine Reihe an Mutationen aufweisen, die sie befähigen, 1.) zunächst den Primärtumorverband zu verlassen und 2.) die Basalmembran zu überwinden (lokale Invasion), 3.) danach in die umliegenden Gefäße einzudringen (Intravasation) und 4.) in dem neuen Medium (Blut bzw. Lymphflüssigkeit) als zirkulierende Tumorzellen (CTC) zu überleben um 5.) anschließend an einer anderen Stelle im Körper an das Gefäßendothel zu adhären, dieses zu durchwandern

(Extravasation) und 6.) in der dahinterliegenden Extrazellulärmatrix Tumorkolonien ausbilden zu können, wobei es keine für Metastasen typischen Mutationen gibt.

Eine Tumorzelle muss demzufolge befähigt sein einen jeden dieser Schritte vollziehen zu können. Gleichzeitig liefert jedoch jeder dieser Schritte Möglichkeiten, den Vorgang zu stören oder gar zu unterbrechen.

## 2.2. Das humane Magenkarzinom

### 2.2.1. Epidemiologie

Das humane Magenkarzinom ist mit mehr als 950.000 neu diagnostizierten Fällen das fünft häufigste Karzinom weltweit. Im Jahre 2012 starben mehr als 720.000 Menschen am Magenkarzinom, es ist damit die zweit häufigste krebsbedingte Todesursache. Bei gleicher Mortalitätsrate ist die Inzidenz bei Männer gut doppelt so hoch wie die bei Frauen. Es lässt sich erkennen, dass das Magenkarzinom damit ein großes und wichtiges gesundheitliches Problem darstellt.

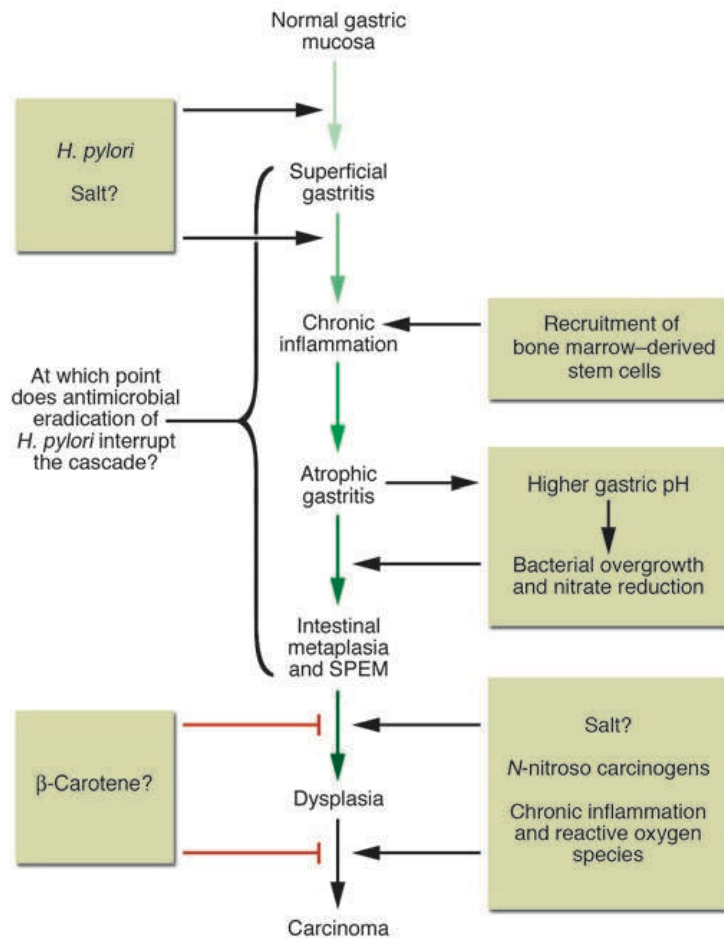
### 2.2.1. Ätiologie und Pathophysiologie

Das Magenkarzinom ist eine multifaktorielle Erkrankung (Karimi et al. 2015). Ätiologisch lassen sich die Faktoren, die das Risiko erhöhen im Laufe des Lebens an einem Magenkarzinom zu erkranken, in exogene und endogene unterteilen.

Endogene Faktoren wären hierbei vor allem Erkrankungen wie chronische Gastritiden und Ulkuserkrankungen des Magens. Seit Ende der 1980er Jahren gilt das Bakterium *Helicobacter pylori* (H.P.) (damals noch *Campylobacter pylori* genannt), welches ein gramnegatives Stäbchenbakterium ist, als Hauptursache für peptische Ulkus-Erkrankungen (Marshall et al. 1988). Dabei löst die Besiedelung mit H.P. im Wirt eine lebenslang-persistierende chronisch aktive Immunantwort aus, die, sollte keine antibiotische Eradikationstherapie erfolgen, in Kombination mit Umwelteinflüssen die Initiation und das Fortschreiten von Schleimhautatrophie, Metaplasie und Dysplasie in Richtung Magenkarzinom antreibt (Correa-Pathway, s. Abb. 1.)



## Einleitung



**Abb. 1: Correa-Pathway.** Flussdiagramm über mögliche Entstehungskaskade des Magenkarzinoms auf dem Boden einer *H. pylori* Infektion (Fox und Wang 2007)

Daher stellt die *H. pylori* den Hauptrisikofaktor für das Magenkarzinom dar (Correa und Houghton 2007) und ist gegenwärtig das häufigste ätiologische Agens für infektionsbedingte Krebserkrankungen, welche 5,5% der globalen Krebslast ausmachen (Wang et al. 2014). Obwohl die meisten Magenkarzinome sporadisch sind, tritt in 10% der Fälle eine familiäre Häufung auf. Bei 1-3% der Magenkarzinome liegt eine Keimbahnmutation, also eine hereditäre Ursache, zu Grunde. Relevante exogene Faktoren sind vor allem ein niedriger sozioökonomischer Status (Khatami und Karbakhsh 2015), der Nikotinabusus (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2010) und die Ernährung. Bei der Ernährung spielen vor allem der geringe Konsum von Obst und Gemüse sowie die hohe Zufuhr von Speisesalz, gepökelten Lebensmitteln und Nitraten eine Rolle (Guggenheim 2013 und Shikata et al. 2006). Eine positive Korrelation zu erhöhtem Körpergewicht konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Yang et al. 2009).

### 2.2.2. Histologie

Die meisten Neoplasien des Magens sind Adenokarzinome. Morphologisch weist das Magenkarzinom jedoch eine große Heterogenität auf. Dies spiegelt sich auch in der Vielfalt der Klassifikationsschemata wider, die jeweils auf unterschiedlichen Ansätzen fußen, wie zum Beispiel dem histologischen Profil, dem Differenzierungsgrad der Zellen, dem Wachstumsmuster oder der Histogenese (Carneiro 1997). Die gebräuchlichsten sind die Klassifikationen nach Laurén und WHO.

Dabei unterscheidet die Klassifikation nach Laurén drei Subtypen: das intestinale Karzinom, das diffusen Karzinom und eine Mischform aus beiden. Das intestinale Karzinom ist zumeist gut bis mäßig differenziert und bildet Drüsenstrukturen, die an kolorektale Adenokarzinome erinnern, wohingegen das diffuse Karzinom schlecht differenziert ist und sich bei fehlender Drüsenbildung aus solitären oder schlecht kohäsiven Tumorzellen zusammensetzt (Lauren 1965).

In der WHO Klassifikation (H. Watanabe, J.R. Jass 1990) wird das Magenkarzinom in sechs Hauptentitäten (Adeno-, Adenosquamöses-, medulläres, hepatoides Adeno-, Plattenepithel- und undifferenziertes Karzinom) unterschieden. Das Adenokarzinom, welches die häufigste Entität darstellt, ist zusätzlich subklassifiziert (papillär, muzinös, tubulär, gemischt und gering kohäsiv (inkl. Siegelringzell-Karzinom)). Dabei beschreibt die WHO-Klassifikation vornehmlich histomorphologische Muster, die auch in Dün- und Dickdarntumoren gezeigt werden konnten, wodurch eine einheitliche histopathologische Typisierung von Magen-Darm-Karzinomen möglich ist (Carneiro 1997).

### 2.2.3. Diagnostik und Therapie

In frühen Stadien zeigen die meisten Patienten mit Magenkarzinom häufig keine, bis sehr unspezifische Symptome. In spätere Stadien dieser Erkrankung weisen Symptome wie Inappetenz, schnelles Völlegefühl, Gewichtsabnahme oder allgemeine Schwäche auf eine mögliche Erkrankung hin. Bei sehr fortgeschrittenen Tumoren können größere Resistenzen, Aszites oder periphere Lymphadenopathien, charakteristischerweise subklavikulär links (Virchow-Lymphknoten), getastet werden.

Da die Krankheit wegen fehlender krankheitsspezifischer Symptome häufig sehr spät diagnostiziert wird, ist es wichtig Patienten, die ein erhöhtes Risikoprofil haben, regelmäßig und frühzeitig zu untersuchen.

Im Mittelpunkt der Diagnostik steht hierbei die Endoskopie des oberen Gastrointestinaltraktes (Magenspiegelung), auch Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) genannt. Während der Untersuchung lassen sich visuell makroskopisch auffällige Bereiche lokalisieren und im nächsten Schnitt biopsieren (Möhler et al. 2012).

Nach einem positiven histopathologischen Befund schließt sich das Grading und Staging an. Beim Grading werden die Zellen des Biopsats mit Zellen des normalen Ursprungsgewebes (in dem Fall Magenschleimhautzellen) verglichen.

Beim Staging wiederum wird der Grad der Tumorausbreitung im Körper bestimmt. Wichtig hierbei ist die Ausbreitung des Primärtumors (T), der Befall von lokalen Lymphknoten (N) und die Identifikation möglicher Tumorabläger, den Metastasen (M).

Üblicherweise bedarf es hierfür der Kombination verschiedener Diagnostik. Dabei liefern die Biopsien und anschließend die Endosonographie wichtige Informationen über die Eigenschaften und die Ausdehnung des Primärtumors im Ursprungsgewebe. Die Abdomensonographie und die Schnittbildgebung von Thorax, Abdomen und Becken, v.a. mittels Computertomographie (CT), liefert weitere Informationen über mögliche Lymphknoten- und Fernmetastasen.

Beim Magenkarzinom ist die Operation in kurativer Absicht die Therapie der Wahl. Dabei bilden Tumoren, die auf die Mukosa begrenzt sind (T1a, N0, M0), die Ausnahme. Diese Tumoren (bis T1) werden auch Magenfrühkarzinome genannt und gehen nur mit einem geringen Risiko einer Lymphknotenbeteiligung einher. Mittels minimalinvasiver endoskopischer Verfahren können die betroffenen Schleimhautareale abgetragen werden.

Bei Magenkarzinomen, die sich einer endoskopischen Behandlungsmöglichkeit entziehen, wird der Tumor operativ entfernt. Dabei ist die vollständige Entfernung des Tumors und der regionären Lymphknoten mit histologisch bestätigt tumorfreien proximalen, distalen und zirkumferentiellen Resektionsrändern das Ziel (R0). Das Resektionsausmaß richtet sich nach der TNM-Klassifikation, der Tumorlokalisation und der Histologie (intestinal vs. diffuser Typ) (Möhler et al. 2012).

Da Tumoren vom diffusen Typ ein diskontinuierliches Wachstumsmuster aufweisen, kann von der makroskopischen Erscheinung des Tumors nicht auf seine eigentliche Ausdehnung geschlossen werden. Daher wählt man beim diffusen Typ mit 8-10 cm

während der Operation einen größeren Sicherheitsabstand zum Tumor als beim intestinalen Typ mit 5 cm.

Bei der totalen Gastrektomie werden das proximale und das distale Ende des Magens abgesetzt und somit der gesamte Magen reseziert – dies ist vor allem bei proximal liegenden Tumoren erforderlich. Die subtotale Gastrektomie ist eine 4/5-Resektion des Magens, bei der das proximale Fünftel des Magens erhalten bleibt – abhängig vom histologischen Subtypen ist dies vor allem bei distalen Magenkarzinomen der Fall.

Im Laufe der Geschichte wurden verschiedene Rekonstruktionsverfahren für Patienten nach Gastrektomie entwickelt. Die bekanntesten sind die Rekonstruktionen nach Billroth I, II und die Y-Rekonstruktion nach Roux.

Bei lokalisierten Adenokarzinomen des Magens (ab uT2) und noch resektablen Tumoren (uT4a) sollten neben der Chirurgie auch zytotoxische Chemotherapeutika eingesetzt werden. Paoletti und Oba (2010) haben in einer Meta-Analyse verschiedener randomisierter klinischer Studien gezeigt, dass bei der adjuvanten Chemotherapie die 5-Jahres-Überlebensrate um 5,8-Prozentpunkte höher lag als bei der alleinigen Resektion des Tumors. Cunningham et al. (2006) fand zusätzlich heraus, dass die perioperative Chemotherapie die 5-Jahres-Überlebensrate um weitere 7,2-Prozentpunkte steigert. Daher gilt in Deutschland eine relative Negativempfehlung zur adjuvanten Chemotherapie bei lokal fortgeschrittenen Tumoren, um die perioperative/neoadjuvante Therapie als Primärtherapie zu festigen (Möhler et al. 2012).

Die gängigen Chemotherapeutika in Deutschland sind vor allem 5-Fluoruracil (5-FU) und Cisplatin, welche als Kombinationstherapie das Überleben im Vergleich zur ausschließlichen 5-FU-Monotherapie verlängern.

Bei bereits stattgefundenener peritonealer Metastasierung birgt die konventionelle Chirurgie keine adäquate Therapiemöglichkeit und die Behandlung mit systemischen Chemotherapeutika in palliativer Absicht liefert so gut wie keine Möglichkeit auf Heilung (Mura und Verdelli 2016).

Daher beschäftigen sich andere Therapieansätze mit der Kombination aus zytoreduktiver Chirurgie und hyperthermaler intraperitonealer Chemotherapie (HIPEC).

Bei der zytoreduktiven Chirurgie versucht der Chirurg nach ausführlicher Exploration des Peritoneums alle makroskopisch erkennbaren Metastasen zu entfernen. Bei der HIPEC macht man sich die Effekte zu Nutze, dass zum einen durch die intraperitoneale Gabe des Chemotherapeutikums die Wirkstoffkonzentration in den Tumoren gesteigert wird, zum anderen, dass die Tumorzellen sensibler auf Hitze reagieren als

normale Zellen (Mura und Verdelli 2016). Zusammen sollte dies einen effektiveren zytoreduktiven Effekt auf die intraperitonealen Metastasen haben.

Die zytoreduktive Chirurgie in Kombination mit der HIPEC führte hierzu auch in jüngster Vergangenheit bei Patienten mit speziellen intraperitonealen Malignomen, wie z.B. dem Kolorektalen- bzw. dem Ovarialkarzinome, zu vielversprechenden Ergebnissen. Darauf aufbauend wurde ein ähnlicher Effekt auch beim Magenkarzinom postuliert. Jedoch waren die Ergebnisse dieser Anwendung weniger vielversprechend als bei den oben genannten Entitäten (Thomassen et al. 2013).

Bis heute wird in der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Deutschen Krebsgesellschaft (DKG) von der Anwendung dieser Verfahren außerhalb von klinischen Studien abgeraten (Möhler et al. 2012).

#### 2.2.4. Metastasierungsverhalten des Magenkarzinoms

Wie in 2.1 bereits beschrieben, sind Metastasen die Hauptursache von krebisbedingten Todesfällen. Wo Patienten mit einem Magenfrühkarzinom (bis T1b) nach vollständiger Resektion noch 5-Jahres-Überlebensraten von bis zu über 90% haben (Isomoto et al. 2009; Gotoda et al. 2010), haben Patienten mit Fernmetastasen hingegen eine mittlere Überlebenszeit von nur wenigen Monaten (Riihimäki et al. 2016).

Da viele Krebsregister nur zwischen dem „Fehlen“ und dem „Vorhandensein“ (M0 vs. M1) von Metastasen unterscheiden, jedoch bekannt ist, dass verschiedene Magenkarzinom-Subgruppen verschiedene Überlebenswahrscheinlichkeiten haben (intestinal vs. diffus) und das Überleben maßgeblich von der Metastasierung abhängig ist, ist für die personalisierte Behandlung von Krebspatienten – die in den klinischen Alltag immer mehr Einzug findet – die genaue Kenntnis über das Metastasierungsverhalten von Tumoren wichtig.

Riihimäki et al. (2016) haben daher bei 7559 Magenkarzinompatienten aus dem schwedischen Medizinregister das Metastasierungsverhalten und das Überleben in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter, Stadium, anatomischer Lokalisation (Kardia vs. Nicht-Kardia) und histologischem Typ verglichen und ausgewertet.

Dabei wiesen ca. 26% der Patienten bei Diagnose eine, knapp 13% bereits mehrere Metastasen auf, die hauptsächlich in der Leber (44%), aber auch im Peritoneum (32%), in der Lunge (15%) und in den Knochen (12%) lokalisiert waren.

Weitere Unterschiede konnte bei der anatomischen Lokalisation der Primärtumoren festgestellt werden: Tumoren der Kardia metastasierten häufiger in die Lunge als ins Peritoneum (22% vs. 20%), wohingegen Nicht-Kardia-Tumoren dreimal häufiger Metastasen im Peritoneum zeigten als in der Lunge. Auch die verschiedenen histologischen Subtypen zeigten Unterschiede im Metastasierungsverhalten: Im Peritoneum waren doppelt so häufig Metastasen vom diffusen Typ (v.a. Siegelringzellen), wohingegen Metastasen, die durch hämatogene Ausbreitung entstanden waren, häufiger beim intestinalen Typ waren. Des Weiteren war zu sehen, dass die meisten Patienten mit Lungenmetastasen ebenfalls Lebermetastasen hatten, Patienten hingegen, die Pleura- bzw. Ovarialmetastasen aufwiesen, öfter bereits peritoneal metastasiert waren. Im Gegensatz dazu hatten Patienten mit Lebermetastasen seltener peritoneale Metastasen, was darauf hinweist, dass das Magenkarzinom typischerweise entweder innerhalb des Peritoneums oder hämatogen und selten auf beiden Wegen metastasiert (Riihimäki et al. 2016). Da derzeit hauptsächlich die Tumorgröße (kleiner/größer 2cm), die Infiltrationstiefe, die angiolymphatische Beteiligung (V/L), die makroskopische Erscheinung (mit oder ohne Ulzeration) und der histologische Subtyp Prädiktoren für die Therapieentscheidung sind (Gurzu et al. 2015), die Metastasierung aber vor allem die Überlebenschancen bestimmt, wäre eine Weiterentwicklung der Therapiekriterien indiziert.

### 2.2.5. Peritonealkarzinose beim Magenkarzinom

Im Jahre 1931 beschrieb J. A. Sampson erstmals die Peritonealkarzinose am Fall eines Ovarialkarzinoms als Herauslösung von Tumorzellen aus ihrem Primärtumor und anschließender Verteilung im Peritoneum. Vornehmlich Tumoren intraperitonealer oder dem Peritoneum direkt anliegender Organe metastasieren peritoneal. Wichtige Vertreter sind gynäkologische Tumoren wie das Ovarialkarzinom oder gastroenterologische Tumoren wie das Kolorektalkarzinom, das Pankreaskarzinom oder das Magenkarzinom.

Wie bereits in 2.1 erwähnt, müssen Tumorzellen für eine erfolgreiche Metastasierung besondere Fähigkeiten besitzen. Zu diesen gehört unter anderem die Fähigkeit der stabilen Adhäsion an Oberflächenstrukturen wie dem Endothel oder – wie im Fall der peritonealen Metastasierung – dem Mesothel.

Bestimmte Zellen des Körpers exprimieren hierzu an ihrer luminalen Oberfläche Zelladhäsionsmoleküle. Dabei spielen Selektine, welche man in E-, P- und L-Selektine unterteilt, eine entscheidende Rolle. Bis auf L-Selektin, welches hauptsächlich von Leukozyten gebildet wird, kennt man E- und P-Selektine vor allem auf Endothelzellen. Hier initiieren sie zusammen mit den Selektinliganden, welche auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert werden, den Adhäsionsprozess. Im anschließenden Schritt wird die Adhäsion durch Integrine und ihren dementsprechenden Liganden gefestigt und modelliert und führt so bei ausreichend fester Bindung zur Extravasation der Zellen in das dahinterliegende Gewebe. Dieser Vorgang – bei den Leukozyten auch Leukozytenadhäsionskaskade genannt – konnte bei Tumorzellen sowohl an Endothel-, als auch an Mesothelzellen beobachtet werden (Gebauer et al. 2013).

Bei der peritonealen Metastasierung spielt hingegen nicht die Adhäsion der Tumorzellen am Gefäßendothel, sondern zunächst die Adhäsion am Mesothel des Peritoneums die entscheidende Rolle. Tumorzellen, die sich aus dem Verband des Primärtumors lösen können und anschließend in der Peritonealflüssigkeit zirkulieren, finden im Peritonealraum andere Überlebensbedingungen als im Gefäßsystem. Bei sehr viel weniger Scherkräften und einer großen kontinuierlichen Oberfläche, bietet die Peritonealhöhle den Tumorzellen gute Voraussetzungen zu adhären oder aber auch Tumorzellkolonien auszubilden. So können sich zumeist unbemerkt multiple peritoneale Mikrometastasen bilden, die einer konventionellen Therapie nicht mehr zugänglich sind. Daher ist die Prognose für Patienten mit peritoneal metastasiertem Magenkarzinom zumeist infaust ist.

Dies zeigt, weshalb die Adhäsion – und damit sowohl die Selektine, als auch die Integrine – bei der Fernmetastasierung von disseminierten Tumorzellen von so zentraler Bedeutung ist.

## 2.3. Integrine

### 2.3.1. Einleitung

Benannt nach ihrer Fähigkeit, extrazelluläre Signale in das Zellinnere zu integrieren (Stewart und O'Connor 2016), spielen Integrine eine wichtige Rolle in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion. Sie gehören zu der Gruppe der Typ 1 Transmembranproteine, die nach extrazellulär mit der umgebenden Matrix und nach intrazellulär sowohl mit dem Zytoskelett der Zelle in Verbindung stehen, als auch an vielen Signalwegen beteiligt sind.

Integrine spielen über ihre mannigfaltigen Interaktionen mit verschiedensten Zell- und Matrixbestandteilen eine modellierende bis zentrale Rolle bei der Adhäsion, Migration, Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen, aber auch bei der Progression von Tumoren (Hynes 2002; Kariya et al. 2017).

### 2.3.2. Aufbau

Integrine sind Heterodimere, deren Untereinheiten die Zellmembran jeweils einfach durchziehen. Der extrazelluläre (N-terminale) Abschnitt bildet mit >1600 Aminosäuren – gegenüber dem intrazellulären (C-terminalen) Abschnitt mit etwa 20-50 Aminosäuren – den weitaus größten Teil des Glykoproteins (s. Abb. 2 B)

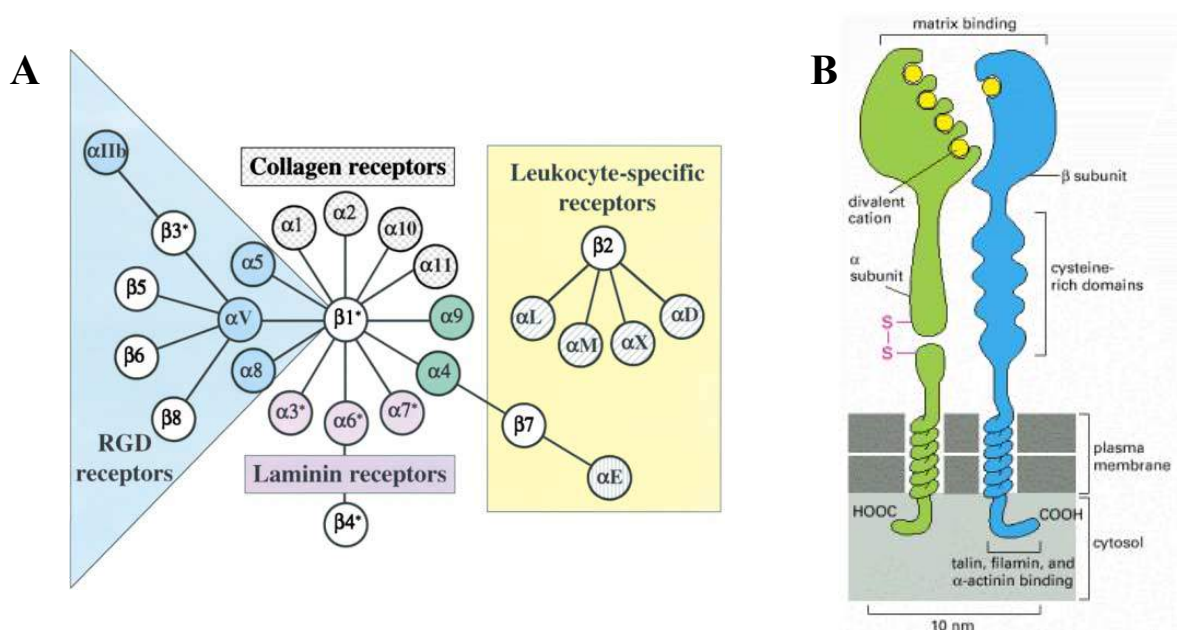


Abb. 2: (A) Schema Integrin-Rezeptor-Familie (Hyne et al. 2002). (B) Aufbau Integrin-Heterodimer (Albers et al. 2002)



Dabei bilden die nicht kovalent-verbundene Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , ein Integrinmolekül (Alberts, Johnson und Lewis 2002; Hynes 2002). Insgesamt 24 Integrin-Heterodimere setzen sich aus 18- $\alpha$ - sind 8- $\beta$ -Untereinheiten zusammen (s. Abb. 2 A).

Das Integrin  $\beta 4$ , welches nur mit der  $\alpha 6$ -Untereinheit das Heterodimer  $\alpha 6\beta 4$  bilden kann, nimmt unter allen Integrinen eine Sonderrolle ein.

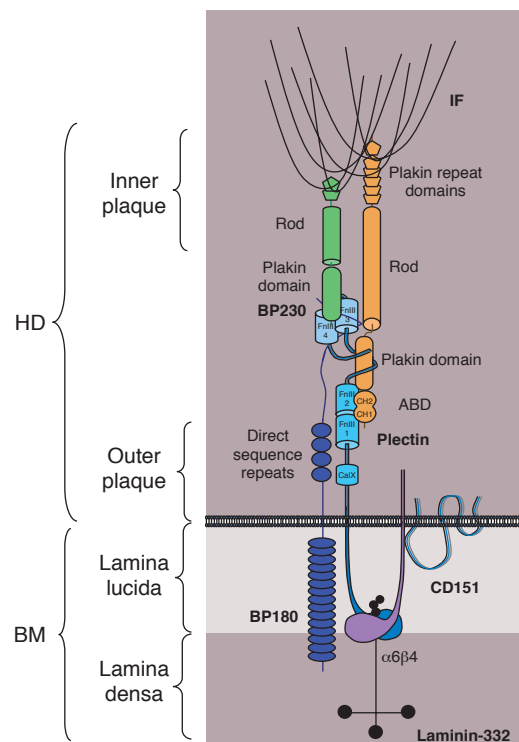
Während der intrazelluläre Abschnitt anderer  $\beta$ -Integrine normalerweise bei weniger als 50 Aminosäuren liegt, beträgt er bei Integrin  $\beta 4$  hingegen 1072 Aminosäuren (Hogervorst et al. 1990).

### 2.3.3. Funktion von Integrin $\alpha 6\beta 4$

Auf der basalen Seite von Zellen epithelialen Ursprungs verbindet das Integrin  $\alpha 6\beta 4$ , als Teil der Hemidesmosomen, das Zytoskelett (über Plektin und BP 230) mit Laminin (-5/-332), das sich in der Basalmembran befindet (Litjens et al. 2006). Durch diese Verbindung werden die Epithelien in der darunterliegenden Extrazellulärmatrix verankert, was essentiell für die Integrität von Epithelien ist (Chen et al. 2009).

Hemidesmosomen sind jedoch keine starren Gebilde. Während der Wundheilung ist es essentiell, dass sich die Verbindung zur Basalmembran löst, um den Epithelzellen am Wundrand die Möglichkeit zu geben ins Wundzentrum zu migrieren. Durch die Phosphorylierung der intrazellulären  $\beta 4$ -Untereinheit löst sich das Integrin  $\alpha 6\beta 4$  aus den Hemidesmosomen.

Dies geschieht über Stimulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie z.B. dem *EGFR*, *HER2*, die wiederum c-Src-Tyrosinkinasen aktivieren und dadurch die  $\beta 4$ -Untereinheit

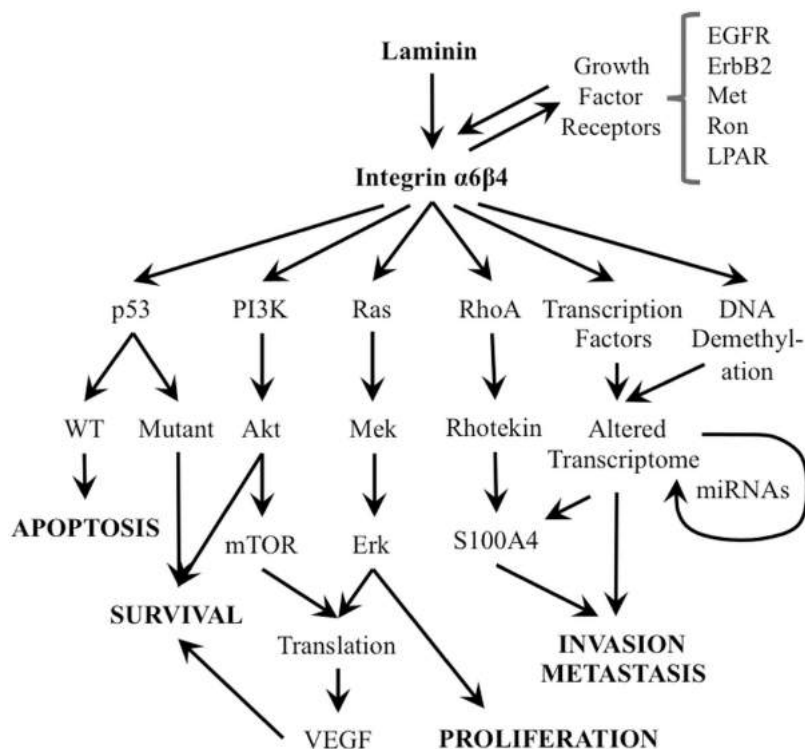


**Abb. 3: Aufbau eines Hemidesmosoms.** Schematische Darstellung der Komponenten: Integrin  $\alpha 6\beta 4$ , CD151, BP180 (Kollagen XVIII/BPAG1), BP230 (BPAG2) und Plektin und den Liganden Laminin-332 und den intrazellulären Intermediärfilament-Partner Kreatin 5- und 14. (Litjens et al. 2006)

direkte phosphorylieren. Hierdurch werden verschiedene Signalwege induziert / Proteine aktiviert, wie z.B. PKC, PI3K, Ras-MAPK, RhoA, p53 usw., die von wesentlicher Bedeutung für Zelladhäsion, -migration, -invasion, -proliferation und -tod sind. (Stewart und O'Connor 2016; Kariya et al. 2017).

### 2.3.4. Integrin $\alpha6\beta4$ in Krebszellen

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Integrin  $\alpha6\beta4$  in mehreren epithelialen Tumor-Entitäten die Malignität erhöht und das Überleben senkt. Dies ist damit zu erklären, dass Integrin  $\alpha6\beta4$  in die Signaltransduktion vieler intrazellulärer Prozesse involviert ist (siehe Abb. 4), welche eine zentrale Rolle bei der Tumorentstehung spielen (Stewart und O'Connor 2016).



**Abb. 4:** Signalwege, die mit Tumorprogression assoziiert sind und durch Integrin  $\alpha6\beta4$  aktiviert werden können. Dabei kann Integrin  $\alpha6\beta4$  mehrere Signaltransduktionskaskade direkt durch Bindung seines Liganden Laminitin oder durch Verstärkung von Signalen verschiedener Wachstumsfaktoren aktivieren (Stewart und O'Connor 2016).

Dazu zählt die Fähigkeit die Gewebsinvasion und Metastasierung zu fördern, die Angiogenese anzuregen, proliferative Signale aufrecht zu erhalten und so die Proliferation zu steigern und die Apoptose p53-abhängig zu steuern. Integrin  $\alpha6\beta4$  vermittelt

dabei als Transmembranprotein Informationen über die Integrität der jeweiligen Zelle im Zellverband (Stewart und O'Connor 2016). Verliert zum Beispiel eine Zelle ihren Zell-Matrix-Kontakt, verliert diese Zelle auch ihre Funktion als Deckgewebe und wird somit wertlos für den Körper. Integrin  $\alpha 6\beta 4$  überträgt dabei das Signal dieses Kontaktverlustes in den Zellkern, welcher wiederum die Anoikis einleitet. Dabei beschreibt Anoikis den programmierten Zelltod von Zellen, die sich aus dem ursprünglichen Zellverband gelöst haben. Dieser Prozess schützt vor einer möglichen Dissemination fremder Zellen in andere Gewebe und somit vor Metastasierung (Liotta und Kohn 2004).

Bemerkenswerterweise kann Integrin  $\alpha 6\beta 4$  sowohl als Tumorsuppressor, als auch als Protoonkogen wirken. In Gegenwart eines p53 vom Wildtyp fördert Integrin  $\alpha 6\beta 4$  die Apoptose. Kommt es jedoch zu p53-Mutationen, kann dies zu einer Hemmung der Apoptose führen. Aus diesem Grund wird Integrin  $\alpha 6\beta 4$  häufig in Tumoren wie dem Pankreaskarzinom oder dem basalen Mammakarzinom überexprimiert (Stewart und O'Connor 2016).

## 2.4. Xenograftmodell

Zusammengesetzt aus dem altgriechischen Wort *xénos* (ξένος = Fremder) und dem englischen *graft* (=Transplantat) beschreibt die Komposition das Transplantieren von Gewebe in eine artfremde Lebensform. In der humanmedizinischen Forschung werden zumeist menschliche Zellen (v.a. Tumorzellen) in immundefiziente Mäuse implantiert, um das Verhalten dieser Zellen in einem lebenden Organismus studieren und mögliche Therapien präklinisch evaluieren zu können.

SCID Mäuse, aus dem englischen für *severe combined immunodeficient*, haben aufgrund einer Mutation nur wenige bis gar keine B- und T-Lymphozyten. Entsprechend funktioniert das erworbene Immunsystem dieser Mäuse nicht suffizient. Dadurch kann man diese Mäuse nutzen, um in und an ihnen das Verhalten artfremder (hier humaner Krebs-) Zellen zu untersuchen, ohne dass die Zellen vom Immunsystem des Wirts (also der Maus) zerstört werden.

In vorangegangenen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass E- und P-Selektin eine zentrale Rolle bei der Metastasierung spielen. Daher wurde neben dem SCID- ein zweites Mausmodell etabliert, bei dem die Mäuse eine zusätzliche E- und

## Einleitung

P-Selektin-Defizienz aufweisen (SCID-select E<sup>-/-</sup> P<sup>-/-</sup> Mäuse). Um dieses Mausmodell zu etablieren, wurden E- und P-Selektin-Knockout Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) mit einer hauseigenen Züchtung, den Balb/c SCID Mäusen, gekreuzt. Mittels Genotypisierung der Nachkommenschaft dieser Kreuzung wurden schlussendlich die E- und P-Selektin-defizienten Mäuse generiert (Köhler et al. 2010). An eben diesen Mäusen und ihrer Wildtyp-Kontrolle fand Köhler et al. (2010) heraus, dass die pulmonale Metastasierung bei E- und P-Selektin-defizienten Mäusen nach subkutaner Inokulation von Kolonkarzinomzellen erheblich reduziert werden konnte.

In der Annahme, dass sich das Mesothel des Peritoneums und das Endothel der Gefäßwände aufgrund ihres gemeinsamen mesodermalen Ursprungs in Bezug auf Oberflächenmoleküle (wie zum Beispiel den Selektinen) ähneln, hat Gebauer et al. (2013) ein intraperitoneales Xenograftmodell gewählt. Dabei wurden die Tumorzellen – in diesem Fall die Pankreaskarzinomzellen – nicht unter die Haut, sondern direkt intraperitoneal inokuliert, um bei den Mäusen eine peritoneale Dissemination zu simulieren und die Auswirkungen einer möglichen Karzinose besser analysieren zu können. Das Ergebnis war, dass die Mäuse, die keine E- und P-Selektine exprimierten, ebenfalls signifikant weniger Peritonealkarzinose aufwiesen als die Wildtyp-Kontrolle.

Weil die peritoneale Metastasierung beim Magenkarzinom eine für den Patienten zu meist terminale Situation darstellt und E- und P-Selektine offensichtlich auch bei der intraperitonealen Metastasierung von großer Relevanz sind, wurde sich im hiesigen Versuch ebenfalls für ein intraperitoneales Xenograftmodell entschieden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

Bezeichnung	Produktname/Mischung	Hersteller
24-Napf-Platte (Colony forming)	Zellkultur Multiwellplatte, 24 Well (Kat. Nr. 662160)	Greiner Bio-One; Stonehouse, UK
96-Napf-Platte (Colony forming)	TC-Platte 96 Well, Cell+, F (Kat. Nr. 83.3924.300)	Sarstedt; Nürnbrecht, Germany
96-Napf-Platte (PCR)	Light Cycler® 480 Multi- well Plate 96 white (Kat. Nr. 04729692001)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany
ABC-AP Kit	Vectastain® ABC-AP Staining Kit (Alkaline Phosphatase, Standard) (Kat. Nr. AK-5000)	Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, USA
Absaugpumpe	VACUSAFE comfort (Kat. Nr. 300703)	Integra Biosciences AG; Zizers, Switzerland
Agarose	2-Hydroxyethylagarose (Kat. Nr. A4018) Typ VII, low gelling temperature	Sigma-Aldrich® , Saint Louis, USA
AK Diluent	Antibody Diluent (Kat. Nr. S0809)	Dako Denmark A/S; Glostrup, Denmark
Alu-Primer forward	Sequenz 5' → 3' TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA	Eurofins Genomics; Ebersberg, Germany
Alu-Primer reverse	Sequenz 5' → 3' GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT	Eurofins Genomics; Ebersberg, Germany
Anti-ITG $\alpha$ 1-AK Isokontrolle: Mouse IgG 1 FITC (Durchflusszytome- trie)	Kat. Nr. 328307	BioLegend; San Diego, USA
Anti-ITG $\alpha$ 2-AK	Kat. Nr. 314306	BioLegend; San Diego, USA

Material und Methoden

Bezeichnung	Produktname/Mischung	Hersteller
Isokontrolle: Mouse IgG 1 FITC (Durchflusszytometrie)		
Anti-ITG $\alpha$ 4-AK Isokontrolle: Mouse IgG 1 FITC (Durchflusszytometrie)	Kat. Nr. 304303	BioLegend; San Diego, USA
Anti-ITG $\alpha$ 5-AK Isokontrolle: Mouse IgG1 Alexa Fluor 488 (Durchflusszytometrie)	Kat. Nr. 12-4900-42	eBioscience; Waltham, USA
Anti-ITG $\alpha$ 6-AK Isokontrolle: Rat IgG2a FITC (Durchflusszytometrie)	Kat. Nr. 313605	BioLegend; San Diego, USA
Anti-ITG $\alpha$ e-AK Isokontrolle: Mouse IgG 1 FITC (Durchflusszytometrie)	Kat. Nr. 350203	BioLegend; San Diego, USA
Anti-ITG $\alpha$ v-AK Isokontrolle: Mouse IgG2a FITC (Durchflusszytometrie)	Kat. Nr. 327907	BioLegend; San Diego, USA
Anti-ITG $\beta$ 1-AK Isokontrolle: Mouse IgG1 FITC (Durchflusszytometrie)	Kat. Nr. 11-0299-41	eBioscience; Waltham, USA
Anti-ITG $\beta$ 2-AK Isokontrolle: Mouse IgG1 APC (Durchflusszytometrie)	Kat. Nr. 551060	BD Bioscience; San Jose, USA
Anti-ITG $\beta$ 3-AK Isokontrolle: Mouse IgG1 FITC (Durchflusszytometrie)	Kat. Nr. 336403	BioLegend; San Diego, USA
Anti-ITG $\beta$ 4-AK	Kat. Nr. 51-1049-82	eBioscience;

*Material und Methoden*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produktname/Mischung</b>	<b>Hersteller</b>
Isokontrolle: Rat IgG2b e-Fluor 660 (Durchflusszytometrie)		Waltham, USA
Anti-ITG $\beta$ 7-AK Isokontrolle: Mouse IgG1 FITC (Durchflusszytometrie)	Kat. Nr. FAB4669F	R&D Systems; Minneapolis, USA
BSA	Bovine Serum Albumin	GE Healthcare; Pasching, Österreich
Deckglas (Neubauer Zählkammer)	Menzel-Gläser 20x26mm, Stärke 0,4mm (631-0900)	Menzel GmbH; Braunschweig, Germany
Demaskierungslösung	Target-Retrieval Solution, Concentrated 10x (Kat. Nr. S1699)	Dako Denmark A/S; Glostrup, Denmark
DNeasy® Kit	DNeasy® Blood & Tissue Kit (Kat. Nr. 69504)	Qiagen GmbH; Hilden, Germany
DPBS	Gibco® DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 500mL [+]CaCl <sub>2</sub> [+]MgCl <sub>2</sub> (Kat. Nr. 14040-091)	Gibco by life technologies; Carlsbad, USA
EDTA-Röhrchen	Mikro-Progengefäß 1,3mL K3E (Kat. Nr. 41.1504.015)	Sarstedt AG & Co; Nümbrecht, Germany
Eindeckmittel	Eukitt® Eindeckmittel	O. Kindler GmbH; Freiburg, Germany
ELISA-Reader	MAX 002 Dias Microplate Reader	Dynex Technologies; Guernsey, Great Britain
Endothel-Medium	Endothelial Cell Medium (Kat. Nr. 1001) 25 ml of fetal bovine serum (FBS, Cat. No. 0025), 5 ml of endothelial cell growth supplement (ECGS, Cat. No. 1052)	ScienCell Research Laboratories; Carlsbad, USA

*Material und Methoden*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produktname/Mischung</b>	<b>Hersteller</b>
	and 5 ml of penicillin/streptomycin solution (P/S, Cat. No. 0503).	
Eppendorf Gefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG; Hamburg, Germany
Excel	Microsoft® Excel 15.39	Microsoft Corporation; Redmond, USA
FACS Puffer	500 mL PBS (Gibco) + 1% BSA + 0,05% NaN <sub>3</sub>	
FACS-Röhrchen	Röhre 3,5mL (Kat. Nr. 55.484)	Sarstedt; Nürnbrecht, Germany
FBS	Heat Inactivated Fetal Bovine Serum	Gibco by life technologies; Carlsbad, USA
FCS Express	FCS Express 4	DeNovo Software; Glendale, USA
Filtertopkäfing	GM500 Mouse IVC Green Line	Tecniplast S.p.A.; Buguggiate, Italy
Flowzytometer	CyFlow® Cube 8 Sorter	Sysmex Partec GmbH; Görlitz, Germany
Flussskammer	1 µ-Slide VI 0.4	Ibidi GmbH; Martinsried, Germany
Gefrierbox	CoolCell®	BioCision; San Rafael, USA
GraphPad Prism	GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software; San Diego, USA
Hämalaun	Mayers Hämalaunlösung (Kat. Nr. 109249)	Merck KGaA; Darmstadt, Germany
HE Färbeautomat	Shandon Varistain 24-4	Thermo Electron Cooperation; Waltham, USA



*Material und Methoden*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produktname/Mischung</b>	<b>Hersteller</b>
Infusionspumpe	KDS-100-CE Legacy Syringe Pump	KD Scientific; Holliston, USA
Inkubator	HERAcell CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus; Hanau, Germany
Kaninchenserum	Rabbit Serum (Normal) (Kat. Nr. X0902)	Dako Denmark A/S; Glostrup, Denmark
Ketamin	Ketamin 10% (100mg/mL)	WDT; Garbsen, Germany
Klebefolie (PCR)	Light Cycler® 480 Sealing Foil (Kat. Nr. 04729757001)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany
Kryomedium	cryo-safe I 50mL (Kat. Nr. KM-11-D)	c. c. pro; Oberdorla, Germany
Kryoröhrchen	Nunc™ Kryoröhrchen 1,0mL (Kat. Nr. 377224)	Thermo Fischer Scientific; Roskilde, Denmark
Kugelmüchel	TissueLyser II (Kat. Nr. 85300)	Qiagen GmbH; Hilden, Germany
Matrigel	Matrigel® Matrix Basement Membrane (Kat. Nr. 354234)	Corning, Inc.; New York, USA
Mikroskop (Zellkultur)	Axiovert 35	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Germany
Mikroskop (Ädhäsionsassay)	Axiovert 200	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Germany
Mikroskop Kamera	AxioCam ERc 5s	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Germany
Mikrotom	MICROM HM 430 Schlittenmikrotom (Kat. Nr. 910010)	Thermo Scientific; Waltham, USA
Mirax	Mirax Midi (Kat. Nr. 15020000161)	Carl Zeiss Microimaging GmbH;

*Material und Methoden*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produktname/Mischung</b>	<b>Hersteller</b>
		Jena, Germany
NanoDrop®	NanoDrop Spektralphoto- meter ND-100	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Germany
Neubauer-Zählkammer	Zählkammer, 0,1mm Tief, 0,0025mm <sup>2</sup>	LO – Laboroptik; Lancing, UK
Objektträger	HistoBond® Objektträger (Kat. Nr. 081000)	Marienfeld; Lauda Königshof, Ger- many
PCR Kit	LightCycler® FastStart SYBR Green I Master (Kat. Nr. 04707516001)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany
PCR-Analysesystem	LightCycler® 480 Instru- ment II	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin 100mL [+] <sup>5000</sup> U/mL Penicillin [+] <sup>5000</sup> µg/mL Streptomycin (Kat. Nr. 15070-063)	Gibco by life technologies; Carlsbad, USA
Perfusorspritze (Flussver- such)	Luer-Lok™-Spritze 20mL (Kat. Nr. 300629)	Becton, Dickinson and Company Limited; Drogheda, Ireland
Permanent Red	Permanent AP Red Kit (Kat. Nr. ZUC001-125)	Zytomed Systems; Berlin, Germany
Pipetten	Serologische Pipetten (verschiedene Größen)	Sarstedt; Nürnbrecht, Germany
Pipettierhilfe	Pipetus® (Kat. Nr. 9907200)	Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt, Germany
Primärantikörper (ITGB4 Färbung)	Anti-Integrin beta 4 anti- body (Kat. Nr. ab110167)	Abcam plc; Cambridge, UK
Primärantikörper Iso- typkontrolle (ITGB4- Färbung))	Rat-IgG2b 0,2mg, 1mL (Kat. Nr. CN230020)	Antigenix America, Inc.;; Huntington Station, USA

*Material und Methoden*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produktname/Mischung</b>	<b>Hersteller</b>
RPMI 1640 Medium	RPMI 1640 Medium [+] L-Glutamine 500mL (Kat. Nr. 21875-034)	Gibco by life technologies; Carlsbad, USA
Schraubröhre	Röhre 50mL (Kat. Nr. 62.559.001)	Sarstedt; Nürnbergrecht, Germany
Sedaxylan	Xylazin 20mg/mL	WDT; Garbsen, Germany
Sekundärantikörper (ITGB4 Färbung)	Biotin-SP-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Rat IgG + IgM (H+L) (minimal cross-reaction to Human Serum Proteins) (Kat. Nr. 312-065-048)	Jackson Immuno Research, Inc.; West Grove, USA
Spritzenfilter	Nalgen™ 25mm Spritzenfilter 0,2µm (Kat. Nr.728-2020)	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Spritzenpumpenleitung	Injectomat® Line 150cm (Kat. Nr. 9004132)	Fresenius Kabi AG; Bad Homburg, Germany
T75-Zellkulturflasche	TC-Flasche T75 (Kat. Nr. 83.3911)	Sarstedt; Nürnbergrecht, Germany
TBS	Tris Buffered Saline: 30,29g Trizma Base + 43,54g NaCl + 100mL HCl mL [2 mol/L] auf 5L Aqua dest. (pH=7,6)	
TBS-T	Tris Buffered Saline + Tween 20: 30,29g Trizma Base + 43,54g NaCl + 100mL HCl mL [2 mol/L] auf 5L Aqua dest. + 1mL Tween 20	
TNF $\alpha$	Recombinant human TNF $\alpha$ (Kat. Nr. 300-01A)	PeproTec, Inc.; Rocky Hill, USA

*Material und Methoden*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produktname/Mischung</b>	<b>Hersteller</b>
Trypsin	Trypsin-EDTA (0,05%) 100mL (Kat. Nr. 25300-054)	Gibco by life technologies; Carlsbad, USA
Wärmeplatte	Typ 14501	MEDAX GmbH & Co. KG; Neumünster, Germany
Wärmeschrank (histologische Schnitte)	Melag	Wilke und Witzel For- schungs- und Laborbedarf Medizintechnik; Hamburg, Germany
Weißkappenröhrchen	Multipurpose Container 30mL (Kat. Nr. 201170)	Greiner Bio-One; Stonehouse, UK
Werkbank	Sicherheitswerkbank HERAsafe HS 18	Heraeus; Hanau, Germany
XTT	Cell Proliferation Kit II (Kat. Nr. 11465015001)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany
Zellkulturmedium	RPMI 1640 Medium 500mL + 10% FBS + 1% PenStrep + 275µL Pu- romycin	
Zentrifuge	Universal 320 R	Hettich; Tuttlingen, Germany

**Tab. 1:** Verzeichnis der genutzten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Medikamente und Biologicals, die nachfolgend im Text mit dem Namen, der unter „Bezeichnung“ vermerkt ist, aufgeführt sind.

## 3.2. Zellversuche (in vitro)

### 3.2.1. Zelllinie

Die Magenkarzinomzelllinie GC5830 stammt aus einem niedrig differenzierten (G3) pT4 pN1 (2/30) L1 V1 Adenokarzinom des Magens eines Patienten, welcher 2009 eine totale Gastrektomie in der Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erhielt (Nentwich, UKE).

### 3.2.2. Integrin $\beta$ 4 k.d. Etablierung

Um den in der Arbeitshypothese erdachten Effekt des Integrin  $\beta$ 4 auf das Metastasierungsverhalten der Magenkarzinom-Zelllinie GC5830 zu untersuchen, bedurfte es einer Vergleichsmöglichkeit von GC5830 Zellen, die das Integrin  $\beta$ 4 normal, und GC5830 Zellen, die nur noch wenig bis kein Integrin  $\beta$ 4 exprimieren.

Dazu wurde im Vorhinein dieses Projektes eine shRNA (short-hairpin RNA) mit der Nukleotidsequenz 5'  $\rightarrow$  3' CGAGAAGCTTCACACCTAT in einen pLVX-shRNA1-Vektor kloniert und anschließend in das Genom der Zellen integriert. Die transduzierte RNA-Sequenz bewirkte nach Transkription die Bindung und den Abbau der für die Integrin  $\beta$ 4-Expression nötige mRNA, wodurch ITGB4 k.d. Zellen generiert wurden. Als Kontrolle dienten Zellen, denen ein Kontrollvektor (LUC), der die LUCiferase-entsprechende shRNA-Sequenz trägt, transduziert wurde. Dies sollte keine Auswirkung auf humane Zellen haben, da diese das Gen für Luciferase nicht exprimieren.

Da den Zellen zusätzlich eine Puromycin-Resistenz transduziert wurde, konnten sie von den nicht-transduzierten Zellen mittels Puromycin-Gabe selektiert werden.

Über die FACS-Analyse wurden die Zellen anschließend auf ihre Integrin  $\beta$ 4-Expression hin untersucht und jene mit der niedrigsten Expression für weitere Zellkulturversuche ausgewählt.

In hiesiger Versuchsreihe wurden die GC5830 LUC und die GC5830 ITGB4 k.d. Zellen genutzt. Die ursprüngliche Zelllinie GC5830 par (Parenteralzelllinie) kam bis auf einen Vorversuch nicht zur Anwendung in dieser Arbeit.

### 3.2.3. Zellkultur

Die Kultivierung der verwendeten humanen Magenkarzinomzelllinie GD5830 erfolgte im Brutschrank unter Standardbedingungen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 16040 Medium mit 10% FCS. Dies geschah unter standardisierten S1-Laborbedingungen.

Alle zwei Tage wurde das Zellwachstum lichtmikroskopisch kontrolliert. Die konfluent wachsenden Zellen mussten im Schnitt alle 4-5 Tage passagiert werden. Der Zeitpunkt wurde dabei mittels eines persönlichen visuellen Cut-offs festgelegt (ca. 70-80% Konfluenz der Zellen).

Um die adhärent wachsenden Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen, wurde zunächst der Mediumüberstand abgesaugt und 5 mL DPBS zum Spülen hinzugegeben. Nach erneutem Absaugen dieses Überstandes wurden die Zellen 5 Minuten mit 2 mL Trypsin inkubiert. Um die Trypsinisierung zu stoppen, wurden 5 mL RPMI 1640 Medium hinzupipettiert. Anschließend waren die Zellen durch vorsichtiges Rütteln und nach mehrmaligem Spülen mit einer Pipette leicht vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen. Von den circa 7 mL Überstand wurde 1 mL in eine neue Zellkulturflasche, in der bereits 15 mL neues Kulturmedium vorgelegt waren, überführt – die restliche Zellsuspension wurde verworfen.

### 3.2.4. Zentrifugation der Zellen

Während aller Zellversuche wurde stets unter gleichen Bedingungen zentrifugiert:

- 1500 UpM
- 5 min
- in 4°C Umgebungstemperatur

### 3.2.5. Konditioniertes Medium

Im Überstand von Zellkulturen können sich autokrine Wachstumsfaktoren befinden, welche im Laufe der Zeit von den Zellen sezerniert wurden.

Um nun diese Wachstumsfaktoren für spätere Versuche nutzen zu können, wird der Überstand zunächst abpipettiert und von möglichen Zellüberresten befreit. Dies wurde mittels Spritzenfilter erreicht werden. Der so gewonnene zellfreie Überstand, das sogenannte konditionierte Medium, wurde bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert und bei Bedarf im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  wieder aufgetaut.

### 3.2.6. Zellzählung

Zur Quantifizierung der in einer Zellsuspension enthaltenen Zellen, kann die Zellkonzentration mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt werden.

Dazu wurde die Zellsuspension zunächst mit DPBS im Verhältnis 1:10 verdünnt (hier:  $90\ \mu\text{L}$  der Zellsuspension mit  $910\ \mu\text{L}$  DPBS).  $10\ \mu\text{L}$  dieser Verdünnung wurden im Anschluss unter das Deckglas der Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellzahl für diese definierte Menge bestimmt. Nach Auszählung aller 4 Eckquadrate (s. Abbildung)

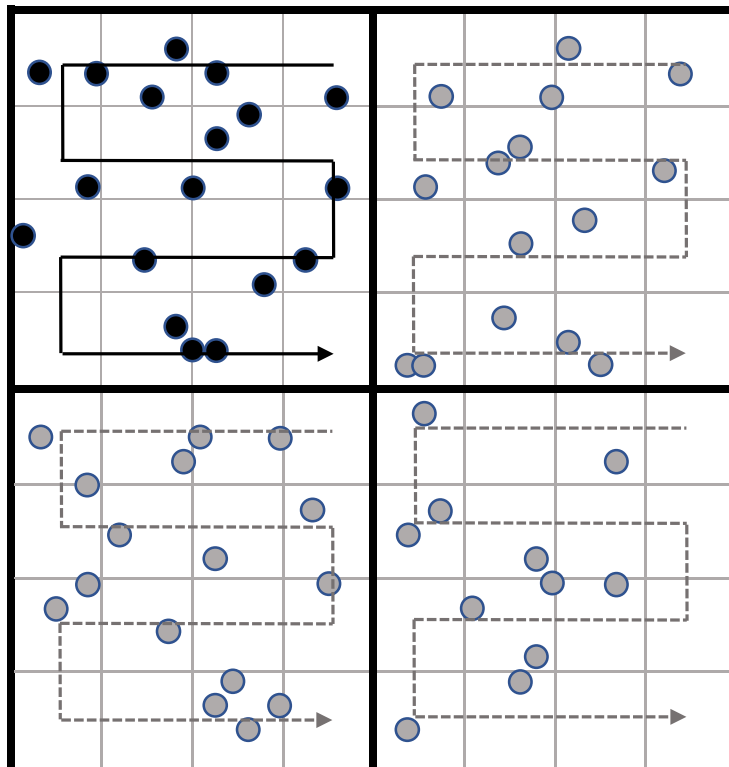


Abb. 5: Schema der meanderförmigen Auszählung der Zellen in einer Neubauer-Kammer (Schema aus eigener Anfertigung)

wurde durch die dadurch erhaltene Zellzahl die Zellkonzentration der Suspension wie folgt bestimmt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} \times 10 [\text{Verdünnung}] \times 10^4 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL} [\text{Zellsuspension}]}$$

### 3.2.7. Kryokonservierung und Rekultivierung der Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum lagerungsfähig zu machen, müssen sie eingefroren werden. Dazu wurde die Zellsuspension, in der sich die bereits abgelösten Zellen befanden (siehe Trypsinierung), in ein Weißkappenröhrchen überführt und zentrifugiert. Nachdem Absaugen des Überstandes, wurde das übrig gebliebene Zellpellet in 5 mL Kryomedium resuspendiert und jeweils 1 mL der Zellsuspension auf 5 Kryoröhrchen verteilt. Anschließend wurde darauf geachtet die Zellen möglichst schonend einzufrieren. Daher wurden die Kryoröhrchen während des Gefriervorgangs in einer Gefrierbox gelagert. Dieser gewährleistet bei -80 °C Umgebungstemperatur ein konstantes Gefrieren der Proben bei -1 °C/min.

Um die Zellen zu rekultivieren, wurden die jeweilige Probe im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und im Anschluss zügig in eine Zellkulturflasche überführt, in dem puromycinfreies RPMI Medium vorgelegt wurde.

Dabei ist es sinnvoll eine T25-Zellkulturflasche zu wählen. Durch den kleineren Flaschenboden befinden sich die Zellen nach dem Aussäen dichter beieinander und können sich autokrin besser stimulieren.

### 3.2.8. Durchflusszytometrie/FACS

Für die FACS-Analyse wurden pro Ansatz 500 µL Zellsuspension mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL in kleine Eppendorf Gefäße überführt und anschließend zentrifugiert. Währenddessen wurden sowohl die Antikörper, als auch ihre jeweiligen Isotypkontrollen mit einer Endkonzentration von 1 µg/mL in je 100 µL FACS-Puffer



gelöst. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in diesem FACS-Puffer-Antikörper-Gemisch resuspendiert und im Dunkeln auf Eis inkubiert – nach 15-20 min sollten die Antikörper an die jeweiligen Antigene (AG) der Zellen gebunden haben.

Nun wurden die Zellen mit zusätzlichen 2 mL FACS-Puffer gemischt und in FACS-Röhrchen überführt. Dieses Gemisch wurde im Anschluss mit dem Durchflusszytometer analysiert und mit dem Programm FCS Express ausgewertet.

### 3.2.9. Adhäsionsassay unter Flussbedingungen

Pro Flusskammer des Ibidi Treats werden 30  $\mu\text{L}$  einer Endothelzellsuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL) aus HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) gegeben, die, nachdem zusätzlich pro Zu- und Ablauf weitere 60  $\mu\text{L}$  Endothelmedium hinzu pipettiert wurden, über Nacht inkubiert werden. Über Nacht konfluieren die HUVECs und bilden in den Flusskammern Monolayer, die danach zur Versuchsvorbereitung mit  $\text{TNF}\alpha$ , welches mit Medium auf 10 ng/mL verdünnt wurde, stimuliert werden. Danach werden 10mL der Tumorzellsuspension ( $10^5$  Zellen/mL) in eine 20 mL Perfusorspritze aufgezogen, die über eine Spritzenpumpenleitung mit den Flusskammern verbunden ist. Über eine Infusionspumpe wird die Tumorzellsuspension mit einer Geschwindigkeit von 8,4 mL/h durch die Flusskammern geleitet und diese mittels Mikroskop beobachtet und gefilmt. Dabei betrachtet man jeweils drei Blickfelder für eine Minute. Die dabei vorbeifließenden Zellen und ihr Flussverhalten können anschließend mit der CapImage-Software ausgewertet werden. Es wurde hierbei unterschieden zwischen:

1. Adhäsion: die Zellen bleiben dauerhaft am Endothel haften
2. Tethering: die Zellen haften und rollen abwechselnd über das Endothel
3. Rolling: die Zellen rollen über das Endothel, ohne fest anzuheften

### 3.2.10. Zellproliferationsassay

Von den GC5830 LUC, als auch von den GC5830 ITGB4 k.d. wurde jeweils eine Zellsuspension mit der Konzentration von 30.000 Zellen/mL hergestellt. Pro Zelllinie wurden auf 30 Näpfe einer 96-Napf-Platte je 100  $\mu$ L Zellsuspension verteilt (siehe Pipettierschema Proliferationsassay) und anschließend bei 37  $^{\circ}$ C für 3-4 Tage inkubiert.

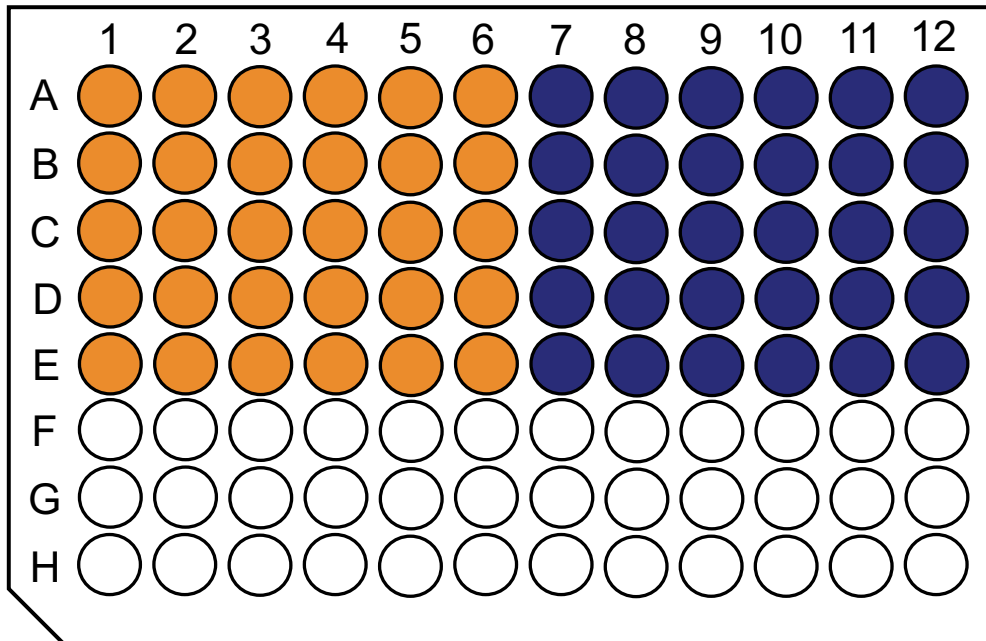


Abb. 6: Pipettierschema des Proliferationsassays. ● LUC Zellen, ● ITGB4 k.d. Zellen

Um die Zellproliferation nach dieser Zeit messen zu können, wurden 6 mL XTT Labeling Reagenz mit 120  $\mu$ L Electron Coupling Reagenz (Cell Proliferation Kit II, Roche) gemischt und 50  $\mu$ L dieser Mischung in jede der 60 Näpfe pipettiert. Nach 4-6 Stunden Inkubation wurde die Extinktion photometrisch mittels ELISA-Reader gemessen.

### 3.2.11. Colony forming assay in Softagar

Für den Assay wurde mit PBS und 2-Hydroxyethylagarose zunächst ein 2%iger Agar hergestellt. Anschließend wurde ein 0,8%iges Agarose-Medium-Gemisch erzeugt (6 Teile RPMI 1640 Medium, 4 Teile 2%ige Agarose). Pro Napf einer 24-Napf-Platte wurden 250 µL pipettiert und zum Aushärten 30 min in den Kühlschrank gestellt. Auf diese Schicht wurde anschließend 250 µL eines Gemisches aus 2%iger Agarose und einer Zellsuspension (1000 Zellen/mL) in einer Endkonzentration von ca. 0,3% pipettiert. Dieses Gemisch wurde erneut für 20 min im Kühlschrank gekühlt und danach im Inkubator (bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub>) gelagert. Erst nach 5 Tagen Inkubation wurde pro Napf 1 mL Zellkulturmedium (entweder konditioniertes, oder unkonditioniertes) pipettiert. Anschließend wurde das Medium einmal wöchentlich gewechselt, um konstante Bedingungen für die Zellen zu schaffen.

Am Ende des Versuchs wurde die Anzahl, Morphologie und Größe der jeweiligen Kolonien mikroskopisch gemessen und ausgewertet.

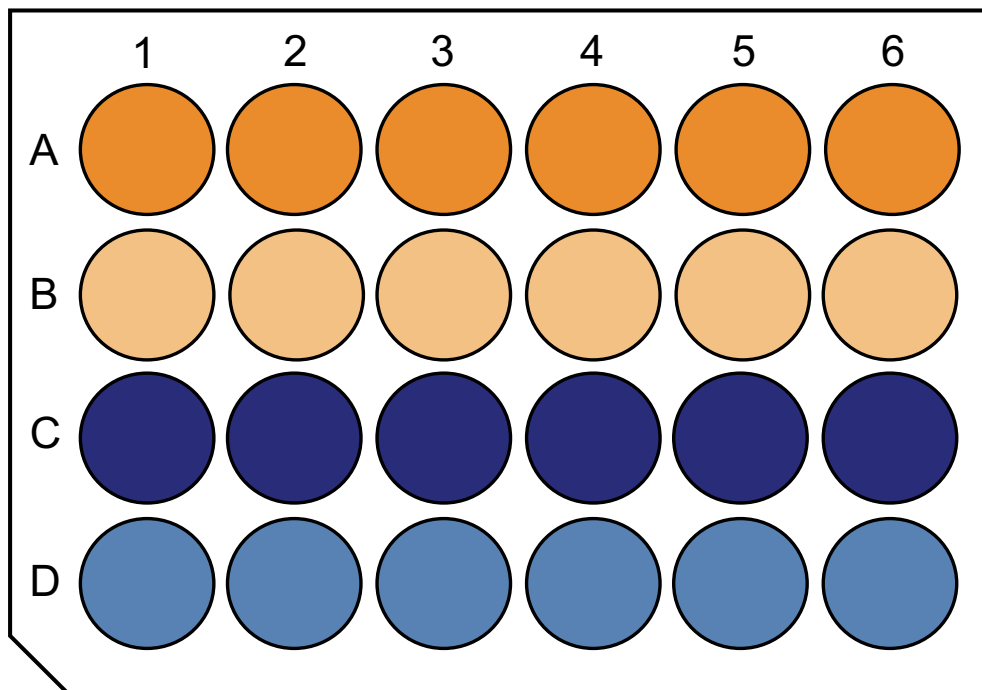


Abb. 7: Pipettierschema colony forming assay in Softagar. ● LUC Medium / LUC Zellen, ● ITGB4 Medium / LUC Zellen, ● LUC Medium / ITGB4 Zellen, ● ITGB4 Medium / ITGB4 Zellen

### 3.2.12. Colony forming assay in Matrigel

Beim Matrigel-gestützten *colony forming assay* wurde statt einer 24- eine 96-Napf-Platte verwendet. Diese wurde zunächst im Inkubator bei 37°C für eine Stunde vorgewärmt.

Pro Zelllinie wurden daraufhin 1,5 mL kaltes Matrigel mit 1,5 mL kalter Medium-Zellsuspension (1000 Zellen/mL bzw. 1200 Z/mL) gemischt und jeweils 50 µL dieser Mischung pro Napf pipettiert. Nach weiteren 30 Minuten im Inkubator ist die Matrigel-Zell-Suspension erhärtet. Auf die erhärtete Matrigel-Zell-Suspension wurde anschließend pro Napf 200 µL des jeweiligen konditionierten Mediums pipettiert.

Die LUC Zellen erhielten LUC Medium, die ITGB4 k.d. Zellen sowohl das LUC, als auch das ITGB4 k.d. Medium (siehe Pipettierschema Matrigel), zusätzlich gab es eine Kontrollreihe mit normalem RPMI 1640 Medium ohne Puromycin (diese wurde im Pipettierschema nicht aufgetragen).

Das Medium wurde nach Sichtbarwerdung der ersten Kolonien erneuert, anschließend im Schnitt alle 3-4 Tage. Nach 2-3 Wochen wurde die Größe, Anzahl und Morphologie der entstandenen Kolonien mikroskopisch gemessen und daraufhin ausgewertet.

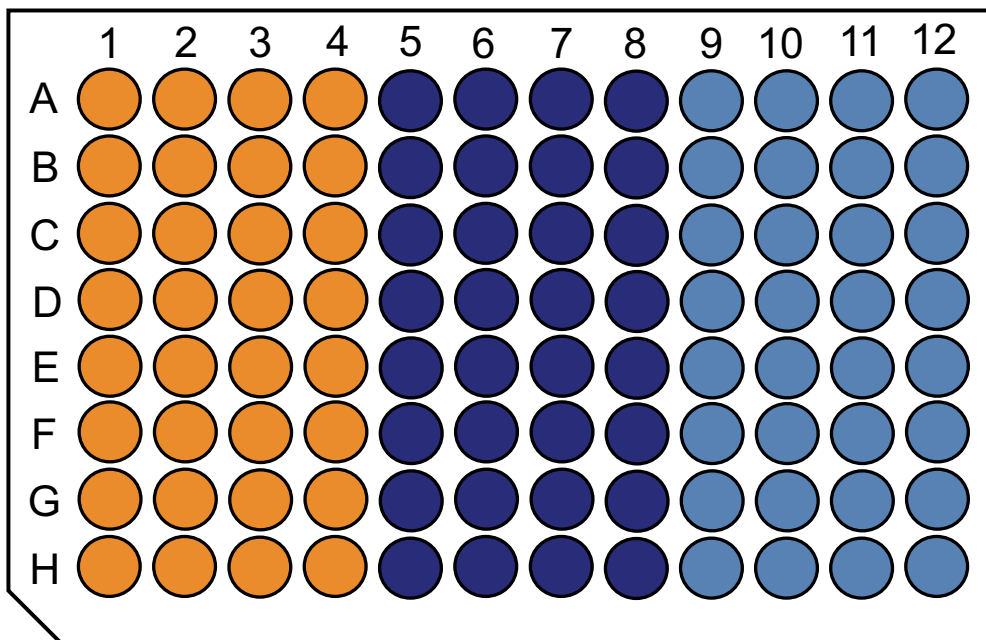


Abb. 8: Pipettierschema colony forming assay in Matrigel. ● LUC Medium / LUC Zellen, ● LUC Medium / ITGB4 Zellen, ● ITGB4 Medium / ITGB4 Zellen

### 3.3. Tierversuche (*in vivo*)

#### 3.3.1. Xenograftmodell

Es wurden zwei Tierversuche desselben Aufbaus durchgeführt. Die Kontrollgruppe umfasste insgesamt 51 ( $n_1 = 21$ ,  $n_2 = 31$ ) SCID, die Experimentalgruppe 50 ( $n_1 = 19$ ,  $n_2 = 31$ ) SCID-select Mäuse. Dabei erhielt die eine Hälfte einer jeden Tiergruppe die LUC, die andere Hälfte die ITGB4 k.d. Zellen. Bei der Inokulation wurden hierbei jedem Tier intraperitoneal  $1 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ L RPMI 1640 Medium (puromycinfrei) appliziert. Vor Injektion wurden die Zellen auf Mykoplasma-Kontamination überprüft und negativ getestet.

Insgesamt waren es vier Gruppen, die wie folgt bezeichnet wurden

- A) SCID / LUC
- B) SCID-select / LUC
- C) SCID / ITGB4 k.d.
- D) SCID-select / ITGB4 k.d.

Im ersten Tierversuch (1) setzten sich die Tiere zu Versuchsbeginn aus 17-26 Wochen alten Mäusen zusammen. In Gruppe A waren 9 Männchen, in Gruppe B 10 Männchen, in Gruppe C 10 Männchen und in Gruppe D 2 Weibchen und 8 Männchen.

Im zweiten Tierversuch (2) setzten sich die Tiere zu Versuchsbeginn aus 11-30 Wochen alten Mäusen zusammen. Gruppe A bestand aus 7 Weibchen und 8 Männchen, Gruppe B aus 6 Weibchen und 10 Männchen, Gruppe C aus 8 Weibchen und 8 Männchen und Gruppe D aus 7 Weibchen und 9 Männchen.

Der Tierversuch wurde als Endpunktversuch durchgeführt. Dabei wurde der Zeitpunkt des Versuchsabbruches abhängig gemacht vom Zustand des Großteils der Tiere einer Gruppe. In (1) war dieser Zeitpunkt nach 56 Tagen, in (2) nach bereits 42 Tagen. Unabhängig vom Endpunkt mussten im Vorhinein bereits einige Tiere getötet werden, bei denen sich vorher festgelegte Abbruchkriterien manifestierten. Diese waren tumorbedingte Hautulzera und Symptome von Aszites oder eines Lymphoms.

## Material und Methoden

	SCID		SCID/SELECT	
	LUC	ITGB4	LUC	ITGB4
1. Tierversuch	geb.: 02.04.14 9x♂	geb.: 02.04.14 10x♂	geb.: 14.03.14 3x♂ 20.03.14 2x♂ 12.03.14 1x♂ 10.03.14 2x♂ 13.02.14 2x♂	geb.: 13.02.14 2x♀ 14.04.14 1x♂ 12.04.14 3x♂ 26.02.14 1x♂ 28.02.14 3x♂
	beimpft: 14.08.14 getötet: 08.10.14	beimpft: 14.08.14 getötet: 09.10.14	beimpft: 14.08.14 getötet: 08.10.14	beimpft: 14.08.14 getötet: 09.10.14
n	9	10	10	10
2. Tierversuch	geb.: 03.03.16 7x♀ 03.03.16 8x♂	geb.: 03.03.16 8x♀ 03.03.16 8x♂	geb.: 12.02.16 2x♀ 29.01.16 1x♀ 22.01.16 1x♀ 24.11.15 2x♀ 28.03.16 3x♂ 23.03.16 2x♂ 12.02.16 1x♂ 16.01.16 1x♂ 26.12.15 1x♂ 16.11.15 1x♂	geb.: 23.03.16 3x♀ 07.03.16 4x♀ 07.03.16 2x♂ 29.01.16 2x♂ 17.12.15 2x♂ 09.12.15 1x♂ 01.12.15 2x♂
	beimpft: 17.06.16 getötet: 28.07.16	beimpft: 17.06.16 getötet: 28.07.16	beimpft: 17.06.16 getötet: 27.07.16	beimpft: 17.06.16 getötet: 28.07.16
n	15	16	15	16

**Tab. 2: Inokulationsschema des Xenograftmodells.** Dargestellt ist die pro Tierversuch eingesetzten Anzahl an Tieren, deren Spezifität (SCID vs. SCID-select), deren Geburtsdatum, Geschlecht, das Datum der Inokulation, die implantierte Zelllinie und das Datum der Tötung.

### 3.3.2. Tierhaltung

Die Tiere wurden unter Standardbedingungen (20°C ±1 °C, 50% rel. Luftfeuchtigkeit, zirkadiane Rhythmik: Dunkelphasen 19:00 – 7:00 Uhr) in Filter-Top-Käfigen gehalten. Die Tiere erhielten Einstreufutter und steriles Wasser *ad libitum* und wurden täglich anhand ihrer Aktivität, des Nahrungsverhaltens und ihres Fells begutachtet.

Die Tiere des ersten Tierversuchs aus dem Jahr 2014 liefen unter der Versuchsnummer 88/09, die des zweiten Tierversuchs aus dem Jahr 2016 unter der Versuchsnummer 69/15. Die Versuchsvorhaben wurde nach § 8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1207, 1313) vom Amt für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt.

### 3.3.3. Gewebeentnahme

Von einer jeden Maus wurde das Blut, das Knochenmark, die Lunge, die Leber, gastrointestinale Organe (Magen, Darm und Milz) und der Primärtumor (Nadelstichtumor), falls vorhanden, entnommen.

Nach Betäubung des Tieres durch eine Überdosis aus Ketamin und Sedaxylan die sich zusammensetzte aus

$$\frac{240 \text{ mg Ketamin} + 32 \text{ mg Sedaxylan}}{\text{kg Körpergewicht [ Tier ]}}$$

wurde das Blut des Tieres über eine perkutane Herzpunktion entnommen. Das so gewonnene Blut wurde in EDTA-Röhrchen bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert. Um das Tier vor Organentnahme zu töten, erfolgte eine zervikale Disklokation.

Im ersten Schritt der Präparation des Tieres wurde das Knochenmark nach Entfernung der proximalen und distalen Femur- und Tibiakondylen durch Spülung der Röhrenknochen mit 1 mL NaCl-Lösung separiert. Da das Blut und das Knochenmark hierbei ausschließlich zur Bestimmung der DNA durch die Alu-PCR (s. Alu-PCR) genutzt wurden, wurden diese Proben direkt in flüssigem Stickstoff gefroren und daraufhin bei -80 °C gelagert.

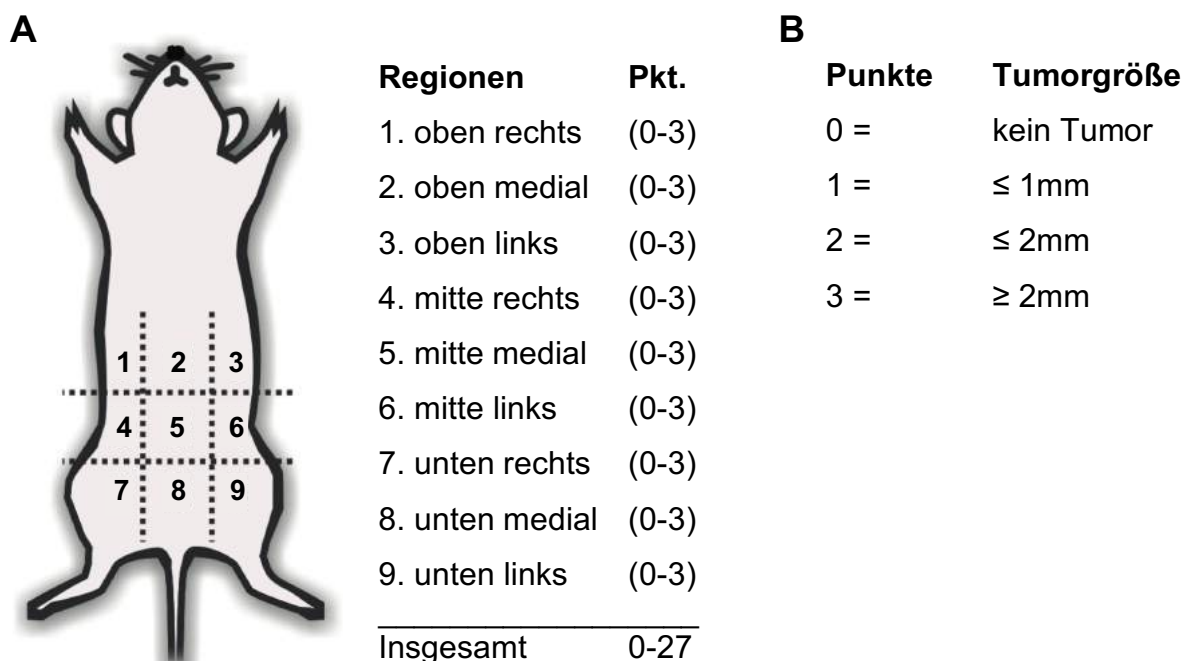
In Rückenlage erfolgte die Eröffnung des Situs des Tieres. Zunächst wurden beide Lungenflügel entnommen - der eine wurde, wie auch das Knochenmark, für die Alu-PCR weggefroren, der andere für die Histologie 24 Stunden in 4%-Formalin-Lösung fixiert. Nachdem das Abdomen des Tieres auf tumoröse Veränderungen hin untersucht und nach PCI (peritonealer Krebs-Index) eingeteilt wurde, wurden die oben bereits genannten Organe entnommen und ebenfalls in für eine mögliche histologische Untersuchung in Formalin fixiert. Der Nadelstichkanal-Tumor, der aus Tumorzellen entstand, die nach Injektion im Stichkanal zurückblieben und dort angewachsen sind, wurden vor dem fixieren zusätzlich gewogen.

Die Gewebsentnahme wurde vollständig protokolliert und archiviert.

### 3.3.4. Peritonealer Krebs-Index (PCI)

Um die Tumormasse der peritonealen Metastasierung zu quantifizieren und damit Aufschluss über die Malignität des Tumors zu erhalten, hat sich beim Menschen der Peritoneale Krebs-Index (engl. peritoneal cancer index = PCI) als Scoring-System etabliert. Dabei wird das Abdomen in neun Regionen und zusätzlich der Dünndarm (von proxi. Jejunum bis dist. Ileum) in vier Abschnitte unterteilt. Jeder dieser 13 Bereiche kann, je nach Tumorgöße, 0-3 Punkte erhalten. Dabei entsprechen 0 Punkte einem makroskopisch negativen Befund, 1 Punkt Tumorgößen  $\leq 0,5$  cm, 2 Punkte Tumorgößen  $\leq 5$  cm und 3 Punkte Tumorgößen  $> 5$  cm. Dementsprechend beträgt der Maximalscore 39 (Sugarbaker 2010).

Bei der Auswertung des Tierversuchs wurde auf die zusätzliche Unterteilung der Dünndarmabschnitte verzichtet. Die pro Region entdeckten Tumoren wurden der Umsetzbarkeit halber nach keinen absoluten Kriterien klassifiziert. Nach Exploration wurden sie visuell unterteilt, dabei entsprachen 1 Punkt in etwa Tumorgöße  $\leq 1$ mm, 2 Punkte Tumorgöße  $\leq 2$  mm und 3 Punkte Tumorgößen  $\geq 2$  mm. Entsprechend dieser Kriterien war der maximal zu erreichende Punktwert 29 (s. Abb. 9)



**Abb. 9: Illustration des Peritonealen Krebs-Index.** (A) Regionen und mögliche Punktwerte von 0-3. Modifiziert nach Sugarbaker (2010) (B) Punktesystem nach Tumorgöße. Modifiziert nach Cho et al. (2014)



### 3.4. Untersuchung muriner Gewebeproben auf humane DNA

#### 3.4.1. Isolierung von DNA

Aus 200  $\mu$ L EDTA-Vollblut, sowie  $1 \times 10^6$  Referenzzellen (GC5830) in 200  $\mu$ L DPBS wurde die DNA nach Herstellerangaben mit Hilfe des DNeasy® Blood Kit isoliert. Die Elution der DNA erfolgte im Anschluss in einem Volumen von 200  $\mu$ L.

Das Lungengewebe und die Knochenmarkprobe mussten zunächst lysiert werden. Dazu wurde im ersten Schritt das Lungengewebe in einer Kugelmühle in 150  $\mu$ L DPBS gemahlen und das Knochenmark zentrifugiert und in 200  $\mu$ L DPBS resuspendiert. Im zweiten Schritt erfolgte die Lysierung dieser Proben nach Herstellerangaben mittels DNeasy® Tissue Kit und die anschließende DNA-Isolierung aus 100  $\mu$ L des Lungengewebes und 200  $\mu$ L der Knochenmarkprobe.

#### 3.4.2. Konzentrationsbestimmung der DNA

Für die Konzentrationsbestimmung wurden 1  $\mu$ L einer jeden Probe auf die Messoberfläche pipettiert. Die Analyse der Probe erfolgte automatisch durch das NanoDrop™-Spektralphotometer.

Dieser Schritt wurde jeweils zweifach durchgeführt und die Ergebnisse im Anschluss gemittelt.

#### 3.4.3. Alu-PCR

Mit einer Alu-PCR ist es möglich, Alu-Sequenzen mittels real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in murinen Gewebeproben zu quantifizieren.

Dazu wurde eine Standardreihe aus extrahierter DNA der humanen Tumorzelllinie mit Kontroll-DNA einer tumorfreien Maus des entsprechenden Mausstamms erstellt. Dabei entsprach die Standardreihe der DNA-Menge von  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^0$  Zellen pro Probe. Hierdurch war es möglich, über die Ergebnisse der Standardreihe auf die Anzahl der disseminierten Tumorzellen in den Blut-, Knochenmark- und Lungenproben der Mausmodelle zu schließen.

Für die Analyse wurden in die Näpfe einer 96-Napf-PCR-Platte zunächst 8  $\mu\text{L}$  Master-Mix (MM), bestehend aus

- 2,6  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O,
- 0,2  $\mu\text{L}$  Forward Primer (Sequenz 5' → 3' TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA),
- 0,2  $\mu\text{L}$  Reverse Primer (Sequenz 5' → 3' GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT),
- 5,0  $\mu\text{L}$  LightCycler® 480 SYBR Green I Master

und anschließend 2 $\mu\text{L}$  der jeweiligen Proben pipettiert – jede Probe einer jeden Gewebeprobe wurde in Doppelbestimmung analysiert (s. Pipettierschema Alu-PCR). Dies geschah unter ständiger Kühlung sowohl der Proben, als auch der Platte (bei -20 °C).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 <sup>6</sup>	Probe 1										
B	10 <sup>5</sup>	Probe 2										
C	10 <sup>4</sup>	Probe 3										
D	10 <sup>3</sup>	usw.										
E	10 <sup>2</sup>											
F	10 <sup>1</sup>											
G	10 <sup>0</sup>											
H	0											

Abb. 10: Pipettierschema in 96-Napf-PCR-Platte für Blut / Knochenmark / Lunge / Leber. Standardreihe mit Negativkontrolle in A-H 1-2 aufgetragen. Proben in doppelter Ausführung in den restlichen Näpfen.

Nach Befüllen aller Näpfe wurde die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und bei 2000 g für 10 Sekunden zentrifugiert.

Im Anschluss erfolgte die Analyse im Light Cycler gemäß folgendem Protokoll:

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

**Tab. 3: Light Cycler-Protokoll.** Dargestellt sind die Programme, die während der Analyse der DNA-Proben stattgefunden haben

### 3.5. Histologie

#### 3.5.1. Herstellung histologischer Schnittpräparate

Nach Entnahme wurden die Gewebe für 24 Stunden in einer wässrigen 4%igen Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden sie in Paraffin gebettet und so haltbar gemacht.

Zum Schneiden der Gewebe wurden die fertigen Paraffinblöcke in ein Schlittenmikrotom eingespannt. Die obersten Paraffinschichten des Präparates wurden so lange entfernt, bis die ersten Gewebsanteile erreicht wurden. Anschließend wurde das Präparat in seinem Winkel zum Messer so verändert, dass bei der horizontalen Schnittführung des Mikrotoms pro Schnitt so viel Gewebe vorhanden ist, wie ab dieser Ebene möglich. Unter ständiger Kühlung und zusätzlicher Befeuchtung der Präparate betrug die Schichtdicker alle Gewebe, exklusive der Lunge, 4 µm.

Von jedem Präparat wurden 20 Schnitte gefertigt, die nach dem Schneiden für 24 Stunden in einem Wärmeschrank bei 37 °C gelagert wurden und danach bereit zum Färben waren.

### 3.5.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Pro Tier erfolgte die HE-Färbung sowohl der Primärtumoren, als auch der IP-Karzinosen in einem Färbeautomaten. In einem mehrstufigen Programm werden die Schnitte zunächst mit Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach der Spülung der Schnitte in destilliertem Wasser erfolgt zunächst die Hämalaun-Färbung (3 min) und nach erneuter Spülung in destilliertem und nicht-destilliertem Wasser die Färbung in Eosin (3 min). Anschließend wurden die Schnitte zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe und anschließend in Xylol entwässert. Danach waren die Schnitte bereit eingedeckt zu werden.

### 3.5.3. Feulgen

Bei der Feulgen Färbung wird die DNA im Zellkern mit Hilfe der Schiff'schen Reagenz rötlich gefärbt. Danach ist es möglich apoptotische Zellen bzw. Mitosefiguren im Präparat besser zu erkennen.

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert, dies geschah im Färbeautomaten. Anschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült (2-3 min), bevor sie in ein-molarer Salzsäure (HCl) zuerst bei Raumtemperatur (1 min), dann bei 60 °C (4 min) und zuletzt erneut bei Raumtemperatur (1 min) behandelt wurden. Nach kurzer Spülung in destilliertem Wasser wurden die durch den vorherigen Schritt frei gewordenen Aldehydgruppen der DNA nach Reaktion mit einer Schiff'schen Reagenz im Dunkeln (60 min) rötlich gefärbt. Danach wurden die Schnitte in SO<sub>2</sub>-Wasser (2 min), fließendem Wasser (5 min) und destilliertem Wasser gespült. Abschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert, bevor sie bereit waren zum Eindecken.

### 3.5.4. Integrin $\beta$ 4

Nach dem Entparaffinieren der Schnitte wurden diese in Demaskierungslösung (1:10) zweimal für jeweils 4 min in der Mikrowelle bei maximaler Energiezufuhr aufgeköcht. Danach wurden die Schnitte für 40 min bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend zweimal für jeweils 5 min in TBS-T und einmal für 5 min in TBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen vorab zu blockieren, wurde die Schnitte mit Kaninchen-Serum (1:10 in TBS) für 30 min inkubiert.

Nach Abkippen des Serums inkubierten die Schnitt für eine Stunde in der Integrin  $\beta$ 4 Primärantikörper-Lösung (1:25 in AK Diluent), bzw. der Isotypkontroll-Lösung (1:10 in AK Diluent).

Anschließend wurden die Schnitte zunächst für 30 min in Sekundärantikörper, danach für 30 min in ABC-AP und darauffolgend für 20 min in Permanent Red inkubiert. Zwischen diesen drei Arbeitsschritten wurden die Schnitte wie oben beschrieben in TBS-T und TBS gewaschen.

Vor und nach der Kernfärbung mit Hämalaun wurden die Schnitte in Leitungs- (5 min) und destilliertem Wasser (1-2 min) gespült, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert und zum Schluss eingedeckt.

## 3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte durch eine ungepaarten zweiseitigen t-Test mit dem Programm Excel. Aufgrund der schiefen Verteilung der Alu-PCR-Ergebnisse wurden die Werte vor der t-Test-Analyse logarithmiert.

Die Ergebnisse wurden als signifikant erachtet, sobald der p-Wert  $< 0,05$  war. In den nachfolgenden Graphen sind die p-Werte wie folgt dargestellt:

- \*  $p < 0,05$
- \*\*  $p < 0,01$
- \*\*\*  $p < 0,001$

Die die graphischen Darstellungen wurden mit den Programmen GraphPad Prism und Excel erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Zellkultur

#### 4.1.1. Durchflusszytometrie/FACS

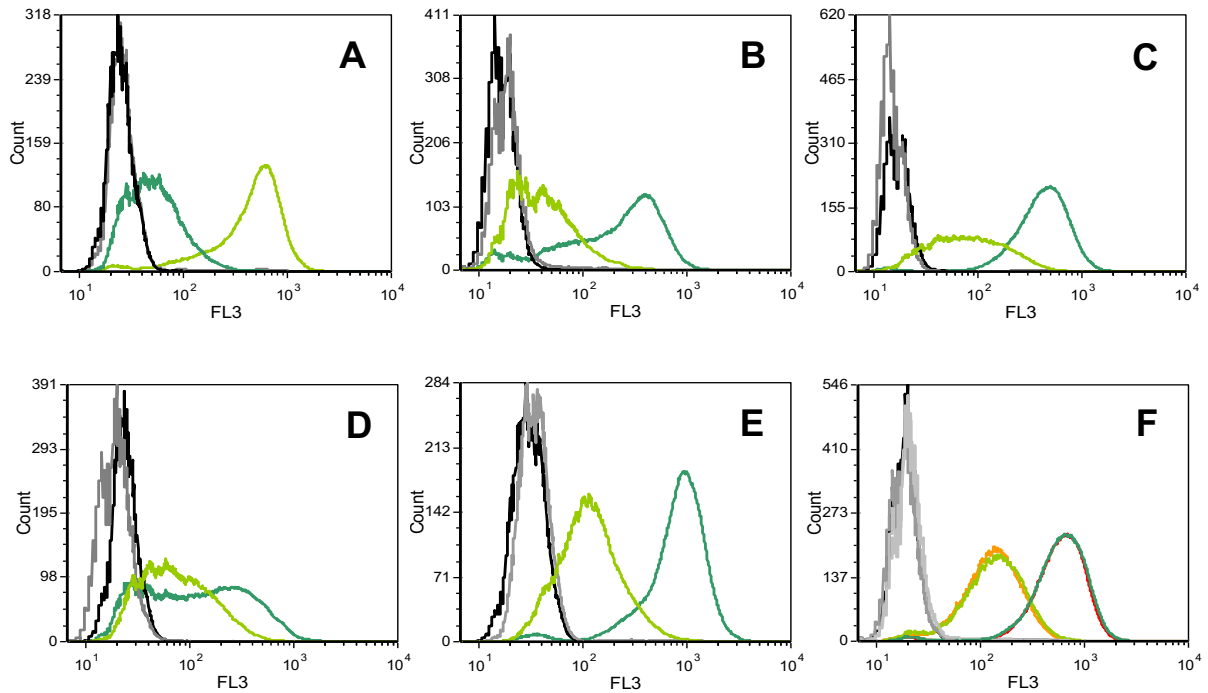
Um den Integrin  $\beta$ 4-Knockdown über den Projektzeitraum hinweg zu überprüfen, wurden regelmäßige FACS-Untersuchung der GC5830 LUC und der GC5830 ITGB4 k.d. Zellen durchgeführt. Dabei war stets die relative Fluoreszenz (Integrin  $\beta$ 4-Expression) der LUC Zellen der Referenzwert für die Bestimmung der Expressionsveränderung (Integrin  $\beta$ 4-Status') der ITGB4 k.d. Zellen.

Am 13.08.14 betrug die relative Fluoreszenz der LUC Zellen 819,05, die der ITGB4 k.d. Zellen 58,99, woraus sich ein Integrin  $\beta$ 4-Knockdown von 92,8% ergab. Bis Anfang Januar 2015 ergaben alle FACS-Analysen auf Integrin  $\beta$ 4 eine Reduktion des Knockdowns um etwas mehr als 90%. Zwischen Januar 2015 und April 2015 stieg die Integrin  $\beta$ 4-Expression der Knockdown-Zellen um etwa zehn Prozentpunkte auf nunmehr 80,5%. Diese Entwicklung setzte sich im Folgemonat fort. Die Integrin  $\beta$ 4-Expression des Knockdowns betrug nur noch 52,3%, woraufhin die Zelllinie verworfen und neue Zellen aufgetaut wurden.

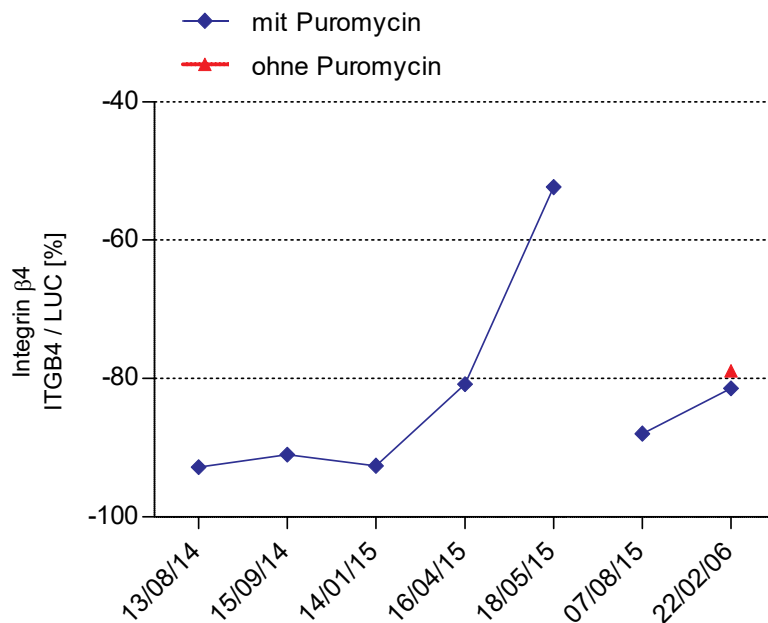
Nach drei Monaten wurden die neuen Zellen erneut auf Integrin  $\beta$ 4 analysiert und es zeigte sich erneut ein guter Knockdown von 88%.

Um den Effekt von Puromycin auf den Knockdown zu evaluieren, wurden diese Zellen sowohl in Puromycin-haltigem, als auch Puromycin-freiem Medium weitergezogen. Nach einem halben Jahr ergab die FACS-Analyse beider Gruppen, dass der Knockdown der Puromycin-haltigen Gruppe mit 81,41% um 2,52 Prozentpunkte besser war als der der Puromycin-freien Gruppe mit 78,89%.

## Ergebnisse



**Abb. 12: Durchflusszytometrische Untersuchung der Integrin  $\beta 4$  Expression von LUC und ITGB4 k.d. Zellen.** (A) Untersuchung vom 15.09.14: die Integrin  $\beta 4$  Expression der LUC ist hellgrün, die der ITGB4 k.d. Zellen dunkelgrün dargestellt. (B) Untersuchung vom 14.01.15: LUC dunkelgrün, ITGB4 k.d. Zellen hellgrün. (C) Untersuchung vom 16.04.15: LUC dunkelgrün, ITGB4 k.d. Zellen hellgrün. (D) Untersuchung vom 18.05.15: LUC dunkelgrün, ITGB4 k.d. Zellen hellgrün. (E) Untersuchung vom 07.08.15: LUC dunkelgrün, ITGB4 k.d. Zellen hellgrün. (F) Untersuchung vom 22.02.16: die Integrin  $\beta 4$  Expression der LUC mit Puromycin ist dunkelgrün, die der ITGB4 k.d. Zellen hellgrün dargestellt. Die rote Linie entspricht der Integrin  $\beta 4$  Expression der LUC ohne Puromycin und die orangene Linie der der ITGB4 k.d. Zellen.

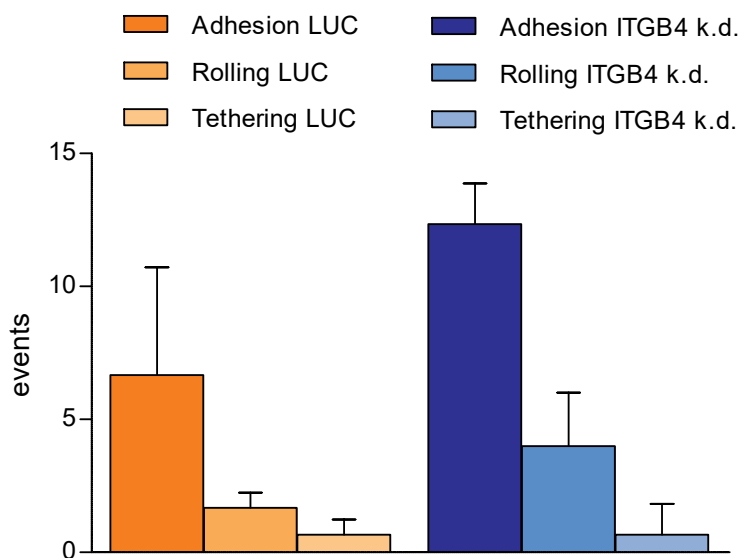


**Abb. 11: Zeitlicher Verlauf des Integrin  $\beta 4$  Knockdowns im Verhältnis zur LUC Kontrolle.** Dargestellt sind die chronologischen Ergebnisse der FACS-Analyse bezogen auf die Integrin  $\beta 4$  Expression der ITGB4 k.d. Zellen im Verhältnis zu der LUC Kontrolle. Am 18.05.15 wurden die Zellen wegen des schlechten Knockdowns verworfen und neu aufgetaut. Diese Zellen wurden am 07.08.15 erneut untersucht. Dieses Mal wurden die Zellen über 6 Monate sowohl in puromycinfreiem, als auch – haltigem Medium kultiviert um zu sehen, ob sich die Qualität des Knockdowns verändert. Nach diesem Zeitraum war kein Unterschied in der ITGB4 Expression zu erkennen.

Zusätzlich zum Integrin  $\beta 4$  wurden die Zellen auch noch auf andere Integrine untersucht, darunter die  $\beta$ -Integrine 1, 2, 3 und 7 und die  $\alpha$ -Integrine 1, 2, 4, 5, 6, E und V. Die Expression des Integrin  $\beta 3$  wurde unter Knockdown von ITGB4 auf 118,9% gesteigert, wie auch die des Integrin  $\alpha 1$  auf 103%. Ähnlich, wenn auch mit 26,6% viel geringer, war die Expression von Integrin  $\alpha 5$  bei den Knockdown-Zellen gesteigert. Bei den restlichen Integrienen war die jeweilige Expression reduziert. Integrin  $\beta 1$  wurden bei den Knockdown-Zellen im Vergleich zu den LUC Zellen auf 13,8% vermindert, Integrin  $\beta 7$  auf 26,7%. Bei den  $\alpha$ -Integrienen waren das  $\alpha V$  um 4,4%, das  $\alpha 4$  um 17,5% und das  $\alpha 2$  um 56,8% vermindert worden. Die Expression des Integrins  $\alpha 6$ , welches als einziges Integrin mit dem Integrin  $\beta 4$  das Heterodimer  $\alpha 6\beta 4$  bilden kann, war ebenfalls um 70,4% stark reduziert. Bei den Integrienen  $\beta 2$  und  $\alpha E$  waren die relativen Fluoreszenzen von LUC und Knockdown-Zellen nach Abzug der relativen Isotypen-Fluoreszenz zum Teil negativ.

#### 4.1.2. Adhäsionsversuch unter Flussbedingungen

Im Flussversuch mit den GC5830 Zellen zeigten sich bei den ITGB4 k.d. Zellen 12,33 ( $\pm 1,53$ ) Ereignisse für Adhäsion, bei den LUC Zellen waren es mit 6,67 ( $\pm 4,04$ ) in etwa halb so viele. Der Unterschied ist mit  $p = 0,07$  statistisch nicht mehr signifikant. Beim Rolling und beim Tethering gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede.



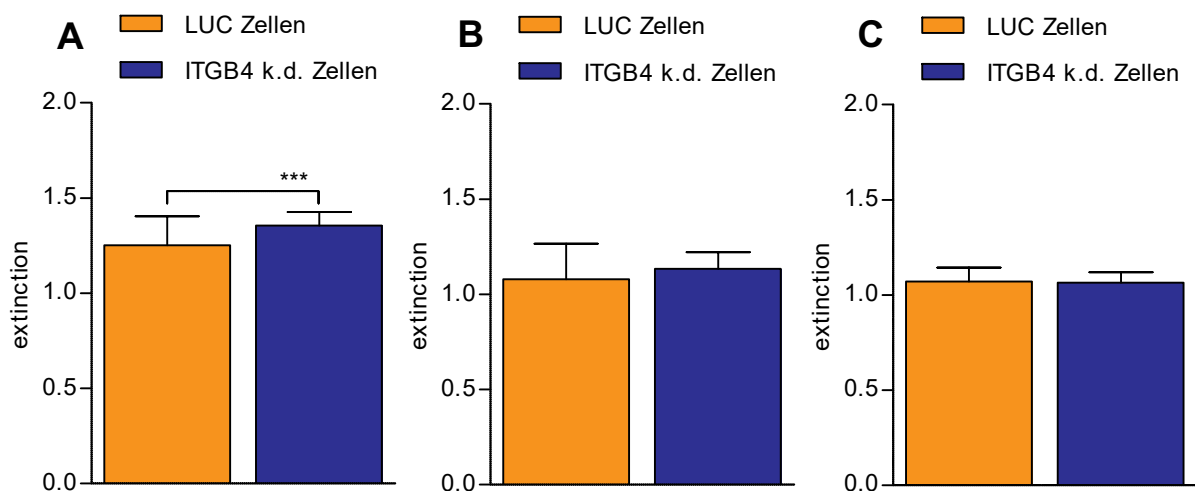
**Abb. 13: Adhäsionsversuch unter Flussbedingungen der LUC und der ITGB4 k.d. Zellen auf aktiviertem Endothel.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung der Interaktionen (events) von LUC und ITGB4 k.d. Zellen mit aktiviertem Endothel. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Adhäsionsverhalten festgestellt werden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



### 4.1.3. Zellproliferationsassay

Beim ersten Proliferationsassay wurden die Zellen ausschließlich in unkonditioniertem RPMI 1640 Medium inkubiert. Die ITGB4 k.d. Zellen zeigten hierbei eine Absorption von 1,356 ( $\pm 0,07$ ), die LUC Zellen eine Absorption von 1,252 ( $\pm 0,152$ ). Die Proliferation ist damit bei den ITGB4 k.d. Zellen im Vergleich zu den LUC Zellen um 8,3% gesteigert, das Ergebnis ist mit  $p < 0,001$  statistisch signifikant.

Beim zweiten Proliferationsassay wurden die Zellen in konditioniertem Medium sowohl der ITGB4 k.d. Zellen (k.d. Medium), als auch der LUC Zellen (LUC Medium) inkubiert. Weder die LUC, noch die ITGB4 k.d. Zellen zeigten in ihrem oder dem konditionierten Medium der anderen Zelllinie einen signifikanten Proliferationsunterschied.



**Abb. 14: Proliferationsassay der LUC und der ITGB4 k.d. Zellen.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung vom Proliferationsassay der LUC und der ITGB4 k.d. Zellen. (A) ersten Proliferationsassay mit unkonditioniertem Medium. Zweiter Proliferationsassay mit (B) konditioniertem Medium der LUC Zellen und (C) mit konditioniertem Medium der ITGB4 k.d. Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 4.1.4. Colony forming assay

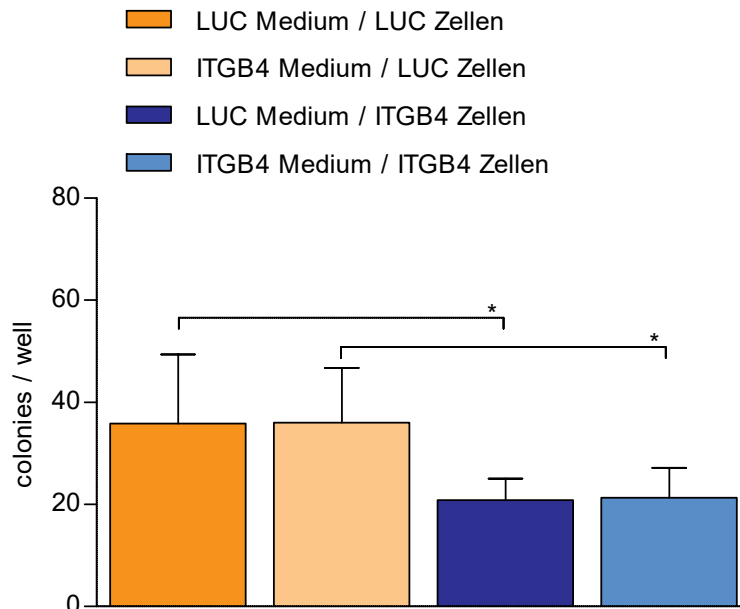
Bei den *colony forming assays* gab es bis zu vier verschiedene Versuchsansätze:

- |   |                                |
|---|--------------------------------|
| LUC Medium mit LUC Zellen               | (nachfolgend Gruppe A genannt) |
| ITGB4 k.d. Medium mit LUC Zellen        | (nachfolgend Gruppe B genannt) |
| LUC Medium mit ITGB4 k.d. Zellen        | (nachfolgend Gruppe C genannt) |
| ITGB4 k.d. Medium mit ITGB4 k.d. Zellen | (nachfolgend Gruppe D genannt) |

#### 4.1.4.1. Softagar

Im Softagar zeigten die Zellen, die in unkonditioniertem Medium inkubiert wurden keinerlei Wachstum. Nur in konditioniertem Medium inkubierte Zellen bildeten Kolonien im Softagar.

Dabei waren in Gruppe A 35,83 ( $\pm 13,50$ ) Kolonien pro Napf, bei Gruppe B waren es 36,00 ( $\pm 10,68$ ) Kolonien pro Napf. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant. Ebenfalls insignifikant war der Unterschied bei den ITGB4 k.d. Zellen: In Gruppe C wurden 20,83 ( $\pm 4,22$ ) Kolonien pro Napf gezählt, in Gruppe D waren es 21,33 ( $\pm 5,79$ ). Jedoch war bei gleichem Medium und unterschiedlicher Zelllinie ein Unterschied in der Kolonibildung auszumachen. Die LUC Zellen bildeten in Gruppe A signifikant mehr Kolonien als die ITGB4 k.d. Zellen in Gruppe C, das gleiche Bild zeigte sich beim Vergleich von Gruppe B und Gruppe D. Damit scheint beim Softagarassay nicht die Wahl des konditionierten Mediums entscheidend, sondern die der Zelllinie.



**Abb. 15: Colony forming assay in Softagar.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung vom colony forming assay in Softagar der LUC Zellen sowohl in LUC, als auch in ITGB4 k.d. Medium und der ITGB4 k.d. Zellen sowohl in LUC, als auch in ITGB4 k.d. Medium. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.1.4.2. Matrigel

Wie auch im Softagar bildeten die in unkonditioniertem Medium inkubierten GC5830 Zellen keine Kolonien. Insgesamt wurden zwei Versuchsansätze ausgewertet, einmal mit 1200 Z/mL und einmal mit 1000 Z/mL. Bei der Auswertung galt es morphologische Unterschiede verschiedener Kolonien zu erfassen und zu quantifizieren. Am Ende konnten unabhängig von der Zellreihe bzw. dem konditioniertem Medium drei morphologische Gruppen unterschieden werden.

Zum einen *Sphäroide*, aus mehreren Tausend Tumorzellen bestehende kugelförmige Kolonien, deren Ränder zumeist glatt begrenzt waren.

Zum anderen *Diskoide*, am Boden der Näpfe wachsende Kolonien, die morphologisch große Ähnlichkeit zu den 2D-Zellkulturen hatten und zum Teil eine Größe von mehreren Millimetern erreichen konnten.

Und zuletzt *Intermediäre*, unregelmäßig berandete kugelige Kolonien mit schaumig-blasigen Ausläufern, die vom Durchmesser her die kleinste Gruppe darstellte.

Bei Betrachtung der durchschnittlichen Anzahl an Kolonien pro Napf fiel auf, dass bei dem Versuchsansatz mit 1000 Z/mL weder die Zelllinie, noch das konditionierte Medium einen Wachstumsunterschied induziert hatte. Die LUC Zellen in LUC Medium (Gruppe A) bildeten im Schnitt 12,63 ( $\pm 8,40$ ) Kolonien pro Napf, die ITGB4 k.d. Zellen bildeten im selbigen Medium (Gruppe C) 13,28 ( $\pm 10,15$ ) und die ITGB4 k.d. Zellen in ITGB4 Medium (Gruppe D) 11,69 ( $\pm 9,06$ ) - der Unterschied in der Anzahl war statistisch nicht signifikant. Jedoch gab es Unterschiede in der morphologischen Zusammensetzung der Kolonien. In fast allen Näpfen bildeten die *Sphäroide* den größten Anteil an den Kolonien, am zweithäufigsten vertreten waren die *Intermediären* und verhältnismäßig selten waren die *Diskoiden*. Diese Verteilung war fast in allen Versuchsansätzen statistisch signifikant, mit zwei Ausnahmen:

- Die LUC Zellen bildeten in LUC Medium (Gruppe A) nicht mehr *Sphäroide* als *Intermediäre* und
- Die ITGB4 k.d. Zellen bildeten in LUC Medium (Gruppe C) nicht mehr *Intermediäre* als *Diskoide*.

Beim Ansatz mit 1200 Z/mL war das Wachstumsverhalten in Bezug auf die durchschnittliche Summe an Kolonien pro Napf ein anderes. Hierbei zeigten die LUC Zellen in LUC Medium (Gruppe A) mit 7,31 ( $\pm 4,33$ ) und  $p = 0,002$  eine signifikant geringere Durchschnittsanzahl an Kolonien pro Napf als beim Ansatz mit 1000 Z/mL. Mit 17,59 ( $\pm 6,78$ ) Kolonien pro Napf und  $p = 0,05$  bildeten wiederum die ITGB4 Zellen in LUC

## Ergebnisse

Medium (Gruppe C) im Schnitt signifikant mehr Kolonien als im Vergleichs-Assay mit 1000 Z/mL. Diese Entwicklung setzte sich auch bei den ITGB4 Zellen, die im eigenen Medium inkubierten (Gruppe D), mit 22,09 ( $\pm 9,14$ ) Kolonien pro Napf und  $p < 0,001$  fort, ebenfalls statistisch signifikant.

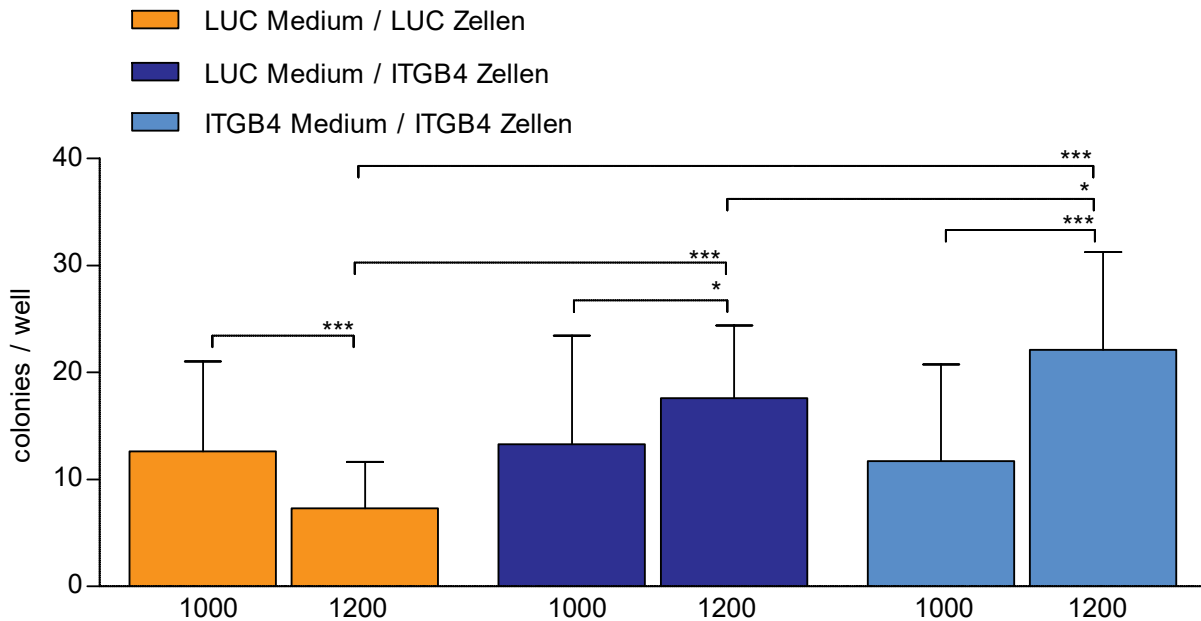
Auch innerhalb des Assays mit 1200 Z/mL waren die Unterschiede in der Anzahl der Kolonien pro Napf statistisch signifikant. Dabei bildete Gruppe D signifikant mehr Kolonien als Gruppe C, und die wiederum mehr als Gruppe A.

Pro Gruppe zeigte sich auch im Assay mit 1200 Z/mL zum größten Teil das gleich morphologische Verteilungsmuster: in Gruppe C und D gab es signifikant mehr Sphäroide als Intermediäre und signifikant weniger Diskoide als Intermediäre ( $S > I > D$ ). In Gruppe A waren die Unterschiede zwar ebenfalls signifikant, jedoch gab es dort am meisten Intermediäre, danach Sphäroide und am wenigsten Diskoide ( $I > S > D$ ).

Betrachtet man die Unterschiede des morphologischen Verteilungsmusters nicht innerhalb einer Gruppe, sondern zwischen den Gruppen, fällt auf, dass die durchschnittliche Anzahl der Sphäroide von Gruppe A bis D sukzessive zunimmt. Wo in Gruppe A nur 2,56 ( $\pm 2,02$ ) Kolonien pro Napf gezählt wurden, konnten in Gruppe D mit 14,31 ( $\pm 7,24$ ) das 5,8-fache an Kolonien pro Napf gezählt werden. Bei den Intermediären betrug der maximale Unterschied hingegen nur das 1,4-fache - hierbei bildete Gruppe D mit im Durchschnitt 6,06 ( $\pm 3,51$ ) am meisten Kolonien pro Napf, Gruppe A mit 4,19 ( $\pm 2,97$ ) am wenigsten. Bei den Diskoiden konnten in Gruppe C die meisten Kolonien gezählt werden. Mit 3,38 ( $\pm 1,86$ ) bildeten sie sechsmal mehr Kolonien pro Napf als Gruppe A mit 0,56 ( $\pm 0,84$ ) und immerhin doppelt so viele wie Gruppe D, bei denen 1,72 ( $\pm 1,40$ ) Kolonien pro Napf gezählt wurden.

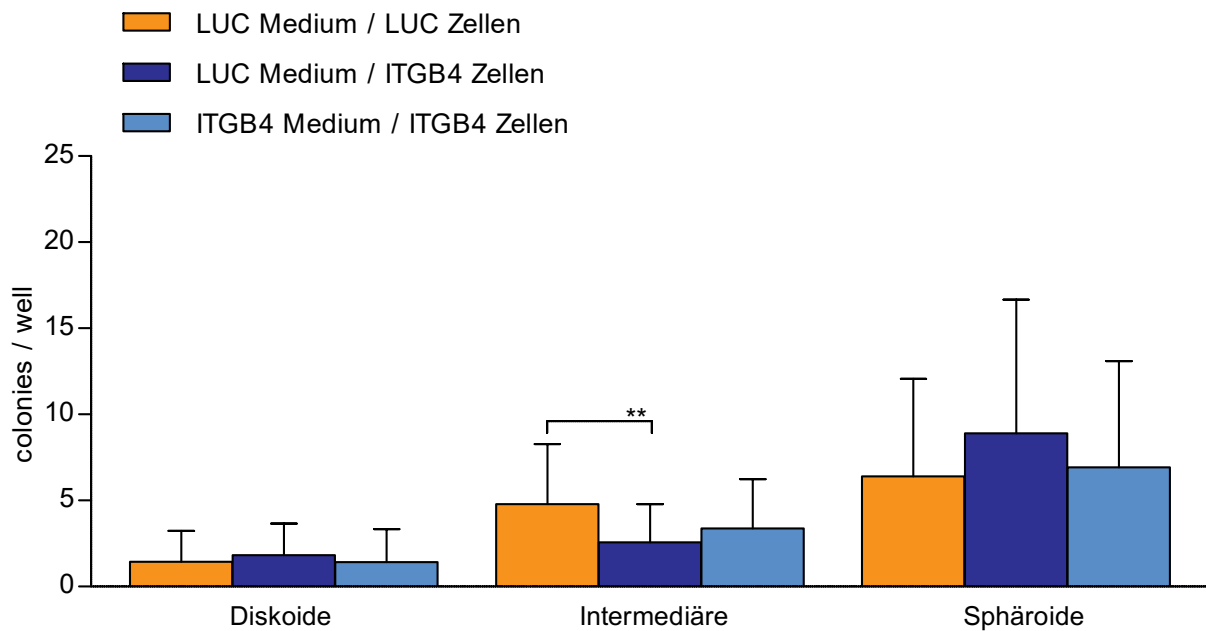
## Ergebnisse

Vergleicht man nun die Gesamtzahl der Kolonien pro Napf zwischen Gruppe A (7,31), Gruppe C (17,59) und Gruppe D (22,09) und die Gesamtzahl der Sphäroide zwischen Gruppe A (2,56 ( $\pm 2,02$ )), Gruppe C (8,69 ( $\pm 5,37$ )) und Gruppe D (14,31 ( $\pm 7,24$ )), lässt sich ein ähnlicher Anstieg feststellen. Es scheint, dass die steigende Anzahl der Kolonien (Gruppe A < Gruppe C < Gruppe D) auf der vermehrten Bildung von Sphäroiden fußt.

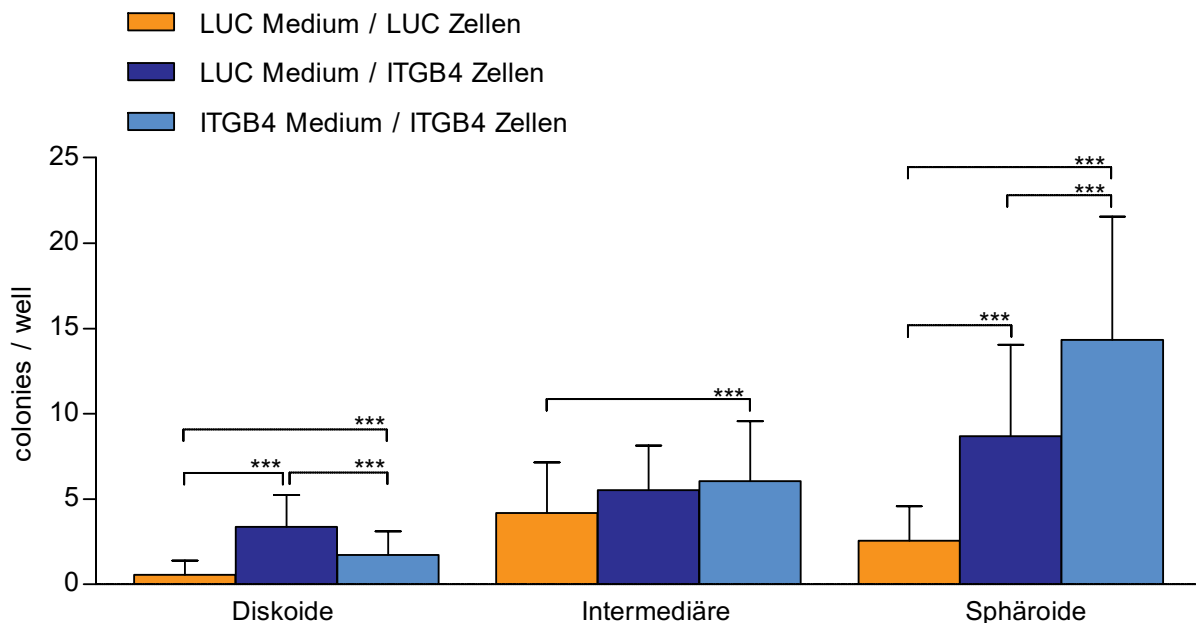


**Abb. 16: Colony forming assay in Matrigel mit 1000 und 1200 Z/mL.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung vom colony forming assay mit 1.: 1000 Z/mL Matrigel und 2.: 1200 Z/mL Matrigel. Dabei erhielten LUC Zellen nur das LUC Medium, ITGB4 k.d. Zellen erhielten sowohl das LUC, als auch das ITGB4 k.d. Medium. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## Ergebnisse



**Abb. 17: Form und Anzahl der Kolonien des colony forming assays mit 1000 Z/mL Matrigel.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung vom colony forming assay mit 1000 Z/mL Matrigel. Morphologisch wurden alle Kolonien unterteilt in *Sphäroide*, *Intermediäre* oder *Diskoide*. LUC Zellen erhielten nur das LUC Medium, ITGB4 k.d. Zellen erhielten sowohl das LUC, als auch das ITGB4 k.d. Medium. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

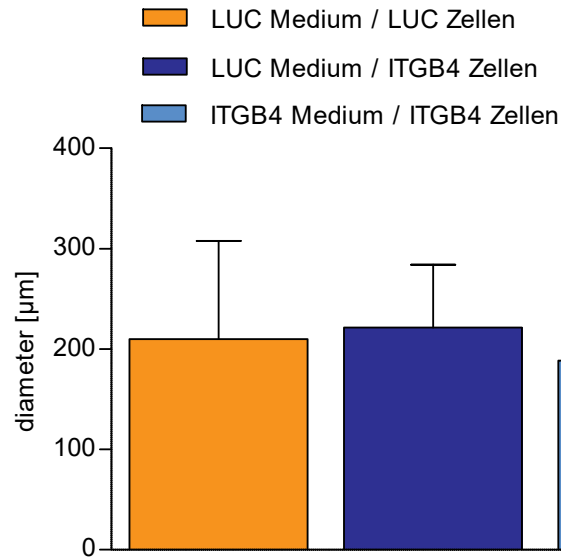


**Abb. 18: Form und Anzahl der Kolonien des colony forming assays mit 1200 Z/mL Matrigel.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung vom colony forming assay mit 1200 Z/mL Matrigel. Morphologisch wurden alle Kolonien unterteilt in *Sphäroide*, *Intermediäre* oder *Diskoide*. LUC Zellen erhielten nur das LUC Medium, ITGB4 k.d. Zellen erhielten sowohl das LUC, als auch das ITGB4 k.d. Medium. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

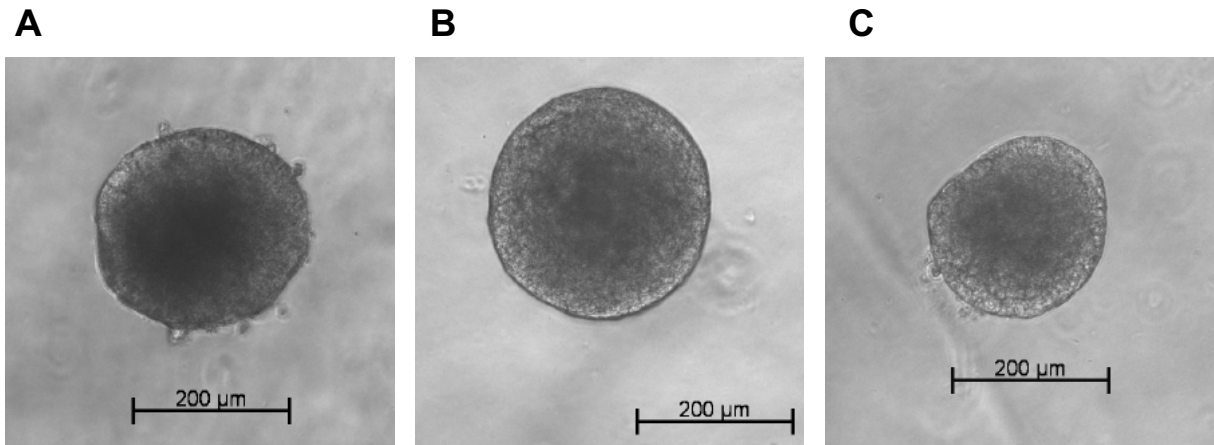
## Ergebnisse

Die Gruppen A, C und D zeigten beim Ansatz mit 1000 Z/mL Matrigel keinen signifikanten Größenunterschied der Sphäroide.

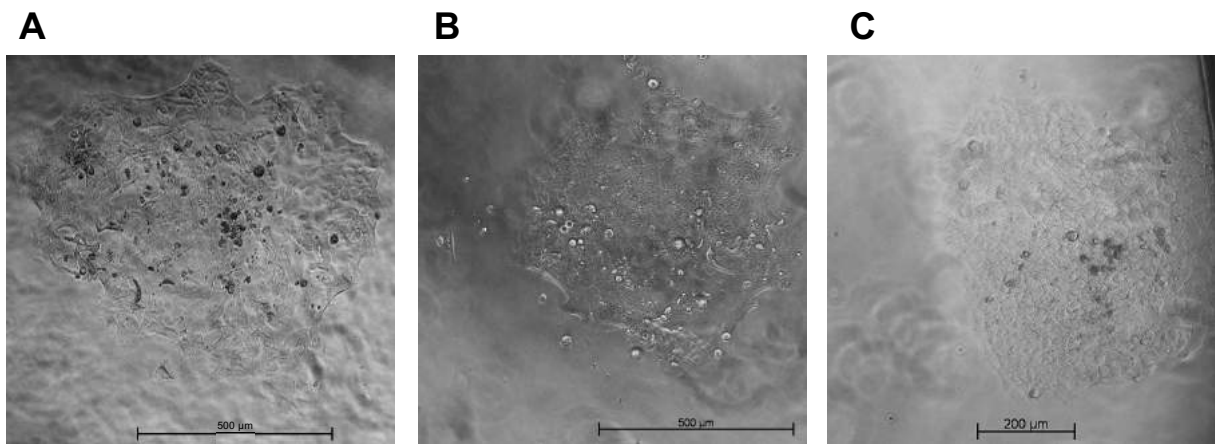
Dabei waren die Sphäroide der Gruppe A im Durchschnitt 203,53  $\mu\text{m}$  ( $\pm 98,17$ ) im Durchmesser, die der Gruppe C 213,43 ( $\pm 62,82$ ) und die Sphäroide der Gruppe D 180,84 ( $\pm 65,65$ ).



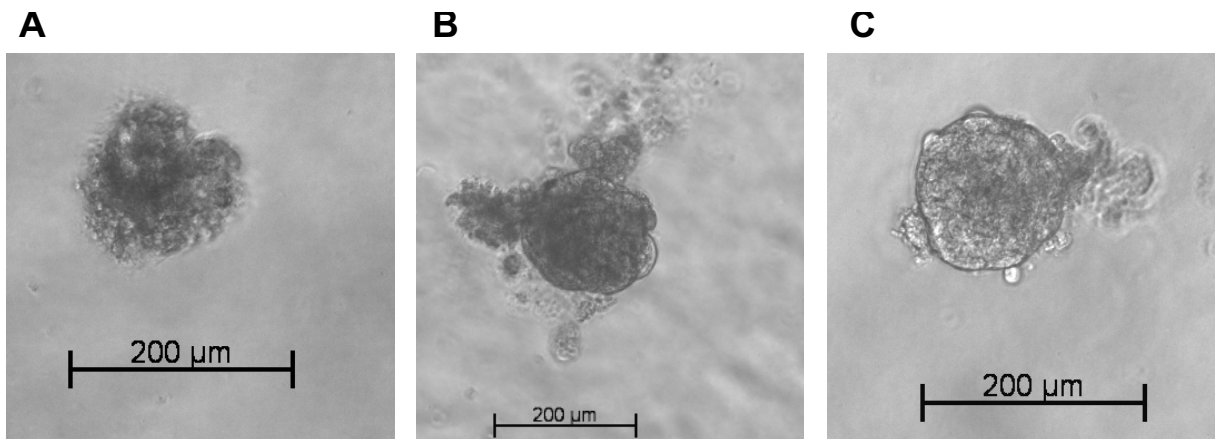
**Abb. 19: Durchmesser der Sphäroiden-Kolonien des colony forming assay mit 1000 Z/mL Matrigel.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung vom Durchmesser der Sphäroiden-Kolonien des colony forming assays mit 1000 Z/mL Matrigel. LUC Zellen erhielten nur das LUC Medium, ITGB4 k.d. Zellen erhielten sowohl das LUC, als auch das ITGB4 k.d. Medium. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Abb. 22: Sphäroide Kolonien der GC5830 in Matrigel.** Dargestellt sind Sphäroid-Kolonien von (A) LUC Zellen in LUC Medium, (B) ITGB4 Zellen in LUC Medium und (C) ITGB4 Zellen in ITGB4 Medium. Dabei entsprechen die abgebildeten Kolonien der durchschnittlichen Morphologie der Zelllinie.



**Abb. 22: Diskoide Kolonien der GC5830 in Matrigel.** Dargestellt sind Diskoid-Kolonien von (A) LUC Zellen in LUC Medium, (B) ITGB4 Zellen in LUC Medium und (C) ITGB4 Zellen in ITGB4 Medium. Dabei entsprechen die abgebildeten Kolonien der durchschnittlichen Morphologie der Zelllinie.



**Abb. 22: Intermediäre Kolonien der GC5830 in Matrigel.** Dargestellt sind Intermediär-Kolonien von (A) LUC Zellen in LUC Medium, (B) ITGB4 Zellen in LUC Medium und (C) ITGB4 Zellen in ITGB4 Medium. Dabei entsprechen die abgebildeten Kolonien der durchschnittlichen Morphologie der Zelllinie.



## 4.2. Tierversuch

### 4.2.1. Peritonealer Krebs-Index (PCI)

In einem Vorversuch zu den hier präsentierten Ergebnissen wurden GC5830 Parental-Zellen sowohl SCID, als auch SCID-select Mäuse intraperitoneal gespritzt. Es war zu sehen, dass der PCI der SCID Mäuse von durchschnittlich 13,10 ( $\pm 6,12$ ) auf 6,8 ( $\pm 4,59$ ) bei den SCID-select Tieren gesunken ist – mit  $p < 0,001$  war dieses Ereignis statistisch signifikant.

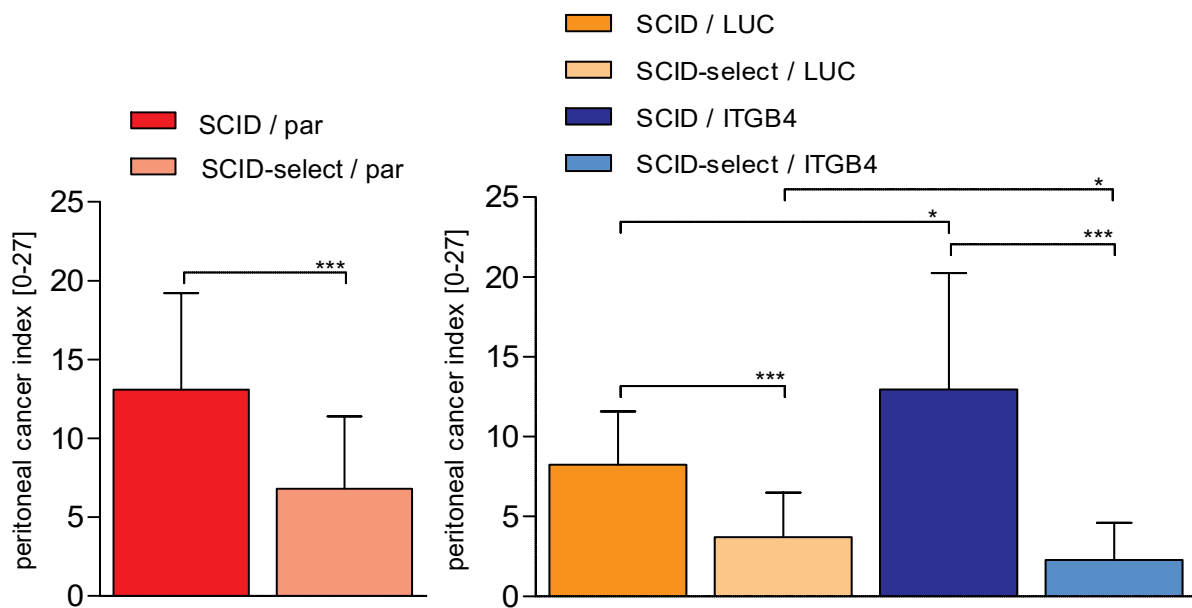
Die hiesige Versuchsreihe wurde zweimal durchgeführt (1.  $n=10$  Tiere, 2.  $n=15$  bzw. 16 Tiere). Da der Aufbau beider Tierversuche identisch war, wurden sie zusammengefasst und nachfolgend singular mit Tierversuch bezeichnet.

Beim Tierversuch konnte das Ergebnis vom Vorversuch sowohl mit den LUC, als auch mit den ITGB4 k.d. Zellen bestätigt werden. Bei den LUC Zellen konnte der PCI der SCID Mäuse von durchschnittlich 8,24 ( $\pm 3,33$ ) auf 3,72 ( $\pm 2,78$ ) bei den SCID-select Mäusen gesenkt werden, dies war mit  $p < 0,001$  statistisch signifikant. Die ITGB4 k.d. Zellen verhielten sich in den SCID-select Mäusen ebenfalls weniger stark metastatisch. Der PCI sank bei ihnen von 12,95 ( $\pm 7,29$ ) bei den SCID Mäusen auf 2,27 ( $\pm 2,32$ ) bei den SCID-select Mäusen. Das Ergebnis war mit  $p < 0,001$  statistisch signifikant.

Zusätzlich konnten beim Tierversuch Unterschiede zwischen den Zellen innerhalb derselben Tiergruppe festgestellt werden.

Die ITGB4 k.d. Zellen zeigten bei den SCID Mäusen mit einem durchschnittlichen PCI von 12,95 ( $\pm 7,29$ ) einen signifikant höheren PCI als die LUC Zellen mit 8,24 ( $\pm 3,33$ ). Der Unterschied war mit  $p = 0,011$  statistisch signifikant. Bei den E- und P-Selektin defizienten Mäusen (SCID-select) zeigt sich jedoch ein offensichtlich additiver Effekt, da der PCI der ITGB4 k.d. Zellen niedriger als der der LUC Gruppe ist. Dieser Effekt ist mit  $p = 0,0482$  unter dem Signifikanzniveau von 5% liegt und damit statistisch signifikant.

## Ergebnisse



**Abb. 23: Peritoneale Krebs-Indizes der Tierversuche nach intraabdomineller Inokulation von GC5830.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung der peritonealen Krebs-Indizes [0-27] der Tierversuche nach intraabdomineller Inokulation von (A) GC5830 Parentalzelllinie (par) Zellen in SCID- und SCID-select Mäuse und (B) GC5830 LUC und ITGB4 k.d. Zellen sowohl in SCID, als auch in SCID-select Mäuse. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Zusätzlich zum reinen PCI, der eine Summe aus neun auszuwertenden intraabdominellen Regionen bildet (siehe 3.3.4), wurden die Versuchsgruppen innerhalb einer Region verglichen. Dabei fielen von der Versuchsgruppe abhängige Effekte auf, die in vielen Regionen zu finden waren.

Region 1) – 9):

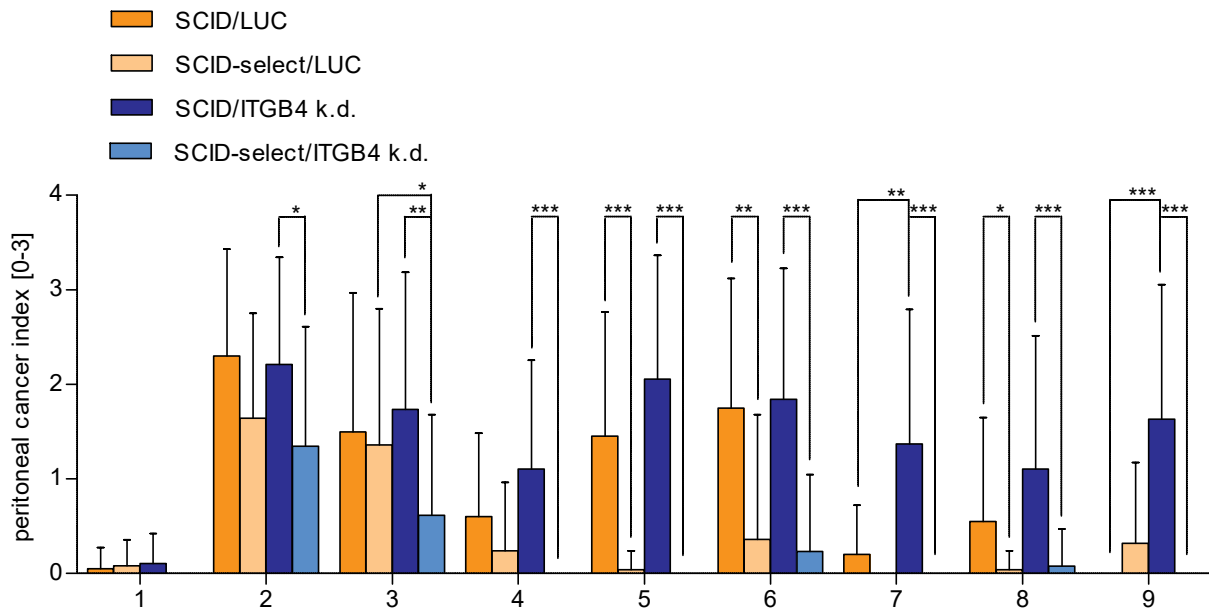
- 1) Der PCI in dieser Region ist im Durchschnitt der niedrigste aller neun. Bei den SCID/LUC betrug er 0,05 ( $\pm 0,22$ ), bei den SCID-select/LUC 0,08 ( $\pm 0,28$ ), die SCID/ITGB4 k.d. Gruppe hatte dort einen PCI von 0,11 ( $\pm 0,32$ ) und die SCID-select/ITGB4 sogar 0. Dabei waren die Unterschiede zwischen den vier Tiergruppen statistisch nicht signifikant.
- 2) Pro Gruppe war der PCI in dieser Region im Durchschnitt am höchsten. Bei den SCID/LUC betrug er 2,3 ( $\pm 1,13$ ), bei den SCID-select/LUC 1,64 ( $\pm 1,11$ ) und bei den SCID/ITGB4 k.d. 2,21 ( $\pm 1,13$ ). Dabei waren die Unterschiede zwischen den drei Gruppen statistisch nicht signifikant. Jedoch wurde der PCI bei den SCID-select Tieren, denen ITGB4 k.d. Zellen injiziert wurden, mit 1,35 ( $\pm 1,26$ ) und  $p = 0,02$  signifikant weniger.
- 3) Der PCI der SCID/LUC betrug 1,50 ( $\pm 1,47$ ), bei den SCID-select/LUC lag er bei 1,36 ( $\pm 1,44$ ) – der Unterschied war statistisch nicht signifikant. Erhielten die E-

und P-Selektin defizienten Tiere jedoch ITGB4 k.d. Zellen, sank der PCI auf 0,62 ( $\pm 1,06$ ), diese Reduzierung des PCIs war mit  $p = 0,04$  statistisch signifikant. Im Vergleich zu der SCID-select/ITGB4 k.d. Gruppe, verursachten die ITGB4 k.d. Zellen mit  $p = 0,004$  und einem PCI von 1,74 (SD1,45) signifikant mehr IP-Karzinose in den SCID Tieren.

- 4) Bei den LUC Zellen war kein Unterschied zwischen den SCID und den SCID-select Tieren in Bezug auf den PCI auszumachen. Die SCID Tiere hatten im Durchschnitt einen PCI von 0,6 ( $\pm 0,88$ ) und die SCID-select Tiere von 0,24 ( $\pm 0,72$ ). Ebenfalls war kein Unterschied zwischen den Zelllinien bei den SCID Tieren zu erkennen, denn die ITGB4 k.d. Zellen verursachten dort einen PCI von 1,11 ( $\pm 1,15$ ). Dies wiederum war mit  $p < 0,001$  statistisch signifikant mehr, als bei den SCID-select Tieren, die ITGB4 k.d. injiziert bekamen. Der betrug der PCI 0.
- 5) Die SCID-select/LUC hatten mit 0,04 ( $\pm 0,2$ ) einen geringen PCI als die SCID/LUC mit 1,45 ( $\pm 1,32$ ). Der Unterschied war mit  $p < 0,001$  statistisch signifikant. Mit  $p < 0,0001$  war der Unterschied zwischen den SCID/ITGB4 k.d. 2,05 ( $\pm 1,31$ ) und den SCID-select/ITGB4 k.d. ebenfalls statistisch signifikant. Es konnte kein Unterschied zwischen den LUC und den ITGB4 k.d. Zellen festgestellt werden.
- 6) Wie bei 5 verhält es sich auch bei Region 6. Die E- und P-Selektin-Defizienz verursacht auch hier eine Verringerung des PCIs. Dabei sinkt er bei den SCID/LUC von 1,75 ( $\pm 1,37$ ) auf 0,36 ( $\pm 1,32$ ) bei den SCID-select/LUC ( $p < 0,01$ ). Bei den ITGB4 k.d. sinkt der PCI von 1,84 ( $\pm 1,38$ ) bei den SCID-Tieren auf 0,23 ( $\pm 0,82$ ) bei den SCID-select Tieren. Auch dies ist statistisch signifikant mit  $p < 0,001$ .
- 7) In Region 7 ist der PCI der SCID/ITGB4 k.d. mit 1,37 ( $\pm 1,42$ ) und  $p = 0,001$  statistisch signifikant höher als der der SCID/LUC mit 0,20 ( $\pm 0,52$ ). Der PCI der SCID-select/ITGB4 k.d. wiederum ist mit 0 und  $p < 0,001$  signifikant geringer als der der SCID/ITGB4 k.d.
- 8) Wie bei Region 5 und 6 wird die IP-Karzinose bei den Tieren mit E- und P-Selektin-Defizienz im Vergleich zu der SCID-Kontrollgruppe gesenkt. Bei den LUCs von 0,55 ( $\pm 1,10$ ) auf 0,04 ( $\pm 0,2$ ) und einer statistischen Signifikanz von  $p=0,03$ . Bei den ITGB4 k.d. Zellen sinkt der PCI von 1,11 ( $\pm 1,41$ ) bei den SCID

auf 0,08 ( $\pm 0,39$ ) bei den SCID-select Tieren. Der Unterschied ist mit  $p=0,001$  signifikant.

- 9) Hier stieg der PCI der SCID Gruppe von 0 bei den LUCs auf 1,63 ( $\pm 1,42$ ) bei den ITGB4 k.d. Zellen. Mit  $p < 0,001$  ist der Anstieg statistisch signifikant. Bei zusätzlicher E- und P-Selektin-Defizienz der Tiere sank der PCI bei den SCID-select Tieren hingegen wieder auf 0, und das bei  $p < 0,001$ .



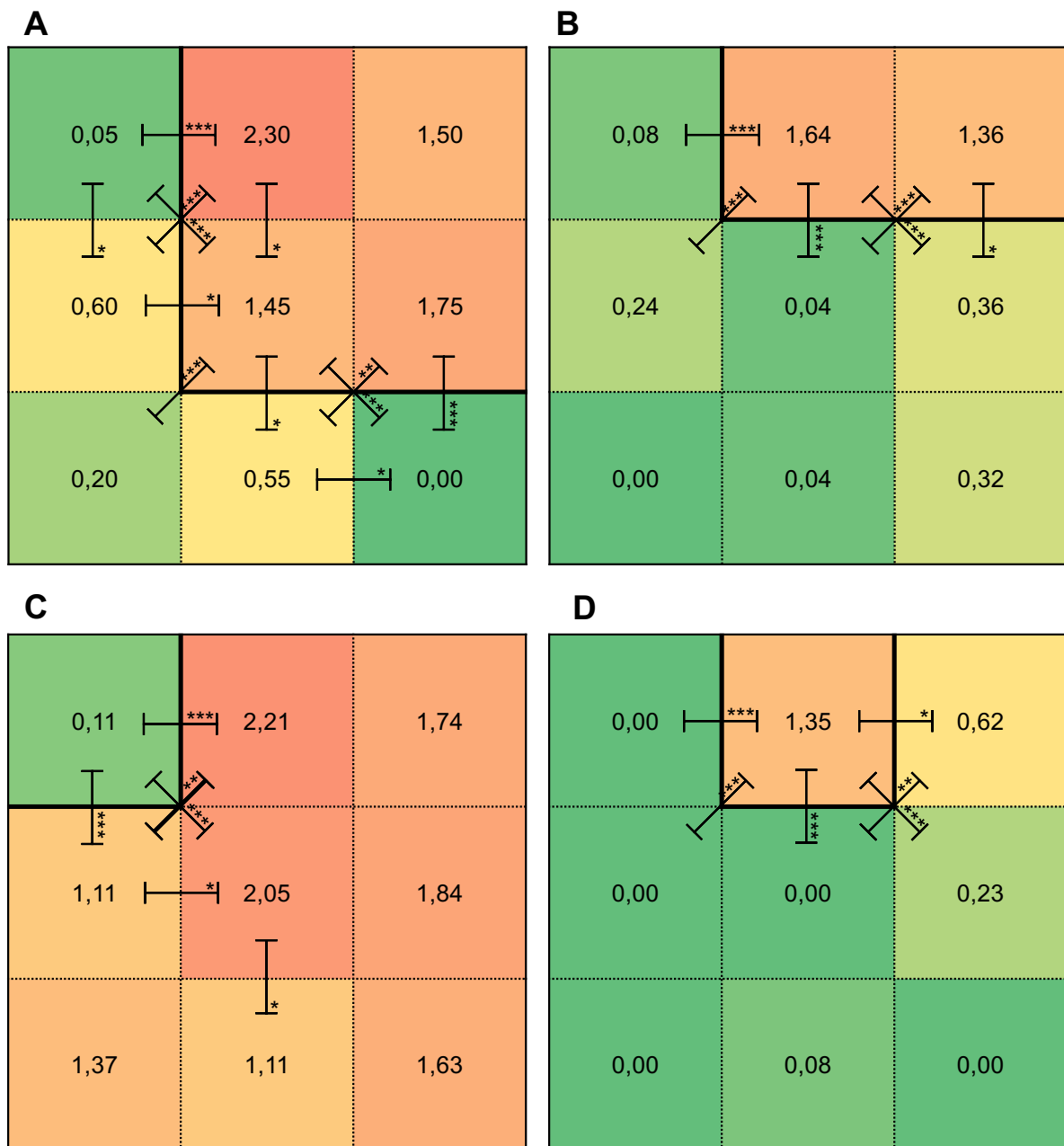
**Abb. 24: Vergleich der intraperitonealen Karzinose nach intraabdomineller Inokulation von GC5830 Zellen innerhalb einer Region.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung der intraperitonealen Karzinose [0-3] der intraabdominellen Regionen 1-9. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Im zweiten Schritt wurde benachbarte Regionen innerhalb einer Versuchsgruppe miteinander verglichen. Dabei fiel eine charakteristische Verteilungswahrscheinlichkeit der IP-Karzinose auf, die im nachfolgenden farblich hervorgehoben und mit Signifikanzniveaus versehen wurde.

Bei allen vier Versuchsgruppen bildet Region 2 die Region mit dem höchsten PCI-Score, die Nachbarregion 1 die Region mit dem niedrigsten PCI-Score, der Unterschied zwischen diesen beiden Regionen ist in allen vier Versuchsgruppen statistisch hoch signifikant. Es scheint, dass sich die IP-Karzinose ausgehend von Region 2 im Abdomen ausbreitet, da die jeweils stärker befallenen Regionen stets angrenzend und gegeneinander statistisch nicht signifikant unterschiedlich sind. Zusätzlich scheint die Höhe des PCI-Scores zur Peripherie hin niedriger zu werden. Dabei bildet sich in allen vier Versuchsgruppe ein „Signifikanzsaum“ der überdurchschnittlich stark befallenen

## Ergebnisse

Regionen (nachfolgend IP-Feld genannt) von weniger bis gar nicht befallenen Regionen abgrenzt. Bei der SCID/LUC Gruppe bildet sich das IP-Feld aus vier Regionen (2, 4, 5, 6), bei den SCID-select/LUC hat sich dieses IP-Feld auf zwei Regionen (2, 3) halbiert. Betrachtet man die SCID/ITGB4 k.d., so hat sich das IP-Feld im Vergleich zu Kontrollgruppe wiederum auf nunmehr acht Regionen (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) verdoppelt. Bei den SCID-select/ITGB4 k.d. hat sich das Verhältnis jedoch umgekehrt: das IP-Feld besteht hier nur noch aus einer Region (2). Der Effekt der E- und P-Selektin-Defizienz

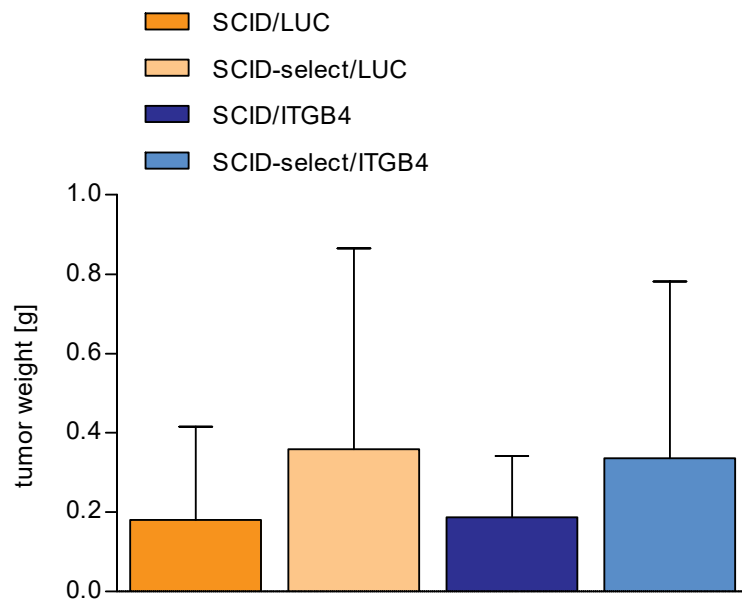


**Abb. 25: Vergleich des Verteilungsmusters der intraperitonealen Karzinose nach intraabdomineller Inokulation von GC5830 Zellen innerhalb einer Versuchsgruppe (A-D).** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel einer jeden Region (1-9) mit gleichzeitiger farblicher Anpassung an den Mittelwert. ■ entspricht einer intraperitonealen Karzinose von 0, ■ von 3. Das IP-Feld ist durchgängig schwarz berandet. (A)SCID/LUC (B)SCID-select/LUC (C)SCID/ITGB4 k.d. (D)SCID-select/ITGB4 k.d. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

hat sich in Kombination mit den ITGB4 k.d. Zelle im Vergleich zur LUC Kontrolle vervierfacht, das IP-Feld halbiert. Damit kann von einem additiven Effekt ausgegangen werden.

#### 4.2.2. Gewicht Nadelstichkanal-Tumor

Die Nadelstichkanal-Tumoren wurden nach der Entnahme gewogen. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Gewicht zwischen den vier Gruppen festgestellt werden.

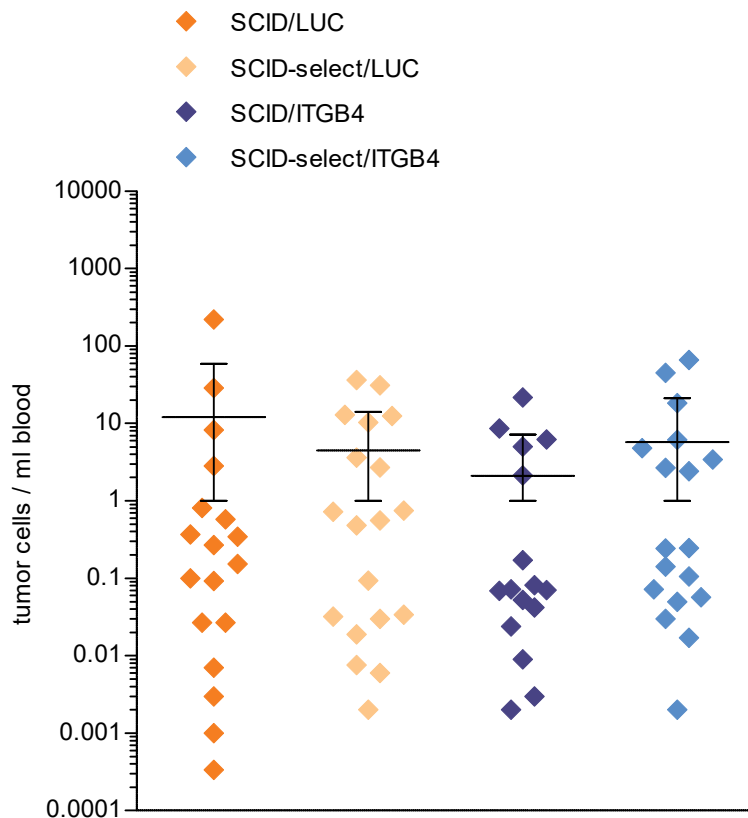


**Abb. 26: Gewicht der Nadelstichkanal-Tumoren.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung der Gewichte der Nadelstichkanal-Tumoren, die den Tieren nach Euthanasie entnommen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 4.2.3. Alu-PCR

## 4.2.3.1. Alu-PCR Blut

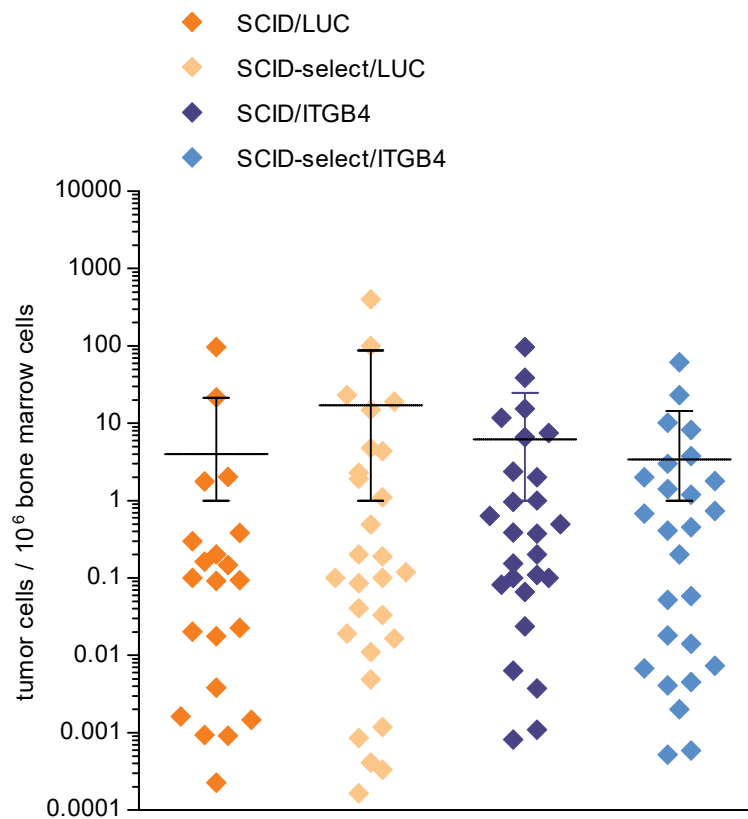
Die SCID/LUC Mäuse wiesen pro Milliliter Blut im Durchschnitt 12,05 ( $\pm 47,37$ ) Zellen mit der humanen Alu-Sequenz, also Tumorzellen, auf. In der SCID-select/LUC Gruppe waren im Durchschnitt 4,50 ( $\pm 9,67$ ) Tumorzelle pro Milliliter Blut zu finden. Im Durchschnitt am wenigsten Tumorzellen pro Milliliter Blut waren mit 2,11 ( $\pm 5,10$ ) in der SCID/ITGB4 Gruppe. Die SCID-select Mäuse, denen ITGB4 k.d. Zellen injiziert wurden, hatten im Durchschnitt 5,77 (SD15,46) Tumorzellen pro Milliliter Blut. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abb. 27: Anzahl humaner Tumorzellen pro Milliliter murinen Blutes.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung der Anzahl humaner Tumorzellen pro Milliliter murinen Blutes. Die Alu-Sequenzen für die Detektion humaner Zellen wurden mittels PCR quantifiziert und auf einen Milliliter Blut hochgerechnet. Die Untersuchung erfolgte bei jedem Versuchstier, das zum Zeitpunkt des Endpunktversuchs noch lebte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.2.3.2. Alu-PCR Knochenmark

Pro  $1 \times 10^6$  muriner Knochenmarkzellen, wurden bei den SCID Mäusen im Durchschnitt 5,6 ( $\pm 20,75$ ) LUC und 8,80 ( $\pm 22,12$ ) ITGB4 k.d. Zellen detektiert. Die SCID-select Mäuse wiesen im Durchschnitt 23,07 ( $\pm 81,77$ ) LUC und 4,58 ( $\pm 12,65$ ) ITGB4 k.d. Zellen auf. Der Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



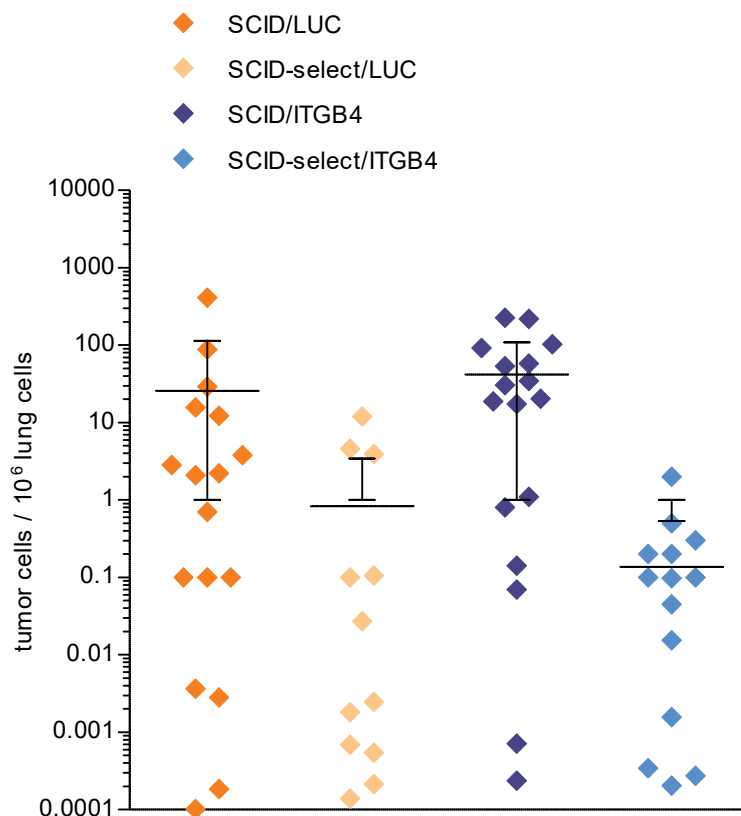
**Abb. 28: Anzahl humaner Tumorzellen pro  $1 \times 10^6$  muriner Knochenmarkzellen.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung der Anzahl humaner Tumorzellen pro 1 Mio. muriner Knochenmarkzellen. Die Alu-Sequenzen für die Detektion humaner Zellen wurden mittels PCR quantifiziert und auf einen 1 Mio. Zellen hochgerechnet. Die Untersuchung erfolgte bei jedem Versuchstier, das zum Zeitpunkt des Endpunktversuchs noch lebte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



### 4.2.3.3. Alu-PCR Lunge

Die Alu-PCR Analyse des murinen Lungengewebes zeigte bei den Mäusen, denen LUC Zellen injiziert wurden, keinen signifikanten Unterschied. Im Durchschnitt fanden sich bei den SCID Mäusen 25,73 ( $\pm 87,77$ ) und bei den SCID-select Mäusen 0,83 ( $\pm 2,60$ ) Tumorzellen pro  $1 \times 10^6$  muriner Zellen des Lungengewebes.

Die ITGB4 k.d. Zellen zeigten in den SCID-select Mäuse durchschnittlich 0,14 ( $\pm 0,40$ ) Tumorzellen pro  $1 \times 10^6$  muriner Zellen im Lungengewebe, in den SCID Mäuse hingegen im Durchschnitt 41,59 ( $\pm 67,50$ ). Dieser Unterschied war jedoch mit  $p = 0,055$  statistisch nicht mehr signifikant.

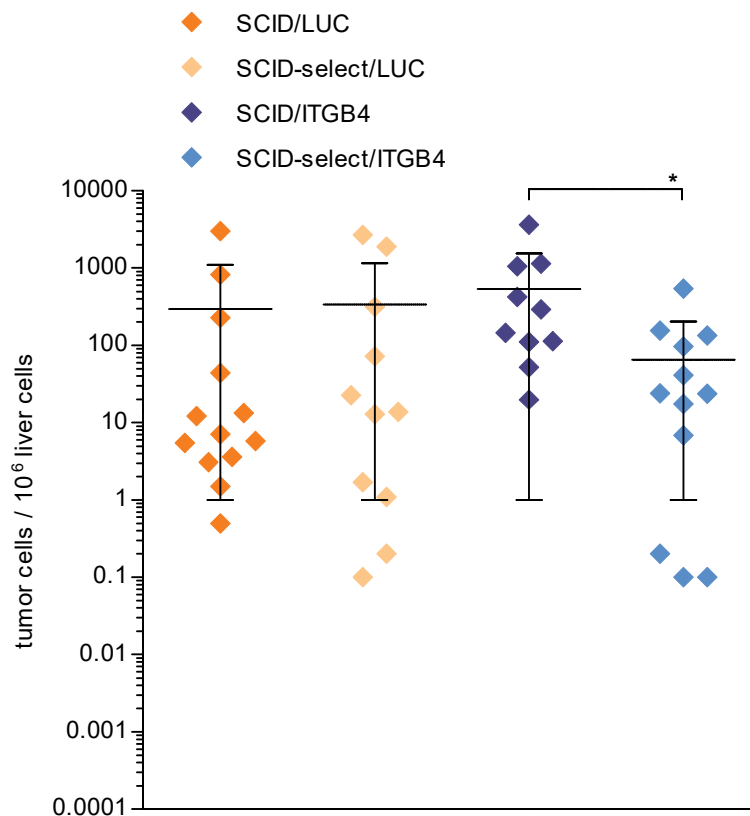


**Abb. 29: Anzahl humaner Tumorzellen pro  $1 \times 10^6$  muriner Lungengewebszellen.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung der Anzahl humaner Tumorzellen pro 1 Mio. muriner Lungengewebszellen. Die Alu-Sequenzen für die Detektion humaner Zellen wurden mittels PCR quantifiziert und auf 1 Mio. Zellen hochgerechnet. Die Untersuchung erfolgte bei jedem Versuchstier, das zum Zeitpunkt des Endpunktversuchs noch lebte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.2.3.4. Alu-PCR Leber

Die Leberproben der SCID/LUC Mäuse wiesen im Schnitt 296,37 ( $\pm 808,79$ ) GC5830 Zellen pro  $1 \times 10^6$  Leberzellen auf, die SCID-select/LUC Mäuse mit durchschnittlich 335,77 ( $\pm 815,24$ ) etwas mehr. Zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Mit 471,43 fand sich die größte Differenz von humanen Tumorzellen pro  $1 \times 10^6$  Zellen des murinen Lebergewebes zwischen den SCID- und den SCID-select Mäusen, denen ITGB4 k.d. Zellen injiziert wurden. Die SCID Mäuse hatten im Durchschnitt 536,78 ( $\pm 1007,49$ ) und die SCID-select Mäuse 65,35 ( $\pm 137,39$ ). Die Differenz war mit  $p = 0,03$  statistisch signifikant.

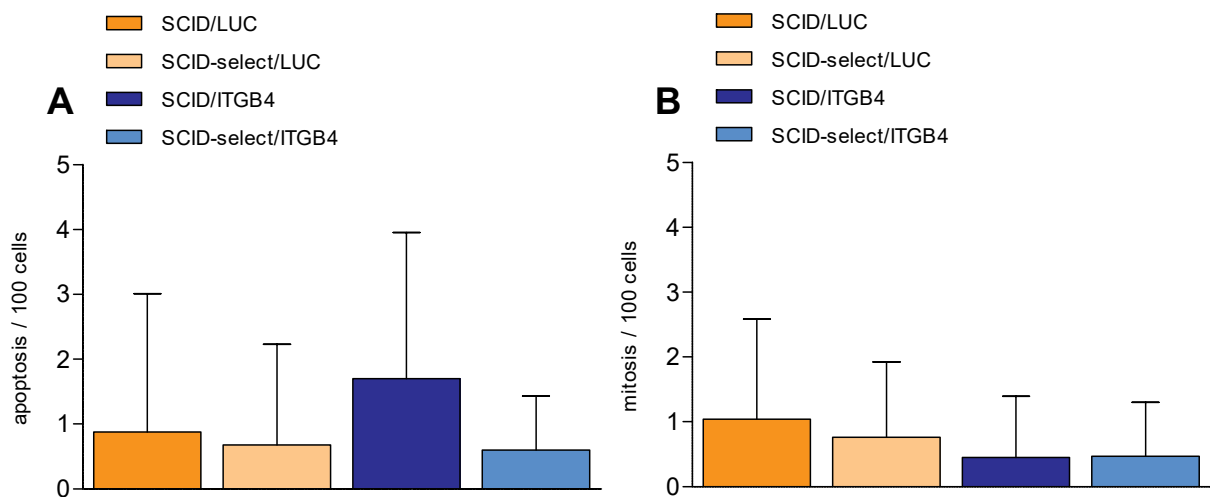


**Abb. 30: Anzahl humaner Tumorzellen pro  $1 \times 10^6$  Lebergewebszellen.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung der Anzahl humaner Tumorzellen pro 1 Mio. muriner Lebergewebszellen. Die Alu-Sequenzen für die Detektion humaner Zellen wurden mittels PCR quantifiziert und auf 1 Mio. Zellen hochgerechnet. Die Untersuchung erfolgte bei jedem Versuchstier, das zum Zeitpunkt des Endpunktversuchs noch lebte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

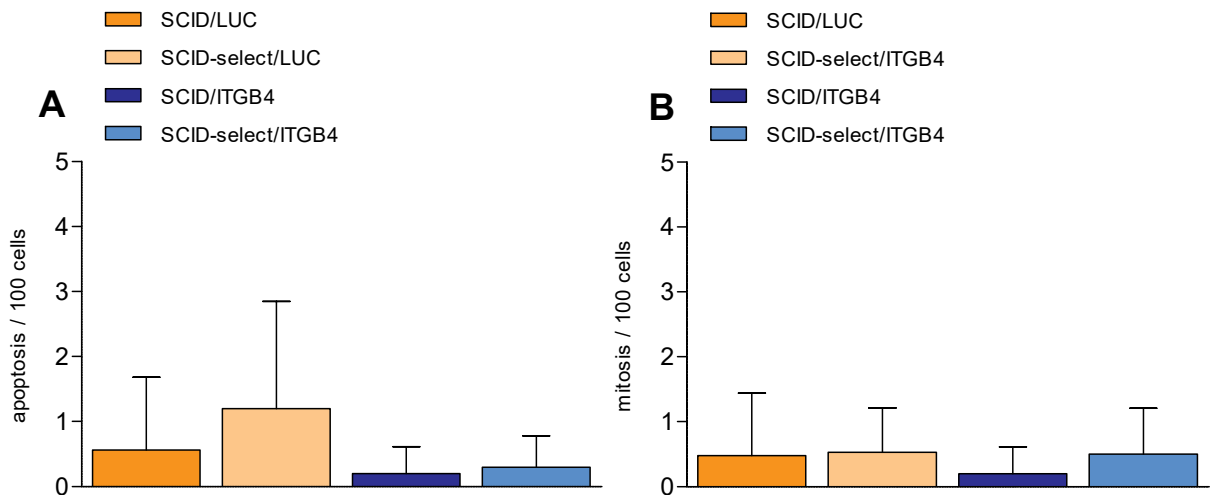
### 4.3. Histologie

#### 4.3.1. Feulgen

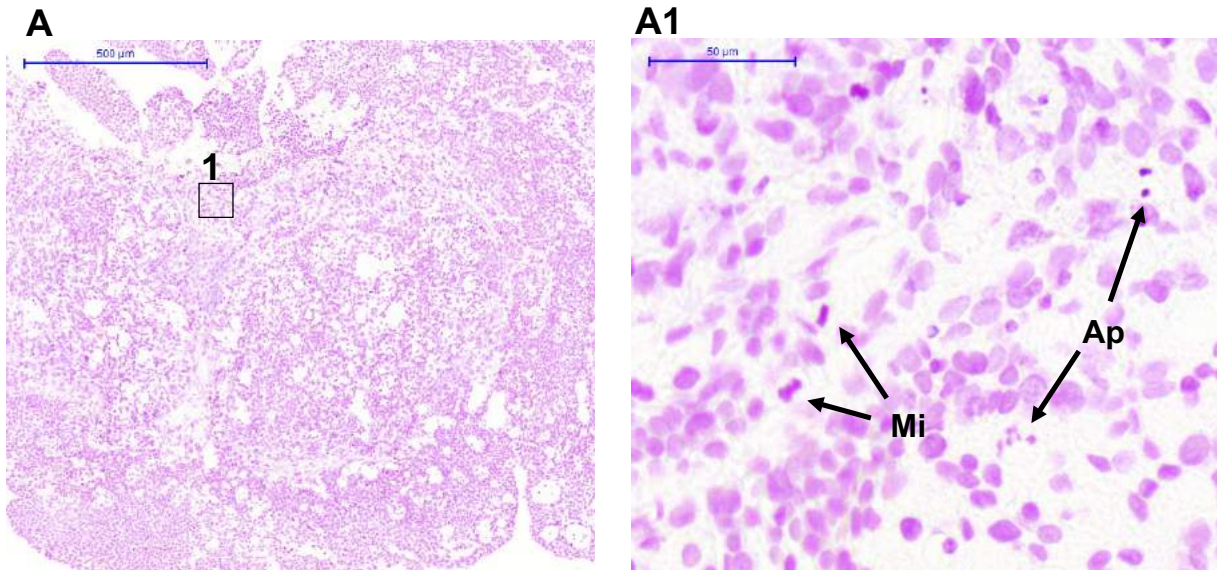
Bei den intraperitonealen Karzinosen konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der apoptotischen bzw. mitotischen Zellen zwischen den SCID- und den SCID-select Mäusen oder den LUC und den ITGB4 k.d. Zellen festgestellt werden. Ähnlich verhielt es sich bei den Stichkanal-Tumoren.



**Abb. 31: Histologische Auswertung von intraperitonealer Karzinose auf Apoptose und Mitose mittels Feulgen-Färbung.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichungen der intraperitonealen Karzinosen untersucht auf (A) Apoptosen pro 100 Zellen und (B) der Mitosen pro 100 Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Abb. 31: Histologische Auswertung von Nadelstichkanal-Tumoren auf Apoptose und Mitose mittels Feulgen-Färbung.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichungen der Nadelstichkanal-Tumoren untersucht auf (A) Apoptosen pro 100 Zellen und (B) der Mitosen pro 100 Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



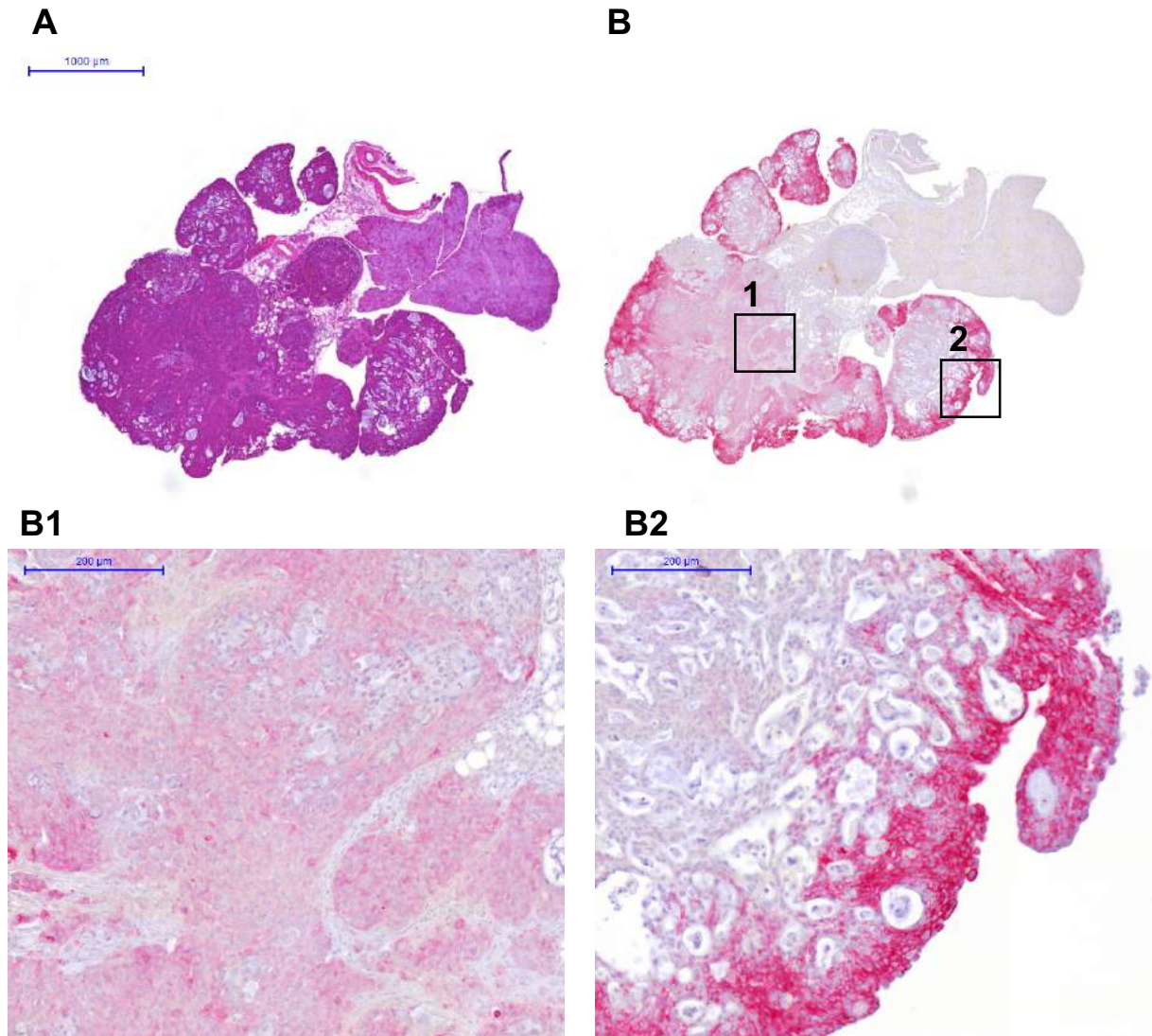
**Abb. 32: Repräsentatives Schnittpräparat nach Feulgen-Färbung.** Dargestellt sind zwei Vergrößerungsstufen des selben Schnittpräparats, welches nach Feulgen gefärbt wurde. (A) Übersicht (B) Ausschnitt aus A. (Mi) zeigt zwei Mitosefiguren in der Metaphase, die sich als intensiv rosa gefärbte Bande darstellen. (Ap) zeigt Apoptosekörperchen bereits untergegangener Zellen.

#### 4.3.2. ITGB4 Färbung

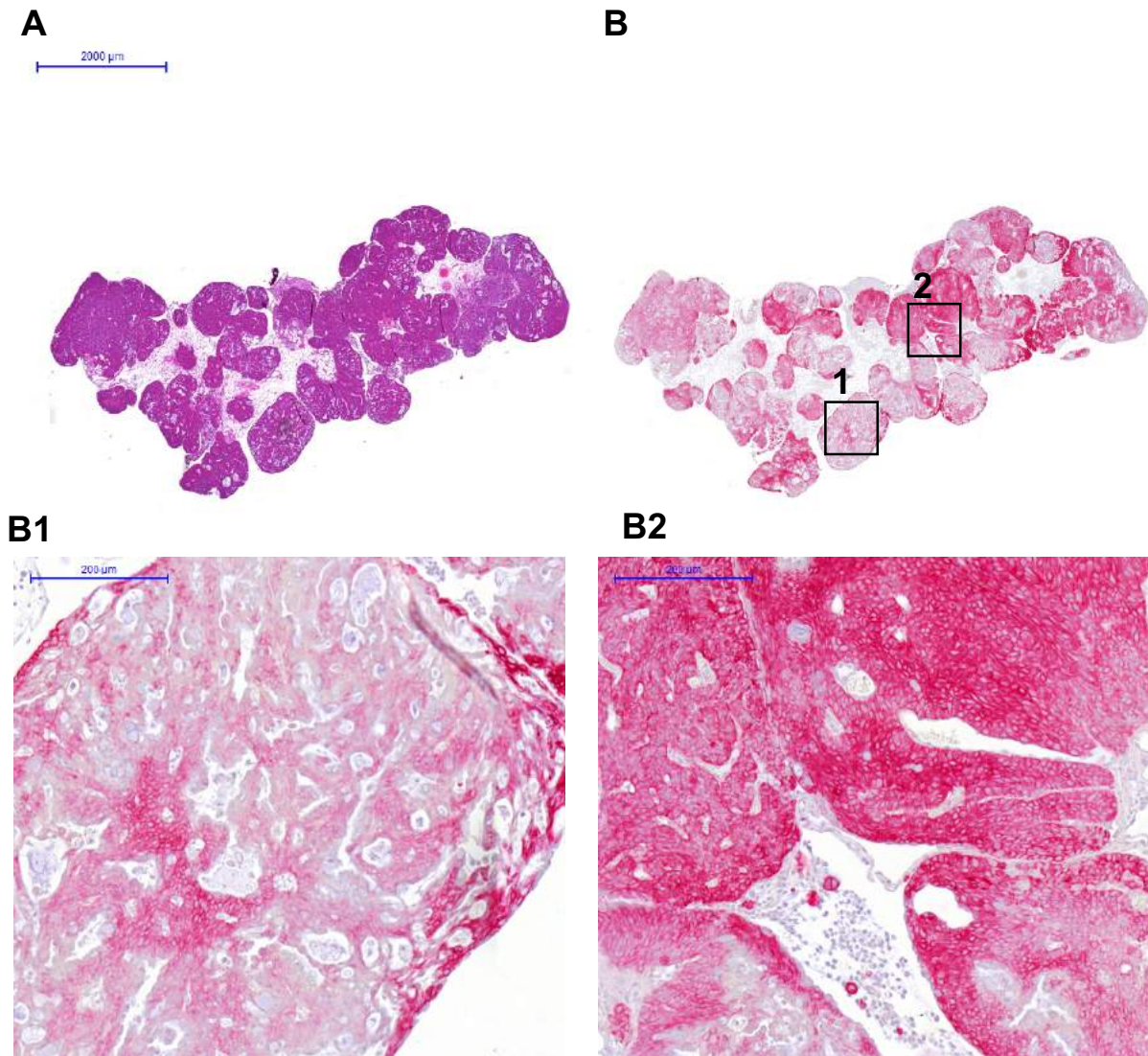
Um die Stabilität des ITGB4 k.d. in den entnommenen Gewebeproben zu bestimmen, wurden die Gewebeschnitte der jeweiligen Versuchsgruppen immunhistologisch auf Integrin  $\beta 4$  gefärbt.

Die Zellmembranen der -Gruppen färbten sich intensiv rot. Dabei ist das immunhistologische Signal randständig ausgeprägter als im Zentrum der Tumoren.

Bei den Schnitten der ITGB4 k.d. Gruppen war das Signal deutlich herabgesetzt. Zentral waren sowohl bei der SCID, als auch der SCID-select Gruppen wenige bis keine immunhistologischen Signale auf Integrin  $\beta 4$  nachzuweisen. Am Rand der Tumoren war das Signal im Durchschnitt ausgeprägter als im Zentrum, jedoch waren die Integrin  $\beta 4$ -positiven Zellen am Tumorrund eher diskontinuierlich verteilt und bildeten dort zu meist schwach positive Areale. Gelegentlich jedoch waren einige von ihnen stark positiv gefärbt, wiesen also eine hohe Expression von Integrin  $\beta 4$  auf (siehe SCID-select/ITGB4 k.d.)

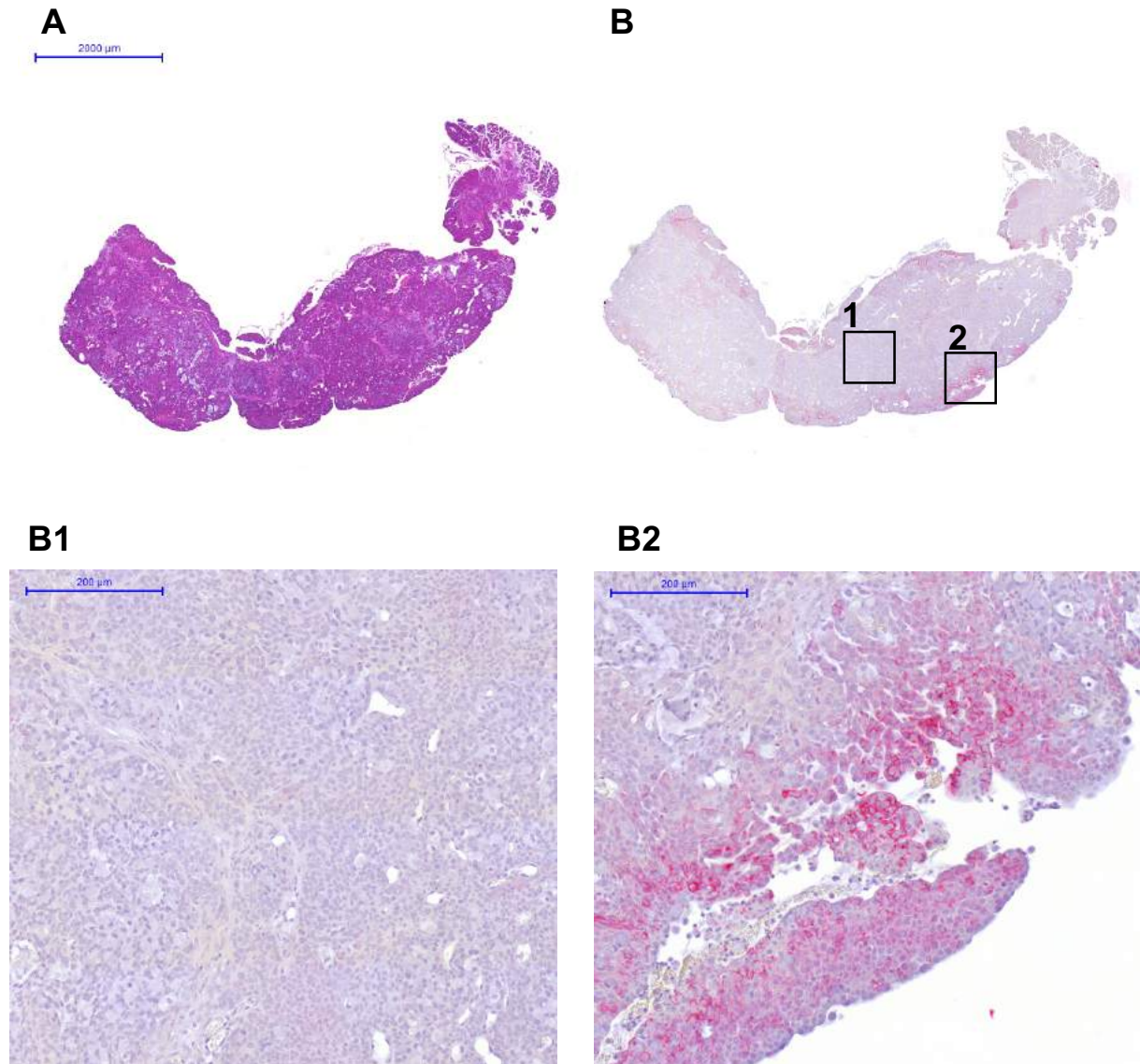


**Abb. 33: Intraperitoneale Karzinose der SCID/LUC.** (A) H.E. gefärbtes Schnittpräparat (B) Immunhistologisch auf Integrin  $\beta 4$  gefärbtes Schnittpräparat. (B1) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus B, der sich im Zentrum des Tumors befindet und homogen positiv ist auf Integrin  $\beta 4$ . (B2) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt in aus B, der sich am Rand des Tumors befindet und sehr stark positiv ist auf Integrin  $\beta 4$ .

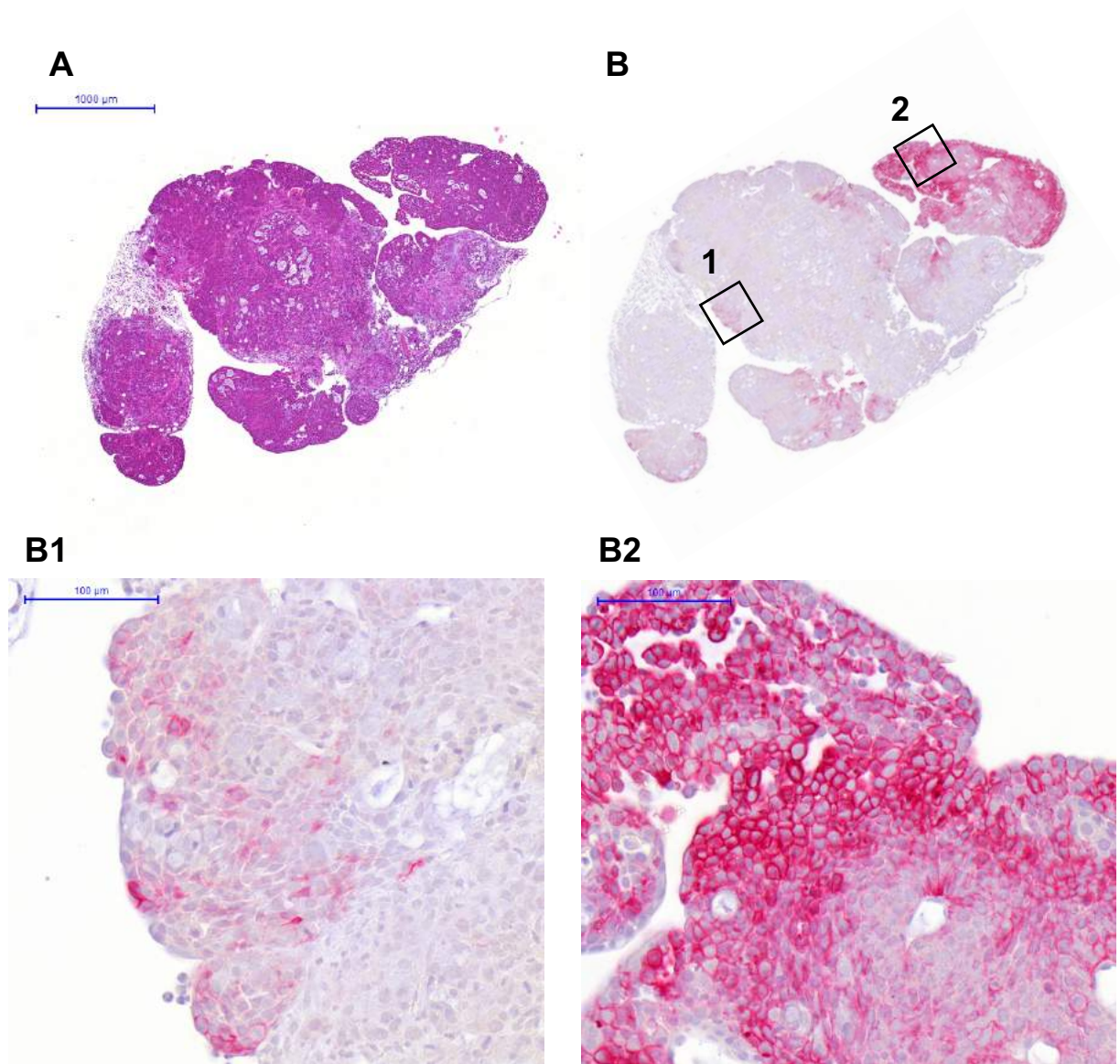


**Abb. 34: Intraperitoneale Karzinose der SCID-select/LUC.** (A) H.E. gefärbtes Schnittpräparat. (B) Immunhistologisch auf Integrin  $\beta 4$  gefärbtes Schnittpräparat. (B1) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus B, der sich im Zentrum des Tumors eines weniger stark angefärbten Areals befindet. Die Färbung auf Integrin  $\beta 4$  ist inhomogen und wird zum Zentrum und zum Rand hin intensiver. (B2) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus B, der sich an einem intensiv auf Integrin  $\beta 4$  gefärbten Areal des Tumors befindet.

## Ergebnisse



**Abb. 35: Intraperitoneale Karzinose der SCID/ITGB4 k.d.** (A) H.E. gefärbtes Schnittpräparat. (B) Immunhistologisch auf Integrin  $\beta$ 4 gefärbtes Schnittpräparat. (B1) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus B, der sich im Zentrum des Tumors befindet und keine Integrin  $\beta$ 4-Expression zeigt. (B2) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus B, der sich am Rand des Tumors befindet und nur sehr sporadisch Integrin  $\beta$ 4-Expression zeigt.



**Abb. 36: Intraperitoneale Karzinose der SCID-select/ITGB4 k.d.** (A) H.E. gefärbtes Schnittpräparat. (B) Immunhistologisch auf Integrin  $\beta$ 4 gefärbtes Schnittpräparat. (B1) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus B, der sich am Rand des Tumors befindet und nur wenig Integrin  $\beta$ 4-Expression zeigt. Am rechten Rand des Ausschnitts sind die Zellen negativ auf Integrin  $\beta$ 4, dies entspricht dem Großteil des Präparats. (B2) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus B, der sich am Rand des Tumors eines Areals befindet, in dem die Integrin  $\beta$ 4-Expression sehr hoch ist. Solche kleinen hochpositiven Areale waren in einigen SCID-select/ITGB4 k.d. Präparaten zu finden.



## 5. Diskussion

Die Diagnose peritoneale Metastasierung leitet für den Patienten häufig den Beginn der Terminalphase ein. Bis heute ist die Mortalität dieser Metastasierungsart enorm hoch und sie lässt sich nur unzureichend behandeln. Das Magenkarzinom stellt weltweit nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache dar. Einer der Gründe dafür fußt auf der Tatsache, dass das Magenkarzinom zu den Tumorentitäten zählt, die häufig nach intraperitoneal metastasieren.

Es war uns daher ein Anliegen, den molekularen Ursachen und damit möglichen Behandlungsmöglichkeiten der peritonealen Metastasierung beim Magenkarzinoms nachzugehen.

Die Auswertung in unserer Studie zeigte einen signifikanten Abfall der IP-Karzinose bei den E- und P-Selektin-defizienten Mäusen. Die Grundidee, dass Integrin  $\beta 4$  ebenfalls einen Abfall der IP-Karzinose bewirkt, konnte im Tierversuch nur zum Teil gezeigt werden. Die SCID Mäuse, denen die ITGB4 k.d. Zellen implantiert wurden, zeigten überraschender Weise genau das Gegenteil von dem, was erwartet wurde: die IP-Karzinose war im Vergleich zu den LUC Zellen signifikant erhöht. Bei den SCID-select Mäuse hingegen wurde die IP-Karzinose in Kombination mit den ITGB4 k.d. Zellen so stark gesenkt, dass sie signifikant geringer war als die der LUC Zellen.

Nun war zu eruieren, wodurch die erhöhte IP-Karzinose bei den SCID- und der starke Abfall bei den SCID-select Tieren zu erklären ist.

Betrachtet man hierzu die *in vitro* Versuche, ist zu sehen, dass die ITGB4 k.d. Zellen unter bestimmten Bedingungen mehr Kolonien generieren als die LUC Kontrolle. Wie bereits in Abschnitt 4.1.4.2 beschrieben, bilden beiden Zelllinien der GC5830 im Matrigel bei einer Konzentration von 1000 Zellen pro Milliliter Matrigel in etwa die gleiche Anzahl an Kolonien. Dies änderte sich hingegen, sobald die Konzentration um 20% gesteigert wurde. In diesem Fall bildeten die LUC Zellen in LUC Medium signifikant weniger Kolonien als die ITGB4 k.d. Zellen. Noch mehr Kolonien waren es nur, wenn die ITGB4 k.d. Zellen in ITGB4 k.d. Medium inkubiert wurden. Diese vermehrte Kolonisierung zeigten die ITGB4 k.d. Zellen jedoch nur im Matrigel. Im Softagar wuchsen die LUC Zellen unabhängig vom Medium, in dem sie inkubiert wurden, signifikant besser als die ITGB4 k.d. Zellen. Grundvoraussetzung bei beiden 3D-Zellkulturen war hingegen die Hinzugabe von konditioniertem Medium. Die darin enthaltenen Wachstumsfaktoren waren offensichtlich essentiell für die Kolonienbildung beider Zelllinien und

zeigten die Wichtigkeit parakriner Stimulation beim Wachstum der Zellen. Dieser Effekt war besonders im *colony forming assay* mit Matrigel zu beobachten: bei 1000 Z/mL Matrigel konnte kein Unterschied zwischen den Zelllinien festgestellt werden, steigerte man hingegen die Zellkonzentration um 20%, war ein signifikanter Anstieg bei den ITGB4 k.d. Zellen zu sehen. Da der parakrine Effekt bei beiden Versuchen Grundvoraussetzung für Wachstum zu sein scheint, ist der Unterschied womöglich in der Art der 3D-Zellkultur zu suchen: bis auf eine dreidimensionale Wachstumsmöglichkeit liefert der Softagar den Zellen im Vergleich zum Matrigel kein realistisches Habitat. In dieser kargen Umgebung bildeten die LUC Zellen wesentlich mehr Kolonien, was im Matrigel keineswegs mehr der Fall war. Dort bildeten die ITGB4 k.d. Zellen signifikant mehr Kolonien, wovon der Löwenanteil den Sphäroiden geschuldet war.

Sphäroide sind multizelluläre Zellverbände, die zumeist aus mehreren Tausend Zellen bestehen und sich in Flüssigkeiten wie z.B. der Peritonealflüssigkeit oder Aszites bilden können (Sodek et al. 2012). Untersuchungen, die sich mit dem Aufbau von Sphäroiden bei Ovarialkarzinom-Zellen beschäftigten, gaben Hinweise, dass der Zusammenschluss ein kompliziertes Netzwerk aus Integrinen und deren Extrazellulärmatrix-Liganden wie Fibronectin, Laminin oder Kollagen ist. Besonders das Integrin-Heterodimer  $\alpha5\beta1$ , dessen Hauptligand das Fibronectin ist, war essentiell für die Ausbildung dieser Sphäroide. Wurden diese Untereinheiten mittels Antikörper blockiert bzw. stimuliert, war die Sphäroid-Bildung dementsprechend inhibiert bzw. gesteigert. Zusätzlich war dieses Phänomen auch bei Hinzugabe exogenen Fibronectins zu beobachten. Aber auch Laminin, welches von den Heterodimeren  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha7\beta1$  und  $\alpha6\beta4$  gebunden werden kann, bewirkte den gleichen Effekt (Casey et al. 2001). Diese molekularen Bestandteile befinden sich auch im Matrigel, wodurch sich die bessere Kolonisierung im Vergleich zum Softagar erklären ließe.

Außerdem scheinen direkte Zell-Zell-Kontakte via Cadherinen die Sphäroid-Bildung zu vermitteln. Versuche an Mammakarzinom-Zellen zeigten abhängig von der Zelllinie, dass E-Cadherine bei der spontanen Bildung und N-Cadherine für den dichten Zusammenschluss eben solcher Sphäroide wichtig sind (Ivascu und Kubbies 2007).

Krebszellen, die eine hohe Invasivität und kontraktiles Verhalten zeigen, bilden besonders bevorzugt kompakte Sphäroide (Sodek et al. 2012). Die Fähigkeit der Verdichtung solcher Zellverbände ist abhängig von der kontraktilen Kapazität der sich in ihnen befindenden Zellen. Da sowohl Cadherine, als auch Integrine von großer Wichtigkeit

für die Bildung von Sphäroiden sind, die Kontraktilität von Zellen über Aktin-Myosin-Aktivierung vermittelt wird und beide Transmembranproteine mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung stehen, ist es wahrscheinlich, dass die Aktin-Myosin-vermittelte Kontraktion an der Sphäroidverdichtung beteiligt ist (Sodek et al. 2012). Durch diesen besonderen Aufbau ahmen Tumorsphäroide avaskuläre Tumorareale nach, die die Bildung von Diffusionsgradienten und erhöhte Medikamentenresistenz umfassen. Aber auch die Proliferationsrate ist in solchen Sphäroiden vermindert (Ivascu und Kubbies 2007).

Außerdem führen die ausgeprägten Zell-Zell-Interaktionen in solchen Gebilden wahrscheinlich dazu, dass die Tumorzellen besser vor Anoikis, also dem programmierten Zelltod, geschützt sind (Braunholz et al. 2016). Ein weiterer Vorteil von Sphäroiden ist die höhere Resistenz gegenüber Apoptose (Santini et al. 2000; Sodek et al. 2012). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Zellarchitektur den Zellen die Möglichkeit gibt länger zu überleben, was die Wahrscheinlichkeit auf Metastasierung dementsprechend erhöht.

Doch welche Rolle spielt das Integrin  $\beta 4$  in diesem Zusammenhang?

Ishii et al. (2000) haben gezeigt, dass die Expression von Integrin  $\beta 4$  sowohl im Xenograftmodell bei SCID Mäusen, als auch bei untersuchten Tumoren von Patienten, invers mit dem Auftreten von IP-Karzinosen beim Magenkarzinom zusammenhängt. Je höher also die Expression war, desto geringer fiel die intraperitoneale Metastasierung aus. Dieses Ergebnis konnte auch in hiesigen Tierversuch bestätigt werden, da, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, die IP-Karzinose bei den SCID Mäusen, denen ITGB4 k.d. Zellen gespritzt wurden, signifikant höher war als bei den LUC Kontrollen. Ishii et al. (2000) nahm an, dass das Integrin  $\alpha 6\beta 4$  Laminin- und Wachstumsfaktorabhängig die Apoptose einleitet und damit die intraperitoneale Ausbreitung der Tumorzellen unterdrückt. Ähnliches berichtete bereits Bachelder (1999), nämlich, dass die Bindung von Integrin  $\alpha 6\beta 4$  an Laminin p53-abhängig Apoptose bei Kolonkarzinomzellen einleitet. Die histologische Analyse der IP-Karzinosen zeigte jedoch weder eine besonders hohe Teilungsrate der ITGB4 k.d. Zellen, noch eine vermehrte Apoptose bei der LUC Zellen, wodurch die verschieden ausgeprägte intraperitoneale Karzinose zu erklären gewesen wäre. Des Weiteren war das Gewicht der Nadelstichkanal-Tumoren beider Zelllinien annähernd identisch, was darauf schließen lässt, dass die GC5830 Zellen, sobald sie sich erstmal im Stroma befinden, gleich gut Tumoren ausbilden können –

und das egal ob LUC oder ITGB4 k.d. Zellen. Aus diesem Grund scheint nicht das Wachstum der Sekundärtumoren, sondern ein vorheriger Schritt der Metastasierungskaskade ausschlaggebend zu sein.

Da die Tumorzellen direkt intraperitoneal injiziert wurden, wurden die Schritte der Metastasierungskaskade übersprungen, die die Magenkarzinomzellen hätten bewältigen müssen, um sich intraperitoneal auszubreiten. Dementsprechend standen die Tumorzellen zunächst vor der Aufgabe am Mesothel des Peritoneums oder an freiliegender Extrazellulärmatrix zu adhären, um anschließend in das dahinterliegende Gewebe zu invadieren und dort neue Tumoren auszubilden.

Gebauer et al. (2013) konnte bereits zeigen, dass E- und P-Selektin bei der peritonealen Metastasierung vom Pankreaskarzinom eine essentielle Rolle spielen. Daher war es nicht überraschend, dass auch die IP-Karzinose in unseren Versuchen bei den SCID-select Mäusen jeweils geringer ausfiel als bei den Kontrolltieren. Doch zeigten bekanntermaßen die ITGB4 k.d. Zellen gegenteiliges Verhalten bei den Kontrolltieren. Es entstand der Anschein, dass die ITGB4 k.d. Zellen unter Umständen bestimmte Adhäsions- bzw. Invasionseigenschaften besaßen, die den Zellen auf normalem Mesothel Vorteile liefern könnten. Auch hierauf hin untersuchten wir die Zellen *in vitro* mittels Adhäsionsassays unter Flussbedingungen. Es zeigte sich, dass die Adhäsion der ITGB4 k.d. Zellen auf aktiviertem Endothel absolut gesehen knapp doppelt so hoch wie die der LUC Kontrolle, im Endeffekt jedoch statistisch nicht signifikant war. Versuche an Mammakarzinomzellen konnten hingegen zeigen, dass Tumorzellen, die unter 3D-Kulturbedingungen gewachsen waren und so Sphäroide ausbildeten, andere Adhäsionseigenschaften aufwiesen, als eben solche unter 2D-Bedingungen. In diesem Fall zeigten die Zellen der 3D-Kultur eine erhöhte Expression von E-Selektin-Liganden und zusätzlich auch eine stärkere Wechselwirkung mit E-Selektin in *in vitro* Adhäsionsassays als die Zellen der 2D-Kultur (Chandrasekaran et al. 2012).

Einer der E- und P-Selektin-Liganden ist dabei das CD44 (Alves et al. 2011; Hanley et al. 2005), ein multifunktionaler Adhäsionsrezeptor, welcher im Körper ubiquitär exprimiert wird. An Oberflächen vieler Tumorzellen wird dieser Rezeptor hingegen sehr stark exprimiert und reguliert so zum Teil die Metastasierung (Senbanjo und Chellaiah 2017). Takaishi et al. (2009) hat dabei gezeigt, dass dieser Oberflächenrezeptor auch auf Magenkarzinomzellen exprimiert wird. Im Xenograftmodell an SCID Mäusen konnte beobachtet werden, dass Tumoren, deren Zellen eine hohe CD44-Expression aufwiesen, besonders gut wuchsen - bei weniger Expression hingegen waren auch die

Tumoren kleiner. Des Weiteren fanden sie heraus, dass Zellen, die viel CD44 produzierten, 10-20 mal mehr Sphäroide unter 3D-Kulturbedingungen erzeugen konnten als CD44 negative Zellen. Wie hoch die *in vitro* Expression von CD44 in den GC5830 ist, wurde bisher nicht analysiert. Aus Vorversuchen mit den GC5830 ist jedoch bekannt, dass die Zellen immunhistologisch stark positiv für CD44 sind.

Betrachtet man nun die Eigenschaft der ITGB4 k.d. Zellen unter 3D-Bedingungen vermehrt Sphäroide auszubilden in Kombination damit, dass (1) die Apoptoserate in Sphäroiden gesenkt ist, (2) die Expression von Integrin  $\beta 4$  antiproportional zur Stärke der Peritonealmetastasierung ist (wegen der reduzierten Apoptose), (3) die Zellen in Sphäroiden bessere Adhäsionseigenschaften haben und (4) vermehrt Adhäsionsmoleküle wie CD44 exprimieren und dies (5) wiederum zu mehr Sphäroiden in *in vitro* und zu mehr Metastasierung *in vivo* führt, scheint es möglich, dass der alleinige Integrin  $\beta 4$  Knockdown den Zellen zunächst einen Überlebens- und Disseminationsvorteil einbrachte, den die ITGB4 k.d. Zellen jedoch in den SCID-select Tieren verloren. Offensichtlich sind die ITGB4 k.d. Zellen enorm abhängig von der E- und P-Selektin-Expression, da die massiv gesenkte IP-Karzinose in den SCID-select Mäusen sonst nicht zu erklären wäre.

In Bezug auf zukünftige Forschung an dieser und möglicherweise auch an anderen malignen Zellreihen sollte sich verstärkt auf die Eigenschaften von Zellen aus 3D-Kulturen konzentriert werden, da vorangegangene Forschungsprojekte Hinweise liefern, dass solche Tumorzellen *in vitro* Eigenschaften zeigen, die so vor allem in *in vivo* beobachtet werden können und mit 2D-Kulturen nicht abzubilden sind.

Ein interessantes Bild zeigte sich innerhalb der Gruppen bei Betrachtung des Verteilungsmusters der intraperitonealen Karzinose. Nach Auswertung der neun Regionen (siehe 4.2.1) schienen die Tumorzellen Regionen sozusagen zu bevorzugen. Es fiel auf, dass die Region 2 in allen vier Gruppen überdurchschnittlich stark von der IP-Karzinose befallen war. Des Weiteren schien sich die IP-Karzinose abhängig von der Versuchsgruppe von dort im restlichen Abdomen auszubreiten. Es gibt dabei verschiedene mögliche Gründe, die alleine oder in ihrer Kombination zu diesem Bild führen könnten.

Zunächst einmal ist die Art und Weise der Inokulation zu betrachten. Den Tieren wurden die Tumorzellen jeweils links-abdominell gespritzt, in etwa dort, wo sich die Region 6 befindet. Davon ausgehen, dass die Spritzspitze nach kranio-medial zeigte (vom Tier

aus gesehen), könnte es sein, dass durch die Spritzenführung vermehrt Zellen infradiaphragmal verteilt wurden und sich so das Verteilungsmuster bildete.

Ein anderer Grund könnte der intraperitoneale Flüssigkeitsstrom sein. Physiologischerweise wird die intraperitoneale Flüssigkeit infradiaphragmal absorbiert. Dem entsprechend würde das Diaphragma wie ein Sieb wirken, in dem sich die Tumorzellen sammeln und so zu einem gehäuften Auftreten von Tumorzellen in dieser Region des Abdomens führen, was ebenfalls zu einem solchen Verteilungsmuster beitragen könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre das sogenannte *Homing* von Zellen. Hämatopoetische Stammzellen zeigen als berühmteste Vertreter dieser Eigenschaft das Phänomen, zu ihrem Ursprungsorgan zurückzufinden (Tavassoli und Hardy 1990). Dies macht man sich in der Stammzelltransplantation zu nutze, bei der man den Patienten nach Zerstörung des körpereigenen Knochenmarks hämatopoetische Stammzellen i.v. spritzt und diese daraufhin Chemokin-vermittelt zum Knochenmark finden. Ähnlich könnten sich hierbei die Magenkarzinomzellen verhalten. Betrachtet man nämlich die am stärksten befallenen Regionen, dann fällt auf, dass sich diese hauptsächlich in dem Bereich befinden, in dem physiologischerweise auch der Magen und ihm angrenzende Organe zu finden sind. Ein erster Schritt herauszufinden, welcher dieser Aspekte ursächlich für das Verteilungsmuster der IP-Karzinose ist, ist die histologische Untersuchung der Zwerchfell-Präparate auf mögliche Sekundärtumoren und deren Ausprägung. Außerdem wäre eine rechts-abdominelle Inokulation der Zellen zu erwägen, um die Applikationsweise der Zellen als mögliche Ursache auszuschließen.

Eine weitere Möglichkeit wäre der Vergleich mit anderen Zelllinien, die den Tieren ebenfalls intraperitoneal injiziert wurden - hier zeigten nämlich Pankreaskarzinomzellen eine ähnliche Verteilung, die jedoch nicht abschließend ausgewertet ist. Will man jedoch ein mögliches Homing-Verhalten ausschließen, sollte der Vergleich im besten Fall an Entitäten vorgenommen werden, die anatomisch bzw. embryologisch einen anderen Ursprung haben, wie z.B. Ovarialkarzinomzellen. Sollten sich diese Zellen bei Exploration des Abdomens ebenfalls vornehmlich epigastral befinden, scheint ein Homing-Verhalten weniger wahrscheinlich.

Neben der peritonealen Metastasierung wurde mittels Alu-PCR auch eine mögliche hämatogene Dissemination der Tumorzellen im Xenograftmodell untersucht. Dafür wurden Blut, Knochenmark, Leber und Lunge der Tiere auf humane Alu-Sequenzen getestet. Bis auf einige Ausnahmen sind im Blut und im Knochenmark der Tiere nur

wenige humane Tumorzellen gefunden worden. In den Leberproben waren im Durchschnitt die meisten Tumorzellen gefunden worden. Nun ist nicht bekannt, ob sich die Tumorzellen intra- und extrahepatisch befanden, da zu bedenken ist, dass die Tumorzellen nach intraperitonealer Inokulation Kontakt zur der Leberoberfläche hatten und bei Organentnahme adhärent gewesen sein könnten. Aus diesem Grund wäre im Anschluss eine histologische Untersuchung der Leberpräparate zu empfehlen. Bei der Untersuchung der Lunge wurden im Durchschnitt weniger ITGB4 k.d. Zellen in den SCID-select Tieren gefunden als bei den Kontrolltieren. Das Ergebnis lag jedoch knapp über dem Signifikanzniveau von 5%, weshalb dies nur als Tendenz zu werten ist. So scheinen die ITGB4 k.d. Zellen auch hämatogene Metastasierungsvorteile zu besitzen, die sie wiederum nur in Anwesenheit von E- und P-Selektin nutzen können. Insgesamt ist unbekannt, auf welchem Weg die Zellen disseminiert sind. Eine Möglichkeit wäre, dass die Tumorzellen über die intraperitonealen Sekundärmetastasen extravasieren sind und zu den Fernmetastasen geführt haben. Es scheint jedoch wahrscheinlicher, dass dies über die Nadelstichkanaltumoren passierte. Um dies abschließend klären zu können, sollte die GC5830 auch in einem ektopen Xenograftmodell, z.B. subkutan, Anwendung finden.

Zusammenfassend und in Betracht aller Ergebnisse lässt sich sagen, dass ein möglicher Therapieansatz gegen die Peritonealmetastasierung beim Magenkarzinom gefunden wurde. Wo der alleinige Knockdown von Integrin  $\beta 4$  zu keiner Reduzierung, gar zu einer Steigerung der Peritonealmetastasierung im Xenograftmodell führte, wurde sie bei zusätzlicher E- und P-Selektin-Defizienz der Mäuse hingegen überaus effektiv gesenkt. Da die bisher durchgeführten *in vitro* Versuche keine direkte Erklärung für diesen Effekt lieferten, gleichwohl sie Tendenzen aufzeigten, wäre eine mögliche Idee, die *in vitro* Bedingungen der Zellen den der *in vivo* wachsenden Zellen anzupassen. Eine diskutierbare Option zum besseren Verständnis wäre die Untersuchung von Zellkulturen, die anstatt unter 2D- unter 3D-Kulturbedingungen gewachsen sind, da mannigfaltige Experimente zu diesem Sachverhalt vielversprechende Ergebnisse lieferten. Zu den möglichen Untersuchungen sollte die Durchflusszytometrie, die Genexpressionsanalyse oder auch ein Adhäsionsassay gehören, die anschließende histologische Untersuchung nicht zu vergessen.

## 6. Zusammenfassung

Die ausgedehnte peritoneale Metastasierung stellt oft die Todesursache bei einer Reihe von Malignomen wie Pankreas-, Ovarial- und Magenkarzinomen dar. Das Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis für die molekularen Mechanismen der peritonealen Metastasierung und speziell des Magenkarzinoms zu erlangen. Wesentliche Schritte dieser Metastasierung sind die Adhäsion der Tumorzellen an die luminale Oberfläche des Mesothels und dessen Durchwanderung in das darunter gelegene Bindegewebe. Dabei nutzen die Tumorzellen ähnlich den Leukozyten auf ihrem Weg in entzündete Gewebe Selektine und Integrine, um an das Mesothel anzuheften. Da die vermehrte Expression von Integrin  $\beta 4$  bei einigen Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, wurden humane Magenkarzinomzellen (GC5830), welche Integrin  $\beta 4$  entweder normal (LUC) oder nach Depletion nur noch in geringen Maßen (ITGB4 k.d.) exprimierten, neben *severe combined immunodeficient* (SCID) auch in E- und P-Selektin defizienten (SCID-select) Mäuse intraperitoneal inokuliert.

Der Tierversuch zeigte widererwartend, dass der alleinige ITGB4 k.d. zu einer ausgeprägteren peritonealen Metastasierung führte als bei den LUC Zellen. Bestätigt werden konnte hingegen die Beobachtung, dass die E- und P-Selektin-Defizienz auch bei den GC5830 zu einer signifikanten Reduzierung der peritonealen Metastasierung führte. Bei der Kombination aus ITGB4 k.d. und Selektin-Defizienz kam es offenbar zu einem additiven Effekt, was sich im signifikant niedrigsten peritonealen Karzinose-Index (PCI) Score aller Vergleichsgruppe äußerte.

Zwar zeigten die ITGB4 k.d. Zellen in den *in vitro* Versuchen eine tendenziell stärkere Adhärenz im Flussversuch und eine höhere Proliferationsrate, doch waren die Unterschiede für eine mögliche Erklärung der *in vivo* Beobachtung zu gering. Im *colony forming assay* hingegen bildeten die ITGB4 k.d. Zellen im Matrigel wesentlich mehr sogenannte Sphäroide. Die Zellen in solchen kugelförmigen Tumorzell-Ansammlungen zeigen aufgrund parakriner Stimulation eine gesenkte Apoptoserate und durch erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie dem CD44 bessere Adhäsionseigenschaften, was in Kombination zur stärkeren peritonealen Metastasierung bei den SCID Mäusen geführt haben könnte. Trotz diesen Vorteiles konnten die ITGB4 k.d. Zellen den Selektin-Knockout der SCID-select Mäuse nicht ausgleichen, was die Wichtigkeit sowohl von Selektinen, aber auch von Integrinen in der Leukozytenadhäsionskaskade unterstreicht und sie als mögliche Targets künftige Krebstherapien interessant macht.



## Zusammenfassung

Extensive peritoneal metastasis is often the cause of death in a range of malignancies such as pancreatic, ovarian, and gastric cancers. The aim of this work was to gain a better understanding of the molecular mechanics of peritoneal metastasis, and in particular of gastric carcinoma. Essential steps of this metastasis are the adhesion of the tumor cells to the luminal surface of the mesothelium and its migration into the underlying connective tissue. Like the leukocytes, tumor cells use selectins and integrins to attach to the mesothelium on their way into inflamed tissue.

Since the increased expression of integrin  $\beta 4$  in some tumor entities is associated with a poorer prognosis, human gastric carcinoma cells (GC5830), which express integrin  $\beta 4$  either normal (LUC) or after depletion only to a small extent (ITGB4 k.d.), were inoculated in addition to *severe combined immunodeficient* (SCID) also in E- and P-selectin deficient (SCID-select) mice intraperitoneally.

The animal experiment showed, contrary to expectations, that the sole ITGB4 k.d. resulted in a more pronounced peritoneal metastasis than in the LUC cells. The observation that E- and P-selectin deficiency also led to a significant reduction in peritoneal metastases in the GC5830 was confirmed. In the combination of ITGB4 k.d. and selectin deficiency, it appeared to have an additive effect, which was expressed in the significantly lowest peritoneal carcinomatosis index (PCI) score of all comparison groups.

Although the ITGB4 k.d. cells in the *in vitro* experiments tended to have a stronger adherence in the adhesion assay and a higher proliferation rate, but the differences were too small for a possible explanation of the *in vivo* observation. In the *colony forming assay*, on the other hand, the ITGB4 k.d. cells in Matrigel formed essentially more so-called spheroids. The cells in such spherical tumor cell clusters show reduced apoptosis due to paracrine stimulation and better adhesion properties through increased expression of adhesion molecules such as CD44, which in combination could have resulted in enhanced peritoneal metastasis in the SCID mice. Despite this advantage, the ITGB4 k.d. cells do not outbalance the selectin knockout of SCID-select mice, underscoring the importance of both selectins and integrins in the leukocyte adhesion cascade and making them attractive targets for future cancer therapies.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

§	Paragraph
°C	Grad Celsius
±	plusminus
10 <sup>6</sup>	1.000.000
2D	zweidimensional, zwei Dimensionen
5-FU	5-Fluoruracil
AEG	adenocarcinoma of esophagogastric junction
AG	Antigen
AK	Antikörper
BGBI	Bundesgesetzblatt
BI	Billroth I
BII	Billroth II
BSA	Bovine Serum Albumin
BSC	best supportive care, best supportive care
bzw.	beziehungsweise
cm	Centimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
c-Src	Akronym aus: cellular and sarcoma
CT	Computertomographie
CTC	circulating tumor cells
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
EMR	Endoskopische Mukosaresektion
ESD	Endoskopische Submukosadisektion
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
GC	Gastric Cancer
geb.	geboren
H.P.	Helicobacter pylori
HE	Hamatoxylin-Eosin
HER-2	human epithal growth factor receptor 2
HIPEC	Siehe Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
i.v.	intravenös
IP	intraperitoneal

## Abkürzungsverzeichnis

ITGB4	Integrin $\beta$ 4
k.d.	Knockdown
Kat. Nr.	Katalognummer
kg	Kilogramm
L	Liter
LK	Lymphknoten
MAGIC	Madical Reseach Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy
MAPK	mitogen activated protein
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Mol (SI-Basiseinheit der Stoffmenge)
mRNA	messenger RNA
ÖGD	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCI	peritoneal cancer index
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
Pkt.	Punkte
Ras	Rat sarcoma
RhoA	Ras homolog gen family, member A
RNA	Ribonukleinsäure (RNS)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCID	severe combined immunodeficient
shRNA	short hairpin RNA
SO <sub>2</sub>	Schwefeldioxid
TBS	Tris Buffered Saline
TNF	Tumornekrosefaktor
UpM	Umdrehungen pro Minute
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
wt	wildtyp
Z/mL	Zellen pro Mililiter

## 8. Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. 2002. Garland Science *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition.*
- Alves CS, Burdick MM, Thomas SN, Pawar P, Konstantopoulos K. 2011. "The Dual Role of CD44 as a Functional P-Selectin Ligand and Fibrin Receptor in Colon Carcinoma Cell Adhesion The Dual Role of CD44 as a Functional P-Selectin Ligand and Fibrin Receptor in Colon Carcinoma Cell Adhesion." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 294: 907–16.
- Bachelder RE, Marchetti A, Falconi R, Soddu S, Mercurio AM. 1999. "Activation of p53 Function in Carcinoma Cells by the  $\alpha 6\beta 4$  Integrin." *Journal of Biological Chemistry* 274: 20733–37
- Braunholz D, Saki M, Niehr F, Öztürk M, Puértolas BB, Konschak R, Budach V, Tinhofer I. 2016. "Spheroid Culture of Head and Neck Cancer Cells Reveals an Important Role of EGFR Signalling in Anchorage Independent Survival." *PLoS ONE* 11: 1–14.
- Carneiro F. 1997. "Classification of Gastric Carcinoma." *Current Diagnostic Pathology* 4: 51–59.
- Casey RC, Burleson KM, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR, Ruff LE, Skubitz APN. 2001. "B1-Integrins Regulate the Formation and Adhesion of Ovarian Carcinoma Multicellular Spheroids." *American Journal of Pathology* 159: 2071–80.
- Chandrasekaran S, Geng Y, DeLouise LA, King MA. 2012. "Effect of Homotypic and Heterotypic Interaction in 3D on the E-Selectin Mediated Adhesive Properties of Breast Cancer Cell Lines." *Biomaterials* 33: 9037–48.

- Chen M, Sinha M, Luxon BA, Bresnick AR, O'Connor KL. 2009. "Integrin  $\alpha 6\beta 4$  Controls the Expression of Genes Associated with Cell Motility, Invasion, and Metastasis, Including S100A4/Metastasin." *The Journal of biological chemistry* 284: 1484–94.
- Cho H, Cho CS, Indig GL, Lavasanifar A, Vakili MR, Kwon GS. 2014. "Polymeric Micelles for Apoptosis-Targeted Optical Imaging of Cancer and Intraoperative Surgical Guidance." *PLoS ONE* 9: e89968
- Correa P, Houghton JM. 2007. "Carcinogenesis of Helicobacter Pylori." *Gastroenterology* 133: 659–72.
- Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, van de Velde CJH, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith B, Langley RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ. 2006. "Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer." *The New England Journal of Medicine* 355: 11–20.
- Fidler IJ. 2003. "The Pathogenesis of Cancer Metastasis: The 'seed and Soil' Hypothesis Revisited." *Nature Reviews Cancer* 3: 453–458.
- Fox JG, Wang TC. 2007. "Inflammation , Atrophy , and Gastric Cancer." *The Journal of Clinical Investigation* 117: 60–69.
- Gebauer F, Wicklein D, Stübke K, Nehmann N, Schmidt A, Salamon J, Peldschus K, Nentwich MF, Adam G, Tolstonog G, Bockhorn M, Izbicki JR, Wagener C, Schumacher U. 2013. "Selectin Binding Is Essential for Peritoneal Carcinomatosis in a Xenograft Model of Human Pancreatic Adenocarcinoma in pfp -- /rag2 -- Mice." *Gut* 62: 741–50.
- Gotoda T, Iwasaki M, Kusano C, Seewald S, Oda I. 2010. "Endoscopic Resection of Early Gastric Cancer Treated by Guideline and Expanded National Cancer Centre Criteria." *British Journal of Surgery* 97: 868–71.

- Guggenheim DE, Saha MA. 2013. "Gastric Cancer Epidemiology and Risk Factors." *Journal of Surgical Oncology* 117: 230–36.
- Gurzu S, Jung I, Kadar Z. 2015. "Aberrant Metastatic Behavior and Particular Features of Early Gastric Cancer." *Apmis* 123: 999–1006.
- Hanley WD, Burdick MM, Konstantopoulos K, Sackstein R. 2005. "CD44 on LS174T Colon Carcinoma Cells Possesses E-Selectin Ligand Activity." *Cancer Research* 65: 5812–17.
- Hogervorst F, Kuikman I, von dem Borne AE, 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: 765–70.
- Hynes RO. 2002. "Integrins : Bidirectional, Allosteric Signaling Machines." *Cell* 110: 673–87.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2010. "Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins" *World Health Organization International Agency for Research on Cancer* 94.
- Ishii Y, Ochiai A, Yamada T, Akimoto S, Yanagihara K, Kitajima M, Hirohashi S. 2000. "Integrin  $\alpha 6\beta 4$  as a Suppressor and a Predictive Marker for Peritoneal Dissemination in Human Gastric Cancer." *Gastroenterology* 118: 497–506.
- Isomoto H, Shikuwa S, Yamaguchi N, Fukuda E, Ikeda K, Nishiyama H, Ohnita K, Mizuta Y, Shiozawa J, Kohno S. 2009. "Endoscopic Submucosal Dissection for Early Gastric Cancer : A Large-Scale Feasibility Study." *Gut* 58: 331–336.
- Ivascu A, Kubbies M. 2007. "Diversity of Cell-Mediated Adhesions in Breast Cancer Spheroids." *International Journal of Oncology* 31: 1403–13.

- Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. 2015. "Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 23: 700–713.
- Kariya Yo, Kariya Yu, Gu J. 2017. "Roles of Integrin  $\alpha\beta4$  Glycosylation in Cancer." *Cancers* 9: 1–10.
- Khatami F, Karbakhsh M. 2015. "Socioeconomic Position and Incidence of Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of Epidemiology and Community Health* 69: 818–819.
- Köhler 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: 602–609.
- Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. 2016. "Review Emerging Biological Principles of Metastasis." *Cell* 168: 670–91.
- Lauren P. 1965. "The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diff Use and so-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification." *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 64: 31–49.
- Liotta LA, Kohn E. 2004. "Cancer and the Homeless Cell." *Nature* 430: 973–74.
- Litjens SHM, de Pereda JM, Sonnenberg A. 2006. "Current Insights into the Formation and Breakdown of Hemidesmosomes." *Trends in Cell Biology* 16: 376–83.
- Marshall BJ, Goodwin CS, Warren JR, Murray R, Blincow ED, Blackbourn SJ, Philipps M, Waters TE, Sanderson CR. 1988. "Prosektive Double-Blind Trial of Duodenal Ulcer Relapse after Eradication of Campylobacter Pylori." *The Lancet* December: 1437–1422.

Möhler M, Al-Batran SE, Andus T, Anthuber M, Arends J, Arnold D, Aust D, Baier P, Baretton G, Bernhardt J, Boeing H, Böhle E, Bokemeyer C, Bornschein J, Budach W, Burmester E, Caca K, Diemer WA, Dietrich CF, Ebert M, Eickhoff A, Ell C, Fahlke J, Feußner H, Fietkau R, Fischbach W, Fleig W, Flentje M, Gabbert HE, Galle PR, Geissler M, Gockel I, Graeven U, Grenacher L, Groß S, Hartmann JT, Heike M, Heinemann V, Herbst B, Herrmann T, Höcht S, Hofheinz RD, Höfler H, Höhler T, Hölscher AH, Horneber M, Hübner J, Izbicki JR, Jakobs R, Jenssen C, Kanzler S, Keller M, Kiesslich R, Klautke G, Körber J, Krause BJ, Kuhn C, Kullmann F, Lang H, Link H, Lordick F, Ludwig K, Lutz M, Mahlberg R, Malfertheiner P, Merkel S, Messmann H, Meyer HJ, Mönig S, Piso P, Pistorius S, Porschen R, Rabenstein T, Reichardt P, Ridwelski K, Röcken C, Roetzer I, Rohr P, Schepp W, Schlag PM, Schmid RM, Schmidberger H, Schmiegel WH, Schmoll HJ, Schuch G, Schuhmacher C, Schütte K, Schwenk W, Selgrad M, Sandler A, Seraphin J, Seufferlein T, Stahl M, Stein H, Stoll C, Stuschke M, Tannapfel A, Tholen R, Thuss-Patience P, Tremel K, Vanhoefer U, Vieth M, Vogelsang H, Wagner D, Wedding U, Wilke A, Wittekind C. 2012. "S3-Leitlinie Magenkarzinom: Diagnostik Und Therapie Der Adenokarzinome Des Magens Und Ösophagogastralen Übergangs." *Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Deutsche Krebsgesellschaft (DKG)*.

Mura G, Verdelli B. 2016. "The Features of Peritoneal Metastases from Gastric Cancer." *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 2: 365–374.

Paoletti X, Oba K. 2010. "Benefit of Adjuvant Chemotherapy for Resectable Gastric Cancer." *Journal of the American Medical Association* 303: 1729–37.

Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist K, Sundquist J, Hemminki K. 2016. "Metastatic Spread in Patients with Gastric Cancer." *Oncotarget* 7: 52307–16.

Sampson JA. 1931. "Implantation Peritoneal Carcinomatosis of Ovarian Origin." *The American journal of pathology* 7: 423–44.



- Santini MT, Rainaldi G, Indovina PL. 2000. "Apoptosis, Cell Adhesion and the Extracellular Matrix in the Three-Dimensional Growth of Multicellular Tumor Spheroids." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 36: 75–87.
- Senbanjo LT, Chellaiah MA. 2017. "CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5: 18
- Shikata K, Kiyohara Y, Kubo M, Yonemoto K, Ninomiya T, Shiota T, Tanizaki Y, Doi Y, Tanaka K, Oishi Y, Matsumoto T, Iida M. 2006. "A Prospective Study of Dietary Salt Intake and Gastric Cancer Incidence in a Defined Japanese Population : The Hisayama Study." *International Journal of Cancer* 119: 196–201.
- Sodek KL, Murphy KJ, Brown TJ, Ringuette MJ. 2012. "Cell–Cell and Cell–Matrix Dynamics in Intraperitoneal Cancer Metastasis." *Cancer Metastasis Review* 31: 397–414.
- Stewart RL, O'Connor KL. 2016. "Clinical Significance of the Integrin in Human Malignancies." *Lab Invest* 95: 976–986.
- Sugarbaker PH. 2010. "Surgical Responsibilities in the Management of Peritoneal Carcinomatosis." *Journal of Surgical Oncology* 101: 713–24.
- Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SSW, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SAK, Shimada Y, Wang TC. 2009. "Identification of Gastric Cancer Stem Cells Using the Cell Surface Marker CD44." *Stem Cells* 27: 1006–20.
- Tavassoli M, Hardy CL. 1990. "Molecular Basis of Homing of Intravenously Transplanted Stem Cells to the Marrow." *Blood* 76: 1059–71.
- Thomassen I, van Gestel IR, van Ramshorst B, Luyer MD, Bosscha K, Nienhuijs SW, Lemmens VE, de Hingh HI. 2013. "Peritoneal Carcinomatosis of Gastric Origin: A Population-Based Study on Incidence, Survival and Risk Factors." *International Journal of Cancer* 134: 622–28.

- Valastyan S, Weinberg RA. 2011. "Review Tumor Metastasis : Molecular Insights and Evolving Paradigms." *Cell* 147: 275–92.
- Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. 2014. "Helicobacter Pylori-Induced Gastric Inflammation and Gastric Cancer." *Cancer Letters* 345: 196–202.
- Watanabe H, Jass JR, Solbin LH in Collaboration with Pathologists in 8 Countries. 1990. *Histological Typing of Oesophageal and Gastric Tomours*. 2nd ed. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Yang P, Zhou Y, Chen B, Wan HW, Jia GQ, Bai HL, Wu XT. 2009. "Overweight , Obesity and Gastric Cancer Risk: Results from a Meta-Analysis of Cohort Studies." *European Journal of Cancer* 45: 2867–73.

## **9. Danksagung**

Im Laufe dieses Projektes haben mich viele Menschen auf ganz unterschiedliche Art und Weise unterstützt und haben so zur Vollendung meiner Doktorarbeit beigetragen.

Vor nunmehr vier Jahren begann ich eben jene Doktorarbeit am Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie unter der Leitung von Herrn Prof. Schumacher.

Aufgrund eines Studienplatztausches, welchen ich ein Semester zuvor tätigte, waren mir mögliche Ansprechpartner am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zunächst gänzlich unbekannt. Auf den Ratschlag von Herrn Prof. Mester hin, es gäbe für eine experimentelle Doktorarbeit keinen besseren Ansprechpartner, wandte ich mich an Herrn Prof. Schumacher.

Herr Professor Schumacher, ich möchte Ihnen für die Möglichkeit danken, dieses Projekt bei Ihnen begonnen haben zu dürfen und es in Form dieser Doktorarbeit abschließen zu können. Stets haben Sie sich die Zeit genommen aufkommende Fragen schnellstmöglich zu beantworten. In all den Jahren konnte ich mich auf Ihr Wort verlassen, wodurch ich in dieser Arbeit Sicherheit bekam.

Auch Dir, Daniel Wicklein, als meinem Betreuer, möchte ich für deine Unterstützung danken. Durch deine Erläuterungen hast du mir die experimentelle Grundlagenforschung näher gebracht. Es war stets interessant deinen Gedankengängen zu folgen und mit Dir dieses Projekt voranzutreiben

Nicht zu vergessen das gesamte Team des anatomischen Instituts, in welchem mich ein Jeder durch seine ganz speziellen Fertigkeiten und seine eigenen Erfahrungen unterstützen konnte. Dabei möchte vor allem Dich, Hanna Maar, hervorheben, die du mir auf so vielen Ebenen deine Unterstützung und Hilfe hast zukommen lassen.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, da sie mich in all der Zeit unterstützt und mir den Rücken freigehalten haben. Durch dich Mama, und auch durch dich Papa, konnte ich mich mit Erfolg meinem Studium und parallel dieser meiner Doktorarbeit widmen – große Bausteine des durch euch gelegten Fundamentes meines zukünftigen Lebens.

*Durch diese Arbeit wurde mein Interesse an Onkologie geweckt.  
Im März 2018 begann ich meine Weiterbildung an der Klinik für  
Radioonkologie und Strahlentherapie der Charité Berlin.*

## **10. Lebenslauf**

## **11. Eidesstattliche Versicherung**

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

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

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

Unterschrift: .....