

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie
Direktor: Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Gegenseitige Beeinflussung von CD24, CD44 und CD133 in humanen Kolonkarzinomzellen und ihre Bedeutung für die spontane Metastasierung im Xenograftmodell

Dissertation

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

vorgelegt von:

Markus Klaus Kukwa
aus Bergisch Gladbach

Hamburg 2021

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.04.2022**

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

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. Jasmin Wellbrock

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. Sarah Minner

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Das kolorektale Karzinom (CRC)	6
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Pathologie	6
1.1.2 Pathophysiologie	7
1.1.3 Metastasierungsverhalten	8
1.2 Der hämatogene Metastasierungsprozess von Karzinomen	8
1.2.1 Lokale Invasion.....	10
1.2.2 Intravasation	12
1.2.3 Zirkulation im Blutkreislauf.....	12
1.2.4 Adhäsion an das vaskuläre Endothel am Ort der künftigen Metastase.....	13
1.2.5 Extravasation	13
1.2.6 Metastatische Kolonisation	14
1.3 Die Tumorstammzellhypothese	14
1.3.1 CSCs und EMT	16
1.4 Kolorektale Tumorstammzellen	17
1.4.1 CD44	18
1.4.2 CD133/Prominin-1	20
1.4.3 CD24/HSA/Nectadrin.....	22
1.4.4 Markerkombination und Einfluss auf die Metastasierung	25
1.5 Wissenschaftliche Fragestellung / Zielsetzung	27
2. Methoden und Material	28
2.1 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien	28
2.2 Zellkultur	28
2.2.1 Subkultivierung	28
2.2.2 Kryokonservierung und Reaktivierung von humanen Tumorzellen	29
2.2.3 Erzeugung von Einzel- und Doppel-Knockdowns mittels shRNA.....	29
2.3 Bestimmung der Oberflächenproteine (CD-Moleküle) mittels Durchflusszytometrie	31
2.4 Xenograft-Mausmodell	32
2.4.1 Heterotope Transplantation humaner Tumorzellen in immundefiziente Mäuse	32
2.4.2 Gewebeentnahme	33
2.5 Untersuchung der murinen Gewebeproben auf humane DNA	34

2.5.1	Extraktion der genomischen DNA aus Blut und Lungengewebe	34
2.5.2	Bestimmung humanen Tumorzelllast in Mausblut und -gewebe mittels <i>real-time</i> PCR (Quantitative <i>Alu</i> -PCR)	34
2.6	Paraffinschnitttechnik	36
2.7	Immunhistochemie	37
2.8	Western Blot.....	38
2.8.1	Erstellung von Proteinextrakten aus Xenografttumoren	38
2.8.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test	39
2.8.3	Nachweis und Quantifizierung von Proteinen mittels Western Blot.....	40
3.	Ergebnisse.....	43
3.1	Durchflusszytometrie	43
3.2	Primärtumorwachstum und spontane systemische Disseminierung von HT29 Xenografts nach Einzel- und Doppel-Knockdown von CD24/CD133 in SCID-Mäusen	47
3.3	Histologische Aufarbeitung von Xenograft-Primärtumoren und Lungengewebe	48
3.4	Quantifizierung der CD24 und CD44 Proteinmengen in Xenografttumoren mittels Western Blot.....	50
4.	Diskussion.....	52
4.1	Änderungen der Expression von CD24, CD44 und CD133 nach KD von CD44 und CD24.....	52
4.2	Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung	54
4.3	Einfluss der Stammzellmarker auf die hämatogene Metastasierung im Xenograftmodell	58
4.4	Fazit und Ausblick	65
5.	Zusammenfassung	67
6.	Abstract	69
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	71
8.	Abbildungsverzeichnis.....	73
9.	Tabellenverzeichnis.....	73
10.	Literaturverzeichnis.....	74

11.	Danksagung	104
12.	Lebenslauf.....	105
13.	Eidesstattliche Versicherung	106

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom (CRC)

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Pathologie

Bösartige (maligne) Tumore nehmen unter allen Krankheiten, an denen ein Mensch leiden kann, eine Sonderstellung ein. Denn zum einen stellen Tumore in Deutschland hinter Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar (Barnes et al., 2016). Zum anderen wird die Diagnose Krebs oftmals als ein tiefer Einschnitt erlebt und zieht nicht selten folgenschwere Konsequenzen nach sich. Einer der häufigsten malignen Tumore in Deutschland und den Ländern der westlichen Welt ist das kolorektale Karzinom (CRC, „*Colorectal Carcinoma*“). In Deutschland betrifft etwa jede achte Krebserkrankung den Dickdarm (Kolon) bzw. Mastdarm (Rektum) (Barnes et al., 2016). Mittlerweile haben Verbesserungen beim Screening, der Diagnostik und der Behandlung des CRC die Langzeitüberlebensraten von Patienten mit Erkrankungen im Frühstadium signifikant erhöht, dagegen sind die Ergebnisse von Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung immer noch unbefriedigend (Bilgin et al., 2017).

Im Jahr 2016 lag die Inzidenz in Deutschland bei ca. 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Barnes et al., 2016) und es wird angenommen, dass die globale Rate der CRC-Neuerkrankungen bis 2030 um 60% steigen wird (Siegel et al., 2021, Arnold et al., 2017). Das Erkrankungsrisiko nimmt mit höherem Lebensalter zu. Mehr als die Hälfte der Patienten erkrankt jenseits des 70. Lebensjahres, nur etwa 10 % der Krebserkrankungen treten vor dem 55. Lebensjahr auf (Barnes et al., 2016).

Die Risikofaktoren für die Entstehung eines CRC sind vielfältig. Neben Lebensstil-assoziierten Risikofaktoren wie Übergewicht und Bewegungsmangel erhöhen toxische und Ernährungs-assoziierte Risikofaktoren wie ballaststoffarme Ernährung, ein erhöhter Verzehr von rotem Fleisch bzw. verarbeiteten Wurstwaren, sowie regelmäßiger Alkohol- oder Tabakkonsum das Karzinomrisiko (Barnes et al., 2016, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019). Zusätzlich scheinen genetische Aspekte einen Einfluss zu haben. 2-5% der CRC treten im Rahmen eines erblichen Tumorsyndroms wie dem Lynch-Syndrom oder der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) auf (Jasperson et al., 2010). Auch eine positive Familienanamnese für CRC, als Hinweis für eine genetische Belastung, kann das Karzinomrisiko signifikant erhöhen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019, Bonelli et al., 1988, Boutron et al., 1995).

Histologisch liegt in > 90 % der Fälle ein Adenokarzinom vor, die restlichen Prozente verteilen sich auf seltenere Entitäten und umfassen unter anderem muzinöse Adenokarzinome („Gallertkarzinome“), Siegelringkarzinome, kleinzellige Karzinome, Plattenepithelkarzinome, undifferenzierte Karzinome oder adenosquamöse Karzinome (Barnes et al., 2016, Rosien und Layer, 2017).

1.1.2 Pathophysiologie

Bereits in den 1980er Jahren wurde durch den amerikanischen Onkologen Bert Vogelstein die Hypothese aufgestellt, dass die Krebsentstehung durch mehrere, aufeinanderfolgende Mutationen wie Punktmutationen und Deletionen erfolgt (Kinzler und Vogelstein, 1996, Cho und Vogelstein, 1992a, Cho und Vogelstein, 1992b). Dieses Modell, heute als der „klassische Weg“ bezeichnet, ist der am längsten bekannte Karzinogeneseweg und wird in weiten Teilen auch heutzutage noch als gültig erachtet. Diese sog. Adenom-Karzinom-Sequenz beschreibt, entsprechend einer *Multistep* - Karzinogenese, die schrittweise Akkumulation genetischer Alterationen mit konsekutiven Onkogenaktivierungen und schrittweisem Verlust von Tumorsuppressor-Genen, die erst zur Entstehung eines Adenoms und dann zur Entwicklung eines invasiven Karzinoms führen (Vogelstein et al., 1988, Fearon und Vogelstein, 1990, Foulds, 1958, Laurent-Puig et al., 1999). In welcher Reihenfolge die Mutationen auftreten ist dabei sekundär, viel entscheidender für die Karzinomentstehung ist die Gesamtakkumulation der genetischen Alterationen (Fearon und Vogelstein, 1990). So zeigen sich im Laufe der Entwicklung eines CRC klassische Mutationen in mindestens vier Genen, gewöhnlich im Onkogen KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) sowie in den drei Tumorsuppressor-Genen APC (*adenomatous polyposis coli*), SMAD4 (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) und P53 (*tumor suppressor p53*) (Fodde et al., 2001, Drost et al., 2015).

Ein anderer Entstehungsweg ist der alternative „serratierte Karzinogeneseweg“, der von Schleimhautvorwölbungen im Bereich des Kolons, sog. Polypen, ausgeht. Genauer gesagt von sessilen serratierten Läsionen, die eine heterogene Gruppe von Polypen mit malignem Potenzial darstellen, zu denen unter anderem traditionelle serratierte Adenome und sessile serratierte Polypen zählen (Rex et al., 2012). Diese auch als Vorläuferläsionen bezeichneten Polypen gehen mit bestimmten epigenetischen Promotor-(CpG)-Methylierungen und hoher Mikrosatelliten-Instabilität einher, die im weiteren Verlauf zur Entstehung eines CRC führen (Hofheinz et al., 2018, Snover et al., 2005).

1.1.3 Metastasierungsverhalten

Das CRC metastasiert vorwiegend hämatogen, aber auch lymphogen und *per continuitatem* (kontinuierlich übergreifend entlang anatomisch verbundener Strukturen). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegen bei einem Viertel der Patienten mit CRC bereits hämatogene Metastasen insbesondere in der Leber vor. Metastasierende Kolontumorzellen folgen zur weiteren hämatogenen Filialisierung den venösen Abflüssen. Entweder über die V. portae hepatis primär in die Leber, die erste hämatogene Filterstation der Tumorzellen, oder, bei tiefen Rektumkarzinomen, über die V. cava primär in die Lunge. Häufig zeigen sich bei CRC zudem metastatische Absiedelungen entlang des Bauchfells (Peritonealkarzinose). Seltener (< 1 – 2 %) finden sich Metastasen in nicht-regionären Lymphknoten, den Ovarien, oder dem Skelett (Böcker et al., 2019, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019). Die Fünf-Jahres-Überlebensrate sinkt mit fortschreitender Tumorausbreitung rapide, ausgehend von 90 % bei Patienten mit auf die Darmwand beschränktem Wachstum auf 33 – 76 %, sobald regionale Lymphknoten befallen sind. Liegen bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen vor, sinkt die Fünf-Jahres-Überlebensrate auf 5 – 10 % (Link et al., 2005). Bei 20 – 25 % der Patienten werden bei der Erstdiagnose synchrone, bei weiteren 20 – 50 % metachrone Lebermetastasen festgestellt (Bockhorn et al., 2008, Slessor et al., 2013, Gomez et al., 2014, van Gestel et al., 2014). Aktuelle Studien zufolge scheint der Zeitpunkt des Auftretens der Metastasierung keinen Einfluss auf das Langzeitüberleben der Patienten zu haben (Bova et al., 2014).

Insgesamt sind Metastasen die Ursache für über 90 % der tumorbedingten Todesfälle bei soliden Tumoren (Gupta und Massagué, 2006) und die Tumorausbreitung mit Bildung von Metastasen wird als die bedrohlichste Eigenschaft bösartiger Tumoren bezeichnet (Hanahan und Weinberg, 2011). Obwohl die Metastasierung, wie am Beispiel des CRC gezeigt, erhebliche Auswirkungen auf die Prognose der Patienten hat, sind viele Schritte dieses komplexen Prozesses immer noch wenig verstanden (Chaffer und Weinberg, 2011).

1.2 Der hämatogene Metastasierungsprozess von Karzinomen

Größtenteils haben Zellen im menschlichen Körper einen „festen Platz“. Ein Enterozyt (Darmepithelzelle) beispielsweise ist Teil eines Gewebeverbands. Er verbleibt im Gewebeverband des Darms, ist dort unter anderem für die Aufnahme verschiedener Stoffe aus der Nahrung zuständig und wandert nicht in andere Organe. Von dieser Regel gibt es

nur wenige Ausnahmen, wie etwa Zellen des Immunsystems, embryonale Zellen, oder Tumorzellen. Maligne Tumorzellen überschreiten festgelegte anatomische Grenzen, wachsen zerstörend in das umgebende Gewebe ein und breiten sich dort aus. Dieses invasive Wachstum ebnet den Weg für den nächsten Schritt der Tumorausbreitung im Körper, die Metastasierung. Einige Tumorzellen lösen sich aus ihrem Zellverband, verlassen den sog. Primärtumor und bilden an anderen Stellen im Körper neue Tochtergeschwülste. Diese neu entstandenen Tochtergeschwülste werden Metastasen (vom griechischen Wort für Übersiedlung) oder Filiae (vom Lateinischen *filia* für Tochter) genannt.

Heute verstehen wir die Entstehung von Metastasen als einen hochselektiven, kaskadenartig ablaufenden Prozess, der aus einer Serie von Schritten besteht, die aufeinanderfolgen, miteinander verknüpft sind und von zellbiologischen Ereignissen begleitet werden (Lange et al., 2014, Talmadge und Fidler, 2010, Chambers et al., 2002).

Allen voran für die Metastasierung von Karzinomen, die ca. 80 % der Krebsfälle und damit die Mehrheit der Krebstodesfälle ausmachen, konnten mehrere Mechanismen aufgedeckt werden, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll (Lambert et al., 2017).

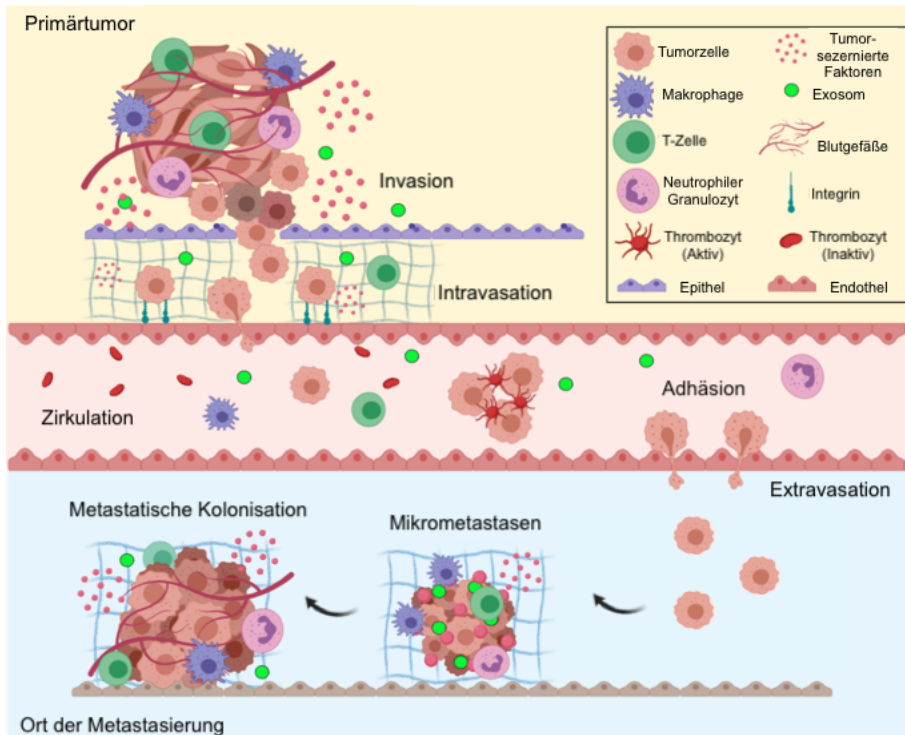


Abbildung 1: Überblick über die Metastasierungskaskade. Der Metastasierungsprozess lässt sich im Wesentlichen in 5 wichtige Teilschritte gliedern: Invasion, Intravasation, Zirkulation, Extravasation und Kolonisation (Talmadge und Fidler, 2010). Nach der malignen Transformation einer Epithelzelle und ihrer unkontrollierten Vermehrung entsteht der Primärtumor. Im nächsten Schritt, der lokalen Invasion, breiten sich primäre Tumorzellen aus dem Primarius über die zugrundeliegende Basalmembran hinaus in das umgebende Gewebe aus. Schreitet das Tumorwachstum weiter voran, finden die Tumorzellen Anschluss an das Gefäßsystem und es kommt zur sog. Intravasation. Die nächsten beiden Schritte bilden die Zirkulation der Tumorzellen im hämatogenen Transit und die Adhäsion am Endothel des zukünftigen Metastasenortes. Hierauf folgt die sog. Extravasation, bei der die Tumorzellen transendothelial in das Gewebeparenchym migrieren. Den Abschluss dieses Prozesses bildet die sog. Kolonisierung, die Bildung mikrometastatischer Kolonien sowie die anschließende Proliferation der mikroskopischen Kolonien zu klinisch nachweisbaren metastatischen Läsionen. (Abbildung modifiziert nach (Fares et al., 2020))

1.2.1 Lokale Invasion

Voraussetzung für eine spätere Metastasierung ist naturgemäß die Entstehung eines Primärtumors, eingeleitet durch die maligne Transformation einer Epithelzelle und einem damit verbundenen unkontrollierten Wachstum im Epithelverband. Nach aktuellem Wissensstand wird die maligne Transformation durch Schäden in DNA-Reparaturmechanismen ausgelöst, infolge derer es zur Akkumulation von Mutationen besonders in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen kommt (Weinberg, 1996). Als Folge dieser Mutationen werden verschiedene Signalwege aktiviert, die ein Fortschreiten der malignen Transformation weiter befeuern.

Vorläufig begrenzen kann dieses Wachstum die physiologisch vorhandene Basalmembran (BM), auf der die Epithelzellen verankert sind. In diesem Tumorstadium spricht man von einem *Carcinoma in situ* (wörtlich: „Krebs am Ursprungsort“). Die Basalmembran, eine mehrheitlich von Glykoproteinen gebildete dreidimensionale Grenzsicht, bildet im übertragenen Sinne eine Brücke zwischen den Epithelzellen und der darunterliegenden Extrazellulärmatrix (ECM) des Bindegewebes. Darüber hinaus fungiert sie als mechanische

Barriere, die innerhalb gewisser Grenzen verhindert, dass Krankheitserreger und maligne transformierte Zellen in tiefere Gewebsschichten vorstoßen können. Krebszellen folgen zwei Hauptverbreitungswegen: den Lymphbahnen und dem Blutkreislauf. Dies erklärt auch, warum maligne transformierte Zellen, die die Basalmembran noch nicht infiltriert und überwunden haben, keine Chance zur Metastasierung haben, da sie keinen direkten Kontakt zu ihren zwei Hauptverbreitungswegen erhalten.

Die Versorgung eines Primärtumors mit Nährstoffen und Sauerstoff durch passive Diffusion ist bis zu einem Tumordurchmesser von 1 bis 2 mm möglich (Folkman, 1995, Folkman, 1971). Das weitere Wachstum über diese kritische Größe hinaus erfordert den Aufbau eines neuen Gefäßnetzwerks im umgebenden Wirtsgewebe (Neoangiogenese) (Folkman, 1995, Folkman et al., 1966). Tumorzellen können den Aufbau von Gefäßen aktiv durch die Sezernierung von proangiogenen Faktoren wie beispielsweise VEGF stimulieren (Folkman, 1983, Folkman und Klagsbrun, 1987, Ferrara, 2004).

Nun setzt ein wichtiger zellbiologischer Prozess ein, durch den maligne Tumorzellen Eigenschaften erwerben, die sie in die Lage versetzen, ihren Ursprungsort zu verlassen und sich weiter im Körper auszubreiten. Dieses zellbiologische Programm, die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), wird normalerweise primär während der Embryogenese und bei Erwachsenen zur Heilung von Epithelgeweben durchlaufen (Kang und Massagué, 2004). Die EMT wird durch eine Reihe von pleiotrop wirkenden Transkriptionsfaktoren (TFs) dirigiert (Ouyang et al., 2010, Moreno-Bueno et al., 2009). Die malignen Tumorzellen „kapern“ dieses Programm und verlieren in diesem Prozess übergangsweise ihren epithelialen Charakter und nehmen einen migrationsfähigen, invasiven, mesenchymalen Charakter an (Hanahan und Weinberg, 2011, Valastyan und Weinberg, 2011). Konkret bauen maligne Tumorzellen ihre epithelialen (homophilen) Zell-Zell-Kontakte, wie bspw. die über E-Cadherin vermittelten Adhärenskontakte, ab, verändern ihr Zytoskelett, lösen sich von ihrer Basalmembran und verlieren ihre baso-apikale Polarität (Kalluri und Weinberg, 2009). Der so erworbene mesenchymale Phänotyp ermöglicht die Auflösung der Tumor-umgebenden ECM und ein Durchbrechen der Basalmembran (lokale Invasion). Ist die Basalmembran überwunden, können sich die malignen Tumorzellen ungehindert im umliegenden Bindegewebe (Stroma) ausbreiten (Scheel und Weinberg, 2012, Thiery et al., 2009, Nieto et al., 2016). Die lokale Invasion des Wirtsstromas durch die malignen Tumorzellen kann durch mehrere Mechanismen erfolgen, wie bspw. durch Freisetzung matrix-degradierender Enzyme. So regulieren die betroffenen Tumorzellen im Zuge der EMT die Expression verschiedener Matrix-Metalloproteinasen herauf (Gilles et al., 2013, Radisky und Radisky, 2010). Die Aktivierung des oben erwähnten EMT-Programms scheint

den künftig metastasierenden Tumorzellen auch überlebenswichtige Stammzell (SC)-Merkmale zu verleihen, die für die metastatische Besiedlung von hoher Relevanz sein könnten (Mani et al., 2008, Morel et al., 2008). Hierauf wird später näher eingegangen.

1.2.2 Intravasation

Im nächsten Schritt der Metastasierungskaskade, der Intravasation, treten die migrierenden malignen Tumorzellen in die Lumina von Lymph- oder Blutgefäßen ein. Die Verbreitung der malignen Tumorzellen über den hämatogenen Kreislauf stellt hierbei den Hauptmechanismus der Tumorausbreitung dar (Gupta und Massagué, 2006). Bei der Intravasation von malignen Tumorzellen spielen vor allem Proteinasen, akzessorische Zellen, Integrine und die Permeabilität neu gebildeter Tumorkapillaren eine wichtige Rolle (Wagener und Müller, 2010, Carmeliet und Jain, 2011, Hamidi und Ivaska, 2018).

1.2.3 Zirkulation im Blutkreislauf

Durch den Übertritt in die Blutgefäße können sich die malignen Tumorzellen über den venösen und arteriellen Kreislauf weit im Körper eines Krebspatienten verbreiten (Pantel et al., 2008). Die nun als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bezeichneten Zellen müssen im hämatogenen Kreislauf eine Vielzahl von Belastungen überstehen und überleben, um Metastasen bilden zu können. Die erste Belastungsprobe an die CTCs stellt der vollständige Kontaktverlust zur ECM des Primarius dar. Epitheliale Zellen, die sich von der ECM ablösen, sind physiologisch nicht dauerhaft überlebensfähig, da nach Verlust der Adhäsion an ECM-Komponenten eine spezielle Form des programmierten Zelltods (Apoptose) (Meredith et al., 1993), die intrinsische Apoptose, ausgelöst wird, auch bezeichnet als *Anoikis* (Frisch et al., 2013, Guo und Giancotti, 2004). Unter physiologischen Bedingungen soll so verhindert werden, dass „heimatlose“ Zellen dem Organismus schaden, indem sie sich in fremden Geweben ansiedeln. CTCs erwerben, vermutlich während des EMT-Prozesses, eine gewisse Anoikis-Resistenz. Sie können die Anoikis bis zu einem gewissen Grad supprimieren und so deren physiologische Kontrolle unterlaufen (Frisch et al., 2013). Auf Proteinebene wirken zum Beispiel eine abnehmende E-Cadherin-Expression und eine zunehmende N-Cadherin-Expression als Verstärker der Anoikis-Resistenz in menschlichen Tumoren (Kim et al., 2012).

Neben diesen durch die Matrixablösung verursachten Belastungen wirken auf die CTCs im Blutkreislauf hämodynamische Scherkräfte sowie Angriffe von Zellen des angeborenen Immunsystems, vor allem von natürlichen Killerzellen (Headley et al., 2016). Um diesen beiden Bedrohungen auszuweichen, kopieren CTCs einige Mechanismen der physiologischen Blutgerinnung. Durch intravasale Wechselwirkung mit Thrombozyten über

die Expression von Gewebefaktor und Bindung an das P-Selektin der Thrombozyten mit Hilfe von P-Selektin-Liganden auf der Tumorzelloberfläche gelingt die Bildung relativ großer, plättchenbeschichteter Tumorzellaggregate (Nierodzik und Karpatkin, 2006). Man nimmt an, dass Tumorzellen sich mit Hilfe dieses Thrombozytenmantels der Immunerkennung entziehen und sich zusätzlich besser gegen Scherkräfte abschirmen können (Joyce und Pollard, 2009, Palumbo et al., 2005). Diese plättchenbeschichteten Tumorzellaggregate zirkulieren dann nicht nur effektiver im Kreislauf, gleichzeitig erhöht sich aufgrund des größeren Durchmessers auch die Wahrscheinlichkeit von Mikroembolien mit Einschluss in einem Kapillarbett (Gay und Felding-Habermann, 2011).

1.2.4 Adhäsion an das vaskuläre Endothel am Ort der künftigen Metastase

Obwohl CTCs theoretisch über die Fähigkeit verfügen, sich im gesamten Körper auszubreiten, zeigt die klinische Realität einen Organotropismus einzelner Karzinomtypen (Fidler, 2003). Die Frage, ob es sich bei dem Organotropismus um einen passiven oder aktiven Prozess handelt, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Der Organotropismus könnte einen passiven Prozess widerspiegeln, bei dem CTCs in Kapillarbetten aufgrund der Anordnung und Größenbeschränkungen der Blutgefäße zum Stillstand kommen. Andererseits könnte der Organotropismus auch auf die Fähigkeit von CTCs hinweisen, mit ihren Liganden mit, je nach Zielorgan unterschiedlichen, Rezeptoren auf den Endothelzellen der Gefäßwände zu interagieren. Hier spielt beispielsweise die unterschiedliche Regulation der E-Selektin-Expression auf Endothelzellen der Lunge (cytokin-induziert) und des Knochenmarks (konstitutiv) eine große Rolle (Schweitzer et al., 1996).

1.2.5 Extravasation

Sobald sich CTCs im Mikrogefäßsystem entfernter Organe befinden, führt der Einschluss im Kapillarbett entweder zu einem mikrovaskulären Bruch oder zwingt die Zellen zur Extravasation (Massague und Obenauf, 2016). Während der Extravasation durchqueren Karzinomzellen die Endothelwand der Gefäßlumina und gehen in das Gewebeparenchym über. Dieser Prozess wird auch transendotheliale Migration (TEM) genannt (Reymond et al., 2013). Die Extravasation ist ein komplexer Prozess, der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, Chemokine und zirkulierende Blutzellen umfasst (Stegner et al., 2014, Alix-Panabieres und Pantel, 2016, Reymond et al., 2013). Bei der organspezifischen Metastasierung, also der Bestimmung der Orte für die Tumorzell-Extravasation und -

Kolonisierung, scheinen insbesondere Integrine eine entscheidende Rolle einzunehmen (Hamidi und Ivaska, 2018).

1.2.6 Metastatische Kolonisation

Das Wachstum einer metastasierten Tumorzellkolonie stellt den finalen Schritt der metastatischen Kaskade dar. Die extravasierten Karzinomzellen sind nun einem neuen, bisher unbekanntem Gewebemikromilieu im Zielorganstroma ausgesetzt (Valastyan und Weinberg, 2011). Allerdings scheint der Großteil der im Kreislauf befindlichen CTCs sehr schlecht auf das Wachstum in diesem neuen Gewebemikromilieu vorbereitet zu sein. Experimentelle Schätzungen nach intravenöser Injektion von Tumorzellen zeigen, dass nur 0,01 % aller CTCs im Blut tatsächlich später metastatische Kolonien bilden (Chambers et al., 2002, Sugarbaker, 1993).

Die metastatische Ineffizienz beruht allem Anschein nach darauf, dass die Tumorzellen nach Disseminierung in das Zielorgan im neuen, bisher unbekanntem Gewebe keine Metastasen ausbilden (Luzzi et al., 1998).

Das Schicksal der in das Stroma des Metastasenorgans disseminierten Tumorzellen (DTCs) könnte ab diesem Zeitpunkt mehrere Richtungen einschlagen. Die DTCs können weiter proliferieren und aus den mikroskopischen Kolonien hin zu klinisch nachweisbaren metastatischen Läsionen auswachsen. DTCs ohne geeignete Interaktionssignale unterliegen möglicherweise einem Wachstumsstop und werden apoptotisch (Malanchi et al., 2011) oder persistieren mehrere Jahre als Mikrometastasen in einem Latenzzustand, der „*dormancy*“, bis zur Wiederaufnahme der Proliferationsfähigkeit und Ausbildung von Makrometastasen/Tumorrezidiven (Luzzi et al., 1998, Pantel und Brakenhoff, 2004, Gomis und Gawrzak, 2017).

Der Weg einer Tumorzelle aus dem Primarius in das Gefäßsystem bis zum endgültigen Metastasierungsort ist lang und erfordert eine große Adaptionsfähigkeit. Die Vermutung liegt nahe, dass für die Tumorprogression, -invasion und -metastasierung nur widerstandsfähige und insbesondere anpassungsfähige Tumorzellen in Frage kommen.

1.3 Die Tumorstammzellhypothese

Es ist seit langem bekannt, dass Tumore komplexe Strukturen bilden, die aus einer heterogenen Population von Zellen mit verschiedenen Niveaus der Zelldifferenzierung und morphologischen Merkmalen bestehen (Heppner, 1984). Gleichzeitig wird angenommen,

dass die meisten Tumoren monoklonalen Ursprungs sind (Fialkow, 1976, Vogelstein et al., 1985). Folgt man dieser Annahme, muss der ursprüngliche Tumor in der Lage sein, all die verschiedenen Tumorzell-Zustände einzunehmen, die in den heterogenen Tumoren vorkommen. Bereits 1855 stellte der deutsche Pathologe Rudolph Virchow die Hypothese auf, dass Tumore durch die Aktivierung ruhender Zellen entstehen, die embryonalen Zellen ähneln (Kesselburg, 2013).

Heutzutage werden diese Zellen als Krebsstammzellen (CSCs) oder tumorinitiierende Zellen (TICs) bezeichnet und gelten als Treiber der Tumorentstehung und des Tumorwachstums (Capp, 2019, Spillane und Henderson, 2007, Reya et al., 2001). Die Tumorstammzellhypothese geht davon aus, dass nicht alle Tumorzellen die gleichen Eigenschaften besitzen und dazu in der Lage sind ein Tumorwachstum zu initiieren. Vielmehr existiert eine kleine Zellpopulation mit Stammzeleigenschaften innerhalb der gesamten Tumorzellmasse, die für die Tumorentstehung notwendig und ausreichend ist. Die zelluläre Tumorerheterogenität entsteht demnach aus einer hierarchischen Organisation im Tumor, mit den pluripotenten CSCs an der Spitze dieser Hierarchiepyramide (Bonnet und Dick, 1997). In diesem Modell teilt sich die sich selbst erneuernde CSC, um Tumorzell-Subpopulationen mit begrenzterer Replikationsfähigkeit zu generieren. Diese Subpopulationen machen dann für gewöhnlich den Großteil der Tumormasse aus (Abb. 2) (Clarke et al., 2006).

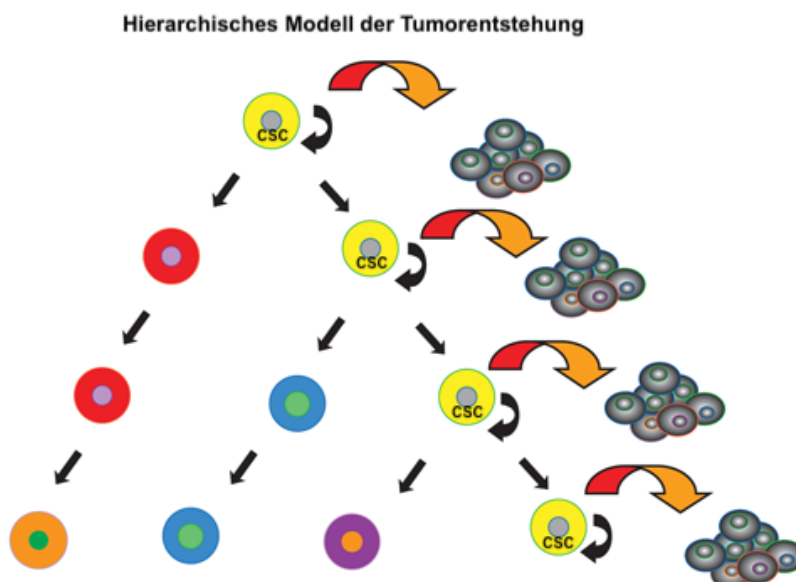


Abbildung 2: Hierarchisches Modell der Tumorentstehung. In diesem Modell der Tumorentstehung haben nur Krebsstammzellen (CSC, gelb) das Potenzial, das Tumorwachstum zu initiieren und aufrecht zu erhalten (große Pfeile). Alle anderen Tumorzellen sind vergleichsweise „differenziert“. Tumorerheterogenität entsteht durch Mutationen in CSCs und Differenzierung ihrer Nachkommen. (Abbildung modifiziert nach (Rahman et al., 2011))

Die CSCs weisen viele Eigenschaften auf, die auch Stammzellen zugeschrieben werden (Wang und Dick, 2005, Dalerba et al., 2007a):

- Stammzellen und CSC sind wenig differenziert
- Beide Zelltypen besitzen die Fähigkeit zur Migration und Selbsterneuerung
- Sowohl CSC als auch Stammzellen besiedeln bestimmte Gewebenischen bevorzugt
- Beide Zelltypen bringen Zellen hervor, die in verschiedene Zelltypen ausdifferenzieren können

Zusätzlich weisen CSCs tumorspezifische Eigenschaften auf, die neben der Fähigkeit zur Metastasenbildung auch unkontrollierte Proliferation und erhöhten Widerstand gegen Apoptose umfassen (Ricci-Vitiani et al., 2008).

CSCs wurden durch ihre Fähigkeit definiert, experimentell mit hoher Effizienz neue Tumore zu bilden, wenn sie in limitierenden Verdünnungen in immungeschwächte Wirtsmäuse xenotransplantiert werden (Alison et al., 2011). Die Isolation von CSCs gelang erstmals in Studien zur akuten myeloischen Leukämie (Lapidot et al., 1994) und später bei soliden malignen Erkrankungen wie Mamma- (Al-Hajj et al., 2003), Kolon- (O'Brien et al., 2007, Ricci-Vitiani et al., 2007) und Pankreaskarzinomen (Hermann et al., 2007). Das enorme tumorigene Potential der CSCs könnte für die Kolonisierung, den letzten Schritt der metastatischen Kaskade, von entscheidender Bedeutung sein.

1.3.1 CSCs und EMT

Tumormetastasierung ist ein hochkomplexer Prozess, der nur durch molekulare Anpassungen der Tumorzellen möglich wird. Ergänzend zur Tumorstammzellhypothese wird die Tumorentwicklung als plastischer Prozess betrachtet, bei dem normale Krebszellen, z. B. als Reaktion auf zellulären Stress, zum einen in CSCs de-differenzieren, bei entsprechenden Signalen aber auch wieder in alle im Tumor vorkommenden Zelltypen differenzieren können (Abb. 3) (Visvader und Lindeman, 2012). Diese Differenzierungs- und De-differenzierungsprozesse, auch als „dynamisches CSC Modell“ zusammengefasst, sind eng mit der EMT und dessen Umkehrprozess, der Mesenchymal-epithelialen Transition (MET) verbunden (Steinbichler et al., 2018, Vermeulen et al., 2012).

CSC-Populationen in CRC-Primärtumoren werden entweder durch Expression des Oberflächenmarkers CD133 (O'Brien et al., 2007, Ricci-Vitiani et al., 2007) oder durch Koexpression von CD166 und CD44 (Dalerba et al., 2007b) identifiziert. Darüber hinaus wird die Koexpression von CD44 und CD24 als zusätzlicher CSC-Phänotyp in etablierten CRC-Zelllinien vorgeschlagen (Yeung et al., 2010). Einige Berichte implizieren, dass neben diesen Oberflächenmarkern auch die Expression von EpCAM, CD26, CD29 und ALDH1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit SC-Eigenschaften von CRC assoziiert sein könnte (Klonisch et al., 2008, Lugli et al., 2010). Im Fokus dieser Arbeit stehen vor allem die Oberflächenmarker CD24, CD44 und CD133, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

1.4.1 CD44

CD44 ist ein transmembranes Glykoprotein und wird ubiquitär im gesamten Körper unter anderem von embryonalen Stammzellen, Bindegewebe oder von hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks exprimiert (Gronthos et al., 2001, Domev et al., 2012). Es fungiert über seine extrazelluläre Domäne als Rezeptor für Hyaluronsäure (HA), einen häufig vorkommenden Bestandteil der ECM, der von Stroma- und Krebszellen gebildet wird (Banerjee et al., 2016). Zudem übt CD44 signifikante Effekte auf die Invasion und Metastasierung verschiedener Tumortypen aus (Chaffer und Goetz, 2018), darunter Adenokarzinome der Lunge (Wang et al., 2019a), Mammakarzinome (Xu et al., 2016), CRC (Mohamed et al., 2019), Prostatakarzinome (Senbanjo et al., 2019) oder Pankreaskarzinome (Liu et al., 2018).

Auch für das CRC spielt CD44 eine bedeutende Rolle. CD44-positive CRC-Zellen zeigen im Vergleich zu CD44-negativen Zellen eine aggressive Proliferation, eine erhöhte Fähigkeit zur Koloniebildung, Unempfindlichkeit gegenüber Apoptose und Resistenz gegen Chemo- und Strahlentherapien (Wang et al., 2012, Cho et al., 2012). Der Abbau von CD44 mit shRNA (*small hairpin* RNA) führt zu einer Verringerung der Zellproliferation, -migration und -invasion, jedoch auch zu einer Hemmung der Apoptose (Lee et al., 2017). Eine Metaanalyse von Wang et al. über den prognostischen und klinischen Wert von CD44 bei Darmkrebs zeigt, dass die Überexpression von CD44 ein ungünstiger Prognosefaktor für CRC-Patienten ist und zur Vorhersage einer schlechten Differenzierung, Lymphknotenmetastasierung und Fernmetastasierung verwendet werden kann (Wang et al., 2019b).

CD44 besitzt multiple Signalfunktionen durch seine Interaktionen mit diversen Proteinen. Neben seiner Funktion für die Zell-Matrix-Interaktion reguliert CD44 unter anderem die Zell-Zell-Interaktion, Zelladhäsion und Migration (Spring et al., 1988). Zusätzlich fungiert CD44 nicht nur als Rezeptor für Hyaluronsäure, sondern auch für Osteopontin, Kollagene und Matrix-Metalloproteinasen (Goodison et al., 1999), sowie als Co-Rezeptor und Organisator im kortikalen Aktin-Skelett (Naor et al., 2008). Wie unter 1.2.1 beschrieben, spielt die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression und fördert die weitere lokale Tumordinvasion (Bourguignon et al., 2014). Zudem scheint CD44 die hämatogene Ausbreitung durch Interaktion mit Selektinen zu unterstützen (Napier et al., 2007). Bei Brustkrebszellen führt ein KD (*knockdown*) von CD44 zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation (Nam et al., 2015). Eine Studie von Takaishi et al. an Magenkarzinomzellen zeigt zudem, dass ein KD von CD44 die Bildung von sphärischen Tumorkolonien und das Tumorstadium in immundefizienten Mäusen reduziert (Takaishi et al., 2009).

Weiterhin wird angenommen, dass CD44 eine Rolle bei der adaptiven Plastizität von Tumorzellen spielt (Zhao et al., 2016). Unter adaptiver Plastizität versteht man die Fähigkeit einer Tumorzelle, verschiedene Identitäten entlang eines phänotypischen Spektrums anzunehmen, um eine optimale Anpassung an die jeweilige Umgebung zu ermöglichen. Dies geschieht in Interaktion mit u.a. der Tumormikroumgebung und soll die selektive Wachstums- und Überlebensfähigkeit gewährleisten. Ein wichtiges Konzept der zellulären Plastizität stellt die EMT dar. Tumorzellen, die die EMT durchlaufen, erhalten nicht nur SC-ähnliche Eigenschaften (siehe oben), sondern zeigen zudem eine erhöhte Invasivität und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Zhao et al., 2016). In einer Studie von Mani et al. mit Mammakarzinomzellen geht dieser Prozess mit einer Zunahme der CD44-Expression einher (Mani et al., 2008). Auch in CRC-Zellen korreliert der EMT-Phänotyp mit der CD44-Expression. Eine Zunahme der CD44-Expression stärkt den eher mesenchymalen Phänotypen entlang des EMT-Spektrums, ein Abbau verringert ihn. Der durch die Überexpression von CD44 erhöhte mesenchymale Phänotyp ist charakterisiert durch eine herunterregulierte E-Cadherin-Expression, hochregulierte N-Cadherin-, α -Actin-, Vimentin- und Fibronectin-Expression und inhibiert die Bildung des membranassoziierten E-Cadherin- β -Catenin-Komplexes, was zur Zellinvasion und -migration führt (Cho et al., 2012). In einer weiteren Arbeit von Du et al. führt der Verlust von CD44 zum Verlust von SC-Eigenschaften, sodass CD44 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung dieser SC-Eigenschaften spielen könnte (Du et al., 2008).

Eine mögliche Erklärung für die Funktionsvielfalt von CD44 könnte darin liegen, dass dieses Protein eine ganze Gruppe unterschiedlicher Isoformen umfasst. Generiert werden die Isoformen durch alternatives *splicing*, während die translatierten Proteine zusätzlich unterschiedlich glykosyliert sein können (Wielenga et al., 1993, Borland et al., 1998). Die unterschiedlichen funktionellen Rollen der CD44-Standard-Isoform (CD44s) und anderer spezifischer CD44-Varianten (CD44v) sind nicht vollständig verstanden, die Expression verschiedener CD44-Isoformen scheint jedoch für die Tumorprogression notwendig zu sein (Gunthert et al., 1995, Wang et al., 2009). Für das CRC hat besonders die Isoform CD44v6 großes Interesse geweckt. CD44v6 ist nicht nur in etwa 60-70 % aller CRC exprimiert, sondern konnte auch als Teil einer positiven Feedback-Schleife zur K-Ras Aktivierung identifiziert werden (Zhang et al., 2003). Zusätzlich agiert CD44v6 als Cofaktor bei der Aktivierung von VEGF-R (*Vascular Endothelial Growth Factor*-Rezeptor) und ist dementsprechend stark mit Angiogenese und der weiteren Tumorausbreitung assoziiert (Tremmel et al., 2009).

Die CD44-Expression kann auf verschiedene Weisen reguliert werden. Spezifische Transkriptionsrepressoren und -aktivatoren wurden identifiziert, die die CD44-Promotoraktivität regulieren. Hierzu zählen unter anderem SP1, EGR1, P53, NF- κ B und ETS-1 (Yan et al., 2016, Chen et al., 2018). Darüber hinaus sind epigenetische Mechanismen, miRNAs (microRNA) und verschiedene Signaltransduktionswege an der Regulierung der CD44-Expression beteiligt (Liu et al., 2011, Chen et al., 2018). So wird die CD44-Expression unter anderem durch den Wnt-Signalweg über β -Catenin reguliert. Nach Aktivierung des β -Catenin/ Tcf-4-Signals in Darmtumoren zeigt sich eine Überexpression von CD44 (Zeilstra et al., 2008).

1.4.2 CD133/Prominin-1

CD133 (auch AC133 oder Prominin-1) ist ein transmembranes Glykoprotein, das unter anderem in hämatopoetischen Zellen, Endothelzellen, oder Epithelzellen der Niere exprimiert wird (Corbeil et al., 2000, Weigmann et al., 1997). CD133 ist in Microvilli und Membranprotrusionen konzentriert, die sog. *lipid rafts* enthalten (Corbeil et al., 2000, Corbeil et al., 2001). *Lipid rafts* sind Mikrodomänen in Membranen eukaryotischer Zellen und werden vielfach als "*signalling platforms*" bezeichnet, da sich in diesen Mikrodomänen Proteine anreichern, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (George und Wu, 2012).

CD133 wird als spezifischer Marker für primäre kolorektale CSCs angesehen, und die CD133-Expression scheint mit der Tumorzell-Differenzierung und Tumorgroße bei Darmkrebs zu korrelieren (Kazama et al., 2018). CD133 wird auch bei vielen weiteren

malignen Tumoren, zum Beispiel der Ovarien, der Nieren, des Pankreas, der Lunge und des Gehirns exprimiert (Hermann et al., 2007, Tirino et al., 2008, Yanagisawa et al., 2009, Salnikov et al., 2010, Wu et al., 2012).

CD133-positive Darmkrebszellen zeigen SC-Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ein multidirektionales Differenzierungspotential (Dalerba et al., 2007b). Zudem weisen sie eine erhöhte Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie auf (Todaro et al., 2010, Chen et al., 2010). Es bestehen allerdings kontroverse Ergebnisse darüber, ob CD133-positive Darmkrebszellen aggressiver metastasieren als CD133-negative (O'Brien et al., 2007, Shmelkov et al., 2008). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte die Fähigkeit zum bidirektionalen Zelltypenwechsel zwischen diesen beiden Subpopulationen als Anpassungsreaktion an die Mikroumgebung sein.

In einer Studie von Feng et al. zeigen durchflusszytometrisch isolierte CD133-positive und CD133-negative SW620-Zellen (humane CRC-Zelllinie) genau diesen bidirektionalen Zelltypenwechsel zwischen den beiden Subpopulationen (Feng et al., 2012). Auch Hsu et al. zeigen an SW620-Zellen, dass die Exposition gegenüber sog. „Umweltstressoren“ wie zum Beispiel Hypoxie das Umschalten von CD133-negativen Zellen auf CD133-positive Zellen verstärkt, während die Exposition gegenüber ECM-Komponenten das Umschalten von CD133-positiven auf CD133-negative Zellen fördert (Hsu et al., 2013). Die Fähigkeit zum bidirektionalen Zelltypenwechsel könnte für die Anpassung an die Mikroumgebung bei der Metastasierung wichtig sein.

Über die (patho)physiologischen Funktionen von CD133 in gesunden Zellen sowie Tumorzellen ist bisher wenig bekannt. Mehrere Studien postulieren, dass CD133 aktiv an Prozessen wie der Signaltransduktion oder interzellulären Interaktionen beteiligt sein könnte. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass einige Zellen CD133-angereicherte Membranvesikel entweder als Exosomen (Bauer et al., 2011) oder als Prominosomen freisetzen (Marzesco et al., 2005, Sgambato et al., 2010). CD133-Exosomen werden beispielsweise während der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen freigesetzt und danach von mesenchymalen Zellen mit Stammzeleigenschaften aufgenommen (Bauer et al., 2011).

Weitere Studien deuten darauf hin, dass CD133, ähnlich wie CD44, eine Rolle bei der adaptiven Plastizität von Krebszellen im Sinne einer EMT spielen könnte. Eine Assoziation von CD133-Expression und Merkmalen der EMT ist für einen stark migratorischen Subklon der Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan-1 beschrieben. Die Expression EMT-verwandter

Transkriptionsfaktoren (Slug, Snail) und mesenchymaler Moleküle (Fibronektin, N-Cadherin) steigt mit ansteigender CD133-Expression und sinkt nach KD von CD133. Die analysierten Tumorzellen zeigen zudem nach einem CD133 KD ein reduziertes Migrationspotenzial (Ding et al., 2012). Choi et al. berichten, dass Stammzellmarker und EMT-Marker in Bezug auf das kolorektale Adenokarzinom eng miteinander korrelieren und insbesondere, dass das Expressionsniveau von EMT-Markern (E-Cadherin, β -Catenin, Snail, Vimentin) mit dem CD133-Expressionsniveau, der Krebszellinvasion und der Metastasierung korreliert (Choi et al., 2017).

Ergänzend zeigen Chen et al. bei Pankreaskarzinomzellen und Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses (HNSCC), die mit Gemcitabin und Strahlentherapie behandelt wurden, dass eine CD133 Hochregulierung die Tumorzellen in einen mesenchymalen Phänotyp überführt. Ein KD von CD133 hingegen bewirkt eine „Verschiebung“ der Tumorzellen in den epithelialen Phänotyp (Chen et al., 2011b). Eine Korrelation von CD133 und EMT beschreiben Koren et al. auch für Lungenkarzinome (Koren et al., 2016).

Die Regulation der CD133-Expression ist nicht vollständig verstanden, aber verschiedene Studien deuten auf die Existenz mehrerer Mechanismen hin. So zeigt eine Studie von Sahlberg et al., dass ein *knockout* des Phospho-inositol 3 kinase (PI3K) / AKT-Signalweges die Expression von CD133 reduziert (Sahlberg et al., 2014). Eine andere Studie zeigt, dass in CRC der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg an der Regulation von CD133 beteiligt sein könnte. Eine Aktivierung dieses Signalweges bewirkt eine vermehrte Expression von CD133 (Kemper et al., 2012). Tabu et al. kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass der Ras / ERK-Signalweg an der Regulation der CD133-Expression beteiligt sein könnte. Die Blockade des Signalweges reduzierte die CD133-Expression in einer Subpopulation der menschlichen CRC-Zelllinie Caco-2 (Tabu et al., 2010). Weitere Signalwege, die vor allem die CD133-Expression bei Tumoren beeinflussen sollen, sind Notch (Konishi et al., 2016), p53 (Park et al., 2015), der *Hypoxie-induzierende Faktor* (HIF) (Ohnishi et al., 2013) und *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) (Won et al., 2015).

1.4.3 CD24/HSA/Nectadrin

Humanes CD24, dessen homologes Protein in der Maus auch als HSA (*heat stable antigen*) oder Nectadrin bekannt ist, ist ein kleines, stark glykosyliertes Mucin-ähnliches Adhäsionsmolekül, das aus 32 Aminosäuren mit mehreren potenziellen O- oder N-verknüpften Glykosylierungsstellen besteht, was sich in einem stark variablen Molekulargewicht zwischen 38 und 70 kDa widerspiegelt (Kristiansen et al., 2004). CD24 wird durch einen Phosphatidylinositol-Anker an Zellmembranen gebunden und physiologisch in der Entwicklung von Pankreas und Gehirn sowie in Prä-B-Lymphozyten, in regenerierenden

Muskeln, in normalen Keratinozyten und in renalen Nierenepithelzellen exprimiert (Kristiansen et al., 2004).

Darüber hinaus wird CD24 von einer Vielzahl von Tumoren exprimiert. Neben einer Überexprimierung in 90 % der CRC (Sagiv et al., 2006) wird eine CD24-Expression für diverse hämatologische Malignome und solide Tumore wie zum Beispiel Pankreaskarzinome, Neuroblastome, Karzinome der Niere, der Brustdrüse u.a. beschrieben (Kristiansen et al., 2004, Nestl et al., 2001, Weichert et al., 2005). Beim primären Pankreaskarzinom wird CD24 in hochgradigen Tumoren und fortgeschrittenen Tumorstadien überexprimiert, was ein Hinweis auf seine Rolle bei der Tumorprogression sein könnte (Jacob et al., 2004).

Weichert et al. analysierten die CD24-Proteinexpression in Darmkrebszelllinien und humanem CRC und korrelierten sie mit klinisch-pathologischen Variablen, einschließlich des Überlebens der Patienten. Laut dieser Studie zeigen die Mehrheit der CRCs sowohl eine membranöse als auch eine zytoplasmatische CD24-Färbung. Obwohl die membranöse CD24-Färbung mit Metastasen assoziiert ist, kann nur die zytoplasmatische Färbung als unabhängiger Prognosemarker im Zusammenhang mit einem schlechten Überleben des Patienten angesehen werden (Weichert et al., 2005). Eine Studie von Sagiv et al. weist allerdings keine prognostische Bedeutung des CD24-Expressionsniveaus bei CRC nach; stattdessen zeigt sich eine vergleichbare CD24-Expression in Adenomen und Karzinomen. Darüber hinaus berichten Sagiv et al., im Gegensatz zu den Ergebnissen von Weichert et al., nur über eine Membranfärbung. Dieselbe Studie ergab, dass CD24 früh im mehrstufigen Prozess der CRC-Karzinogenese exprimiert wird, was auf eine mögliche Rolle als CSC-Marker hindeutet (Sagiv et al., 2006). Dazu passend zeigt die CD24-positive CRC Zellsubpopulation in einer Studie von Yeung et al., verglichen mit der CD24-negativen Subpopulation, Merkmale von CSCs wie erhöhte Chemotherapieresistenz, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und erhöhte tumorigene Kapazität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Yeung et al., 2010).

Die (patho)physiologischen Funktionen von CD24 sind bis dato nicht abschließend geklärt. Bisher haben mehrere *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen eine Rolle von CD24 für die mRNA-Stabilität (Wang et al., 2007), Zelladhäsion (Kadmon et al., 1992), das Wachstum (Rostoker et al., 2015), die Proliferation (Wang et al., 2010), Invasion (Bretz et al., 2012a) und Metastasierung (Rostoker et al., 2015) sowie Apoptose-Inhibition (Pei et al., 2016) von Tumorzellen bestätigt.

CD24 ist physiologisch in *lipid rafts* lokalisiert, wo es an der Regulation von Zelladhäsion und Zellkommunikation beteiligt zu sein scheint (Kristiansen et al., 2004, Hooper, 1999). CD24 wurde als möglicher Träger von Liganden für P-Selektin identifiziert und könnte daher als Vermittler der Adhäsion von Tumorzellen an aktivierte Endothelzellen und Blutplättchen die Metastasierung fördern (Kristiansen et al., 2004).

Die Studienlage ist jedoch nicht eindeutig und der genaue Einfluss von CD24 auf die Metastasierung unklar. Es existieren Hinweise auf eine inverse Korrelation zwischen der CD24-Expression und erhöhtem tumorigenem Potenzial. Studien von Schindelmann et al. sowie Sheridan et al. konnten für CD24-negative Brustkrebszellen besonders prometastatische Eigenschaften, nämlich eine erhöhte Invasivität, nachweisen (Schindelmann et al., 2002, Sheridan et al., 2006).

Auch eine erhöhte Anoikis-Resistenz der Tumorzellen scheint mit einem niedrigen CD24 Expressionsniveau zu korrelieren. An et al. vermuten, dass eine CSC-ähnliche Zellsubpopulation von Brustkrebszellen mit dem Phänotyp CD44-positiv und CD24-negativ mit Anoikis-Resistenz assoziiert ist (An et al., 2015).

Bis heute sind die Regulationsmechanismen von CD24 weitestgehend ungeklärt. Für Urothelkarzinome konnten Smith et al. zeigen, dass die CD24-Expression durch Ral GTPasen reguliert wird. Ein KD der Ral GTPasen führte zu einer verringerten CD24-Expression *in vitro* (Smith et al., 2006). Ral GTPasen haben Einfluss auf verschiedene Zellvorgänge wie den intrazellulären Transport oder die Organisation des Aktin-Zytoskeletts, sind aber vor allem auch an der Regulation diverser Transkriptionsfaktoren wie Jun, NF- κ B und AFX sowie in der Ras-vermittelten Onkogenese beteiligt (Smith et al., 2006, Feig, 2003). Die (verstärkte) Expression von CD24 in diversen Tumoren könnte demnach durch eine verstärkte Aktivierung des Ras/Ral Signalwegs, zum Beispiel während der malignen Transformation, erklärt werden. Ergänzend zeigen Moghadam et al. eine intensivere onkogene Aktivität des Ras-verwandten Proteins Ral-A (RalA) in CD24-positiven Krebszellen im Vergleich zu CD24-negativen Krebszellen. Diese Überexpression und erhöhte RalA-Aktivität ist zum Beispiel bei Pankreaskarzinomen vorherrschend und wird mit Tumorigenität in Verbindung gebracht (Moghadam et al., 2017, Lim et al., 2005). Vesuna et al. liefern Daten aus Mammakarzinom-Zelllinien, die darauf hinweisen, dass auch der Transkriptionsfaktor Twist die CD24-Expression modulieren könnte. Die Überexpression von Twist verminderte die CD24-Expression; vermutlich agierte Twist als direkter transkriptioneller Repressor der CD24-Promotoraktivität (Vesuna et al., 2009).

1.4.4 Markerkombination und Einfluss auf die Metastasierung

Nach der Identifizierung von CSCs bei Brustkrebs (Al-Hajj et al., 2003) erweckten zuerst die Marker CD24 und CD44 ein großes Interesse und ihre Bedeutung als CSC-Oberflächenmarker wurde auch bei anderen Tumorentitäten untersucht. Obwohl die Analyse der beiden Marker vielversprechende Ergebnisse lieferte, sind sie nicht für alle Krebsarten gültig und weisen auch innerhalb von Krebs-Subtypen individuelle Expressionsmuster auf (Ricardo et al., 2011, Visvader und Lindeman, 2008). Auch Yeung et al. verwenden CD24 in Verbindung mit CD44, um CSCs aus CRC-Zelllinien zu isolieren und zu charakterisieren (Yeung et al., 2010). Ihre Studie kommt zu dem Ergebnis, dass durchflusszytometrisch isolierte CD44- und CD24-positive Zellsubpopulationen am stärksten klonogen sind und im Vergleich zu CD44- und CD24-negativen Zellsubpopulationen den höchsten Anteil an Megakolonien (komplexe Strukturen, die Kolonkrypten ähneln) hervorrufen. Auch CD44-, CD24- und ESA- (*erythropoiesis stimulating agents*) positive Pankreaskrebszellen zeigen ein 100-fach erhöhtes tumorigenes Potential verglichen mit Krebszellen, die diesen Phänotyp nicht aufweisen (Li et al., 2007).

Mittlerweile haben sich bereits einige Studien auf die Koexpression von CD44 und CD133 konzentriert. Eine Studie von Chen et al. kommt zu dem Schluss, dass humane CRC-Zellen der Zelllinie HCT116 *in vitro* invasiver sind und *in vivo* mehr Lebermetastasen hervorbringen, wenn sie CD133 exprimieren und ein stark erhöhtes CD44 Level aufweisen (Chen et al., 2011a). Auch in anderen Studien zeigen Zellen mit erhöhter Expression von CD44 und CD133 eine erhöhte Tumorigenität (Zhou et al., 2016). Diese Daten legen nahe, dass die beiden Marker auch prognostisch bedeutsam sein könnten. Unterstützt wird dies durch die Ergebnisse einer Studie von Nagata et al., in der ein Zusammenhang zwischen lokoregionalen Tumorrezidiven nach Rektumchirurgie und immunhistologischem Nachweis von CD133 oder CD44 in den Rektumkarzinom-Proben untersucht wurde. Es zeigte sich, dass das Gesamtüberleben von Patienten, die für beide Marker positiv waren, signifikant kürzer war als das aller anderen Patienten (Nagata et al., 2011). Im Gegensatz dazu zeigt eine Studie von Gazzaniga et al. über den prognostischen Wert von Medikamentenresistenz- und Stammzellmarkern in CTCs von Patienten mit metastasiertem CRC nach Chemotherapie keine Korrelation zwischen der Expression von entweder CD44 oder CD133 und dem Patienten-*outcome* (Gazzaniga et al., 2010).

Im Gegensatz zu den genannten Studien postulieren Shmelkov et al., dass CD44-positive, aber CD24- und CD133-negative Zellen die aggressivsten Kolontumore bilden. Darüber hinaus beobachten sie, dass CD133-positive Zellpopulationen den Phänotyp CD44-low,

CD24-positiv aufweisen. Sie stellen die Hypothese auf, dass aus der CD133-positiven Zellpopulation eine aggressivere CD133-negative Untergruppe entstehen kann, die die Fähigkeit behält, Tumore zu initiieren (Shmelkov et al., 2008).

CTCs können während der Zirkulation im Blutstrom sog. „*cluster*“ bilden, die, im Vergleich zu einzelnen CTCs ein bis zu 50-fach erhöhtes metastatisches Potential aufweisen (Aceto et al., 2014, Bottos und Hynes, 2014). Eine Studie von Kapeleris et al. weist auf diesen CTC-clustern verglichen mit einzelnen CTCs eine erhöhte Expression von CD24, CD44 und CD133 nach (Kapeleris et al., 2020). Dieselbe Studie legt nahe, dass geclusterte Zellen auch eine gesteigerte Fähigkeit zur Koloniebildung und Migration besitzen. Kapeleris et al. schlussfolgern daher, dass die Stammzellen des CRC zur Clusterbildung beitragen und dadurch ein erhöhtes metastatisches Potenzial aufweisen (Kapeleris et al., 2020).

In Übereinstimmung damit postulieren andere Studien eine signifikant höhere Koexpression von CD44 und CD133 bei CRC mit synchronen Lebermetastasen im Gegensatz zu CRC ohne frühe Lebermetastasen (Galizia et al., 2012, Huang et al., 2012). Ergänzend bestätigt eine Studie von Hou et al. die bedeutsame Rolle von CD133- und CD44-positiven Tumorzellen bei der hämatogenen Metastasierung von hepatozellulären Karzinomen (Hou et al., 2012b).

1.5 Wissenschaftliche Fragestellung / Zielsetzung

Im gesamten Magen-Darm-Trakt können Tumore entstehen. Adenokarzinome des Pankreas und Kolons sind dabei relativ häufig und gehen mit einer besonders schlechten Prognose einher, wenn sie metastasiert haben. Die 5 Jahres-Überlebensrate von Patienten mit bereits metastasiertem CRC sinkt auf lediglich 5 - 10 % (Link et al., 2005). Obwohl die Metastasierung die primäre Todesursache für > 90 % der Krebspatienten darstellt (Steeg, 2006), sind viele Prozesse und Regulationsschritte der metastatischen Kaskade noch immer unklar (Barnes et al., 2016). Daher ist ein zentrales Anliegen der Tumorforschung herauszubekommen, welche Faktoren das Tumorwachstum und die Metastasierung von gastrointestinalen Adenokarzinomen beeinflussen. Mit einem besseren Verständnis der molekularen Ereignisse, die zu einer verstärkten Metastasierung des CRC führen oder diese erst möglich machen, könnten neue Diagnose- und Prognoseverfahren sowie therapeutische Ansätze zur Behandlung von CRC entwickelt werden.

Die Tumorstammzellhypothese und die Identifizierung möglicher Stammzellmarker liefern wichtige Bausteine zum besseren Verständnis dieser Prozesse. Dennoch ist die bisherige Literatur über relevante Stammzellmarker widersprüchlich. Die Frage, ob Stammzellmarker sich gegenseitig beeinflussen und welche davon eine direkte fördernde oder hemmende Rolle bei der Entstehung von hämatogenen Metastasen spielen, bleibt weiterhin unklar.

Vor diesem Hintergrund ist das Ziel dieser Arbeit, folgende Fragen zu beantworten:

1. Wie verändern sich die Expressionslevel von CD133, CD24 und CD44 nach KD von CD44 und CD24 in verschiedenen Zelllinien humaner gastrointestinaler (GI)-Tumore? Ergeben sich Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung?
2. Lässt sich, nach Identifikation einer interessanten Kandidaten-Zelllinie, im subkutanen Xenograftmodell der spontanen Metastasierung eine direkte Evidenz für eine funktionelle Rolle eines der Stammzellmarker für die hämatogene Metastasierung finden?

2. Methoden und Material

2.1 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Software und Materialien wie Puffer, Chemikalien, Antikörper oder Kits werden im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode genannt.

2.2 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit fanden die Zelllinien PaCa5061, BxPC3 (ATCC, CRL-1687, Virginia, USA) (Tan et al., 1986) (jeweils humanes duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC)), HT29 (ECACC, 91072201, Porton Down, GB) (Fogh, 2013) und SW620 (ATCC, CCL-227) (Leibovitz et al., 1976) (jeweils humanes CRC) Verwendung. Die Zelllinie PaCa5061 wurde aus einem humanen Tumorpräparat isoliert, das während einer Operation im Universitätsklinikum Eppendorf gewonnen wurde (Kalinina et al., 2010).

Die Kultivierung der ausgewählten Zelllinien erfolgte unter standardisierten S1-Laborbedingungen in Zellkulturflaschen (T75-Zellkulturflasche, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) in einem Zellkulturmedium (RPMI-1640 + L-Glutamin (Gibco, Paisley, UK) + 10 % Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (Gibco) + 100 U/ ml Penicillin / 100 µg/ ml Streptomycin (Gibco) + 0,5 µg/ ml Puromycin (Sigma, Steinheim, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre (HERAcell CO₂-Inkubator, Heraeus; Hanau, Deutschland). Dieses Zellkulturmedium wird im Folgenden als Standardmedium bezeichnet. Puromycin war im Standardmedium bereits enthalten, da von allen Zelllinien von Beginn an Derivate verwendet wurden, die im Vorfeld zu dieser Arbeit mittels lentiviraler Transduktion eines shRNA- und Puromycin-Resistenz-tragenden Vektors erzeugt worden waren (siehe unten). Alle 48 Stunden wurde das Zellwachstum lichtmikroskopisch (Axiovert 35, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) kontrolliert und alle 3 bis 4 Tage eine Subkultivierung, wie folgend beschrieben, durchgeführt.

2.2.1 Subkultivierung

Zum Erhalt der Zellkulturen wurden diese zweimal pro Woche auf neue Zellkulturflaschen passagiert. Der geeignete Zeitpunkt zur Subkultivierung wurde lichtmikroskopisch ermittelt (bei ca. 75 % – 80 % Konfluenz der Tumorzell-*monolayer*). Die Zellen wuchsen konfluent und adhärent. Der erste Schritt der Subkultivierung bestand im Absaugen des alten Zellkulturmediums. Danach wurden die verbliebenen Zellen mit DPBS (1x) (Gibco) gewaschen. Durch Zugabe von 0,05 % Trypsin-EDTA (1x) (Gibco) und Inkubation für

2 Minuten bei 37 °C gelang die Ablösung der adhärennten Zellen vom Flaschenboden. Sollten sich nicht alle Zellen sichtbar vom Boden gelöst haben, wurde die Zeit im Inkubator um 1 bis 2 Minuten verlängert. Um den Fortschritt der Ablösung zu bestimmen, erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Standardmedium gestoppt, die abgelösten Zellen durch vorsichtiges Beklopfen der Flasche sowie wiederholtes Pipettieren vereinzelt und das erforderliche Volumen der Zellsuspension in eine neue Flasche mit Standardmedium überführt. Die restliche Zellsuspension wurde verworfen.

2.2.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von humanen Tumorzellen

Um die Tumorzelllinien bzw. ihre Derivate über eine längere Zeitspanne aufbewahren zu können, wurden Aliquots angefertigt und anschließend kryokonserviert. Die Zellen wurden hierfür, wie im Kapitel 2.2.1 beschrieben, aus einer T75-Zellkulturflasche gelöst und anschließend bei 210 g zentrifugiert, wodurch Zellpellets entstanden. Zu diesen wurden 5 ml cryo-safe I Einfriermedium (c·c·pro, Oberdorla, Deutschland) hinzugegeben und die Zellpellets anschließend resuspendiert. Die Verteilung der Suspension erfolgte mit je 1 ml auf insgesamt fünf Kryoröhrchen, die dann bei -80 °C für mindestens 24 Stunden tiefgefroren (Mr. Frosty Gefrierbehälter, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) wurden. Die langfristige Lagerung der Aliquots erfolgte in Kältetanks mit flüssigem Stickstoff.

Zur Rekultivierung der Aliquots wurden diese für einige Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) wirkt zytotoxisch, daher war eine zügige Verdünnung notwendig. Zum Verdünnen wurden die aufgetauten Aliquots umgehend in frisches, vorgewärmtes Standardmedium überführt. Nach einer Kultivierungszeit im Inkubator von ca. 24 – 48 Stunden in einer T25-Zellkulturflasche (Sarstedt) konnte ein erster Mediumwechsel durchgeführt werden.

2.2.3 Erzeugung von Einzel- und Doppel-Knockdowns mittels shRNA

Von allen Zelllinien lagen bereits zu Beginn dieser Doktorarbeit Sublinien mit shRNA-vermitteltem *knockdown* (KD) von CD24 bzw. CD44 (Sequenz: GGCGCAGATCGATTTGAAT) sowie entsprechende Kontrolltransfektanten (luc bzw. neg) vor, die mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Von der Zelllinie HT29 wurden im Verlauf der Doktorarbeit zusätzliche Derivate mit einem Einzel- bzw. Doppel-KD von CD24 und CD133 erzeugt. Die Generierung aller verwendeten Zelllinien-Derivate erfolgte durch PD Dr. rer. nat. Daniel Wicklein (Institut für Anatomie und Exp. Morphologie, UKE) und PD Dr. rer. nat. Kristoffer Riecken (Labor für Zell- und Gentherapie, UKE). Zur

Überprüfung der Fragestellung wurden vier Sublinien von HT29 generiert. In einem ersten Schritt wurden der KD von CD133 und die entsprechende Kontroll-Transfektante (deren shRNA gegen das in Säugerzellen nicht vorkommende Transkript der Glühwürmchen-Luciferase [„Luc“] gerichtet war) durch Transfektion mit dem nicht-liposomalen Transfektionsreagenz FuGENE (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) hergestellt. Transfektion beschreibt das Einbringen von zellfremdem genetischem Material in eukaryote Zellen. Ein 65-bp-DNA-Oligomer, das eine 19-bp-Anti-CD133-Sequenz (GGAGGATCTTGCTAGCTAT) enthielt, wurde in den pSIREN RetroQ-Vektor (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) gemäß den Anweisungen des Herstellers eingefügt. Die Sequenz wurde mit PubMed BLAST auf mögliche Effekte außerhalb des Ziels („off-target-Effekte“) überprüft. Der verwendete Vektor pSIREN-RetroQ ist ein retroviraler shRNA-Expressionsvektor. Dieses Verfahren nutzt das Phänomen der posttranskriptionellen Gen-Stummschaltung (PTGS) zur Inhibierung der Genexpression. Hierbei wird der zelluläre Prozess der RNA-Interferenz (RNAi) genutzt, um die Genexpression effektiv zu hemmen. RNAi wird durch Einführung einer doppelsträngigen RNA erreicht (shRNA), deren Sequenz zum Zielgen-Transkript homolog ist. Die exogene RNA wird in 21 – 23 Nucleotide (nt) umfassende interferierende RNAs (siRNAs) verdaut. Die entstandene siRNA wird anschließend in einen RISC-Proteinkomplex (*RNA-induced silencing complex*) integriert. Dieser Proteinkomplex besitzt neben einer RNA-Helikase- auch eine Nuklease-Aktivität. Da die siRNA komplementär zur mRNA des Zielgens ist, kann der Komplex spezifisch an der exprimierten mRNA binden. Die mRNA wird zunächst durch die Helikase-Aktivität des Proteinkomplexes entwunden, was im Anschluss einen Abbau durch die Nukleasedomäne erlaubt, so dass die mRNA gespalten wird. Die Zellen wurden unter Verwendung von FuGENE transfiziert und durch Zugabe von 0,5 µg/ml Puromycin zum Zellkulturmedium selektioniert (der Vektor pSIREN-RetroQ enthält ein Puromycin-Resistenzgen). Um den KD zu bestätigen, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Dabei konnten gleichzeitig diejenigen Zellen mit der geringsten CD133-Expression herausortiert und über Grenzverdünnungsklonen ein stabiler KD generiert werden (pro Vertiefung einer 96-well-Platte wurden drei Tumorzellen abgelegt). Die Kolonien mit der stärksten CD133-Reduktion wurden anschließend gepoolt, was die Zelllinie HT29-shCD133 ergab. Der gleiche Vektor, der eine Sequenz gegen Glühwürmchen-Luciferase enthielt, wurde verwendet, um eine transfizierte Kontrollzelllinie (HT29-luc) mit theoretisch unveränderter CD133-Expression zu erzeugen (siehe oben) (Sequenz: GTGCGTTGCTAGTACCAAC).

In einem zweiten Schritt wurde basierend auf den zuvor generierten HT29 luc- und HT29-shCD133-Derivaten durch lentivirale Transduktion ein zusätzlicher KD von CD24 bzw. dessen zugehörige Kontrolle (neg) erzeugt, so dass die vier HT29-Sublinien luc/neg,

luc/shCD24, shCD133/neg und shCD133/shCD24 entstanden. Transduktion bezeichnet das Einbringen von genetischem Material in Zellen mit Hilfe eines Virus, in unserem Fall eines Lentivirus. Im Unterschied zu traditionellen Transfektionsmethoden sind Lentiviren in der Lage, ihre DNA in das zelluläre Genom zu integrieren, und sorgen somit für eine stabile Expression. Die Transduktion wurde von PD Dr. Kristoffer Riecken nach seinem Protokoll durchgeführt (Ernst et al., 2018). Der KD von CD24 wurde durch einen shRNA-vermittelten Ansatz erreicht: Ein 65-bp-DNA-Oligomer, das eine 19-bp-Anti-CD24-Sequenz (AGGCCAAGAAACGTCTTCT) enthielt, wurde in den pLKO.1 neo Vektor (Takara Bio Inc.), der zusätzlich ein Neomycin-Resistenzgen trägt, gemäß den Anweisungen des Herstellers eingefügt. Die Sequenz wurde unter Verwendung von NCBI BLAST auf mögliche *Off-target*-Effekte überprüft. Der gleiche Vektor, der eine Sequenz gegen ein nicht in Säugerzellen vorkommendes Transkript enthielt, wurde verwendet, um eine transduzierte Kontrollzelllinie (HT29 neg) zu erzeugen (Sequenz: CCTAAGGTTAAGTCGCCCT; (Sarbasov et al., 2005)). Nach Zugabe der Viruspartikel zu den Zellen wurde das Medium am nächsten Tag ersetzt und am zweiten Tag nach der Transduktion Neomycin in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben. Die Neomycin-Selektion wurde mindestens eine Woche lang durchgeführt und die Zellen anschließend hinsichtlich der CD24-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Für die Sublinie HT29-luc/shCD24 wurden Zellen mit besonders starker CD24-Reduktion und für die Sublinie HT29-shCD133/shCD24 Zellen mit normalem CD24-Level weiterverwendet (siehe unten).

2.3 Bestimmung der Oberflächenproteine (CD-Moleküle) mittels Durchflusszytometrie

Zur Messung der Expression der Oberflächenproteine auf den Tumorzellen wurden in dieser Arbeit Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper eingesetzt (siehe Tabelle 1). Die Vorbereitung der zu messenden Zellen erfolgte wie unter Absatz 2.2.1 beschrieben, danach folgte die Übertragung von ca. 1×10^5 - 1×10^6 Zellen in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 g und anschließender Abnahme der Überstände wurden die entstandenen Zellpellets mit den Antikörpern in einer Konzentration von 1 µg/ml in 100 µl FACS-Puffer (DPBS (1x) + 1 % BSA + 0,05 % Natrium-Azid) resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation konnten die einzelnen Ansätze in je 2 ml vorgelegten FACS-Puffer in 3,5 ml FACS-Röhrchen (Sarstedt) überführt werden. Die abschließende Messung erfolgte im Durchflusszytometer (CyFlow[®] Cube 8, Partec, Görlitz, Deutschland). Um eine Lebend-/ Tot-Differenzierung der Tumorzellen zu gewährleisten, wurde den Proben kurz

vor Messung 1 µl Propidium-Iodid (Thermo Fisher Scientific Inc., Ausgangskonzentration: 0,5 mg/ ml) zugesetzt. Die Auswertung der Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms FCS Express (FCS Express 4, DeNovo Software, Glendale, USA).

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Hersteller
Primäre Antikörper	
CD44 (mouse IgG1 FITC)	Diaclone, Hamburg, Deutschland
CD24 (Clone eBioSN3 PE)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
CD133 (Clone 293C3 PE)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Isotypenkontrollen	
Mouse IgG1 FITC	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1 PE	eBioscience, San Diego, USA
Mouse IgG2b PE	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.4 Xenograft-Mausmodell

2.4.1 Heterotope Transplantation humaner Tumorzellen in immundefiziente Mäuse

Zellen der von HT29 generierten Sublinien (luc/neg, luc/shCD24, neg/shCD133, shCD133/shCD24) wurden in insgesamt 48 ca. 8 – 12 Wochen alte SCID (*severe combined immunodeficiency*) Mäuse (Fox Chase SCID Mouse (C.B.17 SCID), Charles River Laboratories, Wilmington, USA) injiziert (n = 12). Die Injektion erfolgte in einer kurzzeitigen Inhalationsnarkose. Pro Sublinie wurden 1×10^6 Zellen in 200 µl zusatz-freiem RPMI-1640-Medium subkutan (s.c.) oberhalb des rechten oder linken Schulterblatts injiziert (heterotope Injektion). Die Versuchsgruppen enthielten zu gleichen Anteilen Mäuse beider Geschlechter. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte aufgrund ihrer Immundefizienz pathogenfrei in einzeln belüfteten Käfigen. Die Tiere erhielten während des Versuches unbegrenzt Zugang zu Futter sowie zu sterilem Wasser und wurden regelmäßig auf Veränderungen ihres Fells, des Ernährungs- und Aktivitätsverhaltens untersucht, insbesondere aber des Tumorwachstums. Die hier geschilderten Tierversuche wurden zuvor von der zuständigen Behörde (Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Hansestadt Hamburg) genehmigt (Genehmigungsnummer G19/15).

SCID-Mäuse weisen eine kombinierte Immunschwäche auf, die sich in einem schweren Mangel an reifen, funktionellen B- und T-Lymphozyten äußert. Aufgrund einer beeinträchtigten VDJ-Rekombination, die eine wichtige Rolle bei der Neuordnung der variablen Regionen von Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren spielt, ist die Differenzierung

von B- und T-Lymphozyten-Vorläuferzellen gestört. Die Folge ist ein nicht voll funktionsfähiges erworbenes Immunsystem. Diese Immunschwäche wiederum ermöglicht in den Mäusen das Anwachsen artfremder (humaner) (Tumor-) Zellen, was die besondere Eignung von SCID-Mäusen für den Einsatz in Xenograftexperimenten begründet.

2.4.2 Gewebeentnahme

Für den Tierversuch wurden folgende Endpunkte festgelegt: ein s.c. Tumolvolumen von etwa 1,5 cm³, vorherige Ulzeration der Haut über dem Tumor oder eine starke Verschlechterung des Allgemeinzustandes. Bei Erreichen eines der Endpunkte wurde die jeweilige Maus durch intraperitoneale (i.p.) Gabe eines Ketamin (100 mg/ ml, 1,2 ml/ kg) / Xylazin (20 mg/ ml, 0,8 ml/ kg) -Gemisches anästhesiert. Nach Verlust des Zwischenzehenreflexes erfolgte eine kardiale Blutentnahme. Hierfür wurde das Herz über dem linken Ventrikel punktiert und das gewonnene Blut in einem mit EDTA versetzten Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Disklokation getötet. Zur Entnahme der Lunge wurde der Thorax eröffnet, das Herz-Lungenpaket entnommen und die beiden Lungenflügel vom Herzen abgetrennt. Der linke Lungenflügel wurde für die spätere *Alu*-PCR in ein Cryotube (Nunc Kryoröhrchen 1,0 ml, Thermo Fisher Scientific Inc.) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, der rechte Lungenflügel für die spätere histologische Aufarbeitung in Formalin-Lösung fixiert (siehe unten). Da das gewonnene Blut hierbei ausschließlich zur Bestimmung des Anteils der humanen DNA durch die *Alu*-PCR (siehe unten) benutzt wurde, konnten die entsprechenden Proben nach kurzer Lagerung bei 4 °C einer DNA-Extraktion unterzogen werden (siehe unten). Um eine Verschleppung von Tumorzellen in andere Organe zu vermeiden, erfolgte die Präparation des Primärtumors zuletzt. Dieser wurde aus dem subkutanen Bett herauspräpariert, evtl. von Bindegewebe oder Fett befreit und gewogen. 1/5 des Tumors wurde für die histologische Aufarbeitung in Formalin fixiert (siehe unten), ein weiteres Fünftel für evtl. histologische Gefrierschnitttechnik vorbereitet und das restliche Gewebe ohne Zusätze in Stickstoff tiefgefroren.

Für die Gewebeaufbereitung durch Paraffin-Histologie wurde das entnommene Gewebe in Einbettkassetten überführt und dann in 3,7 % phosphatgepuffertem Formalin für 24 bis max. 72 Stunden fixiert. Anschließend erfolgte die Überführung der Kassetten in 0,1 M Phosphatpuffer. Die Einbettung in Paraplast geschah im Automaten (Einbettungsautomat Leica TP1020, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland). Die gesamte Gewebeentnahme wurde vollständig protokolliert und anschließend archiviert.

2.5 Untersuchung der murinen Gewebeproben auf humane DNA

2.5.1 Extraktion der genomischen DNA aus Blut und Lungengewebe

Die DNA-Isolierung aus je 200 µl EDTA-Vollblut gelang nach Herstellerprotokoll mit Hilfe des peqGOLD Blood DNA Mini Kit Plus S-Line (VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland). Im Anschluss an die Isolierung erfolgte die Elution der gewonnenen DNA in einem Volumen von 200 µl Elution Buffer. Das gewonnene Lungengewebe musste vor der weiteren DNA-Extraktion zuerst lysiert werden. Hierzu wurde von jeder Maus der jeweils komplette linke Lungenflügel in einer Kugelmühle (TissueLyser II, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) in 150 µl DPBS und bei einer Frequenz von 300/s für 4 Minuten homogenisiert. Die weitere Lysierung und DNA-Isolierung der Lungen-Proben erfolgte nach Herstellerprotokoll mittels peqGold Tissue DNA Mini Kit S-Line (VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland) aus je 100 µl des Lungengewebes.

2.5.2 Bestimmung humanen Tumorzelllast in Mausblut und -gewebe mittels *real-time* PCR (Quantitative *Alu*-PCR)

Die in den Blut- und Lungenproben möglicherweise vorhandene humane Tumorzelllast wurde mittels *Alu*-PCR bestimmt. Spezifische Primer für die humane *Alu*-Sequenz wurden im Vorhinein designt (Nehmann et al., 2010). Die *Alu*-Primer binden nur an die humanen Sequenzen der zu untersuchenden Tumorzellen, da die murinen Zellen diese Sequenzen nicht tragen. Somit können über die detektierten *Alu*-Signale Rückschlüsse auf die humane, also metastatische Zelllast in den murinen Organen gezogen werden.

Die Extraktion der genomischen DNA aus Vollblut und Lungengewebe erfolgte im Vorfeld wie unter 2.5.1 beschrieben. Proben derselben Gewebeart wurden auf eine einheitliche DNA-Konzentration von 30 ng/ µl (Lunge) bzw. 10 ng/ µl (Blut) mithilfe des Elutionspuffers des Extraktionskits eingestellt. Die dafür notwendige Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte mittels NanoDrop™ -Spektralphotometer (peqLab, Erlangen, Deutschland).

Die Durchführung der qPCR erfolgte im Light Cycler 480 II (Roche Diagnostics) in einer 96-well Platte (Roche Diagnostics). Alle mitgeführten Standards und Proben wurden in Dreifachbestimmung analysiert. Die Mitführung einer Standardreihe war notwendig, um eine absolute Quantifizierung der Anzahl der humanen Tumorzellen pro eingesetzter Menge an muriner Blut- und Lungen-DNA zu ermöglichen. Für die Erstellung der

Standardreihe wurde die DNA aus den in die Maus injizierten Tumorzellen benötigt, welche parallel *in vitro* weiterkultiviert worden waren. Die Standardreihe bestand aus einer Verdünnungsreihe beginnend bei einer DNA-Menge von 2000 Zellen, die in Kontroll-DNA (DNA des entsprechenden Gewebes / Organs von gesunden (nicht mit Tumorzellen beimpften) Mäusen desselben Mausstamms) gegeben und anschließend in mehreren 1:10 Schritten bis 0,002 Zellen verdünnt wurde. Zusätzlich wurde Kontroll-DNA von gesunden (nicht Tumor-tragenden) Mäusen des entsprechenden Gewebes und des entsprechenden Mausstamms verwendet (Negativ-Kontrolle).

In der *Alu*-PCR betrug das Gesamtreaktionsvolumen pro well 10 µl, bestehend aus 2 µl DNA (Standard-, Negativ- oder Versuchsprobe) und 8 µl Mastermix. Der Ansatz des Mastermix für die 96-well Platte (Tabelle 2) bestand aus KAPA SYBR® FAST (PeqLab), *Alu forward primer*, *Alu reverse primer* (Tabelle 3) und ddH₂O.

Tabelle 2: Mastermix-Reaktionsansatz für eine Probe

Mastermix-Komponenten	Volumen (µl)
ddH ₂ O	2,6 µl
Alu forward (100 pmol/ µl)	0,2 µl
Alu reverse (100 pmol/ µl)	0,2 µl
Kapa SYBR Fast Light Cycler 480	5,0 µl
Gesamtvolumen Mastermix je Sample	8,0 µl

Tabelle 3: Alu-Primer der PCR

Primer	Sequenz 5' → 3'	Hersteller
Alu forward	TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Alu reverse	GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland

Für einen mehrfachen Ansatz wurde der Mastermix entsprechend der Gesamtprobenzahl zuzüglich Pipettierzulage (10 %) angesetzt. Die einzelnen *wells* wurden jeweils zuerst mit der vorverdünnten DNA und anschließend mit dem Mastermix beladen. Danach wurde die 96-well Platte mit einer Folie verschlossen und kurz mit der Perfect Spin Zentrifuge (PeqLab) anzentrifugiert (2000 g für 10 Sekunden). Dies geschah unter ständiger Kühlung auf Eis (4 °C).

Um die im Mastermix enthaltene DNA-Polymerase zu aktivieren und einen simultanen Start aller Reaktionen zu gewährleisten, wurde die PCR-Reaktion mit einer Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten gestartet. Nach dieser Phase startete die Amplifikation der von den

Primern erkannten DNA-Abschnitte in den Proben in 40 Zyklen nach folgendem Schema: (1) Denaturierung bei 95 °C für 10 Sekunden, (2) *annealing* bei 67 °C für 10 Sekunden, (3) Elongation bei 72 °C für 10 Sekunden (Tabelle 4). Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen.

Um unspezifische Produkte wie zum Beispiel Primer-Dimere oder unspezifische Amplifikationsprodukte auszuschließen, wurde im Anschluss an den eigentlichen PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Unspezifische Produkte fluoreszieren ebenfalls, würden detektiert werden und die Messung verfälschen. Durch eine kontinuierliche Erhöhung der Reaktionstemperatur von 65 °C auf 95 °C wurden die Doppelstränge in Einzelstränge aufgeschmolzen, wobei kleinere Produkte einen niedrigeren Schmelzpunkt haben als größere. Ist das Produkt spezifisch, ergibt sich ein *peak* bei einer bestimmten Schmelztemperatur. Spezifische PCR-Produkte hoben sich also von unspezifischen durch einen deutlich höheren Schmelzpunkt ab.

Tabelle 4: Schema PCR-Programm

	Zyklen	Temperatur	Zeit
pre-incubation	1	95°C	5 Minuten
amplification	40	95°C	10 Sekunden
		67°C	10 Sekunden
		72°C	10 Sekunden
melting curve	1	95°C	5 Sekunden
		65°C	1 Minute
		97°C	kontinuierlich
cooling	1	40°C	30 Sekunden

Mithilfe einer entsprechenden Software (LightCycler® 480 Software Version 1.5.0 SP3) erfolgte die Auswertung der *Alu*-PCR über einen sogenannten *crossing point* (Cp)-Wert. Dieser drückt die Zyklenanzahl aus, bei der die signifikante Fluoreszenz zum ersten Mal exponentiell über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Je mehr DNA-Abschnitte vorhanden sind und von den verwendeten Primern erkannt werden, desto niedriger ist der Cp-Wert.

2.6 Paraffinschnitttechnik

Die den Mäusen entnommenen Gewebeproben wurden zum Teil auch in Paraffin eingebettet (siehe oben). Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (MICROM GmbH, Type HM 400 R, Ser. Nr. 10951, Walldorf, Deutschland) konnten anschließend aus den gegossenen

Paraffinblöcken 4 µm dicke Paraffinschnitte für die geplanten immunhistochemischen Färbungen angefertigt werden. Die Schnitte wurden danach kurz bei 40 °C im Wasserbad gestreckt und auf beschichtete Objektträger (HistoBond Adhäsions-Objektträger, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank (Melag, Wilke und Witzel Forschungs- und Laborbedarf Medizintechnik; Hamburg, Deutschland) getrocknet.

2.7 Immunhistochemie

Um die Expression von CD24, CD44 und CD133 auf den Xenografttumor-Gewebeschnitten sichtbar zu machen, wurden diese immunhistochemisch gefärbt (je n = 8). Pro Färbung wurden neben den eigentlichen Proben ein zum Primärantikörper passendes Kontrollgewebe als Positivkontrolle sowie zwei Isotypenkontrollen (vom Kontroll- bzw. Xenograft-Tumorgewebe) mitgeführt. Nach der Entparaffinierung der Schnitte erfolgte eine Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe. Die weitere Vorbehandlung der Schnitte orientierte sich jeweils am eingesetzten Primärantikörper und verlief daher unterschiedlich (Tabelle 5). Zu jedem Primärantikörper wurden passende Isotypenkontrollen sowie Sekundärantikörper verwendet (Tabelle 5). Durch die Vorbehandlung und das „Blocken“ konnten die gewünschten Epitope demaskiert bzw. unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper verringert sowie bei CD133 die endogene Peroxidasereaktivität gehemmt werden. Nach Abschluss der Vorbehandlung folgte eine einstündige Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper bei Raumtemperatur. Für den Nachweis von CD44 und CD133 wurden kommerziell erhältliche Antikörper verwendet, für CD24 ein freundlicherweise von Prof. P. Altevogt (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellter Antikörper (Tabelle 5). Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal mit TBS-T (TBS (30,29 g Trizma Base + 43,54 g NaCl + 100 ml HCl [2 mol/ L] auf 5 Liter Aqua dest. (pH = 7,6)) + 0,1 % TWEEN-20) gewaschen sowie einmalig für 5 Minuten mit TBS gespült. Nach Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper über 30 Minuten erfolgte ein erneuter Waschschrift wie bereits oben beschrieben mit TBS-T und TBS.

Tabelle 5: Färbeprotokolle der untersuchten CD-Moleküle

Protein	Vorbehandlung	Blocken	Primärantikörper	Isotypenkontrolle	Sekundärantikörper	Entwicklung
CD 24	Fast Enzyme für 5 Minuten, RT	Nicht notwendig	Prof. Dr. Altevogt, 1:5 in Antibody- Diluent	mouse IgG2a Klon X0943 (Dako) 1:3,6 in Antibody-Diluent	goat α mouse Klon D0486 (Dako), 1:200 in TBS	ABC-AP (Vector Laboratories) und permanent red (Dako)
CD 44	Citratpuffer (pH 6) für 10 Minuten im Wasserbad bei 85°C	goat Serum 1:10 in TBS für 30 Minuten	Klon G44-26 (BD Pharmingen), Ausgangskonz. 250 µg/ml; 1:100 in Antibody- Diluent;	mouse IgG2b Clone X0944 (Dako); Ausgangskonz. 100 µg/ml; 1:40 in Antibody-Diluent	goat α mouse Klon D0486 (Dako), 1:200 in TBS	ABC-AP (Vector Laboratories) und permanent red (Dako)
CD 133	Dako S2367 pH9 (Tris/EDTA) 10 Minuten, 121°C Dampfkochtopf	Peroxidase- Block: Methanol + 30% H ₂ O ₂ für 20 Minuten	Klon EPR20980- 104 (Abcam), 1:500 in Antibody- Diluent	rabbit mono IgG Klon SP137 (Abcam) 1:73 in Antibody-Diluent	swine α rabbit-Biotin Klon E0353 (Dako) 1:200 in TBS	ABC-POX (Vector Laboratories) und DAB

Zur Sichtbarmachung der Antikörperbindung an ihre entsprechenden Antigene wurde die ABC-Technik (Avidin-Biotin-Komplex-Technik) angewendet. Bei dieser immunhistochemischen Färbetechnik wird der ausgewählte Primärantikörper zum optischen Nachweis in einem zweistufigen Verfahren an ein enzymatisches Amplifikationssystem gebunden. Als Amplifikatoren wurden dabei in diesen Versuchen Avidin-gekoppelte Peroxidase und Avidin-gekoppelte alkalische Phosphatase eingesetzt. Als Bindeglied zwischen spezifischem Primärantikörper und ABC-Peroxidase-Komplex fungierte der oben erwähnte biotinylierte Zweitantikörper (Biotin-Avidin-Bindung). Als Chromogen für die Enzyme wurden DAB (Diaminobenzidin) (SIGMA, St. Louis, USA) als Substrat für die Peroxidase und Permanent Red (Dako, Glostrup, Dänemark) als Substrat für die alkalische Phosphatase verwendet. Der Umsatz von DAB führte dabei zu einer braunen Farbreaktion, beim Umsatz von Permanent Red entwickelte sich eine rote Färbung. Im Anschluss wurden die Zellkerne für wenige Sekunden mit Hämalaun gefärbt und die Schnitte in Leitungs- (5 Minuten) und destilliertem Wasser (1 - 2 Minuten) gespült. Nach Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.

2.8 Western Blot

2.8.1 Erstellung von Proteinextrakten aus Xenografttumoren

Um die Proteinmengen an CD24 und CD44 in den s.c. gewachsenen Xenograft-Primärtumoren genauer zu quantifizieren, wurden die Primärtumore mittels Western Blot Analysen untersucht. Wie unter Kapitel 2.4.2 beschrieben wurden den Mäusen die

Xenografttumore entnommen, zur Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Anschluss bei -80 °C aufbewahrt. Durch eine mechanische Homogenisierung mittels Qiagen TissueLyser II erfolgte die Vorbereitung der Tumorstücke der einzelnen Versuchsgruppen (Luc/Neg, Luc/shCD24, Neg/shCD133, shCD133/shCD24, je n = 5) für die anschließende Isolation der Proteine. Bereits vor dem Homogenisieren wurden den Proben je 200 µl RIPA-Puffer (4 °C) (Tabelle 6) hinzugefügt. Die Zusammensetzung des RIPA-Puffers ist in Tabelle 6 wiedergegeben. Insbesondere beinhaltet dieser PIC (Proteinase-Inhibitor-Cocktail; 1:100; Calbiochem Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) und 1 mM Vanadate (Sigma, Steinheim, Deutschland) zur Inhibition intrinsischer Proteasen und Phosphatasen. Die Homogenate wurden im Anschluss in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und für 30 Minuten inkubiert. Alle beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter ständiger Kühlung der Proben auf Eis. Die Proben wurden anschließend bei 14.000 g für 30 Minuten in der Kühlzentrifuge (4 °C) zentrifugiert. Der erzeugte Überstand wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 6: Zusammensetzung RIPA-Puffer

Konzentration	Komponenten
50 mM	Tris HCL (pH 7,4)
150 mM	NaCl
1%	NP 40 Puffer
1:100	PIC
0,1 %	SDS
2 mM	EDTA
1 mM	Vanadate

2.8.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte kolorimetrisch mit Hilfe des BCA (*bicinchoninic acid*) Protein Assay Kits (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Zunächst wurde dafür aus einer BSA-Stammlösung eine Standardreihe bestimmter Konzentration angesetzt. Die Proben wurden 1:100 und 1:200 in RIPA-Puffer + PIC verdünnt. Im Anschluss wurden 25 µl von jedem Standard und jeder unbekannt Probe als Triplikate auf eine 96-well Platte pipettiert. In jedes *well* kamen anschließend 200 µl Working-Reagenz des Kits (Reagent A und B im Verhältnis 50:1). Danach konnte die Platte mit einem Deckel abgedeckt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert werden. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem *Microplate Reader* (TECAN Infinite M200, Tecan, Schweiz).

2.8.3 Nachweis und Quantifizierung von Proteinen mittels Western Blot

2.8.3.1 Vorbereitung der Proteinproben

Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden 30 µg des jeweiligen Proteinextraktes mit RIPA-Puffer auf ein Probenvolumen von 9 µl aufgefüllt und mit 3 µl Reduktionspuffer (NuPAGE LDS Sample Buffer 4x, Invitrogen, Carlsbad, Deutschland) versetzt.

Im Anschluss wurden die Proben in den Thermoblock überführt und über eine Inkubation für 10 Minuten bei 75 °C denaturiert. Der Inkubationsvorgang bewirkt ein Lösen von nicht-kovalenten Proteinaggregaten, sodass sich die Proteine entfalten. Das im Reduktionspuffer enthaltene anionische Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) lagert sich dann an die gestreckten Proteine an und überdeckt einen Großteil der Eigenladungen der Proteine mit negativen Ladungen. Durch diesen Schritt erwerben die Proteine eine relativ konstante negative Ladungsverteilung, die proportional zur Molekülgröße ist. Hinzu kommen im Falle von Glykoproteinen Ladungen, die aus den angehängten Glykanresten resultieren. Die Probengemische von jeweils 12 µl und ein Proteinmarker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific) wurden anschließend mittels langen Pipettenspitzen in die Sammelgeltaschen überführt.

2.8.3.2 Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Standardmethode zur Trennung von Proteingemischen nach der Molekülmasse und Ladung in einem elektrischen Feld. Wie oben beschrieben sind durch die Vorbehandlung die Proteinproben nun entfaltet und durch SDS negativ geladen. Dies erlaubt eine Auftrennung in Proteinbanden anhand der Kettenlänge, die proportional zur Molekülmasse ist. Kleine Proteine wandern verhältnismäßig schnell in Richtung Anode, große Proteine müssen einen höheren Widerstand überwinden und wandern dementsprechend langsamer durch das Gel. Eine weitere Rolle für das Trennverhalten von Proteinen bei der SDS-PAGE spielen Glykanreste, die von bestimmten Aminosäuren getragen werden können.

Für die Elektrophorese wurde ein vorgefertigtes Gel von Invitrogen verwendet (NuPage Novex 4 – 12 % Bis-Tris Gel, 15 well, Invitrogen). Zunächst wurden 400 ml des vorbereiteten Laufpuffers (NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20x, Invitrogen) in die Elektrophoresekammern gefüllt. Die Taschenbelegung mit je 12 µl blieb in jedem Lauf gleich. In die ersten 5 Geltaschen wurde die Kontrolle (luc/neg) pipettiert. In Tasche 6 wurde der Marker gegeben und in Tasche 7 bis 11 die jeweils zu untersuchende Tumorsublinie (luc/shCD24, neg/shCD133 bzw. shCD133/shCD24). Das System wurde für 1 Stunde und 45 Minuten an eine elektrische Spannung von 130 Volt angeschlossen.

2.8.3.3 Proteintransfer

Die nun getrennten Proteinbanden wurden danach aus dem Gel auf eine haltbare Trägermembran übertragen. Dieser Proteintransfer wird auch als „Blotting“ oder „Blotten“ bezeichnet. Als Trägermembran wurde Polyvinylidenfluorid (PVDF) verwendet. Bei dieser Membran bleiben die Proteinbanden aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen an der Membranoberfläche haften. Diese wurde vor dem Blotten kurz in Methanol geschwenkt, dann mit Aqua dest. abgespült und für mindestens 10 Minuten in Transferpuffer (NuPAGE Transfer Buffer (20 X), Invitrogen) equilibriert.

Anschließend wurde die Membran auf dem Gel platziert und beides zwischen Lagen aus Blottingpapier (Schleicher und Schuel, Dassel, Deutschland) und Schwämmen eingebettet. Dieses Konstrukt wurde in eine Blottingkammer eingespannt und anschließend mit Transferpuffer gefüllt. Der Blottingvorgang lief über 1 Stunde und 30 Minuten mit einer Spannung von 40 Volt.

2.8.3.4 Detektion der Proteinbanden mit Primär- und Sekundärantikörpern

Nach dem Blotten wurde die Membran in 8 ml Blocking Puffer (StartingBlock™ Blocking Buffer, Thermo Scientific) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu blockieren.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe eines Antikörperkonjugats (Immunkonjugat) und einer Detektionslösung. Der primäre Antikörper bindet an sein spezifisches Antigen, welches auf der Membran fixiert ist. An den Fc-Teil des primären Antikörpers bindet dann der sekundäre Antikörper. Der sekundäre Antikörper wiederum ist mit einem Reporterenzym (*Horseradish peroxidase*) gekoppelt, über das später die Detektion erfolgt. Die Detektionslösung (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Waltham, USA) enthält Luminol, dieses wird durch das Reporterenzym des Sekundärantikörpers oxidiert. Bei dieser Reaktion wird, in Abhängigkeit von der Proteinmenge, Energie in Form von Licht freigesetzt. Durch Verwendung eines Röntgenfilms bewirkt dieses Licht an den entsprechenden Positionen der Proteinbanden eine Schwärzung.

5 Minuten vor der Anwendung wurden die Reagenzien A und B der Detektionslösung im Verhältnis 1:2 gemischt und im Anschluss 5 Minuten mit der Membran auf einem Schüttler inkubiert. Darauf folgte die Belichtung der Membran in einem Chemilumineszenz Imager

(Fusion Solo S, Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland) und die Auswertung anhand entsprechender Software (Vision-Capt, Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland). Zur Quantifizierung der Proteinlevel wurde bei allen zu analysierenden Proteinen die Ratio aus dem jeweiligen Protein und der mitgeführten Ladekontrolle (HSC70) berechnet.

Zur Detektion von CD24 wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper gegen CD24 (Antikörper von Prof. P. Altevogt, Verdünnung 1:50) in 8 ml Blocking Puffer + 0,05 % Tween auf dem Rollmischer inkubiert. Nach der Entwicklung von CD24 folgte die erneute Inkubation mit 8 ml Blocking Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde die Membran zerschnitten und mit dem primären Antikörper gegen CD44 (Catalog #BBA10, R&D Systems, Inc. Minnesota, USA, Verdünnung 1:500) in 8 ml Blocking Puffer + 0,05 % Tween für 1 Stunde auf dem Rollmischer inkubiert. Um sicherzustellen, dass alle Geltaschen initial mit der gleichen Proteinmenge beladen worden sind, wurden alle Membranen parallel zu dem Primärantikörper gegen CD44 zusätzlich auch mit einem Antikörper gegen HSC70 inkubiert (Ladekontrolle). Anhand des Proteinmarkers und der zu erwartenden Höhe der Proteinbanden, also je nach Molekulargewicht der Proteine, die im WB nachgewiesen wurden, wurde die Höhe bestimmt, an der die Membran zerschnitten wurde. In unserem Versuch wurde als Ladekontrolle HSC70 (Catalog #sc-7298, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA, Verdünnung 1:2000) verwendet, welches ein Molekulargewicht von 70 kDa aufweist. CD44 kann ein Molekulargewicht zwischen 85 – 250 kDa aufweisen, je nachdem welche Zelllinie man verwendet. Bei HT29 liegt das Molekulargewicht bei ca. 140 kDa, deshalb wurde in unserem Versuch die Membran zwischen 70 kDa und 140 kDa zerschnitten.

Unspezifisch gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Hiernach folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (goat anti mouse IgG (D0486), Dako, Glostrup, Dänemark)) in einer Verdünnung von 1:4000 für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer. Beendet wurde der Detektionsprozess mit drei Waschvorgängen der Membranen mit TBS-T.

Tabelle 7: Übersicht verwendeter Detektions-Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
CD24 (Altevogt)	1:50	goat anti mouse IgG (D0486; Dako, Glostrup, Dänemark)	1:4000
CD44 (Catalog #BBA10, R&D Systems, Inc. Minnesota, USA)	1:500	goat anti mouse IgG (D0486; Dako, Glostrup, Dänemark)	1:4000
HSC70 (Catalog #sc-7298, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA)	1: 2000	goat anti mouse IgG (D0486; Dako, Glostrup, Dänemark)	1:4000

3. Ergebnisse

3.1 Durchflusszytometrie

Um die potenzielle gegenseitige Beeinflussung der Tumorstammzellmarker CD44, CD24 und CD133 zu überprüfen, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen der vier Zelllinien BxPC3, PaCa5061, SW620 und HT29 nach KD von CD44 und CD24 durchgeführt. Dabei wurde stets die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Isotypenkontrolle von der MFI der Antikörperbindung abgezogen. Hieraus ergab sich der in den Abbildungen dargestellte Δ MFI-Wert. In den folgenden Balkendiagrammen wird jeweils der Δ MFI-Wert der Kontrolltransfektante („neg“ bzw. „luc“) als Referenzwert für die Bestimmung der Veränderung der Proteinmengen in den KD-Zellen (shCD44 bzw. shCD24) mit abgebildet.

Die Zelllinie BxPC3 zeigte bei einem KD von CD24 eine unveränderte Menge an CD44 im Vergleich zur Kontrolle. Nach KD von CD44 war eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung von CD24 messbar. Auf BxPC3-Zellen ließ sich in der Durchflusszytometrie kein CD133 nachweisen. Dies änderte sich auch durch einen KD von CD24 oder CD44 nicht. Der KD von CD44 ($p=0,002$) und CD24 ($p=0,0018$) war jeweils sehr deutlich nachweisbar (Abb. 4).

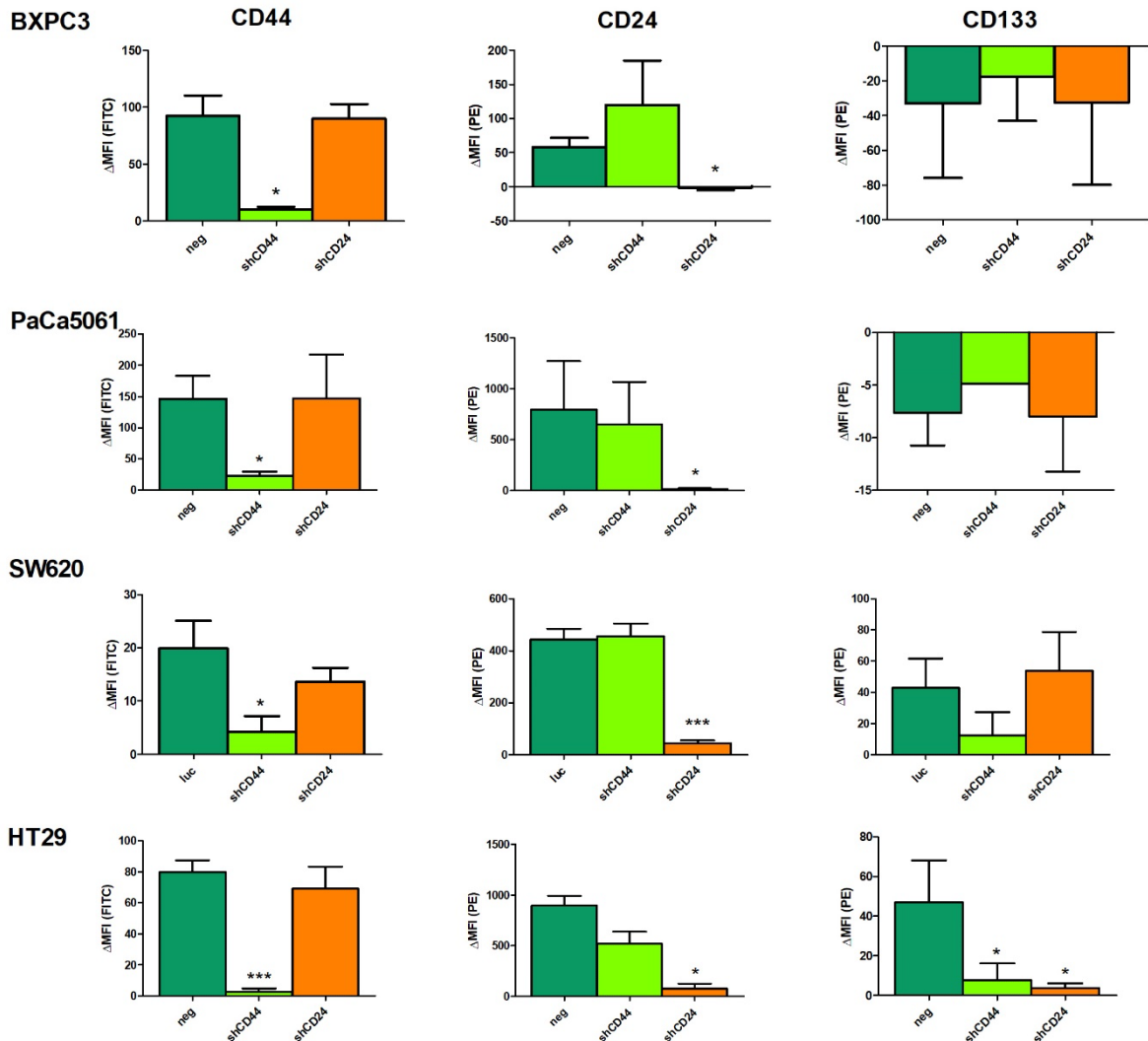


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Messung der Proteinmengen von CD44, CD24 und CD133 auf der Zelloberfläche humaner gastrointestinaler Tumorzellen nach Kontrolltransfektion (neg/Luc, dunkelgrün) bzw. shRNA-vermitteltem KD von CD44 (shCD44, hellgrün) oder CD24 (shCD24, orange). Die Balkendiagramme repräsentieren die Mittelwerte \pm SD (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test (*p < 0,05, **p < 0,001, ***p < 0,0001).

Die Zelllinie PaCa5061 zeigte keine veränderte Proteinmenge von CD44 bei einem KD von CD24. Ebenso wenig erhöhte sich CD24 bei einem KD von CD44. Ähnlich wie die Zelllinie BxPC3 zeigte auch PaCa5061 kein CD133. Das Proteinlevel wurde durch einen KD von CD24 oder CD44 nicht verändert. Sowohl der KD von CD44 ($p=0,0048$) als auch der KD von CD24 ($p=0,0397$) waren signifikant nachweisbar (Abb. 4).

Die Zelllinie SW620 zeigte bei einem KD von CD24 keine Veränderung von CD44. Auch bei einem KD von CD44 konnte keine veränderte Proteinmenge von CD24 beobachtet werden. Auf SW620-Zellen ließ sich CD133 nachweisen, welches durch einen KD von CD44 tendenziell, aber nicht signifikant verringert wurde. Der KD von CD24 hatte keinen

Einfluss auf CD133. Der KD von CD24 ($p=0,00009$) und CD44 ($p=0,010$) war jeweils wieder deutlich nachweisbar (Abb. 4).

Die Zelllinie HT29 zeigte bei KD von CD44 bzw. CD24 keine signifikanten Änderungen in Bezug auf die Menge des jeweils „anderen“ Proteins (CD24 bzw. CD44). Allerdings zeigten sich sowohl im KD von CD44 als auch im KD von CD24 eine signifikante Verringerung von CD133. Der KD von CD24 ($p=0,010$) und CD44 ($p=0,00007$) war erneut deutlich nachweisbar (Abb. 4).

Aufgrund des beobachteten Einflusses des CD24-KD und CD44-KD auf CD133 bei der Zelllinie HT29 wurden anschließend weitere Derivate dieser Linie mit einem KD von CD133 auf die Höhe des CD133 Expressionsniveaus untersucht. Hier zeigte sich überraschend eine deutliche Heraufregulation von CD24 im CD133-KD ($p=0,0004$), während CD44 unverändert blieb (Abb. 5). Der Nachweis von CD133 konnte belegen, dass der CD133-KD ebenfalls sehr gut funktioniert hat ($p=0,0011$) (Abb. 5).

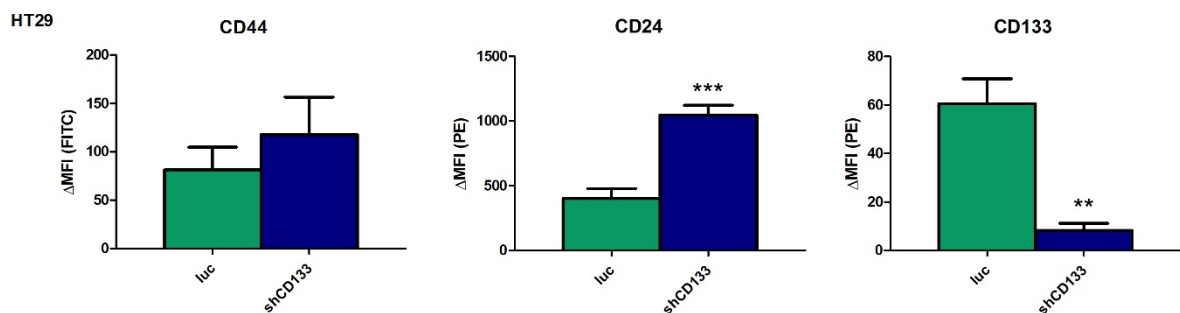


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Messung der Proteinmengen von CD44, CD24 und CD133 auf der Zelloberfläche von HT29-Zellen nach Kontrolltransfektion (luc, dunkelgrün) bzw. shRNA-vermitteltem KD von CD133 (shCD133, dunkelblau). Die Balkendiagramme repräsentieren die Mittelwerte+SD (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test (p < 0,001, ***p < 0,0001).**

Aufgrund der offenbar gegenseitigen Beeinflussung von CD133 und CD24 bei der Linie HT29 (das CD133 Proteinlevel wurde bei CD24-KD verringert, siehe Abb. 4, während das CD24 Proteinlevel bei CD133-KD gesteigert wurde, siehe Abb. 5, wurde im nächsten Schritt ein Doppel-KD von CD133 und CD24 angestrebt. Hierdurch entstanden vier neue Zellinienderivate der Linie HT29 (zur Illustration siehe Abb. 6):

1. die korrespondierende Kontrolle („luc-neg“), für die die oben erwähnte Kontrolltransfektante des CD133-KD („luc“, Selektion mit Puromycin) einer Transduktion mit dem Vektor des zusätzlichen CD24-KD („neg“, Selektion mit Neomycin) unterzogen wurde (Vektor mit scrambled Sequenz für eine ungerichtete shRNA)

2. der CD24-Einzel-KD („luc-shCD24“), für den die oben erwähnte Kontrolltransfektante des CD133-KD („luc“, Selektion mit Puromycin) einer Transduktion mit einem shRNA-Konstrukt gegen CD24 (Selektion mit Neomycin) unterzogen wurde
3. der CD133-Einzel-KD („neg-shCD133“), für den der oben erwähnte CD133-KD (Selektion mit Puromycin) einer Transduktion mit dem Vektor des zusätzlichen CD24-KD (Selektion mit Neomycin) unterzogen wurde
4. der CD133/CD24-Doppel-KD („shCD133/shCD24“), für den der oben erwähnte CD133-KD (Selektion mit Puromycin) einer Transduktion mit einem shRNA-Konstrukt gegen CD24 (Selektion mit Neomycin) unterzogen wurde.

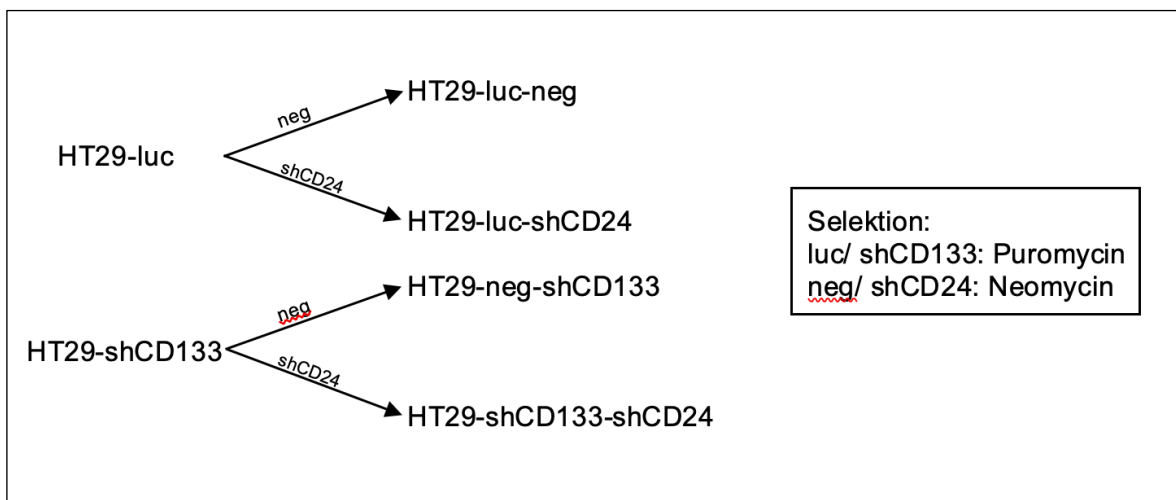


Abbildung 6: Herstellung von CD133/CD24-Doppel-KD-Derivaten und korrespondierender Kontrollen aus der Zelllinie HT29 basierend auf HT29-luc bzw. -shCD133 Zellen.

Die nachstehende Abbildung 7 zeigt, dass die Herstellung der vier Zelllinienderivate für den Doppel-KD von CD133 und CD24 gut funktioniert hat: im CD133-Einzel-KD zeigte sich nach wie vor eine gute CD133-Reduktion ($p=0,001$) und CD24 war wieder erhöht ($p=0,0004$), während CD44 unverändert war (vgl. Abb. 5). Bei CD24-Einzel-KD zeigte sich wieder eine gute CD24-Reduktion ($p=0,0008$), doch war diesmal das CD133 nicht vermindert (im Ggs. zu Abb. 4). Stattdessen zeigte sich eine unerwartete Heraufregulation von CD44 bei KD von CD24 sowohl im Einzel- ($p=0,048$) als auch im CD133/CD24-Doppel-KD ($p=0,036$). Der Doppel-KD konnte wie erhofft das CD24-Level, welches im CD133-KD erhöht war, auf das Niveau der Kontrollzellen angleichen. Die Reduktion von CD133 war auch im Doppel-KD signifikant nachweisbar ($p=0,0008$).

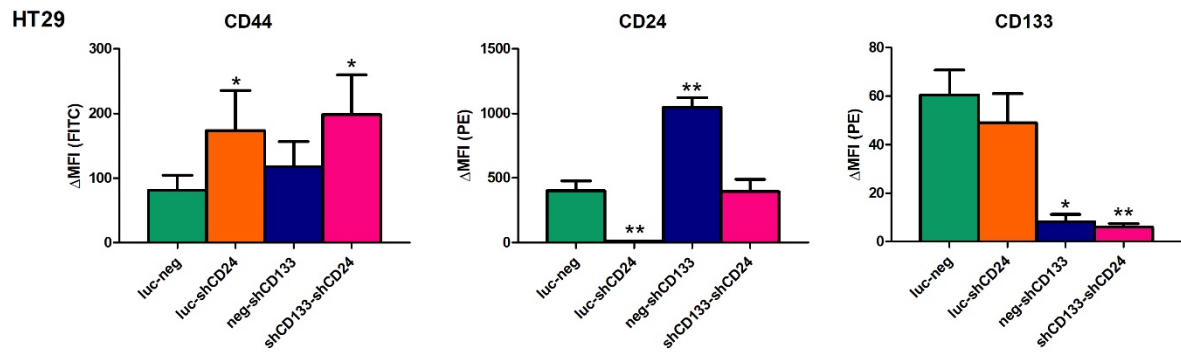


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Messung der Proteinmengen von CD44, CD24 und CD133 auf der Zelloberfläche von HT29-Zellen nach Kontrolltransfektion (luc-neg, dunkelgrün) bzw. shRNA-vermitteltem KD von CD24 (luc-shCD24, orange) oder CD133 (neg-shCD133, dunkelblau) oder Doppel-KD von CD133 und CD24 (shCD133-shCD24, pink). Die Balkendiagramme repräsentieren die Mittelwerte+SD (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test (*p < 0,05; **p < 0,001).

3.2 Primärtumorwachstum und spontane systemische Disseminierung von HT29 Xenografts nach Einzel- und Doppel-Knockdown von CD24/CD133 in SCID-Mäusen

Nach Injektion der Tumorzellen in immundefiziente Mäuse musste der Versuch aufgrund von Ulzerationen der Haut über den sich entwickelnden Xenograft-Tumoren frühzeitig beendet werden. Die Dauer bis zum Erreichen dieses Endpunkts sowie die bei der Autopsie resultierenden Tumorgewichte unterschieden sich nach Einzel-/Doppel-KD von CD24/CD133 nicht. Im Mittel wuchsen die Tumore bis zur Ulzeration ca. 30 d und hatten bei der Autopsie ein Gewicht von ca. 0,3 g (Abb. 8 a).

Das von den Mäusen entnommene Vollblut und Lungengewebe wurde auf Unterschiede in der Menge nachweisbarer humaner DNA in vergleichbaren Mengen muriner DNA untersucht. Diese Methode (Alu-qPCR) gibt in einem Xenograftmodell (humane Tumorzellen in Mäusen) Aufschluss über die metastatische Zelllast in den untersuchten Geweben. Wie die nachfolgenden Abbildungen darstellen, gab es eine signifikante Abnahme der mittleren CTC-Zahl im Vollblut im Doppel-KD von CD133 und CD24 ($p=0,0226$). Im Lungengewebe führte der KD von CD133 zu einem signifikanten Anstieg der DTC ($p=0,0351$). Dieser Effekt wurde durch den Doppel-KD wieder nivelliert (Abb. 8 b).

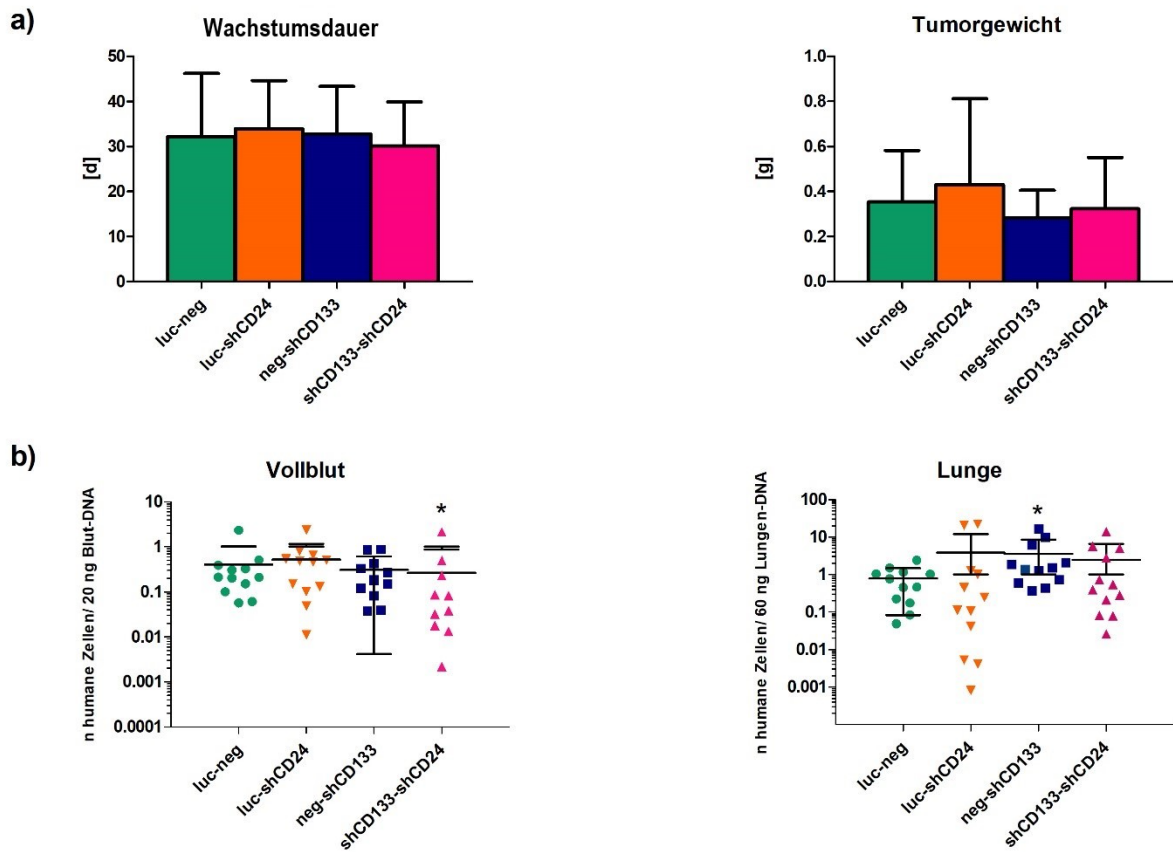


Abbildung 8: Subkutanes Xenograftmodell von HT29-Zellen in immundefizienten Mäusen. Versuchsendpunkte: Tumorgöße von ca. 1 cm³ oder vorherige Ulzeration der Haut. Darstellung der Wachstumsdauer [d] bis zum Erreichen des Endpunktes und resultierendes Tumorgewicht [g] bei Autopsie (a). Detektion der Anzahl humaner Zellen pro eingesetzter GesamtdNA-Menge aus murinem Vollblut bzw. Lungengewebe zum Zeitpunkt der Autopsie (Alu-qPCR) (b). Die Balkendiagramme in (a) repräsentieren die Mittelwerte+SD von n=12. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test (*p < 0,05).

3.3 Histologische Aufarbeitung von Xenograft-Primärtumoren und Lungengewebe

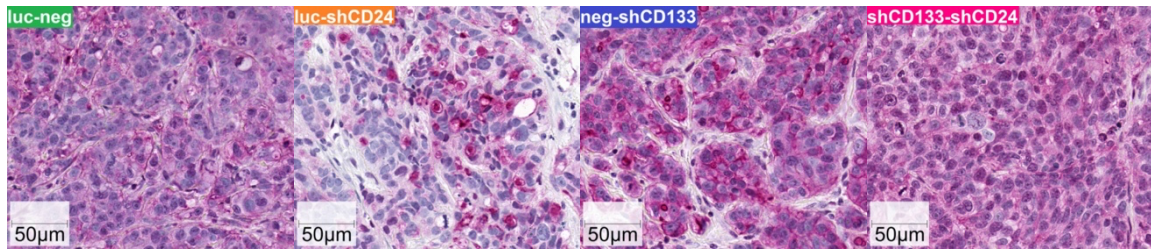
Zunächst sollte untersucht werden, ob die nach Einzel- und Doppel-KD *in vitro* festgestellten Änderungen der Proteinmengen von CD133, CD24 und CD44 auch noch nach Wachstum der Zellen als s.c. Xenografttumore nachweisbar waren. Die an den Primärtumoren durchgeführte immunhistochemische Anfärbung von CD24 wies sowohl in der Kontrolle als auch im Doppel-KD (dessen CD24-Niveau *in vitro* dem der Kontrolle entsprach), eine homogene Verteilung von CD24 im Gewebe auf. Die Tumorzellen waren überwiegend cytoplasmatisch und nur teilweise membranös angefärbt. Die *in vitro* nachgewiesene Steigerung von CD24 im CD133-KD ließ sich rein optisch anhand der IHC Färbungen nicht bestätigen. Die Primärtumore mit KD von CD24 zeigten eine reduzierte, aber homogen verteilte Anfärbbarkeit für CD24. Daher wurde die CD24 Proteinmenge später noch mittels WB quantifiziert (siehe unten).

Der CD133-KD ließ sich immunhistochemisch eindeutig nachweisen (Abb. 9). Daher wurde hier kein WB angeschlossen. In den Gruppen ohne CD133-KD zeigte sich eine sehr heterogene Anfärbbarkeit innerhalb der Xenografttumore ohne klaren Bezug zum Tumorrand oder nekrotischen Kern. Meist waren einzelne Primärtumorzellen CD133-positiv und morphologisch entsprachen diese Zellen am ehesten Becherzell-ähnlichen Zellen, die in HT29-Xenografts typischerweise vorkommen. Zusätzlich schienen in umschriebenen Arealen luminale Oberflächen angefärbt zu sein, die von Tumorzellen umgeben waren, die abortive, Krypten-ähnliche Strukturen bildeten (Pfeile in Abb. 9). In einem Teil dieser Fälle war auch der „Krypten“-inhalt angefärbt. Solche Formationen kamen beim CD133-Einzel- und -Doppel-KD auch vor, waren aber negativ für CD133 (Pfeilköpfe in Abb. 9).

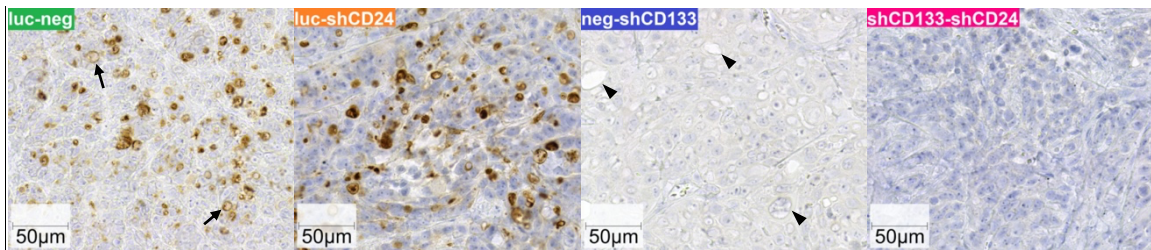
Die Xenografttumore aller Gruppen zeigten nur eine schwache Anfärbbarkeit für CD44. Unabhängig von der Versuchsgruppe konnte CD44 jeweils insbesondere in der Übergangszone vom vitalen Tumorgewebe zu nekrotischen Arealen (paranekrotische Zone) nachgewiesen werden (Abb. 9). Einige Primärtumore aus den Gruppen mit einem CD24-KD wiesen tendenziell verstärkte CD44 Level auf, wie zuvor auch schon in der FACS-Messung *in vitro* festgestellt worden war. Da die CD44 IHC die Anhebung von CD44 im CD24-KD jedoch nicht eindeutig belegen konnte, wurde auch für CD44 ein WB angeschlossen (siehe unten).

Die laut Alu-qPCR signifikant erhöhte Anzahl an disseminierten Tumorzellen in den Lungen von Versuchstieren der Gruppe HT29-neg-shCD133 konnte histologisch nicht verifiziert werden. Es waren jedoch in allen untersuchten Mauslungen aller Versuchsgruppen keine Metastasen histologisch nachweisbar, was erfahrungsgemäß gut zu der frühen Ulzeration und demzufolge geringen Größe der korrespondierenden s.c. Primärtumore in allen Gruppen passte.

CD24



CD133



CD44

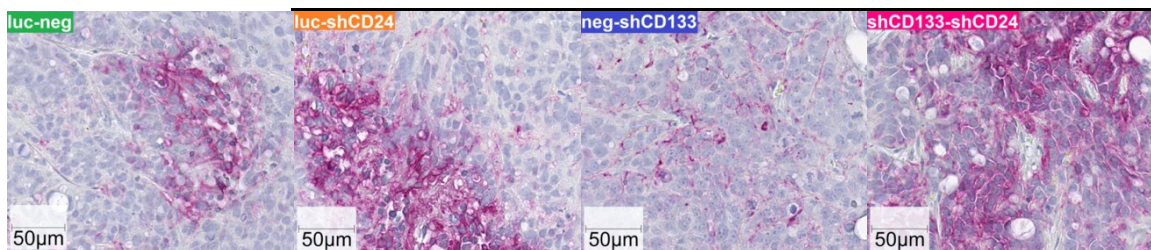


Abbildung 9: Repräsentative Mikrofotographien immunhistochemischer Färbungen der s.c. Xenograft-Primärtumore der HT29-Zellinierivate mit/ ohne CD24/ CD133-Einzel- bzw. -Doppel-KD. Der immunhistochemische Nachweis von CD24 zeigt in den Xenograft-Primärtumoren eine homogene Verteilung im gesamten Gewebe, mit sowohl zytoplasmatischer, als auch membranöser Anfärbung. CD133 scheint vor allem an der apikalen / endoluminalen Oberfläche kryptenähnlicher Strukturen und in Becherzell-ähnlichen Zellen exprimiert. CD44 ist insbesondere in der Übergangszone vom vitalen Tumorgewebe zu nekrotischen Arealen (paranekrotische Zone) exprimiert und es deutet sich die oben beschriebene Induktion von CD44 bei CD24-KD an.

3.4 Quantifizierung der CD24 und CD44 Proteinmengen in Xenografttumoren mittels Western Blot

Tatsächlich zeigte sich, dass die Menge an CD24 in den Xenografttumoren auch nach *in vivo*-Wachstum beim CD133 Einzel-KD signifikant erhöht war ($p=0,0111$, vgl. Abb. 7). Ebenso war der KD von CD24 signifikant nachweisbar ($p=0,0005$) (Abbildung 10). Der Doppel-KD führte wieder zu einer Nivellierung des CD24-Levels.

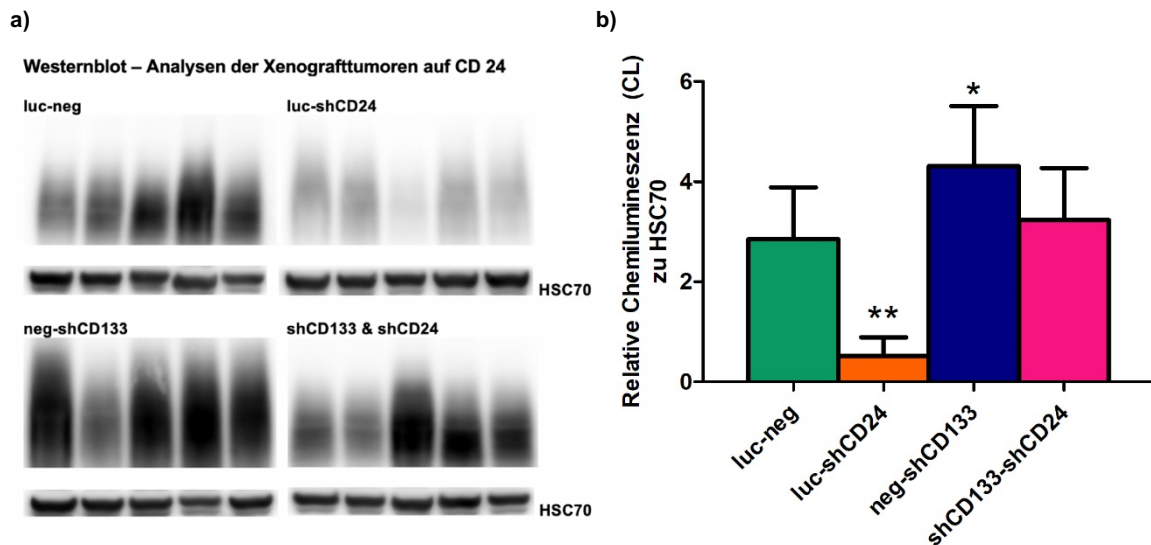


Abbildung 10: CD24-Proteinlevel in Xenografftumor-Gewebeextrakten (Western Blot, n=5). Vergleich zwischen Kontrolle (luc-neg), KD von CD24 (luc-shCD24), KD von CD133 (neg-shCD133) sowie Doppel-KD von CD24 und CD133 (shCD133-shCD24). HSC70 diente als Ladekontrolle (a). Quantifizierung der Proteinlevel (b). Die Balkendiagramme repräsentieren die Mittelwerte+SD der Ratio der Chemilumineszenz-Intensität des analysierten Proteins (CD24) geteilt durch die Chemilumineszenz-Intensität der Ladekontrolle (HSC70) von n=5. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

Im WB für CD44 zeigte sich eine signifikante Steigerung des CD44-Gehalts in den CD24-Einzel-KD-Tumoren ($p=0,0254$) (Abb. 11). Dies bestätigte die zuvor *in vitro* per Durchflusszytometrie nachgewiesene Steigerung des CD44 im CD24-Einzel-KD, jedoch nicht im CD133/ CD24-Doppel-KD (vgl. Abb. 7).

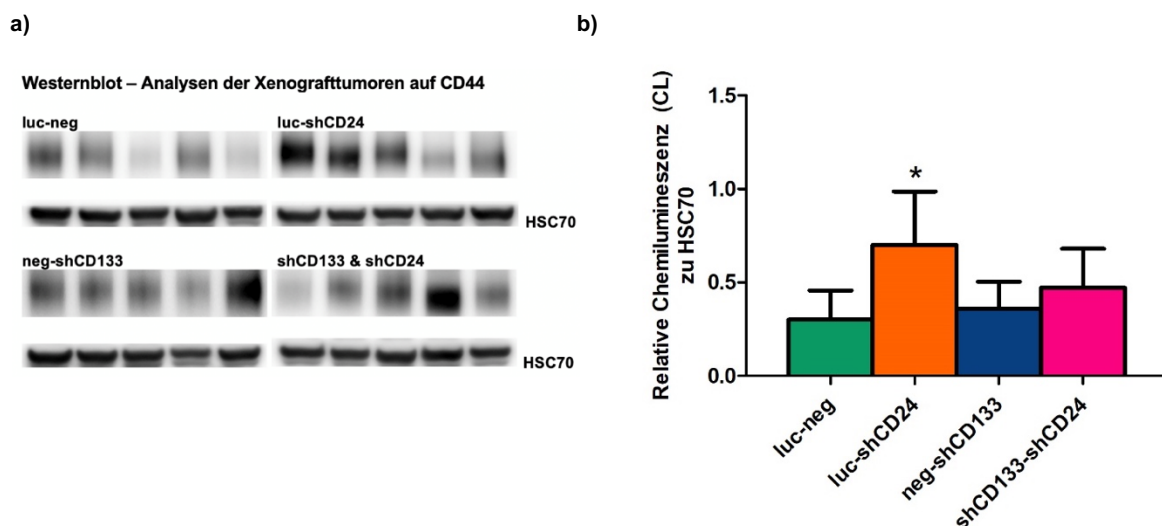


Abbildung 11: CD44-Proteinlevel in Xenografftumor-Gewebeextrakten (Western Blot, n=5). Vergleich zwischen Kontrolle (luc-neg), KD von CD24 (luc-shCD24), KD von CD133 (neg-shCD133) sowie Doppel-KD CD24 und CD133 (shCD133-shCD24). HSC70 diente als Ladekontrolle (a). Quantifizierung der Proteinlevel (b). Die Balkendiagramme repräsentieren die Mittelwerte+SD der Ratio der Chemilumineszenz-Intensität des analysierten Proteins (CD44) geteilt durch die Chemilumineszenz-Intensität der Ladekontrolle (HSC70) von n=5. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test (* $p < 0,05$).

4. Diskussion

Krebserkrankungen sind in unserer Gesellschaft weit verbreitet. Weltweit sind im Jahr 2020 19,3 Millionen neue Krebsfälle und fast 10,0 Millionen Krebstodesfälle aufgetreten (Sung et al., 2021). Darmkrebs (CRC) ist das dritthäufigste Malignom weltweit und ist besonders im metastasierten Stadium mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert (Arnold et al., 2017, Link et al., 2005).

Obwohl vor allem die Metastasierung die primäre Todesursache für > 90 % der Krebspatienten darstellt (Steeg, 2006), bleiben trotz intensiver Forschung viele Prozesse und Regulationsschritte unverstanden (Barnes et al., 2016). In jüngerer Vergangenheit lieferten u.a. die Tumorstammzellhypothese und die Entdeckung potenzieller Stammzellmarker wichtige neue Erkenntnisse zum besseren Verständnis der Tumormetastasierung.

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war zu untersuchen, inwieweit sich die Expressionslevel der potenziellen Tumorstammzellmarker CD133, CD24 und CD44 nach KD von CD44 und CD24 in verschiedenen Zelllinien humaner GI-Tumore verändern, ob es Hinweise auf eine eventuelle wechselseitige Beeinflussung gibt und ob sich nach Identifikation einer Kandidaten-Zelllinie im Xenograftmodell Hinweise für den Einfluss der Marker auf die spontane hämatogene Metastasierung in die Lunge zeigen.

4.1 Änderungen der Expression von CD24, CD44 und CD133 nach KD von CD44 und CD24

Das erste Ziel dieser Doktorarbeit war es zu untersuchen, wie sich ein KD von CD44 bzw. CD24 auf die Expressionslevel von CD133, CD24 und CD44 in verschiedenen Zelllinien humaner gastrointestinaler (GI)-Tumoren auswirkt.

Von den untersuchten Zelllinien reagierte nur HT29 mit sekundären Effekten auf den KD von CD24 und CD44. Es zeigte sich in beiden KDs eine signifikante Reduktion der CD133-Expression. Interessanterweise konnten durch den KD von CD24 oder CD44 in keiner der untersuchten Zelllinien signifikante Änderungen in Bezug auf die Menge des jeweils „anderen“ Proteins erzielt werden. Zur Verifizierung der erhobenen Daten wurden die Expressionslevel der Marker in allen Zelllinien in mindestens drei zeitlich unabhängigen Messungen bestätigt.

Zu diskutieren bleibt zunächst die Frage, wie gut konventionell *in vitro* kultivierte Zellen die Eigenschaften von Zellen im Organismus widerspiegeln und, inwieweit sich *in vitro*-Assays und die verwendeten Marker dazu eignen, Aussagen über die originären Tumorzellen zu treffen. Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben ist der Phänotyp der Tumorzellen sehr plastisch und wird unter anderem durch das umgebende Mikromilieu im Gewebe beeinflusst. Diese sog. „Nischenfaktoren“ wie beispielsweise die extrazelluläre Matrix, Fibroblasten oder Entzündungszellen (Abdul Khalek et al., 2010, Wang et al., 2020) fehlen bei der Kultivierung *in vitro*. Vorstellbar wäre daher, dass sich der Phänotyp der Tumorzellen im Laufe der Kultivierung in der Zellkultur aufgrund der fehlenden Signale dieser „Nischenfaktoren“ verändert haben könnte.

Neben diesem Aspekt weist die Zellkultur-Technologie weitere Limitationen auf, die eine kritische Prüfung über den prädiktiven Wert dieser Modelle notwendig machen. In dieser Arbeit wurden Zelllinien verwendet, die aus krebsartig transformiertem Gewebe isoliert wurden. Übersichtsarbeiten von unter anderem Frank und Nowak kamen zu dem Schluss, dass Tumorzellen durch Akkumulation von somatischen Mutationen, Transformation und Selektion weit vom ursprünglichen Ausgangsgewebe abweichen (Frank und Nowak, 2004, Ponten, 2001). Diese Zellen bilden aber das Ursprungsgewebe der Zelllinien. Die Akkumulation von somatischen Mutationen hängt ferner von der Mutationsrate, der Anzahl der Zellteilungen in der Geschichte einer Zelllinie und der Art des Wettbewerbs zwischen verschiedenen Zelllinien ab (Frank und Nowak, 2004). Denkbar ist demnach eine Akkumulation von Mutationen durch Passagierung, welche die Zelllinie immer weiter vom Ursprungsgewebe entfernt. Gerade nach längerer Kultivierungszeit könnten daher neue Mutationen zu einer veränderten Genexpression führen, die sich in veränderten Markerexpressionen und einer möglicherweise veränderten gegenseitigen Beeinflussung dieser Marker niederschlagen könnte.

Weitere Probleme betreffen die Zell-Authentizität und mögliche Kreuzkontaminationen. Gefürchtet ist vor allem eine Kontamination mit HeLa-Zellen, die oftmals unbemerkt bleibt. Eine Studie von Buehring et al. fand 220 wissenschaftliche Publikationen mit Ergebnissen von Experimenten mit Zelllinien, deren Ursprungszelllinie vermutlich mit HeLa-Zellen überwuchert waren (Buehring et al., 2004). Ein weiteres nicht zu unterschätzendes Problem stellen falsch identifizierte Zelllinien dar. Um eine möglichst hohe Validität und bessere Reproduzierbarkeit von Zellkulturexperimenten mit Zelllinien zu erreichen, sind deshalb intensive Qualitätskontrollen und standardisierte Abläufe in der Zellkultur notwendig (Schmitz, 2011). Um diesen hohen Standard sicherzustellen, wurden die in dieser Arbeit

verwendeten Zelllinien zuvor durch das Leibniz-Institut DSMZ in Braunschweig mittels STR (*short tandem repeats*) - Profiling authentifiziert.

Des Weiteren können Zellmorphologie und zelluläre Funktionen durch Zellkultur-Zusätze beeinflusst werden. Diese werden eingesetzt um etwaige Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen oder Mykoplasmen zu verhindern. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden daher regelmäßig auf das Vorhandensein von Mykoplasmen negativ getestet. Der Einfluss auf u.a. die Zellmorphologie und zelluläre Funktionen durch die prophylaktische Gabe von Antibiotika wurde bereits von Kuhlmann beschrieben (Kuhlmann, 1995). Aber auch Effekte durch den Zusatz von fötalem Kälberserum oder das toxisch wirkende DMSO müssen in der Zellkulturforschung berücksichtigt und bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden (Hartung, 2007).

4.2 Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung

Der beobachtete Einfluss des CD24-KD und CD44-KD auf die CD133-Expression bei der Zelllinie HT29 könnte ein Hinweis auf eine gegenseitige Beeinflussung der Expression von Stammzellmarkern im CRC sein. Um diese potenzielle Beeinflussung weiter zu analysieren, wurden daher weitere Derivate von HT29 mit einem KD von CD133 hergestellt. Hier zeigte sich der gegenteilige Effekt, nämlich eine deutliche Heraufregulation der Expression von CD24 im CD133-KD ($p=0,0004$), wohingegen die CD44-Expression unverändert blieb. Um festzustellen, ob funktionelle Effekte des CD133-KD indirekt über die Heraufregulation von CD24 vermittelt waren, wurde im Anschluss ein Doppel-KD von CD24 und CD133 erfolgreich durchgeführt. Erfreulicherweise konnte der Doppel-KD das CD24-Expressionslevel, welches im CD133-KD erhöht war, wieder auf das Niveau der Kontrollzellen angleichen.

Zudem zeigte sich nun sowohl im „neuen“ Einzel-KD von CD24 (der auf HT29-luc Zellen, also der Kontrolltransfektante der shCD133-KD-Linie basierte) als auch im Doppel-KD von CD133/ CD24 (mit eigentlich „normalisiertem“ CD24-Niveau) eine erhöhte CD44 Expression (*in vitro*), welche zuvor mit den ursprünglichen CD24-KD-Zellen (die auf parental HT29-Zellen basierten) nicht beobachtet wurde. Dieser Unterschied kann verschiedene Ursachen haben. Vorstellbar wäre ein Einfluss auf die CD44-Expression durch den verwendeten neuen Vektor, der u.a. ein Neomycin-Resistenzgen trägt, um eine Doppelselektion auf den CD24-KD (Neomycin) und CD133-KD (Puromycin) zu ermöglichen. Möglicherweise führt auch allein die mehrmalige Transfektion (shCD133) und Transduktion (shCD24) derselben Zellen zu unerwünschten sekundären Effekten, die

letztlich mit einem veränderten CD44-Level einhergehen. Diese Überlegungen werden durch eine Übersichtsarbeit von Stepanenko und Heng untermauert. Sie kommt zu dem Schluss, dass Vektortransfektionen und die weitere Selektionierung der Zellen zelluläre Reaktionen hervorrufen kann, die neben Veränderungen auf Genomebene auch epigenetische und phänotypische Veränderungen verursachen, die über die Funktion der manipulierten Gene hinausgehen (Stepanenko und Heng, 2017). Zusätzlich konnten Moran et al. nachweisen, dass DNA-Vektoren, die das *pac*-Resistenzgen exprimieren (die Puromycin-Resistenz wird durch das Puromycin-N-Acetyltransferase (*pac*)-Gen übertragen), eine unerwartete Reaktion auf fehlgefaltete Proteine hervorrufen (Moran et al., 2009). Die Verwendung Puromycin-basierter Vektoren führte zur Aggregation kritischer multifunktionaler Proteine (u.a. HSP70 (Hitzeschockprotein 70kDa), SUMO-1 (Small ubiquitin-related modifier 1), die konsekutiv mehrere zelluläre Prozesse beeinträchtigen und zu einer Veränderung der Ergebnisse oder der Interpretation experimenteller Studien führen könnten (Moran et al., 2009).

Eine Studie von Li et al. zeigte, dass Puromycin-resistente Subklone, die unter anderem aus HT29- oder SW480-Zelllinien selektioniert wurden, im Durchschnitt >10-mal mehr neue Chromosomenaberrationen aufwiesen als zufällig ausgewählte (ohne Puromycin) Klone aus elterlichen Zellen (Li et al., 2005). Diese erhöhte genetische Instabilität könnte im Einzelfall zu unterschiedlichen sekundären Effekten geführt haben.

Zudem könnte die im „alten“ bzw. „neuen“ Ansatz transduzierte shRNA gegen CD24 an unterschiedlichen Stellen im Genom integriert worden sein, was zu unterschiedlichen sekundären Effekten auf die CD44-Expression geführt haben könnte. Andererseits könnte dieser neue Effekt aber auch ein Hinweis auf eine tatsächlich vorhandene gegenseitige Beeinflussung von CD44 und CD24 sein.

Die Beeinflussung der CD44-Expression durch CD24 wäre zum Beispiel über den Transkriptionsfaktor STAT3 denkbar. STAT3 spielt eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung zum Zellkern und scheint verantwortlich für die Regulation der Genexpression in verschiedenen physiologischen Prozessen zu sein (Wong et al., 2017). Von allen STAT-Proteinen ist vor allem STAT3 als potenzieller Angriffspunkt für die Tumorthherapie in den Fokus der Forschung gerückt (Yu et al., 2014), da es die Transkription mehrerer kritischer Schlüsselgene, die unter anderem an Zellproliferation, Differenzierung, Metastasierung, Zellüberleben und Angiogenese beteiligt sind, maßgeblich zu regulieren scheint (Akira et al., 1994, Forbes et al., 2016, Xiong et al., 2014). Zudem wurde eine erhöhte STAT3 Aktivität bei diversen Tumoren, unter anderem dem CRC, festgestellt (Lin et al., 2011). Eine Studie von Bretz et al. untersuchte die funktionellen Konsequenzen des KD und der Überexpression von CD24 in menschlichen Tumorzelllinien (A549-

Lungenkrebs und BxPC3-Bauchspeicheldrüsenkrebs-Xenografts in Mäusen) und kam zu dem Ergebnis, dass der KD nicht nur die Zellproliferation und Adhäsion reduzierte, sondern auch die Phosphorylierung von u.a. STAT3 (Bretz et al., 2012b). Die Phosphorylierung ist jedoch entscheidend für die Aktivierung von STAT3 und steigert dessen transkriptionelle Aktivität (Rebe et al., 2013). Eine andere Studie fand heraus, dass die Hochregulierung von CD24 die Aktivierung von STAT3 erfordert (Huser et al., 2018).

Interessanterweise legen Daten von Chung et al. nahe, dass der STAT3-Signalweg u.a. die Expression von CD44 zu beeinflussen scheint. Auf der Suche nach chemopräventiven Wirkstoffen (Wirkstoffe, die ein Krankheitsgeschehen wie z. B. Krebs vermeiden oder verzögern sollen) zur Unterdrückung des CSC-Wachstums behandelten Chung et al. in ihrer Studie Mammakarzinom-Zelllinien mit Curcumin und Epigallocatechingallat. Zur Charakterisierung der CSC wurde CD44 gewählt, daher wurde der Behandlungserfolg anschließend anhand einer FACS-Messung der CD44-positiven Subpopulationen gemessen. Die kombinierte Behandlung verringerte die CD44-exprimierende Subpopulation tatsächlich und Western Blot- sowie Immunpräzipitationsanalysen zeigten, dass die Wirkstoffe spezifisch die STAT3-Phosphorylierung verringerten (Chung und Vadgama, 2015). Eine direkte Verbindung von CD44 und STAT3 konnten Chung et al. bereits für Mammakarzinom-Zelllinien zeigen. In dieser Studie führte nicht nur der gezielte KD von STAT3 zu einer Verringerung der CD44-positiven Zellsubpopulation, sondern umgekehrt auch der KD von CD44 zu einer Reduktion von phosphoryliertem STAT3 (Chung et al., 2013).

Da die Expression beider CSC-Marker von aktiviertem (phosphoryliertem) STAT3 beeinflusst zu werden scheint und der jeweilige KD der Marker zu einer verringerten Phosphorylierung von STAT3 führte, würde man annehmen, dass ein KD von CD24 auch die Expression von CD44 verringert und umgekehrt. Da dies nicht der Fall ist, liegt die Vermutung nahe, dass der in dieser Arbeit aufgetretene Effekt der vermehrten Expression von CD44 im CD24-KD, der erst nach Verwendung des neuen Vektors zu beobachten war, am ehesten auf unerwünschte sekundäre Effekte (siehe oben) zurückzuführen ist. Denkbar wäre auch, dass anders als in der oben geschilderten Studie von Bretz et al. Zelllinien-spezifisch die hier verwendeten HT29-Zellen „versuchen“ den Verlust von CD24 durch ein verstärktes STAT3-Signaling zu kompensieren. Dies könnte dann in einer erhöhten CD44-Expression resultieren. Wie im folgenden Kapitel beschrieben, scheinen beide Marker auch einen Einfluss auf die hämatogene Metastasierung zu haben. Die Induktion von CD44 im CD133-CD24-Doppel-KD (FACS) und CD24-Einzel-KD (WB) könnte eine mögliche

Erklärung für die Beobachtung sein, dass die hämatogene Metastasierung nicht verringert war (siehe unten).

Die Signalwege, die Einfluss auf das Expressionsniveau der einzelnen Marker haben, sind Gegenstand aktueller Forschung. Die CD24-Expression könnte unter anderem durch Ral GTPasen reguliert werden (siehe Kapitel 1.4.3.) (Smith et al., 2006). Zudem konnten Ezzeldin et al. auch für CD133 eine direkte Korrelation zwischen CD133-Expression und RalA-Aktivierung in Krebsstammzellpopulationen im hepatozellulären Karzinom zeigen. In ihrer Studie zeigten Zellen mit verstärkter RalA-Aktivierung eine erhöhte Expression von CD133 (Ezzeldin et al., 2014). Auch CD133-positive Medulloblastom-Zellen scheinen ein höheres Maß an RalA-Aktivierung aufzuweisen (Ginn et al., 2016). Interessanterweise konnte auch für CD44 eine solche Korrelation gezeigt werden. In einer Studie von Male et al. wurden die Zellpopulationen der Zelllinie A549 (Adenokarzinom der Lunge) mittels Durchflusszytometrie nach hoher (CD44 Bright) und niedriger CD44 (CD44 Dim) Expression sortiert. Nach der Sortierung wurde die RalA-Aktivierung in diesen beiden Zellpopulationen analysiert. Die CD44 Bright-Population wies eine erhöhte RalA-Aktivierung im Vergleich zur CD44 Dim-Population auf, was darauf hindeutet, dass die RalA-Aktivierung auch für CD44-Expression eine wichtige Rolle spielen könnte (Male et al., 2012). Eine verstärkte Aktivierung der Ral-Proteine konnte nicht nur im Zusammenhang mit einzelnen Markern, sondern auch für CRC im Allgemeinen gezeigt werden. Analysen von CRC-Tumorzelllinien und menschlichem CRC-Patientengewebe zeigten, dass Ral-Proteine im Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe überaktiviert waren, was auf eine mögliche Rolle der Ral-Aktivierung bei der CRC-Onkogenese hinweist (Martin und Der, 2012, Martin et al., 2011). Somit könnten Ral GTPasen an Signalwegen beteiligt sein, über die eine gegenseitige Beeinflussung der Expression denkbar wäre.

Die hier vorgestellten Theorien zu Signalwegen, die eine gegenseitige Beeinflussung der Expression der Marker potenziell vermitteln könnten, bedürfen der Verifizierung in künftigen Studien. Diese Arbeit zeigt im Ergebnis eine Beeinflussung der Expression von CD133 im KD von CD24 bzw. CD44 sowie von CD24 im KD von CD133, und von CD44 im KD von CD24 anhand einer einzelnen humanen CRC-Zelllinie. Bereits in einer zweiten CRC-Zelllinie waren diese Effekte nicht mehr sichtbar, geschweige denn in den untersuchten PDAC-Linien. Nichtsdestotrotz konnte die Beeinflussung von CD44 im CD24-KD sowie von CD24 im CD133-KD auch nach Wachstum der Zelllinienderivate im Xenograftmodell bestätigt werden und dies war mit einem veränderten spontanen Metastasierungsverhalten assoziiert (siehe unten). Um jedoch fundierte Aussagen über die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Beeinflussungen treffen zu können, wären weitergehende Forschungsarbeiten notwendig, für die die vorliegende HT29-Zelllinie ein hilfreiches

Werkzeug darstellt. Es sollten weitere CRC-Zelllinien und insbesondere auch primäre Tumormodelle (z.B. Patienten-abgeleitete, Organoid-basierte Modelle) in Betracht gezogen werden.

4.3 Einfluss der Stammzellmarker auf die hämatogene Metastasierung im Xenograftmodell

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob sich eine direkte Evidenz für eine funktionelle Rolle der Stammzellmarker für die hämatogene Metastasierung finden lässt. Um den Effekt der Depletion eines der Stammzellmarker auf das Tumorwachstum sowie die spontane Metastasierungsfähigkeit realitätsnah *in vivo* abzubilden, wurde ein spontan metastasierendes Xenograft-Mausmodell verwendet.

Damit die Metastasierungskaskade in Gänze durchlaufen wird und „echte“ Metastasen spontan aus dem Primärtumor entstehen können, wurden die Tumorzellen subkutan injiziert. Eine orthotope Injektion der Tumorzellen hätte die Tumorausbreitung präziser rekapitulieren können, da diese eine Interaktion mit dem Ursprungsgewebe ermöglicht, was sich auf die anfängliche Invasion und Intravasation und folglich auch auf die Metastasierung auswirkt (Gomez-Cuadrado et al., 2017, Cespedes et al., 2007). Allerdings ist die subkutane Injektion weniger invasiv als die orthotope Implantation, so dass die Wahrscheinlichkeit einer artifiziellen Streuung von Tumorzellen im Moment der Implantation über verletzte Mikrogefäße bei der subkutanen Injektion geringer sein sollte. Ferner sind die heute gängigen Ansätze zur orthotopen Implantation von CRC-Xenografts nicht im eigentlichen Sinne orthotop, da sie meist nicht die histologisch korrekte Schicht betreffen (Lamina epithelialis der Tunica mucosa der Darmwand).

Erstaunlicherweise zeigte sich ein erster Hinweis auf einen möglichen Einfluss der Stammzellmarker auf die hämatogene Metastasierung bereits im Einzel-KD von CD133. Dieser führte zu einem signifikanten Anstieg der metastatischen Zelllast im Lungengewebe ($p=0,0351$). Zudem konnte die zuerst *in vitro* nachgewiesene Steigerung der CD24-Expression nach CD133-KD später mittels WB ebenfalls an den Xenograft-Primärtumoren bestätigt werden.

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Zelllast im Lungengewebe könnte in der gesteigerten Expression von CD24 liegen. Wie unter Kapitel 1.4.3 beschrieben, spielt CD24 eine Rolle bei der Zelladhäsion. Die Tumorzelle kann mittels CD24 an P-Selektin binden und so leichter ins Gewebe „einwandern“ (Aigner et al., 1997). Dass die CD24-P-Selektin-

Bindung die Lungenmetastasierung fördert, wurde bereits für Mammakarzinome und Lungenadenokarzinome gezeigt (Friederichs et al., 2000). Overdevest et al. inokulierten Mäusen über eine Schwanzveneninjektion CD24-manipulierte humane Urothelkarzinomzellen und stellten fest, dass eine Überexpression von CD24 nicht nur die akute Retention von Tumorzellen in der Lunge steigert, sondern auch zu einer größeren Tumormasse führt (Overdevest et al., 2011). Diese Befunde werden durch die hier getätigte Beobachtung gestützt, dass ein KD von CD24 die gesteigerte Metastasierung CD133-depletierter Xenografttumore, welche durch eine gesteigerte Expression von CD24 gekennzeichnet sind, wieder reduziert. Dass eine erhöhte CD24-Expression mit einer gesteigerten Metastasierungsfähigkeit einhergeht, legen auch Daten von Ke et al. nahe: In dieser Studie zeigte sich, dass CD24-positive Zellsubpopulationen der CRC-Zelllinien HCT116 und SW480 nicht nur CSC-Eigenschaften wie erhöhte Chemotherapie-Resistenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung aufweisen, sondern auch eine verbesserte Fähigkeit zum verankerungslosen Wachstum im *soft agar assay* (Ke et al., 2012).

Eine weitere mögliche Erklärung für die erhöhte Zelllast im Lungengewebe liefert eine neue Studie von Barkal et al., die berichtet, dass CD24 die angeborene Antitumor-Immunantwort moduliert. Tumorzellen sind in der Lage, sich der Clearance durch Makrophagen zu entziehen, indem sie anti-phagozytäre Oberflächenproteine überexprimieren, die auch als "Don't eat me"-Signale bezeichnet werden (Barkal et al., 2019). Zu diesen zählen unter anderem CD47 (Majeti et al., 2009) oder *Programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1) (Gordon et al., 2017). Barkal et al. postulieren, dass auch CD24 ein solches "Don't eat me"-Signal darstellt und die Immunevasion fördert, indem es mit dem inhibitorischen Rezeptor *Sialic acid-binding Ig-like lectin 10* (Siglec-10) auf Tumor-assoziierten Makrophagen interagiert (Barkal et al., 2019). Ein KD von CD24 oder Siglec-10, wie auch die Blockade der CD24-Siglec-10-Interaktion durch einen monoklonalen Antikörper, steigerten die Phagozytose der getesteten CD24-exprimierenden Mamma- und Ovarialkarzinome deutlich (Barkal et al., 2019).

Die durch den KD von CD133 gesteigerte CD24-Expression könnte auch in CRC eine verstärkte Immunevasion mit verminderter Phagozytose bewirken, die zu einer gesteigerten Anzahl von DTC im Lungengewebe führt. Diese Möglichkeit könnte experimentell adressiert werden, indem die Xenograft-Primärtumore mit/ ohne KD von CD133/ CD24 immunhistochemisch auf das Vorhandensein von phagozytierenden Immunzellen der unspezifischen Abwehr hin analysiert werden. Eine quantitativ noch aussagekräftigere Möglichkeit wäre die *ex vivo*-Immunphänotypisierung von Xenograft-Primärtumoren beispielsweise mittels Durchflusszytometrie oder Massenzytometrie (CyTOF). Hier könnte über die gleichzeitige Darstellung mehrerer Leukozyten-spezifischer Oberflächenmoleküle

eine genaue Charakterisierung der in die Xenograft-Tumore einwandernden murinen Leukozyten und deren Aktivitätszustand erfolgen. Zu beachten ist jedoch, dass die Zellen der unspezifischen (angeborenen) Abwehr in Abwesenheit eines adaptiven Immunsystems möglicherweise andere funktionelle Effekte hervorrufen als in einem voll immunkompetenten Wirtsorganismus.

Die verbesserte Metastasierungsfähigkeit in das Lungengewebe könnte auch durch den CD133-KD erklärbar sein. Wie bereits erwähnt, wiesen Shmelkov et al. nach, dass metastatische CD133-positive und CD133-negative Tumorzellen in NOD/SCID-Mäusen seriell tumorerzeugend waren (Shmelkov et al., 2008). Karim et al. untersuchten in ihrer Studie unter anderem die Auswirkungen eines CD133-KD auf die intestinale Tumorigenese in Tiermodellen. Der KO von CD133 führte zu signifikant stärkeren Darmentzündungen, abnormaler Kryptenproliferation und Dysplasie nach chemisch induzierten Darmentzündungen (Karim et al., 2014). Zusätzlich führte der KO zu einer höheren Tumorigenität in genetisch induzierten CRC-Mausmodellen (Karim et al., 2014). Tumore entstehen häufig an Orten chronischer Entzündungen, so auch beim CRC (De Lerna Barbaro et al., 2014). Vorstellbar wäre daher, dass der CD133-KD in den Xenograft-Primärtumoren systemisch auch im Lungengewebe zu vermehrten Entzündungen geführt hat. Der Beitrag von Entzündungen zum Fortschreiten von Primärtumoren ist wissenschaftlich bekannt (Ben-Neriah und Karin, 2011), inwieweit aber das Wachstum von Metastasen beeinflusst wird, ist aktuell noch wenig erforscht. El Rayes et al. konnten jedoch bereits zeigen, dass eine extrinsische Entzündung in der Lunge im Tiermodell zur Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark führt, die dann degranulieren und gespeicherte Proteasen freisetzen, was zur proteolytischen Zerstörung des antitumorigenen Faktors Thrombospondin-1 (TSP-1) führt (El Rayes et al., 2015). Thrombospondine sind eine Familie von Proteinen, die in der ECM vorkommen (Huang et al., 2017) und TSP-1 beeinflusst u.a. die Adhäsion, Invasion, Migration, Proliferation sowie Apoptose von Tumorzellen (Naumov et al., 2006, Jeanne et al., 2015). Allerdings ist die genaue Rolle von TSP1 bei der Invasion und Migration von Tumoren umstritten und die Datenlage teilweise widersprüchlich (Huang et al., 2017). Vorstellbar wäre, dass der CD133-KD zu vermehrten Entzündungen im Lungengewebe führt, die konsekutiv erst zur Rekrutierung von Neutrophilen und dann zum Abbau von TSP-1 führt, was letztlich eine vermehrte Metastasierung begünstigen könnte.

Nach aktuellem Forschungsstand scheint aber vor allem eine erhöhte CD133 Expression mit invasiverem Tumorwachstum und erhöhter Metastasierung assoziiert zu sein (Glumac und LeBeau, 2018). Die hier erhobenen Daten sprechen gegen diese Annahme.

Trotz der aufgeführten prometastatischen Eigenschaften von CD24 zeigte sich in dieser Arbeit im CD24-Einzel-KD keine Verringerung der Zelllast im Lungengewebe. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte in der im KD erhöhten Expression von CD44 liegen. Wie bereits unter Kapitel 1.4.1 beschrieben, zeigen CD44-positive CRC-Zellen u.a. eine aggressive Proliferation, eine erhöhte Fähigkeit zur Koloniebildung und sind resistenter gegenüber Apoptose (Wang et al., 2012, Cho et al., 2012). Verschiedene Studien deuten an, dass CD44 auf vielfältige Weise in die Tumorausbreitung eingreift, so z.B. durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (Bourguignon et al., 2014), die Interaktion mit Selektinen (Napier et al., 2007) oder phänotypische Veränderungen der Tumorzelloberfläche (Zhao et al., 2016) (siehe oben). Es wäre also denkbar, dass der eigentlich Metastasierungshemmende Effekt, ausgelöst durch den CD24-KD, durch die gleichzeitige Induktion von CD44 überlagert und nivelliert wird. Eine parallel am Institut durchgeführte Doktorarbeit zeigt zudem, dass ein CD44-Einzel-KD bei HT29-Zellen die Metastasierung absenkt.

Erstaunlicherweise scheint die CTC-Last in diesem Modell nichts über die Lungenmetastasenlast auszusagen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Doppel-KD von CD24 und CD133 die Zahl der CTCs im Vollblut zum Zeitpunkt der Autopsie (bei Erreichen eines der Abbruchkriterien) signifikant reduziert war ($p=0,0226$). Dies spiegelte sich allerdings nicht in der Metastasenlast im Lungengewebe wider.

Die reduzierte CTC-Last nach Doppel-KD von CD133 und CD24 ist vor allem vor dem Hintergrund zu deuten, dass nach Einzel-KD von CD133 ein signifikanter Anstieg der metastatischen Zelllast im Lungengewebe ($p=0,0351$) nachgewiesen werden konnte, welcher nach zusätzlichem KD von CD24 nicht mehr zu verzeichnen war. In Zusammenschau mit der nach CD133-KD vermehrten CD24-Expression erscheint CD24 also nochmal deutlicher als möglicher Mediator der nach CD133-KD vermehrten Metastasierung.

Kritisch muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass die bisher resümierte Literatur zu CD133 und dessen Einfluss auf die CTC-Zahl (Invasion/ Intravasation) im Widerspruch zu den in dieser Arbeit gesehenem Effekt nach CD133-Einzel-KD zu stehen scheint (gesteigerte Lungenmetastasierung). Um den Effekt richtig einzuordnen, muss hinterfragt werden, ob die CTC-Last direkt mit der Metastasenlast korreliert (dies war in den hier untersuchten Modellen nicht der Fall). Wie bereits beschrieben, scheint die weitere Metastasierung von CTCs ein hochgradig ineffizienter Prozess zu sein. Vor allem die

weitere Kolonisierung wird als limitierender Faktor angesehen, so dass Schätzungen zufolge nur aus ca. 1 von 1000 CTCs tatsächlich metastatische Kolonien entstehen (Chambers et al., 2002, Geiger und Peeper, 2009). Die meisten CTCs überleben im Blutkreislauf nur wenigen Stunden (Meng et al., 2004) und werden dann apoptotisch (Hou et al., 2012a), wahrscheinlich durch eine Kombination aus physikalischem und oxidativem Stress, Anoikis, sowie einem Mangel an Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Entscheidend für die weitere metastatische Kolonisierung scheint nach aktueller Datenlage daher weniger die Anzahl der CTCs im Blutkreislauf, sondern vielmehr die Überlebensfähigkeit und das metastatische Potenzial der einzelnen CTC zu sein. Diese Überlegung würde auch erklären, weshalb in dieser Arbeit eine reduzierte CTC-Last nicht zu einer reduzierten Lungenmetastasierung führte (CD133-/CD24-Doppel-KD) bzw. eine gesteigerte Lungenmetastasierung nicht von einer gesteigerten CTC-Last begleitet war (CD133-Einzel-KD). Gleichwohl korrelieren diverse Studien CTCs mit der Tumorprogression solider Tumoren und nutzen die CTC-Anzahl als prognostisches Werkzeug bei Patienten mit metastasiertem Brust- (Cristofanilli et al., 2004), Darm- (Cohen et al., 2008) und Prostatakrebs (Danila et al., 2007). Aber auch diese Studien klären nicht, ob CTCs mit einer Aggravation der Krankheit assoziiert sind oder direkt zur metastatischen Progression beitragen.

Denkbar wäre auch, dass CTCs, die erfolgreich Fernmetastasen bilden, CSC-ähnliche Eigenschaften besitzen, die ihnen einen Überlebensvorteil in der Zirkulation und bei der späteren Kolonisation gewähren. Für CTCs, die aus Patienten mit Melanomen isoliert wurden, konnte bereits gezeigt werden, dass sie in Xenotransplantationsmodellen eine metastatische Tumorprogression bewirken (Ma et al., 2010). Eine weitere Charakterisierung der CTCs, zum Beispiel hinsichtlich einer Stammzellmarker-Expression, könnte neue Erkenntnisse über die Rolle der CTCs bei der Tumormetastasierung liefern.

Ergänzend zu diesen Überlegungen lässt sich die verminderte Zahl der CTCs im Vollblut im Doppel-KD von CD24 und CD133 auch gut mit dem in der Einleitung dargestellten potenziellen Einfluss der beiden Marker auf die Metastasierung vereinbaren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TICs des CRC, die aus einem Xenograft-NOD/SCID-Mausmodell gewonnen wurden, CD133-positiv waren (O'Brien et al., 2007). Weitere Daten von Shmelkov et al. belegen, dass CD133 im Darmkrebsepithel exprimiert wird (Shmelkov et al., 2008), was auf eine Rolle von CD133 bei der Initiierung der Kolonkarzinom-Metastasierung hindeuten könnte. Wie unter Kapitel 1.4.2 beschrieben scheint CD133 eine Rolle bei der EMT von Tumorzellen zu spielen. Die EMT wird seit nun fast zwei Jahrzehnten als ein Hauptmechanismus angesehen, der die Invasion von Karzinomzellen aus der primären Tumormasse in das umgebende Stroma maßgeblich beeinflusst (Shibue und

Weinberg, 2017). Durch einen KD von CD133 könnte dieser Prozess deutlich reduziert sein, mit der Konsequenz, dass die Tumorzellen nicht in den Blutkreislauf übertreten können (Intravasation) und so nicht als CTCs von uns detektiert werden konnten.

Gestützt wird dieser Erklärungsversuch durch Daten von Li et al. zu einem CRISPR-Cas9-vermittelten CD133-KO in der humanen Kolon-Adenokarzinom Zelllinie LoVo. Im Transwell-Invasionsassay führte der CD133-KO zu einer signifikanten Reduktion der Zellmigration und -invasion (Li et al., 2019). Bei Transwell-Invasionsassays wird eine künstliche ECM mit Hilfe von Kunststoffeinsätzen mit einer zellpermeablen Membran auf Multi-Well-Platten erschaffen, die eine reproduzierbare Messung sowohl der Zellchemotaxis als auch der Zellinvasion durch die ECM erlaubt (Justus et al., 2014).

Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die mittels Western-Blot von Li et al. gesehene deutliche Reduktion der Vimentin-Expression in den CD133-KD Zellen darstellen (Li et al., 2019). Vimentin ist ein wichtiges Intermediärfilament in mesenchymalen Zellen und für eine Reihe von zellulären Funktionen entscheidend, darunter Zelladhäsion und Zellmigration (Ivaska et al., 2007). Schon länger ist bekannt, dass bewegliche und invasive Zellen eine hohe Vimentin-Expression aufweisen (Hendrix et al., 1997, Mendez et al., 2010) und dass ein KD von Vimentin die Migration in unterschiedlichsten Krebszelltypen reduziert (Vuoriluoto et al., 2011, Schoumacher et al., 2010). Die durch den KD von CD133 reduzierte Vimentin-Expression könnte also die Intravasationsfähigkeit der Tumorzellen deutlich reduzieren und den in dieser Arbeit gesehen Effekt mit erklären.

Daten von Liu et al. deuten zudem darauf hin, dass die Aktivierung von FAK (*Src-focal adhesion kinase*) durch die Interaktion zwischen CD133 und Src die Zellmigration fördert (Liu et al., 2016). Das physiologische Src-Proto-Onkogen ist eine Protein-Tyrosin-Kinase, die eine Schlüsselrolle in Signalwegen für unter anderem Zellwachstum, Migration und Überleben spielt (Roskoski, 2015). Src interagiert mit Integrinen, E-Cadherin und der oben genannten FAK und nimmt so Einfluss auf die Zellmigration und Zellmotilität (Roskoski, 2004). Ein KD von CD133 in SW620-Zellen beeinträchtigte die Zellmigration durch reduzierte Phosphorylierungen der FAK durch Src (Liu et al., 2016). FAK wiederum ist ebenfalls ein wichtiger Mediator der Tumorprogression und Metastasierung, da es die Tumorzellmigration und -invasion moduliert (McLean et al., 2005). Interessanterweise legt eine Studie von Avizienyte et al. nahe, dass die Src-induzierte FAK-Phosphorylierung möglicherweise notwendig ist zur Deregulierung der E-Cadherin-Expression und der Störung von interzellulären Kontakten (Avizienyte et al., 2002). Eine Deregulierung von E-Cadherin wiederum führt zur Karzinogenese und ist ein Hauptmerkmal der EMT (Wong et

al., 2018). Der KD von CD133 könnte demnach die allgemeine Zellmotilität durch eine verringerte Phosphorylierung von FAK verringern und konsekutiv den EMT-Prozess hemmen, indem eine Deregulierung von E-Cadherin erschwert wird. Beide Prozesse könnten eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit gesehenen Effekte im Doppel-KD sein und die verminderte humane Zelllast im Vollblut erklären.

In vitro führte der Doppel-KD zu einer signifikanten Induktion von CD44, den wir *in vivo* jedoch nicht bestätigen konnten. Die im Einzel-KD von CD133 gesteigerte Metastasierung könnte durch eine vermehrte CD24-Expression erklärbar sein, die nicht signifikant reduzierte Metastasenlast nach CD24-KD durch eine Induktion von CD44 (siehe oben). Nach einem KD beider Marker wäre eine verminderte Metastasenlast zu erwarten, diese zeigte sich nicht, womöglich weil diese, wie auch schon beim CD24-KD, durch eine erhöhte Expression von CD44 ausgeglichen wird. In zukünftigen Studien könnte diesem Aspekt noch einmal vermehrte Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Da wir sowohl im CD24-, als auch im CD133-Einzel-KD keine Reduzierung der CTCs messen konnten, scheint ein Doppel-KD beider Marker notwendig zu sein. Wie unter Kapitel 1.4.3 beschrieben, ist die Datenlage zum Einfluss von CD24 auf die Metastasierung jedoch widersprüchlich. So legen Daten von Cremes et al. nahe, dass CD24 zwar während der frühen Entwicklung von murinen Mamma- und Prostatakarzinomen ausgeprägt exprimiert wird, aber nicht essentiell für Tumorentstehung und -belastung ist (Cremers et al., 2016). Hasan Ahmed et al. liefern wiederum Daten von CRC-Zelllinien, die nach KD von CD24 eine erhöhte Expression von E-Cadherin sowie eine deutliche Reduktion der FAK-Aktivierung zeigen (Hasan Ahmed und Ilyas, 2014). So könnte ein CD24-KD die invasiven und migratorischen Fähigkeiten von CRC-Zellen stark beeinträchtigen, was den von uns beobachteten Effekt im Doppel-KD untermauern würde.

Zusammenfassend liefern verschiedene Modelle theoretische Erklärungsansätze für die in dieser Arbeit dargestellten Effekte. Gleichzeitig zeigt sich aber auch die Komplexität und Vielschichtigkeit dieses Themas und dass sich auf Basis unserer Ergebnisse neue Forschungsfragen ergeben, die dazu beitragen könnten, die zugrunde liegenden Prozesse präziser zu entschlüsseln.

Leider zeigten alle Tumore nach s.c. Injektion eine frühzeitige Ulzeration, die sich auch in einer geringen Primärtumorgröße bemerkbar machte. Dies führte wiederum dazu, dass die laut Alu-qPCR signifikant erhöhte Lungenmetastasenlast in Versuchstieren der Gruppe HT29-neg-shCD133 histologisch nicht verifiziert werden konnte. Ferner war eine

Expressionsanalyse der CSC-Marker auf den Lungenmetastasen nicht möglich und verbleibt daher als potenzielles Ziel zukünftiger Forschungsarbeiten.

Die zuvor bereits *in vitro* per Durchflusszytometrie nachgewiesene Steigerung der CD44-Expression im CD24-Einzel-KD bestätigte sich auf Proteinebene in CD24-Einzel-KD-Tumoren, jedoch nicht in CD133/ CD24-Doppel-KD-Tumoren. Die veränderte Expression von CD44 könnte, wie oben bereits beschrieben, ein durch den neuen Vektor ausgelöster Effekt oder aber sekundär auf die Depletion von CD24 zurückzuführen sein (wenn auch dieser Effekt im ursprünglichen Einzel-KD von CD24 nicht sichtbar war). Ob die Beeinflussung von CD44 durch den CD24-KD funktionell bedeutsam ist, müssen ebenfalls zukünftige Forschungsarbeiten genauer untersuchen. Da sich in der CD24-Einzel-KD-Gruppe keine Änderung in der resultierenden Anzahl der Lungenmetastasen ergab ist denkbar, dass die Induktion von CD44 einer verminderten Metastasierung entgegenwirken könnte.

4.4 Fazit und Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten legen nahe, dass sich die ausgewerteten CSC-Marker gegenseitig beeinflussen können. Der Ausprägungsgrad eines solchen Einflusses scheint dabei von Tumor zu Tumor unterschiedlich, wie auch die generelle Markerexpression für jedes Karzinom individuell verschieden ist. Vor allem für CD24 und CD133 konnte ein direkter Einfluss auf die hämatogene Metastasierung gezeigt werden, da ein KD beider Marker die Zahl der CTCs im Vollblut signifikant reduzierte. Gleichzeitig jedoch steigerte ein CD133-Einzel-KD die spontane Metastasierung von humanen CRC-Zellen in die Lunge. Sofern CD133 als tatsächlicher CSC-Marker im CRC betrachtet werden kann, erscheint die traditionelle Vorstellung, dass CSC diejenigen Primärtumorzellen sind, die Metastasen hervorbringen, vor dem Hintergrund dieser Arbeit als zu einfach. Umso wichtiger ist die Erkenntnis, dass der CD133-KD die Expression von CD24 fördert und dass eine gentechnische Inhibition dieses Effekts auch die Steigerung der Metastasierung im CD133-KD hemmt. Gleichwohl führt ein alleiniger CD24-KD nicht zu einer Verringerung der Metastasierung, ist aber auch spezifisch mit einer Steigerung der CD44-Expression begleitet. Bisher gibt es kaum direkte funktionelle Evidenz für die Bedeutung dieser Moleküle auf die spontane Tumormetastasierung *in vivo*, da in dem Forschungsfeld überwiegend Disseminierungsmodelle (direkte Injektion der zu untersuchenden Tumorzellen in den Blutstrom von Mäusen) zum Einsatz kommen. Eine Studie von Chen et al. mit CD133-überexprimierenden HNSCC-Zellen (*head and neck squamous cell carcinoma*) zeigte eine verstärkte Proliferation *in vivo*, ob die CD133-Expression aber

tatsächlich Einfluss auf die Initiierung von Metastasen hatte, wurde nicht untersucht (Chen et al., 2011b).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie eröffnen ein breites Spektrum weiterer offener Fragestellungen. Welche Funktion die hier untersuchten CSC-Marker während der Metastasierung des CRC genau übernehmen, ist auch nach Abschluss dieser Arbeit noch nicht verstanden und bedarf weiterer Forschungsarbeit. Schwerpunkt kommender Studien sollte daher die weitere Aufklärung der Funktion der CSC-Marker in der metastatischen Progression des CRC sein.

In weiterführenden Studien sollte zudem über die isolierte Betrachtung der Marker-Expressionsmuster hinausgegangen und die Marker mitsamt der anhängenden Signaltransduktionskaskade(n) untersucht werden. Um genauere Aussagen über eine gegenseitige Beeinflussung treffen zu können, wären weitere Studien der zu Grunde liegenden Signaltransduktionswege mittels Methoden der Protein-Biochemie, Molekularbiologie und RNA-Analyse denkbar, die ggf. später auch potenzielle Ziele einer therapeutischen Behandlung darstellen könnten (Sawyers, 2004).

Ein besseres Verständnis der Funktion der untersuchten Marker und Reliabilität des Triplets CD133, CD24 und CD44 als CSC-Marker im CRC wäre gleich in zweierlei Hinsicht von Vorteil: Sollte sich das hier untersuchte Marker-Triplett als zuverlässige CSC-Marker-Kombination herausstellen, sollten weitere Studien klären, ob der Expressionsstatus von CRC-Zellen für CD133, CD24 und CD44 nicht auch eine Aussage zum weiteren Krankheitsverlauf geben könnten. Dies ist vor allem klinisch von großem Interesse, da Therapieentscheidungen durch die Prognose des Patienten mitbestimmt werden und eine zuverlässige Prognose zu gezielteren Therapien führen würde.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Krebserkrankungen sind in unserer Gesellschaft weit verbreitet. Weltweit sind im Jahr 2020 19,3 Millionen neue Krebsfälle und fast 10,0 Millionen Krebstodesfälle aufgetreten (Sung et al., 2021). Darmkrebs (CRC) ist das dritthäufigste Malignom weltweit und ist besonders im metastasierten Stadium mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert (Arnold et al., 2017, Link et al., 2005). Obwohl vor allem die Metastasierung die primäre Todesursache für >90% der Krebspatienten darstellt (Steeg, 2006), bleiben viele Prozesse und Regulationsschritte unverstanden (Barnes et al., 2016). In jüngerer Vergangenheit lieferten u.a. die Tumorstammzellhypothese und die Entdeckung potenzieller Stammzellmarker wichtige neue Erkenntnisse zum besseren Verständnis der Tumormetastasierung.

Ziele: Diese Dissertation sollte zwei Fragestellungen beantworten: (1) Wie verändern sich die Expressionslevel der potenziellen Stammzellmarker CD133, CD24 und CD44 nach KD von CD44 und CD24 in verschiedenen Zelllinien humaner GI-Tumore und ergeben sich Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung? (2) Lässt sich, nach Identifikation einer Kandidaten-Zelllinie, im Xenograftmodell erstmals direkte funktionelle Evidenz für den Einfluss der Marker auf die spontane hämatogene Metastasierung in die Lunge gewinnen?

Methoden: Vier Zelllinien humaner gastrointestinaler Adenokarzinome mit bereits vorliegendem KD von CD24 bzw. CD44 (zwei PDAC Zelllinien und zwei CRC Zelllinien) wurden mit Hilfe einer Durchflusszytometrie auf die Markerexpression hin untersucht. Aufgrund des beobachteten Einflusses des CD24-KD und CD44-KD auf CD133 bei der Zelllinie HT29 wurden anschließend weitere Derivate dieser Linie mit einem KD von CD133 hergestellt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Aufgrund der offenbar gegenseitigen Beeinflussung von CD133 und CD24 bei der Linie HT29 wurde im nächsten Schritt ein Doppel-KD von CD133 und CD24 angestrebt, hiernach entstanden vier neue Zellinderivate: Kontrolle („luc-neg“), CD133-Einzel-KD („neg-shCD133“), CD24-Einzel-KD („luc-shCD24“) und CD133/CD24-Doppel-KD („shCD133/shCD24“). Diese wurden nach Messung der Markerexpression in immundefiziente Xenograftmodelle injiziert, um den Effekt der Depletion eines der Stammzellmarker auf das Tumorwachstum und die spontane Metastasierung *in vivo* zu analysieren. Aus den Versuchstieren wurden nach Erreichen eines der Endpunkte Vollblut, beide Lungenflügel und die Xenograft-Primärtumore entnommen. Um die humane (metastatische) Zelllast in Blut und Lungengewebe der Versuchstiere zu bestimmen, wurde im Anschluss eine Alu-PCR durchgeführt. Die Xenograft-Primärtumore sowie das Lungengewebe wurden anschließend

immunhistochemisch auf die Markerexpression hin untersucht. Um die Proteinmengen an CD24 und CD44 in den Xenograft-Primärtumoren genauer zu quantifizieren, wurden diese zusätzlich mittels Western Blot Analysen untersucht.

Ergebnisse: Unter den vier untersuchten Zelllinien reagierte nur HT29 mit sekundären Effekten auf den KD von CD24 und CD44, in beiden KDs zeigte sich eine signifikante Reduktion der CD133-Expression. Im daraufhin generierten KD von CD133 zeigte sich der gegenteilige Effekt, nämlich eine deutliche Heraufregulation von CD24. In den auf diesen Befunden aufbauenden generierten 4 „neuen“ Zelllinien zeigte sich sowohl im „neuen“ Einzel-KD von CD24 als auch im Doppel-KD von CD133/ CD24 eine erhöhte CD44 Expression. *In vivo* führte der Einzel-KD von CD133 zu einem signifikanten Anstieg der Metastasenlast im Lungengewebe. Bei Doppel-KD von CD133/CD24 war die Lungenmetastasenlast wieder unverändert, jedoch die CTC-Last im Blut reduziert. Im Einzel-KD von CD24 war die Lungenmetastasenlast nicht verändert. In der abschließenden Analyse der Proteinmengen von CD24 und CD44 in den s.c. gewachsenen Xenograft-Primärtumoren mittels Western Blot zeigte sich, dass die Menge an CD24 in den Xenografttumoren auch nach *in vivo*-Wachstum beim CD133 Einzel-KD signifikant erhöht war. Für CD44 zeigte sich eine signifikante Steigerung des CD44-Gehalts in den CD24-Einzel-KD-Tumoren, jedoch nicht in den CD133/ CD24-Doppel-KD-Tumoren.

Zusammenfassung: Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten legen nahe, dass sich die ausgewerteten CSC-Marker gegenseitig beeinflussen können. Der Ausprägungsgrad eines solchen Einflusses scheint dabei von Tumor zu Tumor unterschiedlich, wie auch die generelle Markerexpression für jedes Karzinom individuell verschieden ist. Vor allem für CD24 und CD133 konnte ein direkter Einfluss auf die hämatogene Metastasierung gezeigt werden, da ein KD beider Marker die Zahl der CTCs im Vollblut signifikant reduzierte. Gleichzeitig jedoch steigerte ein CD133-Einzel-KD die spontane Metastasierung von humanen CRC-Zellen in die Lunge. Sofern CD133 als tatsächlicher CSC-Marker im CRC betrachtet werden kann, erscheint die traditionelle Vorstellung, dass CSC diejenigen Primärtumorzellen sind, die Metastasen hervorbringen, vor dem Hintergrund dieser Arbeit als zu einfach. Umso wichtiger ist die Erkenntnis, dass der CD133-KD sich auch auf die Expression von CD24 auswirkt. Bisher gibt es kaum direkte funktionelle Evidenz für den Einfluss der beiden Marker auf die Tumormetastasierung *in vivo*. Dies sollte in weiterführenden Studien genauer untersucht werden. Zusätzlich sollte über die isolierte Betrachtung der Marker-Expressionsmuster hinausgegangen und die Marker inklusive ihrer Signaltransduktionskaskaden untersucht werden, um genauere Aussagen über eine potenzielle gegenseitige Beeinflussung treffen zu können.

6. Abstract

Background: Cancer is prevalent in our society. Worldwide, 19.3 million new cancer cases and nearly 10.0 million cancer deaths occurred in 2020 (Sung et al., 2021). Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy worldwide and is associated with a very poor prognosis, especially in the metastatic stage (Arnold et al., 2017, Link et al., 2005). Although metastasis in particular is the primary cause of death for >90% of cancer patients (Steeg, 2006), many processes and regulatory steps remain misunderstood (Barnes et al., 2016). More recently, the tumor stem cell hypothesis and the discovery of potential stem cell markers, among others, provided important new insights to better understand tumor metastasis.

Aim: This dissertation aimed to answer two questions: (1) How do the expression levels of the potential stem cell markers CD133, CD24, and CD44 change after KD of CD44 and CD24 in different cell lines of human GI tumors, and is there evidence of mutual interference? (2) After identification of a candidate cell line, can direct functional evidence for the influence of the markers on spontaneous hematogenous metastasis to the lung be obtained for the first time in the xenograft model?

Methods: Four cell lines of human gastrointestinal adenocarcinomas with pre-existing KD of CD24 or CD44 (two PDAC cell lines and two CRC cell lines) were analyzed for marker expression using flow cytometry. Based on the observed influence of the CD24-KD and CD44-KD on CD133 in the HT29 cell line, additional derivatives of this line with a KD of CD133 were subsequently prepared and examined by flow cytometry. Due to the apparent mutual influence of CD133 and CD24 in line HT29, a double KD of CD133 and CD24 was targeted in the next step, after which four new cell line derivatives were generated: control ("luc-neg"), CD133 single KD ("neg-shCD133"), CD24 single KD ("luc-shCD24"), and CD133/CD24 double KD ("shCD133/shCD24"). These were injected into immunodeficient xenograft models after measuring marker expression to analyze the effect of depletion of one of the stem cell markers on tumor growth and spontaneous metastasis in vivo. Whole blood, both lungs, and the xenograft primary tumors were collected from the experimental animals after one of the endpoints was reached. To determine the human (metastatic) cell load in blood and lung tissues of the experimental animals, Alu-PCR was subsequently performed. The xenograft primary tumors as well as the lung tissue were subsequently analyzed for marker expression by immunohistochemistry. To quantify the protein levels of CD24 and CD44 in the xenograft primary tumors more precisely, they were additionally examined by Western blot analysis.

Results: Among the four cell lines examined, only HT29 responded with secondary effects on the KD of CD24 and CD44, showing a significant reduction in CD133 expression in both KDs. The subsequently generated KD of CD133 showed the opposite effect, namely a significant upregulation of CD24. In the generated 4 "new" cell lines based on these findings, both the "new" single KD of CD24 and the double KD of CD133/ CD24 showed increased CD44 expression. In vivo, single-KD of CD133 resulted in a significant increase in metastatic burden in lung tissue. In double-KD of CD133/CD24, lung metastatic load was again unchanged, but blood CTC load was reduced. In single-KD of CD24, the lung metastatic load was not changed. In the final analysis of the protein levels of CD24 and CD44 in the s.c. grown xenograft primary tumors by Western blot, the amount of CD24 was found to be significantly increased in the xenograft tumors even after in vivo growth in the CD133 single-KD. For CD44, there was a significant increase in CD44 content in the CD24 single-KD tumors, but not in the CD133/ CD24 double-KD tumors.

Conclusion: The data obtained in this work suggest that the evaluated CSC markers may influence each other. The degree of such an influence seems to vary from tumor to tumor, just as the general marker expression is individually different for each carcinoma. Especially for CD24 and CD133 a direct influence on hematogenous metastasis could be shown, as a KD of both markers significantly reduced the number of CTCs in whole blood. At the same time, however, a CD133 single KD increased spontaneous metastasis of human CRC cells to the lung. Insofar as CD133 can be considered an actual CSC marker in CRC, the traditional notion that CSCs are those primary tumor cells that give rise to metastases seems too simplistic in light of this work. This makes the finding that CD133-KD also affects CD24 expression all the more important. To date, there is little direct functional evidence for the impact of either marker on tumor metastasis in vivo. This should be investigated in more detail in further studies. In addition, we should go beyond looking at the marker expression patterns in isolation and examine the markers including their signal transduction cascades in order to make more precise statements about a potential mutual influence.

7. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Technik	Avidin-Biotin-Komplex-Technik
ALDH1	Aldehyddehydrogenase 1
APC	Adenomatous polyposis coli
BCA	Bicinchoninic Acid
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CD24	Cluster of Differentiation 24
CD26	Cluster of Differentiation 26
CD29	Cluster of Differentiation 29
CD44	Cluster of Differentiation 44
CD44s	CD44-Standard-Isoform
CD44v	CD44-Varianten
CD133	Cluster of Differentiation 133
Cp	Crossing Point
CRC	Kolorektales Karzinom
CSCs	Krebsstammzellen
CTCs	Zirkulierende Tumorzellen
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
dsDNA	Doppelsträngige DANN
DTCs	Disseminierte Tumorzellen
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGR1	Early Growth Response Protein 1
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ESA	Erythropoiesis Stimulating Agents
et al	Und andere
ETS-1	ETS Proto-Oncogene 1
FACS	Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie
FAK	Src-Focal Adhesion Kinase
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
GBM	Glioblastoma multiforme
GI	Gastrointestinal

HA	Hyaluronsäure
HIF	Hypoxie-induzierender Faktor
HSA	Heat Stable Antigen
HSC70	Heat Shock Cognate 71 kDa Protein
HSP70	Heat Shock Protein 70 kDa
i.p.	Intraperitoneal
IGFBP-2	Insulin-like Growth factor Binding Protein-2
KD	Knockdown
MET	Mesenchymal-Epithelialen Transition
miRNA	microRNA
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
NF- κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
PD-L1	Programmed Cell Death 1 Ligand 1
PI3K	Phospho-inositol 3 Kinase
PIC	Proteinase-Inhibitor-Cocktail
PTGS	Posttranskriptionelle Gen-Stummschaltung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RISC	RNA-induced Silencing Complex
RNAi	RNA-Interferenz
s.c.	Subcutan
SC	Stammzell
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
shRNA	small hairpin Ribonucleic Acid
Siglec-10	Sialic Acid-Binding Ig-like Lectin 10
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription 3
SMAD4	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4
SP1	Specificity Protein 1
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEM	Transendotheliale Migration
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TICs	Tumorinitierende Zellen

TF	Transkriptionsfaktoren
TP53	Tumor Suppressor p53
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor
WB	Western Blot

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über die Metastasierungskaskade.....	10
Abbildung 2: Hierarchisches Modell der Tumorentstehung.....	15
Abbildung 3: Dynamisches CSC Modell.....	17
Abbildung 4: Durchflusszytometrische Messung der Proteinmengen von CD44, CD24 und CD133 auf der Zelloberfläche humaner gastrointestinaler Tumorzellen nach Kontrolltransfektion (neg/Luc, dunkelgrün) bzw. shRNA-vermitteltem KD von CD44 (shCD44, hellgrün) oder CD24 (shCD24, orange).....	44
Abbildung 5: Durchflusszytometrische Messung der Proteinmengen von CD44, CD24 und CD133 auf der Zelloberfläche von HT29-Zellen nach Kontrolltransfektion (luc, dunkelgrün) bzw. shRNA-vermitteltem KD von CD133 (shCD133, dunkelblau).....	45
Abbildung 6: Herstellung von CD133/CD24-Doppel-KD-Derivaten und korrespondierender Kontrollen aus der Zelllinie HT29 basierend auf HT29-luc bzw. -shCD133 Zellen.....	46
Abbildung 7: Durchflusszytometrische Messung der Proteinmengen von CD44, CD24 und CD133 auf der Zelloberfläche von HT29-Zellen nach Kontrolltransfektion (luc-neg, dunkelgrün) bzw. shRNA-vermitteltem KD von CD24 (luc-shCD24, orange) oder CD133 (neg-shCD133, dunkelblau) oder Doppel-KD von CD133 und CD24 (shCD133-shCD24, pink).....	47
Abbildung 8: Subkutanen Xenograftmodell von HT29-Zellen in immundefizienten Mäusen.....	48
Abbildung 9: Repräsentative Mikrofotographien immunhistochemischer Färbungen der s.c. Xenograft-Primärtumore der HT29-Zellinienderivate mit/ ohne CD24/ CD133-Einzel- bzw. -Doppel-KD.....	50
Abbildung 10: CD24-Proteinlevel in Xenografttumor-Gewebeextrakten (Western Blot, n=5).....	51
Abbildung 11: CD44-Proteinlevel in Xenografttumor-Gewebeextrakten (Western Blot, n=5).....	51

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	32
Tabelle 2: Mastermix-Reaktionsansatz für eine Probe.....	35
Tabelle 3: Alu-Primer der PCR.....	35
Tabelle 4: Schema PCR-Programm.....	36
Tabelle 5: Färbeprotokolle der untersuchten CD-Moleküle.....	38

Tabelle 6: Zusammensetzung RIPA-Puffer	39
Tabelle 7: Übersicht verwendeter Detektions-Antikörper	42

10. Literaturverzeichnis

- Abdul Khalek, F. J., Gallicano, G. I. & Mishra, L. 2010. Colon cancer stem cells. *Gastrointest Cancer Res*, S16-23.
- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., Brannigan, B. W., Kapur, R., Stott, S. L., Shioda, T., Ramaswamy, S., Ting, D. T., Lin, C. P., Toner, M., Haber, D. A. & Maheswaran, S. 2014. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, 158, 1110-1122.
- Aigner, S., Stoeber, Z. M., Fogel, M., Weber, E., Zarn, J., Ruppert, M., Zeller, Y., Vestweber, D., Stahel, R., Sammar, M. & Altevogt, P. 1997. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood*, 89, 3385-95.
- Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X. J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M. & Kishimoto, T. 1994. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*, 77, 63-71.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3983-8.
- Alison, M. R., Lim, S. M. & Nicholson, L. J. 2011. Cancer stem cells: problems for therapy? *J Pathol*, 223, 147-61.
- Alix-Panabieres, C. & Pantel, K. 2016. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov*, 6, 479-91.
- An, H., Kim, J. Y., Oh, E., Lee, N., Cho, Y. & Seo, J. H. 2015. Salinomycin Promotes Anoikis and Decreases the CD44+/CD24- Stem-Like Population via Inhibition of STAT3 Activation in MDA-MB-231 Cells. *PLoS One*, 10, e0141919.

- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66, 683-691.
- Avizienyte, E., Wyke, A. W., Jones, R. J., Mclean, G. W., Westhoff, M. A., Brunton, V. G. & Frame, M. C. 2002. Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol*, 4, 632-8.
- Banerjee, S., Modi, S., MCGinn, O., Zhao, X., Dudeja, V., Ramakrishnan, S. & Saluja, A. K. 2016. Impaired Synthesis of Stromal Components in Response to Minnelide Improves Vascular Function, Drug Delivery, and Survival in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*, 22, 415-25.
- Barkal, A. A., Brewer, R. E., Markovic, M., Kowarsky, M., Barkal, S. A., Zaro, B. W., Krishnan, V., Hatakeyama, J., Dorigo, O., Barkal, L. J. & Weissman, I. L. 2019. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature*, 572, 392-396.
- Barnes, B., Kraywinkel, K., Nowossadeck, E., Schönfeld, I., Starker, A., Wienecke, A. & Wolf, U. 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
- Bauer, N., Wilsch-Brauninger, M., Karbanova, J., Fonseca, A. V., Strauss, D., Freund, D., Thiele, C., Huttner, W. B., Bornhauser, M. & Corbeil, D. 2011. Haematopoietic stem cell differentiation promotes the release of prominin-1/CD133-containing membrane vesicles--a role of the endocytic-exocytic pathway. *EMBO Mol Med*, 3, 398-409.
- Ben-Neriah, Y. & Karin, M. 2011. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol*, 12, 715-23.
- Bilgin, B., Sendur, M. A., Bulent Akinci, M., Sener Dede, D. & Yalcin, B. 2017. Targeting the PD-1 pathway: a new hope for gastrointestinal cancers. *Curr Med Res Opin*, 33, 749-759.
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U., Moch, H., Höfler, G. & Kreipe, H. 2019. *Lehrbuch Pathologie*, Elsevier Health Sciences.

- Bockhorn, M., Frilling, A., Fruhauf, N. R., Neuhaus, J., Molmenti, E., Trarbach, T., Malago, M., Lang, H. & Broelsch, C. E. 2008. Survival of patients with synchronous and metachronous colorectal liver metastases--is there a difference? *J Gastrointest Surg*, 12, 1399-405.
- Bonelli, L., Martines, H., Conio, M., Bruzzi, P. & Aste, H. 1988. Family history of colorectal cancer as a risk factor for benign and malignant tumours of the large bowel. A case-control study. *Int J Cancer*, 41, 513-7.
- Bonnet, D. & Dick, J. E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3, 730-7.
- Borland, G., Ross, J. A. & Guy, K. 1998. Forms and functions of CD44. *Immunology*, 93, 139-48.
- Bottos, A. & Hynes, N. E. 2014. Cancer: Staying together on the road to metastasis. *Nature*, 514, 309-10.
- Bourguignon, L. Y., Shiina, M. & Li, J. J. 2014. Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression. *Adv Cancer Res*, 123, 255-75.
- Boutron, M. C., Faivre, J., Quipourt, V., Senesse, P. & Michiels, C. 1995. Family history of colorectal tumours and implications for the adenoma-carcinoma sequence: a case control study. *Gut*, 37, 830-4.
- Bova, R., Kamphues, C., Neuhaus, P. & Puhl, G. 2014. [Impact of time of occurrence of liver metastases (synchronous vs. metachronous) on early postoperative outcome and long-term survival of colorectal cancer patients]. *Zentralbl Chir*, 139, 220-5.
- Bretz, N., Noske, A., Keller, S., Erbe-Hofmann, N., Schlange, T., Salnikov, A. V., Moldenhauer, G., Kristiansen, G. & Altevogt, P. 2012a. CD24 promotes tumor cell invasion by suppressing tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in a c-Src-dependent fashion. *Clin Exp Metastasis*, 29, 27-38.

- Bretz, N. P., Salnikov, A. V., Perne, C., Keller, S., Wang, X., Mierke, C. T., Fogel, M., Erbe-Hofmann, N., Schlange, T., Moldenhauer, G. & Altevogt, P. 2012b. CD24 controls Src/STAT3 activity in human tumors. *Cell Mol Life Sci*, 69, 3863-79.
- Buehring, G. C., Eby, E. A. & Eby, M. J. 2004. Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it? *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 40, 211-5.
- Cai, Z., Cao, Y., Luo, Y., Hu, H. & Ling, H. 2018. Signalling mechanism(s) of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in tumour therapeutic resistance. *Clin Chim Acta*, 483, 156-163.
- Capp, J. P. 2019. Cancer Stem Cells: From Historical Roots to a New Perspective. *J Oncol*, 2019, 5189232.
- Carmeliet, P. & Jain, R. K. 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 417-27.
- Cespedes, M. V., Espina, C., Garcia-Cabezas, M. A., Trias, M., Boluda, A., Gomez Del Pulgar, M. T., Sancho, F. J., Nistal, M., Lacal, J. C. & Mangués, R. 2007. Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *Am J Pathol*, 170, 1077-85.
- Chaffer, C. L. & Goetz, J. G. 2018. CD44 Orchestrates Metastatic Teamwork. *Dev Cell*, 47, 691-693.
- Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331, 1559-64.
- Chambers, A. F., Groom, A. C. & Macdonald, I. C. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2, 563-72.
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A. & Freeman, J. W. 2018. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol*, 11, 64.
- Chen, K. L., Pan, F., Jiang, H., Chen, J. F., Pei, L., Xie, F. W. & Liang, H. J. 2011a. Highly enriched CD133(+)/CD44(+) stem-like cells with CD133(+)/CD44(high) metastatic subset in HCT116 colon cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 28, 751-63.

- Chen, T., Zhang, Y., Guo, W. H., Meng, M. B., Mo, X. M. & Lu, Y. 2010. Effects of heterochromatin in colorectal cancer stem cells on radiosensitivity. *Chin J Cancer*, 29, 270-6.
- Chen, Y. S., Wu, M. J., Huang, C. Y., Lin, S. C., Chuang, T. H., Yu, C. C. & Lo, J. F. 2011b. CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. *PLoS One*, 6, e28053.
- Cho, K. R. & Vogelstein, B. 1992a. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer*, 70, 1727-31.
- Cho, K. R. & Vogelstein, B. 1992b. Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cell Biochem Suppl*, 16G, 137-41.
- Cho, S. H., Park, Y. S., Kim, H. J., Kim, C. H., Lim, S. W., Huh, J. W., Lee, J. H. & Kim, H. R. 2012. CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion. *Int J Oncol*, 41, 211-8.
- Choi, J. E., Bae, J. S., Kang, M. J., Chung, M. J., Jang, K. Y., Park, H. S. & Moon, W. S. 2017. Expression of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell markers in colorectal adenocarcinoma: Clinicopathological significance. *Oncol Rep*, 38, 1695-1705.
- Chung, S. S., Aroh, C. & Vadgama, J. V. 2013. Constitutive activation of STAT3 signaling regulates hTERT and promotes stem cell-like traits in human breast cancer cells. *PLoS One*, 8, e83971.
- Chung, S. S. & Vadgama, J. V. 2015. Curcumin and epigallocatechin gallate inhibit the cancer stem cell phenotype via down-regulation of STAT3-NFkappaB signaling. *Anticancer Res*, 35, 39-46.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L. & Wahl, G. M. 2006. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66, 9339-44.
- Cohen, S. J., Punt, C. J., Iannotti, N., Saidman, B. H., Sabbath, K. D., Gabrail, N. Y., Picus, J., Morse, M., Mitchell, E., Miller, M. C., Doyle, G. V., Tissing, H.,

- Terstappen, L. W. & Meropol, N. J. 2008. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26, 3213-21.
- Corbeil, D., Roper, K., Fargeas, C. A., Joester, A. & Huttner, W. B. 2001. Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic*, 2, 82-91.
- Corbeil, D., Roper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S. M., Simmons, P. J., Peault, B., Buck, D. W. & Huttner, W. B. 2000. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*, 275, 5512-20.
- Cremers, N., Neeb, A., Uhle, T., Dimmler, A., Rothley, M., Allgayer, H., Fodde, R., Sleeman, J. P. & Thiele, W. 2016. CD24 Is Not Required for Tumor Initiation and Growth in Murine Breast and Prostate Cancer Models. *PLOS ONE*, 11, e0151468.
- Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., Reuben, J. M., Doyle, G. V., Allard, W. J., Terstappen, L. W. & Hayes, D. F. 2004. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351, 781-91.
- Dalerba, P., Cho, R. W. & Clarke, M. F. 2007a. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*, 58, 267-84.
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C. & Clarke, M. F. 2007b. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 10158-63.
- Danila, D. C., Heller, G., Gignac, G. A., Gonzalez-Espinoza, R., Anand, A., Tanaka, E., Lilja, H., Schwartz, L., Larson, S., Fleisher, M. & Scher, H. I. 2007. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 13, 7053-8.
- De Lerma Barbaro, A., Perletti, G., Bonapace, I. M. & Monti, E. 2014. Inflammatory cues acting on the adult intestinal stem cells and the early onset of cancer (review). *Int J Oncol*, 45, 959-68.

- Ding, Q., Yoshimitsu, M., Kuwahata, T., Maeda, K., Hayashi, T., Obara, T., Miyazaki, Y., Matsubara, S., Natsugoe, S. & Takao, S. 2012. Establishment of a highly migratory subclone reveals that CD133 contributes to migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Hum Cell*, 25, 1-8.
- Domev, H., Amit, M., Laevsky, I., Dar, A. & Itskovitz-Eldor, J. 2012. Efficient engineering of vascularized ectopic bone from human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 18, 2290-302.
- Drost, J., Van Jaarsveld, R. H., Ponsioen, B., Zimmerlin, C., Van Boxtel, R., Buijs, A., Sachs, N., Overmeer, R. M., Offerhaus, G. J., Begthel, H., Korving, J., Van De Wetering, M., Schwank, G., Logtenberg, M., Cuppen, E., Snippert, H. J., Medema, J. P., Kops, G. J. & Clevers, H. 2015. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*, 521, 43-7.
- Du, L., Wang, H., He, L., Zhang, J., Ni, B., Wang, X., Jin, H., Cahuzac, N., Mehrpour, M., Lu, Y. & Chen, Q. 2008. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res*, 14, 6751-60.
- El Rayes, T., Catena, R., Lee, S., Stawowczyk, M., Joshi, N., Fischbach, C., Powell, C. A., Dannenberg, A. J., Altorki, N. K., Gao, D. & Mittal, V. 2015. Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated degradation of Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 16000-5.
- Ernst, A. K., Putscher, A., Samatov, T. R., Suling, A., Galatenko, V. V., Shkurnikov, M. Y., Knyazev, E. N., Tonevitsky, A. G., Haalck, T., Lange, T., Maar, H., Schroder-Schwarz, J., Riecken, K., Schumacher, U. & Wicklein, D. 2018. Knockdown of L1CAM significantly reduces metastasis in a xenograft model of human melanoma: L1CAM is a potential target for anti-melanoma therapy. *PLoS One*, 13, e0192525.
- Ezzeldin, M., Borrego-Diaz, E., Taha, M., Esfandyari, T., Wise, A. L., Peng, W., Rouyanian, A., Asvadi Kermani, A., Soleimani, M., Patrad, E., Lialyte, K., Wang, K., Williamson, S., Abdulkarim, B., Olyaei, M. & Farassati, F. 2014. RalA signaling pathway as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma (HCC). *Mol Oncol*, 8, 1043-53.

- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A. & Fares, Y. 2020. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther*, 5, 28.
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-67.
- Feig, L. A. 2003. Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol*, 13, 419-25.
- Feng, J. M., Miao, Z. H., Jiang, Y., Chen, Y., Li, J. X., Tong, L. J., Zhang, J., Huang, Y. R. & Ding, J. 2012. Characterization of the conversion between CD133+ and CD133- cells in colon cancer SW620 cell line. *Cancer Biol Ther*, 13, 1396-406.
- Ferrara, N. 2004. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*, 9 Suppl 1, 2-10.
- Fialkow, P. J. 1976. Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta*, 458, 283-321.
- Fidler, I. J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3, 453-8.
- Fodde, R., Smits, R. & Clevers, H. 2001. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 1, 55-67.
- Fogh, J. 2013. *Human tumor cells in vitro*, Springer Science & Business Media.
- Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285, 1182-6.
- Folkman, J. 1983. Angiogenesis: initiation and modulation. *Symp Fundam Cancer Res*, 36, 201-8.
- Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1, 27-31.

- Folkman, J., Cole, P. & Zimmerman, S. 1966. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg*, 164, 491-502.
- Folkman, J. & Klagsbrun, M. 1987. Angiogenic factors. *Science*, 235, 442-7.
- Forbes, L. R., Milner, J. & Haddad, E. 2016. Signal transducer and activator of transcription 3: a year in review. *Curr Opin Hematol*, 23, 23-7.
- Foulds, L. 1958. The natural history of cancer. *J Chronic Dis*, 8, 2-37.
- Frank, S. A. & Nowak, M. A. 2004. Problems of somatic mutation and cancer. *Bioessays*, 26, 291-9.
- Friederichs, J., Zeller, Y., Hafezi-Moghadam, A., Grone, H. J., Ley, K. & Altevogt, P. 2000. The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, 60, 6714-22.
- Frisch, S. M., Schaller, M. & Cieply, B. 2013. Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis. *J Cell Sci*, 126, 21-9.
- Galizia, G., Gemei, M., Del Vecchio, L., Zamboli, A., Di Noto, R., Mirabelli, P., Salvatore, F., Castellano, P., Orditura, M., De Vita, F., Pinto, M., Pignatelli, C. & Lieto, E. 2012. Combined CD133/CD44 expression as a prognostic indicator of disease-free survival in patients with colorectal cancer. *Arch Surg*, 147, 18-24.
- Gay, L. J. & Felding-Habermann, B. 2011. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*, 11, 123-34.
- Gazzaniga, P., Gradilone, A., Petracca, A., Nicolazzo, C., Raimondi, C., Iacovelli, R., Naso, G. & Cortesi, E. 2010. Molecular markers in circulating tumour cells from metastatic colorectal cancer patients. *J Cell Mol Med*, 14, 2073-7.
- Geiger, T. R. & Peeper, D. S. 2009. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1796, 293-308.
- George, K. S. & Wu, S. 2012. Lipid raft: A floating island of death or survival. *Toxicol Appl Pharmacol*, 259, 311-9.

- Gilles, C., Newgreen, D. F., Sato, H. & Thompson, E. W. 2013. Matrix metalloproteases and epithelial-to-mesenchymal transition: implications for carcinoma metastasis. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience.
- Ginn, K. F., Fangman, B., Terai, K., Wise, A., Ziazadeh, D., Shah, K., Gartrell, R., Ricke, B., Kimura, K., Mathur, S., Borrego-Diaz, E. & Farassati, F. 2016. RalA is overactivated in medulloblastoma. *J Neurooncol*, 130, 99-110.
- Glumac, P. M. & Lebeau, A. M. 2018. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Transl Med*, 7, 18.
- Gomez, D., Zaitoun, A. M., De Rosa, A., Hossaini, S., Beckingham, I. J., Brooks, A. & Cameron, I. C. 2014. Critical review of the prognostic significance of pathological variables in patients undergoing resection for colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)*, 16, 836-44.
- Gomez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B. & Brunton, V. G. 2017. Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech*, 10, 1061-1074.
- Gomis, R. R. & Gawrzak, S. 2017. Tumor cell dormancy. *Mol Oncol*, 11, 62-78.
- Goodison, S., Urquidi, V. & Tarin, D. 1999. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol*, 52, 189-96.
- Gordon, S. R., Maute, R. L., Dulken, B. W., Hutter, G., George, B. M., Mccracken, M. N., Gupta, R., Tsai, J. M., Sinha, R., Corey, D., Ring, A. M., Connolly, A. J. & Weissman, I. L. 2017. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*, 545, 495-499.
- Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W. & Gimble, J. M. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*, 189, 54-63.
- Gunthert, U., Stauder, R., Mayer, B., Terpe, H. J., Finke, L. & Friedrichs, K. 1995. Are CD44 variant isoforms involved in human tumour progression? *Cancer Surv*, 24, 19-42.

- Guo, W. & Giancotti, F. G. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 816-26.
- Gupta, G. P. & Massagué, J. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127, 679-95.
- Hamidi, H. & Ivaska, J. 2018. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 18, 533-548.
- Hanahan, D. & Weinberg, Robert a. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 646-674.
- Hartung, T. 2007. Food for thought... on cell culture. *ALTEX*, 24, 143-52.
- Hasan Ahmed, M. A. & Ilyas, M. 2014. CD24 expression is associated with epithelial mesenchymal transition (EMT) phenotype and alterations in actin cytoskeleton in colorectal cancer. *Pathology*, 46, S105.
- Headley, M. B., Bins, A., Nip, A., Roberts, E. W., Looney, M. R., Gerard, A. & Krummel, M. F. 2016. Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature*, 531, 513-7.
- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Seftor, R. E. & Trevor, K. T. 1997. Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am J Pathol*, 150, 483-95.
- Heppner, G. H. 1984. Tumor heterogeneity. *Cancer Res*, 44, 2259-65.
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., Bruns, C. J. & Heeschen, C. 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1, 313-23.
- Hofheinz, R., Arnold, D., Borner, M., Folprecht, G., Graeven, U. & Hebart, H. 2018. Kolonkarzinom. *Onkopedia Leitlinien*, 9.

- Hooper, N. M. 1999. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol Membr Biol*, 16, 145-56.
- Hou, J. M., Krebs, M. G., Lancashire, L., Sloane, R., Backen, A., Swain, R. K., Priest, L. J., Greystoke, A., Zhou, C., Morris, K., Ward, T., Blackhall, F. H. & Dive, C. 2012a. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 30, 525-32.
- Hou, Y., Zou, Q., Ge, R., Shen, F. & Wang, Y. 2012b. The critical role of CD133(+)/CD44(+)/high tumor cells in hematogenous metastasis of liver cancers. *Cell Res*, 22, 259-72.
- Hsu, C. S., Tung, C. Y., Yang, C. Y. & Lin, C. H. 2013. Response to stress in early tumor colonization modulates switching of CD133-positive and CD133-negative subpopulations in a human metastatic colon cancer cell line, SW620. *PLoS One*, 8, e61133.
- Huang, T., Sun, L., Yuan, X. & Qiu, H. 2017. Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. *Oncotarget*, 8, 84546-84558.
- Huang, X., Sheng, Y. & Guan, M. 2012. Co-expression of stem cell genes CD133 and CD44 in colorectal cancers with early liver metastasis. *Surg Oncol*, 21, 103-7.
- Huser, L., Sachindra, S., Granados, K., Federico, A., Larribere, L., Novak, D., Umansky, V., Altevogt, P. & Utikal, J. 2018. SOX2-mediated upregulation of CD24 promotes adaptive resistance toward targeted therapy in melanoma. *Int J Cancer*, 143, 3131-3142.
- Ivaska, J., Pallari, H. M., Nevo, J. & Eriksson, J. E. 2007. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res*, 313, 2050-62.
- Jacob, J., Bellach, J., Grutzmann, R., Alldinger, I., Pilarsky, C., Dietel, M. & Kristiansen, G. 2004. Expression of CD24 in adenocarcinomas of the pancreas correlates with higher tumor grades. *Pancreatology*, 4, 454-60.
- Jaspersen, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. 2010. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138, 2044-58.

- Jeanne, A., Schneider, C., Martiny, L. & Dedieu, S. 2015. Original insights on thrombospondin-1-related antireceptor strategies in cancer. *Front Pharmacol*, 6, 252.
- Joyce, J. A. & Pollard, J. W. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9, 239-52.
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M. & Yang, L. V. 2014. In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp*.
- Kadmon, G., Eckert, M., Sammar, M., Schachner, M. & Altevogt, P. 1992. Nectadrin, the heat-stable antigen, is a cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, 118, 1245-58.
- Kalinina, T., Güngör, C., Thieltges, S., Möller-Krull, M., Penas, E. M., Wicklein, D., Streichert, T., Schumacher, U., Kalinin, V., Simon, R., Otto, B., Dierlamm, J., Schwarzenbach, H., Effenberger, K. E., Bockhorn, M., Izbicki, J. R. & Yekebas, E. F. 2010. Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. *BMC Cancer*, 10, 295.
- Kalluri, R. & Weinberg, R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119, 1420-8.
- Kang, Y. & Massagué, J. 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118, 277-9.
- Kapeleris, J., Zou, H., Qi, Y., Gu, Y., Li, J., Schoning, J., Monteiro, M. J. & Gu, W. 2020. Cancer stemness contributes to cluster formation of colon cancer cells and high metastatic potentials. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 47, 838-847.
- Karim, B. O., Rhee, K. J., Liu, G., Yun, K. & Brant, S. R. 2014. Prom1 function in development, intestinal inflammation, and intestinal tumorigenesis. *Front Oncol*, 4, 323.
- Kazama, S., Kishikawa, J., Kiyomatsu, T., Kawai, K., Nozawa, H., Ishihara, S. & Watanabe, T. 2018. Expression of the stem cell marker CD133 is related to tumor development in colorectal carcinogenesis. *Asian J Surg*, 41, 274-278.

- Ke, J., Wu, X., Wu, X., He, X., Lian, L., Zou, Y., He, X., Wang, H., Luo, Y., Wang, L. & Lan, P. 2012. A subpopulation of CD24(+) cells in colon cancer cell lines possess stem cell characteristics. *Neoplasma*, 59, 282-8.
- Kemper, K., Versloot, M., Cameron, K., Colak, S., De Sousa E Melo, F., De Jong, J. H., Bleackley, J., Vermeulen, L., Versteeg, R., Koster, J. & Medema, J. P. 2012. Mutations in the Ras-Raf Axis underlie the prognostic value of CD133 in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 18, 3132-41.
- Kesselburg, C.-O. 2013. *Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*, Springer-Verlag.
- Kim, Y. N., Koo, K. H., Sung, J. Y., Yun, U. J. & Kim, H. 2012. Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *Int J Cell Biol*, 2012, 306879.
- Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159-70.
- Klonisch, T., Wiechec, E., Hombach-Klonisch, S., Ande, S. R., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K. & Los, M. 2008. Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends Mol Med*, 14, 450-60.
- Konishi, H., Asano, N., Imatani, A., Kimura, O., Kondo, Y., Jin, X., Kanno, T., Hatta, W., Ara, N., Asanuma, K., Koike, T. & Shimosegawa, T. 2016. Notch1 directly induced CD133 expression in human diffuse type gastric cancers. *Oncotarget*, 7, 56598-56607.
- Koren, A., Rijavec, M., Kern, I., Sodja, E., Korosec, P. & Cufar, T. 2016. BMI1, ALDH1A1, and CD133 Transcripts Connect Epithelial-Mesenchymal Transition to Cancer Stem Cells in Lung Carcinoma. *Stem Cells Int*, 2016, 9714315.
- Kristiansen, G., Sammar, M. & Altevogt, P. 2004. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol*, 35, 255-62.
- Kuhlmann, I. 1995. The prophylactic use of antibiotics in cell culture. *Cytotechnology*, 19, 95-105.

- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. 2017. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168, 670-691.
- Lange, T., Samatov, T. R., Tonevitsky, A. G. & Schumacher, U. 2014. Importance of altered glycoprotein-bound N- and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells. *Carbohydr Res*, 389, 39-45.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A. & Dick, J. E. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367, 645-8.
- Laurent-Puig, P., Blons, H. & Cugnenc, P. H. 1999. Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev*, 8 Suppl 1, S39-47.
- Lee, S. Y., Kim, K. A., Kim, C. H., Kim, Y. J., Lee, J. H. & Kim, H. R. 2017. CD44-shRNA recombinant adenovirus inhibits cell proliferation, invasion, and migration, and promotes apoptosis in HCT116 colon cancer cells. *Int J Oncol*, 50, 329-336.
- Leibovitz, A., Stinson, J. C., Mccombs, W. B., 3rd, Mccoy, C. E., Mazur, K. C. & Mabry, N. D. 1976. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res*, 36, 4562-9.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., Awmf). 2019. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL [Online]. Available: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 17.06.2021] [Accessed].
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F. & Simeone, D. M. 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67, 1030-7.
- Li, R., Hehlman, R., Sachs, R. & Duesberg, P. 2005. Chromosomal alterations cause the high rates and wide ranges of drug resistance in cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet*, 163, 44-56.

- Li, W., Cho, M. Y., Lee, S., Jang, M., Park, J. & Park, R. 2019. CRISPR-Cas9 mediated CD133 knockout inhibits colon cancer invasion through reduced epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 14, e0220860.
- Lim, K. H., Baines, A. T., Fiordalisi, J. J., Shipitsin, M., Feig, L. A., Cox, A. D., Der, C. J. & Counter, C. M. 2005. Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. *Cancer Cell*, 7, 533-45.
- Lin, L., Liu, A., Peng, Z., Lin, H. J., Li, P. K., Li, C. & Lin, J. 2011. STAT3 is necessary for proliferation and survival in colon cancer-initiating cells. *Cancer Res*, 71, 7226-37.
- Link, K. H., Sagban, T. A., Morschel, M., Tischbirek, K., Holtappels, M., Apell, V., Zayed, K., Kornmann, M. & Staib, L. 2005. Colon cancer: survival after curative surgery. *Langenbecks Arch Surg*, 390, 83-93.
- Liu, C., Kelnar, K., Liu, B., Chen, X., Calhoun-Davis, T., Li, H., Patrawala, L., Yan, H., Jeter, C., Honorio, S., Wiggins, J. F., Bader, A. G., Fagin, R., Brown, D. & Tang, D. G. 2011. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med*, 17, 211-5.
- Liu, C., Li, Y., Xing, Y., Cao, B., Yang, F., Yang, T., Ai, Z., Wei, Y. & Jiang, J. 2016. The Interaction between Cancer Stem Cell Marker CD133 and Src Protein Promotes Focal Adhesion Kinase (FAK) Phosphorylation and Cell Migration. *J Biol Chem*, 291, 15540-50.
- Liu, Y., Wu, T., Lu, D., Zhen, J. & Zhang, L. 2018. CD44 overexpression related to lymph node metastasis and poor prognosis of pancreatic cancer. *Int J Biol Markers*, 33, 308-313.
- Lugli, A., Iezzi, G., Hostettler, I., Muraro, M. G., Mele, V., Tornillo, L., Carafa, V., Spagnoli, G., Terracciano, L. & Zlobec, I. 2010. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 103, 382-90.
- Luzzi, K. J., Macdonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F. & Groom, A. C. 1998. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*, 153, 865-73.

- Ma, J., Lin, J. Y., Alloo, A., Wilson, B. J., Schatton, T., Zhan, Q., Murphy, G. F., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., Stephen Hodi, F., Frank, N. Y. & Frank, M. H. 2010. Isolation of tumorigenic circulating melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 402, 711-7.
- Majeti, R., Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Pang, W. W., Jaiswal, S., Gibbs, K. D., Jr., Van Rooijen, N. & Weissman, I. L. 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, 138, 286-99.
- Malanchi, I., Santamaria-Martinez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H. A., Delaloye, J. F. & Huelsken, J. 2011. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*, 481, 85-9.
- Male, H., Patel, V., Jacob, M. A., Borrego-Diaz, E., Wang, K., Young, D. A., Wise, A. L., Huang, C., Van Veldhuizen, P., O'brien-Ladner, A., Williamson, S. K., Taylor, S. A., Tawfik, O., Esfandyari, T. & Farassati, F. 2012. Inhibition of RalA signaling pathway in treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 77, 252-9.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J. & Weinberg, R. A. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133, 704-15.
- Martin, T. D. & Der, C. J. 2012. Differential involvement of RalA and RalB in colorectal cancer. *Small GTPases*, 3, 126-30.
- Martin, T. D., Samuel, J. C., Routh, E. D., Der, C. J. & Yeh, J. J. 2011. Activation and involvement of Ral GTPases in colorectal cancer. *Cancer Res*, 71, 206-15.
- Marzesco, A. M., Janich, P., Wilsch-Brauninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D. & Huttner, W. B. 2005. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci*, 118, 2849-58.
- Massague, J. & Obenauf, A. C. 2016. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529, 298-306.

- McClean, G. W., Carragher, N. O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V. G. & Frame, M. C. 2005. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer*, 5, 505-15.
- Mendez, M. G., Kojima, S. & Goldman, R. D. 2010. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*, 24, 1838-51.
- Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E. P., Shete, S., Naftalis, E. Z., Huth, J. F., Beitsch, P. D., Leitch, M., Hoover, S., Euhus, D., Haley, B., Morrison, L., Fleming, T. P., Herlyn, D., Terstappen, L. W., Fehm, T., Tucker, T. F., Lane, N., Wang, J. & Uhr, J. W. 2004. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*, 10, 8152-62.
- Meredith, J. E., Jr., Fazeli, B. & Schwartz, M. A. 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*, 4, 953-61.
- Moghadam, A. R., Patrad, E., Tafsiri, E., Peng, W., Fangman, B., Pluard, T. J., Accurso, A., Salacz, M., Shah, K., Ricke, B., Bi, D., Kimura, K., Graves, L., Najad, M. K., Dolatkhan, R., Sanaat, Z., Yazdi, M., Tavakolinia, N., Mazani, M., Amani, M., Ghavami, S., Gartell, R., Reilly, C., Naima, Z., Esfandyari, T. & Farassati, F. 2017. Ral signaling pathway in health and cancer. *Cancer Med*, 6, 2998-3013.
- Mohamed, S. Y., Kaf, R. M., Ahmed, M. M., Elwan, A., Ashour, H. R. & Ibrahim, A. 2019. The Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers (Notch1, ALDH1, and CD44) in Primary Colorectal Carcinoma. *J Gastrointest Cancer*, 50, 824-837.
- Moran, D. M., Shen, H. & Maki, C. G. 2009. Puromycin-based vectors promote a ROS-dependent recruitment of PML to nuclear inclusions enriched with HSP70 and Proteasomes. *BMC Cell Biology*, 10, 32.
- Morel, A. P., Lievre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S. & Puisieux, A. 2008. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 3, e2888.
- Moreno-Bueno, G., Peinado, H., Molina, P., Olmeda, D., Cubillo, E., Santos, V., Palacios, J., Portillo, F. & Cano, A. 2009. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc*, 4, 1591-613.

- Nagata, T., Sakakura, C., Komiyama, S., Miyashita, A., Nishio, M., Murayama, Y., Komatsu, S., Shiozaki, A., Kuriu, Y., Ikoma, H., Nakanishi, M., Ichikawa, D., Fujiwara, H., Okamoto, K., Ochiai, T., Kokuba, Y., Sonoyama, T. & Otsuji, E. 2011. Expression of cancer stem cell markers CD133 and CD44 in locoregional recurrence of rectal cancer. *Anticancer Res*, 31, 495-500.
- Nam, K., Oh, S., Lee, K. M., Yoo, S. A. & Shin, I. 2015. CD44 regulates cell proliferation, migration, and invasion via modulation of c-Src transcription in human breast cancer cells. *Cell Signal*, 27, 1882-94.
- Naor, D., Wallach-Dayana, S. B., Zahalka, M. A. & Sionov, R. V. 2008. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol*, 18, 260-7.
- Napier, S. L., Healy, Z. R., Schnaar, R. L. & Konstantopoulos, K. 2007. Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells: the roles of CD44v and alternative sialofucosylated selectin ligands. *J Biol Chem*, 282, 3433-41.
- Naumov, G. N., Bender, E., Zurakowski, D., Kang, S. Y., Sampson, D., Flynn, E., Watnick, R. S., Straume, O., Akslen, L. A., Folkman, J. & Almog, N. 2006. A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst*, 98, 316-25.
- Nehmann, N., Wicklein, D., Schumacher, U. & Müller, R. 2010. Comparison of two techniques for the screening of human tumor cells in mouse blood: quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) versus laser scanning cytometry (LSC). *Acta Histochem*, 112, 489-96.
- Nestl, A., Von Stein, O. D., Zatloukal, K., Thies, W. G., Herrlich, P., Hofmann, M. & Sleeman, J. P. 2001. Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res*, 61, 1569-77.
- Nierodzik, M. L. & Karpatkin, S. 2006. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*, 10, 355-62.

- Nieto, M. A., Huang, Ruby y.-J., Jackson, Rebecca a. & Thiery, Jean p. 2016. Emt: 2016. *Cell*, 166, 21-45.
- O'brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445, 106-10.
- Ohnishi, S., Maehara, O., Nakagawa, K., Kameya, A., Otaki, K., Fujita, H., Higashi, R., Takagi, K., Asaka, M., Sakamoto, N., Kobayashi, M. & Takeda, H. 2013. hypoxia-inducible factors activate CD133 promoter through ETS family transcription factors. *PLoS One*, 8, e66255.
- Ouyang, G., Wang, Z., Fang, X., Liu, J. & Yang, C. J. 2010. Molecular signaling of the epithelial to mesenchymal transition in generating and maintaining cancer stem cells. *Cell Mol Life Sci*, 67, 2605-18.
- Overdevest, J. B., Thomas, S., Kristiansen, G., Hansel, D. E., Smith, S. C. & Theodorescu, D. 2011. CD24 offers a therapeutic target for control of bladder cancer metastasis based on a requirement for lung colonization. *Cancer Res*, 71, 3802-11.
- Palumbo, J. S., Talmage, K. E., Massari, J. V., La Jeunesse, C. M., Flick, M. J., Kombrinck, K. W., Jirouskova, M. & Degen, J. L. 2005. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood*, 105, 178-85.
- Pantel, K. & Brakenhoff, R. H. 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, 4, 448-56.
- Pantel, K., Brakenhoff, R. H. & Brandt, B. 2008. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 8, 329-40.
- Park, E. K., Lee, J. C., Park, J. W., Bang, S. Y., Yi, S. A., Kim, B. K., Park, J. H., Kwon, S. H., You, J. S., Nam, S. W., Cho, E. J. & Han, J. W. 2015. Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53. *Cell Death Dis*, 6, e1964.

- Pei, Z., Zhu, G., Huo, X., Gao, L., Liao, S., He, J., Long, Y., Yi, H., Xiao, S., Yi, W., Chen, P., Li, X., Li, G. & Zhou, Y. 2016. CD24 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of cervical cancer cells in vitro. *Oncol Rep*, 35, 1593-601.
- Ponten, J. 2001. Cell biology of precancer. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 8, S97-113.
- Radisky, E. S. & Radisky, D. C. 2010. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15, 201-12.
- Rahman, M., Deleyrolle, L., Vedam-Mai, V., Azari, H., Abd-El-Barr, M. & Reynolds, B. A. 2011. The cancer stem cell hypothesis: failures and pitfalls. *Neurosurgery*, 68, 531-45; discussion 545.
- Rebe, C., Vegran, F., Berger, H. & Ghiringhelli, F. 2013. STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape. *JAKSTAT*, 2, e23010.
- Rex, D. K., Ahnen, D. J., Baron, J. A., Batts, K. P., Burke, C. A., Burt, R. W., Goldblum, J. R., Guillem, J. G., Kahi, C. J., Kalady, M. F., O'Brien, M. J., Odze, R. D., Ogino, S., Parry, S., Snover, D. C., Torlakovic, E. E., Wise, P. E., Young, J. & Church, J. 2012. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol*, 107, 1315-29; quiz 1314, 1330.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-11.
- Reymond, N., D'agua, B. B. & Ridley, A. J. 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer*, 13, 858-70.
- Ricardo, S., Vieira, A. F., Gerhard, R., Leitao, D., Pinto, R., Cameselle-Teijeiro, J. F., Milanezi, F., Schmitt, F. & Paredes, J. 2011. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol*, 64, 937-46.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C. & De Maria, R. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445, 111-5.

- Ricci-Vitiani, L., Pagliuca, A., Palio, E., Zeuner, A. & De Maria, R. 2008. Colon cancer stem cells. *Gut*, 57, 538-48.
- Rosien, U. & Layer, P. 2017. *Facharztwissen Gastroenterologie*, Elsevier Health Sciences.
- Roskoski, R., Jr. 2004. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 324, 1155-64.
- Roskoski, R., Jr. 2015. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*, 94, 9-25.
- Rostoker, R., Abelson, S., Genkin, I., Ben-Shmuel, S., Sachidanandam, R., Scheinman, E. J., Bitton-Worms, K., Orr, Z. S., Caspi, A., Tzukerman, M. & Leroith, D. 2015. CD24(+) cells fuel rapid tumor growth and display high metastatic capacity. *Breast Cancer Res*, 17, 78.
- Sagiv, E., Memeo, L., Karin, A., Kazanov, D., Jacob-Hirsch, J., Mansukhani, M., Rechavi, G., Hibshoosh, H. & Arber, N. 2006. CD24 is a new oncogene, early at the multistep process of colorectal cancer carcinogenesis. *Gastroenterology*, 131, 630-9.
- Sahlberg, S. H., Spiegelberg, D., Glimelius, B., Stenerlöv, B. & Nestor, M. 2014. Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells. *PLoS One*, 9, e94621.
- Salnikov, A. V., Gladkich, J., Moldenhauer, G., Volm, M., Mattern, J. & Herr, I. 2010. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*, 126, 950-8.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-101.
- Sawyers, C. 2004. Targeted cancer therapy. *Nature*, 432, 294-7.
- Scheel, C. & Weinberg, R. A. 2012. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol*, 22, 396-403.

- Schindelmann, S., Windisch, J., Grundmann, R., Kreienberg, R., Zeillinger, R. & Deissler, H. 2002. Expression profiling of mammary carcinoma cell lines: correlation of in vitro invasiveness with expression of CD24. *Tumour Biol*, 23, 139-45.
- Schmitz, S. 2011. *Der Experimentator: Zellkultur*, Springer.
- Schoumacher, M., Goldman, R. D., Louvard, D. & Vignjevic, D. M. 2010. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol*, 189, 541-56.
- Schweitzer, K. M., Drager, A. M., Van Der Valk, P., Thijsen, S. F., Zevenbergen, A., Theijssmeijer, A. P., Van Der Schoot, C. E. & Langenhuijsen, M. M. 1996. Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am J Pathol*, 148, 165-75.
- Senbanjo, L. T., Aljohani, H., Majumdar, S. & Chellaiah, M. A. 2019. Characterization of CD44 intracellular domain interaction with RUNX2 in PC3 human prostate cancer cells. *Cell Commun Signal*, 17, 80.
- Sgambato, A., Puglisi, M. A., Errico, F., Rafanelli, F., Boninsegna, A., Rettino, A., Genovese, G., Coco, C., Gasbarrini, A. & Cittadini, A. 2010. Post-translational modulation of CD133 expression during sodium butyrate-induced differentiation of HT29 human colon cancer cells: implications for its detection. *J Cell Physiol*, 224, 234-41.
- Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R. K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C. H., Goulet, R., Jr., Badve, S. & Nakshatri, H. 2006. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, 8, R59.
- Shibue, T. & Weinberg, R. A. 2017. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*, 14, 611-629.
- Shmelkov, S. V., Butler, J. M., Hooper, A. T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., St Clair, R., Baljevic, M., White, I., Jin, D. K., Chadburn, A., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Gale, N. W., Thurston, G., Yancopoulos, G. D., D'angelica, M., Kemeny, N., Lyden, D. & Rafii, S. 2008. CD133 expression is not restricted to stem cells, and

- both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*, 118, 2111-20.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. 2021. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*, 71, 7-33.
- Singh, A. & Settleman, J. 2010. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29, 4741-51.
- Slessor, A. A., Simillis, C., Goldin, R., Brown, G., Mudan, S. & Tekkis, P. P. 2013. A meta-analysis comparing simultaneous versus delayed resections in patients with synchronous colorectal liver metastases. *Surg Oncol*, 22, 36-47.
- Smith, S. C., Oxford, G., Wu, Z., Nitz, M. D., Conaway, M., Frierson, H. F., Hampton, G. & Theodorescu, D. 2006. The metastasis-associated gene CD24 is regulated by Ral GTPase and is a mediator of cell proliferation and survival in human cancer. *Cancer Res*, 66, 1917-22.
- Snover, D. C., Jass, J. R., Fenoglio-Preiser, C. & Batts, K. P. 2005. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol*, 124, 380-91.
- Song, Y., Chen, Y., Li, Y., Lyu, X., Cui, J., Cheng, Y., Zheng, T., Zhao, L. & Zhao, G. 2019. Resveratrol Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in GBM by Regulating Smad-Dependent Signaling. *Biomed Res Int*, 2019, 1321973.
- Spillane, J. B. & Henderson, M. A. 2007. Cancer stem cells: a review. *ANZ J Surg*, 77, 464-8.
- Spring, F. A., Dalchau, R., Daniels, G. L., Mallinson, G., Judson, P. A., Parsons, S. F., Fabre, J. W. & Anstee, D. J. 1988. The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In(Lu) gene. *Immunology*, 64, 37-43.
- Steeg, P. S. 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*, 12, 895-904.

- Stegner, D., Dutting, S. & Nieswandt, B. 2014. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. *Thromb Res*, 133 Suppl 2, S149-57.
- Steinbichler, T. B., Dudas, J., Skvortsov, S., Ganswindt, U., Riechelmann, H. & Skvortsova, I. 2018. Therapy resistance mediated by cancer stem cells. *Semin Cancer Biol*, 53, 156-167.
- Stepanenko, A. A. & Heng, H. H. 2017. Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 773, 91-103.
- Sugarbaker, P. H. 1993. Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastases from colorectal cancer. *J Surg Oncol Suppl*, 3, 158-60.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*.
- Tabu, K., Kimura, T., Sasai, K., Wang, L., Bizen, N., Nishihara, H., Taga, T. & Tanaka, S. 2010. Analysis of an alternative human CD133 promoter reveals the implication of Ras/ERK pathway in tumor stem-like hallmarks. *Mol Cancer*, 9, 39.
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S. S., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Gordon, S. A., Shimada, Y. & Wang, T. C. 2009. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*, 27, 1006-20.
- Talmadge, J. E. & Fidler, I. J. 2010. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*, 70, 5649-69.
- Tan, M. H., Nowak, N. J., Loo, R., Ochi, H., Sandberg, A. A., Lopez, C., Pickren, J. W., Berjian, R., Douglass, H. O., Jr. & Chu, T. M. 1986. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest*, 4, 15-23.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. & Nieto, M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.
- Tirino, V., Desiderio, V., D'aquino, R., De Francesco, F., Pirozzi, G., Graziano, A., Galderisi, U., Cavaliere, C., De Rosa, A., Papaccio, G. & Giordano, A. 2008.

- Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS One*, 3, e3469.
- Todaro, M., Francipane, M. G., Medema, J. P. & Stassi, G. 2010. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology*, 138, 2151-62.
- Tremmel, M., Matzke, A., Albrecht, I., Laib, A. M., Olaku, V., Ballmer-Hofer, K., Christofori, G., Heroult, M., Augustin, H. G., Ponta, H. & Orian-Rousseau, V. 2009. A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. *Blood*, 114, 5236-44.
- Valastyan, S. & Weinberg, R. A. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275-92.
- Van Gestel, Y. R., De Hingh, I. H., Van Herk-Sukel, M. P., Van Erning, F. N., Beerepoot, L. V., Wijsman, J. H., Slooter, G. D., Rutten, H. J., Creemers, G. J. & Lemmens, V. E. 2014. Patterns of metachronous metastases after curative treatment of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol*, 38, 448-54.
- Vermeulen, L., De Sousa E Melo, F., Richel, D. J. & Medema, J. P. 2012. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol*, 13, e83-9.
- Vesuna, F., Lisok, A., Kimble, B. & Raman, V. 2009. Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia*, 11, 1318-28.
- Visvader, J. E. & Lindeman, G. J. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, 8, 755-68.
- Visvader, J. E. & Lindeman, G. J. 2012. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, 10, 717-728.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R. & Feinberg, A. P. 1985. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science*, 227, 642-5.

- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. & Bos, J. L. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319, 525-32.
- Vuoriluoto, K., Haugen, H., Kiviluoto, S., Mpindi, J. P., Nevo, J., Gjerdrum, C., Tiron, C., Lorens, J. B. & Ivaska, J. 2011. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*, 30, 1436-48.
- Wagener, C. & Müller, O. 2010. *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte; 95 Tabellen*, Georg Thieme Verlag.
- Wang, C. Y., Huang, C. S., Yang, Y. P., Liu, C. Y., Liu, Y. Y., Wu, W. W., Lu, K. H., Chen, K. H., Chang, Y. L., Lee, S. D. & Lin, H. C. 2019a. The subpopulation of CD44-positive cells promoted tumorigenicity and metastatic ability in lung adenocarcinoma. *J Chin Med Assoc*, 82, 196-201.
- Wang, H., Cui, G., Yu, B., Sun, M. & Yang, H. 2020. Cancer Stem Cell Niche in Colorectal Cancer and Targeted Therapies. *Curr Pharm Des*, 26, 1979-1993.
- Wang, J. C. & Dick, J. E. 2005. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol*, 15, 494-501.
- Wang, J. Y., Chang, C. C., Chiang, C. C., Chen, W. M. & Hung, S. C. 2012. Silibinin suppresses the maintenance of colorectal cancer stem-like cells by inhibiting PP2A/AKT/mTOR pathways. *J Cell Biochem*, 113, 1733-43.
- Wang, L., Lin, S., Rammohan, K. W., Liu, Z., Liu, J. Q., Liu, R. H., Guinther, N., Lima, J., Zhou, Q., Wang, T., Zheng, X., Birmingham, D. J., Rovin, B. H., Hebert, L. A., Wu, Y., Lynn, D. J., Cooke, G., Yu, C. Y., Zheng, P. & Liu, Y. 2007. A dinucleotide deletion in CD24 confers protection against autoimmune diseases. *PLoS Genet*, 3, e49.
- Wang, S. J., Wong, G., De Heer, A. M., Xia, W. & Bourguignon, L. Y. 2009. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Laryngoscope*, 119, 1518-30.

- Wang, W., Wang, X., Peng, L., Deng, Q., Liang, Y., Qing, H. & Jiang, B. 2010. CD24-dependent MAPK pathway activation is required for colorectal cancer cell proliferation. *Cancer Sci*, 101, 112-9.
- Wang, Z., Tang, Y., Xie, L., Huang, A., Xue, C., Gu, Z., Wang, K. & Zong, S. 2019b. The Prognostic and Clinical Value of CD44 in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Front Oncol*, 9, 309.
- Weichert, W., Denkert, C., Burkhardt, M., Gansukh, T., Bellach, J., Altevogt, P., Dietel, M. & Kristiansen, G. 2005. Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Clin Cancer Res*, 11, 6574-81.
- Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A. & Huttner, W. B. 1997. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12425-30.
- Weinberg, R. A. 1996. How cancer arises. *Sci Am*, 275, 62-70.
- Wielenga, V. J., Heider, K. H., Offerhaus, G. J., Adolf, G. R., Van Den Berg, F. M., Ponta, H., Herrlich, P. & Pals, S. T. 1993. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res*, 53, 4754-6.
- Won, C., Kim, B. H., Yi, E. H., Choi, K. J., Kim, E. K., Jeong, J. M., Lee, J. H., Jang, J. J., Yoon, J. H., Jeong, W. I., Park, I. C., Kim, T. W., Bae, S. S., Factor, V. M., Ma, S., Thorgeirsson, S. S., Lee, Y. H. & Ye, S. K. 2015. Signal transducer and activator of transcription 3-mediated CD133 up-regulation contributes to promotion of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 62, 1160-73.
- Wong, A. L. A., Hirpara, J. L., Pervaiz, S., Eu, J. Q., Sethi, G. & Goh, B. C. 2017. Do STAT3 inhibitors have potential in the future for cancer therapy? *Expert Opin Investig Drugs*, 26, 883-887.
- Wong, S. H. M., Fang, C. M., Chuah, L. H., Leong, C. O. & Ngai, S. C. 2018. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol*, 121, 11-22.

- Wu, N., Xiao, L., Zhao, X., Zhao, J., Wang, J., Wang, F., Cao, S. & Lin, X. 2012. miR-125b regulates the proliferation of glioblastoma stem cells by targeting E2F2. *FEBS Lett*, 586, 3831-9.
- Xiong, A., Yang, Z., Shen, Y., Zhou, J. & Shen, Q. 2014. Transcription Factor STAT3 as a Novel Molecular Target for Cancer Prevention. *Cancers (Basel)*, 6, 926-57.
- Xu, H., Wu, K., Tian, Y., Liu, Q., Han, N., Yuan, X., Zhang, L., Wu, G. S. & Wu, K. 2016. CD44 correlates with clinicopathological characteristics and is upregulated by EGFR in breast cancer. *Int J Oncol*, 49, 1343-50.
- Yan, Y., Li, Z., Kong, X., Jia, Z., Zuo, X., Gagea, M., Huang, S., Wei, D. & Xie, K. 2016. KLF4-Mediated Suppression of CD44 Signaling Negatively Impacts Pancreatic Cancer Stemness and Metastasis. *Cancer Res*, 76, 2419-31.
- Yanagisawa, S., Kadouchi, I., Yokomori, K., Hirose, M., Hakozaki, M., Hojo, H., Maeda, K., Kobayashi, E. & Murakami, T. 2009. Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney. *Clin Cancer Res*, 15, 3014-22.
- Yeung, T. M., Gandhi, S. C., Wilding, J. L., Muschel, R. & Bodmer, W. F. 2010. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3722-7.
- Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R. & Jove, R. 2014. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*, 14, 736-46.
- Zeilstra, J., Joosten, S. P., Dokter, M., Verwiel, E., Spaargaren, M. & Pals, S. T. 2008. Deletion of the WNT target and cancer stem cell marker CD44 in Apc(Min/+) mice attenuates intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*, 68, 3655-61.
- Zhang, J. C., Wang, Z. R., Cheng, Y. J., Yang, D. Z., Shi, J. S., Liang, A. L., Liu, N. N. & Wang, X. M. 2003. Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant exon 6 in primary tumors and corresponding lymph node metastases of colorectal carcinoma with Dukes' stage C or D. *World J Gastroenterol*, 9, 1482-6.
- Zhao, S., Chen, C., Chang, K., Karnad, A., Jagirdar, J., Kumar, A. P. & Freeman, J. W. 2016. CD44 Expression Level and Isoform Contributes to Pancreatic Cancer Cell

Plasticity, Invasiveness, and Response to Therapy. *Clin Cancer Res*, 22, 5592-5604.

Zhou, J. Y., Chen, M., Ma, L., Wang, X., Chen, Y. G. & Liu, S. L. 2016. Role of CD44(high)/CD133(high) HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer. *Oncotarget*, 7, 7657-66.

11. Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Tobias Lange, für die ständige Hilfe, den regen Austausch und die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas danken. Auch für die stets konstruktive Kritik und das mühevoll Korrigieren meiner Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an das gesamte Team des Anatomischen Instituts für die freundliche Aufnahme und die kollegiale Zusammenarbeit. Einen großen Dank insbesondere an Hanna Maar und Christine Knies, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und deren Anmerkungen wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Schumacher, PD Dr. Wicklein und PD Dr. Riecken gilt mein Dank für kritische Anmerkungen zum Projekt und labortechnische Hilfestellungen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Tante für die bedingungslose Unterstützung, die mich durch das Medizinstudium begleitet und die Erstellung dieser Dissertation erst möglich gemacht haben. Meinem Bruder und meiner Freundin danke ich für den stetigen Glauben an das Gelingen dieser Arbeit und die mentale Unterstützung über meinen gesamten medizinischen Werdegang hinweg.

12. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

13. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: