

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Direktor der Einrichtung
Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Bedeutung von Integrin $\beta 4$ und E-/P-Selektin für das Tumorstadium im Prostatakarzinom-Xenograftmodell

Dissertation

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

vorgelegt von:

Daniela Schetler
aus Soltau

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 22.05.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Tobias Lange

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Manfred Jücker

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Krebs	5
1.2	Das Prostatakarzinom	5
1.2.1	Das Prostatakarzinom	5
1.2.2	Epidemiologie	6
1.2.3	Verlauf und Therapie	6
1.2.4	Prognose	6
1.3	Die Metastasierung als mehrschrittiger Prozess	6
1.4	Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) als Voraussetzung für den Metastasierungsvorgang	8
1.5	Molekulares Mimikry bei der endothelialen Adhäsion	9
1.5.1	Selektine	10
1.6	Integrine	12
1.6.1	Struktur und Liganden der Integrine	12
1.6.2	Das bidirektionale Signaling der Integrine	13
1.6.3	Die Rolle der Integrine bei Transformation und Tumorwachstum.	14
1.6.4	Das Integrin $\alpha 6\beta 4$	14
2	Hypothesen und Fragestellungen	16
3.	Material und Methoden	17
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
3.2	Zelllinien	17
3.3	Depletion von Integrin beta 4 durch shRNA	17
3.4	Zellkultur	17
3.5	Immunhistochemie	18
3.6	Histologische Färbung nach Feulgen	18
3.7	qPCR- <i>profiler array</i>	19
3.8	2D-Proliferationsversuche <i>in vitro</i> unter SDF-1 α -Stimulation	19
3.9	Proliferationsversuche in Soft-Agar	19
3.10	Durchflusszytometrischer Nachweis von ITGB4 und pH2AX	20
3.11	Nachweis von SDF-1 α mittels ELISA	21
3.12	Proteinisolation aus Zellen und Geweben für Western Blot	21
3.13	Herstellung von Gewebelysaten aus Xenografttumoren	22
3.14	Proteinkonzentrationsbestimmung durch Extinktionsmessung	22
3.15	Nachweis von Signalmolekülen im Western Blot	23
3.16	PamGene Tyrosinkinase-Array	25
4.	Ergebnisse	26
4.1	Nachweis der ITGB4-Expression sowie von Markern der Proliferation und Apoptose an Xenografttumor-Material	26
4.1.1	Stabiler <i>knockdown</i> von ITGB4 nach <i>in vivo</i> -Wachstum der Xenografttumoren	26

4.1.2	Die immunhistochemische Färbung auf Ki67 konnte keinen Effekt der ITGB4-Depletion auf die Proliferation der Tumoren nachweisen.	27
4.1.3	ITGB4-depletierte Tumore zeigten eine gesteigerter Apoptose in der Feulgen-, anti-pH2AX und anti-Bim-Färbung	28
4.1.4	Die ITGB4-KD Zellen gehen <i>in vitro</i> nicht in die Apoptose	30
4.1.5	Ergebnis der Western Blot Analysen aus Proteinlysaten der Xenografttumoren	30
4.2	CXCR4-Expression von PC-3-Zellen und Änderungen der intratumoralen Konzentration des CXCR4-Liganden SDF-1 α nach ITGB4-KD und Selektin-KO	31
4.2.1	Screening der Chemokinrezeptor-Expression in PC3-Zellen	31
4.2.2	Der intratumorale SDF-1 α -Gehalt ist allein durch Selektindefizienz als auch durch ITGB4-Depletion verringert.	32
4.2.3	Ergebnis des SDF-1 α ELISA	33
4.3	Analysen zum Wachstumsverhalten der Tumorzellen nach ITGB4-KD	33
4.3.1	XTT-Assay bei Subkonfluenz der kultivierten Zellen	33
4.3.2	Proliferationsversuche nach stärkerer Vereinzelung und unter Stimulation mit SDF-1 α	34
4.3.3	Ergebnis der <i>Colony forming assays</i>	35
4.4.	Durch ITGB4-KD und Selektin-KO ausgelöste Änderungen im Tumor- <i>Signaling</i>	36
4.4.1	Ergebnis der Western Blot Analysen aus Proteinlysaten der Xenografttumoren	36
4.4.2	PamChip [®] KinaseArray kultivierter PC-3-Zellen mit normalem ITGB4-Status bzw. ITGB4-KD	37
5.	Diskussion	38
5.1	Ausblick	45
6.	Zusammenfassung	46
7.	Abstract	47
8.	Abkürzungsverzeichnis	48
9.	Literaturverzeichnis	50
10.	Abbildungsverzeichnis	55
11.	Tabellenverzeichnis	56
12.	Danksagung	57
13.	Lebenslauf	59
14.	Eidesstattliche Versicherung	60

1 Einleitung

1.1 Krebs

Ein Viertel aller Männer und ein Fünftel aller Frauen in Deutschland stirbt an Krebs, wobei mehr als 90 % aller Krebs-bedingten Todesfälle auf die Bildung von Fernmetastasen zurück gehen (Robert-Koch-Institut/Krebsregisterdaten 2013). Die Bezeichnung Krebs beschreibt eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die alle einige wichtige Gemeinsamkeiten aufweisen. Epithelzellen eines Organs haben sich der natürlichen Wachstumskontrolle des Organismus entzogen und teilen sich trotz falschen Bauplans unkontrolliert weiter, statt, wie es den Regeln des Organismus entsprechen würde, abzusterben. Durch Veränderungen im Erbmateriale können Krebszellen neue Fähigkeiten gewinnen (z. B. über die Expression von Onkogenen) oder andere verlieren (z. B. über die genetische Deletion von Tumorsuppressorgenen); sie werden dann als maligne bezeichnet (lateinisch: *malignus* - schlecht geartet). Neubildungen von Körpergewebe (Neoplasien), die durch Fehlregulationen bei der Zellproliferation entstehen, bezeichnet man als maligne Tumoren (lateinisch: *tumor* - Wucherung, Geschwulst). Tumoren werden klassifiziert nach ihrem Ursprungsgewebe, wobei Karzinome vom Epithel abstammen. Die besonderen Eigenschaften der Epithelien sind ihre Ortsständigkeit, die sie durch Anheftung an ihre Basalmembran, über ihre Haftkomplexe und ihren Reichtum an speziellen Zellkontakten beziehen, sowie ihre durch eine apikale und eine basale Seite geprägte Polarität (Nelson 1989). So haben im Körper alle Zellen eine definierte Lokalisation, sind Teile eines Gewebeverbands mit einem dichten Netzwerk an Zellkontakten und verbindenden Fasern. Eine Ausnahme bilden die zur Migration im Körper fähigen mesenchymalen Blut- und Immunzellen. Maligne Zellen proliferieren ungebremst, dringen invasiv in benachbartes Gewebe ein, lösen sich aus ihrem Zellverband und gehen auf Wanderschaft, wobei sie sich über Lymphbahnen sowie Blutgefäße verteilen und sich als Tochtergeschwülste, den Metastasen (altgriechisch: *μετάσταση* - Wanderung), in entfernten Regionen des Körpers ansiedeln können. Das Vorhandensein oder Fehlen von Metastasen bei soliden Tumoren ist ein entscheidender Faktor, der den Verlauf der Erkrankung bestimmt.

1.2 Das Prostatakarzinom

1.2.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom (PCa) ist ein maligner Tumor der Prostata, histologisch handelt es sich dabei in 98% der Fälle um ein Adenokarzinom. Die Prostata umschließt, in einer eigenen Kapsel liegend, den oberen Harnröhrenteil, und ist zonenartig aufgebaut (Benninghoff 1994). Wachstum und Funktion der Prostata werden vorwiegend von dem Geschlechtshormon Testosteron gesteuert, daher ist meist eine Abhängigkeit des Prostatakarzinoms vom Testosteron vorhanden. Anders als bei der gutartigen Hyperplasie, die vom Drüsen-, Muskel-, und Bindegewebe ausgeht, entstammt ein Malignom ausschließlich dem Drüsenanteil und geht in den meisten Fällen, etwa 66%, aus der äußeren Drüsenzone hervor. Da die äußere Zone weit von der Harnröhre entfernt liegt, bleibt der Tumor lange Zeit asymptomatisch und daher unbemerkt.

1.2.2 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist mit ca. 10 % die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache des Mannes (Bonn 2013). Mit einer Neuerkrankungsrate von 67.600 Patienten pro Jahr und einem Anteil von 25% an der Gesamtzahl aller Krebserkrankungen ist es in Deutschland die häufigste Krebserkrankung des Mannes (Robert-Koch-Institut/Krebsregisterdaten 2013). Die Inzidenz steigt seit 1980 kontinuierlich an. Die jährliche Mortalität liegt in Deutschland von um 12.000 Fälle. Die jährliche Prävalenz steigt mit zunehmendem Lebensalter deutlich an; zwischen dem 40. und dem 80. Lebensjahr um mehr als den Faktor 1000 (Schelhase 2006). Zu den Risikofaktoren zählen fortgeschrittenes Alter, genetische Prädisposition, ethnische Abstammung und chronische Prostatitis (Gallagher et al. 2010).

1.2.3 Verlauf und Therapie

Eine lokalisierte maligne Erkrankung unterscheidet sich klinisch selten von einer benignen Hyperplasie, da Frühsymptome fehlen. Wird der Tumor zu spät entdeckt, entwickelt er Metastasen, die sich zunächst in die Lymphknoten des Beckens, später dann aber in andere Organsysteme des Körpers, am häufigsten in die Knochen (Wirbelsäule, Rippen- und Beckenknochen) absiedeln. So sind häufige Erstsymptome Knochenschmerzen oder pathologische Frakturen aufgrund von schon bestehender Metastasen, während der Primärtumor (Primarius) klinisch stumm bleibt. Man spricht dann von einem okkulten Karzinom. Patienten mit lokal begrenzten Tumoren können häufig noch operativ oder strahlentherapeutisch behandelt werden. Aufgrund der Hormonsensitivität des Prostatakarzinoms stehen zudem verschiedene endokrine Therapien zur Verfügung. Hat die Metastasierung bereits stattgefunden, gilt das PCa als unheilbar und die Mortalität steigt deutlich an (Wirth 2016).

1.2.4 Prognose

Eine Behandlung mit Aussicht auf Heilung (kurativ), ist nur möglich, wenn das entartete Gewebe die Organgrenzen noch nicht überschritten hat und keine Metastasen vorliegen. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung liegt bei auf die Drüse begrenzten Tumoren bei 80 – 99 % (Porter et al. 2006). Bei gestreuten Tumoren liegt dieser Wert nur noch bei 31 % (American-Cancer-Society 2012). Die vorliegende mangelhafte Therapierbarkeit des metastasierten PCa macht genauere Kenntnisse über die Grundlagen der Metastasierung erforderlich, um bessere therapeutische Konzepte entwickeln zu können.

1.3 Die Metastasierung als mehrschrittiger Prozess

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass Metastasen bei ihrer Entstehung einem übergeordneten, sequentiellen Prinzip folgen (Lange et al. 2014b). Der Metastasierungsprozess erfolgt kaskadenartig mit einer Vielzahl an Einzelschritten (Chambers et al. 2002), bei denen Zelloberflächenmoleküle, Zelladhäsionsmoleküle sowie charakteristische chemotaktische Faktoren eine entscheidende Rollen spielen (Turner 1982, Raz and Lotan 1987). Zu Beginn wachsen die entarteten Zellen im Epithelverband zwar unkontrolliert, aber noch durch ihre physiologisch vorhandene Basalmembran (BM) begrenzt. Man spricht noch von einem Carcinoma in situ. Während dieser unkontrollierten Proliferation entgleitet die somatische Zelle graduell und irreversibel den komplexen Regulationsmechanismen ihres normalen

Wachstums. Dabei kommt es zur Verschiebung des physiologisch bestehenden Gleichgewichts zwischen Proliferation und programmiertem Zelltod, der Apoptose (altgriechisch: ἀποπτειν – abfallen). Die Zellen senden ab einer bestimmten Primärtumorgröße proangiogene chemotaktische Signale an die Umgebung aus, die zum Einwachsen von Blutgefäßen in den Tumor führen, welche dann seiner Nährstoff- und Sauerstoffversorgung dienen (Neoangiogenese). Der komplexe Metastasierungsvorgang beginnt dann damit, dass einzelne epitheliale Tumorzellen ihre interzellulären Kontakte wie *tight junctions*, Desmosomen sowie ihre Kontakte der *Zonula adhärens* abbauen und sich von ihrer Basalmembran lösen. Auch lösen sie die den Tumor umgebende extrazelluläre Matrix auf und durchbrechen die Basalmembran (Invasion), so dass es zur Migration der Tumorzellen durch das umliegende Bindegewebe (Stroma) kommt. Die Tumorzellen verlieren in diesem Prozess übergangsweise ihren eigentlich epithelialen, nicht migratorischen, stark proliferativen Charakter und nehmen Eigenschaften mesenchymaler Zellen an, d. h. sie werden migratorisch und proliferieren weniger. Diese molekulare und zellbiologische Umorganisation bezeichnet man als epithelial-mesenchymale Transition (EMT), auf die im Kapitel 1.4. näher eingegangen wird (Scheel and Weinberg 2012).

In einem nächsten Schritt durchbrechen die migrierenden Tumorzellen die Gefäßwand (das Endothel) der eingesprossenen Blutgefäße und gelangen so in den zirkulierenden Blutstrom (Intravasation). Die zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) haben den Kontakt zur extrazellulären Matrix (ECM) des Primärtumors verloren, was in einer epithelialen Zelle physiologischerweise den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen würde (Paoli et al. 2013). Dieser bestimmte Fall der intrinsischen Apoptose, der durch die Heimatlosigkeit entsteht, wird *Anoikis* (griechisch: ἀνοικίς - heimatlos) genannt (Frisch et al. 2013). CTCs, die losgelöst von der ECM in den Blutstrom ein- und später wieder austreten, können vermutlich aufgrund der EMT bis zu einem gewissen Grad die *Anoikis* supprimieren (*Anoikis*-Resistenz) (Frisch et al. 2013). Durch die später folgende Anheftung an das Endothel des Metastasenorgans und die Einnistung in das Stroma des Wirtsorgans wird die *Anoikis* dauerhaft supprimiert. Zunächst müssen die CTCs jedoch im Blutstrom überleben und sich am Ort der späteren Metastase an das Gefäßendothel der Blutgefäße anheften (Adhäsion). Schließlich müssen sie auch diese Endothelbarriere überwinden, um ins Stroma des Organs zu gelangen und sich anzusiedeln. Ausgewanderte, ins Stroma des Metastasenorgans disseminierte Tumorzellen (DTC) können einzeln oder in Form von Mikrometastasen in einem Stadium der „*dormancy*“ jahrelang verharren oder erneut proliferieren und detektierbare, klinisch auffällige Metastasen bilden (Kolonisation). Hierfür wird vermutlich die EMT wieder umgekehrt im Sinne einer mesenchymal-epithelialen Transition (MET) (Gunasinghe et al. 2012).

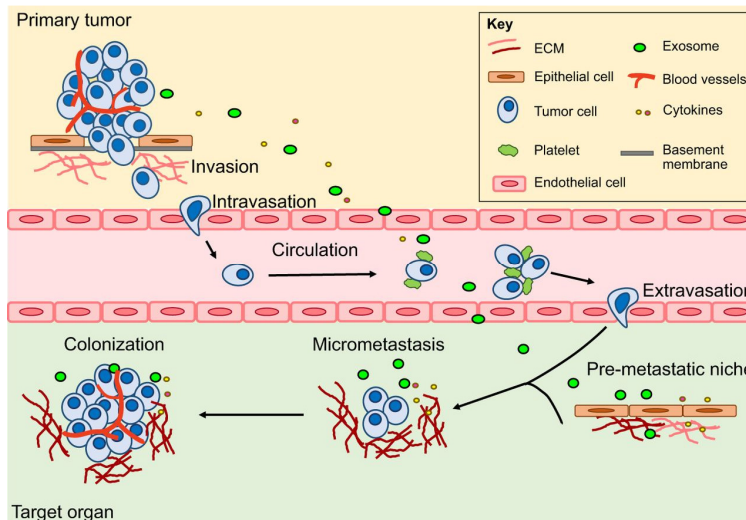


Abbildung 1: Schematische Darstellung der metastatischen Kaskade als mehrschrittiger Prozess. Invasion, Intravasation, Überleben in der Zirkulation des Blutstroms, Extravasation und Verharren in *dormancy* oder Kolonisation des Stromas im Zielorgan sind Schlüsselschritte hämatogener Metastasierung. Durch Sekretion zahlreicher Faktoren (z. B. Cytokine oder Protein- bzw. Nukleinsäure-haltige Exosomen) reguliert der Primärtumor die Entstehung einer prä-metastatischen Nische und beeinflusst somit selbst die Entwicklung von Metastasen (Gomez-Cuadrado et al. 2017).

1.4 Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) als Voraussetzung für den Metastasierungsvorgang

Diverse Studien der vergangenen Jahre weisen darauf hin, dass Primärtumorzellen ihren invasiven, migratorischen Charakter durch Prozesse erlangen, die der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) der Embryonalentwicklung sehr ähnlich sind (Scheel and Weinberg 2012). EMT bezeichnet einen zellulären Prozess, in dem Epithelzellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und über einen Umbau ihres Zytoskeletts, Veränderungen in der Expression ihrer Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAMs) sowie den Verlust ihrer apikal-basalen Polarität einen migrationsfähigen, invasiven, mesenchymalen Charakter annehmen (Hanahan and Weinberg 2011, Valastyan and Weinberg 2011). Es kommt zu einer Herunterregulation von E-Cadherin, Claudin und Occludin, stattdessen werden N-Cadherin und spezielle mesenchymale Integrine heraufreguliert. Die Zellen lösen ihre Interzellular- und Basalmembrankontakte auf, bauen ihr Zytoskelett durch Ausbildung von Stressfasern um und erhalten dadurch einen mesenchymalen Phänotyp. Der fließende Übergang dieser beiden Phänotypen durch die EMT ist ein wichtiger Bestandteil der Embryonalentwicklung. Gemeinsam mit dem umgekehrten Vorgang, der mesenchymal-endothelialen Transition (MET) ermöglicht die EMT eine normale Organentwicklung und steuert wichtige Abläufe wie Gastrulation, Bildung der Neuralleiste oder der Herzklappen (Kang and Massague 2004).

Epithelzellen zeichnen sich durch ihre festen Zell-Zell-Kontakte sowie ihre Verankerung an der Basalmembran und an der die Zelle umgebenden extrazellulären Matrix aus. Wird diese Zell-zu Matrix-Interaktion im gesunden Epithel gestört, tritt der Prozess der Apoptose (Anoikis) ein und die normale Zelle geht zugrunde.

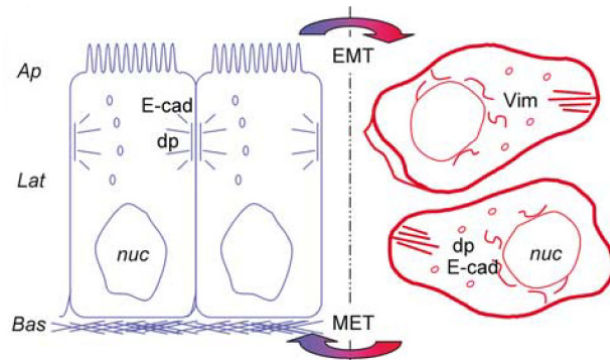


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT).

Epitheliale Zellen (blau) können feste interzelluläre Kontakte wie Adhärenskontakte, Verschlusskontakte oder Desmosomen ausbilden, an deren Aufbau sich Zytokeratinfilamente und verschiedene Zelladhäsionsproteine wie E-cadherin (E-cad) oder Desmoplakin (dp) beteiligen. Dies führt zur Ausprägung einer apikal (ap)-basalen (bas) Polarität der Zellen. Mesenchymale Zellen zeigen einen völlig anderen Phänotypen. Sie sind nicht adhären, sondern migratorisch; Desmoplakin und E-Cadherin wurden internalisiert und abgebaut, das vorherrschende Intermediärfilament ist Vimentin (vim) (Larue and Bellacosa 2005).

Bei Tumorzellen führt die EMT dazu, dass sich einzelne Zellen aus dem Gewebeverband lösen und ohne Kontakt zur Basalmembran überleben können. So fördert die EMT nicht nur das migratorische, invasive Potential der Tumorzellen, sondern gleichzeitig auch ihre Überlebensfähigkeit im zirkulierenden Blutstrom (Anoikis-Resistenz). Der reziproke Prozess, die mesenchymal-epitheliale Transition (MET) wird von der Tumorzelle ebenfalls durchlaufen, nachdem sie sich im Bindegewebe des Metastasenorgans angeheftet hat. Vermittelt wird diese Anheftung durch Integrine auf der Tumorzelloberfläche und könnte eine Voraussetzung für die MET sein. Diese wiederum stellt eine wichtige Vorbedingung für die Kolonisation der Tumorzelle dar, denn durch sie gewinnt die Tumorzelle ihren epithelialen, proliferativen Charakter zurück (Tsai and Yang 2013).

1.5 Molekulares Mimikry bei der endothelialen Adhäsion

Greene & Harvey vermuteten 1964 als erste, dass unterschiedliche Metastasierungsmuster bestimmter Tumorentitäten (Organpräferenz) von spezifischen Bindungen zwischen Tumorzelle und den Endothelzellen der Gefäße im jeweiligen Metastasenorgan abhängen. Sie vermuteten für die transendotheliale Migration von Tumorzellen zudem einen ähnlichen Mechanismus wie bei der Einwanderung von Leukozyten in entzündlich verändertes Gewebe (Greene H.S. 1964). An diesen Prozessen sind endotheliale Adhäsionsmoleküle beteiligt, die in ihrer Expression vom lokalen Chemokininmilieu reguliert werden (Bissell and Hines 2011).

Mittlerweile konnte eine Reihe von Studien die Vermutungen von Greene & Harvey bestätigen (Reymond et al. 2013). Die Adhäsion der Leukozyten/Tumorzellen an das Gefäßendothel verläuft über eine Kaskade, deren erste Moleküle E- und P-Selektine auf der Endothelseite sind. An diese Selektine binden Kohlenhydratreste der Zellmembran von Leukozyten/- Tumorzellen wie sialyl-Lewis X und sialyl-Lewis A (sLeX/A) (Lange et al. 2014b). Durch diese Bindung wird das Abbremsen zirkulierender Leukozyten/Tumorzellen bewirkt und eine lockere Anheftung an das Endothel ermöglicht. Den Selektinen nachgeschaltet schließen sich die Integrine an. Durch sie wird eine Integrin/Rezeptor (z. B. ITGB1/VCAM-1 oder ITGB2/ICAM-1)-vermittelte Kaskade ausgelöst, die zur Festigung der Adhäsion

sowie zum Öffnen der Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen führt. Durch diese geöffneten Kontakte können die Leukozyten/Tumorzellen das Endothel durchwandern (Orr et al. 2000).

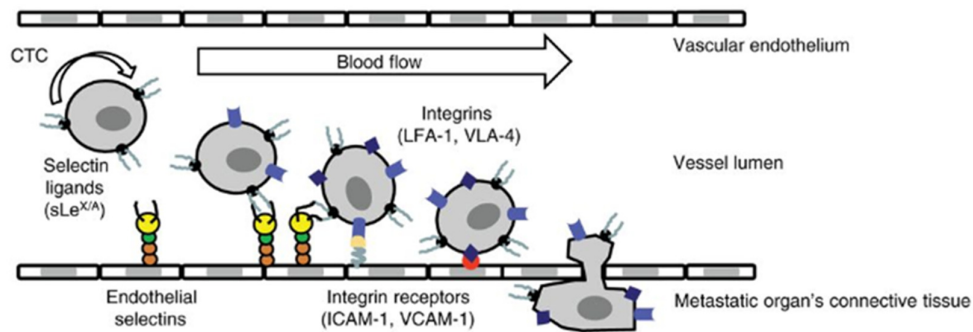


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Leukozyten-/Tumorzell-Adhäsionskaskade.

Initial wird die Bindung der Zellen an die Endotheloberfläche durch Selektine vermittelt. Dies bewirkt ein Abbremsen aus dem Blutstrom und ein Entlangrollen (Rolling) an der Gefäßwand. Daraufhin werden über Ausschüttung von Chemokinen die den Selektinen nachgeschalteten Integrine aktiviert. Diese vermitteln eine feste Adhäsion der Zelle und ermöglichen die nachfolgende Migration der Zelle durch das Endothel und dessen Basalmembran (Lange et al. 2014a).

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe des Instituts für Anatomie und experimenteller Morphologie (UKE) haben gezeigt, dass spontane Metastasierung verschiedener humaner Tumoren in Xenograft-Mausmodellen Selektin-abhängig erfolgt (Kohler et al. 2010, Stübke et al. 2012, Gebauer et al. 2013).

1.5.1 Selektine

Selektine sind Glykoproteine in der Plasmamembran u.a. von Endothelzellen. Sie initiieren die Leukozyten-Endothel-Bindung, die anschließend über Integrin-Rezeptor-Interaktionen konsolidiert werden muss (siehe Abb.4) (Bendas et al. 1999). Dies stellt die Voraussetzung für die Auswanderung von Leukozyten aus dem Blutstrom, z. B. bei einer Entzündung, dar. Die Expression einiger Selektine wird durch das lokale Zytokinmilieu reguliert. Es ist mittlerweile breiter Konsens, dass CTCs bei der Extravasation ähnliche Mechanismen nutzen wie Leukozyten, so dass auch hier die Selektine eine übergeordnete Rolle spielen könnten. Es sind drei Typen von Selektinen bekannt, die sich sowohl in ihrer Aminosäurestruktur als auch in ihren Bindungspartnern (Liganden) unterscheiden und entsprechend ihrer Ursprungszellen in L-(Leukozyten), E-(Endothel) und P-Selektin (Thrombozyten/Plättchen und Endothel) eingeteilt werden. Die Selektine sind heterophile Zelladhäsionsmoleküle, das heißt, sie gehen Verbindungen mit benachbarten Zellen über andere, nicht zur Selektinfamilie gehörende, Moleküle ein. Allen drei Selektinen gemeinsam ist eine aus 5 Domänen bestehende Struktur (Karp 2005).

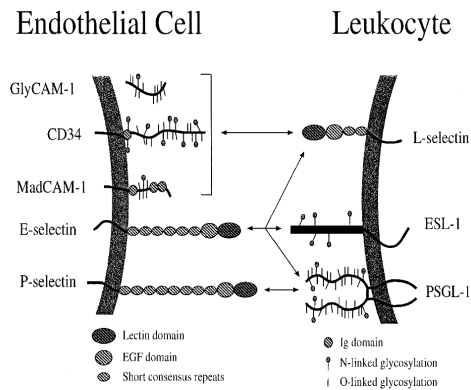


Abbildung 4: Die Selektinfamilie. Schematische Darstellung der Struktur der Selektinmoleküle und ihrer Liganden. P-Selektin wird von aktivierten Thrombozyten und endothelialen Zellen exprimiert, E-Selektin von endothelialen Zellen, L-Selektin von Leukozyten. Gezeigt sind die fünf unterschiedlichen Domänen der Selektine (siehe Text) sowie deren spezifische Liganden (Vestweber and Blanks 1999).

Am N-Terminus des Proteins besitzen alle Selektine eine Calcium-abhängige, Kohlenhydrat-bindende C-Typ-Lectin-Domäne, darauf folgend eine EGF- (epidermaler Wachstumsfaktor-) ähnliche Domäne, der sich, je nach Selektinart, zwischen zwei und neun *short consensus repeats* (SCRs) anschließen. Zum Zellinneren hin folgt den SCRs noch ein 22 Aminosäuren langer transmembranöser Abschnitt sowie ein kurzer zytoplasmatischer Teil (je nach Typ unterschiedlich viele Aminosäuren) mit endständiger COOH-Gruppe, der Bindungssignale bei Ligandenkontakt ins Zellinnere vermittelt und so die Signaltransduktion gewährleistet (Makrilia et al. 2009).

Als Liganden fungieren muzinähnliche Strukturen (langgestreckte Glykoproteine) an deren Serin-Threonin-reichem Proteingrundgerüst Kohlenhydratseitenketten, die eigentlichen Bindungsepitope, glykosidisch geknüpft sind. Die bekanntesten Proteingrundgerüste für Selektinliganden sind GlyCAM-1, CD 34 und MAdCAM-1 (L-Selektin), PSGL-1 und CD24 (P-Selektin) sowie MUC-1, ESL-1, CD43, CD44 und LGALS3BP (E-Selektin). Große Bedeutung als gemeinsames Bindungsepitop der Selektine haben die Tetrasaccharide Sialyl Lewis A (sLeA) und Sialyl Lewis X (sLeX). Diese Kohlenhydratstrukturen werden als tumorprogressionsfördernd und mit erhöhtem Metastasierungspotential einhergehend betrachtet (Dittmar et al. 2008). Eine erhöhte P-Selektin-Expression wurde in Magen- und Mamma-Karzinomen gefunden und diverse Studien zeigen eine Korrelation zwischen erhöhter Expression von löslichem P-Selektin und Tumorprogression (Coskun et al. 2006). Einer der P-Selektin Liganden, CD-24, ist häufig im Mamma-, Kolon-, Lungen-, und Prostata-Ca überexprimiert und mit erhöhter Metastasierungstendenz und schlechterer Prognose assoziiert (Kristiansen et al. 2004). Köhler, Stübke, Gebauer und Mitarbeiter konnten in anderen Tumoren die Relevanz von E-/P-Selektin für die Metastasierung zeigen (Köhler et al. 2010, Stübke et al. 2012, Gebauer et al. 2013), während E/P-Selektin für die Metastasierung im Tiermodell des humanen PCa weniger bedeutsam war. Dort fand die Lungenmetastasierung auch bei völligem Fehlen der endothelialen Selektine statt (Lange et al. 2014a).

Infolge des Ergebnisses der untergeordneten Bedeutung endothelialer Selektine für den Metastasierungsprozess des PCa wurde von der Vermutung ausgegangen, die in der Leukozytenadhäsion den Selektinen nachgeschalteten Integrine könnten bei der Metastasierung des PCa von besonderer Bedeutung sein. Daher wurde die PCa-Zelllinie mit dem stärksten metastatischen

Potenzial im Xenograftmodell (PC-3) mit derjenigen mit dem schwächsten metastatischen Potenzial (DU-145) (Lange et al. 2012) hinsichtlich der Expression der meisten bekannten α - und β -Integrine verglichen. Dabei konnte einzig eine 12-fache Heraufregulation des Gens für β 4-Integrin in der stärker metastasierenden Linie PC-3 gezeigt werden (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe).

1.6 Integrine

1.6.1 Struktur und Liganden der Integrine

Die Familie der Integrine beschreibt eine Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen, die vor allem an der Interaktion der Zelle mit der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt sind und sowohl Signale, die von der Matrix kommen, ins Zellinnere, als auch Signale aus dem Zellinneren an die ECM weiterleiten. Integrine sind damit an Zellwachstum, Differenzierung, Migration, Blutgerinnungs- und Entzündungsprozessen sowie an pathologischen Prozessen wie Tumorentstehung, -wachstum und -metastasierung (Marsico et al. 2018) sowie an Apoptosevorgängen beteiligt. Integrine werden auf praktisch allen Zelltypen exprimiert. Integrine in den Leukozytenzellmembranen ermöglichen ihre zielgerichtete Wanderung zum Ort der Inflammation. Integrine bestehen aus zwei unterschiedlichen Glykoproteinketten, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die beiden Ketten werden als Alpha- bzw. Beta-Untereinheit bezeichnet. Beim Menschen wurden bisher 16 α - und 8 β -Untereinheiten identifiziert. Als Transmembranproteine durchspannen beide Untereinheiten die Zellmembran. Jede dieser Untereinheiten besitzt eine große extrazelluläre Domäne ($\alpha > 940$, $\beta > 640$ Aminosäuren), einen Membran-durchspannenden Abschnitt und eine kurze zytoplasmatische Domäne. Die β 4-Untereinheit besitzt eine lange zytoplasmatische Domäne, die mit dem Zytoskelett verbunden ist (Stupack 2007). Mittels Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung ihrer Serin-, Threonin-, oder Tyrosinreste sind sie in ihrer Funktion regulierbar.

Der extrazellulär liegende Teil des Integrins trägt Bindungsstellen für Liganden, die die sogenannte RGD-Sequenz tragen. Die RGD-Sequenz steht für die Aminosäure-Sequenz Arginin, Glycin und Asparaginsäure (Arg-Gly-Asp). Doch auch einige Nicht-RGD-Proteine wie die extrazellulären Matrixproteine Kollagen, Laminin oder interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs) werden von den Integrinen erkannt. Ihre Ligandenspezifität erhalten sie zum einen durch Kombination der α - und β -Untereinheit, zum anderen durch unterschiedliche Expression und/oder Aktivierung des Rezeptors sowie die Erreichbarkeit seines Liganden (Luo et al. 2007).

Die lange extrazelluläre Domäne der Integrine bindet Liganden der ECM wie Fibronectin, Laminin, Fibrinogen, Kollagen oder Vitronectin. Die intrazelluläre zytoplasmatische Komponente interagiert mit Signalproteinen (siehe Abb. 5). Zudem binden Integrine auch andere Liganden wie Thrombospondin, *von-Willebrand-Faktor*, Faktor X sowie andere CAMs, die mit der Blutgerinnung in Verbindung stehen (Stupack 2007).

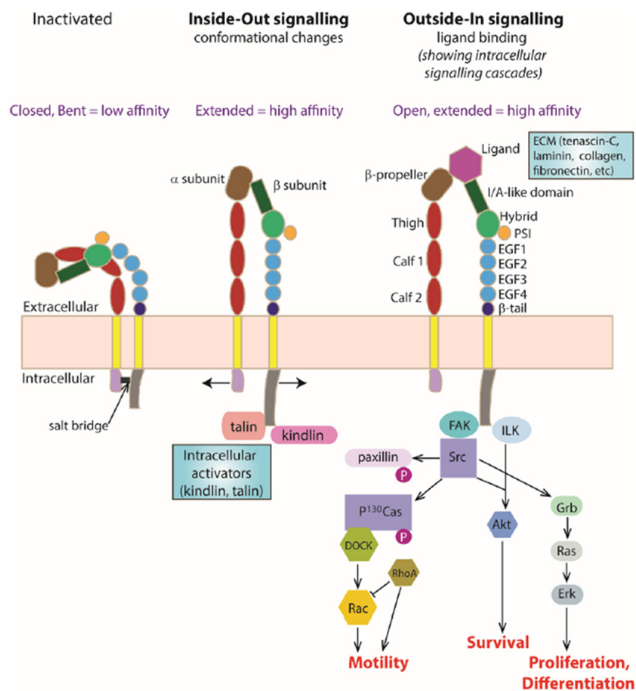


Abbildung 5: Aufbau und Signaling-Funktion der Integrine als Brücken zwischen RGD-Proteinen und Zytoskelett. Die Bindung von Ca^{2+} an die extrazelluläre Domäne verleiht dem Integrin die Fähigkeit zur Bindung von RGD-Proteinen, wie Fibrinogen und Vitronektin. Die Aktivierung der Integrin-Heterodimere durch Bindung ihrer Liganden führt zum Ablauf intrazellulärer Signalkaskaden und resultiert in Prozessen, die für Zellüberleben, Wachstum und Motilität bedeutende Rollen spielen. Durch intrazelluläre Signale werden Veränderungen im Konformationsstatus des Rezeptors induziert. Somit liegt hier sowohl ein *inside-out*-, als auch ein *outside-in-signaling*, also ein bidirektionales Signaling vor (Cheah and Andrews 2018).

1.6.2 Das bidirektionale Signaling der Integrine

Die Integrine besitzen keine eigene intrinsische enzymatische Aktivität, sind jedoch in der Lage, durch Rekrutierung zytosolischer Kinasen, Adaptorproteinen und Interaktion mit zytoskeletalen Strukturen Signalwege zu modulieren. Die durch Ligandenbindung initiierte Signalkaskade geht mit einem Anstieg an Tyrosin-Phosphorylierungen einher. Wichtige Adaptorproteine und Kinasen in diesem *signalling* sind die *focal adhesion kinase* (FAK), Mitglieder der *Src family Kinasen* (SFKs), die *integrin-linked kinase* (ILK), verschiedene *Mitogen-activated kinases* (MAPKs), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), GTPasen der Ras- und Rho-Familie, NF- κ B, Jun, etc., wobei vor allem die Phosphorylierung der FAK mit Zelladhäsionsprozessen assoziiert ist. Durch intrazelluläre Signale werden Veränderungen im Konformationsstatus des Rezeptors induziert. Die Ligandenbindung wiederum beeinflusst intrazelluläre Prozesse. Somit liegt hier sowohl ein *inside-out*-, als auch ein *outside-in-signaling*, also ein bidirektionales Signaling, vor (Aplin et al. 1998, Schwartz and Shattil 2000).

Über verschiedene Wege sind Integrine in der Lage, MAPK zu aktivieren (siehe Abb. 6). Einer führt nach Integrin-Aktivierung zur Rekrutierung und Autophosphorylierung von FAK und schafft so eine Bindungsstelle für die Tyrosin-Kinase Src, welche FAK wiederum an weiteren Stellen phosphoryliert. An diesen kann das Adapterprotein Grb-2 binden und die ERK/MAPK-Kaskade auslösen. Auch das Adapter-Protein Cas, das durch FAK und Src phosphorylierbar ist, kann an FAK binden und damit Bindungsstellen für einen Adapter-Austauschfaktor-Komplex für die GTPase Rap1 erzeugen. Rap1 kann die Kinase Raf aktivieren, die wiederum MEK und ERK sowie JNK aktivieren kann (Giancotti and Ruoslahti 1999, Gilcrease 2007).

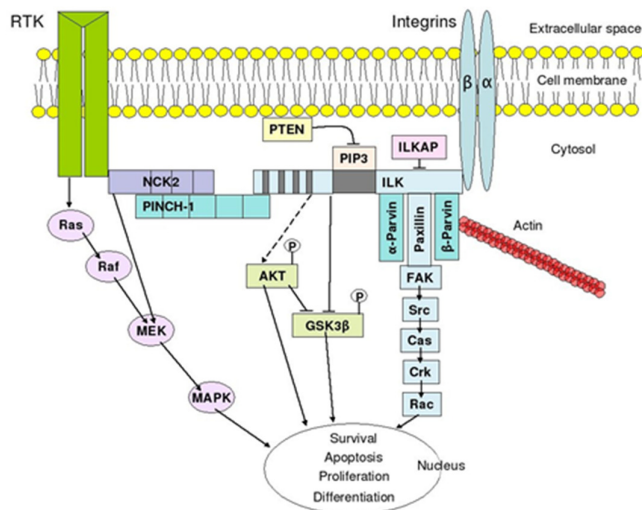


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Integrin-signallings

Das Integrin-Rezeptor-Tyrosin-Kinase *signalling* induziert Zellproliferation, Überleben, und Migration. Die *focal adhesion* Kinase (FAK) und *Src-family* Kinasen (SFKs) sind integriert in die pro-migratorischen Signalwege der Integrine und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) (Gilcrease 2007).

Über diese multiplen Signalwege regulieren Integrine Zellzyklusprogression, Zellüberleben, Proliferation, Migration und Zelldifferenzierung. Auch existieren Kreuzungswege zwischen Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Growth-Faktor-Rezeptoren; GFRs) (Meredith et al. 1993). So führt bspw. FAK die Signale von GFRs und Integrinen zusammen und fördert die Zellmigration.

Die Integrine stimulieren die Expression von Cyclinen und damit den Eintritt in den Zellzyklus (Assoian and Schwartz 2001). Im Gegensatz dazu führt die Blockade der Integrin/Ligand-Interaktion zur Hemmung von Migration und Proliferation und induziert Apoptose (Meredith et al. 1993).

1.6.3 Die Rolle der Integrine bei Transformation und Tumorwachstum.

Bei der Akquisition eines neoplastischen invasiven Phänotyps spielen Integrine durch ihre Fähigkeit, Proliferation zu fördern und Apoptose zu verhindern, eine entscheidende Rolle (Makrilia et al. 2009). Veränderungen ihrer Expression sind mit Tumorgenese assoziiert. So wurde eine Heraufregulation der Integrin-Expression in verschiedenen Tumorentitäten gezeigt: $\alpha\beta6$ im Colon-Ca, $\alpha5\beta1$ im hepatozellulären Ca, $\alpha6\beta4$ im PCa (Mercurio and Rabinovitz 2001). Ebenso wurde eine verstärkte Aktivität von FAK, ILK und Src in verschiedenen Tumoren nachgewiesen (Guo and Giancotti 2004). Die Aktivierung von Integrinen hilft weiterhin den CTCs im Blutstrom, sich mit Leukozyten und Thrombozyten zu ummanteln und sich somit vor den Immunzellen und dem Scherstress des Blutstroms zu schützen (Gao et al. 2014, Erpenbeck and Schon 2010). Auch gibt es Studien die zeigen, dass die Bindung von Integrinen Apoptosevorgänge unterdrückt, indem sie Apoptose-Suppressor-Proteine aktiviert und Caspase-Aktivierung verhindert (Pankov et al. 2003, Kim et al. 2002, Stupack et al. 2001).

1.6.4 Das Integrin $\alpha6\beta4$

Einen wichtigen Mechanismus für die Verankerung epithelialer Zellen an die ECM stellt die Bindung von Integrin $\alpha6\beta4$ (ITGA6/ITGB4) auf der basalen Epithelzellseite an das Laminin-5 der Basalmembran innerhalb der Hemidesmosomen dar (Nievers et al. 1999).

Integrin $\alpha 6\beta 4$ ist wie alle anderen Integrine mit Rezeptortyrosin-Kinasen (RTK) assoziiert und an die oben beschriebenen Signalwege gekoppelt, im Speziellen an den *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGF-R) (Yoon et al. 2006). Studien haben gezeigt, dass eine Überexpression von Integrin- $\alpha 6\beta 4$ in diversen Tumorentitäten zu finden ist und mit Tumorprogression korreliert (Ni et al. 2005, Chung et al. 2002). Zudem ist eine erhöhte Aktivierung der Integrin-assoziierten FAK mit frühen Metastasierungsschritten assoziiert (Mercurio and Rabinovitz 2001, Breuss et al. 1995). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Integrin $\alpha 6\beta 4$ auch eine Rolle in der Entwicklung einer Resistenz der CTCs gegenüber Apoptose bzw. Anoikis spielt (Ramos et al. 2002).

Nachdem in unpublizierten Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit das metastatische Potenzial von PCa-Xenografts mit einer erhöhten Expression von $\beta 4$ -Integrin einherging (siehe oben), wurde der Effekt einer ITGB4-Depletion mittels shRNA im Xenograftmodell untersucht. In Anlehnung an einen weiteren Vorbefund der Arbeitsgruppe, nämlich dass E-/P-Selektin bei der Metastasierung des PCa nur eine untergeordnete Rolle spielen, wurde die Depletion von ITGB4 allein und in Kombination mit einem E/P-Selektin-*knockout* (KO) der Versuchstiere betrachtet. Dabei stellte sich heraus, dass - unabhängig von der Metastasierung - bereits das Primärtumorwachstum in der Versuchsgruppe mit ITGB4-Depletion vermindert war. Dies wurde durch einen gleichzeitigen E/P-Selektin-KO überadditiv verstärkt, während der Selektin-KO allein keinen Effekt auf das Tumorwachstum hatte. Diese Doktorarbeit diente dem Zweck, diese Beobachtungen mechanistisch zu erklären.

2 Hypothesen und Fragestellungen

Das Prostatakarzinom (PCa) stellt die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern dar und geht insbesondere dann mit einer schlechten Prognose einher, wenn es metastasiert hat. Die dem Metastasierungsprozess zugrunde liegenden Mechanismen müssen besser verstanden werden, bevor neue therapeutische Konzepte entwickelt werden können. Die Grundhypothese dieser Arbeit besteht darin, dass die Extravasation von Tumorzellen einen Schlüsselschritt der hämatogenen Metastasierung solider humaner Tumoren darstellt und dass dieser Vorgang durch die Adhäsion von zirkulierenden Tumorzellen an Endothelzellen initiiert wird. In Anlehnung an die Adhäsionskaskade von Leukozyten wird postuliert, dass die endotheliale Adhäsion von Tumorzellen zunächst durch Selektine angestoßen und anschließend durch Integrine verfestigt wird.

In einem vorausgegangenem Projekt wurde bereits die Bedeutung der endothelialen Selektine (E- und P-Selektin) im Metastasierungsprozess des PCa untersucht. Durch Verwendung spontan metastasierender Xenograftmodelle in Wildtyp- und E-/P-Selektin-Doppel-*knockout* Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass PCa-Zellen auch in Abwesenheit der endothelialen Selektine metastasieren können. Basierend auf der Hypothese, dass gemäß der Leukozytenadhäsionskaskade nicht nur die Selektine, sondern auch die Integrine von Bedeutung für die Metastasierung sein könnten, wurden im nächsten Schritt hoch metastatische PCa-Zellen mit schwach metastatischen PCa-Zellen hinsichtlich der Expression ihrer Integrine verglichen und einzig eine Heraufregulation des β 4-Integrins (ITGB4) in hoch metastatischen PC3-Zellen nachgewiesen. Folglich wurde ITGB4 mittels shRNA stabil in den hoch metastatischen PC-3-Zellen depletiert.

Anschließend wurde die Auswirkung dieses *knockdowns* (KD) von ITGB4 auf das Tumorwachstum und die Metastasierung im Xenograftmodell in WT- und E-/P-Selektin-*knockout*-Mäusen untersucht. Unabhängig von potenziellen Effekten auf die Metastasierung führte der KD von ITGB4 allein bereits zu einer signifikanten Verzögerung des subkutanen Tumorwachstums. Während der Selektin-KO gar keinen Effekt auf das Tumorwachstum hatte, führte eine Kombination des ITGB4-KD der Tumorzellen mit dem E-/P-Selektin-KO des Tumorstromas überraschend zu einer nahezu vollständigen Aufhebung des Tumorwachstums.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen, die diesem synergistisch reduzierten Primärtumorwachstum möglicherweise zugrunde liegen, untersucht.

Die zunächst vordringliche Frage war, ob die Tumorwachstumsverzögerung im ITGB4-KD durch eine verminderte Proliferation oder gesteigerte Apoptose bedingt war. Weiterhin wurde als Arbeitshypothese zugrunde gelegt, dass durch beide Konditionen (ITGB4-KD bzw. Selektin-KO) ähnliche oder einander entgegengesetzte Mechanismen in den Tumorzellen ausgelöst werden, die in Kombination die drastische Reduktion des Tumorwachstums erklären könnten. Besondere Berücksichtigung fand hierbei einerseits, dass es sich bei ITGB4 um ein Integrin handelt, das in mehrere zelluläre Signaltransduktionswege eingeschaltet ist. Andererseits wurde in der Arbeitshypothese berücksichtigt, dass der E- und P-Selektin-KO zu einer quantitativen und/oder qualitativen Änderung der zellulären Infiltration des Tumorbettes (bspw. durch tumor-assoziierte Immunzellen) und folglich zu einer Änderung der zellulären und parakrinen Interaktion zwischen Tumorzellen und Stromazellen führen könnte.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte, verwendete Materialien und Kits werden im Zusammenhang der jeweiligen Methode mit aufgeführt.

3.2 Zelllinien

Die Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) in 2007 bezogen. Eine Überprüfung auf mögliche Mykoplasmen-Kontamination war obligat. Während der Versuchsreihen konnte keine Kontamination festgestellt werden.

3.3 Depletion von Integrin beta 4 durch shRNA

Der Knockdown (KD) von ITGB4 in der PC3-Zelllinie erfolgte nach etabliertem Vorgehen (Schwankhaus et al. 2014) mittels lentiviraler Transduktion unter Verwendung des pLVX-shRNA1-Vektors (Clontech, Saint-Germain-en-laye, Frankreich), der die entsprechende shRNA und ein Puromycin-Resistenzgen enthält. Als Kontrollzelllinie wurde bei den PC3-Zellen eine lentivirale Transduktion mit dem pLVX-shRNA1-Vektor durchgeführt, der die shRNA gegen *firefly luciferase* (shLUC) enthält, die in Säugerzellen nicht vorkommt.

shRNA-Nukleotidsequenzen:

shITGB4: 5'-CGAGAAGCTTCACACCTAT-3'

shLUC: 5'-GTGCGTTGCTAGTACCAAC-3'

Nach Selektion mittels Puromycin über mindestens 14 Tage erfolgte die Überprüfung der Depletion von ITGB4 mittels Durchflusszytometrie (CyFlow Cube 8, Partec, Münster, Germany). Anschließend wurden mittels Grenzverdünnungsklonen einzelne Sublinien mit homogener ITGB4-Expression generiert. Mehrere Sublinien mit der stärksten Depletion wurden danach gepoolt, um klonale Effekte in der resultierenden KD-Linie zu vermeiden. Dies ergab das Zellinienderivat PC3-shITGB4, während die Kontrollzellen durch Selektion mit Puromycin entstanden (PC3-shLuc). Die Selektion mit Puromycin wurde für beide Derivate dauerhaft fortgesetzt.

3.4 Zellkultur

Die beschriebenen Arbeiten mit den Prostatakarzinomzellen der Zelllinien PC3-shControl sowie PC3-shITGB4 erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Kultivierung der jeweiligen Zelllinie erfolgte in T25 oder T75 Zellkulturflaschen (Sarstedt, Newton, USA) in RPMI-1640-Medium (Gibco, Paisley, UK), welches mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, Gibco), 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) und 0,5 µg/ml Puromycin (Gibco) versetzt war (Kulturmedium). Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, in wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ in einem Hera Cell Brutschrank (Heraeus Instruments, Germany). Mittels eines Lichtmikroskops (Zeiss, Jena, Germany) wurde die Konfluenz der Zellen regelmäßig kontrolliert und die Zellen bei ca. 70 %iger Konfluenz passagiert. Mit

Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Marienfeld, Germany) wurden die Zellzahlen unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

3.5 Immunhistochemie

Für den Nachweis der Proteine ITGB4, KI67, Bim, pH2AX sowie SDF-1 α wurden formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Xenografttumor-Gewebeschnitte immunhistochemisch gefärbt (je n = 5). Die Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica Biosystems, Wetzlar) in 4 μ m dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden entparaffiniert und in absteigender Ethanolreihe rehydriert (Dako, USA). Je nach eingesetztem Primärantikörper wurden die Schnitte unterschiedlich vorbehandelt bzw. es wurden verschiedene Sekundärantikörper eingesetzt (Tabelle 1). Nach einer einstündigen Inkubation mit den jeweiligen Primär-Antikörpern bei Raumtemperatur wurden die Schnitte zweimal mit TBS-T (TBS + 0,1% TWEEN-20) gewaschen sowie einmalig fünf Minuten mit TBS gespült. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper über 30 min und Waschen erfolgte die Farbentwicklung mit Permanent Red (Dako). Von jedem gefärbten Präparat wurden vier repräsentative Fotos mittels eines Zeiss-Axioplan 2 Mikroskops gewonnen. Dazu wurden im Uhrzeigersinn bei 40-facher Vergrößerung vier verschiedene Bereiche mit gleichem Abstand zum Tumorrand fotografiert. Mit der Software Image J, welches mittels binärer Farbmessung den prozentualen Anteil gefärbter Zellen pro Blickfeld errechnet, wurde das Färbeergebnis quantifiziert.

Tabelle 1: IHC Antikörper

	Vorbehandlung	Blocken	Primär-antikörper	Isokontrolle	Sekundär-antikörper	Entwicklung
Integrin beta 4 (439-9B)	S1699 pH6, 2 x 4min Mikrowelle	rabbit serum (Dako 68g/l) 1:10	abcam 0,5mg/ml 1:25	rat IgG2b Antigenix America 1:10	rabbit α rat (Dako) 1:200	permanent red (Dako)
KI67 (M7240)	S1699 pH6, 16h 85°C Wasserbad	goat serum 1:10	Dako 35mg/l 1:32	mouse IgG1 (Dako 100mg/l) 1:91	goat α mouse (Dako 0,77g/l) 1:200 in TBS	permanent red (Dako)
Bim	S2367 pH9 (Tris/EDTA) 10min 121°C Dampfkochtopf	kein	abcam 1mg/ml 1:100	rabbit poly IgG abcam 1:20	swine α rabbit (Dako 0,51g/l) 1:200	permanent red (Dako)
pH2A.X [EP854(2)Y]	S1699 pH6 10 min 121°C Dampfkochtopf	kein	abcam 1:672	rabbit Ig fraction Dako 1:266000	swine α rabbit (Dako 0,51g/l) 1:200	permanent red (Dako)
SDF1	Citratpuffer pH6, 2 x 4 min Mikrowelle	kein	(abcam#ab9797) 1:250	rabbit Ig fraction Dako 1:9500	Swine α rabbit (Dako 0,51 g/l) 1:200	permanent red (Dako)

3.6 Histologische Färbung nach Feulgen

Zum Nachweis apoptotischer Zellen in den Xenografttumoren wurden die Tumorgewebeschnitte mittels einer Feulgen-Färbung histochemisch gefärbt. Anhand der Morphologie der gefärbten DNA können mitotischen oder apoptotischen Zellkerne unterschieden werden. Für die Färbung wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert, mit Aqua dest. (Merck, Darmstadt, Germany) gespült, kurz in kalte Salzsäure (HCl, 1 mol/L) (Geyer GmbH, Renningen, Germany) getaucht und die DNA in den

Gewebeproben durch Inkubation mit heißer Salzsäure (HCl, 10 mol/L) 4 Minuten bei 60 °C hydrolysiert. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest. wurden die Schnitte für 30 Minuten in fuchsin-schwefeliger Säure (Schiff'sches Reagenz, Merck) unter Lichtausschluss inkubiert und im Anschluss in SO₂-Wasser (200 ml H₂O + 10 ml Natrium-Bisulfit-Lösung 10 % + 10 ml 1M HCl) dreifach gespült. Nach weiterem Wässern in Aqua dest. wurden die Schnitte dann in einer aufsteigenden Ethanolreihe (Walter CMP GmbH, Kiel, Germany) je 2 Sekunden gespült und anschließend mit EUKITT (O-Kindler, Freiburg, Germany) eingedeckelt (Deckgläschen, Roth, Karlsruhe, Germany). Unter einem Lichtmikroskop wurden dann die apoptotischen Zellkerne in den Gewebeschnitten der PC3-shControl- sowie PC3-shITGB4-Tumoren (je n=5) ausgezählt. Pro Tumor wurden sechs Blickfelder pro Schnitt, die im Uhrzeigersinn mit gleichem Abstand vom Tumorrand bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen wurden, mikroskopiert. Pro Blickfeld wurden 100 Zellkerne ausgezählt und dabei der prozentuale Anteil apoptotischer Zellkerne anhand morphologischer Kriterien erfasst. Dabei waren die Gewebeschnitte nicht mehr den Versuchsgruppen zugeordnet, sondern wurden verblindet ausgezählt und erst bei der Auswertung der Versuchsgruppe zugeordnet.

3.7 qPCR-profiler array

Zum Screening der Chemokinrezeptor-Expression in PC3-Zellen wurde ein qPCR-*profiler array* durchgeführt (RT² Profiler PCR Array für humane Chemokine und Rezeptoren, Qiagen #PAHS-022Z). Hierfür wurde Tumorzell-RNA mittels RNAeasy Mini Kit isoliert (Qiagen), mittels Spektrophotometer die RNA-Konzentration bestimmt und mit Hilfe des RT² cDNA First Strand Synthesis Kit (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Die PCR Reaktion wurde nach Herstellerangaben durch Zugabe des SYBRTMGreen MasterMix (ThermoFisher Scientific) angesetzt und unter Verwendung des Light Cycler 480 II (Roche, Basel, Schweiz) ausgeführt.

3.8 2D-Proliferationsversuche *in vitro* unter SDF-1 α -Stimulation

Zur Messung der Zellproliferation wurde eine identische Zellzahl von jeweils 1 x 10⁴ Zellen/ ml der Kontroll- bzw. ITGB4-KD-Zelllinie auf T25 Zellkulturflaschen (Sarstedt, Germany) verteilt (Gesamtvolumen: 5 ml) und unter Standardkulturbedingungen 6 Tage gezüchtet (n = 3 je Zelllinie). Für die Analysen des Wachstumsverhaltens unter SDF-1 α -Simulation wurde dem Medium jeweils im Verhältnis 1:500 rekombinantes SDF-1 α (Peprotech, Germany, Stock 10 μ g/ml in PBS) beigemischt. Dabei wurden die Versuche mit murinem bzw. humanem SDF-1 α durchgeführt. Die Kontrollgruppen erhielten reines PBS. Nach jeweils 24 h wurde das Kulturmedium erneuert. Nach 144 h wurden lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht und die Zellen anschließend mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt. Hierdurch konnte die Zunahme der Zellzahl im Verlauf von 6 Tagen bestimmt werden.

3.9 Proliferationsversuche in Soft-Agar

Um das Wachstumsverhalten der Kontroll- bzw. ITGB4-KD-Zellen unter dreidimensionalen Bedingungen zu studieren, wurden *colony forming assays* in Soft-Agar durchgeführt. Hierfür wurde 2-Hydroxyethylagarose (Sigma, St. Louis, MO, USA) (2% = 2g auf 100 ml PBS, gelagert bei 4°C)

verwendet. Diese wird durch Erwärmen auf 40 °C flüssig und geliert bei <30 °C. Um eine Adhärenz der Zellen am Boden der 24 Well Platten (Sarstedt, USA) zu vermeiden, wurden diese vor Aussaat der Zellen mit 250 µl Agar in Medium (0,8 %) beschichtet und zum Verfestigen 30 Minuten bei 4 °C gekühlt. Die Aussaat der Zellen (600/ml) mit einem Gesamtvolumen von 250 µl/Well erfolgte anschließend in Agar mit Medium (0,3 %) in die beschichteten Wells, die wiederum für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert wurden. Die folgende Kultivierung erfolgte dann unter Standardkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂. Am dritten Tag wurde den Wells jeweils 300 µl frisches Kulturmedium zugegeben, welches in Folge alle 48 h gewechselt wurde. Dazu wurden je Well 200 µl des alten Kulturmediums abgesaugt und anschließend durch 300 µl frisches Medium bzw. Medium plus Zusatz (s.u.) ersetzt, um so ein versehentliches Manipulieren an den Kolonien mit der Pipettenspitze zu verhindern. Die Gesamtdauer der Kultur betrug 11 - 14 Tage.

Die Auswertung der Assays erfolgte mittels Lichtmikroskopie (AxioVs40 V 4.7.2.0, Zeiss), bei der die Kolonien nach Morphologie und Anzahl bewertet wurden. Dabei wurde zwischen Kolonien, die adhärent wuchsen, Kolonien, die dreidimensionale Kugeln bildeten sowie Zwischenformen, die kugelige Formen mit Zellausläufern zeigten, unterschieden. Außerdem wurden die Kolonien nach ihrer Größe klassifiziert (Durchmesser < 100 µm bzw. > 100 µm).

Der Soft Agar Assay wurde im Folgenden unterschiedlich modifiziert:

- durch Zugabe von rh/rm-SDF-1a (Endkonzentration: 20 ng/ml, Peprotech) in das Kulturmedium
- durch Zugabe von Zellkultur-Überstand (konditioniertes Medium, CM) der Kontroll- bzw. ITGB4-KD-Zelllinie, 1:2 verdünnt mit frischem Kulturmedium
- durch Zugabe von konditioniertem Medium mit oder ohne neutralisierendem Antikörper gegen SDF-1a (R&D Systems MAB310, Klon 79014, Endkonzentration: 100 µg/ml)

Die CM wurden gewonnen, indem shControl- bzw. shITGB4-Zellen bei ca. 75%iger Konfluenz für 24h unter serumfreien Bedingungen kultiviert und das Medium anschließend abgenommen wurde. Das Medium wurde abzentrifugiert, gefiltert und, nachdem in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei - 20°C gelagert. Zum Mediumwechsel wurde das CM wie oben beschrieben mit frischem Kulturmedium vermischt (1:2), auf die Soft Agar Assays gegeben und ebenfalls alle 48 h erneuert.

3.10 Durchflusszytometrischer Nachweis von ITGB4 und pH2AX

Um die Qualität des Integrin beta 4 (ITGB4) *knockdown* in den PC3-shITGB4-zellen zu überprüfen, wurden Kontroll- und KD-Zellen mit dem eFluor660-gekoppelten ITGB4-Antikörper (eBioscience, Klon 439-9B) bzw. einem eFluor660-gekoppelten *rat* IgG2b (eBioscience, eB149/10H5) als Isotypen-Kontrolle inkubiert. Dafür wurden die trypsinierten Zellen auf zwei 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen verteilt (max. 1x10⁵ Zellen pro Röhrchen) für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, das Medium abgesaugt und die Zellpellets mit 100 µl FACS-Puffer (PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ + 1% bovines Serumalbumin + 0,05% NaN₃) resuspendiert. Der FACS-Puffer enthielt jeweils eine Endkonzentration von 1 µg/ ml Antikörper bzw. Isotypenkontrolle. Die Inkubation erfolgte für 20 min auf Eis. Danach wurden die Ansätze in FACS-Röhrchen übertragen, in die zuvor 2 ml FACS-Puffer vorgelegt worden war und die durchflusszytometrische Messung erfolgte am CyFlowCube 6 (Partec, Münster). Zur Lebend/Tot-Differenzierung wurde Propidiumiodid verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels FCS Express Software (De Novo).

Um in kultivierten Tumorzellen Apoptose nachzuweisen, wurden diese auf den Gehalt von phosphoryliertem Histon H2AX hin untersucht. Hierfür wurden die Zellen beider Zelllinien mit einem Alexa647-gekoppelten Antikörper gegen pH2AX (S139) (Cell Signaling, Massachusetts, USA) gefärbt. Diese Phosphorylierung ist während der meisten Phasen der Apoptose nachweisbar. Vorher wurden die gewaschenen Zellen mit Fixierungspuffer (4 % Formalin 1:2 in FACS-Puffer (siehe oben)) fixiert, anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach zentrifugiert (Kühlzentrifuge, 5 min, 1500 rpm). Dann wurden die Zellen mit Permeabilitätspuffer (1 % Saponin in PBS) 1:2 in FACS-Puffer (siehe oben) für weitere 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Danach wurden die permeabilisierten Zellen mit Permeabilitätspuffer, der den Antikörper bzw. die entsprechende Isotypenkontrolle enthielt (1 µg/ml), resuspendiert und 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in FACS-Röhrchen, in die 2 ml FACS-Puffer vorgelegt worden war, überführt und durchflusszytometrisch gemessen. Hierbei erfolgte keine Lebend/Tot-Differenzierung, da alle Zellen aufgrund Fixierung/Permeabilisierung Propidium-Iodid-positiv gewesen wären. Die Auswertung erfolgte wieder mit der FCS Express Software.

3.11 Nachweis von SDF-1 α mittels ELISA

Zur Quantifizierung der SDF-1 α -Konzentration im Zell- bzw. Gewebeextrakt wurde das Human CXCL12/SDF-1 DuoSet ELISA Development System (DY350, R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung von SDF-1 α in den Zellkultur-Überständen diente der Analyse der zelleigenen SDF-1 α Sekretion. Dafür wurden beide Zelllinien (PC3-shControl bzw. PC3-shITGB4) mit einer identischen Zellzahl von $8,5 \times 10^6$ Zellen in T75- Kulturflaschen ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel auf 4 ml serumfreies Medium, das 48 h auf den Zellen belassen und anschließend geerntet wurde. Dieses wurde in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei -80 °C gelagert. Für die Zellysate wurden je Zelllinie 5×10^6 Zellen mit dem TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) in 500 µl PBS + PIC (1:100) (Phosphatase-Inhibitor- Cocktail, Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany) homogenisiert und gekühlt (4 °C) bei 14000 rpm 30 min zentrifugiert. Der Überstand mit den Zellproteinen wurde ebenfalls eingefroren und bei -80 °C gelagert. 100 µl davon wurden jeweils für den ELISA verwendet. Für die Messungen der SDF-1 α Konzentration in den Xenografttumoren wurden Gewebelysate verwendet, wie sie auch in den Western Blot Analysen eingesetzt wurden (siehe unten). Diese wurden im Verhältnis 1:10 sowie 1:2 in dem Verdünnungs-Reagenz des ELISA Kits verdünnt.

3.12 Proteinisolation aus Zellen und Geweben für Western Blot

Um intrazelluläre Proteine aus kultivierten Zellen zu isolieren und anschließend deren Konzentration zu bestimmen, wurden Zellkulturansätze beider Zelllinien, PC3-shControl sowie PC3-shITGB4 (je n=3), in T75 Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) ausgesät und unter Standardkulturbedingungen gezüchtet. Nach Erreichen einer 60-70%igen Konfluenz wurde den Zellkulturflaschen das Kulturmedium abgesaugt. Um abgestorbene Zellen sowie Mediumrückstände zu entfernen wurden die Zellen mit je 5 ml kaltem PBS (Gibco, Karlsruhe, Germany) gewaschen. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Anschließend wurden je 1,5 ml NP40-Lysepuffer (Tab. 2) zugefügt, die

adhärenten Zellen vorsichtig mittels Gummischaber (*cell scraper*, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vom Flaschenboden abgeschabt, das Lysat in Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Germany) überführt und weiter im Eisbad gekühlt. Nach einer Lysezeit von 5 min wurden die Tubes gemischt (Vortex Minishaker MS2 JK, IKA, Staufen, Germany) und anschl. 10 min unter maximaler Drehzahl (14000 rpm) zentrifugiert (Kühlzentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5415 D/C, Hamburg, Germany). Der Überstand der entstandenen Zellpellets wurde abpipettiert. 20 µl je Lysat wurden für die Proteinbestimmung in ein neues Eppendorf-Tube überführt, welche dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert wurden (Gefriertruhe Kryotec, Hamburg, Germany).

Tabelle 2: NP-40 Lysepuffer (10ml)

0,82 ml	ddH ₂ O
2,5 ml	0,2 M Hepes 7,5
0,3 ml	5M NaCl
0,2 ml	100% Aprotinin
80 µl	250 mM EDTA
1,0 ml	500 mM NaF
1,0 ml	100 mM NaPPi
2,5 ml	40% Glycin
1,0 ml	10 mM Vanadal
0,1 ml	100 mM Pefablac

3.13 Herstellung von Gewebelysaten aus Xenografttumoren

Die Xenografttumore wurden ohne Zusätze in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Extraktion der Proteine wurden die gefrorenen Tumoren (PC3-shControl/WT, PC3shITGB4/WT, PC3-shControl/SelektinKO) vorsichtig mittels gekühltem Mörser in flüssigem Stickstoff zerrieben und in eisgekühltem RIPA-Puffer (3 ml/g Gewebe) + PIC (Proteinase-Inhibitor-Cocktail) (1:100) resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch durch mehrmaliges Auf-und-Abpipettieren vorsichtig homogenisiert (21-G-Pipettenspitze, Eppendorf, Hamburg, Germany) und anschließend in Eppendorf-Tubes überführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Tubes wurden dann in der Kühlzentrifuge (4 °C) bei 14.000 rpm 20 min zentrifugiert, der gewonnene Überstand wurde abgenommen, eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 3: RIPA-Puffer

50 mM	Tris HCL pH7,4
150 mM	NaCl
1%	NP40 Puffer
PIC	1:100
0,1%	SDS
2 mM	EDTA

3.14 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Extinktionsmessung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels Kolorimetrie. Hierbei wird die Verfärbung der zu untersuchenden Proteinlösung nach Zugabe von bestimmten Farbstoffen mit der Verfärbung von

Eichlösungen bekannter Proteinkonzentration verglichen, wobei die genaue Messung der optischen Dichte der Lösungen zugrunde liegt. Die Bestimmungen wurde mit Hilfe des DC-Protein-Assay-Kits Bio-Rad (Biocompare, San Francisco, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 595 nm mit einem Microplate Reader (TECAN Infinite M200, Tecan, Switzerland) gemessen. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte dann nach einer Standardreihe mit Hilfe einer Eichgeraden.

3.15 Nachweis von Signalmolekülen im Western Blot

Die Zellysate der beiden Zelllinien PC3-shControl sowie PC3-shITGB4 (*in vitro*) (je n=3) sowie die Xenografttumor-Lysate der drei Versuchsgruppen PC3-shControl/WT, PC3-shITGB4/WT, PC3-shControl/Selektin-KO (*in vivo*) (je n = 5) wurden analysiert. In der Versuchsgruppe PC3-shITGB4/Selektin-KO wuchs nur noch in einem Versuchstier überhaupt ein Tumor an, so dass hier keine ausreichend hohe Anzahl von Tumoren für die Analysen zur Verfügung stand.

Die WB Analysen wurden durchgeführt in Anlehnung an Grabinski et al (Grabinski et al. 2011). Folgende Puffer, Lösungen und Gele waren für die WB Analysen notwendig:

10x Running- Buffer (RB) (1L)

- 144 g Glycerin
- 30 g Tris/Base
- Auffüllen mit ddH₂O auf 1L, Lagerung im Kühlraum

1x Running- Buffer (RB) (3,5L)

- 350 ml 10x RB
- 35 ml 10% SDS
- 3115 ml ddH₂O

Transfer-Buffer (TB) (1L)

- 100 ml 10x RB
- 200 ml MeOH
- 10 ml 10% SDS
- 690 ml ddH₂O, Lagerung im Kühlraum

Blockierlösung/Waschlösung

- 50 g Milchpulver in 1L 1xTBS/0,5% TWEEN lösen,
- 500 ml davon als Blockierlösung nutzen
- Verbliebene 500 ml mit 1x TBS/0,5% TWEEN auffüllen auf 1L und als Waschlösung nutzen

Sammelgel (40 ml, 8 Gele)

- 27,6 ml ddH₂O
- 17,6 ml 2M Tris pH 6,7
- 5,36 ml 30% Acrylamid
- 0,4 ml 10% SDS
- 0,03 ml TEMED
- 0,6 ml 10% APS

Trenngel 10% (120,88 ml, 8 Gele)

- 33,8 ml ddH₂O
- 45 ml 1M Tris pH 8,8
- 40 ml 30% Acrylamid
- 1,2 ml 10% SDS
- 0,08 ml TEMED
- 0,8 ml 10% APS

Die Taschen der Gele wurden mit jeweils 20-30 µg Protein beladen. Das Befüllungsvolumen der Taschen lag bei 55 µl. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug 2 h bei einer Anfangsspannung von 120 Volt, die nach dem Einwandern der Proben ins Sammelgel auf 180 Volt erhöht wurde.

Als Blotting-Membran wurde Nitrocellulose benutzt. Die Blottingzeit betrug 2 h bei 70 Volt. Nach dem Blotting wurde die Membran für 1 h mit Milchpulver blockiert (siehe oben) und anschließend mit dem jeweiligen Primärantikörper (verdünnt im Verhältnis 1:1000 in Blockierlösung) über Nacht bei 4°C auf dem Schwenktisch inkubiert (Tab. 4). Die Sekundärantikörper wurden bis zur Endverdünnung 1:5000 in die Waschlösung pipettiert.

Tabelle 4: Primärantikörper für WB

p27 (F-8)	Santa Cruz Biotechnology CA, USA
HSC70 (B-6)	
pS6 (SER235/236)	Cell Signaling Technology, MA, USA
CyclinD1 (92G2)	
pHER2/ErbB2 (Tyr877)	
ERK (MAPK)	
p42/44 MAPK (137F5)	
p38MAPK (D13E1)	
p-Raf (SER338)	
p-MEK ½ (Ser217/221)	
p-p42/44 MAPK (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E)	
p-SRC Family (Tyr416) (D49D4)	
p-JNK (9251)	
pmTOR (S2448)	
pAKT (S473), (T308)	
panAKT (40D4)	
pGSK-3β (Ser9)	

Die Proteinexpression wurde mit Hilfe des LAS-3000 Imager und dem AIDA Image Analyser v.3.44 der Fuji Software (Raytest, Straubenhard, Germany) quantifiziert. Zur Auswertung wurde bei jedem zu analysierendem Protein die Ratio aus analysiertem Protein und der Ladekontrolle (HSC70) gebildet [LAU/mm²].

3.16 PamGene Tyrosinkinase-Array

Um ergänzend zu den WB Analysen auf Änderungen im zellulären *signalling* von PC-3-Zellen nach ITGB4-knockdown *screenen* zu können, wurden in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen (Dr. H. Bohnenberger) Analysen an der PamStation 12 (PamGene, 's-Hertogenbosch, Niederlande) durchgeführt. Hierbei ist es durch Verwendung von Mikrochips möglich, gleichzeitig die Aktivität von ca. 140 Phosphotyrosinkinasen innerhalb einer Probe zu messen. Dabei befinden sich die Substrate der in der Probe befindlichen Kinasen auf dem Chip. Beim Umsetzen der Substrate durch die entsprechende Kinase entsteht ein Fluoreszenzsignal, welches von einer Kamera detektiert wird. Für diese Analysen wurden 2×10^6 PC3-Zellen, sowohl von der shControl- als auch der shITGB4-Linie, nach Herstellerangaben lysiert und für den *Array* prozessiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 60 Zyklen durch die Poren des PamChip vor- und zurückpulsiert. Nach jedem fünften Zyklus wurde eine Aufnahme mittels eingebauter CCD Kamera gewonnen. Die Auswertung der 144 erzeugten Peptidsignale erfolgte mit Hilfe der BioNavigator-Software (PamGene), wobei die Signalintensitäten an den vorhandenen Hintergrund adjustiert wurden, indem das mediane Hintergrundsignal von der medianen Signalintensität subtrahiert wurde. Im letzten Schritt wurde eine *Software*-basierte *upstream*-Analyse durchgeführt, bei der alle detektierten Unterschiede im Substratumsatz integriert werden. Hierdurch berechnet die Software, welche Signalkaskaden am wahrscheinlichsten in den beiden Vergleichsproben (shControl vs. shITGB4) unterschiedlich aktiv sind.

4. Ergebnisse

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Befund, dass ein shRNA-vermittelter, stabiler *knockdown* (KD) von ITGB4 im Xenograftmodell der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC3 zu einer moderaten, aber signifikanten Wachstumsverzögerung der Primärtumoren führt. Wenn der ITGB4-KD mit einem zusätzlichem genetischen *knockout* (KO) von E- und P-Selektin in den Versuchstieren kombiniert wurde, war das Tumorwachstum jedoch nahezu vollständig aufgehoben, während der E-/P-Selektin-KO allein keinen Einfluss auf das Tumorwachstum hatte. Diese Arbeit diente dazu, diese Beobachtungen grundlegend mechanistisch zu erklären.

4.1 Nachweis der ITGB4-Expression sowie von Markern der Proliferation und Apoptose an Xenografttumor-Material

4.1.1 Stabiler *knockdown* von ITGB4 nach *in vivo*-Wachstum der Xenografttumoren

Die Stabilität des KD von ITGB4 in den Xenografttumoren wurde mittels Durchflusszytometrie verifiziert. In dem Xenograft-Modell mit einer kombinierten ITGB4/Selektin-Depletion konnte kein Primärtumorwachstum verzeichnet werden (nur eines der ursprünglich zehn beimpften Versuchstiere pro Gruppe entwickelte überhaupt einen Tumor). Für den Nachweis der ITGB4-Expression wurden daher Tumore der Gruppen PC3-shControl/WT (blau), PC3-shControl/KO (grau) und PC3-shITGB4/WT (orange) verwendet. Die durchflusszytometrischen Analysen der resezierten, resuspendierten Tumorzellen ergaben, dass die ITGB4-Depletion auch nach *in vivo*-Wachstum noch deutlich nachweisbar war ($p < 0,001$) (Abb. 7). Der prozentuale Anteil ITGB4-positiver Tumorzellen wurde im selektindefizienten Milieu signifikant von durchschnittlich 18 % auf 27 % der erhöht ($p = 0,02$).

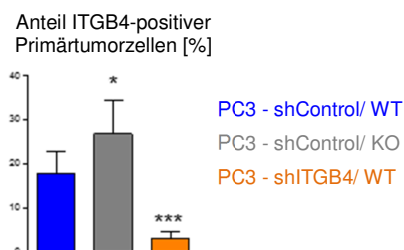


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Analyse der ITGB4-Expression in Xenograft-Primärtumoren.

In den *ex vivo* resuspendierten Tumoren zeigte sich ein stabiler KD von ITGB4 (PC3-shITGB4/WT, orange), während Xenografttumoren mit normalem ITGB4-Status im Selektin-defizienten Milieu (PC3-shControl/KO, grau) einen erhöhten Anteil ITGB4-positiver Primärtumorzellen aufwiesen. Tumore aus der Kombinationsgruppe - mit ITGB4-KD und Selektin-KO - konnten nicht analysiert werden, da sich nur noch in einem Versuchstier überhaupt ein Tumor entwickelte. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von $n = 5$; * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ (t-test).

Zur Überprüfung der Lokalisation des ITGB4 in den Xenografttumoren wurde ein immunhistochemischer Nachweis durchgeführt. Dieser zeigte, dass ITGB4 ausschließlich im Randbereich des Tumors, also in seiner Wachstumszone, exprimiert wird (Abb. 8).

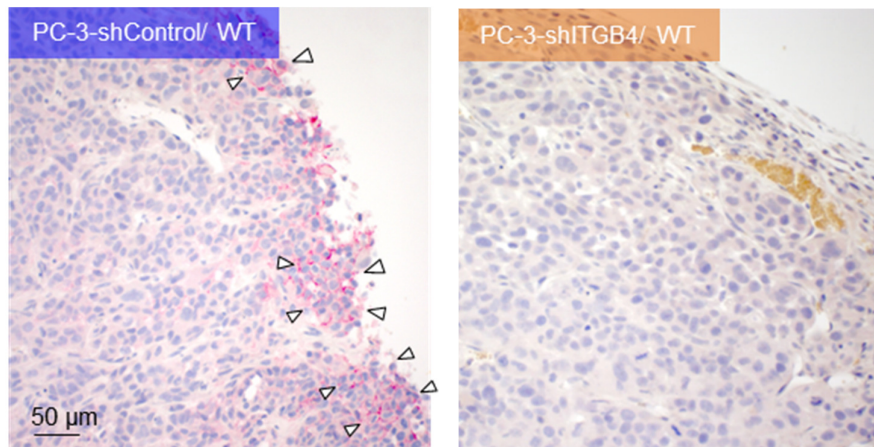


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis der ITGB4 Expression. ITGB4 wurde ausschließlich im Randbereich, in der Wachstumszone des Tumors exprimiert (Pfeilköpfe, Farbentwicklung in rot). Im Xenografttumor der KD-Gruppe (PC-3-shITGB4/WT) ist immunhistochemisch kein ITGB4 nachweisbar.

4.1.2 Die immunhistochemische Färbung auf Ki67 konnte keinen Effekt der ITGB4-Depletion auf die Proliferation der Tumoren nachweisen.

Um zu untersuchen, ob die durch die ITGB4-Depletion ausgelöste Wachstumsverzögerung der Tumoren durch eine verminderte Proliferation der Tumorzellen erklärbar ist, wurde in den Gewebeschnitten der Xenografttumoren (PC3-shContol/WT und PC3-shITGB4/WT) immunhistochemisch Ki67 nachgewiesen und verblindet der Anteil Ki67-positiver Primärtumorzellen in vier Blickfeldern pro Tumor und fünf Tumoren pro Versuchsgruppe ausgewertet. Hierbei ließ sich kein Effekt der ITGB4-Depletion auf die Proliferation der Tumoren verzeichnen (Abb. 9).

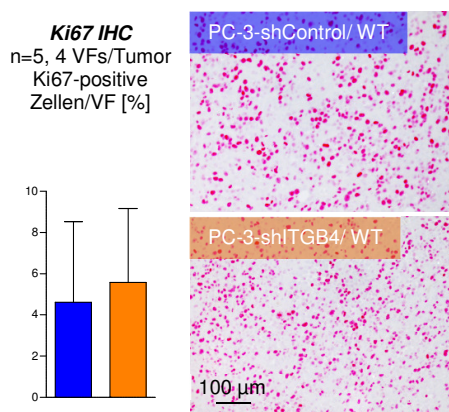


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis der Ki67 Expression in Xenografttumor-Gewebeschnitten. Die Quantifizierung des Anteils Ki67-positiver Primärtumorzellen ergab keinen Unterschied in den Kontroll- bzw. ITGB4-KD Tumoren. Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von $n = 5$ mit je 4 Blickfeldern

Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, ob eine vermehrte Apoptoserate ursächlich für die Wachstumshemmung der ITGB4-depletierten Tumoren gewesen sein könnte.

4.1.3 ITGB4-depletierte Tumore zeigten eine gesteigerter Apoptose in der Feulgen-, anti-pH2AX und anti-Bim-Färbung

Die Feulgen-Färbung an Kontroll- bzw. KD-Tumoren zeigte einen signifikant erhöhten Anteil apoptotischer Zellkerne in den ITGB4-depletierten Tumoren (Abb. 10). Dabei wurden apoptotische Kerne in Gewebeschnitten von je fünf PC3-shControl/WT- und fünf PC3-sh ITGB4-WT-Tumoren gezählt. Diese Auszählung wurde zur Verifizierung des in der ersten Auszählung gewonnenen Ergebnisses an weiteren Gewebeschnitten der Xenografttumoren wiederholt und dabei ein vergleichbares Ergebnis erzielen.

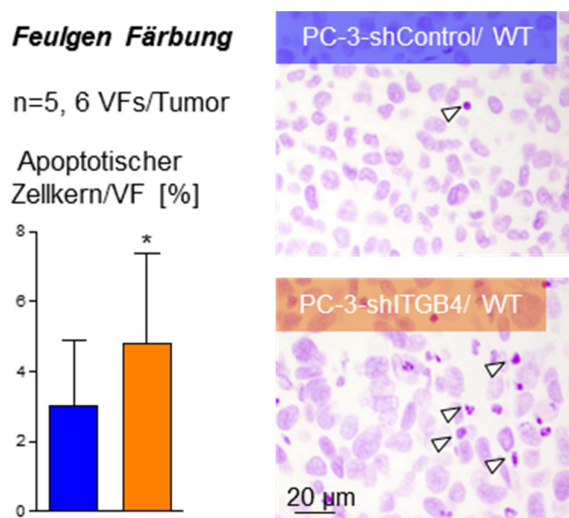


Abbildung 10: Nachweis und Quantifizierung apoptotischer Zellkerne nach Feulgen.

Die Quantifizierung des Anteils apoptotischer Zellkerne in der Feulgen-Färbung (Pfeilköpfe) der Xenografttumorschnitte ergab eine signifikante Zunahme der apoptotischen Zellkerne in den ITGB4-depletierten Tumoren. Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von $n = 5$ mit je 6 Blickfeldern; * $p < 0,05$ (t-test)

Um diesen Befund weiter zu verifizieren wurde das Protein pH2AX zur Darstellung von Apoptosevorgängen mittels IHC in den Tumorgewebeschnitten (PC3-shControl/WT und PC3-shITGB4/WT) nachgewiesen. Der immunhistochemische Nachweis von pH2AX an den Xenograft-Tumorschnitten konnte das Ergebnis der Feulgen-Färbung weiter bestätigen: Es konnte eine deutlich verstärkte pH2AX-Reaktivität und damit eine gesteigerte Apoptose in den ITGB4-depletierten Tumoren nachgewiesen werden (Abb. 11).

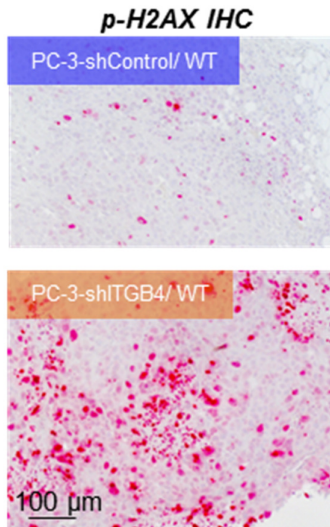


Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis pH2AX-positiver Zellen als Nachweis von Apoptose.
 In den Xenograft-Tumorschnitten der PC3-shITGB4/WT-Gruppe konnte eine deutlich verstärkte pH2AX- Reaktivität und damit eine gesteigerte Apoptose im Vergleich zu den Kontrolltumoren detektiert werden. Eine Quantifizierung wurde aufgrund des augenscheinlichen Unterschieds nicht vorgenommen.

Da sich das pro-apoptotische BH3-only-Protein (Bcl-2 *homology* (BH)) Bim der Bcl-2-Gruppe als Antigen in der immunhistochemischen Färbung ebenfalls zur Quantifizierung von Apoptosevorgängen im Gewebe eignet, wurde in einer weiteren immunhistochemischen Färbung Bim in den Tumorgewebeschnitten nachgewiesen. Dieses dritte angewandte Verfahren zum Nachweis gesteigerter Apoptose konnte die Ergebnisse der Feulgen- und pH2AX-Färbungen zusätzlich bestätigen (Abb. 12).

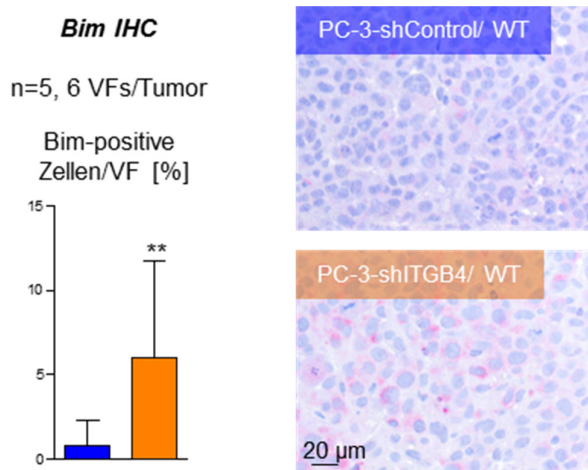


Abbildung 12: Immunhistologischer Nachweis des pro-apoptotischen Bcl-2-Proteins Bim.
 Darstellung des prozentualen Anteils Bim-positiver Xenografttumor-Zellen (rot angefärbt) in Kontroll- bzw. ITGB4-KD-Tumoren. Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von n = 5 mit je 6 Blickfeldern, ** $p < 0,001$ (t-test).

Das bei den ITGB4-depletierten Tumoren beobachtete verzögerte Wachstum konnte nicht einer verringerten Proliferation zugeschrieben werden, sondern einer gesteigerten Apoptose. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob der ITGB4-KD auch *in vitro* zu einer vermehrten Apoptose führt.

4.1.4 Die ITGB4-KD Zellen gehen *in vitro* nicht in die Apoptose

Zum Nachweis von Apoptose in kultivierten Tumorzellen wurde pH2AX intrazellulär mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen Kontroll- bzw. ITGB4-KD-Zellen (PC3-shControl vs. PC3-sh ITGB4) (Abb.13). *In vitro* ließ sich die verstärkte Apoptose in den ITGB4-depletierten Zellen somit nicht nachweisen.

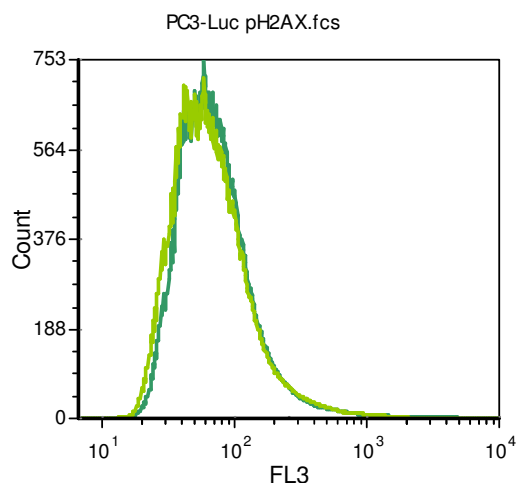


Abbildung 13: Intrazellulärer Nachweis von pH2AX in PC3-shControl (dunkelgrün) vs. PC3-sh ITGB4 Zellen (hellgrün) mittels Durchflusszytometrie.

Es konnte kein Unterschied zwischen den Zelllinien festgestellt werden und somit eine verstärkte Apoptose *in vitro* bei den ITGB4-depletierten Zellen nicht nachgewiesen werden.

4.1.5 Ergebnis der Western Blot Analysen aus Proteinlysaten der Xenografttumoren

Um die *in vivo* nachgewiesene gesteigerte Apoptose in den ITGB4-KD-Tumoren zu erklären, wurden die Proteinextrakte aus den Xenografttumoren im nächsten Schritt auf die Expression verschiedener, Zellzyklus-regulierender Proteine hin untersucht. Analysiert wurde die Expression von p27, Cyclin D3, ERK, p38MAPK, p-RAF, p-MEK, p-ERK1/2 (n=5) mittels Western Blot. Als Ladekontrolle wurde die Expression eines Housekeeping-Gens (HSC70) verwendet. Die in die Analysen eingeschlossenen Moleküle wurden gewählt, weil sie laut Literatur vom ITGB4-signalling beeinflusst werden oder eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellwachstums einnehmen. Die dafür durchgeführten Western Blot Analysen konnten nachweisen, dass p27, Cyclin D3 und pMAPK sowie die p38MAPK in ITGB4-depletierten Tumoren signifikant erhöht und die ERK/p38MAPK-Ratio erniedrigt waren. Die erhöhte MAPK-Aktivität (ERK1/2) war unabhängig von RAF und MEK (Abb.14 a/b). Diese Befunde sprachen angesichts der Literatur (Collins et al. 2005) für eine vermehrte Anoikis-Resistenz in ITGB4-depletierten Tumoren (siehe Diskussion).

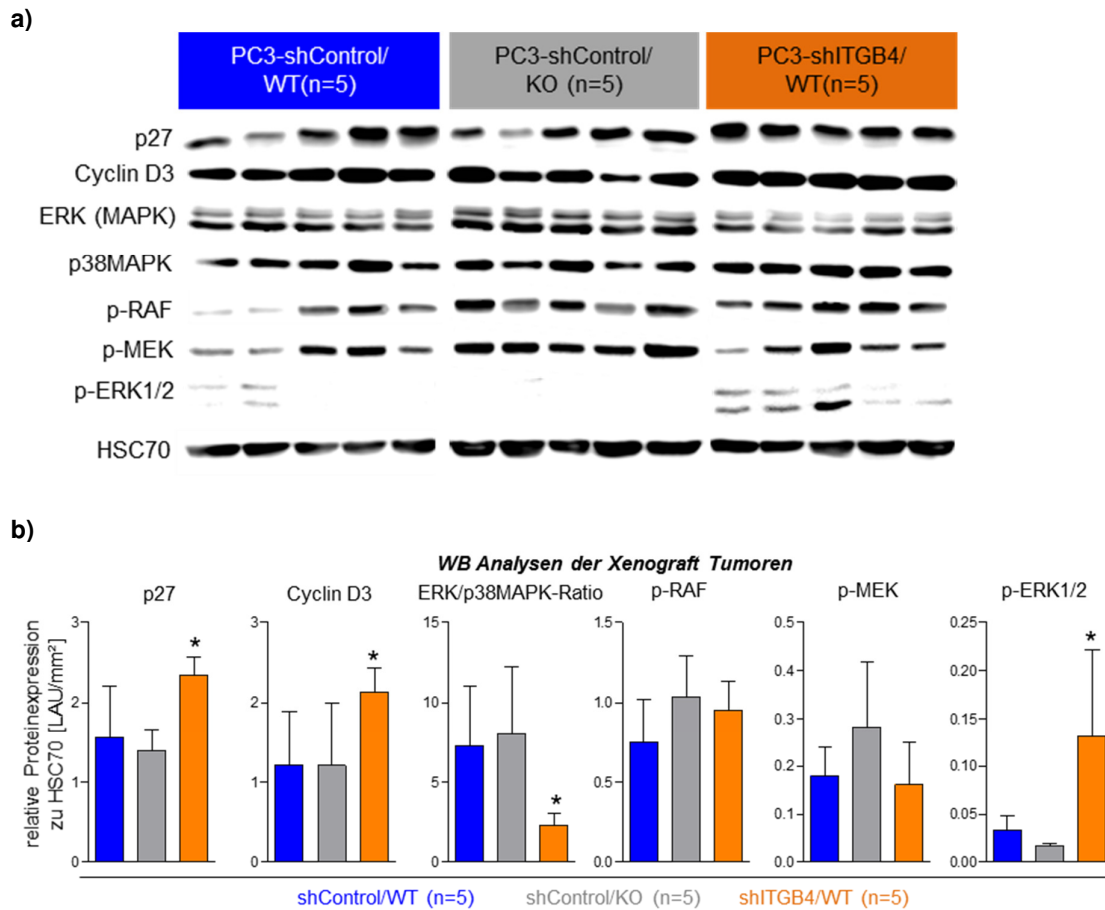


Abbildung 14: Proteinexpression im Western Blot

a) Proteinnachweis in Xenograftumor-Lysaten der Versuchsgruppen PC-3-shControl/WT (blau), PC-3-shControl/KO (grau) und PC-3-shITGB4/WT (orange). Analysiert wurde die Expression von p27, Cyclin D3, ERK, p38MAPK, p-RAF, p-MEK, p-ERK1/2 (n = 5). Als Ladekontrolle wurde die Expression von HSC70 verwendet.

b) Quantifizierung der Proteinexpression. Alle Balkendiagramme repräsentieren die Ratio aus analysiertem Protein und der Ladekontrolle (HSC70) in LAU/mm² (Mittelwerte \pm SD von n = 5. *p < 0,05). Ferner wurde die ERK/p38MAPK-Ratio berechnet.

4.2 CXCR4-Expression von PC-3-Zellen und Änderungen der intratumoralen Konzentration des CXCR4-Liganden SDF-1 α nach ITGB4-KD und Selektin-KO

4.2.1 Screening der Chemokinrezeptor-Expression in PC3-Zellen

Die bisherigen Daten zeigten, dass ITGB4-KD-Tumore einen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen sowie Zeichen der Anoikis-Resistenz aufwiesen. In Kombination mit dem Selektin-KO war diese Resistenzentwicklung offenbar nicht mehr möglich. Basierend auf der Hypothese, dass der Selektin-KO sich über eine Änderung der leukozytären Infiltration des Tumors auf die Tumoretablierung auswirkt (siehe Diskussion), wurde im nächsten Schritt analysiert, über welche Chemokinrezeptoren die Tumorzellen verfügen, da tumor-assoziierte Leukozyten das Tumorstadium gemäß Literatur durch eine lokale Änderung des Chemokin-/Cytokinmilieus fördern könnten. Der hierfür eingesetzte *qPCR-profiler array* betrachtet die meisten bekannten Chemokinrezeptoren und zeigte, dass die PC3-Zellen lediglich den Chemokinrezeptor CXCR4 exprimierten (Abb. 15). Dieser Rezeptor besitzt nur einen bekannten Liganden, das Chemokin CXCL-12 (SDF-1 α , *stromal cell-derived factor 1 α*).

Chemokine receptor qPCR profiler array

Gene symbol	PC-3 C _t -value
CCR1-10	> 30
CXCR1-3	> 30
CXCR4	27,94
CXCR5-7	> 30

Abbildung 15: qPCR profiler array für die Expression von Chemokinrezeptoren.

Unter der Hypothese, dass E-/P-Selektin-abhängige Änderungen im Chemokinmilieu zur Anoikis-Resistenz-Entwicklung ITGB4-depletierter Tumoren notwendig sein könnten, wurde die Chemokinrezeptor-Expression in PC3-Zellen (*in vitro*) mittels qPCR profiler array bestimmt. Nur CXCR4 konnte nachgewiesen werden. Der Ligand von CXCR4 ist SDF-1 α .

Um zu untersuchen, ob der Selektin-KO tatsächlich das intratumorale Milieu von SDF-1 α , welches auf PC-3-Zellen auch tatsächlich auf seinen Rezeptor stoßen würde, beeinflusst, wurden immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von SDF-1 α angefertigt. Die Spezifität des verwendeten IHC-Antikörpers (abcam#ab9797) wurde an Hodengewebe nachgewiesen (nicht gezeigt).

4.2.2 Der intratumorale SDF-1 α -Gehalt ist allein durch Selektindefizienz als auch durch ITGB4-Depletion verringert.

Um zu untersuchen, ob der Selektin-KO tatsächlich die intratumorale Expression von SDF-1 α ändert, wurden zunächst immunhistochemische Färbungen angefertigt. Hierbei deutete sich bereits semiquantitativ an, dass die E-/P-Selektindefizienz der Mäuse den SDF-1 α -Gehalt in den Xenografttumoren tatsächlich verringerte. Zudem konnte beobachtet werden, dass auch der ITGB4-KD den intratumoralen SDF-1 α -Gehalt absenkte (in WT-Mäusen) (Abb.16).

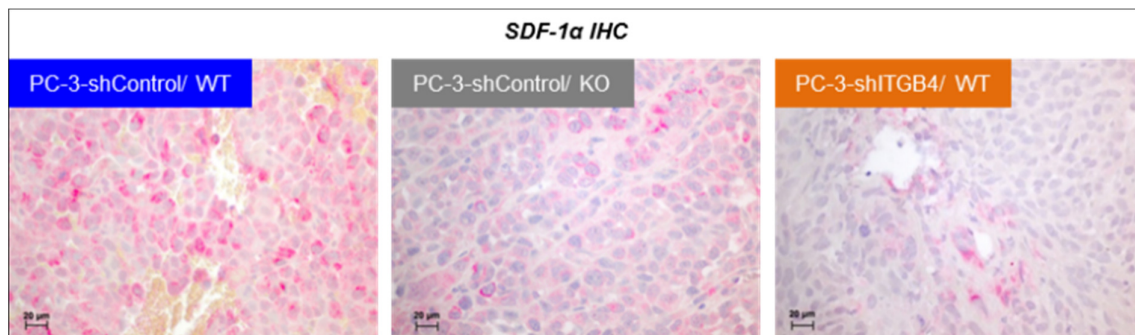


Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von SDF-1 α in Xenografttumoren. Es zeigte sich ein deutliches Signal für SDF-1 α in den PC-3-shControl/WT-Tumoren. Sowohl in PC-3-shITGB4/WT Tumoren als auch in den PC3-shControl/KO-Tumoren war dieses Signal reduziert. Der intratumorale SDF-1 α -Gehalt ist also allein durch Selektindefizienz als auch durch ITGB4-Depletion verringert.

Um diesen Befund zu verifizieren und Unterschiede im SDF-1 α genauer zu quantifizieren, wurde im nächsten Schritt die SDF-1 α -Expression in den Xenografttumoren und den kultivierten Tumorzellen mittels ELISA gemessen. Zuvor wurde sichergestellt, dass der verwendete Antikörper sowohl humanes als auch murines SDF-1 α erkennt (nicht gezeigt).

4.2.3 Ergebnis des SDF-1 α ELISA

Mit dem ELISA gegen SDF-1 α konnte gezeigt werden, dass der intratumorale SDF-1 α -Gehalt *in vivo* durch den Selektin-KO und durch die ITGB4-Depletion verringert ist. Das intratumorale SDF-1 α war in der Gruppe shITGB4/WT gegenüber der Kontrollzelllinie PC-3-shControl/WT um 80 % verringert. Darüber hinaus zeigte sich eine um 60 % reduzierte intratumorale SDF-1 α -Expression nach Selektin-KO (bei normalem ITGB4-Status der Tumorzellen). Folglich führten beiden Konditionen (der Selektin-KO und der ITGB4-KD) einzeln betrachtet zu einer Absenkung des intratumoralen SDF-1 α und das immunhistochemische Ergebnis konnte bestätigt werden. Auch *in vitro* produzierten und sezernierten ITGB4-depletierten PC3-Zellen deutlich weniger SDF-1 α . Die SDF-1 α -Produktion der ITGB4-depletierten Tumorzellen war auf nahezu ein Drittel reduziert. Im Zellkulturüberstand ließen sich deutlich geringere Mengen dieses Chemokins nachweisen als im Zelllysat und auch hier zeigte sich eine Reduktion nach ITGB4-KD (Abb. 17).

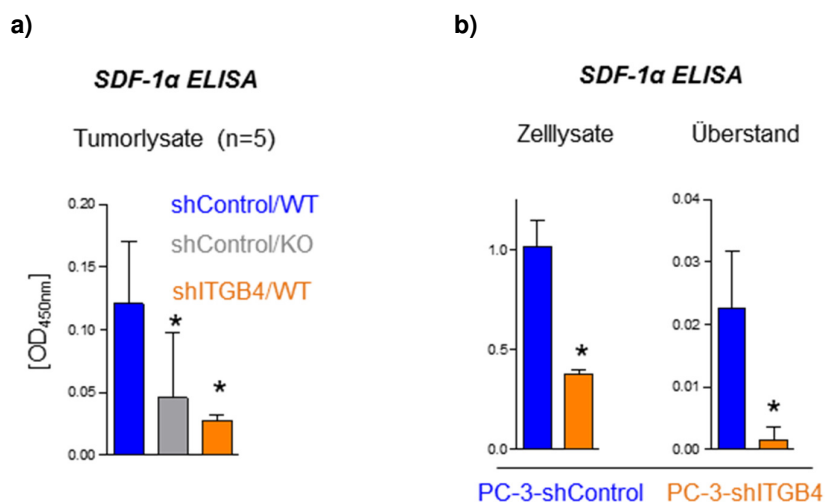


Abbildung 17: Proteinkonzentration von SDF-1 α in Xenografttumoren und in kultivierten Tumorzellen.

a) Der ELISA für SDF-1 α mit den Tumorgewebelysaten (*in vivo*) zeigte einen signifikant verringerten SDF-1 α -Gehalt nach ITGB4-KD (orange). Darüber hinaus zeigte sich ein reduzierter intratumoraler SDF-1 α -Gehalt nach Selektin-KO (bei normalem ITGB4-Status der Tumorzellen) (grau). Balken zeigen Mittelwerte von $n = 5 \pm SD$, $*p < 0,05$ (t-test).

b) Der ELISA für SDF-1 α mit den Zelllysaten der PC3-Zellen (*in vitro*) konnte einen signifikant reduzierten intrazellulären SDF-1 α -Gehalt bei den ITGB4-KD-Zellen zeigen. Die SDF-1 α -Sekretion war bei den ITGB4-KD-Zellen ebenfalls signifikant reduziert, was im ELISA der Zellkulturüberstände gezeigt werden konnte. Balken zeigen Mittelwerte von $n = 3 \pm SD$, $*p < 0,05$ (t-test).

4.3 Analysen zum Wachstumsverhalten der Tumorzellen nach ITGB4-KD

4.3.1 XTT-Assay bei Subkonfluenz der kultivierten Zellen

XTT-Assays mit subkonfluent kultivierten Zellen zeigten eine geringfügige, aber dennoch signifikante Reduktion der Proliferation in den ITGB4-KD-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. So war die optische Dichte bei 490 nm nach Zugabe des XTT-Reagenz beim ITGB4-KD um ca. 23% gegenüber der Kontrolle verringert (Abb. 18).

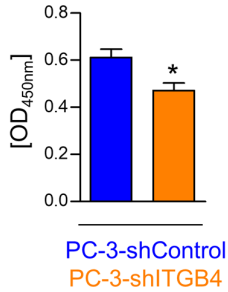


Abbildung 18: XTT-Assay subkonfluent kultivierter Zellen.

Es zeigt sich, dass die ITGB4-KD Zellen (orange) etwas schwächer proliferierten als die Kontrollzellen (blau). Balken zeigen Mittelwerte von $n = 7$, * $p < 0,0001$ (t-test); OD=optical density.

4.3.2 Proliferationsversuche nach stärkerer Vereinzellung und unter Stimulation mit SDF-1 α

Im Gegensatz zur geringfügig (ca. 23%ig) verringerten Proliferation subkonfluent kultivierter Zellen (Abb. 18), zeigte sich bei stärkerer Vereinzellung der Zellen unter Standardbedingungen ein deutlicher Effekt des ITGB4-KD auf die Proliferation der Zellen. In den Zellkultur-Experimenten, bei denen jeweils eine identische, niedrige Anzahl Zellen je Zelllinie (1×10^4 Zellen/ml) ausgesät, sechs Tage kultiviert und anschließend in der Neubauer-Zählkammer erneut gezählt wurde, war das Wachstum ITGB4-depletierter PC-3-Zellen deutlich beeinträchtigt. So hatte sich in der Kontrolle die Zellzahl in den sechs Tagen etwa verzwanzigfach, während die Zellzahl der ITGB4-KD-Zellen sich nur vervierfacht hatte (Abb. 19). Durch Zugabe von rhSDF-1 α (20 ng/ml) konnte die Proliferation der ITGB4-KD-Zellen signifikant auf ca. 187% gesteigert werden, während die PC-3-shControl Zellen von dem Chemokin weitgehend unbeeinflusst blieben (ca. 112%) (Abb. 19).

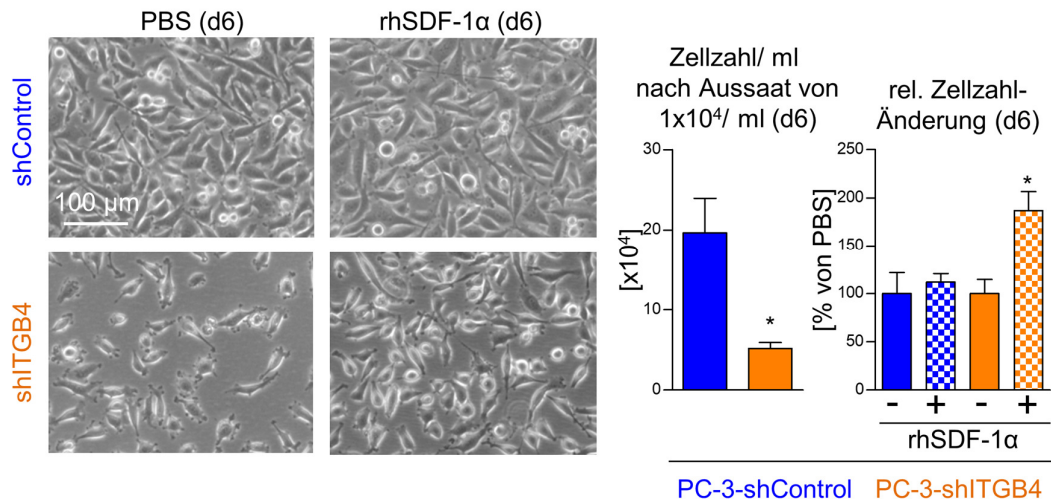


Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahme und zusammenfassende Darstellung der Proliferationsassays nach initial dünner Aussaat. ITGB4-depletierete PC-3-Zellen (orange) zeigten bei starker Vereinzellung (1×10^4 Zellen/ml bei initialer Aussaat) eine deutlich beeinträchtigte Proliferation nach 6 Tagen (d6), die durch Zugabe von rhSDF-1 α (20 ng/ml) signifikant gesteigert werden konnte (gekachelte Füllung). PC-3-shControl Zellen (blau) waren vom rhSDF-1 α unbeeinflusst. Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von $n = 3$, * $p < 0,005$ (t-test).

4.3.3 Ergebnis der Colony forming assays

Um nun die Auswirkung des ITGB4-KD auf die Tumoretablierung unter verankerungslosen Bedingungen *in vitro* zu untersuchen, wurden *Colony forming assays* in Soft-Agar durchgeführt. In allen *Colony forming assays* bildeten die ITGB4-depletierten PC3-Zellen deutlich weniger und kleinere 3D-Kolonien als die Kontrollzellen (Abb. 20). Sowohl durch die exogene Zufuhr von rmSDF-1 α als auch von konditioniertem Medium (CM) der ITGB4-positiven Kontrollzellen (PC-3-shControl-CM) konnte die Anzahl bzw. der mittlere Durchmesser der 3D-Kolonien von ITGB4-depletierten PC-3-Zellen deutlich gesteigert werden (Abb. 20+21). Beide Maßnahmen hatten keinen Einfluss auf die Kolonienformation der Kontrollzellen. CM der shITGB4-Zellen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Kolonienformation von PC-3-shITGB4-Zellen (nicht gezeigt). Zusammengefasst konnte somit gezeigt werden, dass sowohl durch SDF-1 α -Zugabe als auch durch Zugabe von CM aus der Kultur der Kontrollzellen der wachstumshemmende Effekt der ITGB4-Depletion deutlich kompensiert wird. PC-3-shControl-CM enthält signifikant mehr SDF-1 α als PC-3-shITGB4-CM (siehe Kapitel 4.2.3 und Abb. 17).

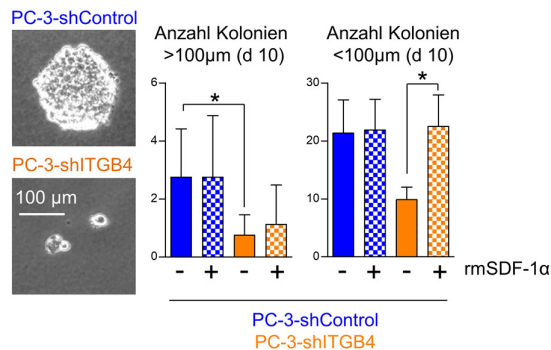


Abbildung 20: Kolonienformation von Kontroll- und ITGB4-KD-Zellen in Soft-Agar unter Zufuhr von rmSDF-1 α . PC-3-shITGB4-Zellen (orange) zeigen nach 10 Tagen Wachstum in *Soft Agar* eine deutlich reduzierte Anzahl von Kolonien, hier kategorisiert nach ihrer Größe. Die Zugabe von rmSDF-1 α konnte die Anzahl kleinerer 3D-Kolonien beim ITGB4-KD signifikant steigern, während die Anzahl größerer Kolonien nur tendenziell zunahm. Bei den Kontrollzellen (blau) hatte rmSDF-1 α gar keinen Effekt auf die Anzahl der sich bildenden Kolonien. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von $n = 8$, * $p < 0,008$ (t-test).

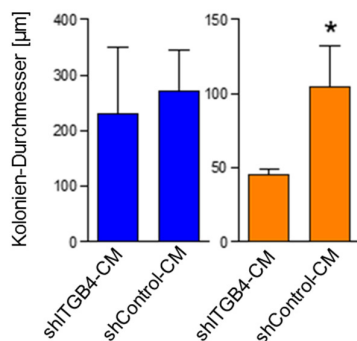


Abbildung 21: Kolonienformation von Kontroll- und ITGB4-KD-Zellen in Soft-Agar unter Zufuhr von konditioniertem Medien der Kontroll- (shControl-CM) bzw. ITGB4-KD-Zellen (shITGB4-CM). Die Zufuhr von PC3-shControl-CM konnte den mittleren Durchmesser der 3D-Kolonien von ITGB4-depletierten PC-3-Zellen (orange) im Vergleich zur Zufuhr von PC-3-shITGB4-CM deutlich steigern. Die Kontrollzellen (blau) hingegen bildeten gleich große Kolonien unabhängig von der Herkunft des CM. Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von $n = 3$, * $p < 0,05$ (t-test).

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob der Kolonien-fördernde Effekt des PC3-shControl-CM auf PC-3-shITGB4-Zellen durch das darin signifikant vermehrt enthaltene SDF-1 α bedingt ist. In einem

weiteren *Colony forming assay* wurde dem shControl-CM daher ein neutralisierender SDF-1 α -Antikörper (R&D Systems MAB310, Clone#79014) zugefügt. Dadurch konnte der Kolonien-fördernde Effekt des PC-3-shControl-CM auf PC-3-shITGB4-Zellen aufgehoben werden (Abb. 22).

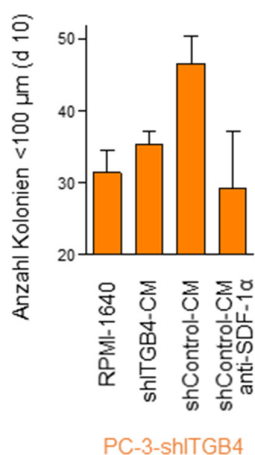


Abbildung 22: Kolonienformation von ITGB4-KD-Zellen in Soft Agar unter Zufuhr von Standardkulturmedium (RPMI-1640), konditionierten Medien der Kontroll- (shControl-CM) oder ITGB4-KD-Zellen (shITGB4-CM) bzw. neutralisierendem SDF-1 α -Antikörper.

Der Kolonien-fördernde Effekt des PC3-shControl-CM auf die PC3-shITGB4-Zellen wird durch den neutralisierenden SDF-1 α -Antikörper wieder aufgehoben. Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von n = 5.

4.4. Durch ITGB4-KD und Selektin-KO ausgelöste Änderungen im Tumor-Signaling

4.4.1 Ergebnis der Western Blot Analysen aus Proteinlysaten der Xenografttumoren

Um die der Tumorwachstumsverzögerung zugrundeliegenden Änderungen im intrazellulären *signaling* zu analysieren, wurde in Ergänzung zu den Analysen von Kap. 4.1.5 die Expression folgender Signalmoleküle mittels Western Blot bestimmt: p-mTOR, p-Akt (S473), panAKT, p-GSK3 β , p-S6, p-SRC, p-FAK, p-JNK, HER-2, Cyclin D1. Diesen Signalmolekülen wird eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Zellwachstums bzw. bei p-FAK, p-JNK und p-SRC eine essentielle Rolle im ITGB4-Signalling zugesprochen.

Von diesen zeigten nur p-SRC und p-JNK eine signifikant verringerte intratumorale Aktivität unter beiden Konditionen (ITGB4-KD bzw. Selektin-KO) im Vergleich zu Kontrolltumoren in WT-Mäusen. Bei p-SRC zeigte sich eine Reduktion um 54 % im ITGB4-KD bzw. um 70 % im Selektin-KO ($p \leq 0,02$) und bei p-JNK eine Reduktion um 57 % im ITGB4-KD bzw. um 60 % im Selektin-KO ($p \leq 0,02$). Die WB-Analysen zu den weiteren Signalmolekülen konnten keine signifikanten Änderungen nach ITGB4-Depletion oder Selektin-KO aufzeigen (Abb. 23).

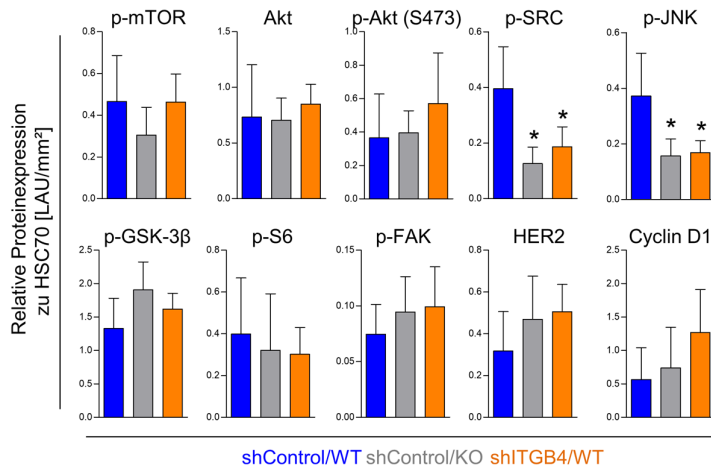


Abbildung 23 Western Blot Analyse intrazellulärer Signalmoleküle aus Proteinlysaten der Xenograftumoren. Quantifizierung der relativen Expression des jeweiligen Proteins als Ratio zur Expression von HSC70 (Ladekontrolle). Nur SRC und JNK zeigen eine signifikant verringerte intratumorale Aktivität unter beiden Konditionen (shITGB4-KD [orange] bzw. Selektin-KO [grau]) verglichen mit den Kontrolltumoren in WT-Mäusen (blau). Balken zeigen Mittelwerte von $n = 5 \pm \text{SD}$, * $p < 0,05$ (t-test).

Um zusätzlich unvoreingenommen nach Änderungen im Tumor-*signalling* zu *screenen*, wurde ergänzend die Aktivität von 100 Tyrosinkinase mittels PamChip® KinaseArray in Proteinlysaten der Tumorzellen beider Zelllinien (PC3-shControl vs. PC3-shITGB4) gemessen (Kooperation mit Dr. H. Bohnenberger, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen).

4.4.2 PamChip® KinaseArray kultivierter PC-3-Zellen mit normalem ITGB4-Status bzw. ITGB4-KD

Im PamChip® Tyrosinkinase-Array aus Zelllysaten beider Zelllinienderivate konnte anhand von *upstream*-Analysen berechnet werden, dass nach ITGB4-Depletion die Aktivität von SRC-Familie-Kinasen reduziert war. Die *upstream*-Analyse kann zwar nicht genau differenzieren, welche SRC-Kinase genau vom ITGB4-KD am stärksten in der Aktivität verändert wird, deutet aufgrund der Nennung einer möglichen Regulation von gleich 7 der 9 bekannten Src-Familie-Kinasen (SRC, FRK, FYN, FGR, YES, LCK, HCK) (Abb. 24) jedoch stark auf eine Beteiligung im Src-Signalweg hin.

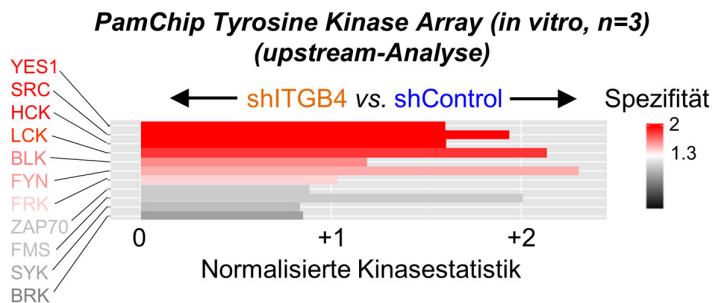


Abbildung 24: Upstream-Analyse des PamChip® Tyrosin Kinase Array. Beim Vergleich *in vitro* kultivierter PC-3-shControl- vs. PC-3-shITGB4-Zellen (upstream-Analyse zur Integration aller differentiell umgesetzten Substrate des Mikrochips) zeigte sich eine Herabregulation von 7 der 9 bekannten SRC-Familie-Kinasen (SFKs) im ITGB4-KD (+1-fache bis +2-fache normalisierte Kinaseaktivität in PC-3-shControl-Zellen).

5. Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass ein ITGB4-KD in PC-3-Zellen zu einem signifikant verzögerten Tumorwachstum im subkutanen Xenograftmodell führt (mittlere Wachstumsdauer: 36,6 Tage in der Kontrolle vs. 59,3 Tage im ITGB4-KD, nicht gezeigt). Diese Wachstumseinschränkung war noch viel deutlicher ausgeprägt, wenn der ITGB4-KD mit einem E/P-Selektin-KO der Versuchstiere kombiniert wurde. Hier wuchs nur noch in einem von zehn Versuchstieren überhaupt ein Tumor an (Wachstumsdauer: 71 Tage, nicht gezeigt), alle anderen Versuchstiere bildeten auch nach 147 Tagen noch keinen Tumor aus. Dahingegen hatte der Selektin-KO allein keinen Einfluss auf die Etablierung der Tumore mit normalem ITGB4-Status (mittlere Wachstumsdauer: 35,2 Tage, nicht gezeigt).

Eine möglicherweise besondere funktionelle Relevanz von ITGB4 für das Wachstum von PC-3-Zellen im Selektin-defizienten Stroma deutete sich bereits durch den signifikant erhöhten Anteil ITGB4-positiver Tumorzellen in den Xenografttumoren aus Selektin-KO-Mäusen gegenüber denen aus WT-Mäusen an (*ex vivo*-Durchflusszytometrie, Abb. 7). Vergleichbare Analysen wurden bislang nicht durchgeführt. Gleichzeitig konnte über die *ex vivo*-Durchflusszytometrie die Stabilität des *knockdowns* nach *in vivo*-Wachstum der Zellen nachgewiesen werden. Unter Kontrollbedingungen waren gerade einmal 18% der Primärtumorzellen ITGB4-positiv (*in vitro* waren es ca. 95% der Zellen, nicht gezeigt), was für eine Herabregulation der ITGB4-Expression in der überwiegenden Tumormasse spricht. Folglich zeigte sich ITGB4-Expression auch nur am Tumorrand (IHC, Abb. 8), was gut vereinbar mit dem Ergebnis der Durchflusszytometrie ist. Aufgrund dieser Lokalisation kann vermutet werden, dass ITGB4 in der Wachstumszone des Tumors exprimiert wird. Aufgrund der deutlichen Verzögerung des Tumorwachstums nach ITGB4-KD und der relativ niedrigen Expression in groß gewachsenen Tumoren, kann vermutet werden, dass zu Beginn des Tumorwachstum ITGB4 vermehrt exprimiert wird und eine wichtige funktionelle Rolle für die Tumoringitiation spielt.

Um zu untersuchen, ob die durch die ITGB4-Depletion ausgelöste Wachstumsverzögerung der Tumoren durch eine verminderte Proliferation der Tumorzellen erklärbar ist, wurde in den Gewebeschnitten immunhistochemisch Ki67 nachgewiesen. Hierbei zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen Kontroll- und KD-Tumoren (Abb. 9). Im Gegensatz hierzu zeigten drei verschiedene Nachweismethoden (Feulgen, anti-pH2AX, anti-BIM) eine gesteigerte Apoptose in den ITGB4-KD-Tumoren (Abb. 10-12). Der Apoptose geht eine Kaskade von intrazellulären Prozessen voraus. Dabei entscheidet die intrazelluläre Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Signalwegen letztlich über das weitere Schicksal der Zelle. Die Gruppe der Bcl-Proteine reguliert die intrinsische Apoptoseeinleitung. Die Vertreter der Bcl-Familie können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Apoptosehemmende und Apoptose-fördernde Proteine. Die pro-apoptotischen BH3-only-Proteine (Bcl-2 homology (BH)) der Bcl-2- Gruppe spielen dabei eine entscheidende Rolle. Zu ihnen gehören die Proteine Bid, Bad und Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death), die an der zellulären Antwort auf unterschiedliche Arten von auf die Zelle einwirkendem Stress beteiligt sind (Shamas-Din et al. 2011). Somit eignet sich das Protein Bim als Antigen in der immunhistochemischen Färbung zur

Quantifizierung von Apoptosevorgängen im Gewebe. Das bei den ITGB4-depletierten Tumoren beobachtete verzögerte Wachstum konnte somit nicht einer verringerten Proliferation, sondern einer gesteigerten Apoptose zugeschrieben werden. Dieses Ergebnis wird durch eine Vielzahl von Studien unterstützt, die eine Apoptose-Induktion nach Hemmung von Integrinen auf der Zelloberfläche von Tumoren beschreiben; das Fehlen einer Integrin-vermittelten Verankerung an der extrazellulären Matrix führt zu *Anoikis* (Paoli et al. 2013).

Hierfür spricht auch der Befund, dass vermehrte Apoptose nach ITGB4-KD zwar in den Xenografttumoren, aber nicht an den unter Standardbedingungen kultivierten Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 13). *In vitro* haften die Zellen noch am Plastik der Zellkulturflasche (wachsen zweidimensional) und sind möglicherweise weniger auf die Bindung an ECM-Komponenten über ITGB4 angewiesen. Erst während der Tumoretablierung, bei der es beim Wachstum im 3D-Raum auf die Fähigkeit zur Adhäsion an Nachbarzellen und Basalmembranen ankommt, scheint ITGB4 für die Suppression der *Anoikis* wichtig zu sein. In einer parallel am Institut durchgeführten Doktorarbeit (Dr. rer. nat. Vera Labitzky) wurden Kontroll- und ITGB4-KD-Zellen aus Standard-Kulturbedingungen (2D) bzw. Kultur in poly-HEMA-beschichteten Flaschen (Verhinderung der Adhäsion an Plastik, 3D) hinsichtlich pH2AX-Expression im WB verglichen. Dabei konnte signifikant mehr pH2AX in den ITGB4-KD-Zellen aus der 3D-Kultur, nicht aber in den ITGB4-KD-Zellen aus der 2D-Kultur nachgewiesen werden.

Um der Vermutung der im Moment der Tumorinitiation in ITGB4-KD-Zellen vermehrt stattfindenden *Anoikis* nachzugehen, sollte an den groß gewachsenen Tumoren (wo ITGB4-KD-Zellen letztlich doch noch - wenn auch zeitlich signifikant verzögert - einen makroskopischen Tumor gebildet hatten) getestet werden, ob sich hieran molekulare Anhaltspunkte für eine *Anoikis*-Resistenzentwicklung nachweisen lassen. Zur Bearbeitung dieser Frage wurden verschiedene WB-Analysen mit Proteinextrakten der Tumore durchgeführt. Hierbei wurde deutlich, dass p27, Cyclin D3 und pMAPK sowie die p38MAPK in ITGB4-depletierten Tumoren signifikant erhöht und die ERK/p38MAPK-Ratio erniedrigt war. Die erhöhte MAPK-Aktivität (ERK1/2) war unabhängig von RAF und MEK (Abb.14). Diese Befunde sprechen angesichts der Literatur (Collins et al. 2005) für eine vermehrte *Anoikis*-Resistenz in „adulten“ ITGB4-depletierten Tumoren. Hierbei ist zu beachten, dass die in diesen Tumoren gleichzeitig histologisch nachgewiesene vermehrte Apoptose sich auf weniger als 6% der Primärtumorzellen bezog, während für die WB-Analysen grobe Tumorstückchen verwendet wurden. Vermutlich gilt der Nachweis der vermehrten *Anoikis*-Resistenz für die grobe Masse des Tumors, während an einzelnen Zellen nach wie vor vermehrte Anzeichen der Apoptose im ITGB4-KD nachweisbar sind. Ein möglicher Mechanismus, über den der *Anoikis*-Stimulus nach Fehlen des ITGB4 beim verankerungslosen Wachstum von Tumorzellen „umgangen“ wird, ist offenbar das Verharren in einem reversiblen Wachstumsarrest (Collins et al. 2005). So führt die in den ITGB4-KD-Tumoren nachgewiesene ERK_{low}/p38MAPK_{high}-Ratio gemäß Literatur zur Tumor „*dormancy*“, was zellbiologisch der Quieszenz (reversiblen Seneszenz) entspricht (Sosa et al. 2011).

Angesichts der praktisch aufgehobenen Tumorbildung nach Kombination von ITGB4-KD und E-/P-Selektin-KO in den Vorarbeiten zu diesem Projekt entstand nun unter Berücksichtigung der WB-Analysen die Hypothese, dass die für das Wachstum von ITGB4-KD-Tumoren erforderliche Anoikis-Resistenzentwicklung bei gleichzeitigem Fehlen von E- und P-Selektin im umliegenden murinen Stroma nicht mehr möglich ist. Hieraus ergab sich nun die Frage, wie oder warum die Selektin-Defizienz der Maus die Resistenzentwicklung hemmt. Wie in der Einleitung erwähnt, werden E- und P-Selektin auf der luminalen Oberfläche von Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert. In unserem subkutanen Xenografttumor-Modell bedeutete dies, dass die Tumorzellen, die in das subkutane Stroma injiziert wurden, selbst vermutlich keinen Kontakt zu murinen Selektinen hatten (eine artifizielle Injektion der Tumorzellen in das Lumen von Hautkapillaren ist äußerst unwahrscheinlich). Da es bei der Injektion aufgrund der Gewebeverletzung jedoch zu einer entzündlichen Begleitreaktion kommen könnte und die Tumorzellen selbst bekanntermaßen eine Vielzahl von Chemokinen und Zytokinen produzieren, wurde vermutet, dass das subkutane Tumorbett bereits kurz nach der Injektion von murinen Immunzellen infiltriert wird. Um das Gefäßsystem verlassen und das Tumorbett infiltrieren zu können, müssen die murinen Leukozyten mit den endothelialen Selektinen interagieren (Reymond et al. 2013, Orr et al. 2000). Die Tumorzellen treffen im Stroma auf eine Vielzahl verschiedener Zellen wie Fibroblasten und Makrophagen (Joyce and Pollard 2009), die durch Ausschüttung von Mediatoren wie Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren den Progress der Tumorbildung weiter vorantreiben können (Gocheva et al. 2010). Wenn die Tumorzellen dann anwachsen, kann hier von einem reaktiven Stroma gesprochen werden, das, ebenso wie entzündetes Gewebe, von Fibroblasten, Leukozyten, mesenchymalen Stammzellen und Makrophagen infiltriert wird (Grivennikov et al. 2010, Valastyan and Weinberg 2011). Die malignen Zellen senden ihrerseits mittels Zytokin- und Chemokinsekretion chemotaktische Signale und rekrutieren Stromazellen wie Fibroblasten, Perizyten und Makrophagen. Die Ausschüttung bioaktiver Moleküle wie Wachstumsfaktoren, Interleukinen und Chemokinen durch die Tumorzellen führt zu einem Phänotypenwechsel der normalen M1 Makrophagen in sogenannte immunsuppressive, tumor-assoziierte M2 Makrophagen (TAMs). Eine hohe Dichte von TAMs korreliert mit einer schlechteren Prognose in einer Mehrzahl publizierter Studien (Gao et al. 2014, Laoui et al. 2014). So kommt es zu einer bidirektionalen Interaktion zwischen den malignen und den gewebseigenen Zellen und zusammen mit der extrazellulären Matrix (ECM) bildet sich hierdurch ein intratumorales Milieu, das als tumor microenvironment (TEM) bezeichnet wird.

Insofern stellten wir die Hypothese auf, dass sich die Selektin-Defizienz über eine Verringerung der Immunzell-Infiltration des Tumorbetts auswirkte. Tumor-assoziierte Leukozyten setzen bekanntlich eine Vielzahl tumorwachstumsfördernder Faktoren wie Chemokine / Zytokine und Wachstumsfaktoren frei (Noy and Pollard 2014), so dass nach E- und P-Selektin-Defizienz das intratumorale Chemokinmilieu verändert sein könnte. In der Annahme, dass also E-/P-Selektin-abhängige Änderungen im Chemokinmilieu zur Anoikis-Resistenzentwicklung ITGB4-depletierter Tumoren notwendig sind, schloss sich eine Analyse der PC3-Zellen hinsichtlich ihrer Chemokinrezeptor-Expression mittels qPCR-Array an, um herauszufinden, welche Chemokine überhaupt auf ihren Rezeptor stoßen würden. Hierbei resultierte nur CXCR4 (Abb. 15), dessen einziger bekannter Ligand SDF-1 α ist (Horuk 2001, Kucia et al. 2004). Durch diesen Liganden aktiviert, startet der Rezeptor eine intrazelluläre

Signaltransduktionskaskade mit Beteiligung diverser G--Proteine und Proteinkinasen. Es ist bekannt, dass die Mehrheit aller Tumorentitäten CXCR4 exprimieren und dessen Ligand CXCL12 (SDF-1 α) eine chemotaktische Wirkung auf die meisten Tumorzellen aufweist. Darüber hinaus ist die SDF-1 α -CXCR4-Achse aufgrund ihrer Angiogeneseförderung auch am Tumorwachstum beteiligt. Die verstärkte Expression des CXCR4 auf Tumorzellen ist mit einer erhöhten Metastasierungstendenz und einer schlechteren Prognose assoziiert (Balkwill 2004).

In Folge zeigte sich tatsächlich eine verminderte intratumorale SDF-1 α -Konzentration in den Selektin-KO- Tumoren im Vergleich zu den PC-3-shControl/WT-Tumoren. Überraschend zeigte sich eine vergleichbare SDF-1 α -Reduktion in den Tumoren, die in WT-Mäusen gewachsen sind, aber den ITGB4-KD aufwiesen. Demzufolge war SDF-1 α durch beide Konditionen, den Selektin-KO der Mäuse sowie den ITGB4-KD der Zellen, in seiner Expression verringert (Abb. 16+17). Zudem konnte die Reduktion der SDF-1 α -Produktion nach ITGB4-KD in den kultivierten Zellen *in vitro* nachgewiesen werden (Abb. 17). Proliferationsassays bei unterschiedlichen Konfluenzstadien wiesen dann auch nach, dass ITGB4-KD-Zellen insbesondere dann einen Wachstumsnachteil haben, wenn sie stärker vereinzelt proliferieren müssen (Abb. 18+19). Dies implizierte einen parakrin wachstumsförderlichen Effekt des im ITGB4-KD reduzierten SDF-1 α , welcher in der Folge experimentell nachgewiesen wurde (Abb. 19-22). So förderte die exogene Zufuhr von rhSDF-1 α die Proliferation speziell der ITGB4-KD-Zellen, nicht aber der Kontrollzellen, nach initial starker Vereinzellung unter Standardkulturbedingungen. Darüber hinaus war die 3D-Kolonienformationsfähigkeit der ITGB4-KD-Zellen deutlich eingeschränkt und besserte sich nach Zufuhr von SDF-1 α sowie von konditioniertem Medium der Kontrollzellen (shControl-CM). Dieser Effekt konnte durch Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen SDF-1 α zu dem shControl-CM wieder aufgehoben werden. Kontrollzellen profitierten bei der 2D- oder 3D-Proliferation/Kolonienbildung weder von rhSDF-1 α noch von shControl-CM.

In der Vergangenheit haben zahlreiche Studien die bedeutende Rolle der SDF-1 α -CXCR4-Achse für die Tumorentstehung und Metastasierung aufgezeigt. Auch wurde beschrieben, dass sich die Tumorzellen selbst, durch Sekretion des Chemokins SDF-1 α , sowohl parakrin als auch autokrin zu mehr Wachstum und Proliferation stimulieren können (Domanska et al. 2013). In den ITGB4-KD-Zellen konnte eine Reduktion der SDF-1 α -Produktion *in vitro* nachgewiesen werden, was auf eine unzureichende autokrine bzw. parakrine Stimulation der ITGB4-KD-Zellen schließen lässt.

Diese Ergebnisse deuteten in der Zusammenschau darauf hin, dass ITGB4-depletierte Tumorzellen bei der Anoikis-Resistenzentwicklung aufgrund einer verringerten endogenen SDF-1 α -Produktion verstärkt auf die exogene Zufuhr von SDF-1 α aus Tumor-assoziierten Leukozyten, möglicherweise Makrophagen, angewiesen sind (Szebeni et al. 2017). Durch Fehlen der endothelialen Selektine gelangen mutmaßlich weniger TAMs in das Tumorbett, was folglich mit dem niedrigeren intratumoralen SDF-1 α -Gehalt einhergeht.

Um zu untersuchen, ob diesem gemeinsamen Effekt des ITGB4-KD und des Selektin-KO (Verringerung des intratumoralen SDF-1 α -Gehalts) auch gemeinsame Änderungen im zellulären Signalling zugrunde

lagen, schlossen sich weitere WB-Analysen mit Proteinlysaten der Xenografttumoren an. Bei der Suche nach weiteren gemeinsamen Effektoren wurde der Fokus auf intrazelluläre Signalmoleküle gelegt, die laut Literatur direkt oder co-stimulatorisch von ITGB4 beeinflusst sind. Von diesen möglichen Effektormolekülen konnte nur bei SRC und JNK eine verringerte intratumorale Aktivität im Vergleich zu Kontrolltumoren in WT-Mäusen nachgewiesen werden, wobei sich eine in beiden Bedingungen (sowohl im alleinigen ITGB4-KD als auch im alleinigen Selektin-KO) nachweisbare Absenkung der intratumoralen SRC und JNK-Aktivität (gemessen am p-SRC/p-JNK-Proteinlevel, Abb. 23) zeigte. Auch in einem unvoreingenommenen Kinase-Aktivitäts-*array*, der die Umsetzung von 144 unterschiedlichen Substraten von Phosphotyrosinkinase gleichzeitig misst, zeigte sich eine Absenkung der Aktivität zahlreicher SRC-Familie-Kinasen (SFKs) im ITGB4-KD (Abb. 24).

Das *Signalling* der Integrine verläuft zentral über die Rekrutierung und Aktivierung von SFKs. Src und seine Isoformen sind notwendig für die Phosphorylierung der focal adhesion kinase (FAK), nach dem diese sich selbst an einem anderen Rest autophosphoryliert hat. Nach Bindung von Adapter-Proteinen wird daraufhin die ERK/MAPK-Kaskade ausgelöst. Adapter-Proteine können an FAK binden und damit Bindungsstellen für einen Adapter-Austauschfaktor-Komplex erzeugen, der, aktiviert, wiederum MEK und ERK sowie die *Jun amino-terminal kinase* (JNK) aktivieren kann. JNK ist somit eine Kinase *downstream* von Src (Guo and Giancotti 2004). Über diese Signalwege regulieren Integrine Zellzyklusprogression, Zellüberleben, Proliferation, Migration und Zelldifferenzierung. Auch existieren Kreuzungswege zwischen Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Growth-Faktor-Rezeptoren (GFRs) (Meredith et al. 1993). Es wurde beschrieben, dass in Fibroblasten für die Anoikis-Suppression eine erhöhte JNK-Aktivität notwendig ist (Almeida et al. 2000). Insofern scheint es zusammenfassend denkbar, dass die verminderte Anoikis-Resistenzentwicklung der ITGB4-depletierten Tumore im Selektin-defizienten Stroma auf eine verminderte Aktivierung von SRC und seines *downstream targets* JNK zurückgeht.

Die Signalkaskade des Chemokins SDF-1 α , welches sowohl im ITGB4-KD als auch im Selektin-KO intratumoral vermindert nachgewiesen wurde, verläuft nach seiner Bindung an CXCR4 über die Proteinkinase B (AKT) und folgend über die Aktivierung von ERK (1/2) und p38 (Ho et al. 2012). Studien konnten diese über den MAP-Kinase-Weg ablaufende Kaskade aufzeigen und auch eine Verbindung der CXCR4/CXCL12-Signalachse mit der Integrin-vermittelten Signalkaskade über FAK, Src und JNK sowie Kreuzungsstellen beider Wege darstellen (Domanska et al. 2013). Ein Einfluss der SDF-1 α -CXCR4-Achse auf den SRC/JNK-Signalweg wurde ebenfalls in mehreren Arbeiten gezeigt (Porcile et al. 2005).

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass SDF-1 α in der Lage ist, das Integrin-vermittelte Signalling zu beeinflussen. So zeigten sich bei Zellen des Nierenzell-Ca nach Stimulation durch SDF-1 α sowohl Veränderungen an Integrinuntereinheiten, eine veränderte Expression sowie Aktivierung der Integrine als auch veränderte Kinaseaktivitäten (Jones et al. 2007).

Von den Effektormolekülen beider Signalkaskaden konnte bei SRC und JNK eine verringerte intratumorale Aktivität im Vergleich zu Kontrolltumoren in WT-Mäusen nachgewiesen werden. Wie oben beschrieben liegt JNK *downstream* von Src. Viele Studien belegen die bedeutende Rolle der SFKs für die Regulation von Proliferation, Adhäsion, Differenzierung und Zellüberleben (Windham et al. 2002). Es wird vermutet, dass Src-Aktivität die EMT steigert, was der Zelle die Fähigkeit zur Anoikis-Resistenzentwicklung verleiht (Zhan et al. 2004). Ebenso wird die Src Aktivierung als einer der Hauptfaktoren bei der Induktion einer *Anoikis*-Resistenz beschrieben (Paoli et al. 2013).

Die Befunde des reduzierten Src-Signalings in den ITGB4-KD-Zellen sprechen angesichts der Expression von ITGB4 am Tumorrand und der physiologischen Bedeutung von ITGB4 für die Anhaftung epithelialer Zellen an ECM-Komponenten für eine vermehrte Anoikis-Induktion in ITGB4-depletierten Tumoren, gegen die die Tumorzellen während der Tumoretablierung resistent werden mussten, was aber bei gleichzeitigem Fehlen von E- und/oder P-Selektin im umliegenden Stroma nicht mehr möglich war. Aufgrund der mechanistischen Vorarbeiten ist die Hypothese, dass sich die Selektin-Defizienz über eine Verringerung der Immunzell-Infiltration des Tumorbetts auswirkt, da die ITGB4-KD-Zellen aufgrund einer verminderten endogenen SDF-1 α Produktion verstärkt auf das von Tumor-assoziierten Leukozyten, möglicherweise von TAMs sezernierte SDF-1 α angewiesen sind. Dieses SDF-1 α benötigen sie zur Suppression der *Anoikis*, die durch das verankerungslose Wachstum induziert wird. Dieses von TAMs sezernierte SDF-1 α könnte über die SDF-1 α -CXCR4-Achse einen alternativen Signalweg zum fehlendem Integrin-*Signalling* ansteuern und damit ebenfalls das SRC/JNK-*Signalling* modulieren, aktivieren und der Zelle die Fähigkeit zur Anoikisresistenzentwicklung verleihen. Diese aus der vorliegenden Arbeit abgeleitete Hypothese muss allerdings im Folgenden durch eine Reihe weiterer Versuche validiert und vertieft werden.

Um die Hypothese, TAMs könnten die notwendige exogene Quelle für das bei der *Anoikis*-Resistenzentwicklung ITGB4-depletierter Tumoren essenzielle SDF1- α sein, weiter zu untermauern, könnten die Tumorgewebeschnitte mittels immunhistochemischer Färbungen auf ihre Gewebeeinfiltration durch CD45+ (Pan-Leukozyten-Marker) bzw. CD68+ (Makrophagen) Zellen untersucht werden. Damit könnte möglicherweise der Nachweis einer verringerten leukozytären Infiltration während Tumorentstehung im Selektin-KO erbracht werden.

Im Folgenden könnten sich dann Proliferationsversuche der PC3-shControl - vs. PC3-sh ITGB4- Zellen mit Co- inkubierten murinen Makrophagen in 2D- und 3D-Kultur (in vitro) anschließen um damit den Fragen nachzugehen, ob sich durch diese Co-Inkubation die Kolonienformation bessert, die Apoptoserate senkt und die SRC/JNK-Aktivität möglicherweise steigert.

Die verzögerte Tumorentwicklung ITGB4-depletierter PC-3-Xenografts lässt sich *in vitro* sehr gut durch 3D-*colony forming assays* simulieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Wiedergewinnung der Tumorzellen aus diesen 3D-Kulturen etabliert. Mit Hilfe der Corning® Matrigel *recovery solution* können Zellen, die unter 3D-Bedingungen kultiviert wurden, zurückgewonnen und verschiedenen Analysen zugeführt werden. So könnte nun analysiert werden, ob ITGB4-depletierte Tumorzellen durch Aussäen in 3D-Wachstumsbedingungen stärker in die Apoptose gedrängt werden als

ITGB4-positive Kontrollzellen. Sollte hierbei eine Apoptose-Induktion in PC-3-shITGB4 nachweisbar sein, könnte der *colony forming assay* mit einem Apoptose-Inhibitor wiederholt werden. Die Hypothese ist dabei, dass die beeinträchtigte Kolonienformation ITGB4-depletierter Zellen durch Inhibition der Apoptose gebessert wird.

Ferner könnte durch die Möglichkeit zur Rückgewinnung der Zellen aus 3D-Kultur analysiert werden, ob ITGB4-depletierte Tumorzellen nach Rückgewinnung aus 3D-Kultur ebenfalls eine verminderte Aktivierung von SRC und/oder JNK zeigen.

Anschließend könnte der Effekt exogen zugeführten rmSDF-1 α bzw. von PC-3-shControl-CM zur 3D-Kultur auf diese Signalmoleküle untersucht werden. Die Hypothese wäre, dass sich nach Zufuhr von SDF-1 α bzw. PC-3-shControl-CM die Menge an nachweisbarem pSRC/pJNK im ITGB4-KD wieder steigert.

In dieser Arbeit wurde nicht analysiert, ob eine Einzeldefizienz von entweder E- oder P-Selektin den gleichen Effekt auf das Tumorwachstum hat, sondern es wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von E- und P-Selektin gar keinen Effekt auf das Tumorwachstum hatte. Versuche mit entweder E- oder P-Selektin-einzeldefizienten Tieren wurden bislang nicht durchgeführt. Es ist unklar, ob die beobachtete Reduktion der Tumorkolonisation ITGB4-depletierter Tumoren bereits in E- oder P-Selektin-einzeldefizienten Tieren auftritt oder eine kombinierte E-/P-Selektin-Defizienz erforderlich ist, um den beobachteten Effekt hervorzurufen. Erkenntnisse hierzu wären für die Erklärung des beobachteten Synergismus von großer Wichtigkeit.

Aufgrund der Vorarbeiten ist anzunehmen, dass die SDF-1 α /CXCR4-Achse essentiell ist für das Überleben der in ITGB4-depletierten Tumoren ausgelösten Anoikis. Um diesen Mechanismus *in vivo* näher zu untersuchen, könnte das Tumorwachstum von PC-3-shControl- und PC-3-shITGB4-Zellen in WT-Mäusen mit und ohne systemische Gabe eines CXCR4-Inhibitors untersucht werden mit der Frage, ob sich der Einfluss der Selektindefizienz auf die synergistische Inhibition der Tumorkolonisation ITGB4-depletierter Tumoren durch CXCR4-Inhibition pharmakologisch mimikrieren lässt. Mit Plerixafor (AMD3100) steht bereits ein klinisch zugelassener Blocker der SDF-1 α -CXCR4-Achse zur Verfügung. Die Hypothese ist hier, dass ITGB4-Depletion in WT Mäusen (wie zuvor) zu einer Verzögerung des Wachstums führt, welches bei zusätzlicher CXCR4-Blockade in WT Mäusen noch deutlicher verlangsamt oder sogar komplett aufgehoben ist. Gleichzeitig sollte das Wachstum der ITGB4-positiven Kontrolle von dieser CXCR4-Inhibition weniger stark beeinflusst werden. Eine weitere Frage wäre auch, inwieweit CXCR4, stimuliert über SDF-1 α , über ITGB4 Wachstumssignale induziert, die bei Fehlen von ITGB4 ausbleiben (Engl et al. 2006), und ob eine ektopische Expression von SDF-1 α in ITGB4-depletierten Tumorzellen deren Anwachsen in selektindefizienten Mäusen ermöglichen würde.

Zuletzt ist noch anzumerken, dass sich die bisherigen Untersuchungen nur auf eine Tumorentität fokussiert haben, daher wäre es interessant zu prüfen, ob die bisherigen Erkenntnisse zu diesem Mechanismus auch auf anderen Tumorentitäten übertragbar sind und ob bei diesen anderen Tumorentitäten ein ähnlicher Synergismus der kombinierten ITGB4/Selektin-Depletion beobachtet werden kann.

5.1 Ausblick

Die Daten dieser Doktorarbeit deuten auf einen zum ITGB4-*Signalling* alternativen Signalweg, vermittelt über die SDF-1 α -CXCR4-Achse, der ebenfalls das Src-*Signalling* aktivieren und dadurch der Zelle die Fähigkeit zur Anoikis-Resistenzentwicklung verleihen könnte. Dies könnte weiterführend das Potenzial eines neuen Ansatzes zur Kombinationstherapie humaner Karzinome in sich bergen.

Mit Plerixafor (AMD3100) steht bereits ein klinisch zugelassener Blocker der SDF-1 α -CXCR4-Achse zur Verfügung. Jedoch eignet sich ITGB4 aufgrund seiner verbreiteten Expression in Normalgeweben nicht als therapeutisches Target. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass die Funktion des ITGB4 von seiner N-Glykosylierung abhängt (Kariya and Gu 2011). In früheren Studien der Arbeitsgruppe konnte bereits die für diese N-Glykosylierung verantwortliche Glykosyltransferase in PC-3-Zellen identifiziert werden (Mgat5b=GnT-Vb) (Lange et al. 2012). Da diese Glykosyltransferase außer (aberrant) in Tumoren nur im Hirn und im Hoden vorkommt (Inamori et al. 2003), also in Organen, die durch eine Blut-Gewebe-Schranke vor einer systemischen Mgat5b-Inhibition geschützt wären, könnte dies ein spezifisches Targeting von Mgat5b und somit der N-Glykosylierung von ITGB4 in Tumoren ermöglichen. So könnte eine möglicherweise funktionell bedeutsame aberrante Glykosylierung von ITGB4 durch einen Mgat5b-Inhibitor in Kombination mit Plerixafor (AMD3100) als Blocker der SDF-1 α -CXCR4-Achse einen neuen Ansatz zur Kombinationstherapie des Prostatakarzinoms darstellen.

6. Zusammenfassung

In einem vorausgegangenen Projekt konnte nachgewiesen werden, dass Prostatakarzinom- (PCa-) Zellen bei Abwesenheit endothelialer Selektine (in E/P-Selektin-KO-Mäusen) metastasieren können und bei besonders hoher metastatischer Kompetenz spezifisch das β 4-Integrin (ITGB4) heraufregulieren. Daraufhin wurde ITGB4 in den hoch metastatischen PC-3-Zellen depletiert und die Auswirkung dieses ITGB4-*knockdowns* (KD) auf Tumorwachstum und Metastasierung im Xenograftmodell in WT- und E-/P-Selektin-*knockout* (KO)-Mäusen untersucht. Der ITGB4-KD allein führte bereits zu einer signifikanten Verzögerung des Tumorwachstums. Bei Kombination des ITGB4-KD mit dem E-/P-Selektin-KO war das Tumorwachstum jedoch nahezu vollständig aufgehoben, während der Selektin-KO allein gar keinen Effekt auf das Tumorwachstum hatte. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Mechanismen, die diese Beobachtung zugrunde liegen. Es wurde untersucht, ob die, durch den ITGB4-KD ausgelöste Wachstumsverzögerung durch eine verminderte Proliferation oder gesteigerte Apoptose bedingt war. Durch verschiedene Nachweismethoden konnte eine gesteigerte Apoptose in den ITGB4-KD-Tumoren gezeigt werden. Aufgrund der physiologischen Funktion von ITGB4 wurde vermutet, dass es sich dabei um die Sonderform der *Anoikis* handelt. Da die Tumore nach alleinigem ITGB4-KD zwar verzögert, aber letztlich doch noch wuchsen, schien eine gewisse Resistenzentwicklung gegen die *Anoikis* in diesen Tumoren abzulaufen, was sich anhand einer RAF/MEK-unabhängigen Induktion der MAPK-Aktivität und erniedrigten ERK/p38MAPK-Ratio andeutete. Zur Erklärung des synergistischen Effektes aus ITGB4-KD und Selektin-KO entstand daher die Hypothese, dass die für das Wachstum von ITGB4-KD-Tumoren erforderliche *Anoikis*-Resistenzentwicklung bei gleichzeitigem Fehlen von E-/P-Selektin im umliegenden Stroma nicht mehr möglich ist. Als mögliche Ursache wurde angenommen, dass sich der Selektin-KO durch eine Verringerung der Immunzell-Infiltration des Tumors auswirkt, was zu einer Veränderung des intratumoralen Chemokinmilieus führen könnte. Eine Analyse der PC-3-Zellen hinsichtlich ihrer Chemokinrezeptor-Expression konnte die Expression von CXCR4 zeigen, dessen Ligand SDF-1 α ist. Folglich konnte nachgewiesen werden, dass die Selektindefizienz und unabhängig davon überraschend auch die ITGB4-Depletion den SDF-1 α -Gehalt in den Xenografttumoren verringert. Die Auswirkung von SDF-1 α auf die Tumoretablierung wurde mit Hilfe von *colony formation assays* analysiert. Der ITGB4-KD führte zu deutlich weniger und kleineren Kolonien als. Sowohl die exogene Zufuhr von rmSDF-1 α als auch die Zugabe von konditioniertem Medium (CM) von ITGB4-positiven Kontrollzellen konnte die Kolonienbildung spezifisch von ITGB4-depletierten PC-3-Zellen steigern. Der Kolonien-fördernde Effekt des PC-3-shControl-CM konnte durch einen neutralisierenden SDF-1 α -Antikörper reduziert werden. Daraus folgt, dass ITGB4-depletierte Tumorzellen bei der *Anoikis*-Resistenzentwicklung aufgrund einer verringerten endogenen SDF-1 α -Produktion auf die exogene Zufuhr von SDF-1 α , z. B. aus tumorassoziierten Leukozyten (TALs), angewiesen sind. Zudem wurde festgestellt, dass der ITGB4-KD und der Selektin-KO jeweils zu einer verminderten Aktivität von SRC und JNK führt, so dass bei Konvergenz beider Veränderungen ein kritisches *level* an Aktivität dieser Kinasen unterschritten werden könnte. Die TALs könnten über die SDF-1 α -CXCR4-Achse einen alternativen Signalweg zum fehlendem Integrin-*Signalling* aktivieren und der Zelle die Fähigkeit zur *Anoikis*-Resistenzentwicklung verleihen.

7. Abstract

The previous data leading to this work demonstrated that human prostate cancer (PCa) cells can metastasize in the absence of endothelial selectins (by using E-/P-selectin knockout (KO) mice in xenograft models) and specifically upregulate $\beta 4$ integrin (ITGB4) when they are highly metastatic. ITGB4 was then depleted in the PCa cell line PC-3 and the effect of this ITGB4 knockdown (KD) on tumor growth and metastasis was investigated in WT and E-/P-selectin KO mice. The ITGB4-KD alone already led to a significant delay in tumor growth. However, when ITGB4-KD was combined with E-/P-selectin KO, tumour growth was almost completely eliminated, while selectin-KO alone had no effect at all on tumor growth. The aim of this work was to investigate the underlying mechanisms of this observation. It was investigated whether the growth delay induced by ITGB4-KD was due to reduced proliferation or increased apoptosis. By different detection methods an increased apoptosis could be shown in the ITGB4-KD tumors. Due to the physiological function of ITGB4 (cell-matrix contact), it was suspected that the increased apoptosis was due to *anoikis* ('homelessness'-induced apoptosis). Since the tumor growth was indeed delayed after ITGB4-KD, but ultimately still grew, a certain resistance against *anoikis* seemed to develop. This suspicion could be substantiated by means of RAF/MEK-independent induction of MAPK activity and decreased ERK/p38MAPK ratio determined in the xenograft tumors. In order to explain the synergistically reduced tumor growth after combined ITGB4-KD and selectin KO, the resulting hypothesis was therefore that *anoikis* resistance is impaired, when E-/P-selectin are absent in the surrounding stroma. As a possible explanation, it was assumed that the selectin KO caused reduced immune cell infiltration of the tumor, which could lead to a change in the intratumoral chemokine environment. An analysis of the PC-3 cells with regard to chemokine receptor expression demonstrated notable expression of CXCR4, whose ligand is SDF-1 α . Consequently, it could be demonstrated that selectin deficiency and, to our surprise, also ITGB4 depletion both reduced the intratumoral SDF-1 α concentration. The effect of SDF-1 α on tumor establishment was analyzed using colony formation assays. The ITGB4-KD led to significantly less and smaller spheroid colonies in soft agar. Both the exogenous supply of rmSDF-1 α and the addition of conditioned medium (CM) of ITGB4-positive control cells could specifically increase the colony formation of ITGB4-KD PC-3 cells. The colony-promoting effect of PC-3-shControl-CM was reduced by a neutralizing SDF-1 α antibody. Based on these results, it was concluded that ITGB4-depleted tumor cells may depend on the exogenous supply of SDF-1 α , *e. g.* from tumor-associated leukocytes (TALs), for *anoikis* resistance development due to reduced endogenous SDF-1 α production. In addition, it was found that the ITGB4-KD and the selectin-KO each led to a reduced activity of SRC and JNK, so that if both changes converge, the activity of these kinases could fall below a critical level. The TALs could activate the SDF-1 α -CXCR4 axis to compensate the lost integrin signaling, which might enable the tumor cells to develop *anoikis* resistance.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BM	Basalmembran
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
Ca	Carcinoma
ca.	circa
CAM	cell adhesion molecules
CD34	cluster of differentiation 34
CM	konditioniertes Medium
CTC	zirkulierende Tumorzellen
CXCR4	C-X-Chemokine receptor 4
d. h.	das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTC	disseminierte Tumorzellen
ECM	extra cellular Matrix
EGF	Epithelial-Growth-Factor
EGFR	Epithelial-Growth-Factor-Receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
et al.	und andere (et alii/aliae)
FACS	fluorescence-activated cell scanning
FAK	Fokal Adhäsion Kinase
Faktor X	Blutgerinnung <i>Stuart-Prower-Faktor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Growth-Factor-Receptor
Gly CAM	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule
GTPase	kleine G-Proteine
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
ICAM	intercellular adhäsion molecule
ICAM-1	intercellular adhäsion molecule 1 (CD54; CD-Marker)
IHC	Immunhistochemie
ILK	Integrin-linked Kinase
ITGB1	β1-Integrin
ITGB2	β2-Integrin
ITGB4	β4-Integrin
KD	knockdown
KO	knockout
MAPK	Mitogen-activated Kinasen
MET	mesenchymal-endotheliale Transition
PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIC	Proteinase Inhibitor Cocktail
RDG	tripeptide Arg-Gly-Asp
RNA	ribonucleic acid
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SCR	short consensus repeats
SDF-1α	stromal cell-derived factor 1
sLeA	sialyl Lewis A

sLeX	sialyl Lewis X
u. a	unter anderem
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VWF	von Willebrand Faktor
WB	Western Blot
WT	Wild Type
z. B.	zum Beispiel

9. Literaturverzeichnis

Almeida, E. A., D. Ilic, Q. Han, C. R. Hauck, F. Jin, H. Kawakatsu, D. D. Schlaepfer and C. H. Damsky (2000). "Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase." *J Cell Biol* 149: 741-754.

American-Cancer-Society. (2012). "Survival rates for prostate cancer." Retrieved 9. Feb 2012, 2012, from <http://www.cancer.org/Cancer/ProstateCancer/OverviewGuide/prostate-cancer-overview-survival-rates>.

Aplin, A. E., A. Howe, S. K. Alahari and R. L. Juliano (1998). "Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins." *Pharmacol Rev* 50: 197-263.

Assoian, R. K. and M. A. Schwartz (2001). "Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression." *Curr Opin Genet Dev* 11: 48-53.

Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." *Nat Rev Cancer* 4: 540-550.

Bendas, G., A. Krause, U. Bakowsky, J. Vogel and U. Rothe (1999). "Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique." *Int J Pharm* 181: 79-93.

Benninghoff, A., Drenckhahn, Detlev und Zenker, Wolfgang (1994). *Anatomie*. München, Urban & Schwarzenberg.

Bissell, M. J. and W. C. Hines (2011). "Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression." *Nat Med* 17: 320-329.

Bonn, D. K. (2013).

Breuss, J. M., J. Gallo, H. M. DeLisser, I. V. Klimanskaya, H. G. Folkesson, J. F. Pittet, S. L. Nishimura, K. Aldape, D. V. Landers, W. Carpenter and et al. (1995). "Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling." *J Cell Sci* 108: 2241-2251.

Chambers, A. F., A. C. Groom and I. C. MacDonald (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." *Nat Rev Cancer* 2: 563-572.

Cheah, M. and M. R. Andrews (2018). "Integrin Activation: Implications for Axon Regeneration." *Cells* 7.

Chieco, P. and M. Derenzini (1999). "The Feulgen reaction 75 years on." *Histochem Cell Biol* 111: 345-358.

Chung, J., R. E. Bachelder, E. A. Lipscomb, L. M. Shaw and A. M. Mercurio (2002). "Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells." *J Cell Biol* 158: 165-174.

Collins, N. L., M. J. Reginato, J. K. Paulus, D. C. Sgroi, J. Labaer and J. S. Brugge (2005). "G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-mediated Bim suppression." *Mol Cell Biol* 25: 5282-5291.

Coskun, U., B. Sancak, I. Sen, N. Bukan, M. A. Tufan, O. Gulbahar and S. Sozen (2006). "Serum P-selectin, soluble vascular cell adhesion molecule-I (s-VCAM-I) and soluble intercellular adhesion molecule-I (s-ICAM-I) levels in bladder carcinoma patients with different stages." *Int Immunopharmacol* 6: 672-677.

Dittmar, T., C. Heyder, E. Gloria-Maercker, W. Hatzmann and K. S. Zanker (2008). "Adhesion molecules and chemokines: the navigation system for circulating tumor (stem) cells to metastasize in an organ-specific manner." *Clin Exp Metastasis* 25: 11-32.

- Domanska, U. M., R. C. Kruijzinga, W. B. Nagengast, H. Timmer-Bosscha, G. Huls, E. G. de Vries and A. M. Walenkamp (2013). "A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide." *Eur J Cancer* 49: 219-230.
- Engl, T., B. Relja, D. Marian, C. Blumenberg, I. Muller, W. D. Beecken, J. Jones, E. M. Ringel, J. Bereiter-Hahn, D. Jonas and R. A. Blaheta (2006). "CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through alpha5 and beta3 integrins." *Neoplasia* 8: 290-301.
- Erpenbeck, L. and M. P. Schon (2010). "Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells." *Blood* 115: 3427-3436.
- Frisch, S. M., M. Schaller and B. Cielply (2013). "Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis." *J Cell Sci* 126: 21-29.
- Gallagher, D. J., A. Feifer and J. A. Coleman (2010). "Genitourinary cancer predisposition syndromes." *Hematol Oncol Clin North Am* 24: 861-883.
- Gao, F., B. Liang, S. T. Reddy, R. Farias-Eisner and X. Su (2014). "Role of inflammation-associated microenvironment in tumorigenesis and metastasis." *Curr Cancer Drug Targets* 14: 30-45.
- Gebauer, F., D. Wicklein, K. Stubke, N. Nehmann, A. Schmidt, J. Salamon, K. Peldschus, M. F. Nentwich, G. Adam, G. Tolstonog, M. Bockhorn, J. R. Izbicki, C. Wagener and U. Schumacher (2013). "Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp--/rag2-- mice." *Gut* 62: 741-750.
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." *Science* 285: 1028-1032.
- Gilcrease, M. Z. (2007). "Integrin signaling in epithelial cells." *Cancer Lett* 247: 1-25.
- Gocheva, V., H. W. Wang, B. B. Gadea, T. Shree, K. E. Hunter, A. L. Garfall, T. Berman and J. A. Joyce (2010). "IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion." *Genes Dev* 24: 241-255.
- Gomez-Cuadrado, L., N. Tracey, R. Ma, B. Qian and V. G. Brunton (2017). "Mouse models of metastasis: progress and prospects." *Dis Model Mech* 10: 1061-1074.
- Grabinski, N., K. Bartkowiak, K. Grupp, B. Brandt, K. Pantel and M. Jucker (2011). "Distinct functional roles of Akt isoforms for proliferation, survival, migration and EGF-mediated signalling in lung cancer derived disseminated tumor cells." *Cell Signal* 23: 1952-1960.
- Greene H.S., H. E. K. (1964). "The relationship between the dissemination of tumor cells and the distribution of metastases." *Cancer Research*: 799-811.
- Grivennikov, S. I., F. R. Greten and M. Karin (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." *Cell* 140: 883-899.
- Gunasinghe, N. P., A. Wells, E. W. Thompson and H. J. Hugo (2012). "Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer." *Cancer Metastasis Rev* 31: 469-478.
- Guo, W. and F. G. Giancotti (2004). "Integrin signalling during tumour progression." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 816-826.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144: 646-674.
- Ho, T. K., X. Shiwen, D. Abraham, J. Tsui and D. Baker (2012). "Stromal-Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as Potential Target of Therapeutic Angiogenesis in Critical Leg Ischaemia." *Cardiol Res Pract* 2012: 143209.
- Horuk, R. (2001). "Chemokine receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* 12: 313-335.

- Inamori, K., T. Endo, Y. Ide, S. Fujii, J. Gu, K. Honke and N. Taniguchi (2003). "Molecular cloning and characterization of human GnT-IX, a novel beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase that is specifically expressed in the brain." *J Biol Chem* 278: 43102-43109.
- Jones, J., D. Marian, E. Weich, T. Engl, S. Wedel, B. Relja, D. Jonas and R. A. Blaheta (2007). "CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells." *Exp Cell Res* 313: 4051-4065.
- Joyce, J. A. and J. W. Pollard (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." *Nat Rev Cancer* 9: 239-252.
- Kang, Y. and J. Massague (2004). "Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis." *Cell* 118: 277-279.
- Kariya, Y. and J. Gu (2011). "N-glycosylation of ss4 integrin controls the adhesion and motility of keratinocytes." *PLoS One* 6: e27084.
- Karp, G. (2005). *Molekulare Zellbiologie*, Springer.
- Kim, S., M. Bakre, H. Yin and J. A. Varner (2002). "Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A." *J Clin Invest* 110: 933-941.
- Kohler, S., S. Ullrich, U. Richter and U. Schumacher (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." *Br J Cancer* 102: 602-609.
- Kristiansen, G., C. Pilarsky, J. Pervan, B. Sturzebecher, C. Stephan, K. Jung, S. Loening, A. Rosenthal and M. Dietel (2004). "CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer." *Prostate* 58: 183-192.
- Kucia, M., K. Jankowski, R. Reca, M. Wysoczynski, L. Bandura, D. J. Allendorf, J. Zhang, J. Ratajczak and M. Z. Ratajczak (2004). "CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion." *J Mol Histol* 35: 233-245.
- Lange, T., M. Kupfernagel, D. Wicklein, F. Gebauer, H. Maar, K. Brugge, I. Muller, R. Simon, T. Schlomm, G. Sauter and U. Schumacher (2014). "Aberrant presentation of HPA-reactive carbohydrates implies Selectin-independent metastasis formation in human prostate cancer." *Clin Cancer Res* 20: 1791-1802.
- Lange, T., T. R. Samatov, A. G. Tonevitsky and U. Schumacher (2014). "Importance of altered glycoprotein-bound N- and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells." *Carbohydr Res* 389: 39-45.
- Lange, T., S. Ullrich, I. Muller, M. F. Nentwich, K. Stubke, S. Feldhaus, C. Knies, O. J. Hellwinkel, R. L. Vessella, C. Abramjuk, M. Anders, J. Schroder-Schwarz, T. Schlomm, H. Huland, G. Sauter and U. Schumacher (2012). "Human prostate cancer in a clinically relevant xenograft mouse model: identification of beta(1,6)-branched oligosaccharides as a marker of tumor progression." *Clin Cancer Res* 18: 1364-1373.
- Laoui, D., E. Van Overmeire, P. De Baetselier, J. A. Van Ginderachter and G. Raes (2014). "Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression." *Front Immunol* 5: 489.
- Larue, L. and A. Bellacosa (2005). "Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways." *Oncogene* 24: 7443-7454.
- Luo, B. H., C. V. Carman and T. A. Springer (2007). "Structural basis of integrin regulation and signaling." *Annu Rev Immunol* 25: 619-647.
- Makrilia, N., A. Kollias, L. Manolopoulos and K. Syrigos (2009). "Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer." *Cancer Invest* 27: 1023-1037.

Marsico, G., L. Russo, F. Quondamatteo and A. Pandit (2018). "Glycosylation and Integrin Regulation in Cancer." *Trends Cancer* 4: 537-552.

Mercurio, A. M. and I. Rabinovitz (2001). "Towards a mechanistic understanding of tumor invasion--lessons from the alpha6beta 4 integrin." *Semin Cancer Biol* 11: 129-141.

Meredith, J. E., Jr., B. Fazeli and M. A. Schwartz (1993). "The extracellular matrix as a cell survival factor." *Mol Biol Cell* 4: 953-961.

Nelson, R.-B. a. (1989). "Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype." *Science* 245: 718-725.

Ni, H., A. B. Dydensborg, F. E. Herring, N. Basora, D. Gagne, P. H. Vachon and J. F. Beaulieu (2005). "Upregulation of a functional form of the beta4 integrin subunit in colorectal cancers correlates with c-Myc expression." *Oncogene* 24: 6820-6829.

Nievers, M. G., R. Q. Schaapveld and A. Sonnenberg (1999). "Biology and function of hemidesmosomes." *Matrix Biol* 18: 5-17.

Noy, R. and J. W. Pollard (2014). "Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy." *Immunity* 41: 49-61.

Orr, F. W., H. H. Wang, R. M. Lafrenie, S. Scherbarth and D. M. Nance (2000). "Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis." *J Pathol* 190: 310-329.

Pankov, R., E. Cukierman, K. Clark, K. Matsumoto, C. Hahn, B. Poulin and K. M. Yamada (2003). "Specific beta1 integrin site selectively regulates Akt/protein kinase B signaling via local activation of protein phosphatase 2A." *J Biol Chem* 278: 18671-18681.

Paoli, P., E. Giannoni and P. Chiarugi (2013). "Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression." *Biochim Biophys Acta* 1833: 3481-3498.

Porcile, C., A. Bajetto, F. Barbieri, S. Barbero, R. Bonavia, M. Biglieri, P. Pirani, T. Florio and G. Schettini (2005). "Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation." *Exp Cell Res* 308: 241-253.

Porter, C. R., K. Kodama, R. P. Gibbons, R. Correa, Jr., F. K. Chun, P. Perrotte and P. I. Karakiewicz (2006). "25-year prostate cancer control and survival outcomes: a 40-year radical prostatectomy single institution series." *J Urol* 176: 569-574.

Ramos, D. M., M. But, J. Regezi, B. L. Schmidt, A. Atakilit, D. Dang, D. Ellis, R. Jordan and X. Li (2002). "Expression of integrin beta 6 enhances invasive behavior in oral squamous cell carcinoma." *Matrix Biol* 21: 297-307.

Raz, A. and R. Lotan (1987). "Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis." *Cancer Metastasis Rev* 6: 433-452.

Reymond, N., B. B. d'Agua and A. J. Ridley (2013). "Crossing the endothelial barrier during metastasis." *Nat Rev Cancer* 13: 858-870.

Robert-Koch-Institut/Krebsregisterdaten (2013). "Krebs in Deutschland für 2009/2010." 8. Ausgabe.

Scheel, C. and R. A. Weinberg (2012). "Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links." *Semin Cancer Biol* 22: 396-403.

Schelhase, T. u. R. S. P. (2006). "Die Todesursachenstatistik - Methodik und Ergebnisse 2004." *Statistisches Bundesamt - Wirtschaft und Statistik*: 614-631.

Schwankhaus, N., C. Gathmann, D. Wicklein, K. Riecken, U. Schumacher and U. Valentiner (2014). "Cell adhesion molecules in metastatic neuroblastoma models." *Clin Exp Metastasis* 31: 483-496.

- Schwartz, M. A. and S. J. Shattil (2000). "Signaling networks linking integrins and rho family GTPases." *Trends Biochem Sci* 25: 388-391.
- Shamas-Din, A., H. Brahmabhatt, B. Leber and D. W. Andrews (2011). "BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis." *Biochim Biophys Acta* 1813: 508-520.
- Sosa, M. S., A. Avivar-Valderas, P. Bragado, H. C. Wen and J. A. Aguirre-Ghiso (2011). "ERK1/2 and p38alpha/beta signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease." *Clin Cancer Res* 17: 5850-5857.
- Stübke, K., D. Wicklein, L. Herich, U. Schumacher and N. Nehmann (2012). "Selectin-deficiency reduces the number of spontaneous metastases in a xenograft model of human breast cancer." *Cancer Lett* 321: 89-99.
- Stupack, D. G. (2007). "The biology of integrins." *Oncology (Williston Park)* 21: 6-12.
- Stupack, D. G., X. S. Puente, S. Boutsaboualoy, C. M. Storgard and D. A. Cheresh (2001). "Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins." *J Cell Biol* 155: 459-470.
- Szebeni, G. J., C. Vizler, K. Kitajka and L. G. Puskas (2017). "Inflammation and Cancer: Extra- and Intracellular Determinants of Tumor-Associated Macrophages as Tumor Promoters." *Mediators Inflamm* 2017: 9294018.
- Tsai, J. H. and J. Yang (2013). "Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis." *Genes Dev* 27: 2192-2206.
- Turner, G. A. (1982). "Surface properties of the metastatic cell." *Invasion Metastasis* 2: 197-216.
- Valastyan, S. and R. A. Weinberg (2011). "Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms." *Cell* 147: 275-292.
- Vestweber, D. and J. E. Blanks (1999). "Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands." *Physiol Rev* 79: 181-213.
- Windham, T. C., N. U. Parikh, D. R. Siwak, J. M. Summy, D. J. McConkey, A. J. Kraker and G. E. Gallick (2002). "Src activation regulates anoikis in human colon tumor cell lines." *Oncogene* 21: 7797-7807.
- Wirth, M. V., Berges, Richard (seit Aktualisierung 2016). (2016). "Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms." Retrieved 05.04.2018, 2018, from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-022OLI_S3_Prostatakarzinom_2016-12.pdf.
- Yoon, S. O., S. Shin and E. A. Lipscomb (2006). "A novel mechanism for integrin-mediated ras activation in breast carcinoma cells: the alpha6beta4 integrin regulates ErbB2 translation and transactivates epidermal growth factor receptor/ErbB2 signaling." *Cancer Res* 66: 2732-2739.
- Zhan, M., H. Zhao and Z. C. Han (2004). "Signalling mechanisms of anoikis." *Histol Histopathol* 19: 973-983.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der metastatischen Kaskade als mehrschrittiger Prozess..	8
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT).....	9
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Leukozyten-/Tumorzell-Adhäsionskaskade.....	10
Abbildung 4:	Die Selektinfamilie. Schematische Darstellung der Struktur der Selektinmoleküle und ihrer Liganden.	11
Abbildung 5:	Aufbau und Signaling-Funktion der Integrine als Brücken zwischen RGD-Proteinen und Zytoskelett.	13
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Integrin-signalings	14
Abbildung 7:	Durchflusszytometrische Analyse der ITGB4-Expression in Xenograft-Primärtumoren.	26
Abbildung 8:	Immunhistochemischer Nachweis der ITGB4 Expression.....	27
Abbildung 9:	Immunhistochemischer Nachweis der Ki67 Expression in Xenografttumor– Gewebeschnitten.	27
Abbildung 10:	Nachweis und Quantifizierung apoptotischer Zellkerne nach Feulgen.	28
Abbildung 11:	Immunhistochemischer Nachweis pH2AX-positiver Zellen als Nachweis von Apoptose.	29
Abbildung 12:	Immunhistologischer Nachweis des pro-apoptotischen Bcl-2-Proteins Bim.	29
Abbildung 13:	Intrazellulärer Nachweis von pH2AX in PC3-shControl (dunkelgrün) vs. PC3-sh ITGB4 Zellen (hellgrün) mittels Durchflusszytometrie.....	30
Abbildung 14:	Proteinexpression im Western Blot.....	31
Abbildung 15:	<i>qPCR profiler array</i> für die Expression von Chemokinrezeptoren.....	32
Abbildung 16:	Immunhistochemischer Nachweis von SDF-1 α in Xenografttumoren.....	32
Abbildung 17:	Proteinkonzentration von SDF-1 α in Xenografttumoren und in kultivierten Tumorzellen.	33
Abbildung 18:	XTT-Assay subkonfluent kultivierter Zellen.	34
Abbildung 19:	Lichtmikroskopische Aufnahme und zusammenfassende Darstellung der Proliferationsassays nach initial dünner Aussaat.	34
Abbildung 20:	Kolonienformation von Kontroll- und ITGB4-KD-Zellen in Soft-Agar unter Zufuhr von rmSDF-1 α	35
Abbildung 21:	Kolonienformation von Kontroll- und ITGB4-KD-Zellen in Soft Agar unter Zufuhr von konditionierten Medien der Kontroll- (shControl-CM) bzw. ITGB4-KD-Zellen (shITGB4-CM).....	35
Abbildung 22:	Kolonienformation von ITGB4-KD-Zellen in Soft Agar unter Zufuhr von Standardkulturmedium (RPMI-1640), konditionierten Medien der Kontroll- (shControl-CM) oder ITGB4-KD-Zellen (shITGB4-CM) bzw. neutralisierendem SDF-1 α -Antikörper.	36
Abbildung 23	Western Blot Analyse intrazellulärer Signalmoleküle aus Proteinlysaten der Xenografttumoren.	37
Abbildung 24:	Upstream-Analyse des PamChip® Tyrosin Kinase Array.	37

11. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	<i>IHC Antikörper</i>	18
<i>Tabelle 2:</i>	<i>NP-40 Lysepuffer (10ml)</i>	22
<i>Tabelle 3:</i>	<i>RIPA-Puffer</i>	22
<i>Tabelle 4:</i>	<i>Primärantikörper für WB</i>	24

12. Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer Person allein, deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Besonders herzlich danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Tobias Lange für das Überlassen der Thematik dieser Doktorarbeit und seine außergewöhnlich gute Betreuung, seine unendliche Geduld, sein immer offenes Ohr und stets freundschaftliche Unterstützung. Unsere zahlreichen Gespräche auf intellektueller sowie persönlicher Ebene, die so manche thematische Wende in meine Dissertation brachten, werden mir immer als bereichernder und motivierender Austausch in Erinnerung bleiben.

Ebenfalls besonders danken möchte ich Prof. Dr. med. Udo Schumacher, Direktor des Instituts für Anatomie und experimentelle Morphologie der Universität Hamburg für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anzufertigen, für seine freundschaftliche Unterstützung und seine für mich immer offene Tür. Er hat mir in jedem Moment Mut gemacht und mir sowohl mit fachlichem als auch moralischem Bestand geholfen, diese wissenschaftliche Arbeit zu vollenden.

Prof. Dr. Manfred Jücker, Leiter des Instituts für Biochemie und Signaltransduktion der Universität Hamburg danke ich für die Kooperation und die Möglichkeit, einige meiner wichtige Experimente in seinem Institut durchführen zu können. Ebenso gebührt mein Dank Dr. med. Florian Ewald für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung bei der Planung und Durchführung einiger Experimente und die sehr lehrreichen und kurzweiligen Stunden im Labor.

Des Weiteren bin ich Dr. M. Brehm aus der Klinik für pädiatrische Hämatonkologie der Universität Hamburg für ihre Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Auch möchte ich Dr. H. Bohnenberger, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen, für seine Kooperation und die Durchführung des PamChip® *KinaseArray*, der in dieser Arbeit beschrieben ist, danken.

Für die Unterstützung bei den Laborarbeiten, die kooperative Arbeitsatmosphäre sowie tolle Zeit, die wir im Labor miteinander verbracht haben, bedanke ich mich herzlich bei Hanna Maar, Renate Gehrke, Maike Märker und Jennifer Schröder-Schwarz sowie allen weiteren, hier nicht namentlich genannten Beteiligten dieser Studie.

Der Sbb - Stiftung Begabtenförderung berufliche Bildung danke ich für das Stipendium zur Förderung meines Studiums.

Tief verbunden bin ich meinem Freund Peter für seine Begleitung, Stärkung, Motivation und sein stets offenes Ohr für all meine Gedanken, sowie meiner Freundin Petra für ihren moralischen Beistand und menschlichen Halt. Für eure persönliche Bindung, Unterstützung und dauerhafte Freundschaft gebührt euch hier mein vollster Dank.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nehmen mein Mann und meine Tochter ein, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben, ihnen gebührt der größte Respekt und mein außerordentlicher Dank. Die vergangenen Jahre waren in jeder Hinsicht aufreibend und ohne ihre liebevolle Fürsorge, Geduld, Hilfe und emotionale sowie technische Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zu dem Werk geworden, welches sie heute ist.

Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft. Von ganzem Herzen Danke!!!

Schließlich möchte ich Klaus und Penny Dahncke danken, dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben, mich während der gesamten Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet, mir emotionale Unterstützung gegeben und mir zur Seite gestanden haben.

Euch ist diese Arbeit gewidmet.

13. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

14. 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:

