

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle Anatomie und Morphologie

Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Der Einfluss von Bortezomib auf die Adhäsion von Tumorzellen an das Gefäßendothel und ihre spontane pulmonale Metastasierung im Xenograftmodell

Dissertation

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

vorgelegt von:

Carolin Pahlow

aus Eutin

Hamburg 2021

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 25.03.2022.

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Tobias Lange

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Die Invasions-Metastasierungs-Kaskade epithelialer Tumoren.....	9
1.2 Die Tumor-Endothel-Interaktion als Schlüsselschritt der Metastasierung.....	11
1.3 Das humane Kolonkarzinom und das humane Osteosarkom.....	12
1.4 Die Zytokin-induzierte Expression von E-Selektin am Gefäßendothel.....	13
1.5 Die proteasomale Hemmung durch Bortezomib.....	14
1.6 Der anti-adhäsive und anti-metastatische Effekt von Bortezomib auf solide Tumorerkrankungen.....	16
2 Arbeitshypothese und Fragestellung.....	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Geräte	19
3.1.2 Verbrauchsmaterial	20
3.1.3 Chemikalien	22
3.1.4 Lösungen	25
3.1.5 Zell- und Mauslinien	25
3.1.6 Software.....	26
3.1.7 Medikamente.....	27
3.2 Methoden	28
3.2.1 Zellkultur.....	28
3.2.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer.....	29
3.2.3 Kryokonservierung und Rekultivierung der Zellen.....	29
3.2.4 Durchflusszytometrie.....	30
3.2.5 Analyse der dynamischen Adhäsion von Tumorzellen unter laminaren Strömungsbedingungen	34

3.2.6	Effekt der systemischen Bortezomib-Therapie auf die spontane Lungenmetastasierung solider humaner Tumore im Xenograftmodell	37
3.2.7	Isolation humaner DNA aus murinem Lungengewebe	39
3.2.8	Konzentrationsbestimmung der DNA	41
3.2.9	<i>Alu</i> -PCR (<i>quantitative realtime PCR</i> für human-spezifische Genomsequenzen).....	41
3.2.10	Statistische Auswertung.....	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Bestimmung der Expression endothelialer Zelladhäsionsmoleküle und die Beeinflussbarkeit durch Bortezomib	44
4.2	Abhängigkeit der Adhäsion von Tumorzellen am Endothel von E-Selektin, ICAM-1 sowie VCAM-1 und die Beeinflussbarkeit durch Bortezomib	45
4.3	Bestimmung der Expression der kanonischen Selektinliganden sialyl-Lewis A und X auf humanen Tumorzellen.....	47
4.4	Unterschiede im statischen und dynamischen Bindungsverhalten von HT29- und HOS-Zellen an E-Selektin.....	47
4.5	Stabilität endothelialer Adhäsionen von HT29- und HOS-Zellen.....	49
4.6	Die Relevanz von VCAM-1 für die endotheliale Adhäsion von HT29 und HOS.....	49
4.7	Anti-metastatischer Effekt von Bortezomib <i>in vivo</i>	50
5	Diskussion	53
5.1	Die Rolle der kanonischen E-Selektinliganden sialyl-Lewis A und sialyl-Lewis X.....	54
5.2	Verringerung der Fernmetastasierung durch Bortezomib im Xenograftmodell	60
6	Zusammenfassung	62
6	Abstract.....	63
7	Literaturverzeichnis.....	64
8	Danksagung.....	69
9	Lebenslauf	71
10	Eidesstattliche Versicherung.....	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die metastatische Kaskade.....	11
Abbildung 2	Der NF- κ B-Pfad	15
Abbildung 3	Unterbrechung des NF- κ B-Pfades durch proteasomale Hemmung	16
Abbildung 4	Zählraster der Neubauer-Zählkammer.....	29
Abbildung 5	Aufbau des Adhäsionsassays unter Flussbedingungen.....	35
Abbildung 6	Festes Adhärenzen.....	35
Abbildung 7	Rollendes Adhärenzen.....	36
Abbildung 8	<i>Tethering</i>	36
Abbildung 9	Nachweis der Expression von E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin auf der Zelloberfläche von HUVEC und deren Modulation durch BZM und IL-1 α	44
Abbildung 10	Feste Adhäsion von Zellen der Zelllinien HT29 und HOS an Endothelzellen.	46
Abbildung 11	Validierung der Bedeutung von E-Selektin für die IL-1 α -vermittelte feste Tumorzelladhäsion am Endothel unter laminaren Strömungsbedingungen.	46
Abbildung 12	Expression von sialyl-Lewis A und X auf HT29- und HOS-Zellen.	47
Abbildung 13	Bindung von rekombinantem humanem E-Selektin an Tumorzellen unter statischen Bedingungen.	48
Abbildung 14	Differentielle Adhäsion von Tumorzellen unter laminaren Strömungsbedingungen an immobilisiertes, rekombinantes humanes E-Selektin.....	48
Abbildung 15	Stabilität der Adhäsion von HT29- und HOS-Zellen auf endothelialen Monolayern.	49
Abbildung 16	Bedeutung von VCAM-1 für die Adhäsion der Tumorzellen auf IL-1 α -stimuliertem Endothel.	50
Abbildung 17	Versuchsaufbau des spontan metastasierenden Xenograft-Mausmodells.....	51
Abbildung 18	Effekt von BZM auf die Tumorstadiumsdauer und das Tumorgewicht im subkutanen HOS- bzw. HT29-Xenograftmodell.....	51
Abbildung 19	Gehalt an humaner DNA in murinen Lungen nach s.c. Wachstum von Xenograft-Primärtumoren.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Liste der verwendeten Geräte	19
Tabelle 2	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 3	Liste der verwendeten Chemikalien	22
Tabelle 4	Liste der verwendeten Lösungen	25
Tabelle 5	Liste der verwendeten Zell- und Mauslinien.....	25
Tabelle 6	Liste der verwendeten Software.....	26
Tabelle 7	Liste der verwendeten Medikamente	27
Tabelle 8	Zuordnung Antikörper/Isotypkontrolle	31
Tabelle 9	Antikörper und Isotypkontrolle für die Farbmarkierung von sialyl-Lewis A und X	32
Tabelle 10	Übersicht der Versuchsgruppen.....	38
Tabelle 11	Zusammensetzung LC-480- <i>Master-Mix</i> pro <i>well</i>	41
Tabelle 12	Standardreihe aus humaner Tumorzell-DNA, vermischt mit Lungen-DNA gesunder Kontrollmäuse.....	42
Tabelle 13	<i>LightCycler</i> -PCR-Protokoll für die qRT- <i>Alu</i> -PCR	43

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BZM	Bortezomib
CAM	<i>cell adhesion molecule</i> – Zelladhäsionsmolekül
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHE	Schweiz
CTC	<i>circulating tumor cells</i> – zirkulierende Tumorzellen
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DEU	Deutschland
DNA	<i>desoxyribonuclein acid</i> – Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> – Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung
DTC	<i>disseminated tumor cells</i> – freigesetzte Tumorzellen
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i> – extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epithelial-mesenchymale-Transition
ESL-1	E-Selektinligand 1
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> – Fetales Kälberserum
FDA	<i>United States food and drug administration</i>
GBR	<i>United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland</i>
HOS	Humanes Osteosarkom
HPMEC	<i>human pulmonary microvascular endothelial cells</i> – humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> – humane Umbilikalvenen-Endothelzellen

i. p.	intraperitoneal
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
I κ B	Inhibierender Faktor κ B
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1 α	Interleukin 1 α
IVC	<i>individually ventilated cages</i> – einzelbelüftete Käfige
KG	Körpergewicht
KRK	Kolorektales Karzinom
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
MM	Master-Mix
NF- κ B	<i>nuclear factor ‘κ-light-chain-enhancer’ of activated B-cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> – phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> – Polymerasekettenreaktion
PSGL-1	P-Selektin Glykoproteinligand 1
rhIL-1 α	rekombinantes humanes Interleukin 1 α
s. c.	subkutan
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
sLeA	sialyl-Lewis A
sLeX	sialyl-Lewis X
TNF α	Tumornekrosefaktor α
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>

1 Einleitung

Maligne Tumorerkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit (Ruhr Universität Bochum 2021). In der globalen Statistik der Todesursachen findet sich Krebs sogar auf Platz zwei (Reboux 2018). Lokal begrenzte Primärtumore können mittels operativer Resektion und unterstützender Therapie häufig gut behandelt werden. Das metastatische Geschehen hingegen bedeutet eine systemische Beeinträchtigung des Patienten und eine solche Entwicklung ist allermeist unheilbar, da die metastasierenden Tumorzellen durch derzeit verfügbare therapeutische Mittel nicht umfassend behandelt werden können (Valastyan und Weinberg 2011). So erklärt sich auch, dass ungefähr 90 % der Krebs-Todesursachen in der Fernmetastasierung begründet liegen (Lambert et al. 2017).

Die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen und daraus resultierend neue therapeutische Optionen zu entwickeln, ist von höchstem Interesse für die translationale onkologische Forschung.

1.1 Die Invasions-Metastasierungs-Kaskade epithelialer Tumoren

Bereits 1889 wurde durch Stephen Paget die sogenannte *seed-and-soil*-Theorie formuliert (Paget 1989), die bis heute Bestand hat. Sie besagt, dass für eine Metastasierung sowohl das Vorhandensein eines Keims (*seed* – vom Primärtumor abgelöste Tumorzellen) als auch ein fruchtbarer Boden (*soil* – empfängliches Gewebe an anderem Ort) erforderlich sind und beides durch den Tumor selbst verursacht oder begünstigt wird (Fidler 2003).

Heutigen Erkenntnissen folgend, muss für eine erfolgreiche Metastasierung eine komplexe Abfolge zellbiologischer Vorgänge eingehalten werden, die im Folgenden am Beispiel von Karzinomzellen (also von epithelialen Zellen abgeleiteten Tumoren) beschrieben und illustriert wird (Invasions-Metastasen-Kaskade) (Valastyan und Weinberg 2011):

Der erste Schritt der metastatischen Kaskade ist die lokale *Invasion* in der direkten Umgebung des Primarius (Gómez-Cuadrado et al. 2017). Dieses bedeutet den Übergang von einer epithelialen in eine mesenchymale Umgebung. Dafür ist ein

Einleitung

Anpassungsprozess der Zelle auf molekularer Ebene erforderlich, der als epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet wird. Durch die Auflösung interzellulärer Bindungen und die Umstrukturierung des Zytoskeletts gewinnen die Zellen die Fähigkeit zur Migration durch das an das Epithel angrenzende mesenchymale Gewebe. In dieser Form ist es den Zellen überdies möglich, in ein Kreislaufsystem einzudringen, wobei im Folgenden auf den Blutkreislauf und nicht das Lymphsystem eingegangen wird (Schumacher und Stürken 2016). Dieser Schritt, der notwendig ist, um eine Verbreitung an Sekundärherde zu ermöglichen, wird *Intravasation* genannt. Nach der Intravasation dient das Gefäßsystem als Transportnetzwerk in die unterschiedlichsten Körperregionen. Daher werden die im Blutstrom befindlichen Tumorzellen als zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells, CTCs*) bezeichnet (Gómez-Cuadrado et al. 2017). *CTCs* sehen sich allerdings mit einer Vielzahl von „Bedrohungen“ konfrontiert. Diese umfassen unter anderem physische Beschädigung durch hämodynamische Scherbelastung, Vernichtung durch das Immunsystem (Gupta und Massagué 2006) und die Anoikis („Heimatlosigkeit“, die durch Herauslösung aus der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix, ECM*) verursachte Apoptose). Es wird angenommen, dass die EMT gleichzeitig zu einer verbesserten Fähigkeit der Tumorzellen, diese Anoikis zu supprimieren, beiträgt (Frisch et al. 2013).

Wenn die *CTCs* dann über den Blutstrom an ihrem Zielort angekommen sind, müssen sie an die dortigen Endothelzellen anhaften, um anschließend ins jeweilige Organ überzutreten (Schumacher und Stürken 2016). Ohne eine erfolgreiche, ausreichend stabile Anhaftung als Schlüsselschritt der Metastasierungskaskade, kann der sich anschließende Teilschritt der *Extravasation* nicht stattfinden (St Hill 2011). Unter Extravasation versteht man den Prozess des Übertritts der *CTCs* aus dem Gefäßsystem in das Zielgewebe (Gupta und Massagué 2006). Die Endothelzellen bilden dabei eine Barriere, die von den *CTCs* überwunden werden muss. Damit dieses überhaupt gelingt, betreiben die *CTCs* molekulare Mimikry: Sie verhalten sich offenbar ganz ähnlich wie Leukozyten im Rahmen von Entzündungen, um an das Endothel andocken und anschließend ins Bindegewebe übertreten zu können (Abbildung 1). Die Anheftung führt dazu, dass die Endothelzellen die Zellkontakte untereinander aufheben, so dass die *CTCs* passieren können. Erst einmal im Zielorgan eingewandert, wird der mesenchymale Phänotyp nicht mehr „benötigt“ und der umgekehrte Prozess, die mesenchymal-

Einleitung

epitheliale-Transition (MET), wird eingeleitet. So erreicht die Tumorzelle einen Zustand ähnlich dem ursprünglichen und es kann sich ein Epithelzellverband im Zielorgan ausbilden (Schumacher und Stürken 2016). Dort können die Tumorzellen als disseminierte Tumorzellen (*disseminated tumor cells, DTCs*) einzeln oder als Mikrometastasen vorliegen und für Jahre oder gar Jahrzehnte bestehen (Gómez-Cuadrado et al. 2017). Erst mit dem Prozess der *Kolonisation*, der möglicherweise die MET erfordert, beginnt das Wachstum aus *DTCs* zu klinisch relevanten Makrometastasen (Lambert et al. 2017).

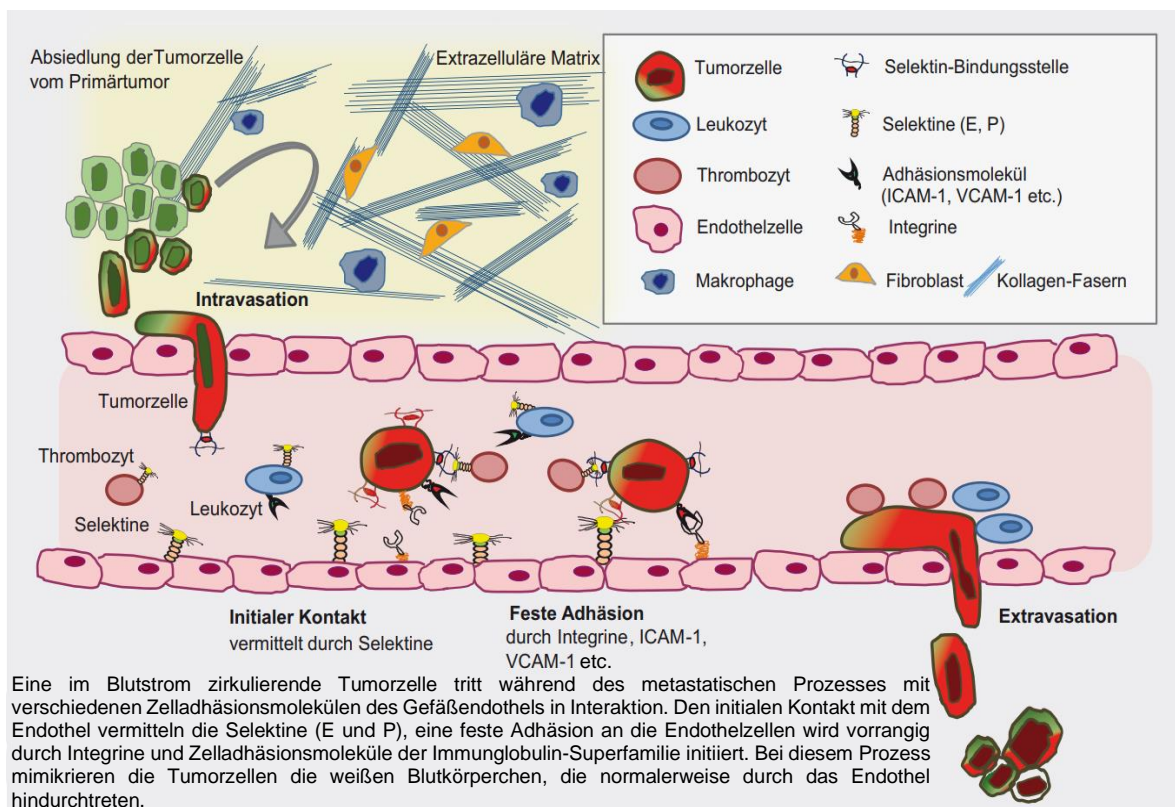


Abbildung 1 Die metastatische Kaskade

Abbildung nach Stürken in (Schumacher und Stürken 2016), S. 351.

1.2 Die Tumor-Endothel-Interaktion als Schlüsselschritt der Metastasierung

Wie oben bereits angedeutet, werden endotheliale Zelladhäsionsmoleküle auf der luminalen Oberfläche aktivierter Endothelzellen exprimiert und sind bei der Bindung von Leukozyten während einer Entzündung und, wie neuere Hinweise ergeben haben, bei der Bindung von *CTCs* an Gefäßendothel während der Metastasierung von entscheidender Bedeutung. Die Zelladhäsionsmoleküle können in zwei

Einleitung

Gruppen eingeteilt werden: die endothelialen Selektine (E- und P-Selektin) sowie die Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (z. B. *intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1 und *vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1) (Alexiou et al. 2001, Schumacher und Stürken 2016). Die Selektine ermöglichen hierbei den initialen Zellkontakt von Leukozyten bzw. CTCs am vaskulären Endothel, die Integrinrezeptoren ICAM-1 und VCAM-1 hingegen die feste Adhäsion der Leukozyten/CTCs an das Endothel (Schumacher und Stürken 2016, St Hill 2011). Tumorzellen können verschiedene, jeweils Kohlenhydratstrukturen tragende Liganden für die Bindung an E-Selektin exprimieren. Spezifisch relevant wirken sich hier solche Liganden aus, die sialyl-Lewis-Strukturen tragen (Alexiou et al. 2001), die sich in sialyl-Lewis A (sLeA, entspricht dem Tumormarker CA 19-9) und sialyl-Lewis X (sLeX, entspricht CD15s) differenzieren lassen (Kannagi 2007, St Hill 2011). Erhöhte Spiegel der Kohlenhydratresiduen sLeA und sLeX in humanen Tumorgeschehen gehen mit einer schlechten Prognose einher (Reymond et al. 2013). Getragen werden können sie u. a. von Glykoproteinen oder Glykolipiden (Starzonek et al. 2020). Beispiele von Glykoproteinen in dieser Funktion sind PSGL-1, CD24, CD44, LGALS3BP u. a. (Reymond et al. 2013). Überdies könnten weitere Zuckerreste, denen die sLeA- und sLeX-Strukturen fehlen, zur Bindung an E-Selektin befähigt sein (Starzonek et al. 2020).

Es konnte im Xenograftmodell bereits nachgewiesen werden, dass im Zuge einer genetischen Ausschaltung von E- und P-Selektin bei Mäusen die Metastasierung unterschiedlicher Tumorzelltypen drastisch reduziert werden kann (Gebauer et al. 2013, Heidemann et al. 2014, Köhler et al. 2010). Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese formuliert, dass eine pharmakologische Hemmung der Expression von E-Selektin eine Reduktion der Metastasierung mit sich bringen müsste.

1.3 Das humane Kolonkarzinom und das humane Osteosarkom

Für die vorliegende Arbeit wurden Zelllinien solcher solider humaner Tumoren gewählt, die überhaupt in der Lage sind, unter dynamischen Flussbedingungen an Endothelzellen zu adhären, sofern man diese vorab mit Zytokin stimuliert. Als Beispiele wurden zunächst humane Kolonkarzinomzellen der Linie HT29 (Fogh und Trempe 1975) und humane Osteosarkomzellen der Linie HOS ausgewählt

Einleitung

(McAllister et al. 1971). Diese Tumorzelllinien sind durch ihren Ursprung grundsätzlich sehr verschieden, da es sich um epitheliale (HT29) beziehungsweise nicht-epitheliale (HOS) Zellen handelte. Daher waren sie möglicherweise geeignet, grundsätzliche Unterschiede im Adhäsionsverhalten an Endothelzellen zu untersuchen (unpublizierte Vorarbeiten der Arbeitsgruppe).

„Das Kolorektale Karzinom (KRK) ist mit etwa 64.000 Neuerkrankungen und ca. 26.000 Todesfällen pro Jahr in Deutschland einer der häufigsten malignen Tumoren“ (AWMF et al. 2019). Jeder 20. Deutsche ohne Risikofaktoren (d. h. ohne familiäre Vorbelastung) erkrankt im Laufe seines Lebens an Darmkrebs. In den allermeisten Fällen handelt es sich beim KRK um ein Adenokarzinom (Müller 2014/15), einen vom Drüsenepithel ausgehenden Tumor (Krams 2019). Das KRK metastasiert sowohl lymphogen als auch hämatogen – je nach Sitz und Lage des Primärtumors zum Beispiel in die Leber oder Lunge (Müller 2014/15).

Das Osteosarkom ist die am häufigsten diagnostizierte primäre Malignität des Knochens (Dorfman und Czerniak 1995). Meist in den Metaphysen langer Röhrenknochen lokalisiert (Müller 2014/15), vermag es, in die allermeisten Regionen des Körpers zu streuen. Den bei weitem dominierenden Anteil der Metastasen findet man allerdings in der Lunge. Über 90 % der mit einem metastasierten Osteosarkom der langen Röhrenknochen versterbenden Patienten weisen pulmonale Metastasen auf (Jeffrey et al. 1975). Da sich Sarkome aus mesenchymalem Gewebe entwickeln, handelt es sich um nicht-epitheliale Tumore (Krams 2019).

1.4 Die Zytokin-induzierte Expression von E-Selektin am Gefäßendothel

In Bezug auf Krebs gibt es Hinweise, dass im Gegensatz zu einem ausschließlich lokalen Geschehen vielmehr eine durch den Primarius verursachte systemische Reaktion hervorgerufen wird. Ein solcher Prozess kann die Sekretion von Zytokinen sein. Diese bewirken neben vielen weiteren Faktoren in vom Primärtumor entfernt liegendem Gewebe die Bildung einer sogenannten prämetastatischen Nische,

Einleitung

welche die Metastasenbildung ermöglicht oder zumindest erleichtert (McAllister und Weinberg 2014).

So konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von E-Selektin auf dem Gefäßendothel am Ziel-(Metastasen-)Ort durch aus dem Primärtumor freigesetzten Faktoren schon in der prämetastatischen Phase induziert wird (Hiratsuka et al. 2011). Dies erscheint insbesondere für die pulmonale Metastasierung relevant, da die Expression von E-Selektin in der Lunge durch pro-inflammatorische Zytokine induziert wird (Jiang et al. 2014). Speziell für prämetastatisches Lungengewebe wurde gezeigt, dass sich in Bereichen erhöhter E-Selektin-Expression verstärkt metastasierende Tumorzellen finden (Hiratsuka et al. 2011).

In vivo zeigt sich für unterschiedliche Krebszellarten in verschiedenen Tumormodellen eine erhöhte Metastasierung, wenn Zytokine wie TNF α oder IL-1 injiziert werden (Chirivi et al. 1993, Egberts et al. 2008). IL-1-Rezeptor-Antagonisten hingegen führten zu einer signifikanten Reduktion der Lungenmetastasen (Chirivi et al. 1993). Erhöhte Serumspiegel von TNF α oder IL-1 hingegen korrelieren mit einer unvorteilhaften Prognose bei Krebspatienten (Lewis et al. 2006, Michalaki et al. 2004).

1.5 Die proteasomale Hemmung durch Bortezomib

Proteasome sind Proteinkomplexe, die frei im Zytosol vorkommen und dem Abbau nicht mehr benötigter Proteine dienen. Die Bestandteile des 26S-Proteasoms sind zwei regulatorische 19S-Cap-Komplexe und ein zentraler katalytischer 20S-Kernkomplex. Fast alle der abzubauenen Proteine werden durch das Proteasom anhand von angehängten Polyubiquitininketten als Substrat erkannt (Hauser 2008). In malignen Zellen ist die Proteasenaktivität erhöht, was eine Grundlage des ungehinderten Tumorwachstums darstellt. Eine Proteasomen-Hemmung würde bedeuten, dass die Zelle wegen der Überfüllung durch nicht mehr benötigte und fehlerhafte Proteine in den Zelltod getrieben würde (Vetter 2004).

Das oben aufgeführte Zytokin IL-1 sowie auch TNF α bewirken die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 am Gefäßendothel mittels des NF- κ B-Pfades (Read et al. 1995). Nach Bindung der Zytokine an ihre Rezeptoren auf Endothelzellen erfolgt eine Phosphorylierung und Ubiquitinierung von I κ B, einer unterdrückenden Komponente des NF- κ B-Komplex. Aufgrund der

Einleitung

Ubiquitinierung wird das I κ B von diesem Komplex innerhalb des Proteasoms abgespalten. Das auf diese Weise aktivierte NF- κ B tritt in den Zellkern über und aktiviert dort unterschiedliche Gene (Gilmore 2006), bspw. die des E-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1 (Abbildung 2).

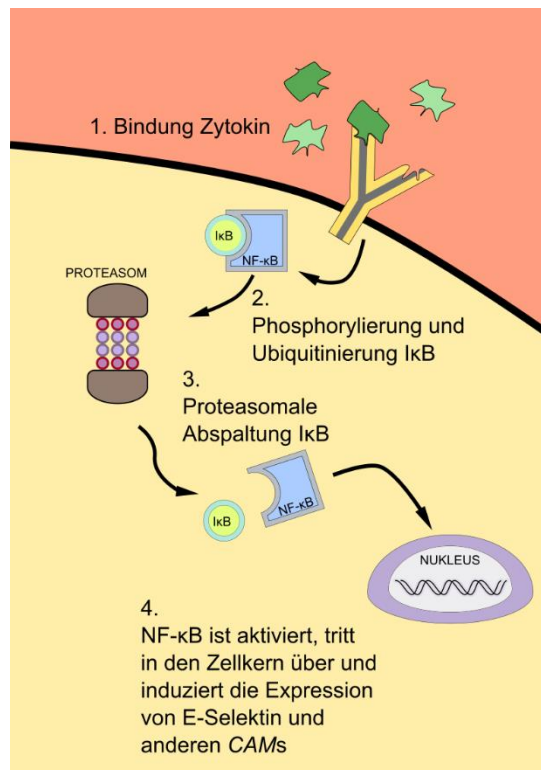


Abbildung 2 Der NF- κ B-Pfad

Abbildung nach (Gilmore 2006), S.6682 und (Paramore und Frantz 2003), S. 611-612.

Dementsprechend wirkt eine chemische Proteasom-Hemmung der Zytokinvermittelten Induktion von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in Endothelzellen entgegen und führt in vitro zu einer verringerten Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel (Read et al. 1995).

Der erste von der *United States food and drug administration* (FDA) zugelassene Proteasom-Inhibitor war Bortezomib (BZM, Velcade®). Seine Zulassung gilt für die Behandlung des Multiplen Myeloms, eines malignen B-Zell-Tumors, der nach dem Non-Hodgkin-Lymphom die zweithäufigste hämatologische Krebsform darstellt (Paramore und Frantz 2003). BZM zeichnet sich durch seine anti-proliferativen, pro-apoptischen und anti-angiogenen Effekte aus (Sunwoo et al. 2001).

BZM inhibiert reversibel das 26S-Proteasom. Ein entscheidender Faktor in der Verwendung von BZM stellt die Fähigkeit, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors

Einleitung

NF- κ B zu verhindern, das (Abbildung 3), welches wiederum wichtig für die Pathogenese von inflammatorischen und neoplastischen Erkrankungen ist (Paramore und Frantz 2003).

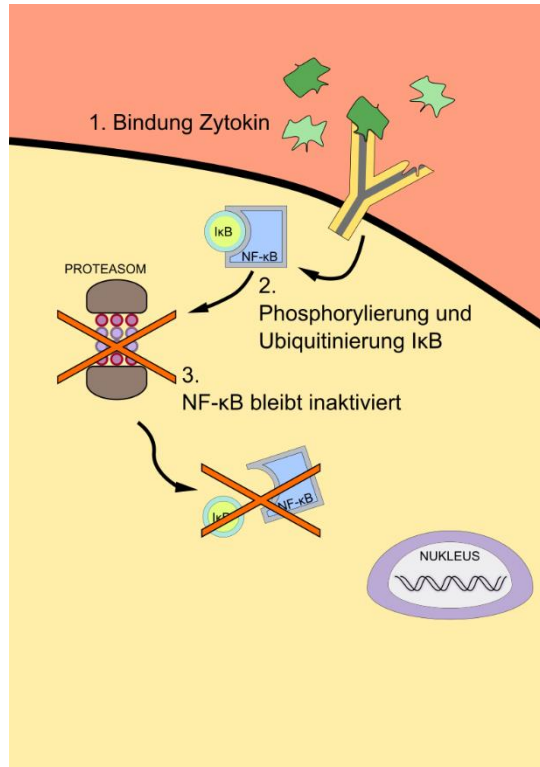


Abbildung 3 Unterbrechung des NF- κ B-Pfades durch proteasomale Hemmung

Abbildung nach (Gilmore 2006), S. 6682 und (Paramore und Frantz 2003), S. 611-612.

Ein für die Therapie mit Proteasom-Inhibitoren wichtiger Umstand ist, dass maligne Tumorzellen empfindlicher auf die Proteasom-Hemmung reagieren als normale Zellen. Besonders am Einsatz von BZM ist, dass eine basale Proteasom-Aktivität erhalten bleibt, da es das Proteasom nur zu 80 % hemmt. Normale Zellen werden so in ihrer Funktionsfähigkeit nicht beeinträchtigt, maligne Zellen allerdings gehen gezielt in der Apoptose unter (Vetter 2004).

1.6 Der anti-adhäsive und anti-metastatische Effekt von Bortezomib auf solide Tumorerkrankungen

Den Ausführungen folgend sollte ein Proteasom-Hemmer wie BZM auch die Zytokin-vermittelte Induktion von E-Selektin und anderen CAMs reduzieren. Die daraus folgende Hypothese besagt, dass BZM möglicherweise eine anti-adhäsive

Einleitung

und demnach auch anti-metastatische Wirkung auf humane solide Tumoren haben könnte. Eine solche Wirkung wäre besonders hilfreich während temporär vorherrschender Episoden erhöhter *CTC*- und Zytokinausschüttungen, wie sie beispielsweise während medizinischer Interventionen wie Biopsien und chirurgischen Eingriffen bei Patienten mit soliden Tumoren auftreten (Bosch et al. 2003, Mathenge et al. 2014, Weitz et al. 1998, Yamaguchi et al. 2000, Ziprin et al. 2003).

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Da der therapeutische Erfolg bei bereits metastasierten Tumorerkrankungen häufig enttäuschend ist, konzentriert sich die vorliegende Arbeit darauf, den Metastasierungsprozess besser zu verstehen, um ihn letztlich beeinflussen zu können.

Als lohnendes Ziel erscheint die Bindung zwischen Endothel und den Tumorzell-Liganden. Deren Vielfalt hingegen legt nahe, die Expression der überschaubaren Anzahl der Selektine und Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules, CAMs*) auf dem Endothel genauer zu untersuchen, sie zu beeinflussen und dadurch die Anhaftung von zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells, CTCs*) zu beeinträchtigen. Dies könnte die Extravasation behindern oder gar unterbinden, um schließlich die Metastasierung zu verringern.

Aus dieser Überlegung entspringt die Hypothese, dass der seit vielen Jahren zugelassene Proteasom-Inhibitor Bortezomib (BZM) die metastatische Kaskade günstig beeinflussen könnte. BZM reguliert die Expression einiger Bindungsmoleküle herab. Die Anhaftung von CTCs an Endothel wird verringert. Am konkreten Beispiel zweier Krebszelllinien, namentlich HT29-Kolonkarzinomzellen und Zellen des humanen Osteosarkoms (HOS) soll dieser Ablauf quantitativ untersucht werden. Für eine erfolgreiche Bindung spielt endothelseitig vor allem E-Selektin eine Rolle; darüber hinaus sind z. B. auch ICAM-1 und VCAM-1 relevant. Für ein tiefergehendes Verständnis stellen sich u. a. folgende Fragen:

1. In welchem Ausmaß lässt sich durch den Einfluss von BZM die Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf humanen Endothelzellen reduzieren?
2. Kann folglich das Adhäsionsverhalten der Krebszellen an Endothelzellen unter laminaren Strömungsbedingungen durch die Gabe von BZM reduziert werden?
3. Können die *in vitro* beobachteten Zusammenhänge auf ein Experiment *in vivo* übertragen werden? Reduziert eine regelmäßige BZM-Gabe also die spontane pulmonale Metastasierung der gewählten Zelllinien im subkutanen Xenograftmodell?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 1 Liste der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Produktname/Produkt- nummer	Hersteller
Inkubator	HERAcell®	Heraeus Holding GmbH (Hanau, DEU)
Lichtmikroskop	Primovert	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, DEU)
Neubauer-Zählkammer	–	LO – Laboroptik Ltd (Lancing, GBR)
Zentrifuge	Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, DEU)
Wasserbad	–	GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, DEU)
<i>Flouescense-activated- cell-sorter: FACS-Gerät</i>	<i>CyFlowCube 8 Cytometer</i>	Sysmex Partec GmbH (Görlitz, DEU)
Mikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss AG (Oberkochen, DEU)
Vortexgerät	<i>MS1 Minishaker</i>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, DEU)
Kugelmühle	<i>TissueLyser II</i>	QIAGEN GmbH, (Hilden, DEU)
Thermoblock	–	HLC (Ditabis AG) (Pforzheim, DEU)

Material und Methoden

Laborwaage	PJ 3000	Mettler-Toledo GmbH (Greifensee, CHE)
Zentrifuge	<i>Pico 17 Thermo Scientific</i>	Heraeus Holding GmbH (Hanau, DEU); Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)
Zentrifuge	<i>PerfectSpin P</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, DEU)
Spektralphotometer	<i>NanoDrop™</i> - Spektralphotometer	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, DEU)
Kühlblock	–	Eppendorf AG (Hamburg, DEU)
<i>LightCycler</i>	<i>LightCycler 480.15</i>	Roche Deutschland Holding GmbH (Mannheim, DEU)
Perfusorpumpe/Spritzenpumpe	KDS-100-CE	KD Scientific Inc. (Holliston, USA)
<i>Cool Cell freezing container</i>	CLS 432002-1ae	Corning Inc. (Corning, USA)

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Produktname/Produktnummer	Hersteller
Zellkulturflasche	T 75 # 83.3911.002, <i>vent. cap.</i>	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DEU)
Deckgläschen	# L 189.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DEU)
EDTA-Röhrchen	#41.1504.015	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DEU)
Serologische Pipette 5 ml	# 86.1253.001	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DEU)

Material und Methoden

Serologische Pipette 10 ml	# 86.1254.001	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DEU)
Serologische Pipette 25 ml	# 86.1685.001	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DEU)
Serologische Pipette Aspi	# 86.1251.011	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DEU)
FACS-Röhrchen 3,5 ml	# 55.484	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DEU)
Flussskammer <i>Ibidi Treat®</i>	<i>μ-Slide VI^{0.4}</i> , # 80606	Ibidi GmbH (Gräfelfing, DEU)
Reagiergefäß/ <i>Tube</i>	2,0-ml-Eppendorf- <i>Tube</i> # 0030.120.094	Eppendorf AG (Hamburg, DEU)
Reagiergefäß/ <i>Tube</i>	1,5-ml-Eppendorf- <i>Tube</i> # 72.690.001	Eppendorf AG (Hamburg, DEU)
QIAamp- <i>Minispin-Column</i>	Bestandteil QIAamp® <i>DNA Blood Mini Kit</i> # 51306	QIAGEN GmbH (Hilden, DEU)
2-ml- <i>Collection-Tube</i>	Bestandteil QIAamp® <i>DNA Blood Mini Kit</i> # 51306	QIAGEN GmbH (Hilden, DEU)
96- <i>well</i> -Platte	# 04729692001	Roche Deutschland Holding GmbH (Mannheim, DEU)
<i>Sealing foil</i> /Klebefolie Abdichtung der <i>well</i> - Platte	# 04729757001	Roche Deutschland Holding GmbH (Mannheim, DEU)
Kryoröhrchen	Nunc™ Kryoröhrchen 1,0 ml # 377224	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 3 Liste der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Produktname/Produktnummer	Hersteller
Ethanol (96–100 %)	# 2246.5000 Chemsolute	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DEU)
Aqua Dest	Aqua	B. Braun SE (Melsungen, DEU)
QIAamp® <i>DNA Blood Mini Kit</i>	# 51306	QIAGEN GmbH (Hilden, DEU)
<i>Phosphate buffered saline</i> (DPBS)	# 14109-094	Gibco™ Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)
Fetales Kälberserum (FCS)	# 10500-064	Gibco™ Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)
Penicillin/Streptomycin	# 15070-063	Gibco™ Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)
Trypsin/EDTA	# 25300-054	Gibco™ Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)
Einfriermedium	cryo-safe I 50mL # KM-11-D	c-c pro Gesellschaft für Herstellung und Vertrieb von Produkten für Cellculturen mbH (Oberdorla, DEU)
rhIL-1 α	#200-01A	PeproTech Inc. (Cranbury, USA)
Propidiumiodid	P4170	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DEU)

Material und Methoden

FACS-Puffer	DPBS (1X) Zusammensetzung: (-CaCl ₂ , -MgCl ₂) + 1 % BSA + 0,05 % NaN ₃	Gibco™ Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)
FACS-Puffer für die Bestimmung der statischen E-Selektin- Bindung an humane Tumorzellen	DPBS (1X) Zusammensetzung: (+CaCl ₂ , +MgCl ₂) + 1 % BSA + 0,05 % NaN ₃	Gibco™ Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)
FACS-Antikörper E-Selektin (human)	# 12-0627-41, CD26E, PE-gekoppelt	eBioscience Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
FACS-Antikörper P-Selektin (human)	# 12-0626-80, CD62P, PE-gekoppelt	eBioscience Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
FACS-Antikörper ICAM-1 (human)	# 12-0549-42, CD54, PE-gekoppelt	eBioscience Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
FACS-Antikörper VCAM-1 (human)	# 12-1069-41, CD106, PE-gekoppelt	eBioscience Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
FACS-Isotypkontrolle der CAM-Testung	# 12-4714-42, MouseIgG1 κ, PE-gekoppelt	eBioscience Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
rhE-Selektin	rhE-Selektin/Fc Chimäre # 724-ES	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
Isotypkontrolle Chimäre	hFc, rhlgG1Fc, # 110-HG	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
Anti-sLeA-AK	NBP 2-54349 AF488	Novus Biologicals, LLC (Centennial, USA)

Material und Methoden

Anti-sLeX-AK	Alexa Fluor® 488 Mouse Anti-Human CD15s # 563528	BD Pharmingen™ BD Bioscience (San Jose, USA)
Maus-IgM-AK	Alexa Fluor® 488 Biolegend # 401617	BioLegend Global Headquarters (San Diego, USA)
Sekundärantikörper: <i>Goat-anti-human-Biotin-gekoppelt</i>	# B1140	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DEU)
Streptavidin/APC	# 554067	BD Pharmingen™, BD Bioscience (San Jose, USA)
E-Selektin-AK	# 336004	BioLegend Global Headquarters (San Diego, USA)
VCAM-1-AK	# BBA5	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
ATL-Puffer	Bestandteil QIAamp® DNA <i>Blood Mini Kit # 51306</i>	QIAGEN GmbH (Hilden, DEU)
Proteinkinase K	Bestandteil QIAamp® DNA <i>Blood Mini Kit # 51306</i>	QIAGEN GmbH (Hilden, DEU)
AL-Lyse-Puffer	Bestandteil QIAamp® DNA <i>Blood Mini Kit # 51306</i>	QIAGEN GmbH (Hilden, DEU)
AW-1-Puffer	Bestandteil QIAamp® DNA <i>Blood Mini Kit # 51306</i>	QIAGEN GmbH (Hilden, DEU)
AW-2-Puffer	Bestandteil QIAamp® DNA <i>Blood Mini Kit # 51306</i>	QIAGEN GmbH (Hilden, DEU)
AE-Puffer	Bestandteil QIAamp® DNA <i>Blood Mini Kit # 51306</i>	QIAGEN GmbH (Hilden, DEU)
<i>Alu-PCR-Primer forward</i>	Sequenz 5' → 3' TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA	Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, DEU)

Material und Methoden

<i>Alu-PCR-Primer reverse</i>	Sequenz 5' → 3' GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT	Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, DEU)
<i>LightCycler-480-Master-Mix (LCMM)</i>	<i>SYBR Green</i> # 04 887 352 001	Roche Deutschland Holding GmbH (Mannheim, DEU)
Zellmedium	RPMI-1640 Medium + (L-Glutamin) # 21875-034	Gibco™ Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)

3.1.4 Lösungen

Tabelle 4 Liste der verwendeten Lösungen

Bezeichnung	Produktname/Produktnummer	Hersteller
Medium HT29	RPMI-1640 Medium + (L-Glutamin) mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin	Gibco™ Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)
Medium HOS	RPMI-1640 Medium + (L-Glutamin) mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin	Gibco™ Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)
Medium HUVEC	<i>Endothelial Cell Medium</i> # 1001	ScienCell Research Laboratories, Inc. (Carlsbad, USA)

3.1.5 Zell- und Mauslinien

Tabelle 5 Liste der verwendeten Zell- und Mauslinien

Bezeichnung	Produktname/Produktnummer	Hersteller
Kolonkarzinomzelllinie HT29	–	ECACC (Porton Down, GBR)

Material und Methoden

Osteosarkomzelllinie HOS	–	Klinik und Poliklinik der Pädiatrischen Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Hamburg, DEU)
Humane Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC)	# C-12203	Promocell GmbH (Heidelberg, DEU)
Mauslinie	CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcoCrl	Charles River Laboratories (Wilmington, USA)

3.1.6 Software

Tabelle 6 Liste der verwendeten Software

Anwendung	Produktname/Produktnummer	Hersteller
Auswertung Zellflusseexperimente	<i>CapImage</i>	Dr. Zeintl Software Engineering (Heidelberg, DEU)
Datenverarbeitung	<i>Microsoft® Excel</i>	Microsoft (Redmond, USA)
Auswertung FACS- Analysen	FCS Express 4	De Novo Software (Pasadena, USA)
Erstellung von Graphiken	<i>GraphPad Prism 5.03</i>	GraphPad Software, Inc. (San Diego, USA)

3.1.7 Medikamente

Tabelle 7 Liste der verwendeten Medikamente

Bezeichnung	Produktname/Produktnummer	Hersteller
Bortezomib	Velcade®	Janssen-Cilag GmbH (Neuss, DEU)
Ketamin	–	Gräub aniMedica GmbH (Senden-Bösensell, DEU)
Xylazin	Rompun ® 2 %	Bayer Vital GmbH (Leverkusen, DEU)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 stammte aus der *European collection of authenticated cell cultures* (ECACC, Porton Down, GBR).

Die humane Osteosarkomzelllinie HOS wurde freundlicherweise von der Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bereitgestellt.

Es wurden humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (Promocell, Heidelberg, DEU) verwendet.

Für die Kultivierung der verwendeten humanen Tumorzelllinien wurden im Inkubator Standardbedingungen von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, und 5 % CO₂ genutzt und RPMI-1640-Medium + L-Glutamin mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet.

Die Kultivierung der humanen Endothelzellen erfolgte ebenso unter Standardbedingungen, jedoch in einem Endothelzellmedium.

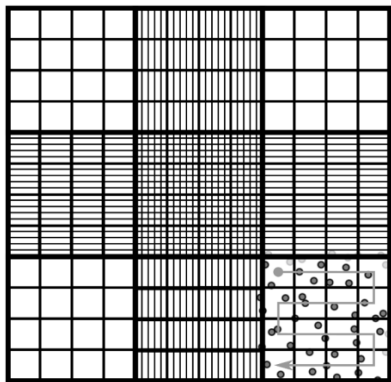
Die Wachstumskontrolle erfolgte alle zwei Tage per Lichtmikroskop. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen wie folgend passagiert, um ihr weiteres Wachstum sicherstellen zu können:

Nach restlosem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin (0,05 % EDTA mit Phenolrot) im Brutschrank bei 37 °C für 5 min bzw. bis zum vollständigen Ablösen der Zellen inkubiert. Um die Trypsinreaktion zu stoppen, folgte die Zugabe des jeweiligen Zellkulturmediums inklusive 10 % FCS (Volumenverhältnis Medium:Trypsin etwa 4:1). Somit standen die Zellen zur weiteren Verwendung je nach Bedarf zur Verfügung. Zum Passagieren der Zellen wurde 15 ml frisches Medium in die neue Zellkulturflasche vorgelegt und mit einem Bruchteil der abgelösten Zellen (Tumorzellen: etwa ein Zehntel, Endothelzellen: etwa ein Drittel) versehen.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Ein Standardverfahren zur Bestimmung der Konzentration von Zellen in einer Zellsuspension ist die Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer. In einem ersten Arbeitsschritt wurden die Zellen in einer Zellkulturflasche trypsinisiert und die sich ergebende Suspension in ein 30-ml-Röhrchen überführt. Dann wurde durch fünfminütige Zentrifugation bei 150 g und Abnahme des entstandenen Überstands ein Pellet erzeugt. Dieses wurde mit 10 ml Medium resuspendiert.

Anschließend wurde die Zellsuspension zehnfach mit PBS verdünnt (90 µl PBS, 10 µl Zellsuspension). Aus der sich ergebenden Suspension wurden 10 µl unter das Deckglas der Zählkammer gegeben.



c Zellkonzentration $\left[\frac{1}{ml}\right]$

n Summe der Zellen in allen vier Eckquadranten

$$c = \frac{n}{4} \cdot \frac{10^5}{ml}$$

Abbildung 4 Zählraster der Neubauer-Zählkammer

Es schloss sich die Zellzählung an, wobei alle Zellen in den vier Eckquadranten gezählt wurden. Dabei wurden diejenigen Zellen, die die rechte oder obere Kante der Quadrate berührten oder überdeckten, nicht mitgezählt. Da die plane Geometrie der Kammer und die Schichtdicke der Probe bekannt waren, errechnete sich die Zellkonzentration nach der oben angegebenen Formel.

3.2.3 Kryokonservierung und Reaktivierung der Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden Zellpellets mit einem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen pipettiert. Nach diesem Arbeitsschritt wurde schonend eingefroren. Dieses wurde realisiert, indem die Kryoröhrchen in eine Einfrierbox gegeben wurden, um den Temperaturgradienten auf -1 K/min zu

begrenzen. Die Einfrierbox wurde für einige Stunden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, um die tiefgefrorenen Zellen dann in flüssigen Stickstoff zu transferieren.

Zur Rekultivierung der Zellen wurden zunächst in eine Zellkulturflasche 15 ml Medium vorgelegt und im Inkubator prä-equilibriert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad für drei bis fünf Minuten aufgetaut und darauffolgend ihr Inhalt in die Zellkulturflasche überführt. Nach ca. 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um das verdünnte Einfriermedium zu entfernen.

3.2.4 Durchflusszytometrie

3.2.4.1 *Bestimmung der Expression endothelialer Zelladhäsionsmoleküle*

Um zu analysieren, ob Bortezomib (BZM, Velcade®) die Zytokin-vermittelte Induktion endothelialer CAMs hemmt, wurden HUVEC zunächst für 30 min mit $10\text{ }\mu\text{M}$ BZM oder einer Lösemittelkontrolle (PBS) vorbehandelt und anschließend mit 10 ng/ml IL-1 α (rhIL-1, PeproTech, #200-01A, Cranbury, USA) oder PBS stimuliert (4 h). So ergaben sich folgende HUVEC-Ansätze:

1. HUVEC-Kontrolle (PBS)
2. HUVEC + IL-1 α
3. HUVEC + BZM + IL-1 α

Anschließend wurden die Zellen abgelöst und für die durchflusszytometrische Analyse auf verschiedene Färbeansätze in 1,5-ml-Eppendorf-*tubes* verteilt (nicht mehr als 1×10^6 Zellen pro Ansatz).

Hierbei wurden je zwei Ansätze pro zu testendem *CAM* angesetzt – einer für den jeweiligen Antikörper und einer für die zugehörige Isotypkontrolle, die im Sinne einer Negativkontrolle fungierte, wodurch sich folgende Übersicht ergab:

Tabelle 8 Zuordnung Antikörper/Isotypkontrolle
Antikörper **Isotypkontrolle**

Anti-E-Selektin-PE, human (eBioscience, # 12-0627-41, Waltham, USA)	Mouse IgG1-PE, κ (eBioscience, # 12-4714-42, Waltham, USA)
Anti-P-Selektin-PE, human (eBioscience, # 12-0626-80, Waltham, USA)	
Anti-ICAM-1-PE, human (eBioscience, # 12-0549-42, Waltham, USA)	
Anti-VCAM-1-PE, human (eBioscience, # 12-1069-41, Waltham, USA)	

Die so verteilten Zellsuspensionen wurden bei 210 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes verblieb das Zellpellet im Eppendorf-*tube* und konnte nun weiterbehandelt werden. Zunächst wurde der Antikörper bzw. die Isotypkontrolle mit FACS-Puffer auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt. Anschließend wurde jedes Pellet in 100 µl dieser Lösung resuspendiert.

Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation auf Eis im Dunkeln. Im Folgenden wurden die Ansätze in korrespondierende FACS-Röhrchen überführt, in welche zuvor 2 ml FACS-Puffer vorgelegt worden waren. Anschließend wurden die Messungen im FACS-Gerät durchgeführt. Zur lebend-tot-Differenzierung wurden die Zellsuspensionen unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung mit Propidiumiodid versehen. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten und die Erstellung der Abbildungen erfolgte mit der FCS-Express-4.0-Software.

3.2.4.2 *Bestimmung der Expression der Selektinliganden sialyl-Lewis A und X auf humanen Tumorzellen*

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Selektinliganden sialyl-Lewis A und X auf den humanen Tumorzelllinien HT29 und HOS wurden die Tumorzellen zur Herstellung der Färbeansätze zunächst per Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend wurden die Zellen auf verschiedene Färbeansätze in 1,5 ml Eppendorf-tubes verteilt (nicht mehr als 1×10^6 Zellen pro Ansatz). Es ergab sich folgende Übersicht:

Tabelle 9 Antikörper und Isotypkontrolle für die Farbmarkierung von sialyl-Lewis A und X

Antikörper	Isotypkontrolle
anti-sLeA-AF488 (Novus Biologicals, # NBP2-54349 AF488, Centennial, USA)	Mouse IgM-AF488 (BioLegend, # 401617, San Diego, USA)
anti-sLeX-AF488 (BD Pharmingen, # 563528, San Jose, USA)	

Das weitere Vorgehen entsprach dem bereits unter 3.2.4.1 beschriebenen Vorgehen. Anschließend wurden die Messungen im FACS-Gerät durchgeführt. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten und die Erstellung der Abbildungen erfolgte mit der FCS-Express-4.0-Software.

3.2.4.3 *Bestimmung der statischen rhE-Selektin-Bindung an humane Tumorzellen*

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der statischen E-Selektin-Bindung an Tumorzellen wurden pro Tumorzelllinie zwei Ansätze vorbereitet:

Ein Ansatz zur *Messung der statischen E-Selektin-Bindung* und ein Ansatz der *Fc-Kontrolle*. Die Fc-Kontrolle fungierte im Sinne einer Isotypkontrolle, da das rekombinante humane (rh) E-Selektin als chimäres Protein gekoppelt an humanes IgG-Fc (hIgG-Fc) vorlag, wodurch die Chimäre auch zur unspezifischen Bindung fähig war. Die Ansätze unterschieden sich also dadurch, dass beim ersten

Material und Methoden

rhE-Selektin gekoppelt an hlgG-Fc und beim anderen anstelle dessen nur hlgG-Fc hinzugegeben wurde.

Sowohl das rhE-Selektin als auch das hlgG-Fc für die Fc-Kontrolle mussten weiterhin mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (APC, s. u.) gekoppelt werden, um das Bindungsverhalten mittels Durchflusszytometrie quantifizieren zu können.

Hierfür wurden pro zu untersuchender Zelllinie jeweils 100 µl FACS-Puffer in zwei Eppendorf-*tubes* gegeben. Hierbei war zu beachten, dass der FACS-Puffer zum Nachweis von Selektinbindungsstellen sowohl Ca^{2+} als auch Mg^{2+} enthalten musste. Es folgte die Zugabe von 1 µl rhE-Selektin (R&D Systems, # 724-ES, Minneapolis, USA, 1 mg/ml) bzw. hlgG-Fc (R&D Systems, # 110-HG, Minneapolis, USA, 1 mg/ml) und jeweils 0,5 µl Sekundär-Antikörper (Sigma-Aldrich, # B1140, Taufkirchen, DEU, mindestens 0,1 mg/ml). Anschließend wurde das Reagenz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Streptavidin/APC (BD Pharmingen, # 554067, San Jose, USA, 0,2 mg/ml) erfolgte dann eine Inkubation über 15 min im Dunkeln auf Eis.

Die zu testenden humanen HT29- und HOS-Tumorzellen wurden mittels Trypsin abgelöst und ein Teil der Zellen ($<1 \times 10^5$ Zellen) auf je zwei Ansätze verteilt und bei 210 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes blieb das gewünschte Tumorzellpellet im Eppendorf-*tube*.

Je 100 µl der APC-gekoppelten rhE-Selektin- bzw. hlgG-Fc-Kontroll-Proben wurden auf die Tumorzellpellets gegeben und resuspendiert. Nach Inkubation über 20 min auf Eis im Dunkeln wurden die Ansätze in korrespondierende FACS-Röhrchen überführt, in die zuvor 2 ml FACS-Puffer ($+\text{Ca}^{2+} +\text{Mg}^{2+}$) vorgelegt worden waren. Es folgte die durchflusszytometrische Analyse im FACS-Gerät. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten und die Erstellung der Abbildungen erfolgte mit der FCS-Express-4.0-Software.

3.2.5 Analyse der dynamischen Adhäsion von Tumorzellen unter laminaren Strömungsbedingungen

3.2.5.1 Dynamische Adhäsion humaner Tumorzellen an HUVEC

Zur Analyse der Adhäsion der HT29- und HOS-Zellen am Endothel unter Flussbedingungen mussten die HUVEC in speziellen Flusskammern kultiviert werden. In mehrere Flusskammern (ibidi GmbH, *Ibidi Treat® μ -Slide VI^{0,4}*, # 80606, Gräfelfing, DEU) wurden je 30 μ l einer Endothelzellsuspension ($1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) gegeben. Die Flusskammern wurden anschließend mit je 65 μ l Medium am vorderen und hinteren Ende befüllt. So konnten über Nacht unter Standard-Kulturbedingungen konfluente *Monolayer* aus HUVEC in den Flusskammern entstehen.

Am Tag des Experiments wurden die HUVEC-*Monolayer* entweder unbehandelt belassen (unstimulierte Kontrolle) oder mit rhIL-1 α stimuliert (10 ng/ml, 4 h, 37 °C). Von letzteren wurde ein Teil zuvor mit BZM vorbehandelt (3,8 μ g/ml für 30 min bei 37 °C). Dieser Versuchsaufbau entspricht dem Vorgehen beim durchflusszytometrischen Experiment. Zusätzlich wurden nur mit IL-1 α vorbehandelte HUVEC kurz vor dem Adhäsionsexperiment (für die letzten 30 min der IL-1 α -Stimulation) mit blockierenden Antikörpern gegen E-Selektin (BioLegend, # 336004, San Diego, USA) bzw. VCAM-1 (R&D Systems, # BBA5, Minneapolis, USA) inkubiert, Endkonzentration jeweils 20 μ g/ml. Gegen Ende der Stimulation der HUVEC in den Flusskammern wurden parallel die Tumorzellen in ihren Zellkulturflaschen durch Trypsin abgelöst. Anschließend konnten sie in einer Zelldichte von 10^5 Zellen/ml mittels Perfusorpumpe mit einer laminaren Strömungsgeschwindigkeit von 8,5 ml/h durch die Flusskammern geleitet werden.

Mittels Videomikroskopie wurden die Anzahl und die Qualität der adhäsiven Ereignisse von Tumorzellen an das Endothel erfasst (Abbildung 5).

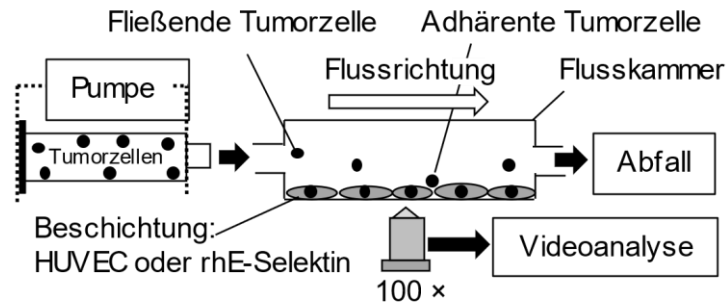


Abbildung 5 Aufbau des Adhäsionsassays unter Flussbedingungen

Abbildung nach (Starzonek et al. 2020), S. 26.

Dabei betrachtete man drei Blickfelder pro Flusskammer jeweils für eine Minute. Die dabei vorbeifließenden Tumorzellen und ihr Adhäsionsverhalten an den Endothel-Monolayern wurden im Anschluss mit der *CapImage*-Software ausgewertet. Es wurden folgende Adhäsionsmodi unterschieden:

1. **Feste Adhäsion:** dauerhafte Anhaftung der Zellen ans Endothel,
2. **Rolling:** Rollen der Zellen über das Endothel, ohne feste Anhaftung,
3. **Tethering:** wechselnde Anhaftung und Rollen der Zellen über das Endothel.

Hierbei wurde als adhäsives Ereignis gewertet, wenn eine Tumorzelle aus aktivem Fluss heraus abrupt an eine Endothelzelle andockte und diesen Ort während des Beobachtungszeitraums nicht mehr verließ (*stabile* oder *feste Adhäsion*). Eine solche feste Adhäsion entsprach im Auswertemodus der Videosequenz (*CapImage*-Software) einer zunächst aufwärts gerichteten schrägen weißen Linie (*fließende Tumorzelle*) auf dunklem Hintergrund (Endothelmonolayer), die zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Aufnahme zu einer horizontalen Linie ohne Steigung wurde (*adhärente Tumorzelle*).



Abbildung 6 Festes Adhärenieren

Abbildung nach (Starzonek et al. 2020), S. 26.

Wenn die horizontale Linie eine stetige aber flachere Steigung aufwies, handelte es sich um eine *rollende* Adhäsion.

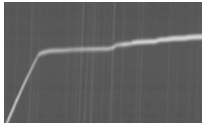


Abbildung 7 Rollendes Adhärenzen

Abbildung nach (Starzonek et al. 2020), S. 26.

Wenn die Linie ein stufenförmiges Profil mit horizontalen Segmenten ausbildete, handelte es sich um ein *Tethering*.

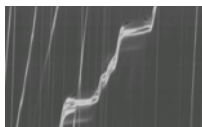


Abbildung 8 Tethering

Abbildung nach (Starzonek et al. 2020), S. 26.

Tumorzellen, die aufgrund von Kollision mit bereits zuvor adhärenzten anderen Tumorzellen aus dem Fluss heraus angehalten wurden, wurden nicht gewertet (Wechsel von aufwärtsgerichteter schräger weißer Linie zu horizontalem Verlauf auf weißem Hintergrund, der auf eine andere adhärenzte Zelle, die ein Strömungshindernis darstellt, zurückzuführen war), da es sich hierbei um keine echte Adhäsion, sondern um eine mechanische Behinderung des Fließverhaltens handelte. Ebenso wenig wurden Tumorzellen gewertet, die bereits zu Beginn des Beobachtungszeitraums an einer Endothelzelle stabil adhärenzten.

In einem weiteren Versuchsschritt konnte durch Erhöhung der Flussrate auf 200 ml/h die *Stabilität* der endothelialen Adhäsionen (welche bei der niedrigeren Flussrate von 8,5 ml/h zuvor entstanden waren) untersucht werden. Hierfür wurde zunächst ein Foto der im Blickfeld befindlichen adhärenzten Tumorzellen nach Perfusion bei 8,5 ml/h für 1 min angefertigt. Anschließend wurde die Flussrate maximal erhöht (200 ml/h), so dass die adhärenzten Zellen in unterschiedlichem Umfang durch die Scherbelastung abgelöst wurden. Nach etwa 5 s wurde ein weiteres Foto von demselben Blickfeld angefertigt, so dass der Anteil der ablösbaren Zellen durch Vergleich der Fotos ermittelt werden konnte.

3.2.5.2 Bestimmung der Adhäsion humaner Tumorzellen an rhE-Selektin unter laminaren Flussbedingungen

Zur Bestimmung der Adhäsion humaner Tumorzellen an rhE-Selektin unter laminaren Flussbedingungen wurde die Flusskammer anstelle von HUVEC mit rhE-Selektin beschichtet.

Das chimäre rhE-Selektin/IgG-Fc-Protein (R&D Systems, # 724-ES, Minneapolis, USA) lag in der Ausgangskonzentration von 1 mg/ml in PBS vor. Es folgte die Verdünnung um den Faktor 1:50 auf 20 µg/ml. 150 µl dieser Suspension wurden in die Flusskammer pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Als Negativkontrolle zu rhE-Selektin wurde – analog zu der durchflusszytometrischen Bestimmung der Selektinbindung an die Tumorzelloberfläche – wieder die Fc-Kontrolle (R&D Systems, rhIgG1Fc # 110-HG, Minneapolis, USA) verwendet (Verdünnung und Durchführung wie bei rhE-Selektin).

Anschließend wurden die beschichteten Flusskammern analog zum unter 3.2.5.1 beschriebenen Vorgehen mit den Tumorzellsuspensionen perfundiert. Auch die Auswertung der unterschiedlichen adhäsiven Ereignisse entsprach dem dort geschilderten Vorgehen.

3.2.6 Effekt der systemischen Bortezomib-Therapie auf die spontane Lungenmetastasierung solider humaner Tumore im Xenograftmodell

In diesem Versuchsmodell wurden humane Tumorzellen in immundefiziente SCID-Mäuse (engl. *Severe Combined Immunodeficiency*, Mauslinie CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcoCrI des Züchters *Charles River Laboratories*, Wilmington, USA) injiziert. Die Auswahl fiel auf diese Mauslinie, da sie die minimal notwendige Immundefizienz aufwies, was eine spontane Metastasierung zuverlässig ermöglichte. Durch eine genetische Mutation verfügten die SCID-Mäuse nur über unreife B- und T-Lymphozyten; dies hatte zur Folge, dass ihr adaptives Immunsystem insuffizient war, was ermöglichte, dass die menschlichen Tumorzellen und deren Wachstum bzw. Eigenschaften in einem zwar artfremden aber lebenden Organismus besser untersucht und verstanden werden konnten. Bei intaktem Immunsystem der Mäuse hätten die humanen Tumorzellen zu einer

Material und Methoden

umfangreichen Abstoßungsreaktion geführt. Ein solches Einbringen von humanen (Tumor-)Zellen in eine andere Spezies (hier die Maus) nennt sich Xenograftmodell.

Zu Beginn des Tierversuchs, in dem 12 Wochen alte SCID-Mäuse beider Geschlechter als Versuchstiere dienten (n=40), wurden die Versuchstiere zunächst auf ihre jeweilige Versuchsgruppe aufgeteilt und eine gleichmäßige Geschlechterverteilung zwischen den Gruppen sichergestellt.

Tabelle 10 Übersicht der Versuchsgruppen
n=40 Mäuse

	BZM	PBS
HT29	10 Mäuse	10 Mäuse
HOS	10 Mäuse	10 Mäuse

Die Haltung der Tiere erfolgte in einzelbelüfteten Käfigen (*individually ventilated cages, IVC*) unter Standardbedingungen (20 °C ± 1 K, 50 % rel. Luftfeuchtigkeit, zirkadiane Rhythmik: Dunkelphasen 19:00–07:00 Uhr). Ernährt wurden sie mit Einstreufutter und sterilem Wasser *ad libitum*. Täglich fand eine Begutachtung ihrer Aktivität, des Nahrungsaufnahmeverhaltens und ihres Fells statt.

Allen Mäusen wurden in einem Volumen von je 200 µl (Medium ohne Zusätze) 1×10^6 vitale HT29-Kolonkarzinomzellen bzw. HOS-Osteosarkomzellen subkutan oberhalb der rechten Skapula injiziert. Am darauffolgenden Tag begann die Behandlung eines Teils der Versuchstiere mit 1,25 mg/kg KG (Körpergewicht) BZM (Velcade®) gelöst in PBS (Gesamtvolumen 100 µl) bzw. mit PBS (Kontrolle, ebenfalls 100 µl). Die Applikation erfolgte intraperitoneal zweimal pro Woche. Die Behandlungsdauer erstreckte sich bei regelmäßiger Kontrolle des Allgemein- und Gewichtszustands der Tiere über die gesamte Dauer des Tumorwachstums.

Bei einer Tumorgröße von ca. 1,5 cm³ bzw. beginnender Ulzeration der über dem Tumor befindlichen Haut erfolgte die Tötung und Organentnahme.

Die Mäuse wurden dazu einer Narkose mit Ketamin/Rompun unterzogen:

Ketamin (100 mg/ml) der Fa. Gräub	0,3 ml
Rompun 2 % der Fa. Bayer	0,2 ml
0,9 % NaCl der Fa. Braun	2,0 ml

Von diesem Gemisch wurden 0,15 ml/10 g KG intraperitoneal verabreicht. Es folgte die Herzpunktion zur terminalen Blutentnahme (EDTA-Röhrchen) und die zervikale Dislokation zur Tötung. Anschließend wurde das Herz-Lungen-Paket entnommen, rechter und linker Lungenflügel wurden vom Herzen getrennt und der linke Lungenflügel bei -80°C eingefroren. Der rechte Lungenflügel wurde in 4 % Formalin fixiert. Danach folgte die Entnahme der subkutanen Primärtumore.

Die Tierversuche wurden vom Amt für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Genehmigungsnummer G11/65).

3.2.7 Isolation humaner DNA aus murinem Lungengewebe

Die humane Zelllast in den Mauslungen sollte als Messgröße für die Metastasierung mittels quantitativer PCR für human-spezifische DNA-Sequenzen (*Alu*-PCR) ermittelt werden. Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der DNA dienten die linken Flügel der zuvor entnommenen Mauslungen. Die Isolation der DNA erfolgte durch das *QIAmp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, DEU). Die Verwendung dieses *Kits* ist ursprünglich nicht für die Isolation von DNA aus Lungengewebe vorgesehen. Der vom Hersteller beabsichtigte Einsatz erstreckt sich lediglich auf die Isolation von DNA aus Blut. Für die vorliegende Arbeit gelang es, die DNA-Isolation aus Lungengewebe zu etablieren.

Die Lungenflügel wurden in zwei etwa gleich große Teile getrennt, je in ein 2-ml-*round-bottom-tube* gegeben und gewogen. Anschließend wurde eine autoklavierte Metallkugel hinzugefügt, um das Lungengewebe mit dem nun beigemischten Puffer (PBS) in einer Kugelmühle zu homogenisieren (4 min bei $30\frac{1}{5}$). Hierbei musste beachtet werden, dass zu jedem Lungengewicht bis 30 mg eine Menge von 80 μl PBS appliziert werden konnte – Gewichtsabweichungen erforderten eine Angleichung der Puffermenge. Die Mengenangaben im Folgenden beziehen sich jeweils auf ein Lungengewicht von 30 mg, Abweichungen des Lungengewichts erforderten jeweils eine Angleichung der Quantität der weiterhin zugefügten Substanzen.

Material und Methoden

Nach erfolgter Homogenisierung wurden 100 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinkinase K zugegeben und die Proben durchmischt (Vortex), bevor sie für 1 h bei 56 °C im Thermoblock inkubiert wurden. Dieser Schritt war essentiell für den Abbau der Proteine und die Freisetzung der Nukleinsäuren.

Im Anschluss wurden die Proben für 2–3 s bei 9600 g zentrifugiert, um sicherzustellen, dass die Deckel der *round-bottom-tubes* frei von Inhalt waren.

Die Mixturen wurden um 200 µl AL-Lyse-Puffer ergänzt, 15 s durchmischt (Vortex) und bei 70 °C für 10 min im Thermoblock inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 200 µl Ethanol (96–100 %) in die *tubes*, bevor sie erneut für 15 s auf dem Vortexgerät durchmischt und anschließend zentrifugiert wurden.

Der komplette Inhalt der *tubes* wurde daraufhin per Pipette entnommen und auf eine *QIAmp-Minispin-Column* gegeben, welche in ein *2-ml-collection-tube* gesteckt war. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 6200 g für 1 min bei Raumtemperatur. Das entstandene Filtrat konnte verworfen werden, während die Säule in ein neues *2-ml-tube* gesetzt und mit 500 µl AW-1-Puffer (der bei Anbruch der Flasche mit 25 ml Ethanol ergänzt worden war) versetzt wurde. Der vorherige Arbeitsschritt wurde wiederholt und eine Zentrifugation der Proben für 1 min bei 6200 g durchgeführt, bevor das entstandene Filtrat erneut verworfen und wiederum die Säule in ein neues *2-ml-tube* gesetzt werden konnte. Die Proben wurden nun mit 500 µl AW-2-Puffer (der bei Anbruch der Flasche mit 30 ml Ethanol versetzt worden war) ergänzt und bei 17000 g für 3 min in der Zentrifuge gewaschen.

Das hervorgegangene Filtrat wurde abermals verworfen und die Säulen in ein neues *2-ml-collection-tube* gesetzt. Die Proben wurden nun in einer Leerzentrifugation für 1 min bei 17000 g geschleudert.

Die Säulen mit der Lungen-DNA wurden im Anschluss in ein *1,5-ml-Eppendorf-tube* gesetzt, bevor in jede Probe 200 µl AE-Puffer (ohne Angleichen) zur Elution appliziert wurden. Die Proben wurden nun bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und für 1 min bei 6200 g zentrifugiert. Die Säule konnte wiederum verworfen werden, da sich nun die isolierte DNA im *1,5-ml-Eppendorf-tube* befand.

Material und Methoden

Im Vorfeld wurde die DNA aus den Lungen tumorfreier SCID-Mäuse isoliert, auf 30 ng/µl verdünnt und ebenfalls in die *well*-Platte pipettiert (Negativkontrolle H1–H2). Hierbei wurde die Lungen-DNA von 3–5 Kontrollmäusen gepoolt. Weiterhin wurde aus HT29- bzw. HOS-Zellen aus der Zellkultur die DNA aus jeweils 1×10^6 Zellen isoliert und zur Erzeugung der folgenden Standardreihe mit der Kontroll-DNA in absteigender Konzentrationsreihe (1:10-Stufen) vermischt (*wells* A1–G2). Hierdurch wurde es möglich, anhand der Standardreihe auf die Anzahl der metastatischen Tumorzellen im murinen Lungengewebe zu schließen:

Tabelle 12 Standardreihe aus humaner Tumorzell-DNA, vermischt mit Lungen-DNA gesunder Kontrollmäuse

Pipettierschema			Absolute Zellzahl
A1	–	A2	2×10^3
B1	–	B2	2×10^2
C1	–	C2	2×10^1
D1	–	D2	2×10^0
E1	–	E2	2×10^{-1}
F1	–	F2	2×10^{-2}
G1	–	G2	2×10^{-3}
H1	–	H2	0 (Negativkontrolle)

Alle Versuchsproben, Standards und Negativkontrollen wurden in Doppelbestimmungen auf die 96-*well* Platte gegeben. Nach Abdichten durch eine Klebefolie und Zentrifugation für 10 s in der *PerfectSpin*-Zentrifuge wurde die Platte in den *LightCycler 480 1.5* eingesetzt und die qRT-*Alu*-PCR durchgeführt.

Die *Alu*-PCR lief nach folgendem Protokoll ab:

Tabelle 13 *LightCycler-PCR-Protokoll für die qRT-Alu-PCR*

Programm	Zyklus [n]	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Präinkubation	1	95	300
Amplifikation	40	Denaturierung: 95	10
		Primerhybridisierung: 67	10
		Elongation: 72	10
Schmelzkurve	1	Denaturierung: 95	5
		Primerhybridisierung: 65	60
		Elongation: 97	kontinuierlich
Abkühlung	1	40	30

3.2.10 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe von *Microsoft Excel* und *GraphPad Prism* statistisch ausgewertet graphisch dargestellt.

Zur Testung auf Signifikanz wurde ein ungepaarter zweiseitiger t-Test verwendet. p-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Unterschiedliche Signifikanzniveaus wurden wie folgt definiert:

- **p* < 0,05,
- ***p* < 0,001,
- ****p* < 0,0001.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Expression endothelialer Zelladhäsionsmoleküle und die Beeinflussbarkeit durch Bortezomib

Dieser Dissertation lag die Hypothese zugrunde, dass Bortezomib (BZM) die zytokinvermittelte Induktion von E-Selektin und anderen endothelialen Zelladhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecules – CAMs*) vermindert. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) unter Zellkulturbedingungen durch Zugabe von IL-1 α stimuliert und zusätzlich teilweise mit BZM vorbehandelt. Unbehandelte HUVEC dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die HUVEC durchflusszytometrisch auf die Expression von E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass es durch IL-1 α zu einer Hochregulation von E-Selektin, ICAM-1 sowie VCAM-1 kam, welche durch eine Vorbehandlung mit BZM reduziert wurde (Abbildung 9). HUVEC exprimierten unter unstimulierten Bedingungen lediglich ICAM-1. P-Selektin konnte auch nach IL-1 α -Gabe nicht auf der Zelloberfläche von HUVEC nachgewiesen werden, weshalb dieses CAM nicht weiter betrachtet wurde.

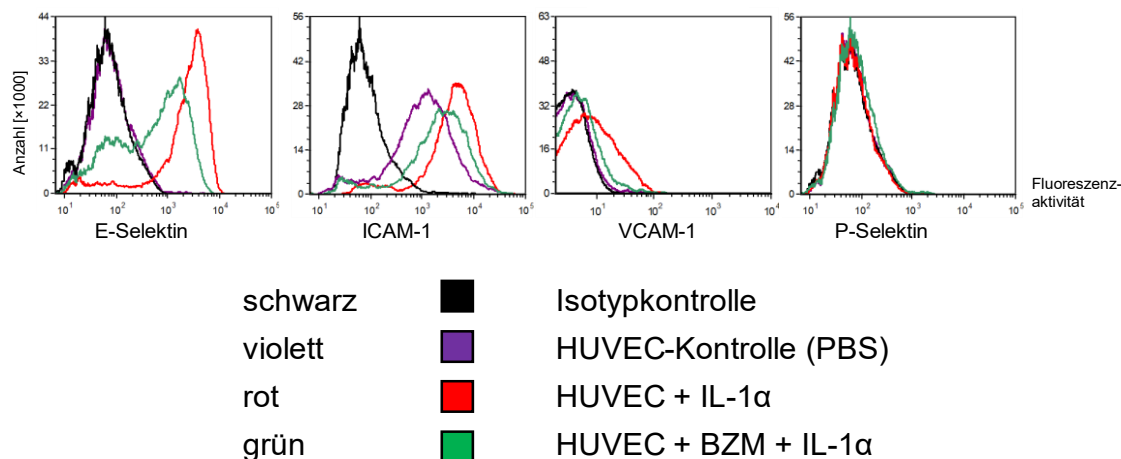


Abbildung 9 Nachweis der Expression von E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin auf der Zelloberfläche von HUVEC und deren Modulation durch BZM und IL-1 α

IL-1 α -stimulierte HUVEC (rot) exprimieren deutlich mehr E-Selektin und ICAM-1 und etwas mehr VCAM-1 als nicht-stimulierte Kontrollen (violett). Vorbehandlung der HUVEC mit BZM reduziert den stimulierenden Effekt von IL-1 α auf die Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1. Die schwarze Linie zeigt jeweils die unspezifische Bindung der Isotypkontrolle an. Abbildung modifiziert enthalten in Lange et al. (*submitted*).

4.2 Abhängigkeit der Adhäsion von Tumorzellen am Endothel von E-Selektin, ICAM-1 sowie VCAM-1 und die Beeinflussbarkeit durch Bortezomib

Um die Relevanz der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen der Adhäsionsmoleküle des Endothels für die Interaktion der Tumorzellen mit dem Endothel zu untersuchen, wurden Flussversuche durchgeführt. Hier wurden adhärenente endotheliale *Monolayer* vorab mit IL-1 α stimuliert bzw. teilweise zusätzlich mit BZM vorbehandelt und Tumorzellen in Suspension über die Endothelzell-*Monolayer* unter definierten Bedingungen mit einer laminaren Flussrate von 8,5 ml/h geleitet.

Quantifiziert wurde die Anzahl der festen adhäsiven Ereignisse pro Zeiteinheit (min).

In diesen Versuchen wurden sowohl HT29-Kolonkarzinomzellen als auch HOS-Osteosarkomzellen untersucht, da diese Zelllinien basierend auf Vorerfahrungen der Arbeitsgruppe zuverlässig adhäsive Interaktionen mit Endothelzellen im gewählten Versuchsaufbau zeigten. Die Behandlung der endothelialen *Monolayer* mit IL-1 α resultierte in einer vermehrten Adhäsion von Zellen beider Tumorzelllinien. Die der IL-1 α -Behandlung vorangehende Behandlung mit BZM verursachte jedoch nur bei HOS-Zellen nahezu eine Aufhebung der durch IL-1 α vermittelten Adhäsionen. HOS-Zellen zeigten somit im Gegensatz zu HT29-Zellen ein BZM-sensitives Adhäsionsverhalten (Abbildung 10). Diesen Unterschieden wurde im Weiteren nachgegangen. Zunächst jedoch wurde validiert, dass die IL-1 α -induzierte, vermehrte Adhäsion von Tumorzellen am Endothel von den zuvor analysierten Adhäsionsmolekülen abhängig ist.

Ergebnisse

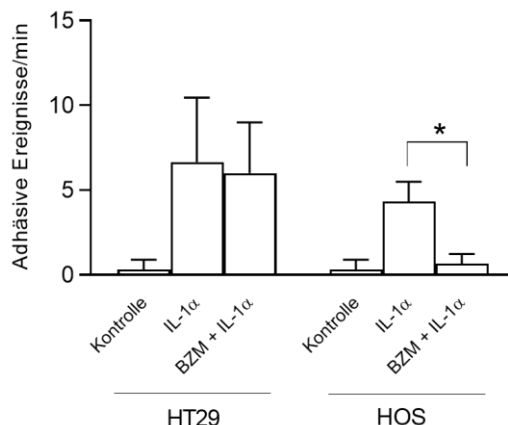


Abbildung 10 Feste Adhäsion von Zellen der Zelllinien HT29 und HOS an Endothelzellen.

Endotheliale *Monolayer* (HUVEC) wurden unbehandelt (Kontrolle) bzw. nach Vorbehandlung mit IL-1 α , teilweise in Kombination mit BZM in einer Flusskammer mit Suspensionen aus HT29- bzw. HOS-Zellen überflossen. Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichung (SD) von n=3. * p <0,05.

Daten enthalten in Lange et al. (*submitted*).

Wie in Abbildung 11 gezeigt, ergab die Blockade von E-Selektin auf dem Endothel mittels Antikörper eine deutliche Abnahme der festen Adhäsion von Tumorzellen am Endothel. Obwohl dieser Effekt eine statistische Signifikanz für beide Tumorzelllinien aufwies und damit E-Selektin als primäres, die Adhäsion vermittelndes Zelladhäsionsmolekül identifiziert werden konnte, waren diese Effekte deutlich prononcierter bei HT29- im Vergleich zu HOS-Zellen. Auch hier wurden wieder die festen Adhäsionen gewertet.

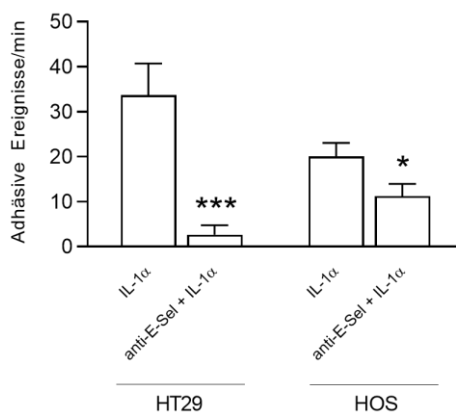


Abbildung 11 Validierung der Bedeutung von E-Selektin für die IL-1 α -vermittelte feste Tumorzelladhäsion am Endothel unter laminaren Strömungsbedingungen.

Quantitative Erfassung der pro Zeiteinheit am endothelialen *Monolayer* in der Flusskammer fest adhären Tumorzellen mit und ohne vorherige Behandlung des IL-1 α -stimulierten Endothels mittels E-Selektin-blockierendem Antikörper (anti-E-Sel). Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichung (SD) von n=3. * p <0,05, *** p <0,0001.

Daten enthalten in Lange et al. (*submitted*).

4.3 Bestimmung der Expression der kanonischen Selektinliganden sialyl-Lewis A und X auf humanen Tumorzellen

Im Weiteren wurde die molekulare Grundlage des unterschiedlichen Ansprechens der Tumorzelllinien HT29 und HOS auf die BZM-Behandlung des Endothels untersucht. Dies im Besonderen vor dem Hintergrund, dass die Adhäsion der HOS-Zellen weniger stark von E-Selektin abhing als die der HT29-Zellen (Abbildung 11). Ein erster Schritt zur möglichen Erklärung der beobachteten Unterschiede bestand im Nachweis der am häufigsten beschriebenen Liganden für E-Selektin auf beiden Zelllinien. Hierfür kamen die Zuckerstrukturen sialyl-Lewis A und X in Betracht, welche mittels Durchflusszytometrie auf der äußeren Zellmembran vitaler Tumorzellen bestimmt wurden. Interessanterweise exprimierten HOS-Zellen im Gegensatz zu HT29-Zellen kein sialyl-Lewis A oder X (Abbildung 12).

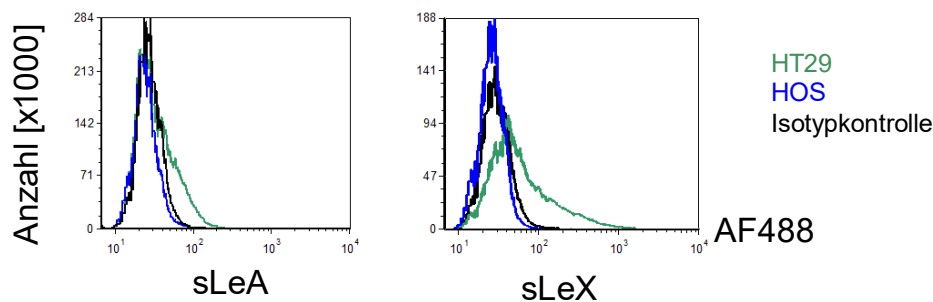


Abbildung 12 Expression von sialyl-Lewis A und X auf HT29- und HOS-Zellen.

Repräsentative Abbildung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von sialyl-Lewis A (sLeA) und X (sLeX) auf der Oberfläche von HT29- (grün) und HOS-Zellen (blau). Die schwarzen Linien repräsentieren die Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle (*mouse IgM-APC*), die für beide Antikörper gleich war.

Abbildung modifiziert enthalten in Lange et al. (*submitted*).

4.4 Unterschiede im statischen und dynamischen Bindungsverhalten von HT29- und HOS-Zellen an E-Selektin

Passend zu den Ergebnissen einer differentiellen Expression von sialyl-Lewis A und X auf HT29- und HOS-Zellen zeigten sich zwischen beiden Zelllinien deutliche Unterschiede in der Fähigkeit, E-Selektin unter statischen Inkubationsbedingungen zu binden. Hierfür wurde fluoreszenzmarkiertes, rekombinantes humanes E-Selektin verwendet (rhE-Selektin/IgG-Fc, siehe 3.2.4.3). Passend zu den in Abbildung 12 gezeigten Ergebnissen zur sialyl-Lewis-A- und -X-Expression waren

Ergebnisse

HT29-Zellen in der Lage, E-Selektin unter statischen Bedingungen zu binden, HOS-Zellen jedoch nicht (Abbildung 13).

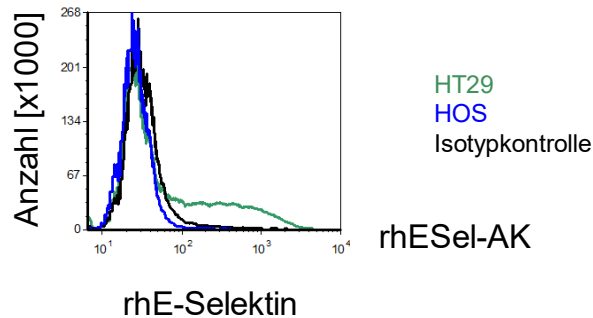


Abbildung 13 Bindung von rekombinatem humanem E-Selektin an Tumorzellen unter statischen Bedingungen.

Repräsentative durchflusszytometrische Analyse zur Bindung von rekombinatem E-Selektin an HT29- (grün) vs. HOS-Zellen (blau) unter statischen Bedingungen. Die schwarze Linie zeigt das Bindungsverhalten von rhIgG-Fc an, welches im chimären rhE-Selektin/IgG-Fc-Protein des getesteten E-Selektin enthalten ist und auf identische Weise fluoreszenzmarkiert wurde („Isotypkontrolle“).

Abbildung modifiziert enthalten in Lange et al. (*submitted*).

Diese Unterschiede ließen sich auch hinsichtlich einer deutlich ausgeprägteren, insbesondere festeren Adhäsion von HT29-Zellen an immobilisiertes, rekombinantes E-Selektin unter Flussbedingungen (8,5 ml/h) im Vergleich zu HOS-Zellen nachvollziehen (Abbildung 14).

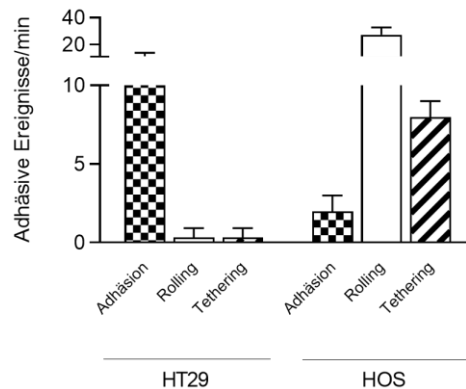


Abbildung 14 Differentielle Adhäsion von Tumorzellen unter laminaren Strömungsbedingungen an immobilisiertes, rekombinantes humanes E-Selektin.

Anzahl adhäsiver Ereignisse der Tumorzellen je Zeiteinheit unter Flussbedingungen an rekombinantes humanes E-Selektin, aufgetrennt nach der Qualität der Adhäsion (siehe 3.2.5.2). Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichung (*standard deviation – SD*) von $n=3$. Daten enthalten in Lange et al. (*submitted*).

Ergebnisse

4.5 Stabilität endothelialer Adhäsionen von HT29- und HOS-Zellen

Unterschiede im Adhäsionsverhalten der gewählten Zelllinien an Endothel, die möglicherweise das unterschiedliche Ansprechen auf die BZM-Therapie erklären könnten, wurden im nächsten Schritt („Abspülversuch“) hinsichtlich der Stabilität der Tumorzelladhäsion am IL-1 α -stimulierten Endothel untersucht. Wie in Abbildung 15 gezeigt, bildeten sowohl HT29- als auch HOS-Zellen feste Adhäsionen unter der routinemäßig genutzten Flussrate (8,5 ml/h), welche am Ort der Extravasation zirkulierender Tumorzellen, d. h. innerhalb von postkapillären Venolen vorherrscht. Wurde dann jedoch die Flussrate erhöht (200 ml/h), wurden die meisten HOS-Zellen wieder abgespült, während die Adhäsionen der HT29-Zellen überwiegend stabil blieben (Abbildung 15).

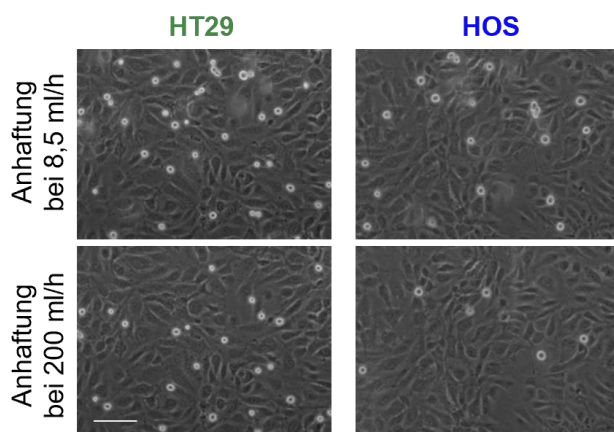


Abbildung 15 Stabilität der Adhäsion von HT29- und HOS-Zellen auf endothelialen Monolayern.

Die obere Reihe zeigt repräsentative Fotografien fester Adhäsionen beider Tumorzelllinien an Endothel unter der routinemäßig eingesetzten Flussrate (8,5 ml/h). Unmittelbar nach Erstellen der Fotos der oberen Reihe wurde die Flussrate für wenige Sekunden auf ein Maximum erhöht (200 ml/h) und wurden erneut Fotos vom selben Bildausschnitt aufgenommen, die in der unteren Reihe dargestellt sind. Hierdurch zeigte sich, dass die Mehrheit der adhären HT29-Zellen dem „Abspülen“ standhielt, während adhären HOS-Zellen deutlich häufiger abgespült wurden. Der Balken entspricht 100 μ m.

Abbildung modifiziert enthalten in Lange et al. (*submitted*).

4.6 Die Relevanz von VCAM-1 für die endotheliale Adhäsion von HT29 und HOS

Angesichts der relativ schwachen Reduktion der Anzahl fester Adhäsionen an Endothel durch die E-Selektin-Blockade im Falle von HOS-Zellen (s. Abbildung 11) wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die Adhäsionen der Tumorzellen neben

Ergebnisse

E-Selektin auch über VCAM-1 vermittelt waren. Die Nutzung eines blockierenden anti-VCAM-1-Antikörpers bei ansonsten unverändertem Versuchsaufbau verglichen mit demjenigen, der Abbildung 11 zugrunde lag, zeigt, dass die endotheliale Adhäsion der HOS-, nicht jedoch der HT29-Zellen auch durch VCAM-1 vermittelt war (Abbildung 16).

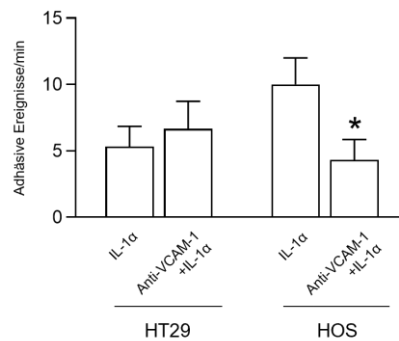


Abbildung 16 Bedeutung von VCAM-1 für die Adhäsion der Tumorzellen auf IL-1 α -stimuliertem Endothel.

Anzahl fester Adhäsionen der Tumorzelllinien pro Zeiteinheit unter laminaren Strömungsbedingungen (Flussrate: 8,5 ml/h) an IL-1 α -stimuliertes Endothel mit und ohne vorherige Zugabe eines VCAM-1-blockierenden Antikörpers. Daten enthalten in Lange et al. (*submitted*).

4.7 Anti-metastatischer Effekt von Bortezomib *in vivo*

Die oben beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass BZM die Interaktion von Tumorzellen mit dem Endothel beeinflussen kann (je nach untersuchter Zelllinie), vermutlich durch eine reduzierte Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin und VCAM-1. Sollte die endotheliale Adhäsion von im Blutstrom befindlichen Tumorzellen tatsächlich von übergeordneter Bedeutung für den Vorgang der hämatogenen Metastasierung sein, so könnte der anti-adhäsive Effekt von BZM eine anti-metastatische Wirkung *in vivo* entfalten (auf solche Tumoren, die ein BZM-sensitives Adhäsionsverhalten zeigen). Diese Frage sollte nunmehr *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden immundefizienten SCID-Mäusen subkutan (s. c.) im Bereich der rechten Skapula HT29- oder HOS-Zellen appliziert und im Anschluss zweimal wöchentlich bis zum Versuchsende die Versuchstiere systemisch (intraperitoneal, i. p.) mit BZM oder PBS als Vehikel-Kontrolle behandelt. Bei Erreichen einer s. c. Tumorgröße von 1,5 cm³ wurden die Tiere euthanasiert, die Lungen entnommen und auf den Gehalt humaner DNA mittels *Alu*-qPCR untersucht

Ergebnisse

(Abbildung 17). Hierdurch sollte auf die metastatische Zelllast in den Lungen der Versuchstiere rückgeschlossen werden.

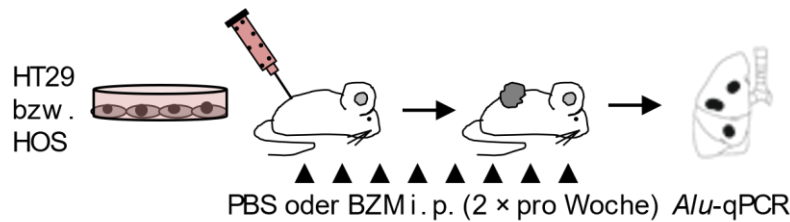


Abbildung 17 Versuchsaufbau des spontan metastasierenden Xenograft-Mausmodells

Die Relevanz der *in-vitro*-Befunde wurde im Tiermodell validiert. Dazu wurden die humanen HT29- bzw. HOS-Zellen subkutan in immundefiziente SCID-Mäuse injiziert. In der Folge wurden die Versuchstiere bis zum Erreichen einer s. c. Tumorgroße von ca. 1,5 cm³ (Versuchsende) zweimal pro Woche intraperitoneal mit BZM oder PBS (Lösemittelkontrolle) behandelt. Im Anschluss wurde der Gehalt humaner DNA in den Lungen der Versuchstiere quantifiziert (*Alu*-qPCR), um auf die metastatische Zelllast schließen zu können.

Abbildung modifiziert enthalten in Lange et al. (*submitted*).

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit BZM zu einer geringfügigen, aber signifikanten Verlängerung der Primärtumorwachstumsdauer im HOS-Modell, jedoch nicht im HT29-Modell führte. Ein Einfluss der Therapie auf die resultierenden Primärtumorgewichte zeigte sich jedoch nicht (Abbildung 18).

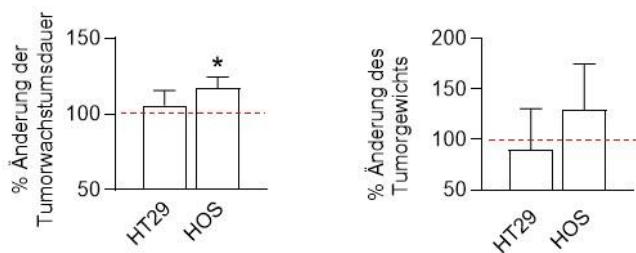


Abbildung 18 Effekt von BZM auf die Tumorwachstumsdauer und das Tumorgewicht im subkutanen HOS- bzw. HT29-Xenograftmodell.

Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der prozentualen Änderung der Tumorwachstumsdauer bzw. der Tumorgewichte bei Autopsie nach Behandlung mit BZM (PBS-behandelte Mäuse wurden als 100 % definiert). n=10, **p*<0,05. Daten enthalten in Lange et al. (*submitted*).

Die Analyse des Gehalts an humaner DNA in den murinen Lungen (*Alu*-qPCR) zeigte schließlich, dass die BZM-Behandlung nur im HOS-Xenograftmodell zu einer signifikanten Reduktion der pulmonalen Metastasenlast führte, nicht jedoch im HT29-Xenograftmodell (Abbildung 19).

Ergebnisse

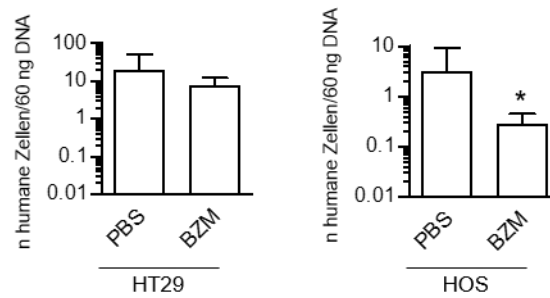


Abbildung 19 Gehalt an humaner DNA in murinen Lungen nach s.c. Wachstum von Xenograft-Primärtumoren.

Gezeigt ist die humane Zelllast/60 ng muriner Lungen-DNA in mit PBS bzw. BZM behandelten Mäusen. Nur im HOS-Xenograftmodell ließ sich eine Reduktion der pulmonalen Tumorzelllast unter BZM-Behandlung aufzeigen. Das in dieser Gruppe signifikant verlängerte Primärtumorwachstum (Abbildung 18) wurde bei der statistischen Analyse des Unterschieds der Metastasenlast in der Lunge zwischen den Gruppen (PBS vs. BZM) als *Covariate* berücksichtigt (* $p < 0,05$, ANCOVA). Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert und Standardabweichung (SD) von $n=10$. Daten enthalten in Lange et al. (*submitted*).

5 Diskussion

Mehr als 90 % der Todesfälle, die mit Krebserkrankungen in Verbindung stehen, sind der Bildung von Fernmetastasen und ihren klinischen Folgen zuzurechnen (Valastyan und Weinberg 2011). Ein wichtiger Schritt beim Ablauf der metastatischen Kaskade ist die Extravasation zirkulierender Krebszellen aus dem Blutstrom (Gupta und Massagué 2006, Schumacher und Stürken 2016). Diese wird dadurch eingeleitet, dass Kohlenhydrat-Liganden auf der Tumorzelloberfläche an CAMs wie E-Selektin binden – analog zur Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen im Rahmen von Entzündungen (Gebauer et al. 2013, Heidemann et al. 2014, Köhler et al. 2010, Schumacher und Stürken 2016, Stübke et al. 2012, Wicklein et al. 2013).

Im Zusammenhang mit entzündlichen Vorgängen läuft die Hochregulierung des E-Selektins unter Einfluss des Ubiquitin-Proteasom-*Pathways* ab (Read et al. 1995, St Hill 2011). Dies stellte den Ursprung der dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothese dar, nämlich, dass die Blockade des Proteasoms ein hilfreiches Vorgehen bei der Verringerung von Krebsmetastasierung und somit auch ein wirksames Mittel im Kampf gegen die Metastasen-bedingten Todesfälle sein könnte (Read et al. 1995). Diese Arbeit zeigt, dass der bereits zugelassene Proteasom-Inhibitor Bortezomib (BZM, Velcade®) die Zytokin-vermittelte Induktion von E-Selektin und weiteren endothelialen CAMs in Endothelzellen hemmt. Dieser hemmende Effekt ist bei den hier untersuchten Tumorzelllinien zumindest teilweise (HOS) ausreichend, um die Adhäsion von humanen Tumorzellen an Endothelzellen unter laminaren Strömungsbedingungen zu reduzieren. Im Falle einer anti-adhäsiven Wirkung *in vitro* führt die BZM-Behandlung auch zu einer reduzierten spontanen pulmonalen Metastasierung *in vivo*. Dies gilt in der vorliegenden Arbeit für die verwendeten HOS-Osteosarkomzellen, die nicht über die kanonischen E-Selektin-Liganden sialyl-Lewis A (sLeA) und X (sLeX) verfügen. Bei HT29-Kolonkarzinomzellen, die sLeA und sLeX exprimieren, war BZM hinsichtlich endothelialer Adhäsion und spontaner pulmonaler Metastasierung wirkungslos.

Die eingangs beschriebene molekulare Mimikry, nach der die CTCs sich Funktionen der Leukozyten zu Nutze machen (Schumacher und Stürken 2016), ermöglicht einen Zugang zum Verständnis der hier wirkenden Abläufe. So wurde bereits die

anti-adhäsive Wirkung eines synthetischen Proteasom-Inhibitors (MG132) auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion unter definierten Strömungsbedingungen analysiert und gezeigt, dass die Anhaftung von neutrophilen Granulozyten an mit Zytokin vorbehandelten Endothelzellmonolayern durch MG132 signifikant reduziert und die Transmigration fast vollständig unterbunden werden konnte. Für Lymphozyten hingegen wurden noch gravierendere Effekte beobachtet: schon die Adhäsion wurde um mehr als 90 % reduziert. Es trat keinerlei Transmigration mehr auf (Read et al. 1995).

Auch in der vorliegenden Arbeit wirkte BZM dem stimulierenden Effekt des Zytokins IL-1 α entgegen und reduzierte die Expression der Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1. In früheren Analysen der Arbeitsgruppe (unveröffentlichte Daten) konnte nachgewiesen werden, dass diese Wirksamkeit von BZM auch nach TNF α -Stimulation bei Betrachtung humaner pulmonaler mikrovaskulärer Endothelzellen (HPMEC) zu beobachten ist.

In der Betrachtung der Adhäsionsmoleküle der CTCs ans Endothel scheint insbesondere die Reduktion von E-Selektin ein relevanter Aspekt zu sein, da E-Selektin als wichtiges, die Adhäsion von Tumorzellen vermittelndes Zelladhäsionsmolekül identifiziert werden konnte (Schumacher und Stürken 2016, St Hill 2011). In Folge einer E-Selektin-Blockade trat ein qualitativer Unterschied zwischen den beiden verwendeten Zelllinien auf, so fanden sich deutlich betontere Effekte bei HT29-Zellen im Vergleich zu HOS-Zellen. Letztere scheinen bei der Adhäsion an Endothel also weniger stark von E-Selektin abhängig zu sein als die HT29-Zellen. Passend hierzu konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass HOS-Zellen, aber nicht HT29-Zellen, bei ihrer Adhäsion ans Endothel zusätzlich von VCAM-1 abhängen.

5.1 Die Rolle der kanonischen E-Selektinliganden sialyl-Lewis A und sialyl-Lewis X

Um dem unterschiedlichen Ansprechen der Tumorzelllinien HT29 und HOS auf die BZM-Behandlung auf den Grund zu gehen, wurde die molekulare Basis der Tumor-Endothel-Interaktion für beide Zelllinien untersucht. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen bestand in dem Ergebnis der

Diskussion

durchflusszytometrischen Bestimmung der Expression der *kanonischen* E-Selektinliganden sLeA und sLeX: HT29-Zellen exprimierten sLeA und sLeX, HOS-Zellen hingegen nicht.

Ein Ansatz zur Erklärung ist, dass die Zellen, die über sLeA und sLeX verfügen, mit besonders hoher Affinität an E-Selektin binden (St Hill 2011). Das bedeutet, dass bereits wenige E-Selektin-Bindungsstellen (wie etwa nach BZM-Behandlung des Endothels) auszureichen scheinen, um eine feste Bindung zwischen HT29-Tumorzellen und dem Endothel zu ermöglichen. Daher würde die BZM-vermittelte Reduktion des E-Selektins (um etwa 60 %) nicht ausreichen, um diese HT29-Tumorzell-Endothel-Interaktion zu unterbinden.

Unter Berücksichtigung des in den Versuchen begrenzenden Parameterraums (Auswahl der Zelllinien, Dosierung, etc.) lässt sich über eine negative Korrelation zwischen sLeA- und sLeX-Expression und BZM-Wirksamkeit nur spekulieren. Um eine wirkliche Korrelation herzustellen, müssten viele weitere sLeA- und sLeX-positive bzw. -negative Zelllinien hinsichtlich ihres Ansprechens auf BZM bei der endothelialen Adhäsion untersucht werden. Dies wurde im Nachgang zu dieser Doktorarbeit auch vorgenommen und die vermutete Korrelation konnte bestätigt werden (Lange et al., *submitted*). Somit rückt als mögliches Ziel eines erweiterten Therapieansatzes die Bindung von sLeA und sLeX an E-Selektin in den Fokus. Dahinter steht die Überlegung, eine BZM-Sensitivität auch bei sLeA- und sLeX-exprimierenden Zellen zu erreichen, indem in den o. g. Bindungsablauf eingegriffen wird.

Ferner könnte eine stärkere Herunterregulierung des E-Selektins angestrebt werden, um einen Effekt bei HT29-Zellen zu bewirken. Hierfür müssten weitere Dosierungen oder Wirkdauern von BZM getestet werden.

Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass eine kennzeichnende Eigenschaft der Wirkung von BZM ist, dass eine basale Restaktivität des Proteasoms erhalten bleibt (Vetter 2004). Somit ist BZM nicht für einen Ansatz geeignet, der zum Ziel hat, Bindungen an E-Selektin vollständig zu unterbinden. Um die Adhäsion von sLeA- und sLeX-positiven Tumorzellen wie HT29 zu hemmen, müssten also andere Mechanismen gefunden werden.

Diskussion

Eine Herangehensweise könnte der Einsatz von GMI-1359 von *GlycoMimetics* sein. Es handelt sich um ein Molekül, das sowohl E-Selektin als auch den Chemokinrezeptor CXCR4 blockiert. Beide sind zentral am Metastasierungsprozess solider Tumoren in den Knochen beteiligt. Die Möglichkeit, beide Moleküle mit einer einzigen Substanz blockieren zu können, könnte die Wirksamkeit der Behandlungen solcher Krebserkrankungen wie beispielsweise Mamma- und Prostatakrebs steigern. Derzeitiger Stand der Untersuchungen ist eine Phase-1b-Studie mit Brustkrebspatientinnen, die bereits Metastasen im Knochen aufweisen. Überdies wird GMI-1359 bereits in der Behandlung des kindlichen Osteosarkoms eingesetzt (GlycoMimetics 2021).

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Steigerung der BZM-Wirksamkeit bei sLeA- und sLeX-positiven Tumorzellen ist die Beeinflussung der tumorzellseitigen Bindungsanteile. Dabei fallen zwei mögliche Ziele für eine Beeinflussung ins Auge: die Synthese der Liganden oder ihr Einbau in die Trägerstrukturen auf der Zelloberfläche. Die Biosynthese der kanonischen Selektinliganden ist seit Jahrzehnten bekannt (Trinchera et al. 2017) wodurch die dabei beteiligten Glykosyltransferasen als mögliche therapeutische Ziele enthüllt werden. Als Beispiel sei die Core-2-O-Glykan-Synthase (C2GnT2) genannt, die bei der Synthese des Strukturproteins Core-2-O-Glykan essenziell ist (Brockhausen et al. 2009, Stone et al. 2009). Letzteres ist die übliche Bindungsstelle für sLeX (Brockhausen et al. 2009). Wenn es gelänge, die C2GnT2 zu inhibieren, könnte dies bezüglich der Adhäsion und folglich Metastasierung dieser Zellen eine BZM-Sensitivität hervorrufen.

Bei den Trägerstrukturen der Isomere sLeA und sLeX auf der Tumorzelloberfläche handelt es sich zum Einen um Glykolipide und zum Anderen um (O-glykosidisch-verbundene) Glykoproteine (Ragupathi et al. 2009, Reymond et al. 2013). Zu den letzteren zählen CD44 (inkl. HCELL), PSGL-1, CD24, MUC1 und LGALS3BP (Reymond et al. 2013). CD44 ist ein häufig exprimiertes Zellglykoprotein, welches in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt ist. Es ist essenziell in Prozessen der Hämatopoese, Entzündung, Angiogenese und Wundheilung. Erhöhte Expression von CD44 bringt *in vivo* metastatisches Potenzial und ein schlechtes Outcome mit sich (Hanley et al. 2005). CD44 dient zudem als Tragegerüst für HCELL (*hematopoietic cell E-/L-selectin ligand*, dem potentesten, auf humanen

Diskussion

Zellen zu findenden E-Selektin-Liganden) (Jacobs und Sackstein 2011). In bisher unveröffentlichten Ergebnissen der Arbeitsgruppe existieren bereits vielversprechende Erkenntnisse bezüglich CD44, allerdings im Zusammenhang mit den BZM-sensitiven, sLeA- und sLeX-negativen Zellen. Hier waren nach Depletion von CD44 die endotheliale Adhäsion und auch die spontane pulmonale Metastasierung deutlich reduziert. Bei den BZM-resistenten Zellen zeigte sich nach *knockdown* von CD44 hingegen keine Reduktion der Adhäsion oder der sLeA- und sLeX-Expression (Lange et al., *submitted*). Ein *knockdown* von CD24 führte bei BZM-resistenten Zellen nur zu einer transienten Reduktion von sLeA und sLeX sowie der Adhäsivität. Insofern scheinen unterschiedliche Glykoproteine innerhalb kurzer Zeit einander als Träger von sLeA und sLeX ersetzen zu können. Zudem wurde festgestellt, dass die Adhäsion von BZM-resistenten Zellen sich nicht verringerte, wenn die Glykoproteine der Tumorzelloberfläche unspezifisch mittels Pronase abgebaut wurden. Dies spricht wiederum gegen eine Rolle von Glykoproteinen als Träger von sLeA und sLeX und lenkt den Fokus stärker auf Glykolipide als mögliche pro-adhäsive Moleküle BZM-resistenter Zellen (Lange et al., *submitted*). Durch weitere Forschung in diese Richtung könnten der Anwendbarkeit von BZM weitere Fenster geöffnet werden, z. B. in Kombination mit Hemmstoffen der Glykolipidsynthese.

Was die sLeA- und sLeX-negativen HOS-Zellen betrifft, ist hier im Gegensatz zu den sLeA- und sLeX-positiven HT29-Zellen zu erkennen, dass der BZM-Effekt auszureichen scheint, um die schwächer E-Selektin-abhängige Adhäsion zu verringern. Bei der Einordnung der verbleibenden Adhäsionsvorgänge darf allerdings nicht übersehen werden, dass im Fall von HOS-Zellen neben E-Selektin auch VCAM-1 als CAM nicht zu vernachlässigen ist aber dessen Expression ebenso durch BZM-Gabe herunterreguliert wird. Daher müsste im nächsten experimentellen Schritt nun analysiert werden, ob BZM noch seine anti-adhäsive Wirkung auf HOS-Zellen entfaltet, wenn die Endothelzellen in ihrer E-Selektin-Expression gentechnisch behindert werden, bspw. durch einen *knockdown* von E-Selektin. Alternativ könnten E-Selektin-*knockout*-Mäuse zum Einsatz kommen, um zu analysieren, ob BZM hier noch seine anti-metastatische Wirkung auf ein HOS-Xenograft entfaltet. Dass die Adhäsion der HOS-Zellen zwar signifikant verringert, aber nicht vollständig unterbunden wird, kann über die residuale E-Selektin-Expression hinaus darin begründet liegen, dass es noch weitere

relevante CAMs geben könnte, die hier nicht erfasst werden. Dieser Spur nachzugehen, könnte einen zusätzlichen Weg zu einem therapeutischen Vorgehen eröffnen.

Diese Dissertation gibt einen Hinweis, dass sLeA- und sLeX-positive Tumorzellen der untersuchten Zelllinien in der Lage sind, rhE-Selektin unter statischen Bedingungen zu binden, die sLeA- und sLeX-negativen hingegen nicht. Es scheint daher zu gelten, dass sLeA und sLeX eine Bindung an rhE-Selektin auch bei Abwesenheit von Flussbedingungen ermöglichen. Es ist jedoch unklar, ob dieser Zusammenhang auf weitere Tumorzelllinien übertragen werden kann. Immerhin gibt es neue Hinweise in der aktuellen Literatur, dass rhE-Selektin ausschließlich an sLeA, aber nicht an alternative angebotene Zuckerstrukturen bindet – dies schließt sLeX ein (Starzonek et al. 2020). Diese Erkenntnis könnte gewinnbringend eingesetzt werden bei einer möglichen Therapie, die das Unterbinden der E-Selektin-Liganden-Synthese zum Ziel hat. Somit müsste lediglich noch die sLeA-Synthese zum Ziel solcher Bemühungen werden oder, falls es praktikabler wäre, könnte die parallel verlaufende Synthese in Richtung sLeX verschoben werden. Dadurch könnte möglicherweise die physiologische Funktion von sLeX auf Leukozyten besser erhalten werden.

Ferner ist bereits bekannt, dass für die Effektivität des Bindungsverhaltens das Zusammenspiel aus sLeA- und sLeX-Expression und Strömungscharakter determinierend ist (Starzonek et al. 2020). Die untersuchten sLeA- und sLeX-negativen Zellen gehen wesentlich schwächere Bindungen ein und dies auch nur unter Flussbedingungen. Unter statischen Bedingungen kommt die Bindungsaktivität zum Erliegen. Interessanterweise sind genau solche Zusammenhänge bereits in den 1990er Jahren für humane Leukämie-Zellen (HL60) beschrieben worden (Handa et al. 1997). Für humane neutrophile Granulozyten ist zudem gezeigt worden, dass eine Blockade der Glykosphingolipidsynthese sich auf die Adhäsion an E- und P-Selektin unterschiedlich auswirkt. Die Adhäsion an E-Selektin wird dabei erkennbar verringert, während die Adhäsion an P-Selektin unbeeinflusst bleibt. Glykosphingolipide scheinen also E-Selektin-Rezeptoren auf menschlichen Neutrophilen zu sein (Nimrichter et al. 2008). Diese Beobachtung passt sehr gut zum bereits erwähnten Pronase-insensitiven Adhäsionsverhalten BZM-resistenter Tumorzellen. Möglicherweise tragen die BZM-resistenten Zellen

Diskussion

wie Neutrophile bestimmte Glykosphingolipide, über die sie am Endothel adhären.

Die Beobachtung, dass trotz der durch den Strömungscharakter verursachten Scherspannungen die Stabilität der Bindungen verstärkt wird, erscheint zunächst kontraintuitiv. Zur Erklärung kann hier allerdings der sog. *Catch-Bond*-Effekt dienen. Dieser tritt im Zuge der Bindungsvorgänge von Leukozyten an Endothel auf, wobei es sich ebenso um Selektin-vermittelte Anhaftungen handelt. Der *Catch-Bond*-Effekt besagt, dass die Energie, die notwendig ist, um bspw. eine Lektin-Zucker-Bindung zu lösen, bei Anlegen einer Scherkraft steigt (Thomas 2008).

Zusammenfassend ist zu folgern, dass die HT29-Tumorzellen die kanonischen E-Selektinliganden sLeA und sLeX exprimieren. Ist E-Selektin auf der Endothelzelloberfläche vorhanden, dann vermögen diejenigen Tumorzellen, die über sLeA und sLeX verfügen, besonders fest zu adhären. Diese sehr stabilen Bindungen entstehen schon bei einem geringen Maß an E-Selektin-Expression (wie nach Behandlung des Zytokin-stimulierten Endothels mit BZM) und auch unter statischen Bedingungen. Der Befund, dass die HOS-Zellen für eine BZM-Therapie empfänglich sind, könnte mit der Tatsache korrelieren, dass sie nicht über sLeA und sLeX verfügen. Deren Fehlen scheint das Potenzial für feste Adhäsionen bedeutend zu verringern, wie im Abspülversuch gezeigt werden konnte. Damit korrespondierte im Flussversuch, dass die HOS-Zellen auf dem rhE-Selektin vornehmlich rollende Adhäsionen eingingen, während die HT29-Zellen im Wesentlichen fest adhärten. Insofern konnte diese Arbeit nachweisen, dass humane Tumorzellen, die nicht über die kanonischen E-Selektin-Liganden sLeA und sLeX verfügen, trotzdem E-Selektin-vermittelt an Endothel adhären können und unter laminaren Strömungsbedingungen mit rhE-Selektin interagieren können. Es muss also nicht-kanonische Liganden für E-Selektin auf humanen Tumorzellen geben, die nur bei Anlegen einer Scherkraft funktional sind. Die hier getesteten HOS-Zellen, die nicht über sLeA und sLeX und das damit einhergehende Potenzial fester Adhäsion verfügen, waren signifikant empfänglich für eine BZM-Therapie.

In Anbetracht der Tatsache, dass bei HOS-Zellen eine deutlich geringere (wenn auch immer noch signifikante) Abhängigkeit vom Vorhandensein des E-Selektins für die endotheliale Adhäsion bestand, war zusätzlich zu überprüfen, welche anderen Faktoren – wie in erster Linie vermutlich andere Adhäsionsmoleküle –

relevanten Einfluss auf das Adhäsionsverhalten dieser Krebszellen haben. Das hier verwendete Zytokin induzierte im Wesentlichen auch VCAM-1. ICAM-1 hingegen war bereits unter basalen Bedingungen deutlich exprimiert. Unter diesen basalen Bedingungen fand aber keine nennenswerte Adhäsion statt. Daher wurde im nächsten Schritt nach Zytokin-Stimulation das VCAM-1 blockiert. Interessanterweise konnte auch durch Blockade von VCAM-1 die Adhäsion der HOS-Tumorzellen, nicht jedoch die der HT29-Zellen an das Endothel reduziert werden. Anhand dieser Erkenntnis eröffnet sich ein gesamtes weiteres Studienfeld, da die Zytokin-abhängige Induktion von VCAM-1 wiederum auch durch BZM reduziert wurde.

Die Tatsache, dass in dieser Arbeit lediglich zwei Zelllinien untersucht wurden, schränkt die Generalisierbarkeit der Erkenntnisse erheblich ein. Es bedarf hier Untersuchungen an weiteren Zelllinien, die bezüglich des Vorhandenseins der kanonischen Selektinliganden sLeA und sLeX unterschiedlich sein sollten.

5.2 Verringerung der Fernmetastasierung durch Bortezomib im Xenograftmodell

Die vorangegangenen Untersuchungen hatten gezeigt, dass BZM *in vitro* die endotheliale Adhäsion von Tumorzellen als wichtigen Teilschritt der Metastasierungskaskade reduzieren konnte (bei Betrachtung sLeA- und sLeX-negativer Tumorzellen). Zudem konnte die Hypothese formuliert werden, dass die durch BZM vermittelte Reduktion der Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle (vor allem E-Selektin und VCAM-1) an diesem Effekt wesentlich beteiligt war. Die Überprüfung des möglicherweise anti-metastatischen Effekts von BZM in einem Tierversuch stellte somit den nächsten logischen Schritt dar.

Die BZM-Behandlung bewirkte eine geringfügige, aber dennoch statistisch signifikante Verlängerung der Primärtumorwachstumsdauer beim HOS-Tumormodell, nicht jedoch beim HT29-Modell. Das resultierende Primärtumorgewicht zeigte sich in beiden Tumormodellen von einer BZM-Behandlung unbeeinträchtigt.

Diskussion

Passend zu den vorangegangenen *in-vitro*-Ergebnissen zeigte sich bei dem über die kanonischen E-Selektinliganden sLeA und sLeX verfügenden HT29-Modell kein signifikanter Effekt einer BZM-Behandlung auf die Lungenmetastasierung. Bei dem nicht über sLeA oder sLeX verfügenden HOS-Modell zeigte die BZM-Gabe eine statistisch signifikante Reduktion der pulmonalen Metastasenlast.

Somit lässt sich festhalten, dass BZM ein antimetastatisches Potenzial für einige Tumoren bereithält. Dabei handelt es sich offenbar um diejenigen, die nicht über die kanonischen E-Selektinliganden sLeA und sLeX verfügen. Daher scheint der Einsatz von BZM zumindest für einige Tumorerkrankungen eine therapeutische Option darzustellen. Für die hier untersuchte Tumorzelllinie, die über sLeA und sLeX verfügt, gilt dies eventuell nicht – möglicherweise solange nicht die E-Selektin-Expression vollständig unterbunden wird. Auch hier ist die Erweiterung der Untersuchung auf zusätzliche Zelllinien für eine generalisierte Aussagekraft erforderlich. Es handelt sich bei sLeA um den Tumormarker CA 19-9 (Kannagi 2007). Da dieser ohnehin häufig diagnostisch erhoben wird, würde es kaum Aufwand bedeuten, den zugehörigen Status ebenso als Kriterium für eine BZM-Behandlung heranzuziehen. Bei CA-19-9-negativen Patienten könnten Phasen erhöhter Zytokin- oder CTC-Emission, wie sie zum Beispiel während Operationen oder Biopsien auftreten (Bosch et al. 2003, Mathenge et al. 2014, Weitz et al. 1998, Yamaguchi et al. 2000, Ziprin et al. 2003), von einer BZM-Gabe begleitet werden, um eine transient erhöhte Disseminierung zu unterdrücken. Alternativ zur Bestimmung im Serum, könnte sLeA auch immunhistochemisch an Biopsie-Proben nachgewiesen werden, um bspw. prä-operativ die Patienten für eine mögliche peri-operative BZM-Behandlung zu stratifizieren.

Zusammenfassend sind die Erkenntnisse der zugrundeliegenden Experimente als durchaus vielversprechend zu bezeichnen. Eine antiadhäsive und dadurch antimetastatische Wirkung einer BZM-Therapie liegt in bestimmten Konstellationen *in vitro* und im Xenograftmodell vor. Somit gibt es keinen Grund, nicht zuversichtlich in weiterführende Versuche mit menschlichen Probanden einzusteigen, zumal BZM seit Jahren in der Myelom-Therapie eingesetzt wird und dabei beherrschbare Nebenwirkungen gezeigt hat (Mohan et al. 2017).

6 Zusammenfassung

Eine der bedrohlichsten Eigenschaften von Tumorerkrankungen ist ihr Potenzial, Metastasen zu bilden. Dies läuft in einem komplexen Prozess ab, der unterschiedliche Ansätze für eine pharmakologische Intervention bietet. Ein Teilschritt ist die Extravasation von Krebszellen aus dem Blutstrom. In diesem Zuge ist es erforderlich, dass zirkulierende Tumorzellen am Endothel anhaften können. Dabei spielt E-Selektin eine wichtige Rolle. Dessen Expression auf dem Endothel kann durch Gabe des bereits zugelassenen Wirkstoffs Bortezomib (BZM) reduziert werden. Dieses wurde im ersten Schritt dieser Arbeit experimentell nachgewiesen. Weiterhin wurde untersucht, wie das Adhäsionsverhalten von Krebszellen der Zelllinien HOS und HT29 unter laminaren Flussbedingungen an Endothelzellen nach Stimulation des Endothels mit Zytokin sowie durch Vorbehandlung mit BZM beeinflusst werden kann. Dabei zeigten die Zelllinien ein unterschiedliches Verhalten, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass HT29-Zellen die kanonischen E-Selektinliganden sialyl-Lewis A und X (sLeA/sLeX) exprimieren, HOS-Zellen hingegen nicht. Diese Liganden binden offenbar besonders fest an E-Selektin, so dass schon die unter BZM-Therapie verringerte Menge von E-Selektin ausreichend stabile Bindungen ermöglicht. Für HT29-Zellen konnte folglich kein anti-adhäsiver Effekt durch BZM nachgewiesen werden. Für HOS-Zellen, die zwar kein sLeA oder sLeX exprimieren, aber dennoch E-Selektin-abhängig an Endothel adhären und unter dynamischen Bedingungen relativ locker an E-Selektin anhaften, konnte durch BZM eine signifikante Reduktion der Adhäsion erreicht werden.

In einem weiteren Schritt wurden diese Zusammenhänge auf ein Xenograftmodell übertragen. Mäusen wurden Tumorzellen der o. a. Zelllinien subkutan injiziert. Die Metastasenlast in der Lunge wurde quantifiziert, indem bei Erreichen einer Primärtumorgröße von etwa 1,5 cm³ der Anteil humaner DNA in den Mäuselungen mittels *Alu*-PCR ermittelt wurde. Hier bestätigte sich das Bild, dass bei HOS-Zellen unter BZM-Gabe eine signifikante Reduktion der Metastasierung erreicht werden konnte, bei HT29-Zellen hingegen nicht.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass möglicherweise für die Subgruppe sLeA- und sLeX-negativer Tumore eine antimetastatische Wirkung durch die Gabe von BZM erreicht werden kann.

6 Abstract

One of the most threatening characteristics of tumor diseases is their potential to cause distant metastases. Metastases occur in the course of a complicated process that allows for a number of different approaches for a pharmacologic intervention. One substep is the extravasation of tumor cells out of the bloodstream. In this process, it is necessary for circulating tumor cells to adhere to the endothelium. E-selectin plays an important role in this process. Its expression on the endothelium can be reduced by administration of the already approved drug Bortezomib (BZM). This was experimentally demonstrated in the first step of this work.

Furthermore, it was investigated how the adhesion behavior of cancer cells of the cell lines HOS and HT29 under laminar flow conditions to endothelial cells can be influenced after stimulation of the endothelium with cytokine by pretreatment with BZM. Here, the cell lines show different behavior, which may be due to the fact that HT29 cells express the canonical E-selectin ligands sialyl-Lewis A and X (sLeA/sLeX), whereas HOS cells do not. These ligands apparently bind particularly tightly to E-selectin, so that even the reduced amount of E-selectin under BZM therapy allows sufficiently stable binding. Consequently, no anti-adhesive effect by BZM could be demonstrated for HT29 cells. For HOS cells, which do not express sLeA or sLeX but nevertheless adhere to endothelium in an E-selectin-dependent manner and adhere relatively loosely to E-selectin under dynamic conditions, a significant reduction in adhesion could be achieved by BZM.

In a further step, these relationships were applied to a xenograft model. Mice were subcutaneously injected with tumor cells of the above cell lines. The metastatic load in the lung was quantified by determining the amount of human DNA in the mouse lungs by Alu-PCR when a primary tumor size of approximately 1.5 cm³ was reached. This confirmed the pattern that a significant reduction in metastasis was achieved in HOS cells but not in HT29 cells, when BZM was administered.

The results suggest that possibly for the subgroup of sLeA- and sLeX-negative tumors an antimetastatic effect can be achieved by the administration of BZM.

7 Literaturverzeichnis

- Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Kremmyda A, Bramis I, Tsigris C (2001) Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer* 37(18): 2392–2397.
- AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Leitlinienprogramm Onkologie (2019) S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Kurzversion 2.1. <http://www.leitlinienprogrammmonkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> Zugriff am 18.2.2021.
- Bosch B, Guller U, Schnider A, Maurer R, Harder F, Metzger U, Marti WR (2003) Perioperative detection of disseminated tumour cells is an independent prognostic factor in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 90(7): 882–888.
- Brockhausen et al. (2009) Chapter 9 O-GalNAc Glycans, in: *Essentials of Glycobiology*. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D., Hrg., 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Chirivi RGS, Garofalo A, Padura IM, Mantovani A, Giavazzi R (1993) Interleukin 1 Receptor Antagonist inhibits the augmentation of metastasis induced by Interleukin 1 or Lipopolysaccharide in a human melanoma/nude mouse system. *Cancer Res* 53(20): 5051–5054.
- Dorfman HD, Czerniak B (1995) Bone Cancers. *Cancer* 75(1): 203–210.
- Egberts J-H, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, Kloese S, Kettler B, Forstner C von, Kneitz C, Tepel J, Adam D, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A (2008) Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 68(5): 1443–1450.
- Fidler IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis the seed and soil hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3(6): 453–458.
- Fogh und Trempe (1975) New Human Tumor Cell Lines, in: *Human Tumor Cells in Vitro*. Fogh, Jørgen, Hrg. SPRINGER SCIENCE+BUSINESS MEDIA, LLC, New York, 115ff.
- Frisch SM, Schaller M, Cieply B (2013) Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis. *J Cell Sci* 126(Pt 1): 21–29.

Literaturverzeichnis

- Gebauer F, Wicklein D, Stübke K, Nehmann N, Schmidt A, Salamon J, Peldschus K, Nentwich MF, Adam G, Tolstonog G, Bockhorn M, Izbicki JR, Wagener C, Schumacher U (2013) Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp--/rag2-- mice. *Gut* 62(5): 741–750.
- Gilmore TD (2006) Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25: 6680–6684.
- GlycoMimetics (2021) GMI-1359. <http://glycomimetics.com/pipeline/programs/gmi-1359/> Zugriff am 26.9.2021.
- Gómez-Cuadrado L, Tracey N, Ma R, Qian B, Brunton VG (2017) Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech* 10(9): 1061–1074.
- Gupta GP, Massagué J (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127(4): 679–695.
- Handa K, Stroud MR, Hakomori (1997) Sialosyl-Fucosyl Poly-LacNAc without the Sialosyl-Lex Epitope as the Physiological Myeloid Cell Ligand in E-Selectin-Dependent Adhesion: Studies under Static and Dynamic Flow Conditions. *Biochemistry* 36(41): 12412–12420.
- Hanley WD, Burdick MM, Konstantopoulos K, Sackstein R (2005) CD44 on LS174T colon carcinoma cells possesses E-selectin ligand activity. *Cancer Res* 65(13): 5812–5817.
- Hauser (2008) Zellorganellen, in: *Duale Reihe Biochemie*. Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R., Hrg., 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, S. 379–381.
- Heidemann F, Schildt A, Schmid K, Bruns OT, Riecken K, Jung C, Ittrich H, Wicklein D, Reimer R, Fehse B, Heeren J, Lüers G, Schumacher U, Heine M (2014) Selectins mediate small cell lung cancer systemic metastasis. *PLoS ONE* 9(4): e92327.
- Hiratsuka S, Goel S, Kamoun WS, Maru Y, Fukumura D, Duda DG, Jain RK (2011) Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation. *PNAS* 108(9): 3725–3730.
- Jacobs PP, Sackstein R (2011) CD44 and HCELL: Preventing hematogenous metastasis at step 1. *FEBS Lett* 585(20): 3148–3158.
- Jeffrey GM, Price CH, Sissons HA (1975) The metastatic patterns of osteosarcoma. *Br J Cancer* 32(1): 87–107.

Literaturverzeichnis

- Jiang M, Xu X, Bi Y, Xu J, Qin C, Han M (2014) Systemic inflammation promotes lung metastasis via E-selectin upregulation in mouse breast cancer model. *Cancer Biol Ther* 15(6): 789–796.
- Kannagi R (2007) Carbohydrate Antigen Sialyl Lewis A – its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung Med J* 30(3): 189–209.
- Köhler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U (2010) E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer* 102(3): 602–609.
- Krams (2019) Grundlagen der Pathologie, in: *Kurzlehrbuch Pathologie*. Kellner, Udo; Frahm, Sven Olaf; Mawrin, Christian; Krams, Matthias, Hrg., 3. Aufl. Thieme, Stuttgart, S. 35–36.
- Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA (2017) Emerging biological principles of metastasis. *Cell* 168(4): 670–691.
- Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR (2006) Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med* 4(48).
- Mathenge EG, Dean CA, Clements D, Vaghar-Kashani A, Photopoulos S, Coyle KM, Giacomantonio M, Malueth B, Nunokawa A, Jordan J, Lewis JD, Gujar SA, Marcato P, Lee PWK, Giacomantonio CA (2014) Core needle biopsy of breast cancer tumors increases distant metastases in a mouse model. *Neoplasia* 16(11): 950–960.
- McAllister RM, Gardner MB, Greene AE, Bradt C, Nichols WW, Landing W H (1971) Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma. *Cancer* 27: 397–402.
- McAllister SS, Weinberg RA (2014) The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* 16(8): 717–727.
- Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J (2004) Serum levels of IL-6 and TNF- α correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 90(12): 2312–2316.
- Mohan M, Matin A, Davies FE (2017) Update on the optimal use of bortezomib in the treatment of multiple myeloma. *Cancer Manag Res* 9: 51–63.

Literaturverzeichnis

- Müller M (2014/15) Chirurgie, 12. Aufl. Med. Verl.- und Informationsdienste., Breisach. 113, 196-197, 200, 245, 432.
- Nimrichter L, Burdick MM, Aoki K, Laroy W, Fierro MA, Hudson SA, Seggern CE von, Cotter RJ, Bochner BS, Tiemeyer M, Konstantopoulos K, Schnaar RL (2008) E-selectin receptors on human leukocytes. *Blood* 112(9): 3744–3752.
- Paget S (1989) The Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1: 571–573.
- Paramore A, Frantz S (2003) Bortezomib. *Nat Rev Drug Discov* 2: 611–612.
- Ragupathi G, Damani P, Srivastava G, Srivastava O, Sucheck SJ, Ichikawa Y, Livingston PO (2009) Synthesis of sialyl Lewis(a) (sLe(a), CA19-9) and construction of an immunogenic sLe(a) vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 58(9): 1397–1405.
- Read MA, Neish AS, Luscinskas FW, Palombella VJ, Maniatis T, Collins T (1995) The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity* 2(5): 493–506.
- Reboux G (2018) Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> Zugriff am 15.2.2021.
- Reymond N, Borda d'Água B, Ridley AJ (2013) Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* 13(12): 858–870.
- Ruhr Universität Bochum (2021) Translationale Proteomics. https://www.ruhr-uni-bochum.de/mpc/forschung/clinical_proteomics/cancerresearch.html.de Zugriff am 1.10.2021.
- Schumacher U, Stürken C (2016) Das Rätsel der Metastasierung. *Biol Unserer Zeit* 46(6): 350–356.
- St Hill CA (2011) Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. *Frontiers Biosci* 16(8): 3233–3251.
- Starzonek S, Maar H, Labitzky V, Wicklein D, Rossdam C, Buettner FFR, Wolters-Eisfeld G, Guengoer C, Wagener C, Schumacher U, Lange T (2020) Systematic analysis of the human tumor cell binding to human vs. murine E- and P-selectin under static vs. dynamic conditions. *Glycobiology* 30(9): 695–709.
- Stone EL, Ismail MN, Lee SH, Luu Y, Ramirez K, Haslam SM, Ho SB, Dell A, Fukuda M, Marth JD (2009) Glycosyltransferase function in core 2-type protein O glycosylation. *Mol Cell Biol* 29(13): 3770–3782.

Literaturverzeichnis

- Stübke K, Wicklein D, Herich L, Schumacher U, Nehmann N (2012) Selectin-deficiency reduces the number of spontaneous metastases in a xenograft model of human breast cancer. *Cancer Lett* 321(1): 89–99.
- Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl Bancroft C, Sausville E, Adams J, Elliott P, van Waes C (2001) Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamos cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7(5): 1419–1428.
- Thomas W (2008) Catch Bonds in adhesion. *Annu Rev Biomed Eng* 10: 39–57.
- Trinchera M, Aronica A, Dall'Olio F (2017) Selectin Ligands Sialyl-Lewis a and Sialyl-Lewis x in Gastrointestinal Cancers. *Biology (Basel)* 6(16).
- Valastyan S, Weinberg RA (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147(2): 275–292.
- Vetter C (2004) Proteasom-Inhibitor: Wenn die Zelle im Müll erstickt. *Dtsch Arztebl* 101(23): A-1691.
- Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C, Knebel Doeberitz M von (1998) Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 4(2): 343-348.
- Wicklein D, Schmidt A, Labitzky V, Ullrich S, Valent P, Schumacher U (2013) E- and p-selectins are essential for repopulation of chronic myelogenous and chronic eosinophilic leukemias in a scid mouse xenograft model. *PLoS ONE* 8(7): e70139.
- Yamaguchi K, Takagi Y, Aoki S, Futamura M, Saji S (2000) Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection. *Ann Surg* 232(1): 58–65.
- Ziprin P, Ridgway PF, Pfistermüller KLM, Peck DH, Darzi AW (2003) ICAM-1 mediated tumor-mesothelial cell adhesion is modulated by IL-6 and TNF-alpha: a potential mechanism by which surgical trauma increases peritoneal metastases. *Cell Commun Adhes* 10(3): 141–154.

8 Danksagung

Direkt nach dem Physikum – vor mittlerweile einigen Jahren – begann ich meine Promotion am Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie unter der Leitung von Prof. Schumacher. Ich danke Herrn Prof. Schumacher für alle Gespräche, sein stets offenes Ohr und dass ich unter seiner Leitung meine Dissertation anfertigen durfte.

Prof. Tobias Lange, der in kurzer Zeit von meinem Betreuer zu meinem Doktorvater wurde, gilt mein großer Dank. Sowohl zu Beginn in der experimentellen Phase als auch während des Schreibens nach meiner langen Mutterschaftspause stand er mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Immer konnte ich mich an ihn wenden und bekam in kürzester Zeit eine hilfreiche Antwort. Für diese Präsenz und die Betreuung bin ich ihm überaus dankbar und bin überzeugt, dass ich mir keinen besseren Doktorvater hätte wünschen können.

Dr. Vera Labitzky, Hanna Maar, Sarah Starzonek und dem gesamten Team des Instituts danke ich für ihren Beitrag an meiner Promotion und ihre Unterstützung. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Christine Knies, die mich in ihrer fürsorglichen Art begleitete und unterstützte und die ich jederzeit um Hilfe bitten durfte.

PD Dr. habil. Nana-Maria Wagner, die nicht nur eine liebe Freundin sondern längst Familie ist, danke ich für ihre professionelle Hilfe und jeden Rat und jede Erfahrung, von der ich profitieren durfte.

Der größte Dank gilt meinem Ehemann Lukas-R. Pahlow. Ohne seine Unterstützung, seine Gabe zur Motivation, seine Liebe und Geduld hätte ich diese Arbeit nicht beenden können. Er geleitete mich bei der Vervollständigung dieser Arbeit und er vervollständigt mich.

Ich bedauere, dass mein Großvater Dr. Hans L. Hansen diese Dissertationsschrift nicht mehr lesen konnte. Die Erinnerung an seine Disziplin und sein Durchhaltevermögen war mir stets eine Inspiration und Motivation, nicht aufzugeben.

Danksagung

Zuletzt danke ich meinen Eltern Angelika und Thomas Hansen und meiner Schwester Josefin Hansen, die mich durch mein Leben, mein Studium und auch durch diese Promotion begleitet haben. Durch ihren immerwährenden Einsatz in der liebevollen Betreuung unserer Söhne schenken sie mir Zeit, die mir die Vollendung dieser Dissertationsschrift ermöglicht hat. Ihnen widme ich diese Arbeit.

9 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt


Lebenslauf

10 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.

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, connected strokes. The signature is positioned above a dotted line.

Unterschrift: