

Das Tetraspanin CO-029/D6.1A in
Membrankomplexen und Exosomen:
Einfluss auf Tumorprogression und Angiogenese

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Sabine Gesierich

aus Bietigheim-Bissingen

Dekan: Prof. Dr. Holger Puchta
Referent: Prof. Dr. Margot Zöller
Koreferent: PD Dr. Jonathan Sleeman
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2006

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	X
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 KREBS.....	1
1.1.1 Definition und Häufigkeit von Krebs	1
1.1.2 Entstehung von Krebs.....	1
1.1.3 Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinom.....	2
1.2 TUMORPROGRESSION UND METASTASIERUNG	3
1.2.1 Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren	4
1.2.2 Insensitivität gegenüber Wachstumsinhibitoren.....	4
1.2.3 Resistenz gegenüber dem Zelltod.....	5
1.2.4 Uneingeschränkte Proliferation	6
1.2.5 Gefäßneubildung	7
1.2.6 Gewebsinvasion und Metastasierung	8
1.3 TETRASPANINE	10
1.3.1 Strukturelle Charakteristika und Expression von Tetraspaninen.....	10
1.3.2 Das „Tetraspanin-Netzwerk“	12
1.3.3 Funktion und Relevanz der Tetraspanine bei Tumorprogression und Metastasierung ...	14
1.3.4 Das Tetraspanin D6.1A	15
1.4 INTEGRINE	16
1.4.1 Strukturelle Charakteristika und Expression von Integrinen.....	16
1.4.2 Funktion und Relevanz der Integrine bei Tumorprogression und Metastasierung.....	17
1.4.3 Das Integrin $\alpha 6\beta 4$	18
1.5 DAS BSP73 TUMORSYSTEM	19
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1 MATERIAL.....	21
2.1.1 Geräte	21

2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	23
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.1.4	Enzyme.....	26
2.1.5	Radioisotop.....	27
2.1.6	Versuchssysteme.....	27
2.1.7	Größenmarker.....	27
2.1.8	Antikörper.....	27
2.1.8.1	Primärantikörper.....	27
2.1.8.2	Sekundärantikörper und Reagenzien.....	29
2.1.9	Expressionsvektoren und cDNAs.....	30
2.1.10	Bakterienstämme.....	30
2.1.11	Zelllinien.....	31
2.1.11.1	Homo sapiens Pankreasadenokarzinomzelllinien.....	31
2.1.11.2	Homo sapiens Kolorektalkarzinomzelllinien.....	31
2.1.11.3	Rattus norvegicus metastasierende Pankreasadenokarzinomzelllinien.....	32
2.1.11.4	Rattus norvegicus etablierte Zelllinien.....	32
2.1.12	Rattenstamm.....	32
2.1.13	Standard Puffer und Lösungen.....	32
2.2	METHODEN.....	33
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1.1	Plasmid-DNA-Präparationsmethoden.....	33
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.2.1.3	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	34
2.2.1.4	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	35
2.2.1.5	Enzymreaktionen.....	35
2.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	36
2.2.2.1	Bakterienkulturmedien.....	36
2.2.2.2	Anzucht von Bakterienstämmen.....	36
2.2.2.3	Lagerung von Bakterienstämmen.....	36
2.2.2.4	Bestimmung der Zelldichte.....	37
2.2.2.5	Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	37
2.2.2.6	Transformation elektrokompenter Bakterien.....	37
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	38
2.2.3.1	Generelle Proteinbiochemische Methoden.....	38
2.2.3.2	Herstellung von Zellysaten.....	39
2.2.3.3	Präparation von Exosomen.....	39
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	39
2.2.3.5	Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen - Silberfärbung.....	40
2.2.3.6	Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen.....	40
2.2.3.7	Zymogramm zur Bestimmung der MMP-Menge in konditioniertem Zellkulturüberstand..	41

2.2.3.8	Produktion und Aufreinigung des GST-CD151/EC2-Fusionsproteins	42
2.2.4	Immunologische Methoden	42
2.2.4.1	Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridom-Überstand	42
2.2.4.2	Immunisierungsprotokoll und Aufreinigung eines Kaninchen anti-Ratte-CD151 poly- klonalen Antikörpers	43
2.2.4.3	Markierung von Antikörpern	44
2.2.4.4	Immunpräzipitation	44
2.2.4.5	FACS-Analyse	45
2.2.4.6	Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	45
2.2.4.7	Immunfluoreszenzfärbung	46
2.2.4.8	Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten	47
2.2.5	Zellbiologische Methoden	48
2.2.5.1	Generelle Arbeitsroutinen	48
2.2.5.2	Transfektion und Selektion eukaryotischer Zellen	49
2.2.5.3	Reklonierung transfizierter Zellen	49
2.2.5.4	Matrigelassay	50
2.2.5.5	Adhäsionsassay	50
2.2.5.6	Proliferationsassay	50
2.2.5.7	Migrationsassays	51
2.2.6	Tierexperimentelle Arbeiten	52
2.2.6.1	In vivo Intravitalmikroskopie	52
2.2.6.2	In vitro Angiogeneseassay	52
3	ERGEBNISSE	53
3.1	EINFLUSS DER KOLOKALISATION VON INTEGRINEN UND TETRASPANINEN AUF DIE MOTILITÄT HUMANER PANKREASADENO- UND KOLOREKTALKARZINOMZELLINIEN	53
3.1.1	Expression von Integrinen und Tetraspaninen	53
3.1.2	Kolokalisation von Integrinen und Tetraspaninen	55
3.1.3	Koimmunpräzipitation von Tetraspaninen mit Integrinen	57
3.1.4	Einfluss der Aktivierung der Proteinkinase C auf die Migration und Adhäsion der Tumorzellen an Laminin 5	59
3.1.5	Kolokalisation und Koimmunpräzipitation von Integrinen und Tetraspaninen nach Akti- vierung der Proteinkinase C	62
3.2	EINFLUSS DES TETRASPANINS D6.1A UND DES INTEGRINS $\alpha 6 \beta 4$ AUF DIE NEOANGIO- GENESE VON PANKREASADENOKARZINOMEN	66
3.2.1	Rolle des Tetraspanins D6.1A bei der zellulären Morphogenese	66
3.2.2	Das Tetraspanin D6.1A induziert Tumorangiogenese	69
3.2.3	Etablierung eines in vitro Modells zur Untersuchung der Angiogeneseinduktion durch das Tetraspanin D6.1A	72

3.2.4	Einfluss von D6.1A auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen und Angiogenesefaktoren.....	74
3.2.5	Exosome von AS-D6.1A Tumorzellen enthalten D6.1A und induzieren Neoangiogenese	76
3.2.6	Hochregulation der Expression von D6.1A auf Endothelzellen neu gebildeter Blutkapillaren	79
3.2.7	Einfluss von D6.1A auf die Tumorumgebung.....	81
4	DISKUSSION	87
4.1	EINFLUSS DER KOLOKALISATION VON INTEGRINEN UND TETRASPANINEN AUF DIE MOTILITÄT HUMANER PANKREASADENO- UND KOLOREKTALKARZINOMZELLINIEN.....	87
4.1.1	Integrin und Tetraspanin Expressionsprofil	88
4.1.2	Kolokalisation von Integrinen und Tetraspaninen.....	89
4.1.3	Auswirkung der Tetraspanin-Integrin-Komplexe auf die Zellmotilität.....	91
4.2	EINFLUSS DES TETRASPANINS D6.1A UND DES INTEGRINS $\alpha 6\beta 4$ AUF DIE NEOANGIOGENESE VON PANKREASADENOKARZINOMEN.....	93
4.2.1	Rolle des Tetraspanins D6.1A bei der zellulären Morphogenese.....	93
4.2.2	Das Tetraspanin D6.1A induziert die Tumorangiogenese.....	94
4.2.3	Exosome von AS-D6.1A Tumorzellen enthalten D6.1A und induzieren die Neoangiogenese	95
4.2.4	Einfluss von D6.1A auf die Tumorumgebung.....	96
4.2.5	D6.1A-induzierte Angiogenese und mögliche involvierte biochemische Signaltransduktionswege.....	97
4.2.6	Interaktion von D6.1A mit Endothelzellen.....	98
4.2.7	Perspektiven	99
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	101
6	LITERATUR	102
	DANKSAGUNG.....	118
	PUBLIKATIONSLISTE	119
	LEBENS LAUF	120

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	„a disintegrin and metalloprotease“
AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazol
APS	Ammoniumpersulfat
AS	BSp73AS, Pankreasadenokarzinom der Ratte
bFGF	„basic fibroblast growth factor“
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
°C	Grad Celcius
ca.	zirka
CAM	„cell adhesion molecule“
CD	„cluster of differentiation“
CD44v	CD44-Variante
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfat
Ci	Curie
cm	Zentimeter
Cy2	Cyanine 2-OSu
d.h.	das heißt
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“
dsDNA	doppel-strängige DNA
E	Extinktion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC1	kleine extrazelluläre Schleife
EC2	große extrazelluläre Schleife
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	„enhanced green fluorescence protein“
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
EMT	epitheliale-mesenchymale Transformation
EpCAM	„epithelial cell adhesion molecule“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	extrazellulären Matrix
F	Mikrofarad
f	Verdünnungsfaktor
FACS	„fluorescence activated cell sorter“
FCS	Foetales Kälberserum
FITC	Fluoroisothiocyanat
FPLC	„fast protein liquid chromatographie“

FPRP	„prostaglandin F _{2α} receptor regulatory protein”
G	Glycin
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GST	Gluthation-S-Transferase
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
³ H	radioaktives Wasserstoffisotop
HEPES	„N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N’2-ethanesulfonic acid”
HGF	„hepatocyte growth factor”
hIg	Hamster Ig
HRP	„horseradish peroxidase”
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IGF	„insulin-like growth factor”
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	kilo
kb	Kilobase
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
m	Milli, Meter
M	Molar
MALDI	„matrix assisted laser desorption/ionisation”
MAPK	„mitogen-activated protein kinase”
MHC	„major histocompatibility complex”
mIg	Maus Ig
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	„messenger RNA”
MW	Mittelwert, „molecular weight”
n	Versuchsanzahl, Nano
na	nicht anwendbar
N-CAM	„neural cell adhesion molecule“
NP-40	Nonidet P-40
nt	nicht getestet
n.v.	nicht veröffentlicht
OD	optische Dichte
p	Protein
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PDGF	„platelet derived growth factor”
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI4K	Phosphatidylinositol-4-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Proteinlipase C

PMA	Phorbolmyristataacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastom-Protein
proHB-EGF	„pro heparin-binding epidermal growth factor“
proTGF α	„pro transforming growth factor α “
RAEC	Rattenaortaendothelzelllinie
rIg	Ratte Ig
RNA	„ribonucleic acid“
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SF	„scatter factor“
SH2	„Src homology 2“
ssDNA	einzel-strängige DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEMS	„Tetraspanin enriched microdomains“
TfR	Transferrinrezeptor
TGF β	„transforming growth factor β “
TIMP	„tissue inhibitor of metalloprotease“
TM4SF3	Vier-Transmembrandomänen-Superfamilie
TNF	„tumor necrosis factor“
TOF	„time of flight“
tPA	tissue-type plasminogen activator
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Unit (enzymatische Einheit)
u.a.	unter anderem
UP	Uroplakin
uPA	„urokinase-type plasminogen activator“
uPAR	„urokinase-type plasminogen activator receptor“
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
VEGFR	„vascular endothelial growth factor receptor“
VT	Volumenteil
w/v	Gewichtsprozent
WB	Western Blot
Wnt	„wingless-type“
z.B.	zum Beispiel
Ω	Ohm
μ	Mikro

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Strukturelle Charakteristika von Tetraspaninen.....	11
Abbildung 1.2:	Darstellung der einzelnen Domänen eines Tetraspanins und ihre Funktion.	12
Abbildung 3.1:	Kolokalisation von Integrinen und Tetraspaninen auf der humanen Pankreasadenokarzinomzelllinie 818.....	56
Abbildung 3.2:	Koimmunpräzipitation von CD9, CD151 und CO-029 mit $\alpha 3$ und $\beta 4$ in humanen Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien.....	58
Abbildung 3.3:	Migrationsverhalten humaner Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien auf Laminin 5	60
Abbildung 3.4:	Adhäsionsverhalten humaner Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien auf Laminin 5	61
Abbildung 3.5:	Kolokalisation und zelluläre Verteilung von $\alpha 3$ /CD9, $\beta 4$ /CD151 und $\beta 4$ /CO-029 nach Aktivierung der PKC mit PMA.....	64
Abbildung 3.6:	Kabelartiges Wachstum von AS-D6.1A auf Matrigel	67
Abbildung 3.7:	Kolokalisation von D6.1A mit $\alpha 3$, $\beta 1$ und VEGF auf AS-D6.1A Tumorzellen nach Wachstum auf Matrigel.....	68
Abbildung 3.8:	Tumorneoangiogenese in BDX Ratten 7 Tage nach Applikation der Tumorzellen evaluiert durch Intravitalmikroskopie	69
Abbildung 3.9:	Neoangiogenese in AS-D6.1A Tumoren evaluiert durch immunhistologische Färbung	70
Abbildung 3.10:	Proliferation der Tumorzellen.....	71
Abbildung 3.11:	AS-D6.1A induzierte Angiogenese im Peritonealnetz nach Kokultur mit Tumorzellen oder konditioniertem Überstand der Tumorzellen.....	72
Abbildung 3.12:	Der Antikörper D6.1 blockierte AS-D6.1A induzierte Angiogenese im Peritonealnetz nach Kokultur mit Tumorzellen	73
Abbildung 3.13:	Expression von bFGF, VEGF und MMPs in AS und AS-D6.1A Tumorzellen	76
Abbildung 3.14:	AS-D6.1A Exosome enthalten D6.1A und induzieren Neoangiogenese.....	77

Abbildung 3.15: Silberfärbung der Exosomenpräparation von AS und AS-D6.1A Tumorzellen	78
Abbildung 3.16: Expression von Tetraspaninen und Integrinen auf Rattenmesenterien nach Tumorzellapplikation	80
Abbildung 3.17: Expression von CD31 und D6.1A auf Endothelzellen im Pankreas der Ratte nach Tumorzellapplikation.....	81
Abbildung 3.18: Expression von Angiogenesefaktoren auf den Mesenterien der Ratten nach Applikation der Tumorzellen	85
Abbildung 3.19: Expression von Angiogenesefaktoren und matrixdegradierenden Enzymen auf einer Rattenaortaendothelzelllinie (RAEC) und auf einer Fibroblastenzelllinie nach Kultivierung mit konditioniertem AS oder AS-D6.1A Zellkulturüberstand.....	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Darstellung der verwendeten Primärantikörper unter Angabe des Isotyp und der Spezifität	27
Tabelle 2.2:	Darstellung der verwendeten Sekundärantikörper und Reagenzien	29
Tabelle 2.3:	Darstellung der verwendeten Pankreasadenokarzinom-Zelllinien unter Angabe des Ursprungs und der Metastasierungseigenschaften	31
Tabelle 2.4:	Darstellung der verwendeten Kolorektalkarzinom-Zelllinien unter Angabe des Ursprungs und der Metastasierungseigenschaften.....	31
Tabelle 3.1:	Integrin und Tetraspanin Expressionsprofil auf humanen Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien.....	54
Tabelle 3.2:	Kolokalisation von Integrinen mit Tetraspaninen auf humanen Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien.....	55
Tabelle 3.3:	Koimmunpräzipitation von CD9, CD151 und CO-029 mit $\alpha 3$ und $\beta 4$ in humanen Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien.....	59
Tabelle 3.4:	Kolokalisation von $\alpha 3/CD9$, $\beta 4/CD151$ und $\beta 4/CO-029$ nach PKC Aktivierung durch PMA Stimulation	63
Tabelle 3.5:	Koimmunpräzipitation nach Aktivierung der PKC.....	63
Tabelle 3.6:	Expression von Integrinen, Tetraspaninen, angiogenetischen Faktoren und Matrixdegradierenden Enzymen in AS und AS-D6.1A Tumorzellen.	75
Tabelle 3.7:	Expression von Integrinen, Tetraspaninen, angiogenetischen Faktoren und matrixdegradierenden Enzymen in Peritonealmakrophagen nach Applikation der Tumorzellen.....	83
Tabelle 3.8:	Expression von Integrinen, Tetraspaninen, Angiogenesefaktoren und matrixdegradierenden Enzymen auf Mesenterialzellen nach Applikation der Tumorzellen	84

1 Einleitung

1.1 Krebs

1.1.1 Definition und Häufigkeit von Krebs

Die Bezeichnung „Krebs“ wurde zuerst von griechischen Ärzten verwendet. Sie läßt sich auf eine Erscheinungsform des Mammakarzinoms zurückführen, bei der oberflächlich sichtbare, gestaute Venen eine an einen Krebs erinnernde Form aufweisen. Das griechische Wort für das seitwärts laufende Schalentier, „karkinos“, ist zudem der Ursprung für das medizinische Fachwort Karzinom.

In den vergangenen hundert Jahren hat die Anzahl an Menschen, die jährlich an Krebs erkranken bzw. an bösartigen Tumoren versterben, dramatisch zugenommen. In Deutschland werden derzeit pro Jahr ca. 350.000 – 400.000 Erstdiagnosen einer bösartigen Krebserkrankung gestellt, mehrere Millionen Menschen befinden sich in Therapie oder müssen nach einer abgeschlossenen Behandlung regelmäßig zu Nachsorgeuntersuchungen. Während zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts ca. 10 % aller Todesfälle auf eine Krebserkrankung zurückzuführen sind, beträgt der entsprechende Anteil heute ca. 29 % mit weiter steigender Tendenz. Krebserkrankungen sind damit nach den Herz-Kreislauf-Krankheiten die zweithäufigste Todesursache und werden in absehbarer Zeit die Spitze der Mortalitätsursachen einnehmen (Hiddemann et al., 2004).

1.1.2 Entstehung von Krebs

Anhand von Tierversuchen für Hautkrebs wurde bereits Anfang der 40er Jahre das Mehrstufenmodell der Karzinogenese erstellt. Nach diesem Modell geht man heute bei der Mehrzahl der Krebserkrankungen davon aus, dass nicht eine einzelne Veränderung, sondern eine Kette von Ereignissen notwendig ist, die zur Entstehung einer Krebserkrankung führen. Dabei werden verschiedene Schritte unterschieden: Initiation, Promotion und Progression. Im ersten

Schritt, der Initiation, entstehen potentielle Tumorzellen, die sich phänotypisch nicht von gesunden Zellen unterscheiden. Im Verlauf der Promotion entstehen aus den maligne transformierten Zellen morphologisch erkennbare, präneoplastische Zellen, aus denen sich in weiteren Schritten klinisch manifeste Tumore entwickeln können (Hiddemann et al., 2004).

Tumore können durch verschiedene Faktoren induziert werden. Chemische und physikalische Kanzerogene bewirken eine molekulare Veränderung des Wirtsgenoms. Eine Beziehung zwischen Kanzerogenese und Mutation war erstmalig von Theodor Boveri 1917 vermutet worden. 1928 stellte K. H. Bauer die somatische Mutationshypothese der Krebsentstehung auf, obwohl zu jener Zeit die molekulare Natur des genetischen Materials noch unbekannt war. Dass Kanzerogene die genetische Information der Wirtszelle ändern, also Mutagene sind, gilt heute - fast 80 Jahre nach Bauers Veröffentlichung - als gesichert.

Zu den Krebsgenen gehören die Onkogene und die Antionkogene, welche die Tumorigenese fördern bzw. supprimieren. Diese Gene sind im normalen, d.h. genetisch nicht veränderten Zustand, als Schlüsselgene für die Transduktion physiologischer Signale vom Zelläußeren zum Zellkern verantwortlich. Zwischen den Produkten beider Gengruppen, den Onkoproteinen und Antionkoproteinen, besteht ein fein reguliertes Gleichgewicht. Störungen dieses Gleichgewichtes durch die konstitutive Aktivierung von Onkogenen und/oder die Inaktivierung von Antionkogenen begünstigen die Tumorigenese (Petrides, 1998).

1.1.3 Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinom

Das Pankreaskarzinom stellt heute die fünfthäufigste tumorbedingte Todesursache dar. Aufgrund der schwierigen Diagnosestellung, der Aggressivität des Krankheitsverlaufs und der unbefriedigenden Wirksamkeit systemischer Therapieformen überleben nur 1-5 % aller Patienten mit einem Adenokarzinom des exokrinen Pankreas einen Zeitraum von 5 Jahren nach Diagnosestellung (Williamson, 1988). Bei der Ätiopathogenese des Pankreaskarzinoms spielen Umweltfaktoren (z.B. Tabakrauch und Ernährungsgewohnheiten) sowie bestimmte Erkrankungen bzw. postoperative Zustandsbilder (chronische Pankreatitis, Diabetes mellitus) eine Rolle. Auch die genetische Prädisposition und die berufliche Exposition gegenüber bestimmten chemischen Substanzen gelten als Risikofaktoren für die Entstehung exokriner Pankreaskarzinome.

Mehr als 90 % aller malignen Pankreastumore gehen vom exokrinen Pankreasepithel aus, wobei es sich zumeist um ein duktales Adenokarzinom handelt. Charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist die frühzeitige Ausbreitung in die regionären Lymphknoten und in

benachbarte Strukturen wie Gallenwege, Duodenum und große abdominelle Gefäße. Bei der Mehrzahl der Patienten finden sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Metastasen in der Leber. Weitere typische Fernmetastasenlokalisationen stellen das Peritoneum und die Lunge, selten die Knochen und das Gehirn dar (Scheithauer und Hahn, 2004).

Das kolorektale Karzinom ist weltweit eine der häufigsten malignen Erkrankungen, wobei die Inzidenz in den einzelnen Ländern der Erde sehr stark schwankt. Für das Jahr 1998 wird die Zahl der in Deutschland neu an einem kolorektalen Karzinom erkrankten Menschen auf 51.700 geschätzt. Das kolorektale Karzinom ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters, nur 5 % der Erkrankungen treten vor dem 40. Lebensjahr auf. Bezüglich der Ätiologie des kolorektalen Karzinoms lassen sich drei Gruppen unterscheiden. Etwa 10 % der kolorektalen Karzinome entstehen im Rahmen definierter hereditärer Krebs syndrome und bis zu 5 % entstehen nach chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Bei dem größten Teil (85 %) der Fälle sind umweltbedingte Faktoren so wie die Ernährung mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Entstehung mitursächlich. Für diese Annahme spricht u.a. die Tatsache, dass sich das Erkrankungsrisiko von Immigranten dem Risiko der Einwohner des Einwanderungslandes angleicht (Correa und Haenszel, 1978; Doll und Peto, 1981). Eine ballaststoffarme, fett- und proteinreiche Ernährung, Alkohol- und Tabakkonsum und ein Mangel an verschiedenen Mineralstoffen sind die wichtigsten nichtgenetischen Risikofaktoren (Weitz et al., 2004).

1.2 Tumorprogression und Metastasierung

Hanahan und Weinberg (2000) fassen die genetischen Veränderungen von Krebszellen in sechs physiologischen Eigenschaften der Tumorzellen zusammen, welche für das unkontrollierte Wachstum von Tumoren essentiell sind. Diese Eigenschaften sind:

- die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren
- die Insensitivität gegenüber Wachstumsinhibitoren
- die Resistenz gegenüber dem kontrollierten Zelltod (Apoptose)
- die uneingeschränkte Proliferation
- die Gefäßneubildung (Neoangiogenese) des Tumors und
- die Gewebsinvasion und Metastasierung.

1.2.1 Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren

Um von einem Ruhezustand in einen aktiven, proliferativen Zustand zu gelangen, benötigen „normale Zellen“ mitogene Wachstumsfaktoren. Im Gegensatz dazu haben Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen die Fähigkeit erworben, unabhängig von exogenen Stimuli uneingeschränkt zu proliferieren. Zum einen produzieren Tumorzellen ihre eigenen Wachstumsfaktoren, die an die Rezeptoren der Tumorzellen binden und somit die Proliferation der Zellen durch autokrine Stimulation aktivieren (Fedi et al., 1997). Zum anderen werden die Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, die häufig eine Tyrosinkinaseaktivität aufweisen, auf den Tumorzellen überexprimiert. Zum Beispiel ist der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-R/erbB) auf Magen-, Gehirn- und Brusttumoren hochreguliert (Slamon et al., 1987). Strukturelle Veränderungen in diesen Tyrosinkinase-Rezeptoren führen zur Aktivierung der Rezeptoren, die unabhängig von der Bindung eines Liganden wachstumsfördernde Signale in die Zelle weiterleiten (Fedi et al., 1997). Ein weiterer Mechanismus besteht darin, dass cytoplasmatische Kinasen der Signaltransduktionskaskaden konstitutiv aktiv sind und ebenfalls zu einer uneingeschränkten Proliferation der Tumorzellen führen. Bei humanen Kolonkarzinomen tragen die Hälfte der Tumore zum Beispiel eine Mutation im *ras* Onkogen (Kinzler und Vogelstein, 1996). Es ist jedoch unbestritten, dass darüber hinaus das Gewebe, das den Tumor umgibt, eine bedeutende Rolle in der Tumorprogression spielt. Skobe und Fusenig (1998) formulierten deshalb: „Erfolgreiche Tumorzellen sind solche, die die Fähigkeit erlangt haben, ihre normalen Nachbarzellen zur Ausschüttung wachstumsfördernder Signale zu bewegen“.

1.2.2 Insensitivität gegenüber Wachstumsinhibitoren

Um die Gewebshomöostase zu erhalten, benötigen Zellen antiproliferative Signale. Diese Signale beinhalten lösliche Wachstumsinhibitoren, Inhibitoren, die in der extrazellulären Matrix (EZM) in immobilisierter Form vorliegen und Moleküle auf den Zellmembranen benachbarter Zellen, die an Transmembranrezeptoren binden und Signale über intrazelluläre Signaltransduktionswege weiterleiten. Es gibt zwei Mechanismen, wie antiproliferative Signale die Proliferation von Zellen inhibieren. Zum einen werden Zellen aus dem Proliferationszyklus in die G_0 -Phase des Zellzyklus überführt, wo sie verweilen, oder Zellen verlieren vollständig ihre Fähigkeit zur Proliferation, während sie ausdifferenzieren und spezifische Eigenschaften erlangen. Fast alle antiproliferativen Signale werden über das Retinoblastom-Protein (pRb) ge-

steuert. Dieses Protein blockiert im hypophosphorylierten Zustand die Proliferation der Zellen, indem es den Transkriptionsfaktor E2F bindet. Damit wird die Transkription einer Reihe von Genen verhindert, deren Genprodukte für die S-Phase benötigt werden (Weinberg, 1995). Erst nach Phosphorylierung des pRb-Proteins wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt.

Der antiproliferative Faktor TGF β (transforming growth factor β) verhindert die Phosphorylierung von pRb und damit die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F. Es wurde ebenfalls beschrieben, dass in manchen Zellen TGF β die Transkription *c-myc* abhängiger Gene unterdrückt, deren Genprodukte die Maschinerie der G1-Phase regulieren (Moses et al., 1990; Hannon und Beach, 1994; Datto et al., 1997). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie Tumore diesem antiproliferativen Signal entgehen können. In manchen Tumoren ist die Anzahl der TGF β Rezeptoren auf der Zelloberfläche reduziert oder sie exprimieren eine mutierte, funktionell inaktive Form dieses Rezeptors (Fynan und Reiss, 1993; Markowitz et al., 1995). Das Smad4 Protein, das intrazellulär das Signal vom Liganden aktivierten TGF β Rezeptor weiterleitet, stellt ebenfalls einen möglichen Angriffspunkt dar, um die antiproliferative Wirkung zu unterbinden. Schutte et al. (1996) beschrieben eine Mutation im kodierenden Gen von Smad4, was eine Elimination des Genproduktes zur Folge hatte. Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um einer Ausdifferenzierung zu entgehen. Eine mögliche Strategie besteht in der Überexpression des Transkriptionsfaktors *c-myc*, was zu einem ungehinderten Zellwachstum führt und die Ausdifferenzierung verhindert (Kinzler und Vogelstein, 1996).

1.2.3 Resistenz gegenüber dem Zelltod (Apoptose)

Tumore gewinnen ihre Fähigkeit zu einem ungehinderten Wachstum nicht alleine durch eine Stimulation der Proliferation sondern auch durch eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber dem Zelltod, der Apoptose. Bei der Apoptose kommt es nacheinander zu einer Zerstörung der zellulären Membranen, zum Abbau des Cytoskeletts und zur Auflösung der Chromosomen. Schließlich zerfällt die Plasmamembran in viele Vesikel und die Zelle löst sich auf (Löffler, 1998). Ob eine Zelle der Apoptose zugeführt wird oder nicht, hängt von verschiedenen Signalen ab, sogenannten „survival signals“ und „death signals“. Die „survival signals“ werden z.B. über IGF-1/IGF-2 und dem dazugehörigen IGF-1 Rezeptor oder IL-3 und dem dazugehörigen IL-3 Rezeptor in die Zelle weitergeleitet (Lotem und Sachs, 1996; Butt et al., 1999). Die „death signals“ werden über die Bindung des FAS Liganden an den FAS Rezeptor

oder über die Bindung von TNF α (tumor necrosis factor α) an den TNF-R1 Rezeptor eingeleitet (Ashkenazi und Dixit, 1999). Zusätzlich wird das Überleben der Zelle über Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen bestimmt (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Viele der apoptotischen Signale wirken auf die Mitochondrien und führen so zu einer Freisetzung von Cytochrom C (Green and Reed, 1998). Die Bcl-2 Proteinfamilie, die an der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien beteiligt ist, haben entweder proapoptotische (Bax, Bak, Bid, Bim) oder antiapoptotische (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) Eigenschaften. Die Resistenz der Tumorzellen gegenüber Apoptose wird über viele unterschiedliche Mechanismen erworben. Am häufigsten wird der Verlust des Tumorsuppressorproteins p53 beobachtet, das in mehr als 50 % der Tumore durch Mutation inaktiviert ist. Dadurch führt ein DNA-Schaden nicht mehr zur Aktivierung der Apoptose (Harris, 1996). Bei vielen Lungen- und Kolonkarzinomen kann man eine Überexpression eines inaktiven FAS-Rezeptors nachweisen (Pitti et al., 1998), wodurch ebenfalls die Tumorzellen einen Mechanismus erlangt haben, um der Apoptose zu entgehen. Generell werden in nahezu allen Tumoren Veränderungen gefunden, die eine Apoptoseresistenz ermöglichen.

1.2.4 Uneingeschränkte Proliferation

Fast alle Zellen eines Organismus tragen in sich ein Programm, das ihre Teilungsfähigkeit limitiert. Hayflick (1997) konnte zeigen, dass Zellen, die in Kultur gehalten werden, ein endliches Teilungsvermögen besitzen. Nach einer bestimmten Anzahl von Teilungen kommt es bei den Zellen zu einem Wachstumsstopp. Counter et al. (1992) konnten zeigen, dass in somatischen Zellen eine Limitierung der Zellteilung durch sechs Basenpaar lange, repetitive Segmente an den terminalen Regionen von Chromosomen, den sogenannten Telomeren, erfolgt. Die Telomere werden bei jeder Teilung um 50-100 bp verkürzt, da die DNA-Polymerase nicht in der Lage ist, diese 3'-Bereiche chromosomaler DNA während der S-Phase zu replizieren. Letztendlich führt dies zur Wachstumskrise und zum Zelltod.

Für das maligne Wachstum von Tumoren ist es daher unerlässlich, dass sich die Zellen *in vivo* die Fähigkeit zur unlimitierten Vermehrung aneignen. Die Aufrechterhaltung der Telomerlänge wurde in allen Arten von malignen Zellen gezeigt (Shay und Bachetti, 1997). 85 % - 90 % der Tumorzellen erreichen dies durch eine Hochregulation der Expression der Telomerase, die das Anhängen solcher Sechser-Wiederholungen an die terminalen Chromosomenbereiche katalysiert (Bryan und Cech, 1999). Ebenfalls wurde gezeigt, dass manche Tumorzellen in der Lage sind, durch zwischenchromosomale Rekombination die Telomerlänge auf-

rechtzuerhalten, und so zum unlimitierten Wachstum der Krebszellen beitragen (Bryan et al., 1995).

1.2.5 Gefäßneubildung (Tumorangiogenese)

Eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ist für jede Zelle erforderlich, um die notwendigen Stoffwechselfvorgänge in der Zelle zu gewährleisten. Die Bereitstellung dieser Faktoren erfolgt über die Zirkulation, wobei die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) ein sehr genau regulierter Prozess ist. Damit Tumore über eine bestimmte Größe hinaus wachsen können, müssen die Tumorzellen die Fähigkeit erlangen, Angiogenese zu induzieren (Bouck et al., 1996; Hanahan und Folkman, 1996; Folkman, 1997). Es scheint, als ob die Angiogenese wie durch einen Schalter, auch als „angiogenic switch“ bezeichnet, induziert wird. Es ist bekannt, dass Tumore Angiogenesefaktoren erhöht exprimieren und/oder angiogenetische Faktoren aus der Umgebung rekrutieren (Folkman, 1995). Auch Zellen des peritumoralen Gewebes tragen zur Gefäßneubildung bei. Die Angiogenese wird durch ein fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen fördernden und inhibierenden Signalen reguliert. Zu den wichtigsten Proteinen, die endotheliales Zellwachstum und Migration aktivieren, gehören Angiogenin, bFGF (basic fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), IL8, TNF α , TGF α , TGF β und VEGF (vascular endothelial growth factor) (Giordano und Johnson, 2001).

Viele verschiedene Tumore, insbesondere Karzinome der Brust, Blase und des Magen-Darm-Trakts exprimieren VEGF (Pepper, 1997). Eine vermehrte Expression von VEGF wurde nach Aktivierung von Protoonkogenen oder nach Mutation des Tumorsuppressors p53 dokumentiert (Kieser et al., 1994; Rak et al., 1995). Des Weiteren können Zustände wie Hypoxie, z.B. in nekrotischen Tumorarealen, und Hypoglykämie die Expression von VEGF regulieren (Claffey und Robinson, 1996). VEGF bindet an zwei Rezeptortyrosinkinasen, VEGFR1 und VEGFR2, die auf Endothelzellen exprimiert werden. Die Bindung von VEGF an VEGFR2 führt zur Dimerisierung des Rezeptors und zur Autophosphorylierung der Tyrosinreste. VEGFR2 aktiviert direkt die Proteinlipase C- γ (PLC- γ), die wiederum über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), insbesondere von PKC β 2, den Raf-MEK-MAPK Signaltransduktionsweg aktiviert. Durch die Rekrutierung weiterer Adapterproteine mit SH2-Domänen, wie Grb2, Nck und Shc, an VEGFR2 können weitere Signalkaskaden angeschaltet werden (Zachary, 2003).

Integrine und Integrin-abhängige Signaltransduktion spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation der Angiogenese. Ruhende Gefäße exprimieren ein anderes Integrinprofil als sprossende Kapillaren (Varner und Cheresh, 1996; Giancotti und Ruoslahti, 1999). Die Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$ sind maßgeblich an der Proliferation von Endothelzellen beteiligt. Sie interagieren mit bFGF, TNF α und VEGF oder mit dem extrazellulären Matrixprotein Del-1 und führen so zur Expression von HoxD3 und $\alpha\beta3$ (Ho et al., 2004).

Matrixdegradierende Enzyme sind wesentlich an der Regulation der Angiogenese beteiligt. Sie regulieren die Bioverfügbarkeit der angiogenetischen Faktoren und Inhibitoren. Viele Proteasen führen zu einer Freisetzung von bFGF, das in der EZM gespeichert vorliegt (Whitelock et al., 1996). Angiostatin, ein Fragment des Plasminogens, blockiert die bFGF- und VEGF-stimulierte Proliferation von Endothelzellen. Es konnte gezeigt werden, dass von Tumorzellen sezernierte Metalloproteinasen oder uPA am Abbau von Plasminogen zu Angiostatin oder zu angiostatinähnlichen Fragmenten beteiligt ist (Gorrin Rivas et al., 1998). Endostatin, ein weiterer Inhibitor der Angiogenese, wird ebenfalls von Tumoren produziert und stellt ein Abbauprodukt von Kollagen XVIII dar (O'Reilly et al., 1997).

1.2.6 Gewebsinvasion und Metastasierung

Maligne, also metastasierende Tumore sind definiert durch die Fähigkeit zur Invasion des umgebenden Gewebes, des Gefäßsystems und vom Primärtumor entfernt lokalisierter Organe. 90 % der Todesfälle bei Krebs sind auf Metastasen zurückzuführen (Sporn, 1996). Der Prozess der Metastasierung ist mehrstufig und setzt sich aus folgenden konsekutiv ablaufenden Prozessen zusammen: Lösung der individuellen Tumorzelle aus dem Gewebsverband des Primärtumors, Durchbrechen der Basalmembran, Eindringen in das Gefäßsystem, Adaptation an den Strömungsdruck innerhalb der Blutbahn, Anheftung an das Gefäßendothel und Extravasation, Einnistung und Wachstum in einem fremden Organsystem (Fidler, 2003). Tumorzellen, wie Stammzellen, durchlaufen ein Programm, wobei aus primär epithelialen Zellen mesenchymale hervorgehen. Dieses Programm, auch epitheliale-mesenchymale Transformation (EMT) genannt, schliesst Veränderungen in der Transkription von Genen ein und wird durch Wachstumsfaktoren eingeleitet (Jechlinger et al., 2002; Oft et al., 2002). Zu den Hauptmediatoren gehören TGF β und autokrine Wachstumsfaktoren wie EGF, HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor), bFGF und PDGF (platelet derived growth factor). Die wesentlich beteiligten Signaltransduktionswege sind Rezeptortyrosinkinasen (RTK)/Ras und Wnt-, Notch-, Hedgehog- und NF- κ B-abhängige Signaltransduktionskaskaden (Huber et al., 2005).

Entsprechend den von der metastasierenden Tumorzelle zu erfüllenden Aufgaben, sind folgende Molekülgruppen massgeblich an der Metastasierung beteiligt: Adhäsionsmoleküle, Matrix-degradierende Enzyme, Homing-Rezeptoren, Chemokine und Zytokine. Der erste Schritt der Metastasierungskaskade geht mit einem Verlust an Zell-Zelladhäsionsmolekülen einher. Expression und Funktion von E-Cadherin ist bei vielen epithelialen Krebsformen gestört (Cavallaro et al., 2002). E-Cadherin liegt zusammen mit β -Catenin und α -Catenin in einem Core-Komplex vor. Freies β -Catenin leitet Signale in den Zellkern weiter, wo es mit dem Transkriptionsfaktor TCF assoziiert und an der Regulation der Genexpression beteiligt ist (Christofori und Semb, 1999). Beim Wilms-Tumor, Neuroblastom und beim kleinzelligen Bronchialkarzinom konnte eine Expressionsänderung von einer stark adhesiven in eine schwach adhesive Isoform von N-CAM nachgewiesen werden (Johnson, 1991; Kaiser et al., 1996). Metastasierende Tumorzellen müssen bei der Invasion und Metastasierung mit ganz unterschiedlichen Komponenten der EZM interagieren können; dies wird durch eine Änderung des Expressionsprofil der Integrine erreicht. Man dokumentierte eine reduzierte Expression von $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ Integrine, die die Adhäsion an die Basalmembran fördern. Die Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 6$ und $\alpha 6\beta 4$, die das Überleben der Tumorzelle, Migration und Proliferation fördern, werden überexprimiert (Mercurio und Rabinovitz, 2001). Einen weiteren wesentlichen Parameter stellen Matrix-degradierende Enzyme dar. Die Impermeabilität der Basalmembran stellt eine Barriere für disseminierende Tumorzellen dar, die mit Hilfe dieser Enzyme überwunden werden muss (Matrisian, 1999). Die Hauptkomponenten sind unspezifische Proteasen wie Trypsin und Cathepsin, das Plasminsystem, Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Heparanasen (Hagedorn et al., 2001). Eine hohe MMP-2 und MMP-9 Expression wurde in Mamma-, Kolon-, Lunge-, Haut-, Ovar- und Prostatakarzinomen festgestellt und korreliert mit einer schlechten Prognose (Turpeenniemi-Hujanen, 2005). Eine Überexpression von Heparanase wurde auf Mamma-, Kolon-, Lunge-, Prostata-, Ovarial- und Pankreaskarzinomen festgestellt, wobei eine hohe Expression mit einer verkürzten Überlebenszeit und gesteigerter Angiogenese korreliert. Heparanase spielt speziell bei Absiedlung und Proliferation disseminierter Tumorzellen über die Freisetzung von Wachstums- und angiogenetischen Faktoren eine Rolle (Vlodavsky et al., 2002; Simizu et al., 2004). Es ist allerdings nicht erforderlich, dass die Tumorzellen diese Proteasen selbst exprimieren (Werb, 1997), vielmehr werden diese von Bindegewebszellen oder inflammatorischen Zellen sezerniert.

1.3 Tetraspanine

1.3.1 Strukturelle Charakteristika und Expression von Tetraspaninen

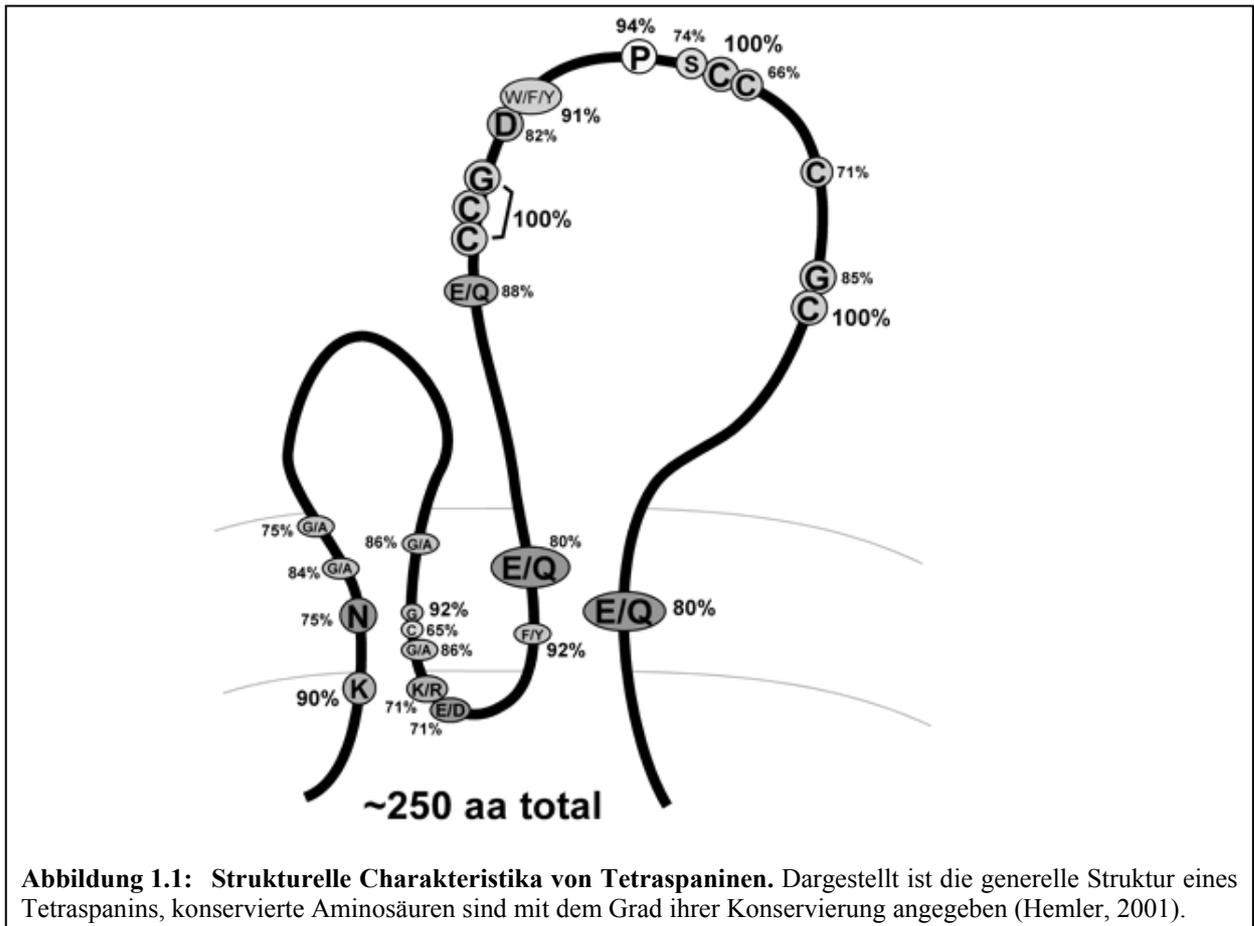
Tetraspanine sind integrale Membranproteine mit vier Transmembrandomänen. Sie sind aufgebaut aus einer kleinen extrazellulären Schleife (EC1), einer großen extrazellulären Schleife (EC2), einer kleinen intrazellulären Schleife und kurzen cytoplasmatischen Abschnitten. Ein weiteres wichtiges Kriterium der Tetraspaninproteinfamilie sind 4-6 konservierte Cysteine in der großen extrazellulären Schleife, zwei davon befinden sich in einem CCG Motiv, die für die Ausbildung von Disulfidbrücken und damit für die korrekte Faltung der EC2-Domäne verantwortlich sind. Zusätzlich konnten polare Aminosäureketten in den Transmembrandomänen 1, 3 und 4 von Tetraspaninen nachgewiesen werden (Hemler, 2003; Stipp et al., 2003; Boucheix und Rubinstein, 2001).

Die meisten Tetraspanine liegen glykosiliert vor, was zur Heterogenität des Molekulargewichtes, das zwischen 20 bis 50 kDa variiert, beiträgt (Yunta und Lazo, 2003). Es handelt sich dabei um N-Glykosilierungen in der EC2-Domäne. Ausnahmen davon sind CD9, welches in EC1 glykosiliert vorliegt (Boucheix et al., 1991) und CD81 und NET-2, die nicht glykosiliert sind (Oren et al., 1990).

In eukaryotischen Organismen sind Tetraspanine weit verbreitet. So sind z.B. bei Säugetieren mehr als 30 Mitglieder der Tetraspaninproteinfamilie bekannt, 37 Mitglieder existieren in *Drosophila* und 20 in *Caenorhabditis elegans* (Stipp et al., 2003). Selbst in 4 Pilzarten konnten Tetraspanine nachgewiesen werden (Gourgues et al., 2002).

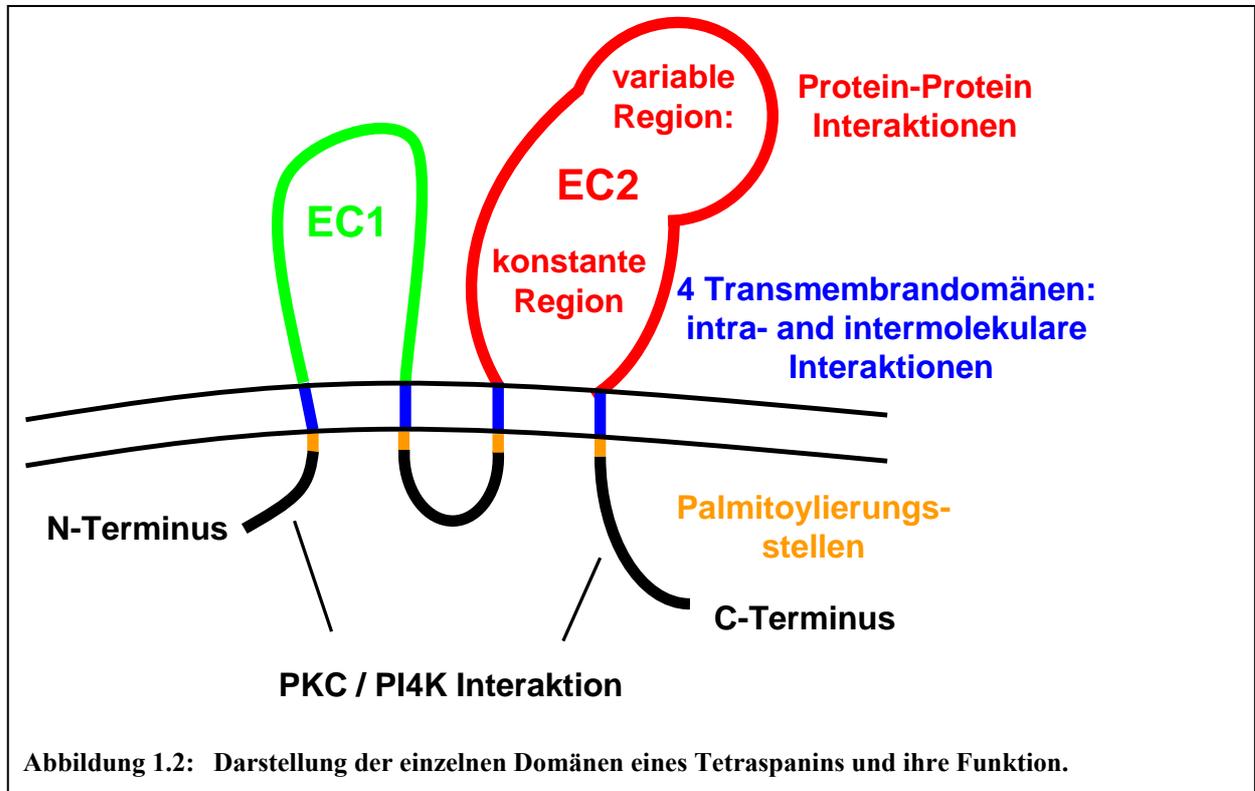
Die Expression von Tetraspaninen ist stark heterogen. Einige Tetraspanine werden in fast allen Zellarten exprimiert, wie z.B. CD9 oder CD81. Im Gegensatz dazu zeigen andere Tetraspanine ein restringiertes Expressionsprofil. CD37 wird ausschließlich in B-Zellen (Schwartz-Albiez et al., 1988), Uroplakine im Epithel der Harnblase (Walz et al., 1995) und RDS/ Peripherin in der Retina exprimiert (Travis et al., 1991). Alle bisher untersuchten Säugetierzellen exprimieren mehrere Mitglieder der Tetraspaninproteinfamilie, mit der Ausnahme von Erythrozyten, auf denen keine Tetraspanine nachgewiesen werden konnten (Boucheix et al., 2001).

Die generelle Struktur der Tetraspanine mit den konservierten Aminosäuren ist in Abbildung 1.1 dargestellt, die einem Übersichtsartikel von M. Hemler entnommen wurde (Hemler, 2001).



Viele Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Struktur und die Funktionen der einzelnen Tetraspanindomänen aufzuklären. Heute kennt man fünf definierte Bereiche, welche die Eigenschaften von Tetraspaninen beeinflussen. Die große extrazelluläre Schleife besteht aus einer variablen und einer konstanten Domäne. Die variable Domäne ist an spezifischen Interaktionen mit anderen Proteinen wie z.B. mit Integrinen beteiligt, während die konstante Domäne die Homodimerisierung von Tetraspaninen beeinflusst. Die vier Transmembrandomänen sind an der Ausbildung von intra- und intermolekularen Interaktionen beteiligt. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Biosynthese und bei der Ausbildung von Tetraspanin-Tetraspanin-Interaktionen, die letztlich zur Bildung eines „Tetraspanin-Netzwerkes“ führen. In intrazellulären juxtamembranen Bereichen befinden sich Cysteine, die palmitoyliert vorliegen und ebenfalls für die Ausbildung des Tetraspanin-Netzwerkes verantwortlich sind. Der cytoplasmatische C-Terminus ist an Interaktionen mit Proteinen des Cytoskeletts oder mit Signaltransduktionsmolekülen, wie z.B. mit der Proteinkinase C (PKC), beteiligt. Viele Tetraspanine wie CD63, Net-1, CD82, CD37, Tspan-3, CD151 oder CO-029 besitzen in dieser Domäne ein Tyr-Xaa-Xaa-Ø (YXXØ) Motiv, Ø steht für eine Aminosäure mit einer hydrophoben Seitenkette. Es handelt sich um ein Tyrosin-basierendes Sortierungssignal, das von

den Adapterproteinen AP-1, -2 und -3 erkannt wird, die an der Sortierung von Klathrin-umhüllten Vesikeln beteiligt sind (Stipp et al., 2003).



1.3.2 Das „Tetraspanin-Netzwerk“

Bis heute sind mehr als 38 Transmembranmoleküle bekannt, die mit Tetraspaninen interagieren (zusammengefasst aus Hemler, 2003). Zu ihnen zählen diverse Integrine, Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie (wie z.B. CD2, CD3, CD4, CD8, MHC-Klasse I, MHC-Klasse II), Proteoglykane (Syndecan, CD44), Proteine, die an der Regulation des Komplementsystems beteiligt sind (CD21, CD46), Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und deren Liganden (EGFR, epidermal growth factor receptor; proTGF α , pro transforming growth factor α ; proHB-EGF, pro heparin-binding epidermal growth factor) sowie verschiedene andere Proteine (CD19, γ -Glutamyltranspeptidase, ADAM10, usw). Boucheix und Rubinstein (2001) bezeichneten die ausgedehnten Komplexe aus Tetraspaninen und den mit ihnen assoziierten Molekülen als „Tetraspanin-Netzwerk“. Die Interaktionen der Tetraspanine mit anderen Molekülen können in primäre, sekundäre und tertiäre Interaktionen eingeteilt werden.

Primäre Interaktionen treten zwischen Tetraspaninen und anderen Proteinen auf. Sie sind spezifisch, direkt, entstehen bereits früh während der Biosynthese im ER und können durch stringente Detergenzien wie z.B. Brij96, Digitonin oder Triton X-100 nicht zerstört werden. Bei-

spiele für primäre Interaktionen sind die Assoziationen der Tetraspanine Uroplakin 1a (UP1a) und UP1b mit dem Transmembranproteinen Uroplakin II und Uroplakin III (Wu et al., 1995), die Assoziation von CD151 mit $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ (Yauch et al., 1998; Sterk et al., 2000) und die Assoziationen von CD9 und CD81 mit EWI-2 und EWI-F (CD9P-1, FPRP) (Stipp et al., 2001a; Stipp et al., 2001b).

Sekundäre Interaktionen sind indirekt, zahlreich und sensitiv gegenüber Detergenzien wie Digitonin und Triton X-100. Es handelt sich hierbei zum Beispiel um Tetraspanin-Tetraspanin-Interaktionen, die in Brij96 erhalten bleiben. Sie treten während der Biosynthese später auf (Golgi oder post-Golgi), werden durch Palmitoylierung stabilisiert und lagern primäre Komplexe zu größeren Komplexen mit multiplen Komponenten zusammen. Der Verlust der Palmitoylierungsstellen von CD151 beeinflusst nicht die primäre Assoziation mit $\alpha 3\beta 1$, verringert aber die Assoziation mit anderen Tetraspaninen wie z.B. mit CD9, CD63 und CD81 (Yang et al., 2002; Berditchevski et al., 2002).

Tertiäre Interaktionen sind definiert als diejenigen Tetraspanin-Interaktionen, die durch Detergenzien wie Brij96 und Triton X-100 zerstört werden, aber in weniger hydrophoben Detergenzien wie Brij58, Brij99, Brij35 und CHAPS erhalten bleiben. Signaltransduktionsproteine wie PKC (Zhang et al., 2001) und TypII PI4K (Yauch und Hemler, 2000) werden nur unter Verwendung solch milder Detergenzien in Tetraspanin-Komplexen gefunden. Diese milden Detergenzien führen oft zu einer unvollständigen Solubilisierung der Tetraspanine, wodurch solche tertiären Komplexe in den unlöslichen leichten Fraktionen von Saccharosedichtegradienten angereichert sind (Claas et al., 2001). Diese Tetraspanin-Komplexe höherer Ordnung werden auch als „Tetraspanin enriched microdomains“ (TEMS) bezeichnet, die sich aber grundlegend von „lipid rafts“ unterscheiden. „Lipid rafts“ sind Plasmamembranmikrodomänen mit einem hohen Anteil an Sphingolipiden, Cholesterol und Phospholipiden mit langen gesättigten Fettsäureseitenketten. Während „lipid rafts“ oft Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) verankerte Proteine und Caveolin beinhalten (Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998), sind diese Proteine gewöhnlich in TEMS nicht vorhanden (Berditchevski et al., 2002; Yauch und Hemler, 2000). Ein weiterer Unterschied besteht in dem Verhalten gegenüber Triton X-100. Lipid rafts sind resistent gegenüber Triton X-100, während Tetraspanin-Komplexe durch dieses Detergenz zerstört werden (Simons und Ikonen, 1997; Claas et al., 2001).

1.3.3 Funktion und Relevanz der Tetraspanine bei Tumorprogression und Metastasierung

Einige Tetraspanine wurden als potentielle Marker zur Charakterisierung von Tumorzellen untersucht. So wird z.B. CD9 auf 90 % der B-Zellen bei akuter Leukämie und auf 50 % bei akuter myeloider Leukämie exprimiert (Boucheix, 1985). In kolorektalen Karzinomen wurde das Tetraspanin CO-029 beschrieben und das Antigen L6 wird in Brust-, Lungen-, Kolon- und in Ovarialtumoren überexprimiert (Szala et al., 1990; Marken et al., 1992). Den Tetraspaninen wurde schon früh eine Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung zugeschrieben. In frühen Stadien der Melanomentstehung wird CD63 hoch exprimiert und anschließend im fortgeschrittenen Stadium herunterreguliert (Hotta et al., 1988). Dong et al. (1995) konnten zeigen, dass CD82 eine Suppressorrolle in der Metastasierung von Prostatakrebs einnimmt. Das gleiche konnte für CD9 nachgewiesen werden. Die Expression von CD9 auf den Metastasen von Brust- und Oesophaguskarzinomen ist im Vergleich zum Primärtumor herunterreguliert (Miyake et al., 1995; Uchida et al., 1999). Das Expressionsniveau dieser Tetraspanine kann einen Hinweis auf den Verlauf der Krebserkrankung geben und dient als prognostischer Tumormarker. Patienten mit Bronchialkarzinom haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von 86 %, wenn CD9 und CD82 koexprimiert werden, im Vergleich zu 31 %, wenn diese Antigene nicht exprimiert sind (Adachi et al., 1998). Auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass CD9 auf etablierten Zelllinien aus Metastasen von Kolonkarzinomen niedriger exprimiert wird im Vergleich zu Zelllinien, die aus dem entsprechenden Primärtumor etabliert wurden (Cajot et al., 1997). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Transfektion von CD9 oder CD63 in Melanomzellen eine Reduzierung des Metastasierungspotenzials zur Folge hatte (Ikeyama et al., 1993; Radford et al., 1995). Im Gegensatz dazu führt die Transfektion von D6.1A/CO-029 in eine schwach-metastasierende Zelllinie zu einem Anstieg des Metastasierungspotenzials (Claas et al., 1998).

Während der malignen Transformation treten Veränderungen in Zelladhäsion und Zellmotilität auf. Antikörper gegen Tetraspanine haben einen großen Einfluß auf die Migration von Zellen. So führt z.B. anti-CD9 zu einer Inhibition der Migration bei Kolonkarzinomzelllinien (Cajot et al., 1997). Auch Antikörper gegen die Tetraspanine CD81 oder CD151 führen je nach Zellart zu einer Hemmung oder zu einer Stimulation der Zellmigration (Boucheix et al., 2001). Wie bereits erwähnt assoziieren Tetraspanine mit Laminin-bindenden Integrinen ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$). Es gibt keinen Hinweis darauf, dass Tetraspanine die Konformation der Integrine oder die Affinität zu Liganden beeinflussen, vielmehr wird vermutet,

dass Integrin-abhängige Migration, Spreading und die Zellmorphologie durch Tetraspanine reguliert wird (Hemler, 2003). An Hand von CD151 wurde gezeigt, dass eine Mutation in der primären Integrinbindungsstelle den Verlust der Assoziation zu $\alpha 3$ und $\alpha 6$ Integrinen zur Folge hat. Die Zellen behielten ihre Integrin-abhängige Zelladhäsionseigenschaften, aber Integrin-abhängiges Zellspreading und Kabelstrukturbildung der Zellen auf Matrigel ging verloren (Kazarov et al., 2002).

Tetraspanine regulieren Integrin-abhängige Funktionen, indem sie Kinasen, Phosphatasen und andere Signaltransduktionsmoleküle in das Tetraspanin-Netz rekrutieren und diese dann mit den Integrinketten interagieren. Mit Hilfe von Integrin $\alpha 3$ Chimeren konnte gezeigt werden, dass eine korrekte $\alpha 3$ Domäne notwendig ist, um intrazellulär Tetraspanin-assoziierte Signaltransduktionsenzyme wie die Phosphatidylinositol-4-Kinase (Yauch et al., 1998) und PKCs (Zhang et al., 2001) zu rekrutieren.

1.3.4 Das Tetraspanin D6.1A

Das Tetraspanin D6.1A ist das homologe Protein des humanen Tetraspanins CO-029 in der Ratte. Ursprünglich wurde D6.1A (CO-029, TM4SF3) als ein Tumor-assoziiertes Antigen auf mehreren humanen Karzinomen und Astrocytomzelllinien beschrieben (Szala et al., 1990). D6.1A assoziiert mit den Integrinen $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ und nach Auflösung der Hemidesmosomen mit $\alpha 6\beta 4$. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es mit den Tetraspaninen CD9 und CD81, und mit einem Mitglied der Immunglobulin Superfamilie, dem Prostaglandin F2 α Rezeptor regulatorischen Protein, der Typ II Phosphoinositol-4-Kinase, EpCAM und CD44v4-v7 interagiert (Claas et al., 1998; Claas et al., 2005; Herlevsen et al., 2003). Huerta et al. (2003) zeigten, dass die metastasierende Kolonkarzinomzelllinie SW620 im Vergleich zur SW480 Zelllinie aus dem Primärtumor desselben Patienten eine hohe Expression von CO-029 aufweist, was auf eine Rolle dieses Antigens bei der Tumorprogression hinweist. Tanaka et al. (2002) fanden die Expression von D6.1A auf einer dedifferenzierten Rattenhepatomlinie hochreguliert und postulieren eine mögliche Funktion von D6.1A bei der Differenzierung und Proliferation von Zellen. Eine erhöhte Expression von D6.1A wurde ebenfalls in hepatozellulären Karzinomen nachgewiesen und es wurde eine mögliche Relevanz bei der hämatogenen intrahepatischen Metastasierung postuliert (Kanetaka et al., 2001; Kanetaka et al., 2003). Frühere Untersuchungen in unserem Labor lieferten erste Hinweise über die Mechanismen der pro-metastatischen Funktion von D6.1A. So führte die Transfektion der schwach metastasierenden BSp73AS Zelllinie mit D6.1A nach Injektion zur

Bildung eines hämorrhagischen Aszites und zu einer Verbrauchskoagulopathie in der Ratte (Claas et al., 1998; Herlevsen et al., 2003). Die Überlebensrate von Tumorzellen im Gefäßsystem wird durch die Interaktion mit Leukozyten und Thrombozyten verbessert (Bick, 1992), so dass D6.1A auf diese Weise pro-metastatisch wirken könnte. Auf molekularer Ebene sind die Funktionen von D6.1A jedoch noch weitgehend unbekannt.

1.4 Integrine

1.4.1 Strukturelle Charakteristika und Expression von Integrinen

Integrine sind heterodimere Transmembranglykoproteine, die aus einer α - und einer β -Kette aufgebaut sind. Bis heute sind mindestens 25 Integrine bekannt. 18 unterschiedliche α - und 8 β -Ketten stehen zur Verfügung, aus denen die Integrine aufgebaut werden (Kuphal et al., 2005). Sowohl die α - als auch die β -Kette bestehen aus einer großen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einem kurzen cytoplasmatischen Abschnitt aus 20 bis 50 Aminosäuren. Eine Ausnahme stellt die $\beta 4$ -Kette dar, sie besitzt eine große cytoplasmatische Domäne aus mindestens 1000 Aminosäuren. Die α - und die β -Kette sind nicht kovalent miteinander verbunden und im Gegensatz zu anderen Oberflächenrezeptoren besitzen die Integrine nur eine schwache Affinität zu ihren Liganden. Die extrazelluläre Domäne der α -Kette besteht aus sieben homologen Wiederholungen von etwa 60 Aminosäuren, drei bis vier dieser homologen Bereiche binden zweifach geladene Kationen. Diese N-terminalen Wiederholungen bilden eine cyclische Struktur, weshalb diese Struktur als sieben-facher β -Propeller bezeichnet wurde (Hynes, 2002). Manche α -Ketten ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ und αV) werden in der extrazellulären Domäne in der Nähe der Transmembranregion proteolytisch gespalten, und die beiden Ketten werden durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten. Die cytoplasmatische Domäne der α - und β - Kette binden an Proteine des Aktincytoskeletts und sind an der Rekrutierung von Adapterproteinen und Signaltransduktionsmolekülen beteiligt. Eine der Hauptaufgaben der Integrine besteht darin, die extrazelluläre Matrix (EZM) mit dem Aktincytoskelett zu verbinden. Während manche Integrine nur eine spezifische Komponente der EZM binden, $\alpha 5 \beta 1$ bindet selektiv an Fibronectin, können andere Integrine mehrere Komponenten der EZM erkennen. $\alpha \nu \beta 3$ bindet z.B. an Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen, von Willebrand Faktor und proteolytische Formen von Kollagen und Laminin (van der Flier und Sonnenberg, 2001).

Zusätzlich spielen die Integrine eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion zwischen den Zellen und ihrer Umgebung. Das „Outside-in signaling“ beeinflusst Proliferation, Polarität, das Wachstum und die Migration der Zellen (Aplin et al., 1998). Im Gegensatz dazu reguliert das „inside-out signaling“ die Interaktion der Integrine mit der extrazellulären Umgebung, aus einer schwachen Bindung kann durch Konformationsänderung eine starke Bindung entstehen. Die Expression der Integrine ist auf das Unterreich der Vielzeller (Metazoa) begrenzt. Weder in Prokaryoten, Pflanzen oder Pilzen konnte man Integrine nachweisen (Whittaker und Hynes, 2002). In *Caenorhabditis elegans* fand man eine β -Kette und zwei α -Ketten, aus denen zwei Integrine aufgebaut werden (Hynes, 2002).

1.4.2 Funktion und Relevanz der Integrine bei Tumorprogression und Metastasierung

Verschiedene Integrine spielen eine wichtige Rolle für Proliferation, Migration und das Überleben der Zellen. Antagonisten dieser Integrine hemmen Migration und Invasion transformierter Zellen und besitzen die Fähigkeit Apoptose auszulösen. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Integrinantagonisten Tumorangiogenese und Metastasierung blockieren können (Jin und Varner, 2004). Integrine besitzen keine eigene enzymatische Aktivität, aber sie interagieren mit Kinasen und Adaptermolekülen in Fokalkontaktstellen und können auf diese Weise Signaltransduktionsmoleküle aktivieren.

Viele Studien haben gezeigt, dass Expressions- und Verteilungsunterschiede der Integrine in malignen Tumoren im Vergleich zu pre-neoplastischen Tumoren des gleichen Typs auftreten (Mizejewski, 1999). So wird z.B. $\alpha\beta3$ an der invasiven Front von malignen Melanomzellen stark exprimiert, aber nur schwach auf pre-neoplastischen Melanomen (Brooks et al., 1994). Auch für das Integrin $\alpha6\beta4$ wurde eine Hochregulation bei verschiedenen Karzinomen und die Mobilisierung aus Hemidesmosomen in migratorische Regionen der Zellen beschrieben (Tennenbaum et al., 1993; Rabinovitz und Mercurio, 1997). Während der Tumorprogression werden die Integrine nicht nur hochreguliert, sondern auch eine verringerte Expression von $\alpha1$, $\alpha6$, $\beta1$ oder $\beta4$ wurde bei der Bildung von Neoplasmen in Brustepithelgewebe dokumentiert (Mizejewski, 1999). Ein anderer Mechanismus, wie Zellen ihr migratorisches Verhalten verändern können, besteht in der veränderten Affinität der Integrine gegenüber ihren Liganden. Pampori et al. (1999) zeigten, dass sich die Affinität von $\alpha\beta3$ in einer Vielzahl von Zellen verändert. Integrine stimulieren die Migration der Zellen, indem sie Rho und Rac GTPasen aktivieren und Aktinfilamente mit der Zellmembran verknüpfen (Ren et al., 1999).

Antagonisten von $\alpha 5\beta 1$ blockieren die Migration auf Vitronectin, aber nicht die Adhäsion zu Vitronectin; dies bedeutet, dass durch die Antagonisten die Regulationsmechanismen der Migration, aber nicht die Adhäsionseigenschaften der Integrine beeinflusst werden (Kim et al., 2000b). Es konnte gezeigt werden, dass $\alpha 5\beta 1$ Antagonisten die Proteinkinase A (PKA) aktivieren, und dadurch die Bildung der Stressfasern verhindert wird. Letztendlich führt dies zu einer Inhibition der Migration.

Nicht nur die Migration, sondern auch die Invasion von Tumorzellen wird durch Integrine reguliert. Felding-Habermann et al. (2002) zeigten, dass eine erhöhte Expression von $\alpha v\beta 3$ mit einer erhöhten Invasion und Metastasierung von Tumorzellen korreliert. In Brustkarzinomen konnte gezeigt werden, dass die Expression von $\alpha 6\beta 4$ zu einer erhöhten Tumorzellinvasion und Metastasierung führt (Mercurio et al., 2001; Ramos et al., 2002).

Integrine spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der Angiogenese. Auf ruhendem Endothel wird weder $\alpha v\beta 3$ noch $\alpha 5\beta 1$ exprimiert, aber nach Stimulation mit angiogenetischen Wachstumsfaktoren werden beide Integrine auf den Endothelzellen während der Bildung neuer Blutgefäße exprimiert (Brooks et al., 1994; Kim et al., 2000a). Senger et al. (1997) konnten nachweisen, dass Antagonisten von $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 1\beta 1$ die VEGF-induzierte Angiogenese hemmen.

Untersuchungen von mehreren Gruppen zeigten, dass es für das Überleben nicht-transformierter Zellen notwendig ist, an die EZM zu binden. So führt die Ligandenbindung der Integrine zu einer Blockierung der Apoptose. Inhibitoren der Apoptose wie z.B. die Proteinkinase B und Akt werden aktiviert und die Aktivität der Caspase 8 wird gehemmt (Pankov et al., 2003; Kim et al., 2002).

1.4.3 Das Integrin $\alpha 6\beta 4$

Das Integrin $\alpha 6\beta 4$ bindet an verschiedene Lamininisoformen. Die stärkste Affinität besitzt es gegenüber Laminin 5, einer Komponente der epidermalen Basallamina (Niessen et al., 1994). Das Integrin wurde als ein Bestandteil von Hemidesmosomen nachgewiesen (Stepp et al., 1990). Im Gegensatz zu anderen Integrinen interagiert $\alpha 6\beta 4$ mit Intermediärfilamenten aus Keratin. Diese Assoziation wird durch Plectin und BP230 in Hemidesmosomen vermittelt (Niessen et al., 1997). Da bei der Tumorprogression die Tumorzellen ihre Polarität verlieren und Hemidesmosome aufgelöst werden, ging man zuerst davon aus, dass die Expression von $\alpha 6\beta 4$ während der Tumorinvasion herunterreguliert wird (Rabinovitz und Mercurio, 1996). Andererseits wurde $\beta 4$ zuerst als ein tumorassoziiertes Antigen nachgewiesen (Kimmel und

Carey, 1986). Rabinovitz et al. (1999) konnten zeigen, dass EGF (epidermal growth factor) bei Karzinomzelllinien zu einer Stimulation der Migration führt. EGF aktiviert die PKC, die schließlich Serinreste der β 4-Kette phosphoryliert. Dies führt zur Auflösung der Hemidesmosomen und α 6 β 4 assoziiert mit F-Aktin in Filopodien und Lamellipodien. Eine Phosphorylierung der β 4-Kette an Tyrosin durch aktivierte Kinasen führt zum Anschalten weiterer Signaltransduktionswege. Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) wird aktiviert, die wiederum an der Regulation von Rho GTPasen beteiligt ist (Mercurio und Rabinovitz, 2001). Letztendlich wird durch eine veränderte Organisation des Aktincytoskeletts die Migration der Zellen initiiert. Die Phosphorylierung der β 4-Kette an Tyrosin wird durch assoziierte Tyrosinkinaserzeptoren hervorgerufen, α 6 β 4 assoziiert z.B. mit c-met, erbB2 oder EGFR (Wilhelmsen et al., 2006). Abhängig vom Expressionsprofil der Zelle kann α 6 β 4 unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen Zellarten ausüben. Bachelder et al. (1999) zeigten, dass α 6 β 4 in p53 defizienten Tumorzellen das Überleben der Zelle fördert, während es in Tumorzellen, die p53 exprimieren, die Apoptose stimuliert.

1.5 Das BSp73 Tumorsystem

Am Beispiel der Integrine, CAMs und Oberflächenproteasen wurde der Beitrag der Oberflächenproteine an der Metastasierung gezeigt. Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial, die gemeinsam von einer Parentalzelllinie abstammen, stellen ein geeignetes System dar, um diesen Beitrag zu untersuchen. Ein solches Modell ist das BSp73 Tumorsystem. Aus einem spontan aufgetretenen Adenokarzinom des Pankreas (BSp73) einer BDX Ratte wurde die Parentallinie etabliert (Zoller et al., 1978). Tumore mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial wurden nach mehreren aufeinanderfolgenden *in vivo* Passagen über subkutane Transplantation etabliert. Diese Tumore waren wiederum die Grundlage für die Etablierung von *in vitro* kultivierbaren Zelllinien. Die als BSp73AS bezeichnete Sublinie verfügt über ein schwaches, die als BSp73ASML bezeichnete Schwesterlinie über ein sehr ausgeprägtes Metastasierungspotenzial (Matzku et al., 1983). BSp73AS Zellen bilden nach Injektion in die Fußpfote von BDX Ratten lokale Tumore und befallen die Lymphknoten, falls eine frühzeitige Entfernung des Primärtumors unterbleibt. Im Gegensatz dazu bilden BSp73ASML Zellen kleine Primärtumore. Sie befallen die Lymphknoten wesentlich früher und sind in der Lage, Lungenmetastasen zu bilden.

Die Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen differentiell exprimierte Oberflächenmoleküle stellte den ersten Schritt bei der Suche nach metastasierungsassoziierten Antigenen dar. Die Immunisierung von Balb/c Mäusen mit BSp73ASML Tumorzellmembranen lieferte Antikörper gegen fünf Antigene, die auf BSp73ASML Zellen hoch und auf BSp73AS Zellen nicht exprimiert werden (Matzku et al., 1989). Mit Hilfe dieser monoklonalen Antikörper wurden die entsprechenden Antigene identifiziert. Dabei handelt es sich um eine variante Isoform des Hyaluronsäurerezeptors CD44 (Gunthert et al., 1991), C4.4A (Rosel et al., 1998) ein Molekül mit Ähnlichkeit zum uPAR, EpCAM (Wurfel et al., 1999), das Integrin $\alpha 6\beta 4$ (Herlevsen et al., 2003) sowie das Tetraspanin D6.1A (Claas et al., 1998). Durch DNA-CHIP Technologie wurden mittlerweile mehrere hundert Proteine identifiziert, die auf beiden Sublinien differentiell exprimiert werden (Tarbe et al., 2002).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Auf Grund der frühen und fulminanten Metastasierung haben Patienten mit einem Pankreasadenokarzinom eine überaus schlechte Prognose. Unterschiede des Expressionsprofils von Tetraspaninen und Integrinen spielen eine wesentliche Rolle bei der Metastasierung. So ist bei gastrointestinalen Tumoren speziell die Expression des Integrins $\alpha 6\beta 4$ und des Tetraspanins CO-029 mit einer schlechten Prognose verbunden. Im Gegensatz dazu korreliert die Expression von CD9, ein verwandtes Tetraspanin des CO-029, mit einer geringen Bildung von Metastasen. Die Frage der Bedeutung der häufig beschriebenen Assoziation von Tetraspaninen und Integrinen für die Metastasierung wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. In früheren Studien wurden diesbezüglich im Metastasenmodell in der Ratte zwei interessante Ergebnisse dokumentiert. Zum einen wiesen Doppeltransfektanten der Pankreasadenokarzinomzelllinie BSp73AS mit $\alpha 6\beta 4$ und D6.1A - dem homologen Protein von CO-029 in der Ratte - nach i.p. Applikation eine außergewöhnlich starke Metastasierung in die Leber auf, und unter Stressbedingungen zeigten diese Zellen einen migratorischen Phänotyp. Zum anderen führte die Applikation D6.1A-überexprimierender Zellen in Ratten zu einer lethalen Verbrauchskoagulopathie, deren Ursache noch nicht geklärt wurde. Ziel der Dissertation war daher die Beantwortung folgender Fragen: 1. Welche Bedeutung hat die Assoziation von D6.1A/CO-029 mit $\alpha 6\beta 4$ in humanen Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomen für das migratorische Potenzial der Tumorzellen? 2. Welche Mechanismen liegen der Verbrauchskoagulopathie zugrunde, die durch D6.1A-überexprimierende Tumore induziert wird?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern	Roth, Karlsruhe
Analysenwaage RC210 D	Sartorius, Göttingen
B-Radioaktivitätszähler Betaplate 120 S	LKB Wallace, New Jersey, USA
Brutschrank für Bakterienkultur	Melag, Berlin
Brutschrank für Zellkultur	Labotect, Göttingen
DNA-Gelelektrophoresekammern	Bio-Rad, München
Elektroporator Easy Ject	Eugentec, Seraing, Belgien
Elektrophoresekammer Mini-Protean [®] II	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer Protean [®] II xi cell	Bio-Rad, München
Entwicklermaschine Hyperprocessor	Amersham, Freiburg
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Fotokassette	Amersham, Freiburg
FPLC Pharmacia LKB GP10	Pfizer, Karlsruhe
Fraktionensammler LKB RediFrac	Pfizer, Karlsruhe
Gradientenmischer	Hoefler, San Francisco, USA
Inversmikroskop DM-IL	Leica, Bensheim
Kamerasystem Spot CCD	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA
Kamerasystem Wild MPS48	Leica, Bensheim
Kryostat HM 505 N	Micom Laborgeräte, Walldorf
Magnetrührer 3000	Heidolph, Keilheim
Mikroskop DMRBE	Leica, Bensheim
Mikrowelle	Philips, Wiesbaden
Monitor PVM-1440M	Sony, Tokyo, Japan

pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer Ultraspec III	Amersham, Freiburg
Pipettus-Akku	Hirschmann, Eberstadt
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Powersupply PS 9009	Gibco, Gaithersburg, USA
Präparationsbesteck	Richter, Münster
Rotor GSA	Kendro, USA
Rotor SW34	Kendro, USA
Rotor SW41Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Schüttelinkubator	Infors HT, Stuttgart
Sterilbank	Heraeus, Stuttgart
Transferapparatur Mini Trans-Blot [®]	Bio-Rad, München
Transferapparatur Trans-Blot [®]	Bio-Rad, München
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator Midi Doc	Herolab, Wiesloch
Ultraschall Homogenisator	Bandelin Elektronik, Berlin
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter, Krefeld
Videokamera	Kappa, Gleichen
Viderekorder AG-7350-E	Panasonic, Osaka, Japan
Waage Iso 9001	Sartorius, Göttingen
Waage PT 3100	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Whirlmixer Vortex Genie	Si Inc., New York, USA
Vakuumpumpe	Bachhofer, Reutlingen
Zählkammer Neubauer improved	Brand, Wertheim
Zellerntegerät Harvester 96	Tomtec Inc., Hamden, USA
Zentrifuge Sorvall RC5B Plus	Kendro, USA
Zentrifuge Biofuge13R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge15	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Dako-Pen	DakoCytomat., Glostrup, Dänemark
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen
Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten	Eugentec, Seraing, Belgien
Filtermatten für β -Radioaktivitätszähler	LKB, Wallace, New Jersey
Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Membranfilter, 0,2 μ m	Sartorius, Göttingen
Membranfilter Millipore „V“, 0,025 μ m	Milipore, Bredford, USA
Nitrozellulosemembran Hybond ECL	Amersham, Freiburg
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	American Nat. Can, Greenwich, GB
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Platten 96-well, flach- und rundboden	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter 0,2 μ m	Renner, Darmstadt
Spritzen	BD Biosciences, Heidelberg
Whatman TM 3MM Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten 96-well, 24-well, 6-well	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin 6 ml, 20 ml	Vivascience, Hannover

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Fluka, Buchs, Schweiz
Agarose	Sigma, Steinheim
3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC)	Sigma, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Gibco, BRL, Eggenstein
Ampicillinsulfat	Calbiochem, Darmstadt

Bactoagar	Fluka, Buchs, Schweiz
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA, Pasching, Österreich
Brij58	Sigma, Steinheim
Brij96	Fluka, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Riedel-de Haën, Seelze
Coomassie R-250	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Einbettmedium Neg-50	R.-A. Scientific., Kalamazoo, USA
Essigsäure	Riedel-de Haën, Seelze
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
Freunds Adjuvans	Sigma, Steinheim
G418 Sulfat	PAA, Pasching, Österreich
Gelatine	Merck, Darmstadt
Gelatine (Cold Water Fish Skin)	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	AppliChem, Darmstadt
Glutathion, reduziert	Calbiochem, Darmstadt
Glutathion-Agarose	Sigma, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	GERBU, Gaiberg
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N´2-ethanesulfonic acid (HEPES)	GERBU, Gaiberg
Hygromycin	PAA, Pasching, Österreich
Immersionsöl	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Fluka, Buchs, Schweiz

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma, Steinheim
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Sigma, Steinheim
Kaliumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumchromalaun	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumtetrathionat	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Calbiochem, Darmstadt
Ketavet	Pfizer, Karlsruhe
Kristallviolett	Sigma, Steinheim
Laminin 5	K. Miyazaki, Yokohama, Japan
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Matrigel (EZM Gel)	Sigma, Steinheim
Mayer's Hämalaun	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Riedel-de Haën, Seelze
Mowiol (4-88)	Calbiochem, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	AppliChem, Darmstadt
Natriumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	GERBU, Gaiberg
Natriumhydrogencarbonat	Appllichem, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Opti-Flour Scintillatorflüssigkeit	Szintillations-Flüssigkeit Packard
Paraformaldehyd	Sigma, Steinheim
Penicillin	Sigma, Steinheim

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Steinheim
Phorbolmyristataacetat (PMA)	Sigma, Steinheim
PolyFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Bioscience, Freiburg
Rompum	Bayer, Leverkusen
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Mix)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco cell culture, Karlsruhe
Salzsäure	Riedel-de Haën, Seelze
Sepharose 4B (CNBr aktiviert)	Amersham Bioscience, Freiburg
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	Sigma, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypsin	Sigma, Steinheim
Trypton	Applichem, Darmstadt
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe
Zinkchlorid	Merck, Darmstadt

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „zur Analyse“.

2.1.4 Enzyme

<i>Hind</i> III	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Nhe</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Not</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Die zu den Enzymen dazugehörigen Puffer waren 5 x oder 10 x konzentriert und wurden von der entsprechenden Firma bezogen.

2.1.5 Radioisotop

³H-Thymidin Amersham Bioscience, Freiburg

2.1.6 Versuchssysteme („Kits“)

ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Freiburg
FluoReporter Oregon Green 488 Protein Labeling Kit	Molecular Probes, Leiden, NL
Vectastatin ABC Kit	Vector Lab., Burlingame, USA
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

2.1.7 Grössenmarker

GeneRuler™ 100 bp DNA-Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primärantikörper

Tabelle 2.1: Darstellung der verwendeten Primärantikörper unter Angabe des Isotyp und der Spezifität

Spezifität	Antikörper	Isotyp	Quelle / Referenz
anti-Human-CD9	MEM-61	mIgG1	Immunotools, Friesoythe
anti-Human-CD11a (α L)	G43-25B	mIgG2a	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Human-CD18 (β 2)	MEM-48	mIgG1	Immunotools, Friesoythe
anti-Human-CD29 (β 1)	MEM-101A	mIgG1	Immunotools, Friesoythe
anti-Human-CD49a (α 1)	SR84	mIgG1	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Human-CD49b (α 2)	12F1-H6	mIgG2a	BD Pharmingen, Hamburg

Spezifität	Antikörper	Isotyp	Quelle / Referenz
anti-Human-CD49c ($\alpha 3$)	C3 II.1	mIgG1	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Human-CD49c ($\alpha 3$), blocking	P1B5	mIgG1	Chemicon, Temecula, USA
anti-Human-CD49d ($\alpha 4$)	9F10	mIgG1	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Human-CD49e ($\alpha 5$)	IIA1	mIgG1	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Human-CD49f ($\alpha 6$)	GoH3	rIgG2a	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Human-CD53	MEM-53	mIgG1	Immunotools, Friesoythe
anti-Human-CD63	MEM-259	mIgG1	Immunotools, Friesoythe
anti-Human-CD71 (TfR)	Okt9	mIgG1	European Collection of Animal cell cultures
anti-Human-CD81	M38	mIgG1	Imai et al., 1993
anti-Human-CD82	C33	mIgG2a	Imai et al., 1992
anti-Human-CD104 ($\beta 4$)	439-9B	rIgG2b	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Human-CD104 ($\beta 4$), blocking	ASC-9	mIgG2a	Chemicon, Temecula, USA
anti-Human-CD151	11B1	mIgG1	Geary et al., 2001
anti-Human-CO-029	CO-029	mIgG1	Sela et al., 1989
anti-Ratte-bFGF	bFM-2	mIgG1	Biomol, Hamburg
anti-Ratte-CD9	B2C11	mIgG2a	European Collection of Animal cell cultures
anti-Ratte-CD11b (αM)	WT.5	mIgA	BD Pharmigen, Hamburg
anti-Ratte-CD18 ($\beta 2$)	WT.3	mIgG1	BD Pharmigen, Hamburg
anti-Ratte-CD29 ($\beta 1$)	Ha2/5	hIgM	BD Pharmigen, Hamburg
anti-Ratte-CD31	TLD-3A12	mIgG1	BD Pharmigen, Hamburg
anti-Ratte-CD44	Ox-50	mIgG1	European Collection of Animal cell cultures
anti-Ratte-CD49a ($\alpha 1$)	Ha31/8	mIgG2	BD Pharmigen, Hamburg
anti-Ratte-CD49b ($\alpha 2$)	Ha1/29	hIgG2	BD Pharmigen, Hamburg
anti-Ratte-CD49c ($\alpha 3$)	Ralph 3.1	mIgG2a	European Collection of Animal cell cultures
anti-Ratte-CD49d ($\alpha 4$)	MR α 4-1	mIgG2a	BD Pharmigen, Hamburg
anti-Ratte-CD49e ($\alpha 5$)	HMa5-1	hIgG1	BD Pharmigen, Hamburg
anti-Ratte-CD49f ($\alpha 6$)	MAB1410	mIgG1	Chemicon, Temecula, USA
anti-Ratte-CD61 ($\beta 3$)	F11	mIgG1	BD Pharmigen, Hamburg
anti-Ratte-CD81	Eat2	hIgG1	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Ratte-CD151		rabbit IgG	Claas et al., 2005
anti-Ratte-D6.1A	D6.1	mIgG1	Matzku et al., 1989
anti-Ratte-IFN γ	DB-1	mIgG1	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Ratte-IL4		rabbit IgG	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Ratte-MMP-2		rabbit IgG	Dianova, Hamburg
anti-Ratte-MMP-9	VIIC2	mIgG1	Dianova, Hamburg
anti-Ratte-MMP-13		rabbit IgG	Dianova, Hamburg

Spezifität	Antikörper	Isotyp	Quelle / Referenz
anti-Ratte-TIMP-1	102B1	mIgG1	Biozol, München
anti-Ratte-TIMP-2	3A4	mIgG2a	Biozol, München
anti-Ratte-TNF α	TN3-19.12	hIgG	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Ratte-uPA		rabbit IgG	American Diagnostica, Stanford, USA
anti-Ratte-uPAR		rabbit IgG	American Diagnostica, Stanford, USA
anti-Ratte-VEGF		goat IgG	R&D, Eschborn
anti-Ratte-VEGFR1		rabbit IgG	Biotrend, Köln
anti-Ratte-VEGFR2		rabbit IgG	Biotrend, Köln

2.1.8.2 Sekundärantikörper und Reagenzien

Tabelle 2.2: Darstellung der verwendeten Sekundärantikörper und Reagenzien

Spezifität	Konjugat	Spezies	Quelle / Referenz
anti-Hamster IgG	Biotin	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Hamster IgG	Cy2	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Hamster IgG	FITC	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Hamster IgG	HRP	Ziege	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
anti-Hamster IgM	FITC	Maus	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Kaninchen IgG	Biotin	Ziege	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
anti-Kaninchen IgG	FITC	Ziege	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
anti-Kaninchen IgG	HRP	Ziege	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
anti-Maus IgA	FITC	Kaninchen	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
anti-Maus IgG	Biotin	Kaninchen	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG	Cy2	Esel	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
anti-Maus IgG	FITC	Esel	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG	HRP	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG	Rhodamin	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG	FITC	Maus	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG	Rhodamin	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Ziege IgG	Biotin	Esel	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
anti-Ziege IgG	Cy2	Esel	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
anti-Ziege IgG	FITC	Esel	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
anti-Ziege IgG	HRP	Maus	Dianova, Hamburg
Phalloidin	FITC		Sigma, Steinheim

2.1.9 Expressionsvektoren und cDNAs

pcDNA3.1(+)/Hygro:	eukaryotischer Expressionsvektor mit dem Selektionsmarker Hygromycin, (Invitrogen, Karlsruhe)
pcDNA3.1(+)/Hygro-EGFP	EGFP wurde mit HindIII und NotI aus dem Vektor pEGFP-N1 in pcDNA3.1(+)/Hygro kloniert
pcDNA3.1(-)/Zeo:	eukaryotischer Expressionsvektor mit dem Selektionsmarker Zeocin (Invitrogen, Karlsruhe)
pcDNA3.1(-)/Zeo-EGFP	EGFP wurde mit NheI und NotI aus dem Vektor pEGFP-N1 in pcDNA3.1(-)/Zeo kloniert
pEGFP-N1:	eukaryotischer Expressionsvektor zur Generierung von N-terminalen EGFP-Fusionsproteinen, (Clontech, Mountain View, USA)
pGEX-4T-2:	prokaryotischer Expressionsvektor zur Generierung von Glutathion-S-Transferase(GST)–Fusionsproteinen (Amersham Bioscience, Freiburg)
pGEX-4T-2-CD151/EC2:	die große extrazelluläre Domäne (EC2) von CD151 der Ratte wurde bereits im Rahmen früherer Projekte mit EcoRI und NotI in pGEX-4T-2 kloniert (Karaduman, 2002)

2.1.10 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> DH5 α :	Genotyp: F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ ⁻ (Invitrogen, Karlsruhe)
<i>E.coli</i> BL21:	Genotyp: F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>lon</i> (Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.11 Zelllinien

2.1.11.1 Homo sapiens Pankreasadenokarzinomzelllinien

Tabelle 2.3: Darstellung der verwendeten Pankreasadenokarzinom-Zelllinien unter Angabe des Ursprungs und der Metastasierungseigenschaften

Zelllinie	Ursprung	Referenz	Metastasierung / Referenz
AsPC1	Aszites	Chen et al., 1982	stark metastasierend / Jimenez et al., 2000
BxPC3	Primärtumor	Tan et al., 1986	nicht metastasierend / Takamori et al., 1996
Capan1	Lebermetastase	Fogh et al., 1977	stark metastasierend, Jimenez et al., 2000
Capan2	Primärtumor	Fogh et al., 1977	metastasierend / Takamori et al., 1996
Colo357	Lymphknotenmetastase	Morgan et al., 1980	metastasierend / Tzanakakis et al., 2003
MiaPaca1	Primärtumor	Yunis et al., 1977	nicht metastasierend / Takamori et al., 1996
Panc1	Primärtumor	Lieber et al., 1975	schwach metastasierend / Sakurai et al., 1997
Panc89	Lymphknotenmetastase	Okabe et al., 1983	schwach metastasierend / Zöller M. n.v.
Pt45P1	Primärtumor	Moore et al., 2001	
818	Aszites	Lehnert et al., 2001	metastasierend / Zöller M. n.v.

2.1.11.2 Homo sapiens Kolorektalkarzinomzelllinien

Tabelle 2.4: Darstellung der verwendeten Kolorektalkarzinom-Zelllinien unter Angabe des Ursprungs und der Metastasierungseigenschaften

Zelllinie	Ursprung	Referenz	Metastasierung / Referenz
Colo320	Primärtumor	Quinn et al., 1979	nicht metastasierend / Schumacher et al., 1997
Colo320DM	Primärtumor	Quinn et al., 1979	nicht metastasierend / Schumacher et al., 1997
HT29	Primärtumor	von Kleist et al., 1975	metastasierend / de Vries et al., 1995
Lovo	Lymphknotenmetastase	Drewinko et al., 1976	metastasierend / Liu et al., 2003
SW480	Primärtumor	Leibovitz et al., 1976	nicht metastasierend / de Vries et al., 1995
SW707	Primärtumor	Leibovitz et al., 1976	
SW948	Primärtumor	Leibovitz et al., 1976	
WIDR	Primärtumor	Noguchi et al., 1979	schwach metastasierend / Shah et al., 1994

2.1.11.3 *Rattus norvegicus* (BDX) metastasierende Pankreasadenokarzinomzelllinien

BSp73AS (AS)	schwach metastasierend, Matzku et al., 1983
AS-EGFP	AS Zellen wurde mit pEGFP-N1 stabil transfiziert
BSp73AS-D6.1A (AS-D6.1A)	Claas et al., 1998
AS-D6.1A-EGFP	AS-D6.1A Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)/Hygro-EGFP stabil transfiziert
BSp73AS- β 4 (AS- β 4)	Herlevsen et al., 2003
AS- β 4-EGFP	AS- β 4 Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)/Hygro-EGFP stabil transfiziert
BSp73AS-db (AS-db)	Herlevsen et al., 2003
AS-db-EGFP	AS-db Zellen wurden mit pcDNA3.1(-)/Zeo-EGFP stabil transfiziert

2.1.11.4 *Rattus norvegicus* etablierte Zelllinien

Rattenaortaendothelzelllinie (RAEC)	isoliert aus dem Wistar Rattenstamm, Cell lining, Berlin
Fibroblasten	isoliert aus der Lunge von BDX Ratten mit NiSO ₄ (Weth, 2000)

2.1.12 Rattenstamm

BDX Ratten wurden in der Tierbarriere im Deutschen Krebsforschungszentrum unter pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und erhielten sterilisiertes Futter und Wasser ad libitum. Ratten im Alter von 6-10 Wochen wurden für die Versuche herangezogen.

2.1.13 Standard Puffer und Lösungen

PBS	137 mM NaCl; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
6 x Laemmli-Puffer:	350 mM Tris, pH 6,8; 10 % (w/v) SDS; 36 % (v/v) Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Plasmid-DNA-Präparationsmethoden

Plasmid-DNA-Minipräparation (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)

Resuspensionspuffer: 50 mM Glukose; 25 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA (autoklavieren)

Lysispuffer: 1 % (w/v) SDS; 0,2 M NaOH

Neutralisierungspuffer: 3 M Kaliumacetat; 11,5 % (v/v) Essigsäure

Eine Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB-Medium (s. Abschnitt 2.2.2.1) über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert und 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurde 1 min bei 18.000 g zentrifugiert. Nach Aufnahme des Bakterienpelletes in 100 µl Resuspensionspuffer wurden 150 µl Lysispuffer zugegeben und für 5 min bei RT unter mehrmaligem Invertieren inkubiert. Danach wurden 200 µl Neutralisierungspuffer zugegeben, die lysierten Bakterien 20 min bei 18.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt und für 30 min bei 18.000 g abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (10 min, 18.000 g) und nach 10 minütigem Trocknen bei RT in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

Plasmid-DNA-Midipräparation (Qiagen Plasmid Midi Kit)

P1-Puffer: 50 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

P2-Puffer: 200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS

P3-Puffer: 3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5

QBT-Puffer: 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % (v/v) Isopropanol;
0,15 % (v/v) Triton X-100

QC-Puffer: 1,0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % (v/v) Isopropanol

QF-Puffer: 1,25 M NaCl; 50 mM Tris, pH 8,5; 15 % (v/v) Isopropanol

Eine Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Mit 200 µl dieser Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Nach Zentrifugation der Bakterien-

suspension (15 min, 6.000 g, 4°C) wurde das Pellet in 4 ml P1-Puffer aufgenommen, mit 4 ml P2-Puffer für 5 min bei RT durch mehrmaliges Invertieren lysiert und nach Zugabe von 4 ml P3-Puffer für 15 min auf Eis neutralisiert. Nach anschließender Zentrifugation (30 min, 20.000 g, 4°C) wurde der klare Überstand über eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte QIAGEN-tip 100 Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 10 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Die Präzipitation der Plasmid-DNA aus dem Eluat erfolgte mittels Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 15.000 g und 4°C. Die Plasmid-DNA wurde einmal mit 2 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach 10 minütigem Trocknen bei RT wurde die Plasmid-DNA in 200 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer: 40 mM Tris; 0,1 % (v/v) Essigsäure; 1 mM EDTA, pH 8,0

6 x Ladepuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 30 % (v/v) Glycerin

Für analytische und präparative Zwecke wurden 0,1-1 µg DNA in 0,8 – 1,5 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer aufgeköcht, nach Abkühlung auf 60°C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelform mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach 30 min war die Agaroselösung zu einem Gel polymerisiert und wurde nach Entfernung des Kamms in die Gelkammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel leicht bedeckt war. Die Proben wurden mit 6 x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Pro Gel wurde in eine Tasche 3 µl DNA-Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 5 V/cm durchgeführt und die DNA mittels UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht.

2.2.1.3 Reinigung von DNA-Fragmenten

Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

QG-Lysispuffer: Qiagen, Zusammensetzung nicht angegeben

PE-Puffer: Qiagen, Zusammensetzung nicht angegeben

Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit. Nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese wurde die DNA mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und pro 100 mg Agarosegel 300 µl QG-Lysispuffer zugegeben und 10 min bei 50°C lysiert. Um die Ausbeute von DNA-Fragmenten <500 bp und >4 kb zu erhöhen wurde der Ansatz mit 100 µl

Isopropanol pro 100 mg Agarosegel versetzt, die DNA-Agaroselösung auf eine QIAquick Säule gegeben und 1 min bei 18.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde mit 0,5 ml QG-Lysis-puffer und anschließend mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen (1 min, 18.000 g). Nach einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt (1 min, 18.000 g) wurde die DNA mit 50 µl ddH₂O von der Säule eluiert.

Reinigung von DNA-Fragmenten über QIAquick Säulen

PB-Puffer: Qiagen, Zusammensetzung nicht angegeben

PE-Puffer: Qiagen, Zusammensetzung nicht angegeben

Nach erfolgtem restriktionsenzymatischen Verdau der DNA erfolgte eine Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit. Der Reaktionsansatz wurde mit 5 VT PB-Puffer vermischt, auf eine QIAquick Säule gegeben und 1 min bei 18.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen (1 min, 18.000 g) und nach einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt (1 min, 18.000 g) wurde die DNA mit 50 µl ddH₂O von der Säule eluiert.

2.2.1.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Einer OD von 1 entsprechen 50 µg/ml dsDNA, 40 µg/ml RNA oder 33 µg/ml ssDNA. Das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren der Proteine liegt bei 280 nm und durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt sich die Reinheit der Nukleinsäuren feststellen. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert von 1,8, eine reine RNA-Lösung von 2,0.

2.2.1.5 Enzymreaktionen

Restriktionsverdau

Die Spaltung von DNA durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen erfolgte bei 37°C für mindestens 1 h unter Verwendung der mitgelieferten Restriktionsenzym-puffer. Pro µg DNA wurden 3 Einheiten („Units“) Enzym eingesetzt. Nach erfolgtem Restriktionsverdau wurde die DNA über QIAquick Säulen aufgereinigt und einem zweiten Restriktionsverdau unterzogen. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels einer Agarosegelaufreinigung gewonnen und die gereinigte DNA in einer Ligationsreaktion eingesetzt.

Ligation

Insert-DNA und Vektor-DNA wurden in verschiedenen molaren Verhältnissen (1:1, 5:1 und 10:1) vermischt, mit 1 µl T4 DNA Ligase (5 U/µl), 2 µl T4 DNA Ligase Puffer (10 x) und ddH₂O in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt und bei 16°C über Nacht inkubiert. Durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C wurde die Reaktion beendet, und die Ligation wurde direkt für die Transformation elektrokompenter Bakterien eingesetzt.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Bakterienkulturmedien

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl
(autoklaviert)

Für die entsprechenden Agar-Nährböden wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Bactoagar zugesetzt. Die Agarlösung wurde nach dem Autoklavieren auf 60°C abgekühlt und je nach Resistenz der Bakterien 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin zugegeben. Die Nährböden wurden unter der Sterilbank in Petrischalen gegossen und nach dem Erkalten bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.2 Anzucht von Bakterienstämmen

Zur Anzucht wurde ein Aliquot der tiefgefrorenen Bakterienkultur mit einer Impföse entnommen und auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde eine einzelne Kolonie gepickt, 5 ml LB-Medium angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C über Nacht kultiviert.

2.2.2.3 Lagerung von Bakterienstämmen

Für eine längerfristige Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde eine Übernachtskultur angeimpft, 500 µl dieser Übernachtskultur mit 500 µl sterilem Glycerin (50 %) gemischt und bei -80°C eingefroren und gelagert. Häufig benötigte Bakterienstämme wurden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht inkubiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.4 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte indirekt durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}). Einer OD_{600} von 1 entsprechen etwa 8×10^8 Bakterien/ml Kulturmedium.

2.2.2.5 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

400 ml LB-Medium wurde mit 4 ml Übernachtskultur *E.coli* DH5 α angeimpft und bei 37°C in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD von 0,5 inkubiert. Danach wurde die Kulturlösung 30 min auf Eis abgekühlt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt und die Rotoren waren vorgekühlt. Die Bakterien wurden 15 min bei 4.000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 400 ml eiskaltem, sterilem ddH₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4.000 g, 4°C) und Aufnahme in 200 ml eiskaltem, sterilem ddH₂O wurden die Bakterien ein weiteres Mal zentrifugiert (15 min, 4.000 g, 4°C) und in 10 ml eiskaltem, sterilem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (15 min, 4.000 g, 4°C) wurde das Bakterienpellet in 2 ml eiskaltem, sterilem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in 50 μ l Aliquots bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.2.6 Transformation elektrokompetenter Bakterien (Elektroporation) (Dower et al., 1988)

SOC-Medium: 2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl;
2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glukose
(sterilfiltriert)

Die elektrokompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Da die DNA-Lösung salzfrei sein sollte, wurden 5 μ l Ligationsansatz 10 min auf einem Membranfilter Millipore „V“ in ddH₂O dialysiert. 50 μ l elektrokompetente Bakterien wurden mit 10 ng Plasmid-DNA oder 5 μ l dialysiertem Ligationsansatz versetzt und gemischt. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 2 mm) gegeben und ein elektrischer Impuls von 4,5-5,0 ms wurde appliziert (2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω). Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte durch Ausplattieren der Bakteriensuspension auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum und Inkubation über Nacht bei 37°C.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Generelle Proteinbiochemische Methoden

Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte mittels des Bio-Rad Protein Assays in 96-well-Platten. Die Kalibriergerade (5 – 50 µg/ml) wurde mit einer BSA-Stamm-lösung (1 mg/ml) in einem Volumen von 160 µl angesetzt. 10 µl aufgereinigter Antikörper oder 80 µl Exosomenpräparation wurde mit PBS auf 160 µl verdünnt. Die Proben und die Kalibriergerade wurden mit 40 µl Bio-Rad Reagenz versetzt, 5 min bei RT inkubiert und bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben mittels der Kalibriergeraden unter Berücksichtigung der Probenverdünnung bestimmt.

Dialyse von Proteinen

Zum Wechseln des Puffersystems von Proteinlösungen oder um Salze und andere Verunreinigungen zu entfernen, wurden die Proben dialysiert. Der Dialyseschlauch wurde 5 min in ddH₂O aufgeköcht, das ddH₂O durch frisches ddH₂O ersetzt und für weitere 5 min gekocht. Die Probe wurde in den Dialyseschlauch überführt und über Nacht in PBS oder in einem anderen Dialysepuffer bei 4°C unter ständigem Rühren dialysiert. Am darauf folgenden Tag wurde der Puffer durch frischen Dialysepuffer ersetzt und die Probe erneut über Nacht bei 4°C unter Rühren dialysiert.

Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren konzentriert. Hierzu wurden die Proben in den Zentrifugalkonzentratoren bei 3.000 g und 4°C bis zu einem Restvolumen von 0,5 ml zentrifugiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen (3.000 g, 4°C) und erneut bei 3000 g und 4°C auf ein Volumen von 0,5 ml abzentrifugiert.

Beschichten von Plastikoberflächen

Bicarbonatpuffer: 15 mM Na₂CO₃; 35 mM NaHCO₃; pH 9,6

Proteine haben die Eigenschaft, in alkalischem Milieu an Plastikoberflächen zu binden. Die Zellkulturplatten wurden mit 0,3 µg/ml Laminin 5 in Bicarbonatpuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen, und unspezifische Bindungsstellen des Plastiks wurden durch Inkubation mit 1 % (w/v) BSA in PBS 1 h bei

37°C abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS konnten die Platten für die Versuche eingesetzt werden.

2.2.3.2 Herstellung von Zellysaten

Lysispuffer: 25 mM HEPES; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 2 mM PMSF;
1 x Protease Inhibitor Mix; 1 % (v/v) Detergens

5 x 10⁷ Zellen wurden dreimal mit eiskaltem, detergensfreiem Lysispuffer gewaschen und in 5 ml Lysispuffer für 4 h bei 4°C unter Rotation lysiert. Danach wurden die unvollständig gelösten Zellbestandteile sowie die Zellkerne durch Zentrifugation (30 min, 20.000 g, 4°C) sedimentiert und das geklärte Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden entweder direkt in der Immunpräzipitation eingesetzt oder bis zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 Präparation von Exosomen (modifiziert nach Raposo et al., 1996)

1 x 10⁷ AS bzw. AS-D6.1A Zellen wurden pro 75 mm²-Zellkulturflasche ausgesät und über Nacht kultiviert. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel, das alte Medium wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 15 ml RPMI 1640 Medium supplementiert mit 10 % FCS (15 h, 100.000 g), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin wurde zugegeben. Zwei Tage später wurde das konditionierte Medium gesammelt und zweimal 10 min bei 500 g zentrifugiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 2.000 g und für 30 min bei 10.000 g. Die im Überstand vorhandenen Exosomen wurden durch einen Zentrifugationsschritt für 90 min bei 100.000 g präzipitiert. Anschließend wurde der Exosomen-Niederschlag mit PBS gewaschen und erneut für 90 min bei 100.000 g präzipitiert. Die Exosomen wurden 100fach konzentriert in PBS aufgenommen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Rotiphorese Gel 30: Acrylamidmix, bestehend aus 30 % (w/v) Acrylamid;
0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in ddH₂O

Trenngel (8-12 %): 8-12 % Acrylamidmix; 375 mM Tris, pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS;
0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat; 0,04 % (v/v) TEMED

Sammelgel (5 %): 5 % Acrylamidmix; 125 mM Tris, pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS;
0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat; 0,1 % (v/v) TEMED

Laufpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

Zur Herstellung der Gele wurden 5 ml Trenngel zwischen zwei Glasplatten in einer Gießvorrichtung gegossen, mit 1 ml Isopropanol überschichtet und zur Polymerisation 30 min bei RT stehengelassen. Nach Abgießen des Isopropanols wurde das polymerisierte Trenngel mit 2 ml Sammelgel überschichtet, der Kamm eingesetzt und zur Polymerisation für weitere 30 min bei RT stehengelassen. Das Gel wurde in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und pro Gel wurden 3 µl Größenmarker in eine Tasche pipettiert. Die Proben wurden mit 6 x Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95°C gekocht und je Taschengröße 25-50 µl Probe pro Tasche pipettiert. Eine Spannung von 80 V wurde angelegt, bis die Proben ins Trenngel gewandert waren, danach wurde die Elektrophorese bei 180 V durchgeführt.

2.2.3.5 Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen - Silberfärbung

Fixierungslösung: 30 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure

Sensitivierungslösung: 0,3 % (w/v) Kaliumtetrathionat; 0,5 M Kaliumacetat;
30 % (v/v) Ethanol

Entwicklerlösung: 3 % (w/v) Kaliumcarbonat; 50 µM Natriumthiosulfat;
0,01 % (v/v) Formalin

Stopplösung: 4 % (w/v) Tris; 2 % (v/v) Essigsäure

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel viermal 30 min in Fixierungslösung inkubiert, wodurch die Proteine im Gel fixiert wurden. Um die Empfindlichkeit der Silberfärbung zu erhöhen wurde das Gel 45 min in der Sensitivierungslösung inkubiert und sechsmal 10 min in ddH₂O gewaschen. Die Färbung erfolgte für 1-2 h in 0,5 % (w/v) Silbernitratlösung. Nach kurzem Waschen in ddH₂O, max. 15 s, wurde das Gel für 20-40 min in Entwicklerlösung inkubiert. Durch Einlegen des Gels für 45 min in Stopplösung wurde die Reaktion beendet.

2.2.3.6 Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen („Western Blot“) (modifiziert nach Towbin et al., 1979)

Transferpuffer: 50 mM Tris; 380 mM Glycin; 0,02 % (w/v) SDS;
20 % (v/v) Methanol

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel 10 min bei RT in Transferpuffer äquilibriert. Die Nitrozellulosemembran wurde 5 min in ddH₂O aktiviert und weitere 10 min in Transferpuffer eingelegt. Zwei Kunststoffasereinlagen sowie vier WhatmanTM 3MM-Filterpapiere wurden ebenfalls 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer der Proteine wurden zwei Lagen WhatmanTM 3MM-Filterpapier, das Gel, die Membran und wieder zwei Lagen Filterpapier zwischen die Kunststoffasereinlagen gelegt und es wurde so in die mit Transferpuffer gefüllte Transfervorrichtung eingespannt, dass die Nitrozellulosemembran zur Anode ausgerichtet war. Der Transfer der Proteine erfolgte über Nacht bei 4°C und einer Spannung von 30 V.

2.2.3.7 Zymogramm zur Bestimmung der MMP-Menge in konditioniertem Zellkulturüberstand

Lösung 1:	2,5 % (v/v) Triton X-100
Lösung 2:	2,5 % (v/v) Triton X-100; 50 mM Tris, pH 7,5
Lösung 3:	2,5 % (v/v) Triton X-100; 50 mM Tris, pH 7,5; 5 mM CaCl ₂ ; 1 µM ZnCl ₂
Entwicklungslösung:	50 mM Tris, pH 7,5; 5 mM CaCl ₂ ; 1 µM ZnCl ₂
Färbelösung:	0,5 % (w/v) Coomassie R-250; 30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

2,5 x 10⁵ Zellen wurden pro Vertiefung in eine 24-well-Platte ausgesät. Einen Tag später wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 2 h in serumfreiem Zellkulturmedium gehungert. Das Medium wurde abgenommen und durch 200 µl frisches serumfreies Zellkulturmedium ersetzt. Nach 36 h wurde das konditionierte Medium abgenommen und durch Zentrifugation (15 min, 18.000 g, 4°C) von Zellbestandteilen getrennt. Aliquots dieser Überstände wurden mit 6 x Laemmli-Puffer versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung in einem 10 % Acrylamidgel das 1 mg/ml Gelatine enthielt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 30 min in Lösung 1 inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation für jeweils 30 min in Lösung 2 und Lösung 3. Das Gel wurde mehrmals kurz in Entwicklungslösung gewaschen und 24 h bei 37°C in Entwicklungslösung inkubiert. Die Färbung des Gels erfolgte für 30 min in Färbelösung. Zur Entfärbung wurde das Gel bis zu einem Tag in Entfärbelösung gewaschen.

2.2.3.8 Produktion und Aufreinigung des GST-CD151/EC2-Fusionsproteins

Resuspensionspuffer: 1 x PBS; 10 % (v/v) Glycerin; 1 mM PMSF

Elutionspuffer: 10 mM reduziertes Glutathion; 50 mM Tris, pH 8,0

pGEX-4T-2-CD151/EC2 (s. Abschnitt 2.1.9) transformierte *E.coli* BL21 Bakterien wurden in 12 ml LB-Medium mit 2 % Glukose angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurde 1 Liter LB-Medium mit 2 % Glukose angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 kultiviert. Nach Induktion der Transkription durch Zugabe von 0,1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurde die Kultur für weitere 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 10 min bei 4.000 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 30 ml kaltem Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Bakterien wurden durch eine Ultraschallbehandlung (3 mal 30 s) auf Eis aufgeschlossen und nach Zugabe von 1 % (v/v) Triton X-100 für 30 min auf Eis inkubiert. Die aufgeschlossenen Bakterien wurden 20 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde einer Affinitätschromatographie unterzogen. Hierzu wurden 70 mg Glutathion-Agarose in 15 ml ddH₂O bei RT für 30 min quellen gelassen, zweimal mit PBS gewaschen (1 min, 3.000 g, 4°C) und zusammen mit dem Überstand 1 h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Dabei wurden die GST-Fusionsproteine spezifisch an die Glutathion-Agarose gebunden. Die Glutathion-Agarose wurde in eine Säule überführt, zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen und durch Zugabe von 6 mal 1 ml Elutionspuffer wurden die GST-Fusionsproteine mittels reduziertem Glutathion von der Glutathion-Agarose eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden auf den Proteingehalt getestet, Fraktionen, die das GST-Fusionsprotein enthielten, wurden vereinigt und in PBS dialysiert. Das GST-Fusionsprotein GST-CD151/EC2 konnte dann zur Generierung eines Kaninchenantikörperserums eingesetzt werden.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridom-Überstand

Lösung A: 100 mM Glycin, pH 2,7

Lösung B: 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,2

Die Überstände von Hybridomzellkulturen wurden nach dem Sammeln 15 min bei 3.000 g zentrifugiert, und nach Zugabe von 20 mM Tris, pH 8,0 und 0,1 % (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert. Zur Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers wurde 1 l Hybridomüberstand

20 min bei 20.000 g zentrifugiert und über einen Membranfilter (0,2 µm) filtriert. Mit dem filtrierten Überstand wurde über Nacht bei 4°C eine Protein G Säule beladen. Der Antikörper wurde mittels Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC) mit einer Flussrate von 1,5 ml/min von der Protein G Säule eluiert. In einem Fraktionensammler wurden je 150 µl 1 M Tris, pH 8,2 in 15 Sammelröhrchen vorgelegt. Die Protein G Säule wurde 20 min mit Lösung B gewaschen, danach erfolgte der Elutionsschritt für 30 min mit 70 % Lösung A und 30 % Lösung B. Pro Fraktion wurden 80 Tropfen gesammelt. Anschließend wurde die Konzentration von Lösung A kontinuierlich auf 100 % erhöht, um sämtliche gebundene Proteine von der Protein G Säule zu eluieren. Nach einem 15 minütigen Waschschrift der Säule mit 100 % Lösung B konnte die Protein G Säule erneut beladen werden. Die Fraktionen, die den Antikörper enthielten, wurden vereinigt, in Zentrifugalkonzentratoren konzentriert, mit PBS gewaschen und anschließend in 0,5 ml PBS aufgenommen (s. Abschnitt 2.2.3.1). Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (s. Abschnitt 2.2.3.1) und die Einsetzkonzentration wurde anhand der FACS-Analyse (s. Abschnitt 2.2.4.5) ermittelt.

2.2.4.2 Immunisierungsprotokoll und Aufreinigung eines Kaninchen anti-Ratte-CD151 polyklonalen Antikörpers

Gewinnung des polyklonalen Kaninchenserums

Vor der ersten Immunisierung wurde dem Kaninchen zur Gewinnung des Präimmunerums 5 ml Blut abgenommen. Die Immunisierung wurde in 4 Wochen Zeitintervallen durchgeführt, und dem Kaninchen wurde bei der Immunisierung subkutan 400 µg GST-CD151/EC2 Fusionsprotein injiziert. Das Fusionsprotein wurde vor der Injektion im Verhältnis 1:1 mit Freund's Adjuvans vermischt. Jeweils 10-14 Tage nach der Immunisierung wurde dem Kaninchen 15 ml Blut aus der Ohrvene entnommen, wobei die erste Blutentnahme zur Gewinnung des polyklonalen Antikörpers nach der 3. Immunisierung erfolgte. Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend 10 min bei 3.000 g, 20 min bei 15.000 g und 20 min bei 20.000 g jeweils bei 4°C zentrifugiert.

Herstellung einer GST-CD151/EC2 Säule

Kopplungspuffer: 0,2 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl; pH 8,3
Blockierungspuffer: 0,2 M Glycin, pH 8,0
Waschpuffer: 0,1 M Natriumacetat, pH 4; 0,5 M NaCl

10 mg GST-CD151/EC2 Fusionsprotein wurden über Nacht in Kopplungspuffer dialysiert. Zur Aktivierung wurden 0,5 g Sepharose 4B (CNBr-aktiviert) mit 100 ml kalter 1 mM HCl gewaschen und über Nacht bei 4°C zusammen mit dem Fusionsprotein unter Rotation inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min, 18.000 g, 4°C) wurde der Überstand verworfen und 2 ml Blockierungspuffer zugegeben, um noch freie Bindungsstellen auf der Sepharose durch Kopplung von Glycin zu inaktivieren. Nach Inkubation über Nacht unter Rotation bei 4°C wurde die GST-CD151/EC2-gekoppelte Sepharose fünfmal mit Kopplungspuffer und fünfmal mit Waschpuffer gewaschen (3 min, 18.000 g, 4°C) und zur Herstellung einer Säule verwendet.

Aufreinigung des polyklonalen Antikörpers

Das Kaninchenserum wurde 1:10 mit 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,2 verdünnt, über einen Membranfilter (0,2 µm) filtriert, und mit dem filtrierten Serum wurde über Nacht bei 4°C eine GST Säule beladen, um polyklonale Antikörper gegen GST zu entfernen. Anschließend wurde das Serum über Nacht bei 4°C auf eine GST-CD151/EC2 Säule geladen. Die Elution des polyklonalen Antikörpers von der Säule erfolgte wie bereits in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben.

2.2.4.3 Markierung von Antikörpern

FITC

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Primärantikörper mit dem FluoReporter Oregon Green 488 Protein Labeling Kit markiert. 0,2 mg Primärantikörper wurde mit PBS auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und mit 20 µl 1 M Natriumhydrogencarbonat pH 8,3 versetzt. 500 µg Fluoreszenzfarbstoff wurden in 50 µl DMSO aufgenommen und 5,3 µl dieser Farbstofflösung wurden zu der Antikörperlösung pipettiert. Danach wurde der Ansatz geschützt vor Lichteinstrahlung 1 h bei RT gerührt und über Nacht in PBS mit 0,1 % (w/v) Natriumazid dialysiert.

2.2.4.4 Immunpräzipitation

Um Proteine im Zelllysate zu entfernen, die unspezifisch an die Protein G Sepharose binden, wurden die Zelllysate mit 1/20 VT Protein G Sepharose versetzt und für 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (3 min, 3.000 g, 4°C) wurden die

Zellysate für die Immunpräzipitation eingesetzt. 1 ml der jeweiligen Zellysate wurde mit Primärantikörper (1 µg/ml) versetzt und 2 h bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Zur Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden 1/20 VT Protein G Sepharose zugegeben und weitere 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die an die Protein G Sepharose gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe viermal mit dem jeweiligen eiskalten Lysispuffer ohne Proteinaseinhibitoren gewaschen, hierzu wurden die Proben 1 min bei 18.000 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Lysispuffer resuspendiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe zweimal mit je 45 µl 100 mM Glycin pH 2,7 von der Protein G Sepharose eluiert. Die Proben wurden mit 10 µl 1 M Tris pH 8,0 und 20 µl 6 x Laemmlipuffer versetzt, 5 min bei 95°C gekocht und einer SDS-PAGE unterzogen. Die präzipitierten Proteinmengen wurden im Verhältnis zur Proteinmenge im Zellysate densitometrisch mit der Software NIH Image 1.60 ausgewertet.

2.2.4.5 FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorter)

Die FACS-Analyse dient dem Nachweis der Oberflächenexpression von Proteinen. Nach dem Trypsinisieren wurden die Zellen 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 x 10⁵ Zellen pro Vertiefung in eine 96-well-Rundbodenplatte pipettiert und zweimal mit 150 µl PBS gewaschen. Für ein intrazelluläres FACS wurden die Zellen mit 1 % (v/v) Formalin in PBS 20 min bei 4°C fixiert, zweimal mit 150 µl PBS gewaschen und anschließend mit 1 % (v/v) Tween 20 in PBS permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit 150 µl PBS wurden die Zellen in 50 µl Primärantikörper (1-10 µg/ml) in PBS resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 150 µl PBS wurden die Zellen in 50 µl Fluorochrommarkiertem Sekundärantikörper entsprechend der Verdünnungsangaben des Herstellers in PBS aufgenommen. Die Zellen wurden 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und anschließend dreimal mit 150 µl PBS gewaschen. Die Proben wurden an einem FACSCalibur gemessen und mittels der CellQuest Software ausgewertet.

2.2.4.6 Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

PBST 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS

ECL-Substratlösung: kurz vor Gebrauch 1 VT Lösung 1 mit 1 VT Lösung 2 mischen (ECL Western Blotting Detection Reagent)

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h in 5 % fettfreiem Milchpulver (w/v) in PBST auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in PBST wurde die Membran mit 2-5 µg/ml Primärantikörper in PBST 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min in PBST gewaschen und mit einem HRP-markiertem Sekundärantikörper in PBST 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde dreimal 5 min in PBST gewaschen und 1 min mit 1 ml ECL-Substratlösung inkubiert. Danach wurde die Membran in einer Fotokassette einem Hyperfilm exponiert und dieser wurde mit Hilfe der Entwicklermaschine entwickelt. Die Proteinmarkerbanden wurden auf den Film übertragen, um eine Größenordnung der Signale zu ermöglichen.

2.2.4.7 Immunfluoreszenzfärbung

PBG: 0,2 % (w/v) Gelatine (Cold Water Fish Skin); 0,5 % (w/v) BSA
in PBS

Elvanol: 20 % (w/v) Mowiol in 2 Teilen PBS, pH 8,0 und 1 Teil Glycerin

Runde, sterile Glasplättchen von 14 mm Durchmesser wurden mit Laminin 5 beschichtet (s. Abschnitt 2.2.3.1) und in die Vertiefungen einer 24-well-Platte gelegt. 3×10^4 Zellen wurden pro Vertiefung auf die Glasplättchen ausgesät und 2 Tage im Brutschrank kultiviert. Für die Stimulation mit PMA wurde das Medium abgenommen, durch frisches Zellkulturmedium ohne FCS mit 10^{-8} mol/l PMA ersetzt und für weitere 1 h oder 2 h kultiviert. Die auf den Glasplättchen adhären Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 20 min bei 4°C mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert. Die Zellen wurden 4 min mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS bei 4°C permeabilisiert, dreimal mit PBS gewaschen und 30 min bei 4°C mit PBG inkubiert. Die Glasplättchen wurden mit je 15 µl Primärantikörper (10 µg/ml) in PBG 1 h bei 4°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen für 5 min mit PBG wurden die Zellen 1 h bei 4°C mit je 15 µl Rhodamin-markiertem Sekundärantikörper (5 µg/ml) in PGB inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sechsmal für 5 min mit PBG gewaschen, mit 20 µl mIgG oder rIgG (10 µg/ml) in PBG 1 h bei 4°C geblockt und 1 h bei 4°C mit je 15 µl FITC-markiertem Primärantikörper (10 µg/ml) in der Gegenwart von mIgG oder rIgG (10 µg/ml) in PBG inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS wurden die Zellen einmal kurz mit ddH₂O gewaschen und zum Trocknen ausgelegt. Danach wurden die Glasplättchen auf einen mit einem Tropfen Elvanol versehenen Objektträger zellseitig gelegt und über Nacht bei 4°C getrocknet. Die mikroskopische Analyse erfolgte an

einem Leica Mikroskop DMRBE mit einer SPOT CCD Kamera und der Software SPOT 2.1.2.

2.2.4.8 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten

Beschichtungslösung: 5,0 g Gelatine wurden in 1 Liter ddH₂O dreimal aufgekocht und 0,5 g Kaliumchromalaun wurden zugegeben.

Vectastain-Lösung: 2 Tropfen Reagenz A (Avidin) und 2 Tropfen Reagenz B (biotinylierte Peroxidase) werden in 10 ml PBS verdünnt (Vectastatin ABC Kit).

AEC-Lösung 1: 2,1 ml 0,1 M Essigsäure wurden mit 7,9 ml 0,1 M Natriumacetat gemischt.

AEC-Lösung 2: 4,0 mg AEC wurden in 500 µl Dimethylformamid gelöst.

Die Objektträger wurden 5-10 min in Beschichtungslösung eingetaucht, 12 h bei 37°C getrocknet und bei 4°C aufbewahrt. Nach der Präparation der Rattenorgane wurden diese auf Korkplättchen mit Einbettmedium Neg-50 überschichtet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Schneiden bei -80°C aufbewahrt. Von den Gefrierpräparaten wurden bei -20°C 5-7 µm dicke Serienschnitte angefertigt, auf Gelatine-beschichtete Objektträger überführt und bei RT getrocknet. Zum Fixieren wurden die Schnitte 4 min in eine Chloroform/Aceton-Lösung (1:1) getaucht und über Nacht bei RT getrocknet. Die fixierten Schnitte wurden mit einem Fettstift (Dako-Pen) umrandet und zum Blocken mit je 100 µl 1 % (w/v) BSA in PBS 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach 5 minütigem Waschen in PBS wurden die Schnitte getrocknet und mit je 100 µl Primärantikörper in 1 % (v/v) FCS in PBS 1 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal in PBS gewaschen, getrocknet und mit je 100 µl Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper in PBS 30 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte getrocknet und mit je 100 µl Vectastain-Lösung 30 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen und getrocknet. AEC-Lösung 1 und 2 wurden vermischt und mit 5 µl 30 % H₂O₂ versetzt. Je 100 µl der AEC-Lösung wurden pro Schnitt aufgetragen und 5-20 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte getrocknet, mit Mayers Hämalaunlösung 30 s gegengefärbt und unter fließendem Wasser gespült. Die Schnitte wurden getrocknet, mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt und an einem Leica Mikroskop DMRBE mit der SPOT CCD Kamera und der Software SPOT 2.1.2 ausgewertet.

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Generelle Arbeitsroutinen

Alle Arbeiten an den Zellkulturflaschen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien wurden steril geliefert oder im Fall von Glasartikeln vor Gebrauch hitzesterilisiert (8 h bei 280°C). Verwendete Kunststoffartikel wie Reaktionsgefäße oder Pipettenspitzen wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Alle verwendeten Nährmedien und Lösungen waren steril oder wurden vor Gebrauch sterilfiltriert.

Zellkulturmedium: RPMI 1640 supplementiert mit
10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (30 min bei 56°C)
2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

Das Zellkulturmedium für die humanen Pankreasadenokarzinomzelllinien enthielt zusätzlich 10 mmol/l Natriumpyruvate. Die transfizierten Tumorzelllinien AS-EGFP, AS-D6.1A und AS-β4 wurden in Zellkulturmedium supplementiert mit 0,5 mg/ml G418 kultiviert, die AS-D6.1A-EGFP, AS-β4-EGFP und AS-db Tumorzellen erhielten zusätzlich 100 µg/ml Hygromycin und die AS-db-EGFP Tumorzellen 100 µg/ml Hygromycin und 50 µg/ml Zeocin.

Kultivierung: Die Tumorzelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage mit zuvor auf 37°C erwärmtem Zellkulturmedium.

Passagieren: Adhärente Zellen wurden vor Erreichen völliger Konfluenz mit PBS gewaschen und mit 0,25 % (w/v) Trypsin/4 mM EDTA in PBS von den Zellkulturflaschen abgelöst. Nach Zentrifugation (5 min, 600 g, 4°C) wurde das Pellet in Zellkulturmedium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Waschen: Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 600 g, 4°C) und Resuspension des Zellpelletes gewaschen.

Kryokonservierung: Zellen wurden mittels Trypsin von den Zellkulturflaschen abgelöst und zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in eiskaltem 10 %igem DMSO (v/v) in FCS resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Die längerfristige Lagerung erfolgte in der Gasphase flüssigen Stickstoffs.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in ein 37°C Wasserbad gestellt. Die Zellen wurden mit 1 ml Zellkulturmedium gemischt und in 10 ml Zellkulturmedium überführt. Nach Zentrifugation der Zellen (5 min, 600 g, 4°C) wurde das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt.

Zellzahlbestimmung: 50 µl Zellsuspension wurde mit Trypanblaulösung [0,16 % (w/v) Trypanblau, 0,85 % (w/v) NaCl] verdünnt. Das Auszählen der ungefärbten, lebenden Zellen erfolgte in einer Neubauer Zählkammer. Die Zellzahl berechnet sich aus dem Mittelwert der ausgezählten Zellen von vier Großquadraten [MW], dem Volumen von 0,1 µl pro Großquadrat und dem entsprechenden Verdünnungsfaktor [f].

$$\text{Zellzahl [Zellen/ml]} = \text{MW} \times 10^4 \times f$$

2.2.5.2 Transfektion und Selektion eukaryotischer Zellen

8×10^5 Zellen wurden pro Vertiefung in eine 6-well-Platte ausgesät und über Nacht bis etwa 60 % Konfluenz kultiviert. Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen in PBS gewaschen und 1,5 ml Zellkulturmedium zugegeben. 1,5 µg Plasmid-DNA wurde in 100 µl serumfreiem RPMI 1640 Medium aufgenommen, mit 10 µl PolyFect Transfektionsreagenz versetzt und 10 min bei RT inkubiert, um die Bildung von DNA-PolyFect Komplexen zu gewährleisten. Anschließend wurden diese Komplexe in 600 µl Zellkulturmedium aufgenommen und auf die Zellen gegeben. Nach 24 h Inkubationszeit wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht. Nach Selektion wurden die Zellen auf die Proteinexpression der transfizierten cDNA getestet und bei ausreichend hoher Proteinexpression wurden diese Zellen rekloniert.

2.2.5.3 Reklonierung transfizierter Zellen

Transfizierte Zellen wurden in 24-well-Platten in Konzentrationen von einer Zelle/Vertiefung, drei Zellen/Vertiefung und zehn Zellen/Vertiefung zusammen mit 1×10^6 Rattenthymozyten pro Vertiefung ausgesät. Vertiefungen, in denen ein einzelner Zellklon heranwuchs, wurden markiert. Diese Klone wurden auf die Proteinexpression der transfizierten cDNA getestet.

Klone mit ausreichend hoher Proteinexpression wurden ein zweites Mal rekloniert, um das Kultivieren von Einzelklonen sicher zu stellen.

2.2.5.4 Matrigelassay

Matrigel wurde über Nacht bei 4°C aufgetaut und 1:2 mit eiskaltem Zellkulturmedium verdünnt. In jede Vertiefung einer 24-well-Platte wurden 100 µl der verdünnten Matrigellösung vorgelegt und zum Polymerisieren des Matrigels wurde die Platte für 2 h in einen 37°C Brutschrank gestellt. 1×10^5 Zellen wurden pro Vertiefung in 500 µl Zellkulturmedium zugegeben und für die angegebene Zeit bei 37°C inkubiert. Zum Blockieren mit Primärantikörpern wurden diese in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die Dokumentation erfolgte an einem Leica Inversmikroskop DM-IL mit dem Kamerasystem Wild MPS48.

2.2.5.5 Adhäsionsassay

1×10^6 Zellen wurden 16 h mit ^3H -Thymidin-haltigem Zellkulturmedium (10 µ Ci/ml) kultiviert. Für die Stimulation mit PMA wurde das Medium abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ohne FCS, das 10^{-8} mol/l PMA enthielt, ersetzt und weitere 2 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und 5×10^4 Zellen wurden pro Vertiefung in eine mit BSA oder Laminin-5 beschichtete 96-well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit bzw. ohne Antikörper für 2 h bei 37°C kultiviert. Die Inhibition mit Antikörpern wurde mit anti- $\alpha 3$ oder anti- $\beta 4$ in einer Konzentration von 10 µg/ml durchgeführt. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen, um die nicht adhären Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden mittels 0,25 % (w/v) Trypsin/ 4 mM EDTA in PBS von den Zellkulturplatten abgelöst. Mit Hilfe eines Harvesters wurden die Zellen geerntet, auf eine Filtermatte überführt und diese wurde 2 h bei 50°C getrocknet. Die Filtermatte wurde mit 10 ml Szintillationslösung Optifluor getränkt und die Radioaktivität wurde an einem β -Counter gemessen. Pro Ansatz wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.5.6 Proliferationsassay

Kristallviolettlösung: 1 % (w/v) Kristallviolett, 10 % (v/v) Ethanol

Pro Zeitpunkt wurde eine 24-well-Platte mit 1×10^5 Zellen pro Vertiefung angesetzt. Nach 12 h Inkubationszeit wurde der Zeitpunkt 0 bestimmt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS

gewaschen und 10 min mit 300 μ l 3 % (v/v) Formalin inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min mit 300 μ l Kristallviolettlösung. Die überschüssige Kristallviolettlösung wurde mit ddH₂O gewaschen und die Platten bei RT getrocknet. Durch Zugabe von 300 μ l 10 % (v/v) Essigsäure wurde das Kristallviolett aus den Zellen herausgelöst und in einer 96-well-Platte bei 595 nm gemessen. Die angegebenen Antikörper wurden den Zellen in einer Konzentration von 10 μ g/ml am Zeitpunkt 0 zugegeben. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde die Kristallviolettfärbung mit den angesetzten 24-well-Platten durchgeführt. Pro Ansatz wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.5.7 Migrationsassays

Migrationsassay

In die Mitte von Laminin 5 beschichteten 35 mm Petrischalen (s. Abschnitt 2.2.3.1) wurde jeweils ein rundes, steriles Glasplättchen mit einem Durchmesser von 6 mm gelegt. Pro Petrischale wurden 1 x 10⁶ Zellen ausgesät. Vor Erreichen vollständiger Konfluenz wurde das Deckglas entfernt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und frisches Zellkulturmedium mit 1 % (v/v) FCS zugegeben. In den Ansätzen zur Stimulation der PKC mit PMA wurde PMA in einer Konzentration von 10⁻⁸ mol/l eingesetzt. Nach Kultivierung der Zellen für 24 h wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die in die ursprünglich durch das Deckglas geschützte Fläche eingewandert sind. Es wurden 10 Felder mit einer Fläche von 1 mm² ausgezählt.

In vitro Wundheilung

1 x 10⁶ Zellen wurden in 35 mm Petrischalen ausgesät und bis kurz vor Erreichen vollständiger Konfluenz kultiviert. Mit einer Pipettenspitze wurde ein Strich in den Zellrasen gekratzt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und frisches Zellkulturmedium mit 1 % (v/v) FCS zugegeben. In den Ansätzen zur Stimulation der PKC mit PMA wurde PMA in einer Konzentration von 10⁻⁸ mol/l eingesetzt. Nach Inkubation der Zellen für 48 h wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 10 min mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 30 s mit Mayers Hämalaunlösung gefärbt und mit Leitungswasser gespült. Die Auswertung erfolgte an einem Leica Inversmikroskop DM-IL mit dem Kamerasystem Wild MPS48.

2.2.6 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.6.1 *In vivo* Intravitalmikroskopie

5×10^6 EGFP-transfizierte Tumorzellen wurden intraperitoneal (i.p.) in BDX Ratten injiziert. Sowohl am Tag der Tumorzellapplikation als auch drei Tage später erhielten die Ratten 200 μg Antikörper oder mIgG zur Kontrolle i.p. pro Tier. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Ratten getötet und die Mesenterien für die immunhistologische Untersuchung präpariert und eingefroren oder die Ratten wurden für die Intravitalmikroskopie mit Rompum und Ketavet narkotisiert. Der Bauchraum wurde mit einem kleinen Schnitt geöffnet und die Ratte wurde auf einer speziellen Platte, die konstant auf 37°C gehalten wurde, fixiert. Die Mesenterien wurden in 50 ml Ringer's Lösung bei 37°C fixiert und mikroskopisch untersucht. Mit einer Videokamera wurden Filmaufnahmen auf einem Videorecorder festgehalten und anschließend mit der Software CapImage 7.3 ausgewertet. Pro Ratte wurden 20 Felder analysiert, es wurde die Tumorfläche und die Fläche der Kapillaren bestimmt. Die Gefäßdichte berechnete sich aus der Fläche der Kapillaren pro Tumorfläche.

2.2.6.2 *In vitro* Angiogeneseassay

Von 6 Wochen alten BDX Ratten wurde das Peritonealnetz steril präpariert, in 1 cm^2 große Stücke geteilt und in die Vertiefungen von 6-well-Platten gelegt. 5×10^5 Tumorzellen, 2 ml Überstand konfluenter Tumorzellkulturen vor und nach der Präparation der Exosomen (s. Abschnitt 2.2.3.3) 1:1 verdünnt mit Zellkulturmedium oder 2,5 μg AS-D6.1A Exosome und AS Exosome mit vergleichbarer Menge an CD9, CD81 und CD151 wurden mit dem Peritonealnetz 72 h kultiviert. Die angegebenen Antikörper wurden in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. Die Neubildung der Kapillaren wurde mikroskopisch an einem Leica Mikroskop DMRBE mit der SPOT CCD Kamera und der Software SPOT 2.1.2 ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Kolo-kalisation von Integrinen und Tetraspaninen auf die Motilität humaner Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien

Tetraspanine sind Transmembranmoleküle, die, wie der Name bereits besagt, viermal die Membran durchspannen. Sie interagieren untereinander sowie mit weiteren Transmembranmolekülen, insbesondere Integrinen (Yauch und Hemler, 2000; Zhang et al., 2001). In diesen multimolekularen Komplexen verknüpfen sie Proteine anderer Superfamilien mit spezifischen Signaltransduktionsmolekülen und bilden dabei auf den Oberflächen von Zellen ausgedehnte Netzwerke aus („Tetraspanin Web“) (Boucheix und Rubinstein, 2001). Über diese Interaktionen beeinflussen sie die Funktion der assoziierten Moleküle. Die häufigsten assoziierten Integrinpartner sind $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$. Eine Interaktion mit dem Integrin $\alpha 6\beta 4$, das ein Bestandteil der Hemidesmosome darstellt, war lange Zeit nur für CD151 bekannt (Sterk et al., 2000). Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe hatten jedoch im Metastasenmodell in der Ratte aufgezeigt, dass auch das Tetraspanin D6.1A mit $\alpha 6\beta 4$ interagieren kann und diese Interaktion mit einer gesteigerten Motilität der Tumorzellen und, *in vivo*, mit einer Metastasenbildung in der Leber einhergeht. Da dieser Befund für die frühe Metastasierung von Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomen wichtig sein konnte, habe ich begonnen, die Expression von Integrinen und Tetraspaninen auf humanen Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien zu untersuchen.

3.1.1 Expression von Integrinen und Tetraspaninen

Die Expression der Integrine $\alpha 1$ bis $\alpha 6$, αL , $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 4$ und die Expression der Tetraspanine CD9, CD53, CD63, CD81, CD82, CD151 und CO-029 wurde auf zehn humanen Pankreasadenokarzinomzelllinien AsPC1, BxPC3, Capan1, Capan2, Colo357, MiaPaca1, Panc1, Panc89, Pt45P1 und 818 und auf acht humanen Kolorektalkarzinomzelllinien Colo320, Colo320DM, HT29, Lowo, SW480, SW707, SW948 und WIDR mittels

Durchflußzytometrie bestimmt. Das Ergebnis der Durchflußzytometrie ist in Tabelle 3.1 angegeben.

Tabelle 3.1: Integrin und Tetraspanin Expressionsprofil auf humanen Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien. Die Expression der Integrine und Tetraspanine wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. In der Tabelle ist das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität der Antikörperfärbung gegenüber der Kontrollfärbung dargestellt: -- keine Färbung (1,0 – 1,3); ± schwache Färbung (> 1,3 – 2,0); + Färbung (> 2,0 – 5,0); ++ starke Färbung (> 5,0 – 10,0); +++ sehr starke Färbung (> 10,0).

		$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	αL	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 4$	CD 9	CD 53	CD 63	CD 81	CD 82	CD 151	CO-029
Pankreasadenokarzinomzelllinien	AsPC1	--	+++	+++	±	+	+++	--	++	--	+++	++	--	++	+	++	+	+++
	BxPC3	+	+++	+++	±	+	+++	--	++	--	+++	+	--	+	+	++	±	±
	Capan1	±	++	++	--	±	+++	--	++	--	+++	+	--	+	+++	+	+	++
	Capan2	+	+++	+++	--	+	+++	--	++	--	+++	++	--	++	+	+	++	+
	Colo357	+	++	++	--	--	+++	--	++	--	+++	++	--	+	+	+	+	±
	MiaPaca1	--	++	+	--	+	+++	--	+	--	+++	++	--	++	++	+	++	--
	Panc1	±	++	++	--	++	+++	--	++	--	++	++	--	++	+++	+++	++	--
	Panc89	+	+++	+++	--	++	+++	--	+++	--	+++	+++	--	++	+++	++	±	±
	Pt45P1	+	++	++	--	++	++	--	++	--	--	+	--	++	+++	++	++	--
	818	±	++	+	--	--	+++	--	+	--	++	++	--	+	+++	+	++	++
Kolorektalkarzinom-	Colo320	+	+++	+	±	+	++	--	+	--	++	--	--	++	++	+	+	+
	Colo320DM	+	+++	+	--	±	++	--	+	--	+++	--	--	+	++	+	±	±
	HT29	+	+++	++	--	--	+++	--	+	--	+++	++	--	++	++	++	+	++
	Lovo	±	+++	+	--	+	++	--	+	--	+++	+++	--	+++	+	+	++	+++
	SW480	±	++	++	--	+	+++	--	+	--	++	++	--	+	++	+++	+++	--
	SW707	+	++	+	--	+	+++	--	+	--	+++	++	--	+	++	++	++	++
	SW948	--	+	+	--	+	+++	--	+	--	+++	++	--	+	+	+	+	+
	WIDR	±	++	+	--	--	+++	--	+	--	+++	+	--	+	+	++	++	++

Alle Tumorzelllinien exprimierten die Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ und $\beta 1$. 18 der 19 Tumorzelllinien exprimierten die Integrinkette $\beta 4$, wobei die Expression von $\beta 4$ stärker war als die Expression von $\beta 1$. Eine schwache Expression der Integrinketten $\alpha 1$ und $\alpha 4$ wurde nur bei wenigen Tumorzelllinien gemessen. Die Tumorzelllinien exprimierten kein αL , $\beta 2$ oder CD53. Die Tetraspanine CD63, CD81 und CD82 wurden von allen Tumorzelllinien exprimiert. Alle Tumorzelllinien exprimierten das Tetraspanin CD151, wobei es auf 70 % der Pankreasadenokarzinomzelllinien und auf 89 % der Kolorektalkarzinomzelllinien stark exprimiert wurde. Bis auf zwei Zelllinien exprimierten die Tumorzelllinien das Tetraspanin CD9. 79 % der Kolorektalkarzinomzelllinien und 40 % der Pankreasadenokarzinomzelllinien exprimierten das Tetraspanin CO-029.

3.1.2 Kolokalisation von Integrinen und Tetraspaninen

Da die Mehrzahl der Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien sowohl die Tetraspanine CD9, CD63, CD81, CD82, CD151 und CO-029 als auch die Integrinketten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ exprimierten, stellte sich die Frage, welche Integrine mit welchen Tetraspaninen interagieren. Diese Frage wurde mit Hilfe der Kolokalisation von Integrinen mit Tetraspaninen durch Immunfluoreszenzfärbung der Tumorzelllinien und anschließender mikroskopischer Untersuchung beantwortet. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Als Beispiel ist die Kolokalisation von Integrinen mit Tetraspaninen auf der humanen Pankreasadenokarzinomzelllinie 818 in Abbildung 3.1 wiedergegeben.

Tabelle 3.2: Kolokalisation von Integrinen mit Tetraspaninen auf humanen Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien. Die Kolokalisation wurde mittels Fluoreszenzfärbung der Tumorzellen mit den entsprechenden Antikörpern und anschließender mikroskopischer Untersuchung bestimmt. In der Tabelle ist die Stärke der Kolokalisation dargestellt: -- keine Kolokalisation; \pm schwache Kolokalisation; + Kolokalisation; ++ starke Kolokalisation; na nicht anwendbar; nt nicht getestet.

		$\alpha 3$ mit			$\beta 1$ mit			$\alpha 6$ mit				$\beta 4$ mit				
		CD 9	CD 81	CD 151	CD 9	CD 81	CD 151	CD 9	CD 81	CD 151	CO-029	CD 9	CD 81	CD 151	CO-029	
Pankreasadenokarzinomzelllinien	AsPC1	+	+	nt	+	+	nt	+	--	+	++	--	--	+	+	
	BxPC3	+	++	nt	++	++	nt	+	--	+	\pm	++	--	+	\pm	
	Capan1	+	++	nt	+	++	nt	--	--	\pm	\pm	--	--	\pm	\pm	
	Capan2	++	+	nt	+	+	nt	+	++	\pm	--	++	+	\pm	\pm	
	Colo357	+	\pm	nt	++	\pm	nt	--	--	\pm	\pm	--	--	\pm	\pm	
	MiaPaca1	\pm	+	++	\pm	+	++	\pm	\pm	\pm	na	+	\pm	\pm	na	
	Panc1	\pm	++	++	\pm	++	+	\pm	+	+	na	\pm	--	+	na	
	Panc89	+	++	nt	+	+	nt	\pm	\pm	+	\pm	\pm	\pm	\pm	+	+
	Pt45P1	+	+	++	+	+	++	\pm	--	\pm	na	na	na	na	na	na
	818	+	+	++	+	++	+	\pm	+	+	+	--	--	+	+	
Kolorektalkarzinom-	Colo320	na	+	nt	na	+	nt	na	+	--	\pm	na	--	--	\pm	
	Colo320DM	na	+	nt	na	+	nt	na	+	--	\pm	na	\pm	--	\pm	
	HT29	+	+	nt	+	+	nt	\pm	\pm	++	++	\pm	\pm	++	++	
	Lovo	\pm	+	+	\pm	+	+	\pm	--	+	\pm	\pm	--	\pm	\pm	
	SW480	+	\pm	++	+	+	+	\pm	\pm	+	na	--	--	+	na	
	SW707	\pm	\pm	+	\pm	\pm	+	+	\pm	+	+	+	\pm	++	\pm	
	SW948	\pm	\pm	nt	\pm	\pm	nt	+	\pm	\pm	\pm	--	--	\pm	+	
	WIDR	\pm	+	nt	+	+	nt	\pm	\pm	+	+	--	--	+	+	

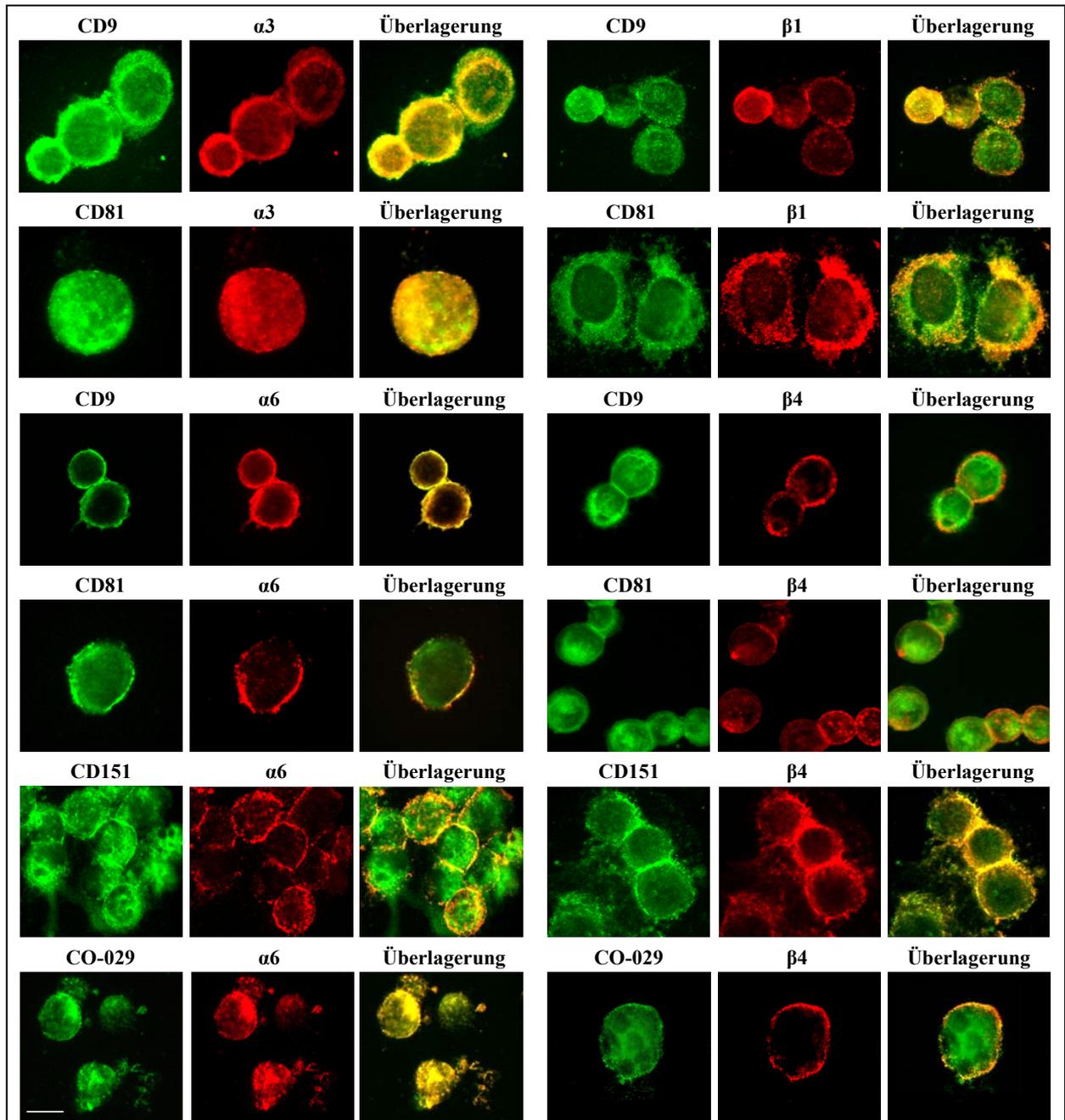


Abbildung 3.1: Kolokalisation von Integrinen und Tetraspaninen auf der humanen Pankreasadenokarzinomzelllinie 818. 818 Tumorzellen wurden auf Glasplättchen in 24-well-Platten ausgesät und 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit dem Primärantikörper (15 min, 37°C) und mit dem Rhodamin-markierten Sekundärantikörper (30 min, 37°C) inkubiert. Die Glasplättchen wurden gewaschen, geblockt und mit dem zweiten FITC-markierten Primärantikörper (1 h, 4°C) inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen wurden die Zellen in Elvanol eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Einzelfärbungen und die Überlagerung der Einzelfärbungen sind dargestellt, eine Kolokalisation wird durch eine Gelbfärbung bei Überlagerung der beiden Einzelfärbungen angezeigt. Maßstab: 50 µm.

$\alpha 3$ und $\beta 1$ kolokalisierte mit dem Tetraspanin CD9 in 10 bzw. 11 von 16 Tumorzelllinien. In 14 bzw. 15 von 18 Tumorzelllinien kolokalisierten diese Integrinketten mit CD81. Kolokalisation von $\alpha 3$ und $\beta 1$ mit dem Tetraspanin CD151 trat in allen 7 getesteten Tumorzelllinien ein. Die $\alpha 6$ Integrinkette kolokalisierte mit CD9 in nur 8 von 18 Tumorzelllinien und mit

CD81 in nur 7 von 18 Tumorzelllinien. Die Kolokalisation von $\beta 4$ mit CD9 (4 von 18) und CD81 (1 von 18) wurde sehr selten dokumentiert, was darauf hindeutet, dass die Tetraspanine CD9 und CD81 häufiger mit dem $\alpha 3\beta 1$ Integrin als mit dem $\alpha 6\beta 1$ Integrin interagierten. Die Kolokalisation von $\alpha 6$ mit CD151 (10 von 18) und CO-029 (5 von 14) fiel mit der Kolokalisation von $\beta 4$ mit CD151 (9 von 18) und CO-029 (5 von 14) zusammen. $\alpha 3\beta 1$ kolokalisierte häufig mit den Tetraspaninen CD9, CD81 und CD151. Im Gegensatz dazu kolokalisierte $\alpha 6\beta 4$ mit den Tetraspaninen CD151 und CO-029.

3.1.3 Koimmunpräzipitation von Tetraspaninen mit Integrinen

Um die Ergebnisse der Kolokalisation von Tetraspaninen und Integrinen zu bestätigen und um nachzuweisen, dass eine tatsächliche Interaktion zwischen den Integrinen und Tetraspaninen besteht, wurden die Zellen lysiert und einer Immunpräzipitation (IP) mit anti- $\alpha 3$ und anti- $\beta 4$ unterzogen. Die Immunpräzipitation mit anti-TfR diente als Negativkontrolle, da die Zellen den Transferrinrezeptor (TfR) exprimieren und dieser unter den verwendeten Lysisbedingungen nicht mit den Tetraspaninen interagiert. Im Anschluss an die Immunpräzipitation wurden die Proteine in einer Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden diese mit anti-CD9, anti-CD151 und anti-CO-029 auf koimmunpräzipitierte Tetraspanine untersucht. Vier der zehn Pankreaskarzinomzelllinien wurden zur Untersuchung der Koimmunpräzipitation von Tetraspaninen mit Integrinen herangezogen; die zwei stark metastasierenden Zelllinien AsPC1 und Capan1, die metastasierende Zelllinie 818 und zum Vergleich die nicht-metastasierende Zelllinie MiaPaca1. Aus den Kolorektalkarzinomzelllinien wurde WIDR und SW707 ausgewählt.

Unter der Lysisbedingung mit 1 % Brij96 koimmunpräzipitierte das Tetraspanin CD151 sowohl mit der $\alpha 3$ als auch mit der $\beta 4$ Integrinkette. CO-029 wurde in den Immunpräzipitaten von $\alpha 3$ aber nicht von $\beta 4$ detektiert und CD9 koimmunpräzipitierte weder mit $\alpha 3$ noch mit $\beta 4$ unter diesen Bedingungen. Unter milderer Lysisbedingungen mit 1 % Brij58 koimmunpräzipitierte die $\alpha 3$ Integrinkette CD9 und CO-029 in allen Tumorzelllinien außer in der humanen Kolorektalkarzinomzelllinie SW707. Ebenfalls enthielten alle $\beta 4$ Präzipitate mit der Ausnahme der Tumorzelllinie SW707 das Tetraspanin CO-029 aber kein CD9. In Teil A der Abbildung 3.2 ist die Koimmunpräzipitation unter der Lysisbedingung mit 1 % Brij96 für die Pankreasadenokarzinomzelllinie 818 dargestellt, Teil B zeigt die Koimmunpräzipitation nach Lysis mit 1 % Brij58 für die Pankreasadenokarzinomzelllinien 818 und Capan1 und für die

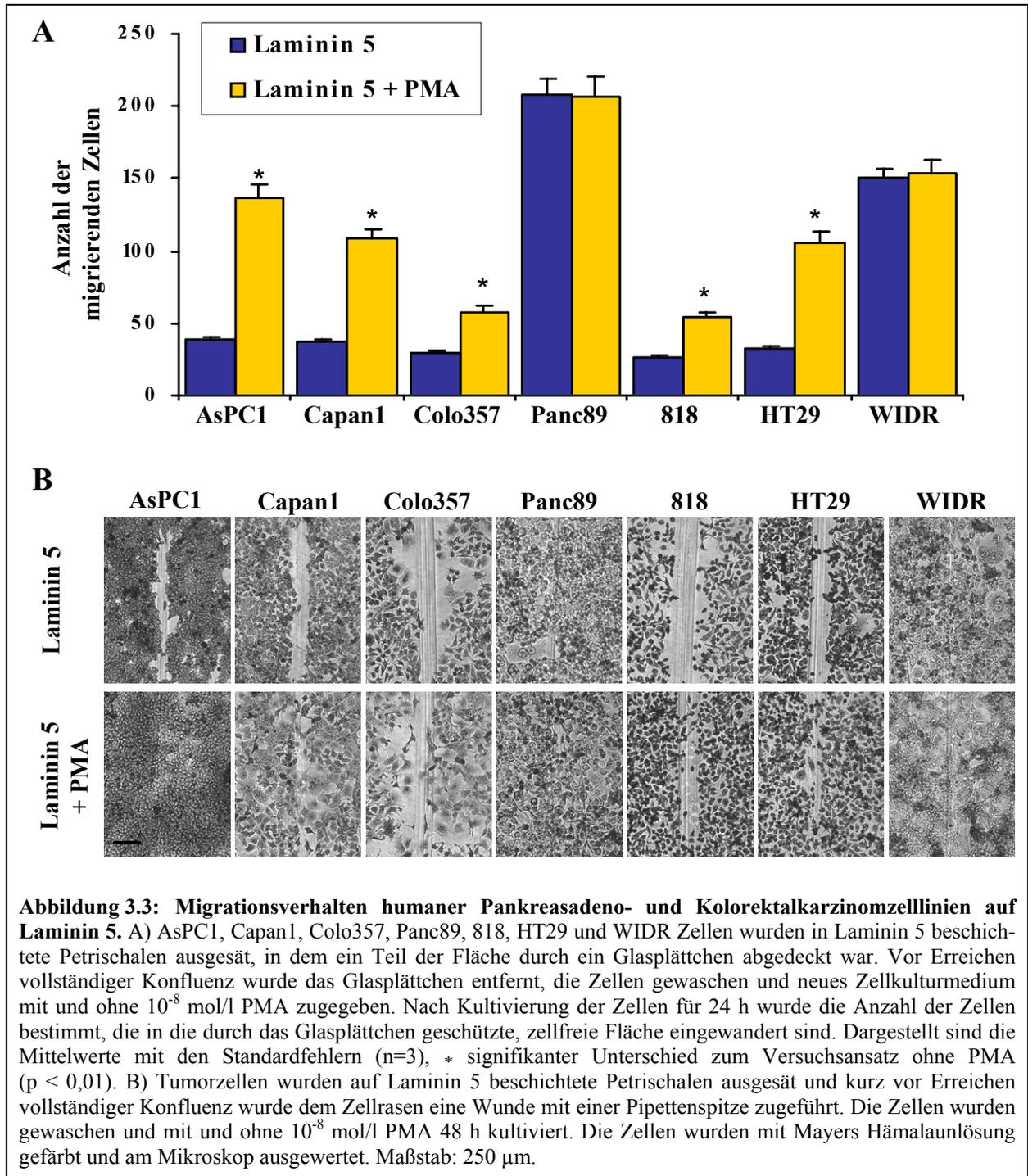
Tabelle 3.3: Koimmunpräzipitation von CD9, CD151 und CO-029 mit $\alpha 3$ und $\beta 4$ in humanen Pankreas- adeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien. Die Koimmunpräzipitation wurde nach dem Lysieren der Zellen mit 1 % Brij58 (Western Blot, CD9 und CO-029) oder 1 % Brij96 (Western Blot, CD151) durchgeführt. In der Tabelle ist die densitometrische Auswertung der präzipitierten Proteinmenge im Verhältnis zur Proteinmenge im Zellysats dargestellt: -- < 0,1; \pm > 0,1 – 0,2; + > 0,2 – 0,4; ++ > 0,4 – 0,6; +++ > 0,6; na nicht anwendbar.

	IP	$\alpha 3$	$\beta 4$	$\alpha 3$	$\beta 4$	$\alpha 3$	$\beta 4$
	WB	CD9		CO-029		CD151	
Pankreasadeno- karzinomzelllinie	AsPC1	+	--	+	+	++	+
	Capan1	++	--	++	\pm	++	++
	MiaPaca1	++	--	na	na	++	++
	818	+++	--	++	++	+++	++
Kolo- rektal-	SW707	\pm	+	\pm	--	++	+
	WIDR	++	--	++	+	+++	++

3.1.4 Einfluss der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) auf die Migration und Adhäsion der Tumorzellen an Laminin 5

Eine hohe Proteinexpression von $\alpha 3\beta 1$ (Hood et al., 2002; Mercurio et al., 2001) und CD9 (Hashida et al., 2003; Ono et al., 1999) korreliert mit einer „guten Prognose“, d.h. mit einer geringen Bildung von Metastasen. Im Gegensatz dazu ist auf stark metastasierenden Tumoren die Expression von $\alpha 6\beta 4$, CD151 und CO-029 häufig erhöht (Katayama et al., 2003; Kanetaka et al., 2001) und metastasierende Tumorzellen zeigen oft eine erhöhte Migration. Demnach könnte die Assoziation von $\alpha 6\beta 4$ mit CD151 und CO-029 einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Tumorzellen haben. Beide Integrine, $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$, besitzen die Fähigkeit Laminin 5 zu binden (Belkin et al., 2000). Aus diesem Grund wurde das Migrationsverhalten der Tumorzelllinien auf Laminin 5 untersucht. Des Weiteren wurden die Tumorzellen mit dem Phorbolster Phorbolmyristataacetat (PMA) stimuliert, der über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zu einer Internalisierung von Tetraspanin-Integrin-Komplexen und so zu einer erhöhten Migration der Tumorzellen führen kann (Zhang et al., 2001). Von den Pankreasadenokarzinomzelllinien wurden die zwei stark metastasierenden Zelllinien AsPC1 und Capan1, die metastasierenden Zelllinien Colo357 und 818 und die schwach metastasierende Zelllinie Panc89 untersucht. Aus den Kolorektalkarzinomzelllinien wurde die metastasierende Zelllinie HT29 und die schwach metastasierende Zelllinie WIDR

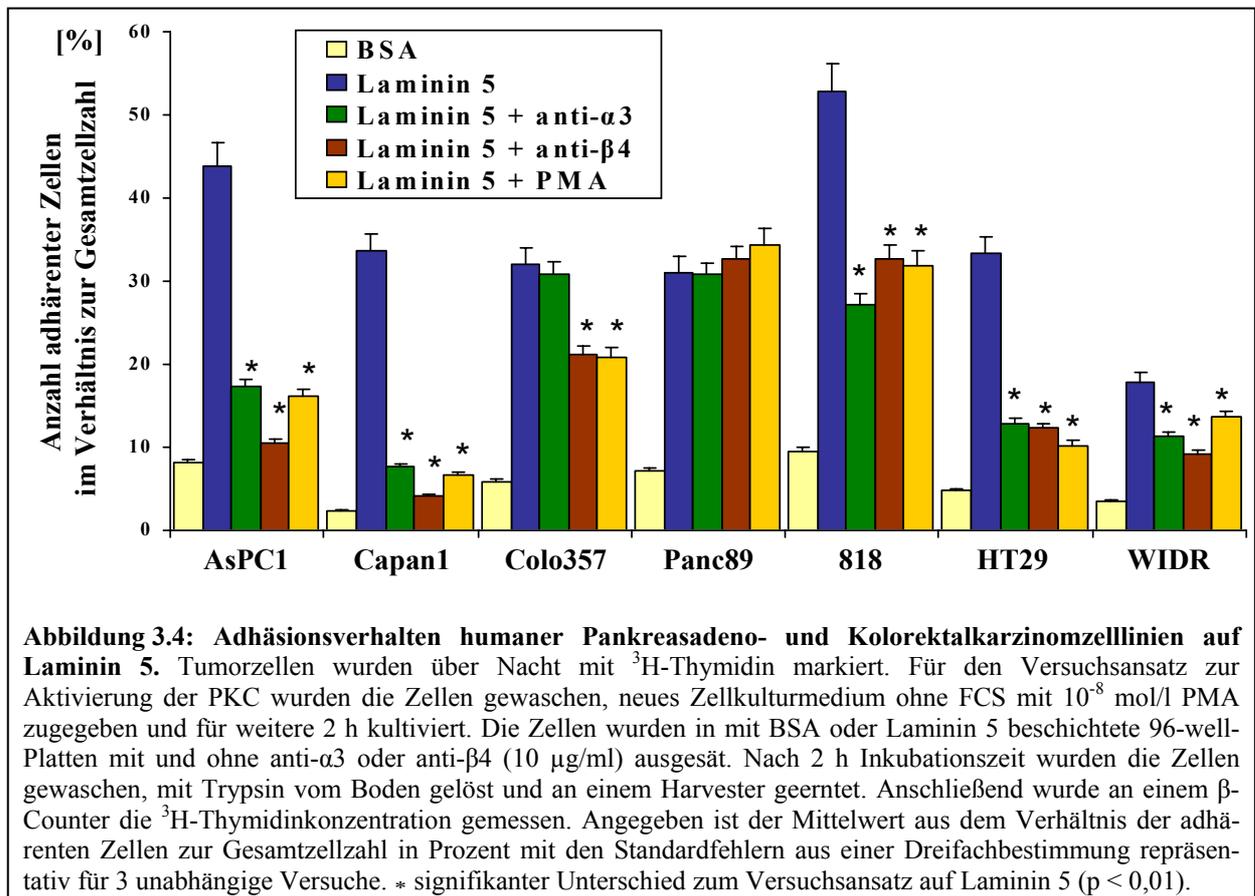
ausgewählt. Vor Erreichen eines konfluenten Zellrasens auf Laminin 5 beschichteten Petrischalen, in dem sich ein Glasplättchen befand, wurde das Glasplättchen entfernt und nach 24 h die Anzahl der Zellen bestimmt, die in die zellfreie Fläche eingewandert sind. Das Ergebnis ist in Teil A der Abbildung 3.3 dargestellt.



Weiterhin wurde einem Zellrasen vor Erreichen vollständiger Konfluenz auf Laminin 5 beschichteten Petrischalen mit einer Pipettenspitze eine Verletzung in der Art eines Stichs

zugeführt, und das Migrationsverhalten der Tumorzellen in die „Wunde“ wurde nach 48 h dokumentiert (s. Teil B der Abbildung 3.3). Beide Versuchsansätze wurden mit und ohne PMA Stimulation (10^{-8} mol/l) durchgeführt.

Während die Tumorzelllinien Panc89 und WIDR auf Laminin 5 unabhängig von der PMA-Stimulation aus dem semikonfluenten Zellrasen in die zellfreie Fläche migrierten, konnte die Migration von AsPC1, Capan1, Colo357, 818 und HT29 Zellen durch den Phorbolester PMA stimuliert werden. Dieses Ergebnis wurde durch den zweiten Versuchsansatz bestätigt, bei dem nach 48 h die Migration der Zellen in eine durch eine Pipettenspitze verursachte Wunde dokumentiert wurde. Das Schließen der Wunde wurde bei AsPC1, Capan1, Colo357, 818 und HT29 Tumorzellen durch Aktivierung der PKC beschleunigt. Bei Panc89 und WIDR war die Wundschließung auch ohne Zugabe von PMA außergewöhnlich schnell.



Um auszuschließen, dass eine verringerte Migration auf Laminin 5 auf Unterschiede in dem Adhäsionsverhalten der Tumorzelllinien an Laminin 5 zurückzuführen ist, wurde zusätzlich die Adhäsion der Tumorzellen auf BSA und Laminin 5 untersucht. Durch Zugabe der inhibierenden Antikörper anti- α 3 oder anti- β 4 wurde der Einfluss der Integrine α 3 β 1 und α 6 β 4 an der Adhäsion an Laminin 5 dokumentiert. Des Weiteren wurde durch Zugabe von 10^{-8} mol/l

PMA der Einfluss der Aktivierung der PKC auf das Adhäsionsverhalten der Tumorzelllinien untersucht.

Alle Tumorzelllinien adhärten stärker an Laminin 5 als an BSA. Mit Ausnahme von Colo357 und Panc89 wurde die Bindung an Laminin 5 durch anti- α 3 und anti- β 4 blockiert. Bei Panc89 hatte sowohl anti- α 3 als auch anti- β 4 keinen Einfluss auf die Lamininbindung und bei Colo357 wurde die Adhäsion an Laminin 5 durch anti- β 4 gehemmt, aber nicht durch anti- α 3. Die Aktivierung der PKC führte zu einer geringeren Adhäsion an Laminin 5 bei den Tumorzelllinien, bei denen die Adhäsion auch durch den Antikörper anti- β 4 blockiert werden konnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

Die Aktivierung der PKC korrelierte bei den Tumorzelllinien, bei denen auch die Motilität durch PMA gesteigert wurde, mit einer geringeren Adhäsion an Laminin 5. Die Zelllinien, bei denen PMA keinen Einfluß auf die Adhäsion an Laminin 5 hatte, migrierten sowohl mit als auch ohne PMA schnell.

3.1.5 Kolokalisation und Koimmunpräzipitation von Integrinen und Tetraspaninen nach Aktivierung der Proteinkinase C (PKC)

Die Adhäsion von Tumorzellen an Laminin 5 wird über die Integrine α 3 β 1 und α 6 β 4 vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der PKC durch PMA mit einer verringerten Adhäsion der Tumorzellen an Laminin 5 korreliert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der inhibierende Antikörper anti- β 4 bei denselben Tumorzelllinien den gleichen Effekt hervorrufen konnte. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass PMA zu einer Neuverteilung und oder zu einer veränderten Kolokalisation von Integrinen und Tetraspaninen führen kann. Da auf stark invasiven Tumorzellen neben dem Integrin α 6 β 4 auch die Tetraspanine CD151 und CO-029 hoch exprimiert sind, wurde als nächstes untersucht, ob PMA die Kolokalisation von α 6 β 4 mit CD151 und/oder von α 6 β 4 mit CO-029 beeinflussen und letztendlich ausschlaggebend für die erhöhte Motilität der Tumorzellen sein könnte. Zur Untersuchung der Kolokalisation nach Aktivierung der PKC wurden dieselben humanen Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien herangezogen, die bereits zur Untersuchung des Einflusses der PKC Aktivierung auf die Motilität der Tumorzellen verwendet wurden. Die Tumorzellen wurden auf Laminin 5 beschichtete Glasplättchen ausgesät. Die Aktivierung der PKC erfolgte für 1 - 2 h mit 10^{-8} mol/l PMA. Nach erfolgter Immunfluoreszenzfärbung wurde die Kolokalisation der Integrine und Tetraspanine mikroskopisch ausgewertet.

Tabelle 3.4: Kolokalisation von $\alpha 3$ /CD9, $\beta 4$ /CD151 und $\beta 4$ /CO-029 nach PKC Aktivierung durch PMA Stimulation. Die Tumorzellen wurden 2 h ohne FCS mit 10^{-8} mol/l PMA inkubiert. Kolokalisation wurde nach Färbung der Zellen mit den entsprechenden Antikörpern am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Grad der Kolokalisation: \pm schwache Kolokalisation; + deutliche Kolokalisation; ++ starke Kolokalisation. Verteilung der Kolokalisation: s größtenteils Kolokalisation an der Zelloberfläche; i größtenteils intrazelluläre Kolokalisation; s + i Kolokalisation gleichmäßig an der Zelloberfläche und intrazellulär verteilt.

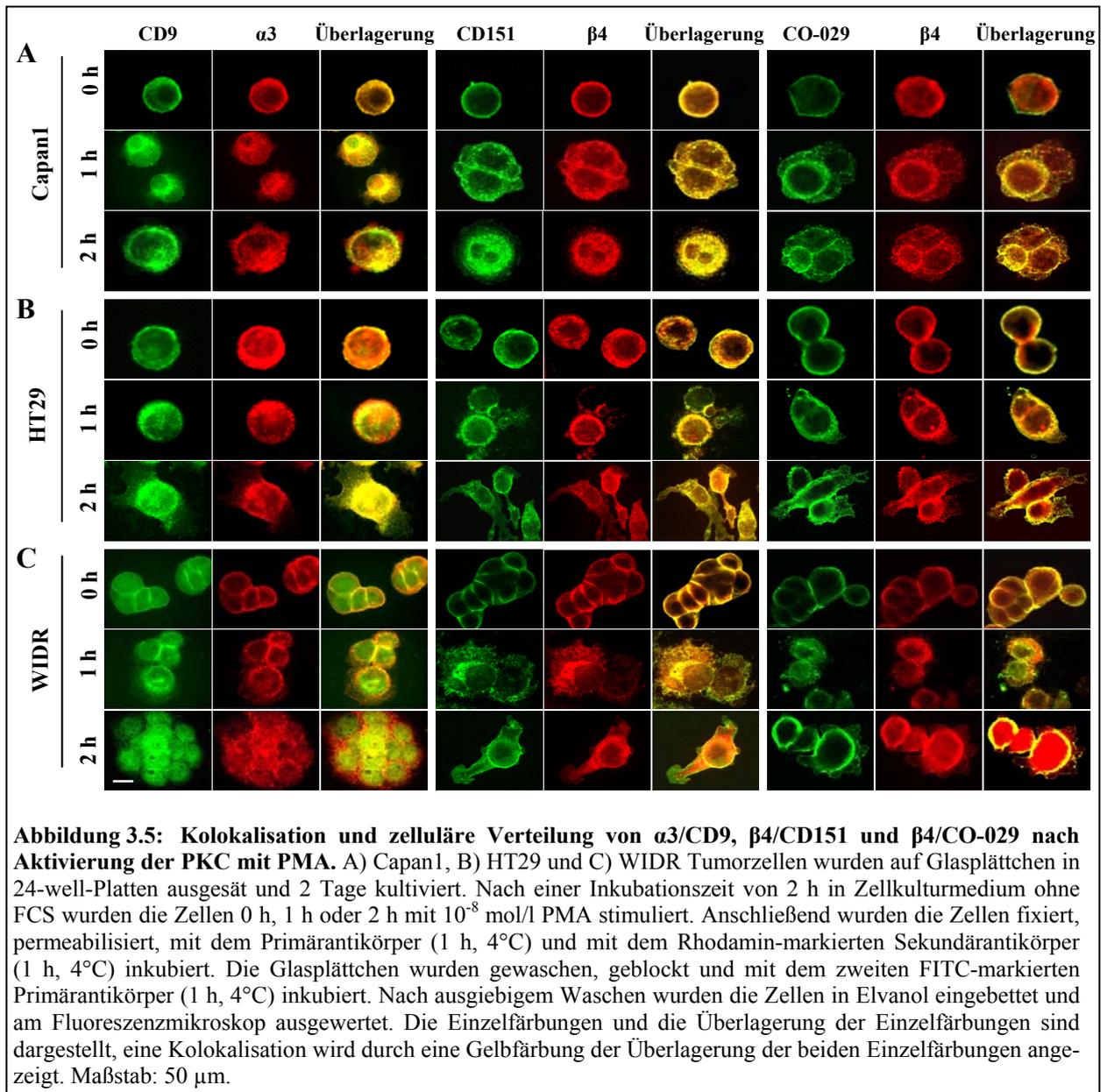
	PMA	$\alpha 3$ / CD9		$\beta 4$ / CD151		$\beta 4$ / CO-029	
		-	+	-	+	-	+
Pankreasadeno- karzinomzelllinien	AsPC1	+ (s)	+ (i)	+ (s)	+ (s)	+ (s)	+ (s)
	Capan1	+ (s)	+ (i)	\pm (s)	+ (i)	\pm (s)	+ (i)
	Colo357	+ (s)	+ (i)	\pm (s)	+ (s + i)	\pm (s)	+ (s + i)
	Panc89	+ (s)	+ (i)	+ (s)	+ (s)	+ (s)	+ (s)
	818	+ (s)	+ (s + i)	+ (s)	++ (i)	+ (s)	++ (s + i)
Kolo- rektal-	HT29	+ (s)	+ (s + i)	++ (s)	++ (s)	+ (s)	++ (s + i)
	WIDR	+ (s)	+ (s + i)	+ (s)	++ (s)	+ (s)	++ (s)

Tabelle 3.5: Koimmunpräzipitation nach Aktivierung der PKC. Zellen wurden mit 1 % Brij58 (Western Blot: CD9 und CO-029) oder Brij96 (Western Blot: CD151) lysiert und die Zelllysate wurden einer Koimmunpräzipitation unterzogen. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der präzipitierten Proteinmenge im Verhältnis zur Proteinmenge im Zelllysat von drei unabhängigen Versuchen. -- keine Kolokalisation; nt nicht getestet

Zelllinien	IP PMA WB	$\alpha 3$			$\beta 4$		
		--	+	Ratio (+/-)	--	+	Ratio (+/-)
Capan1	CD9	0,53	0,46	0,87	--	--	
MiaPaca1	CD9	0,46	0,24	0,52	--	--	
818	CD9	0,76	0,47	0,62	--	--	
WIDR	CD9	0,52	0,36	0,69	--	--	
Capan1	CO-029	0,55	0,50	0,92	0,14	0,38	2,71
818	CO-029	0,58	0,29	0,50	0,41	0,56	1,38
WIDR	CO-029	0,57	0,36	0,63	0,31	0,42	1,35
Capan1	CD151	nt	nt		0,65	0,90	1,38
818	CD151	0,63	0,42	0,67	0,48	0,65	1,35

In fast allen Tumorzelllinien kolokalisierte $\alpha 6\beta 4$ im größeren Ausmaß mit CD151 und CO-029 nach erfolgter Aktivierung der PKC durch PMA. Die Ergebnisse der Kolokalisation sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die densitometrische Auswertung der Koimmunpräzipitationen vor und nach Aktivierung der PKC bestätigte das Ergebnis. Nach Aktivierung der PKC präzipitierte anti- $\beta 4$ eine größere Menge an CD151 und CO-029, jedoch war eine geringere Menge an CD9, CD151 und CO-029 in $\alpha 3$ Präzipitaten zu finden. Die Ergebnisse der Ko-

immunpräzipitation sind in Tabelle 3.5 wiedergegeben.



Nach 1 h PMA Stimulation waren die $\alpha 6\beta 4$ -CD151 und die $\alpha 6\beta 4$ -CO-029 Komplexe internalisiert und in der perinuklearen Region angereichert. 2 h PMA Stimulation führten in den einzelnen Tumorzelllinien zu einer unterschiedlichen Verteilung der $\alpha 6\beta 4$ -CD151 und der $\alpha 6\beta 4$ -CO-029 Komplexe. Die Kolokalisation von $\alpha 3/CD9$, $\beta 4/CD151$ und $\beta 4/CO-029$ in den Tumorzelllinien Capan1, HT29 und WIDR nach Stimulation mit PMA ist in Abbildung 3.5 dargestellt. In Capan1 Zellen, dessen Motilität durch die Stimulation mit PMA stark anstieg, waren die $\alpha 6\beta 4$ -CD151 und die $\alpha 6\beta 4$ -CO-029 Komplexe diffuse verteilt und nicht an der Zelloberfläche angereichert. In WIDR Zellen, die unabhängig von der PMA Stimulation migrierten, waren diese Komplexe ausschließlich auf der Plasmamembran lokalisiert. Nach

PMA Stimulation wurde keine Übereinstimmung zwischen gesteigerter Motilität, gesteigerter Kolokalisation und Internalisierung von $\alpha3/CD9$ dokumentiert. Ohne Aktivierung der PKC kolokalisierten $\alpha3$ und CD9 vorwiegend an den Zell-Zell-Kontakt-Stellen, wo $\beta4/CD151$ und $\beta4/CO-029$ nur geringfügig kolokalisierten. $\alpha3/CD9$ kolokalisierte nach PMA Stimulation überwiegend im Cytoplasma.

Die Aktivierung der PKC führte zu einer verstärkten Assoziation von $\alpha6\beta4$ mit den Tetraspaninen CD151 und CO-029. Die $\alpha6\beta4$ -CD151 und $\alpha6\beta4$ -CO-029 Komplexe waren im Cytosol bevorzugt in der perinuklearen Region angereichert. Die Kolokalisation von $\alpha3\beta1$ mit CD9 war deutlich an den Zell-Zell-Kontakten ausgeprägt. Nach PKC Aktivierung lösten sich die Zell-Zell-Kontakte auf und $\alpha3\beta1$ -CD9 Komplexe verteilten sich diffuse im Cytosol. Im Gegensatz zu $\alpha6\beta4$ -CD151 und $\alpha6\beta4$ -CO-029 Komplexe assoziierte nach PKC Aktivierung weniger $\alpha3\beta1$ mit dem Tetraspanin CD9. Nur die Assoziation von $\alpha6\beta4$ mit CD151 oder CO-029 wurde durch die Aktivierung der PKC mit PMA verstärkt und diese verstärkte Kolokalisation korrelierte mit einer erhöhten Zellmotilität.

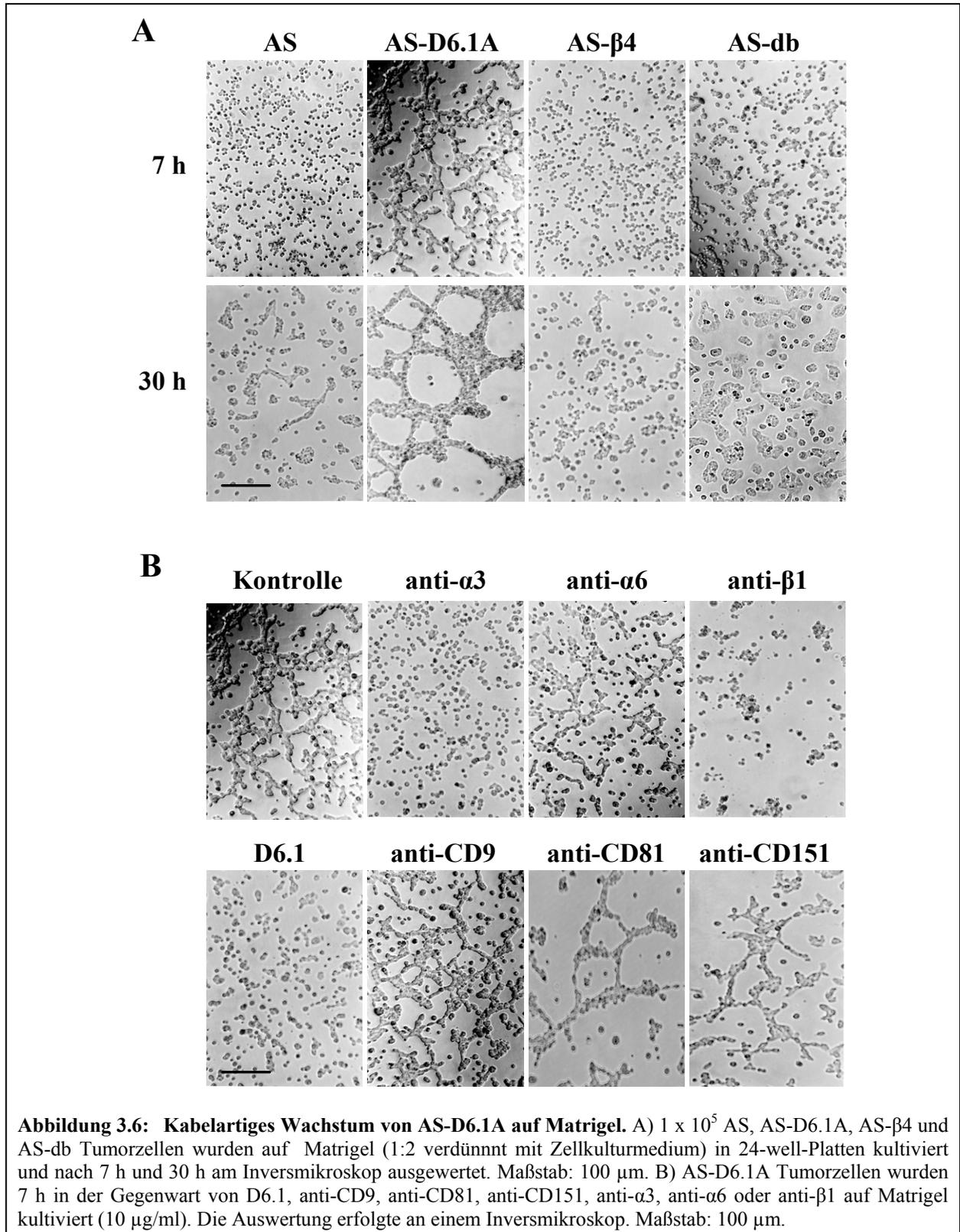
3.2 Einfluss des Tetraspanins D6.1A und des Integrins $\alpha 6\beta 4$ auf die Neoangiogenese von Pankreasadenokarzinomen

3.2.1 Rolle des Tetraspanins D6.1A bei der zellulären Morphogenese

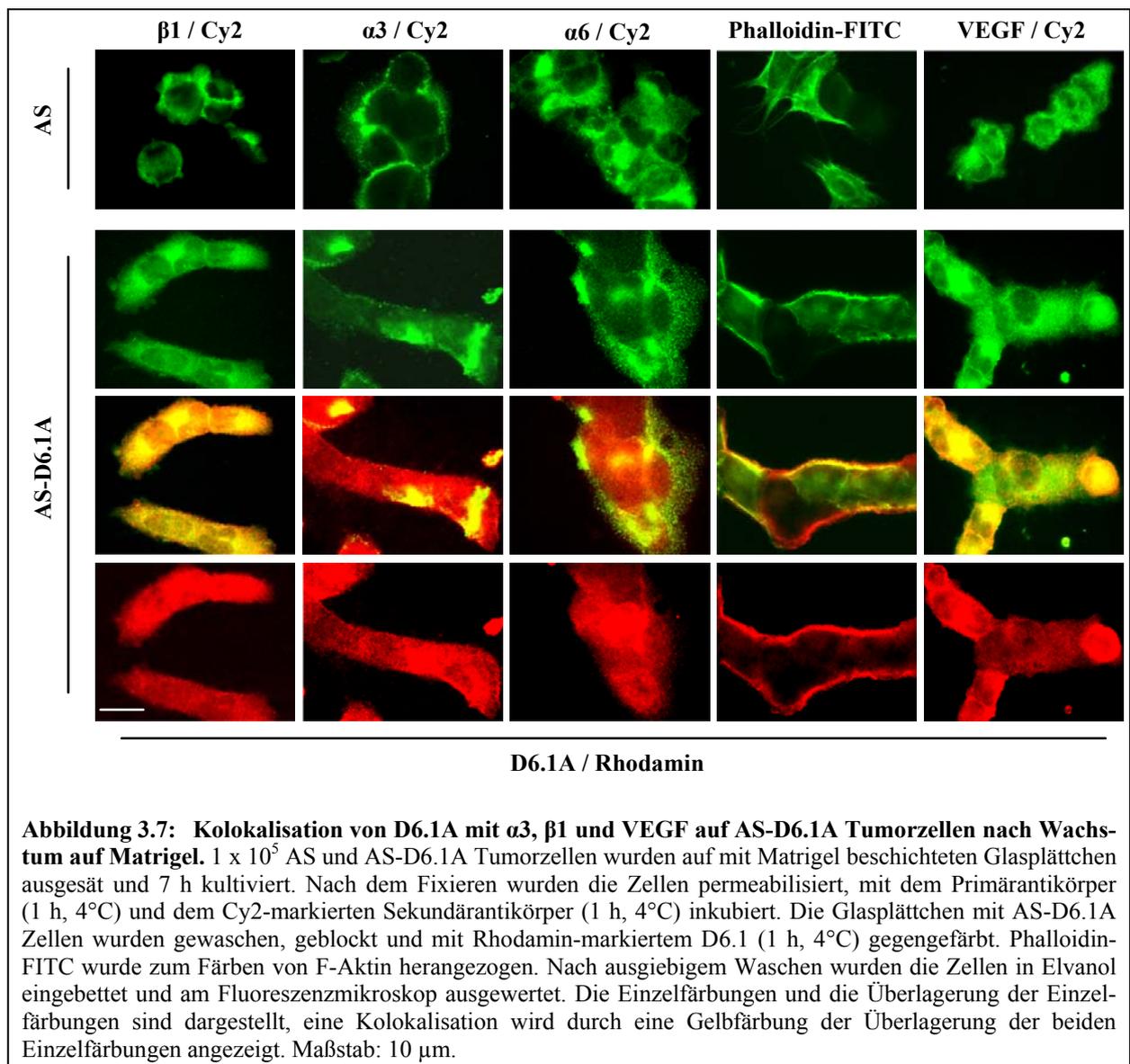
Das kabelartige Wachstum von Zellen auf Matrigel wurde in früheren Studien als ein *in vitro* Modell der Angiogenese betrachtet (Auerbach et al., 2003). Zhang et al. (2001) zeigten, dass das Tetraspanin CD151 einen Einfluss auf diesen Prozess nehmen kann. Das kabelartige Wachstum von Tumorzellen und Fibroblasten auf Matrigel konnte durch anti-CD151 oder anti- $\alpha 6$ gehemmt werden. Claas et al. (1998) konnten zeigen, dass eine subkutane Injektion von D6.1A überexprimierenden Tumorzellen in Ratten eine Verbrauchskoagulopathie zur Folge hatte. Intraperitoneale Applikation dieser Tumorzellen führte zu einem hämorrhagischen Aszites (Herlevsen et al., 2003). Diese Befunde waren der Ausgangspunkt unserer Arbeitshypothese, dass möglicherweise das Tetraspanin D6.1A Einfluss auf die Neoangiogenese von Tumoren nimmt. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde eine aus BDX Ratten isolierte Pankreasadenokarzinomzelllinie, die BSp73AS (AS) Tumorzelllinie verwendet (Matzku et al., 1983). Die AS Tumorzellen, die weder D6.1A noch $\alpha 6\beta 4$ exprimieren, wurden mit der D6.1A cDNA (Claas et al., 1998) bzw. mit der $\beta 4$ cDNA (Herlevsen et al., 2003) transfiziert. Die AS Tumorzellen exprimieren die $\alpha 6$ Integrin Kette, die mit dem transfizierten $\beta 4$ das Integrin $\alpha 6\beta 4$ bildet (Shaw et al., 1996). AS-db Tumorzellen wurden sowohl mit der D6.1A cDNA als auch mit der $\beta 4$ cDNA transfiziert.

Um einen möglichen Einfluss von D6.1A auf die Angiogenese abschätzen zu können, wurde zuerst das Wachstum der transfizierten Tumorzellen auf Matrigel evaluiert. Die Zellen wurden auf Matrigel ausgesät. Das Wachstum der Zellen wurde nach 7 h und 30 h dokumentiert (s. Teil A der Abbildung 3.6). Bereits nach 7 h zeigten AS-D6.1A Tumorzellen auf Matrigel ein kabelartiges Wachstum, welches nach 30 h sehr stark ausgeprägt war. AS Tumorzellen zeigten erst nach 30 h leichte kabelartige Auswüchse. AS- $\beta 4$ und AS-db Zellen wiesen weder nach 7 h noch nach 30 h auf Matrigel ein kabelartiges Wachstum auf. Das kabelartige Wachstum der AS-D6.1A Zellen konnte durch den Antikörper D6.1 aber nicht durch die Antikörper anti-CD9, anti-CD81 oder anti-CD151 blockiert werden, obwohl diese Tetraspanine ebenfalls auf den AS-D6.1A Zellen hoch exprimiert vorkommen. AS-D6.1A

Zellen exprimieren die Integrine $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$. Jedoch zeigten nur die Antikörper gegen $\alpha 3$ und $\beta 1$ eine Hemmung der Kabelstruktur. Der Antikörper anti- $\alpha 6$ hatte keinen Einfluss auf das kabelartige Wachstum. Die Ergebnisse sind in Teil B der Abbildung 3.6 gezeigt.

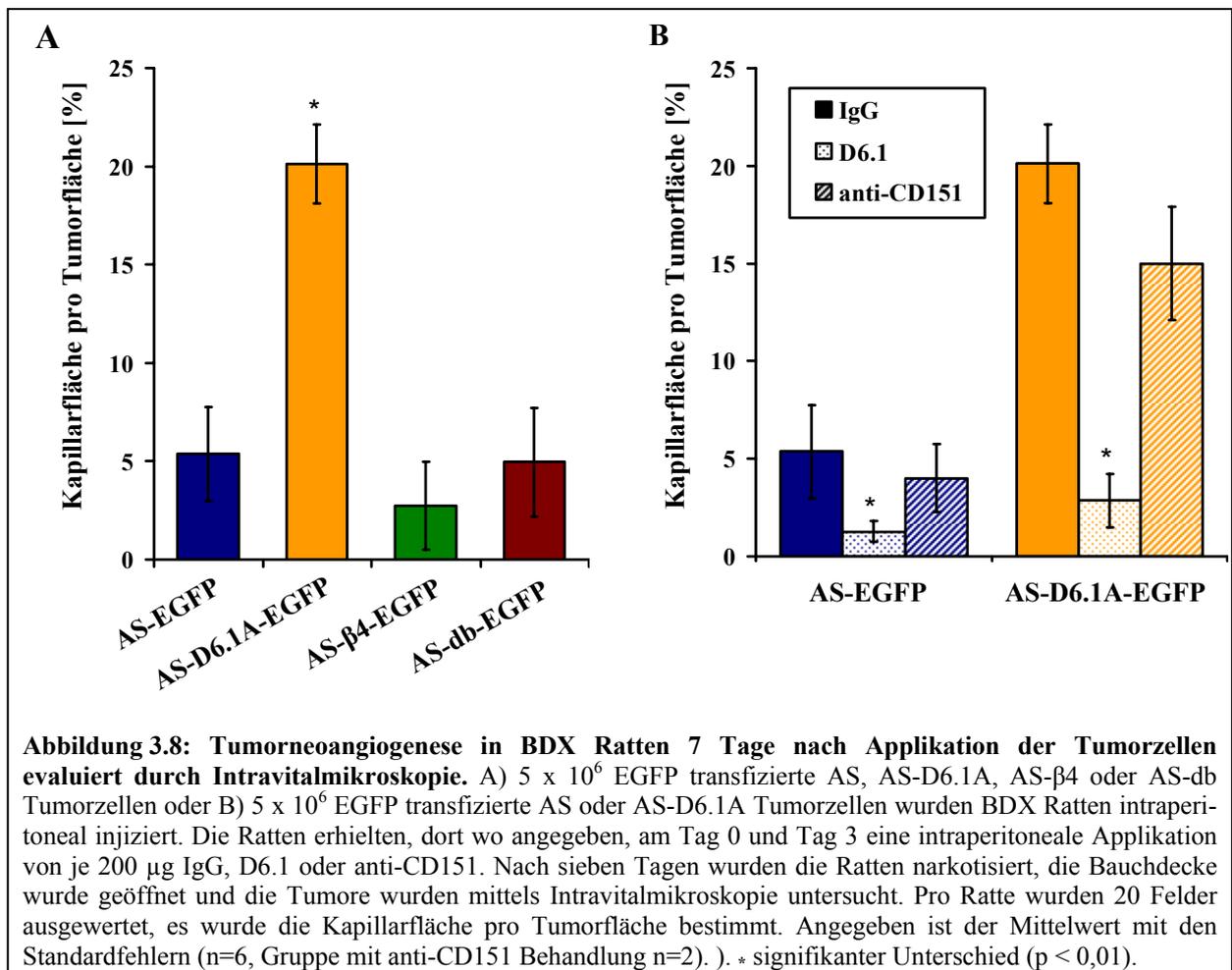


Da Tetraspanine ihre funktionelle Aktivität über assoziierte Moleküle ausüben und mit Integrinen interagieren, wurde die zelluläre Lokalisation von $\alpha 3$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ in AS und AS-D6.1A Tumorzellen und die Kolokalisation mit D6.1A in AS-D6.1A Tumorzellen untersucht, nachdem sie 7 h auf Matrigel gewachsen waren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 zusammengefasst. D6.1A kolokalisierte mit $\alpha 3$ und $\beta 1$, aber kaum mit $\alpha 6$. Es wurde keine Kolokalisation von D6.1A mit Aktinbündeln dokumentiert. Jedoch konnte eine Kolokalisation von D6.1A mit VEGF gezeigt werden.

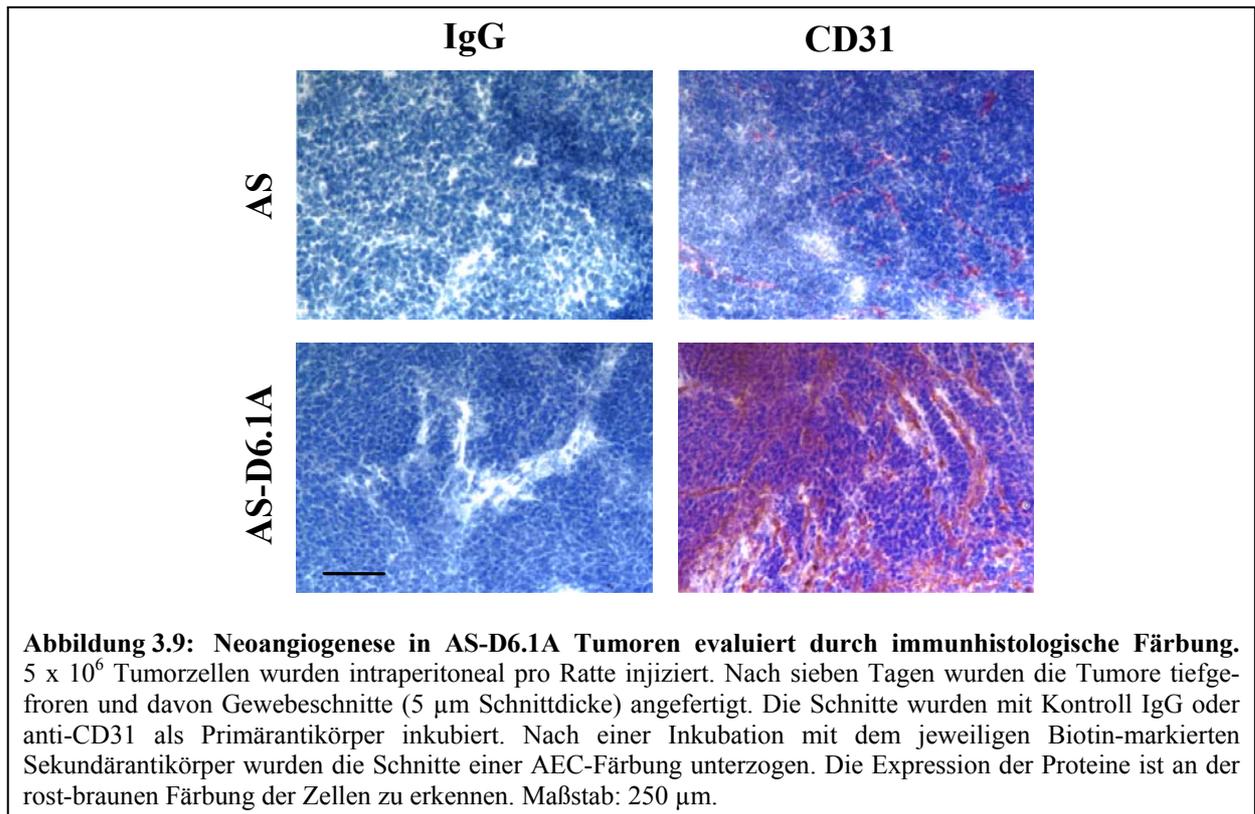


3.2.2 Das Tetraspanin D6.1A induziert Tumorangiogenese

Da AS-D6.1A Tumorzellen auf Matrigel ein kabelartiges Wachstum aufwiesen und diese Kabelstruktur durch den Antikörper D6.1, aber nicht durch die Antikörper gegen die Tetraspanine CD9, CD81 oder CD151 gehemmt werden konnte, sollte nun in einem *in vivo* Experiment überprüft werden, ob D6.1A in der Tat einen Einfluss auf die Tumorneoangiogenese hat. Diese Frage wurde mit Hilfe der Intravitalmikroskopie beantwortet. Die Tumorzellen wurden stabil mit EGFP (enhanced green fluorescence protein) transfiziert, damit die Tumorzellen anschließend bei der Intravitalmikroskopie durch ihre Fluoreszenz eindeutig identifiziert werden konnten. EGFP transfizierte AS, AS-D6.1A, AS- β 4 und AS-db Tumorzellen wurden BDX Ratten intraperitoneal injiziert. Nach sieben Tagen wurden die Ratten narkotisiert. Die Bauchdecke wurde geöffnet und die Bildung von neuen Blutkapillaren wurde durch Intravitalmikroskopie der Mesenterien evaluiert. Pro Ratte wurden 20 Felder in verschiedenen Abschnitten des Mesenteriums ausgewertet. Das Ergebnis ist in Teil A der Abbildung 3.8 zusammengefasst.



In AS-D6.1A Tumoren wurde pro Tumorfläche eine fünffach erhöhte Blutkapillardichte im Vergleich zu AS Tumoren festgestellt. AS- β 4 oder AS-db Tumore zeigten gegenüber den AS Tumoren keine erhöhte Kapillardichte. Zusätzlich wurden die AS und AS-D6.1A Tumore eingefroren, um Gewebeschnitte anzufertigen. Die Gewebeschnitte wurden mit anti-CD31, einem Endothelzellenmarker, untersucht. Auch hier wiesen die AS-D6.1A Tumore mehr Blutkapillaren als die AS Tumore auf. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.9 dargestellt.



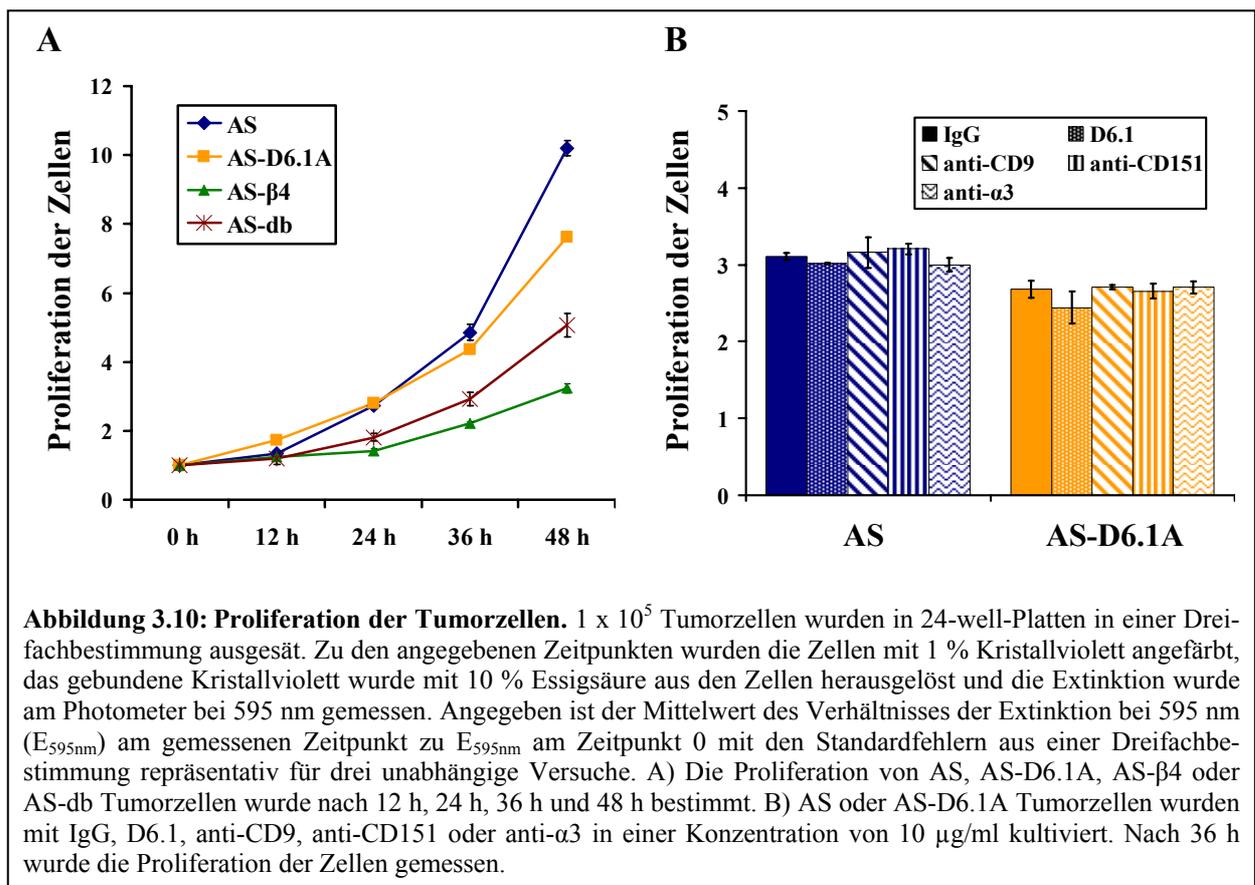
Die Neoangiogenese in AS-D6.1A Tumoren konnte mit dem Antikörper D6.1 gehemmt werden. Die Ratten erhielten am Tag der Tumorzellapplikation und drei Tage später je eine Injektion von $200 \mu\text{g}$ Kontroll IgG, D6.1 oder anti-CD151 intraperitoneal. Kontroll IgG oder anti-CD151 führte zu keiner signifikanten Reduktion der Neoangiogenese in den Tumoren (s. Teil B der Abbildung 3.8). D6.1 blockierte auch in AS Tumoren die Neoangiogenese, obwohl die AS Tumorzellen kein D6.1A exprimieren.

Um auszuschließen, dass die erhöhte Tumorangiogenese in AS-D6.1A Tumoren auf ein beschleunigtes Tumorwachstum zurückzuführen ist, wurde die Zellproliferation von AS, AS-D6.1A, AS- β 4 und AS-db Tumorzellen untersucht. Die Zellen wurden in einer Dreifachbestimmung in 24-well-Platten ausgesät und nach den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zellzahl durch Anfärben mit 1 % Kristallviolett und anschließende Messung der Extinktion bei 595 nm bestimmt. Die Extinktion am Zeitpunkt 0 wurde gleich 1 gesetzt und die Extink-

tionen der anderen Zeitpunkte wurden als ein vielfaches von 1 angegeben. Die Proliferation der Tumorzellen ist in Teil A der Abbildung 3.10 wiedergegeben.

AS Tumorzellen proliferierten am schnellsten, gefolgt von AS-D6.1A, AS-db und AS- β 4 Tumorzellen. Obwohl AS-D6.1A Tumorzellen im Vergleich zu AS Tumorzellen langsamer proliferierten, war die Neoangiogenese in diesen Tumorzellen erhöht. Um ebenfalls auszuschließen, dass die Inhibition der Neoangiogenese von AS-D6.1A Tumoren durch D6.1 eine Folge von verlangsamer Proliferation war, wurde die Proliferation von AS und AS-D6.1A Tumorzellen in Gegenwart von IgG, D6.1, anti-CD9, anti-CD151 oder anti- α 3 evaluiert.

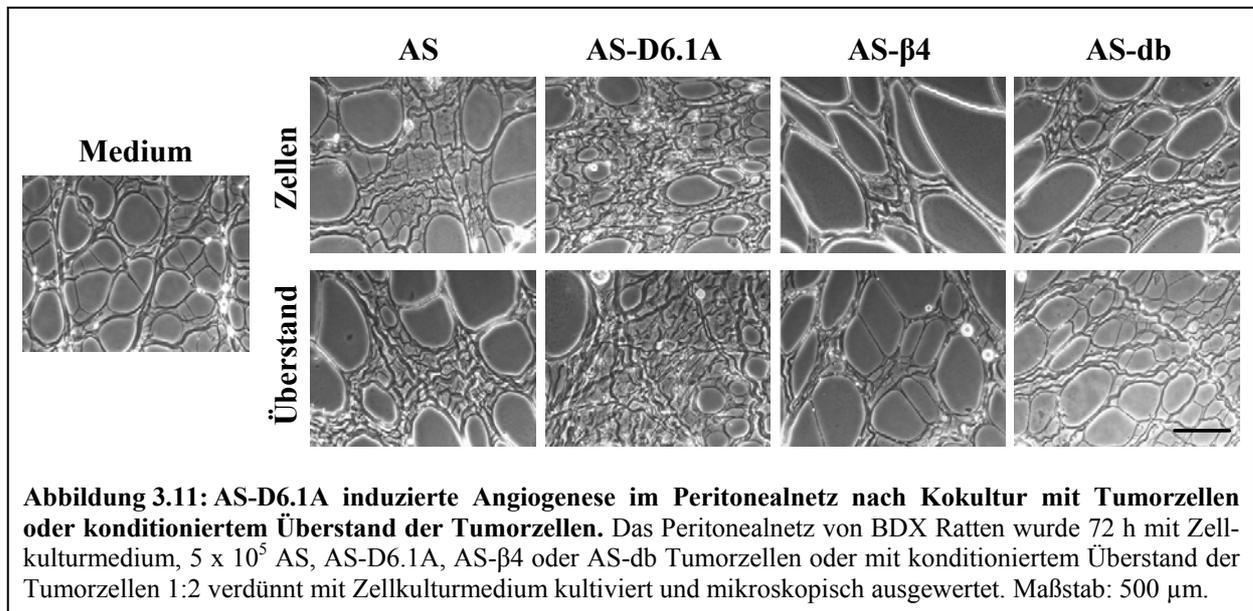
Die Antikörper hatten weder auf die Proliferation von AS noch auf die Proliferation von AS-D6.1A Tumorzellen einen Einfluss. Die Ergebnisse sind in Teil B der Abbildung 3.10 dargestellt. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Induktion der Neoangiogenese in AS-D6.1A Tumoren auf eine erhöhte Proliferation von AS-D6.1A Tumorzellen zurückzuführen ist. Ebenso ist die Inhibition der Neoangiogenese in AS und AS-D6.1A Tumoren durch den Antikörper D6.1 keine Folge von verminderter Proliferation.



3.2.3 Etablierung eines *in vitro* Modells zur Untersuchung der Angiogenese-induktion durch das Tetraspanin D6.1A

Um den Einfluss des Tetraspanins D6.1A auf die Angiogenese weiter zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Modell etabliert. Das Peritonealnetz von BDX Ratten wurde präpariert und in Gegenwart von AS, AS-D6.1A, AS- β 4 oder AS-db Tumorzellen kultiviert. In einem parallelen Ansatz wurde das Peritonealnetz mit konditioniertem Überstand der Tumorzellen, 1:2 verdünnt mit Zellkulturmedium, kultiviert. Nach 72 h wurde das Netz auf die Bildung von neuen Blutkapillaren mikroskopisch untersucht.

Das Ergebnis der Intravitalmikroskopie konnte in diesem *in vitro* Modell bestätigt werden. Das Peritonealnetz wies eine Vielzahl von kleinen Blutkapillaren nach Kokultur sowohl mit AS-D6.1A Tumorzellen als auch nach Kokultur mit konditioniertem Überstand von AS-D6.1A Tumorzellen auf. Nach Kokultur mit AS Tumorzellen wurde ebenfalls eine Induktion der Angiogenese festgestellt, die aber nicht so stark ausgeprägt war wie bei AS-D6.1A Tumorzellen. AS- β 4 oder AS-db Tumorzellen bzw. konditionierter Überstand dieser Tumorzellen hatte keinen Einfluss auf die Angiogenese. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 zusammengefasst.



Im *in vitro* Modell wurde ebenfalls der Einfluss der Antikörper D6.1, anti-CD9, anti-CD151 und anti- α 3 auf die Induktion der Angiogenese im Peritonealnetz durch AS oder AS-D6.1A Tumorzellen untersucht. Das Peritonealnetz wurde 72 h mit Medium oder 5×10^5 Tumorzellen und in Gegenwart von 10 μ g/ml Antikörper kultiviert. D6.1 blockierte die Angiogenese sowohl bei AS als auch bei AS-D6.1A Tumorzellen. Im Gegensatz dazu hatten die Antikörper

anti-CD9 oder anti-CD151 keinen inhibierenden Effekt auf die Angiogenese. In Übereinstimmung mit der Hemmung des kabelartigen Wachstums der AS-D6.1A Tumorzellen durch anti- $\alpha 3$ auf Matrigel konnte der Antikörper die Angiogeneseinduktion durch die AS-D6.1A Tumorzellen im *in vitro* Modell inhibieren.

Das Tetraspanin D6.1A induzierte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Angiogenese. Der Überstand der Tumorzellen reichte aus, um eine Neubildung von Kapillaren zu fördern. D6.1 inhibierte sowohl AS als auch AS-D6.1A induzierte Angiogenese. Die Frage auf welche Art und Weise der Antikörper D6.1 AS induzierte Angiogenese blockierte, wird im Abschnitt 3.2.6 behandelt. Doch zunächst wurden die AS und AS-D6.1A Tumorzellen auf die Expression und Sekretion von Matrixmetalloproteinasen und Angiogenesefaktoren untersucht, um einen Hinweis darauf zu bekommen, über welchen Mechanismus D6.1A die Angiogenese induzieren könnte.

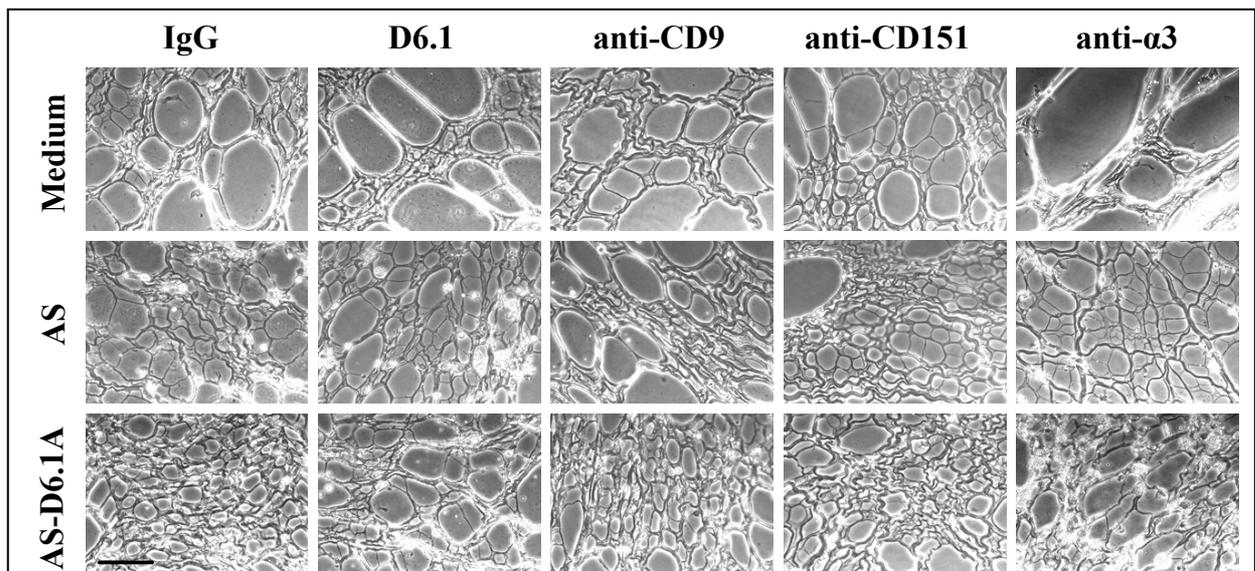


Abbildung 3.12: Der Antikörper D6.1 blockierte AS-D6.1A induzierte Angiogenese im Peritonealnetz nach Kokultur mit Tumorzellen. Das Peritonealnetz von BDX Ratten wurde 72 h mit Zellkulturmedium, 5×10^5 AS oder AS-D6.1A Tumorzellen oder mit konditioniertem Überstand der Tumorzellen 1:2 verdünnt mit Zellkulturmedium kultiviert. Kontroll IgG und die Antikörper D6.1, anti-CD9, anti-CD151 oder anti- $\alpha 3$ wurden in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Maßstab: 500 μm .

3.2.4 Einfluss von D6.1A auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen und Angiogenesefaktoren

Auf Grund der Tatsache, dass konditionierter AS-D6.1A Zellkulturüberstand ausreichte, um im *in vitro* Modell Angiogenese zu induzieren, wurden die AS und AS-D6.1A Tumorzellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen, angiogenetische und anti-angiogenetische Faktoren untersucht. Die Tumorzellen wurden zuerst permeabilisiert, fixiert und schließlich mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Zusätzlich wurden das Integrin- und das Tetraspaninexpressionsprofil der Tumorzellen evaluiert.

Das Integrinexpressionsprofil der AS und AS-D6.1A Tumorzellen wurde zum Teil bereits von Claas et al. (1998) und Herlevsen et al. (2003) beschrieben. AS oder AS-D6.1A Tumorzellen exprimieren kein $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$ und $\beta 4$. Sie exprimierten dagegen $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$, wobei $\alpha 4$ in AS-D6.1A Tumorzellen gegenüber AS Tumorzellen hochreguliert war. Beide Zelllinien exprimierten die Tetraspanine CD9, CD81 und CD151. Die Expression von CD151 war in den AS-D6.1A Tumorzellen im Vergleich zu AS Tumorzellen hochreguliert. Die angiogenetischen Faktoren VEGF, bFGF und TNF α wurden in beiden Tumorzelllinien exprimiert, VEGF war in den AS-D6.1A Tumorzellen im Vergleich zu AS Tumorzellen leicht hochreguliert. Beide Zelllinien exprimierten die anti-angiogenetischen Faktoren IFN γ , TIMP-1, TIMP-2 und IL4. AS Tumorzellen exprimierten die Matrixmetalloproteinasen MMP-2, MMP-9 und MMP-13. MMP-13 wurde in den AS-D6.1A Tumorzellen stärker exprimiert als in den AS Tumorzellen. MMP-9 war in den AS-D6.1A Tumorzellen im Vergleich zu AS Tumorzellen herunterreguliert. Die Ergebnisse der Durchflußzytometrie sind in der Tabelle 3.6 wiedergegeben.

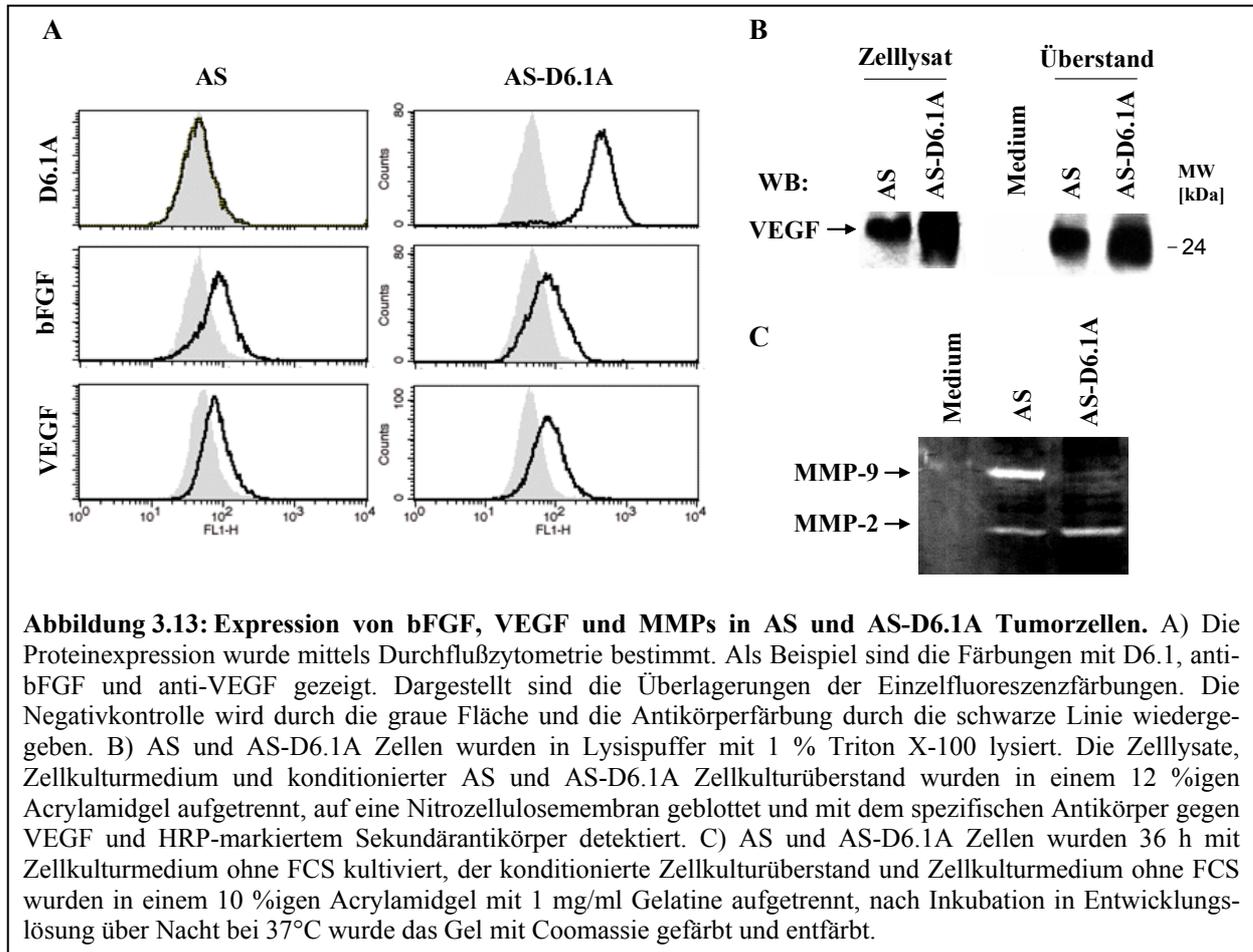
Auf Grund der unterschiedlichen Expression der Matrixmetalloproteinasen wurde konditioniertes Zellkulturmedium auf sezernierte Matrixmetalloproteinasen untersucht. Die Tumorzellen wurden mit Zellkulturmedium ohne FCS kultiviert und das konditionierte Zellkulturmedium wurde in einem 10 %igen Acrylamidgel mit 1 mg/ml Gelatine aufgetrennt. Die Enzymaktivität der Matrixmetalloproteinasen führt zu einem Abbau der Gelatine. Nach Inkubation des Geles in Entwicklungslösung und anschließender Färbung mit Coomassie zeigt sich der Gelatineabbau als helle, nichtgefärbte Banden. Das Ergebnis des Zymogramms ist in Teil C der Abbildung 3.13 wiedergegeben. Sowohl die Expression als auch die sezernierte Menge an MMP-9 war in AS-D6.1A Tumorzellen im Vergleich zu AS Tumorzellen verringert.

Tabelle 3.6: Expression von Integrinen, Tetraspaninen, angiogenetischen Faktoren und Matrixdegradierenden Enzymen in AS und AS-D6.1A Tumorzellen. Die Proteinexpression wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Die Negativkontrollen wurden auf eine mittlere Fluoreszenzintensität von 10 eingestellt. Angegeben ist der Mittelwert der gefärbten Zellen in Prozent und in Klammern der Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (n=3). Zusätzlich sind in der Tabelle die berechneten Signifikanzwerte der Expression der AS-D6.1A Tumorzellen im Vergleich zu den AS Tumorzellen dargestellt.

		AS gefärbte Zellen [%] (mittl. Fluoreszenzint.)	AS-D6.1A gefärbte Zellen [%] (mittl. Fluoreszenzint.)	Signifikanz p-Wert
Integrine	$\alpha 3$	96 (276)	97 (370)	- (-)
	$\alpha 4$	60 (33)	89 (124)	0,0109 (0,0021)
	$\alpha 5$	96 (1217)	92 (1517)	- (-)
	$\alpha 6$	71 (93)	74 (111)	- (-)
	$\beta 1$	96 (267)	92 (224)	- (-)
	$\beta 3$	12 (10)	22 (19)	0,0257 (0,0252)
Tetraspanine	CD9	84 (158)	93 (161)	- (-)
	CD81	96 (2570)	94 (2658)	- (-)
	CD151	55 (114)	73 (159)	0,0388 (0,0501)
	D6.1A	- -	95 (468)	<0,0001 (<0,0001)
angiogenet. Faktoren	VEGF	31 (76)	56 (104)	0,0053 (-)
	bFGF	47 (150)	42 (162)	- (-)
	TNF α	14 (52)	12 (84)	- (-)
anti-angiogenet. Faktoren	IFN γ	13 (11)	7 (13)	-
	IL4	30 (142)	27 (141)	- (-)
	TIMP-1	16 (18)	9 (11)	- (-)
	TIMP-2	48 (33)	29 (18)	0,0072 (0,0291)
Matrixdegra- dierende Enzyme	MMP-2	36 (161)	28 (215)	- (-)
	MMP-9	23 (128)	11 (109)	0,0102 (-)
	MMP-13	40 (139)	55 (279)	0,0292 (0,0004)

In Teil A der Abbildung 3.13 ist als Beispiel das Ergebnis der Durchflußzytometrie für die Expression von D6.1A, bFGF und VEGF in den Tumorzellen AS und AS-D6.1A angegeben. Die leicht erhöhte Expression von VEGF in AS-D6.1A Tumorzellen im Vergleich zu AS Tumorzellen konnte nach Auftrennung der 1 % Triton X-100 Zelllysate und der konditionierten Zellkulturüberstände in einer SDS-PAGE, Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-

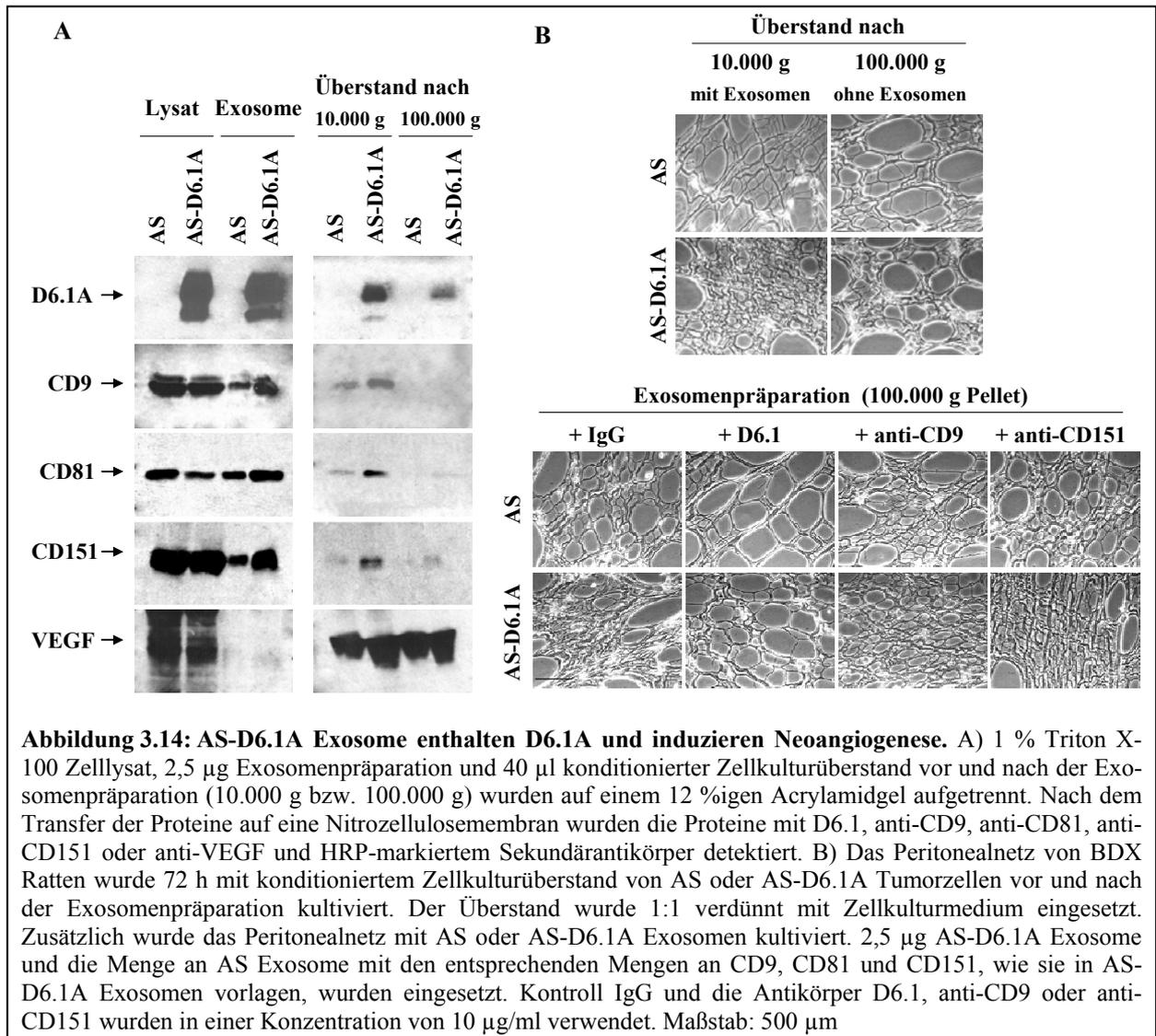
membran und anschließender Inkubation mit anti-VEGF ebenfalls bestätigt werden (s. Teil B der Abbildung 3.13).



3.2.5 Exosome von AS-D6.1A Tumorzellen enthalten D6.1A und induzieren Neoangiogenese

Tumorzellen sind in der Lage Membranvesikel, sogenannte Exosome zu sezernieren. Diese intraluminalen Vesikel werden bei der Fusion von multivesikulären Endosomen mit der Plasmamembran freigesetzt (Fevrier and Raposo, 2004; Stoorvogel et al., 2002). Escola et al., (1998) konnten zeigen, dass Tetraspanine wie CD9 und CD81 vermehrt auf Exosomen vorkommen. Da konditionierter Zellkulturüberstand von AS-D6.1A Tumorzellen ausreicht, um Angiogenese zu induzieren und nur geringe Unterschiede in den sezernierten Angiogenesefaktoren zwischen AS und AS-D6.1A Tumorzellen zu verzeichnen waren, haben wir die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise die Angiogenese auf sezernierte Exosome zurückzuführen ist. Es wurden die Exosomen aus konditioniertem AS und AS-D6.1A

Zellkulturüberstand präpariert. 1 % Triton X-100 AS und AS-D6.1A Zelllysat, AS und AS-D6.1A Exosomen, sowie konditionierter Zellkulturüberstand vor (10.000 g) und nach der Präparation von Exosomen (100.000 g) wurden auf einem 12 %igen Acrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine mit D6.1, anti-CD9, anti-CD81, anti-CD151 oder anti-VEGF nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Teil A der Abbildung 3.14 dargestellt.

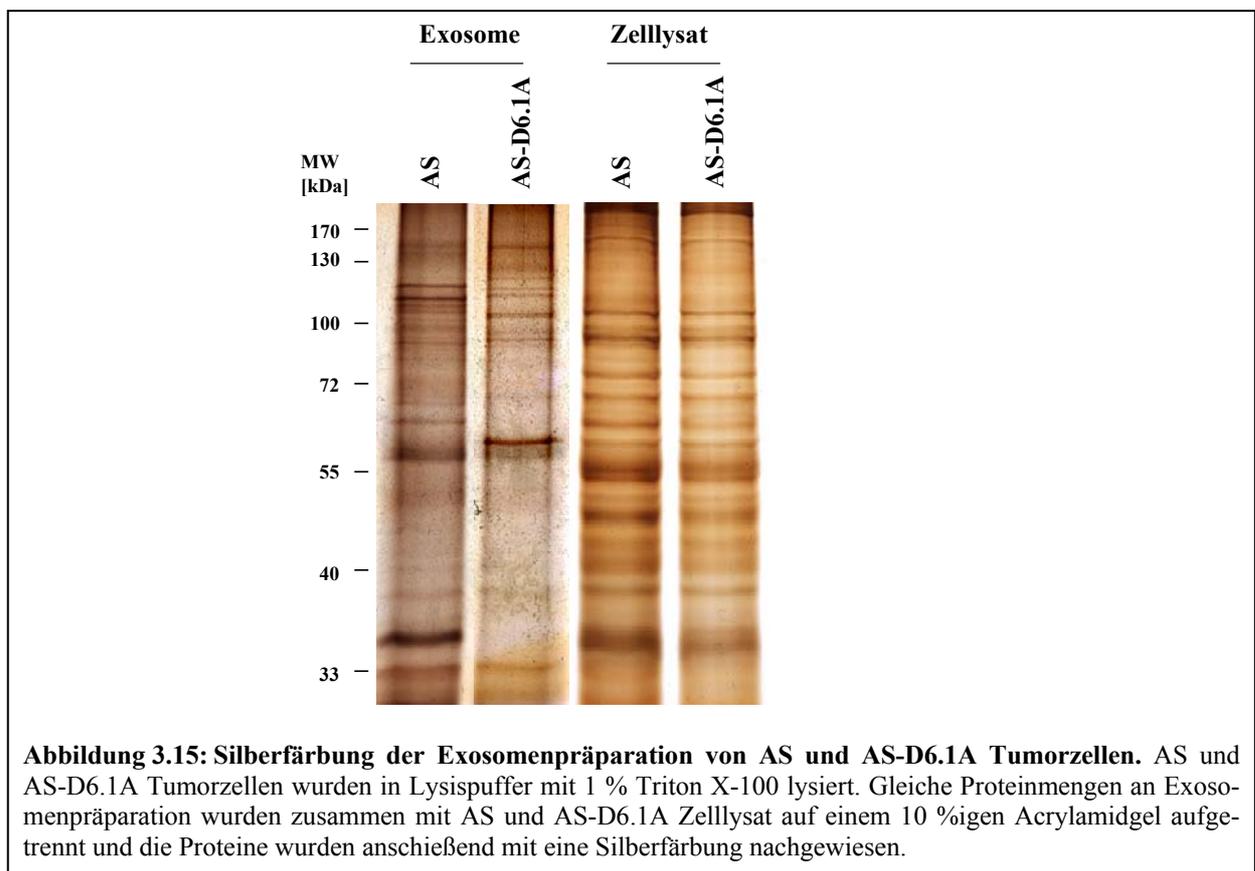


Die Tetraspanine CD9, CD81 und CD151 wurden in den Exosomen von AS Tumorzellen nachgewiesen, AS-D6.1A Exosome enthielten zu den bereits genannten Tetraspaninen das Tetraspanin D6.1A. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Tetraspanine CD9, CD81 und CD151 in den AS-D6.1A Exosomen im Vergleich zu den AS Exosomen angereichert waren. VEGF wurde in den konditionierten Zellkulturüberständen von AS und AS-D6.1A Tumor-

zellen sowohl vor als auch nach der Exosomenpräparation nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde VEGF weder in AS noch in AS-D6.1A Exosomen detektiert.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Exosome von AS-D6.1A Tumorzellen in der Lage sind Angiogenese im Peritonealnetz zu induzieren. Auf Grund der Tatsache, dass die AS-D6.1A Exosome CD9, CD81 und CD151 anreicherten, wurde die Menge an diesen Tetraspaninen densitometrisch bestimmt. Das Peritonealnetz von BDX Ratten wurde 72 h mit konditioniertem AS oder AS-D6.1A Zellkulturüberstand vor und nach der Exosomenpräparation, 1:2 verdünnt mit Zellkulturmedium, kultiviert. Zusätzlich wurde das Peritonealnetz mit Exosomen von AS-D6.1A Tumorzellen kultiviert, die der Menge an eingesetztem konditioniertem Überstand entsprach. Die AS Exosome wurden so eingesetzt, dass sich die Mengen an CD9, CD81 und CD151 in AS und AS-D6.1A Exosomen entsprachen. Der Exosomenkokultur wurde IgG, D6.1, anti-CD9 oder anti-CD151 in einer Konzentration von 10 µg/ml zugesetzt. Das Ergebnis ist in Teil B der Abbildung 3.14 wiedergegeben.

Eine Induktion der Angiogenese wurde mit konditioniertem Überstand und Exosomen von AS-D6.1A Tumorzellen hervorgerufen. Konditionierter AS-D6.1A Zellkulturüberstand nach der Exosomenpräparation führte im Gegensatz dazu zu keiner Induktion der Angiogenese im Peritonealnetz. Im Einklang mit den *in vivo* Experimenten konnte auch hier die Angiogenese durch den Antikörper D6.1, aber nicht durch anti-CD9 oder anti-CD151 gehemmt werden.



Um einen Hinweis zu bekommen, auf welche Weise die Exosomen von AS-D6.1A Tumorzellen die Angiogenese induzieren können, wurden gleiche Proteinmengen an Exosomenpräparation von AS und AS-D6.1A Tumorzellen und 1 % Triton X-100 Zellysate auf einem 10 %igen Acrylamidgel aufgetrennt und anschließend wurden die Proteine mit einer Silberfärbung nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.15 wiedergegeben.

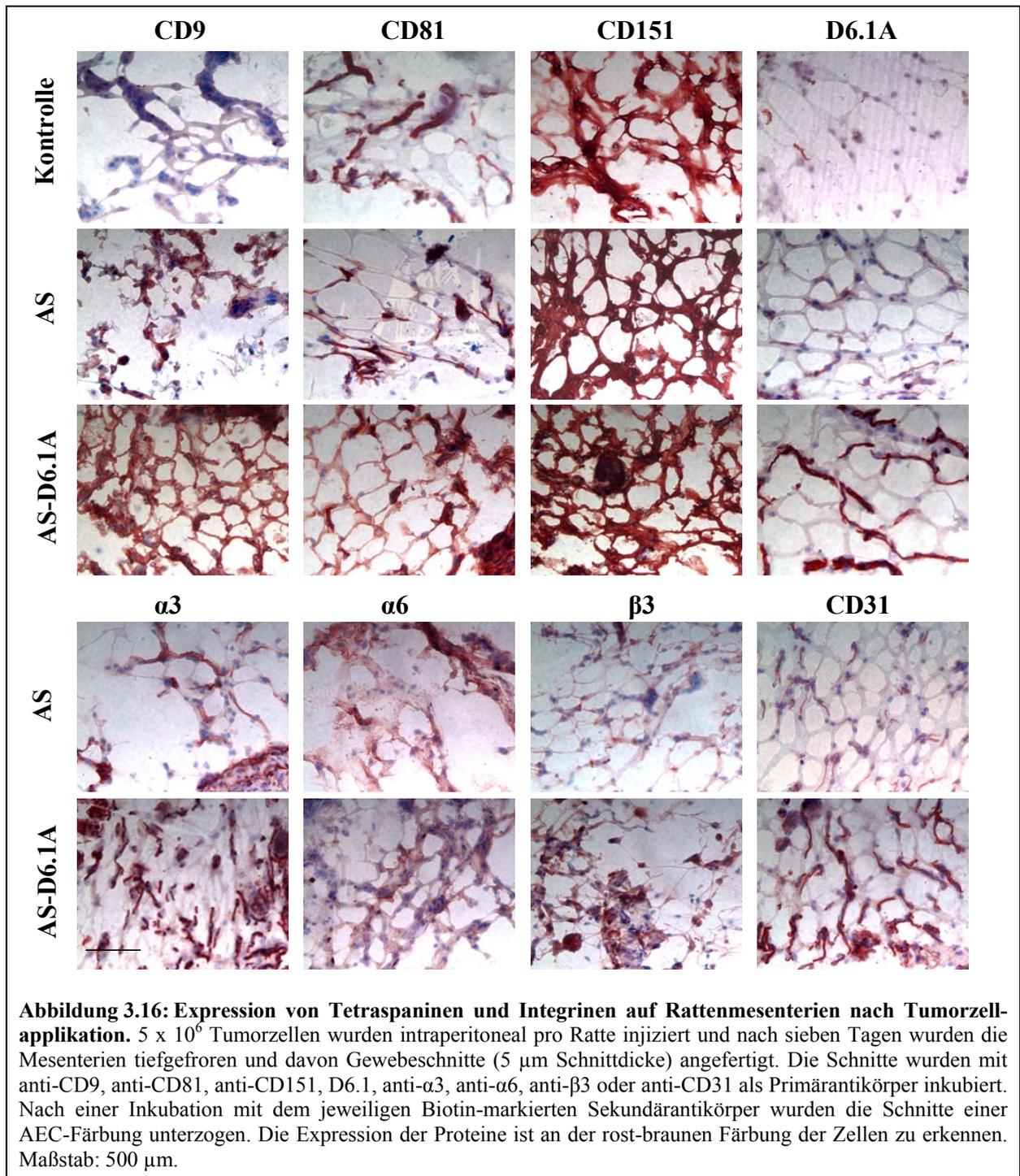
Nur ein Teil der Proteine, die im Zellysate sowohl von AS als auch von AS-D6.1A Tumorzellen nachgewiesen wurden, konnten auch in den Exosomen detektiert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass AS und AS-D6.1A Exosome nicht das gleiche Proteinprofil aufweisen. Nicht alle Proteine, die in AS Exosomen enthalten waren, konnten in AS-D6.1A Exosomen nachgewiesen werden. Ebenso waren Proteine in AS-D6.1A Exosomen nachzuweisen, die nicht in den Exosomen von AS Tumorzellen detektiert wurden. Die massenspektrometrische Analyse differentiell exprimierter Proteine mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde noch nicht abgeschlossen.

3.2.6 Hochregulation der Expression von D6.1A auf Endothelzellen neu gebildeter Blutkapillaren

Der Antikörper D6.1 inhibierte nicht nur in AS-D6.1A Tumoren, sondern auch in AS Tumoren die Neoangiogenese. Damit stellte sich die Frage, wie D6.1 die Neoangiogenese in AS Tumoren blockieren konnte, obwohl diese Tumore kein D6.1A exprimieren. Claas et al. (1996) konnten zeigen, dass das Tetraspanin D6.1A in geringem Maße auf Kapillaren aber nicht auf Venen und Arterien exprimiert wird. Es sollte zuerst die Frage geklärt werden, ob D6.1A auf den Endothelzellen der Kapillaren exprimiert wird und falls es exprimiert wird, ob AS-D6.1A Tumore einen Einfluss auf die Höhe der Expression dieses Tetraspanins auf den Endothelzellen haben. Die Mesenterien von BDX Ratten wurden sieben Tage nach Applikation der Tumorzellen auf die Expression der Tetraspanine CD9, CD81, CD151 und D6.1A und der Integrine $\alpha 3$, $\alpha 6$ und $\beta 3$ untersucht. Zusätzlich wurden die Mesenterien auf die Expression von CD31 einem Marker für Endothelzellen getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

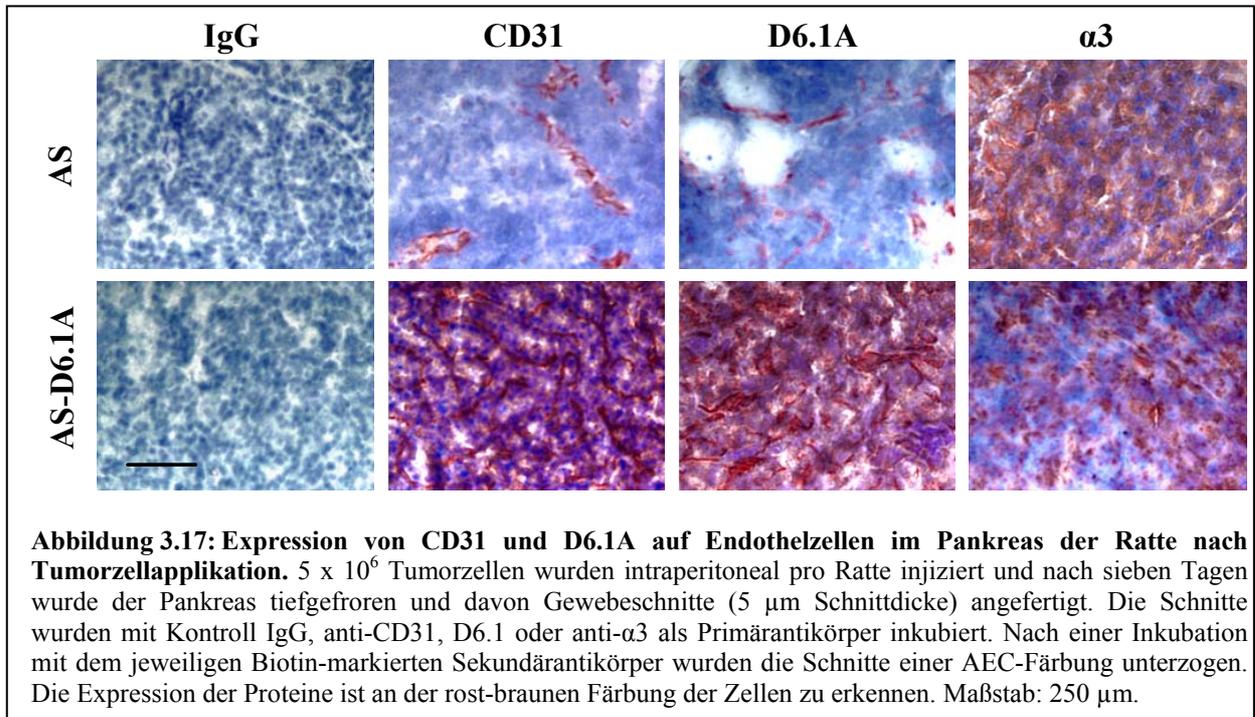
Das Tetraspanin D6.1A wurde auf den Endothelzellen neu gebildeter Kapillaren hoch reguliert, was daran zu erkennen war, dass CD31 positive Zellen ebenfalls positiv für D6.1A waren. Zusätzlich konnte eine Hochregulation von $\alpha 3$ und $\beta 3$ dokumentiert werden. Die Expression von D6.1A auf den Kapillaren war unabhängig davon, ob der Tumor das Tetraspanin D6.1A exprimiert oder nicht. Auch nach Applikation von AS Tumorzellen wurde

D6.1A auf neu gebildeten Kapillaren exprimiert, jedoch war die Höhe der Expression nicht so stark, wie nach Applikation von AS-D6.1A Tumorzellen.



Die Neoangiogenese nach Applikation von AS-D6.1A Tumorzellen war nicht nur auf den Tumor und das angrenzende Mesenterium beschränkt, sondern auch in Pankreasgewebeschnitten konnte eine starke Zunahme der CD31 Färbung festgestellt werden. Die Endothelzellen waren auch hier positiv für das Tetraspanin D6.1A (s. Abbildung 3.17).

Die Tatsache, dass neu gebildete Kapillaren das Tetraspanin D6.1A hoch regulierten, unabhängig davon, ob der Tumor D6.1A exprimierte oder nicht, könnte eine Erklärung dafür sein, dass der Antikörper D6.1 die Neoangiogenese nicht nur in AS-D6.1A Tumoren, sondern auch in AS Tumoren blockierte.



3.2.7 Einfluss von D6.1A auf die Tumorumgebung

Da die intraperitoneale Applikation von AS-D6.1A Tumorzellen in Ratten nicht nur in den Tumoren sondern auch in einem entfernten Gewebe - wie dem Pankreas - zu einer Induktion der Angiogenese führte, sollte der Einfluss von AS-D6.1A Tumoren auf das umliegende Gewebe untersucht werden. Hierzu wurden Peritonealmakrophagen und Mesenterialzellen aus der Ratte, eine Woche nach intraperitonealer Applikation der AS oder AS-D6.1A Tumorzellen, auf die Expression von Integrinen, Tetraspaninen, Angiogenesefaktoren, Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren mittels Durchflußzytometrie getestet.

Mit Ausnahme von $\alpha 6$ und uPA war die Expression von Integrinen, Tetraspaninen, Angiogenesefaktoren und der Extrazellulärenmatrix degradierenden Enzymen in den Peritonealmakrophagen in den Ratten hoch reguliert, die gegenüber der Kontrollgruppe entweder AS oder AS-D6.1A Tumorzellen erhalten hatten. Signifikante Unterschiede im Expressionsprofil der Peritonealmakrophagen der Ratten mit AS-D6.1A Tumoren gegenüber den Ratten mit AS Tumoren waren nur für $\beta 3$ und uPAR zu verzeichnen, die Expression beider Proteine war in

Peritonealmakrophagen der AS-D6.1A Ratten erhöht. Die Ergebnisse der Durchflußzytometrie sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

In den Mesenterialzellen wurden größere Unterschiede in der Proteinexpression der AS-D6.1A Ratten gegenüber AS Ratten analysiert. Die Expression von VEGF, bFGF, MMP-2, MMP-9, uPA, uPAR, CD31, VEGFR1 und VEGFR2 war signifikant in den Mesenterialzellen der AS-D6.1A Ratten gegenüber den Mesenterialzellen der AS Ratten erhöht. Die Ergebnisse der Durchflußzytometrie der Mesenterialzellen sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

Diese Daten konnten durch die immunhistologische Färbung der Mesenterien bestätigt werden. Eine Woche nach Applikation von AS oder AS-D6.1A Tumorzellen wurden die Mesenterien aus den Ratten präpariert, tiefgefroren und davon Gewebeschnitte angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden schließlich auf die Expression von VEGF, bFGF, VEGFR1, VEGFR2, MMP-2, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, uPA und uPAR getestet. Die immunhistologischen Färbungen der Mesenterien sind in Abbildung 3.18 wiedergegeben.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass Kapillarendothelzellen den Ursprung für uPA und Matrixmetalloproteinasen darstellen und die Expression der Rezeptoren VEGFR1, VEGFR2 und uPAR auf Kapillarendothelzellen durch AS-D6.1A Tumoren hochreguliert werden, wurde eine Fibroblastenzelllinie und eine Rattenaortaendothelzelllinie (RAEC) in Gegenwart von konditioniertem AS oder AS-D6.1A Zellkulturüberstand kultiviert. Die Fibroblasten und RAEC wurden mittels Durchflußzytometrie auf die Expression von bFGF, VEGF, TNF α , D6.1A, CD31, VEGFR1, VEGFR2, MMP-2, MMP-9, MMP-13, uPA und uPAR getestet. Das Ergebnis der Durchflußzytometrie ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Konditionierter AS-D6.1A Zellkulturüberstand führte zu einer signifikanten Hochregulation der Expression von TNF α und uPAR in der Fibroblastenzelllinie gegenüber konditioniertem AS Zellkulturüberstand. Die Expression von VEGF, bFGF, MMP-2 und MMP-9 war in den Fibroblasten nach Kultivierung mit konditioniertem AS oder AS-D6.1A Zellkulturüberstand gegenüber dem Kontrollansatz mit Medium erhöht. Die Kokultur mit konditioniertem AS-D6.1A Zellkulturüberstand führte in den RAEC zu einer signifikanten Hochregulation von CD31, VEGFR1, VEGFR2 und uPAR gegenüber konditioniertem AS Zellkulturüberstand. Die Expression von VEGF, TNF α , MMP-2 und MMP-9 war in den RAEC Zellen nach Kokultur mit konditioniertem AS oder AS-D6.1A Zellkulturüberstand hochreguliert.

Diese *in vitro* Versuche mit definierten Zellkulturlinien bestätigten, dass das Tetraspanin D6.1A zu einer veränderten Genexpression in Fibroblasten und Endothelzellen führen kann und somit D6.1A einen Einfluss auf das umliegende Gewebe von Tumoren ausübt.

Tabelle 3.7: Expression von Integrinen, Tetraspaninen, angiogenetischen Faktoren und matrixdegradierenden Enzymen in Peritonealmakrophagen nach Applikation der Tumorzellen. 5×10^6 AS oder AS-D6.1A Tumorzellen wurden intraperitoneal pro Ratte injiziert und sieben Tage später wurden die Peritonealmakrophagen präpariert und die Proteinexpression mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Für ein intrazelluläres FACS wurden die Zellen zuvor in 1 % (v/v) Formalin in PBS fixiert und anschließend in 1 % (v/v) Tween 20 in PBS permeabilisiert. Die Negativkontrollen wurden auf eine mittlere Fluoreszenzintensität von 10 eingestellt. Angegeben ist der Mittelwert der gefärbten Zellen in Prozent und in Klammern der Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (n=3). Zusätzlich sind in der Tabelle die berechneten Signifikanzwerte dargestellt.

		Kontrolle	AS		AS-D6.1A		
		gefärbte Zellen [%], (mittlere Fluoreszenz)	gefärbte Zellen [%], (mittlere Fluoreszenz)	Signifikanz zur Kontrolle p-Wert	gefärbte Zellen [%], (mittlere Fluoreszenz)	Signifikanz zur Kontrolle p-Wert	Signifikanz zur Kontrolle p-Wert
Integrine	α_M	97 (243)	97(1254)	– (<0,0001)	98(1841)	– (0,0002)	– (0,0100)
	α_3	12 (30)	25 (138)	0,0334 (0,0011)	26 (177)	0,0360 (0,0003)	– (–)
	α_4	92 (90)	97 (598)	– (<0,0001)	97 (580)	– (<0,0001)	– (–)
	α_5	80 (122)	81 (582)	– (0,0019)	82 (633)	– (0,0019)	– (–)
	α_6	24 (25)	33 (35)	– (–)	36 (25)	– (–)	– (–)
	β_2	72 (347)	99(1155)	– (0,0024)	99(1864)	– (0,0002)	– (0,0122)
	β_3	38 (17)	55 (48)	0,0276 (0,0047)	73 (72)	0,0026 (0,0005)	– (0,0213)
Tetraspanine	CD9	87 (69)	98 (635)	– (<0,0001)	97 (658)	– (<0,0001)	– (–)
	CD81	61 (134)	91 (696)	0,0312 (<0,0001)	89 (816)	0,0354 (<0,0001)	– (–)
	CD151	36 (18)	54 (92)	0,0313 (0,0012)	56 (98)	0,0344 (0,0020)	– (–)
	D6.1A	nd	16 (503)	0,0080 (<0,0001)	32 (563)	0,0010 (<0,0001)	0,0238 (–)
angiogenet. Faktoren	VEGF	12 (14)	27 (31)	0,0154 (0,0384)	41 (30)	0,0034 (0,0422)	0,0479 (–)
	bFGF	13 (15)	46 (69)	0,0045 (0,0063)	53 (63)	0,0024 (0,0052)	– (–)
	TNF α	37 (96)	59 (118)	0,0288 (–)	72 (132)	0,0077 (–)	– (–)
matrixdegradierende Enzyme und Inhibitoren	MMP-2	28 (19)	38 (52)	– (0,0101)	52 (48)	0,0213 (0,0126)	– (–)
	MMP-9	14 (13)	47 (81)	0,0011 (0,0212)	47 (71)	0,0019 (0,0256)	– (–)
	MMP-13	22 (15)	31 (43)	– (0,0103)	38 (46)	0,0425 (0,0090)	– (–)
	TIMP-1	6 (10)	18 (23)	0,0315 (0,0445)	17 (26)	0,0409 (0,0389)	– (–)
	TIMP-2	4 (11)	12 (15)	0,0363 (–)	19 (15)	0,0085 (–)	– (–)
	uPA	2 (11)	8 (15)	– (–)	15 (40)	0,0070 (0,0090)	– (0,0084)
	uPAR	9 (13)	17 (25)	– (0,0424)	30 (56)	0,0066 (0,0046)	0,0334 (0,0161)

Tabelle 3.8: Expression von Integrinen, Tetraspaninen, angiogenetischen Faktoren und matrixdegradierenden Enzymen auf Mesenterialzellen nach Applikation der Tumorzellen. 5×10^6 AS oder AS-D6.1A Tumorzellen wurden intraperitoneal pro Ratte injiziert und sieben Tage später wurden die Mesenterialzellen präpariert und die Proteinexpression mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Für ein intrazelluläres FACS wurden die Zellen zuvor in 1 % (v/v) Formalin in PBS fixiert und anschließend in 1 % (v/v) Tween 20 in PBS permeabilisiert. Die Negativkontrollen wurden auf eine mittlere Fluoreszenzintensität von 10 eingestellt. Angegeben ist der Mittelwert der gefärbten Zellen in Prozent und in Klammern der Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (n=3). Zusätzlich sind in der Tabelle die berechneten Signifikanzwerte dargestellt.

		Kontrolle	AS		AS-D6.1A		
		gefärbte Zellen [%], (mittlere Fluoreszenz)	gefärbte Zellen [%], (mittlere Fluoreszenz)	Signifikanz zur Kontrolle p-Wert	gefärbte Zellen [%], (mittlere Fluoreszenz)	Signifikanz zur Kontrolle p-Wert	Signifikanz zur Kontrolle p-Wert
Integrine	α_M	9 (129)	76 (601)	0,0003 (0,0002)	68 (789)	0,0004 (0,0004)	– (0,0436)
	$\alpha 1$	4 (37)	44 (201)	0,0027 (0,0009)	30 (183)	0,0062 (0,0013)	– (–)
	$\alpha 2$	22 (20)	36 (79)	0,0361 (0,0013)	37 (92)	0,0292 (0,0012)	– (–)
	$\alpha 3$	50 (31)	87 (182)	0,0060 (0,0035)	78 (281)	0,0068 (0,0005)	– (0,0184)
	$\alpha 4$	36 (147)	39 (127)	– (–)	64 (122)	0,0123 (–)	0,0206 (–)
	$\alpha 5$	74 (91)	70 (193)	– (0,0080)	74 (217)	– (0,0038)	– (–)
	$\alpha 6$	59 (114)	68 (128)	– (–)	66 (134)	– (–)	– (–)
	$\beta 1$	45 (23)	72 (55)	0,0154 (0,0105)	74 (147)	0,0151 (0,0022)	– (0,0073)
	$\beta 2$	86 (135)	42 (258)	0,0025 (0,0275)	55 (230)	0,0138 (0,0406)	– (–)
	$\beta 3$	35 (90)	30 (47)	– (–)	33 (104)	– (–)	– (–)
Tetraspanine	CD9	89 (312)	87 (198)	– (0,0276)	86 (186)	– (0,0271)	– (–)
	CD81	95 (412)	77 (556)	– (0,0241)	75 (760)	– (0,0042)	– (0,0265)
	CD151	94 (115)	89 (272)	– (0,0132)	78 (165)	– (–)	– (–)
	D6.1A	21 (67)	33 (73)	– (–)	41 (172)	– (0,0345)	– (0,0284)
angiog. Faktoren	VEGF	37 (35)	42 (61)	– (0,0388)	70 (217)	0,0008 (0,0016)	0,0009 (0,0029)
	bFGF	46 (81)	58 (134)	– (0,0225)	76 (322)	– (0,0015)	0,0128 (0,0050)
	TNF α	65 (105)	69 (121)	– (–)	65 (112)	– (–)	– (–)
anti-angiogenet.	IFN γ	39 (50)	8 (37)	0,0055 (–)	11 (31)	0,0092 (–)	– (–)
	IL4	47 (81)	29 (35)	0,0277 (0,0098)	25 (31)	0,0309 (0,0073)	– (–)
	TIMP-1	59 (50)	27 (49)	0,0168 (–)	32 (39)	0,0222 (–)	– (–)
	TIMP-2	49 (64)	42 (46)	– (–)	46 (52)	– (–)	– (–)
matrixdegrad. Enzyme	MMP-2	15 (31)	27 (67)	0,0472 (0,0116)	48 (212)	0,0090 (0,0006)	0,0021 (0,0014)
	MMP-9	13 (30)	27 (40)	0,0235 (–)	47 (140)	0,0198 (0,0043)	0,0032 (0,0067)
	MMP-13	13 (52)	17 (134)	– (0,0032)	29 (178)	0,0500 (0,0023)	0,0113 (–)
	uPA	15 (68)	20 (57)	– (–)	39 (294)	0,0267 (0,0001)	0,0281 (0,0001)
	uPAR	39 (90)	32 (93)	– (–)	38 (205)	– (0,0101)	– (0,0094)
Endothelzell-marker	CD31	43 (137)	48 (113)	– (–)	65 (298)	0,0211 (0,0066)	0,0234 (0,0053)
	VEGFR1	23 (44)	34 (47)	– (–)	54 (703)	0,0213 (0,0003)	0,0311 (0,0004)
	VEGFR2	31 (53)	45 (47)	– (–)	58 (102)	0,0381 (0,0192)	0,0431 (0,0109)

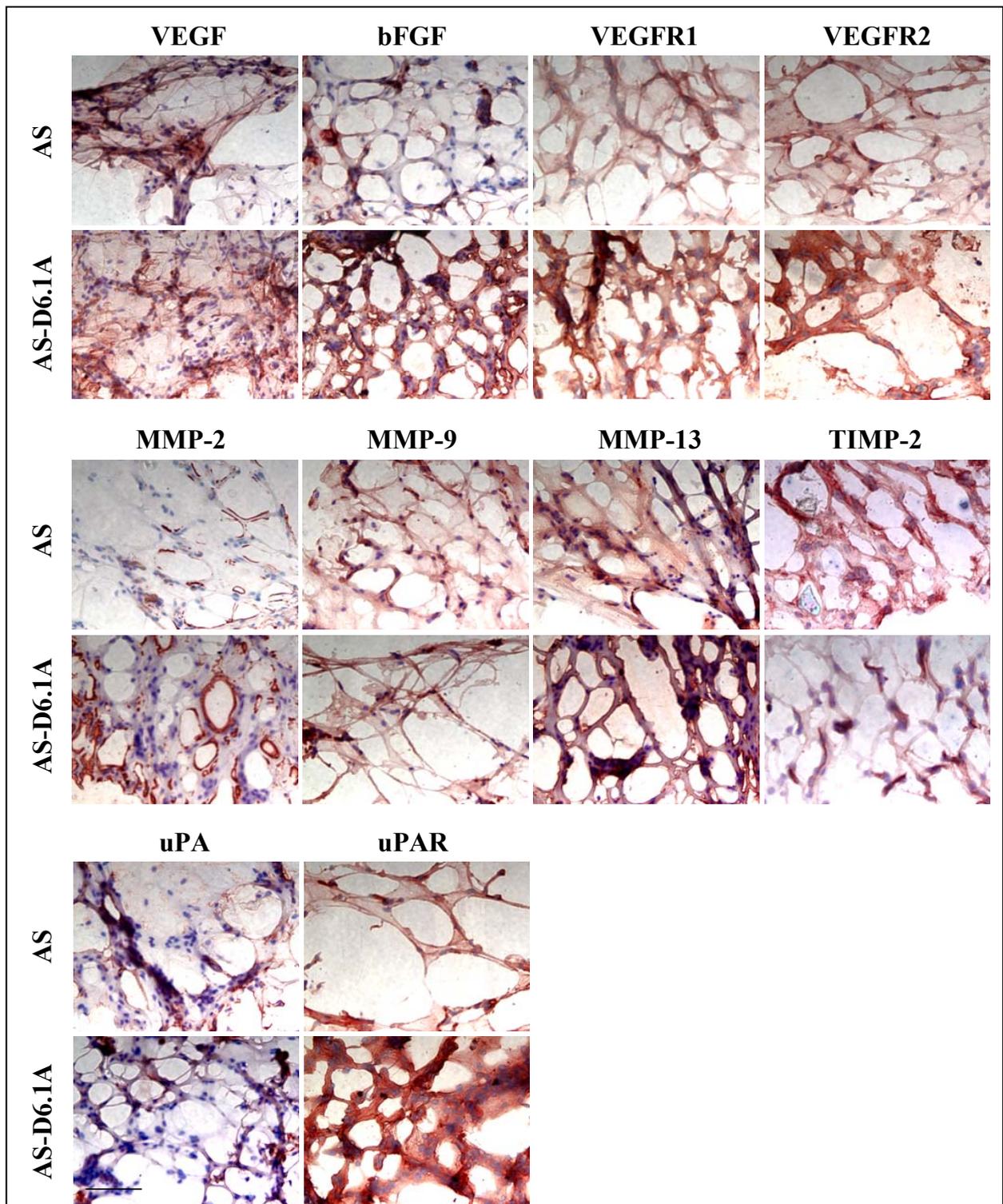
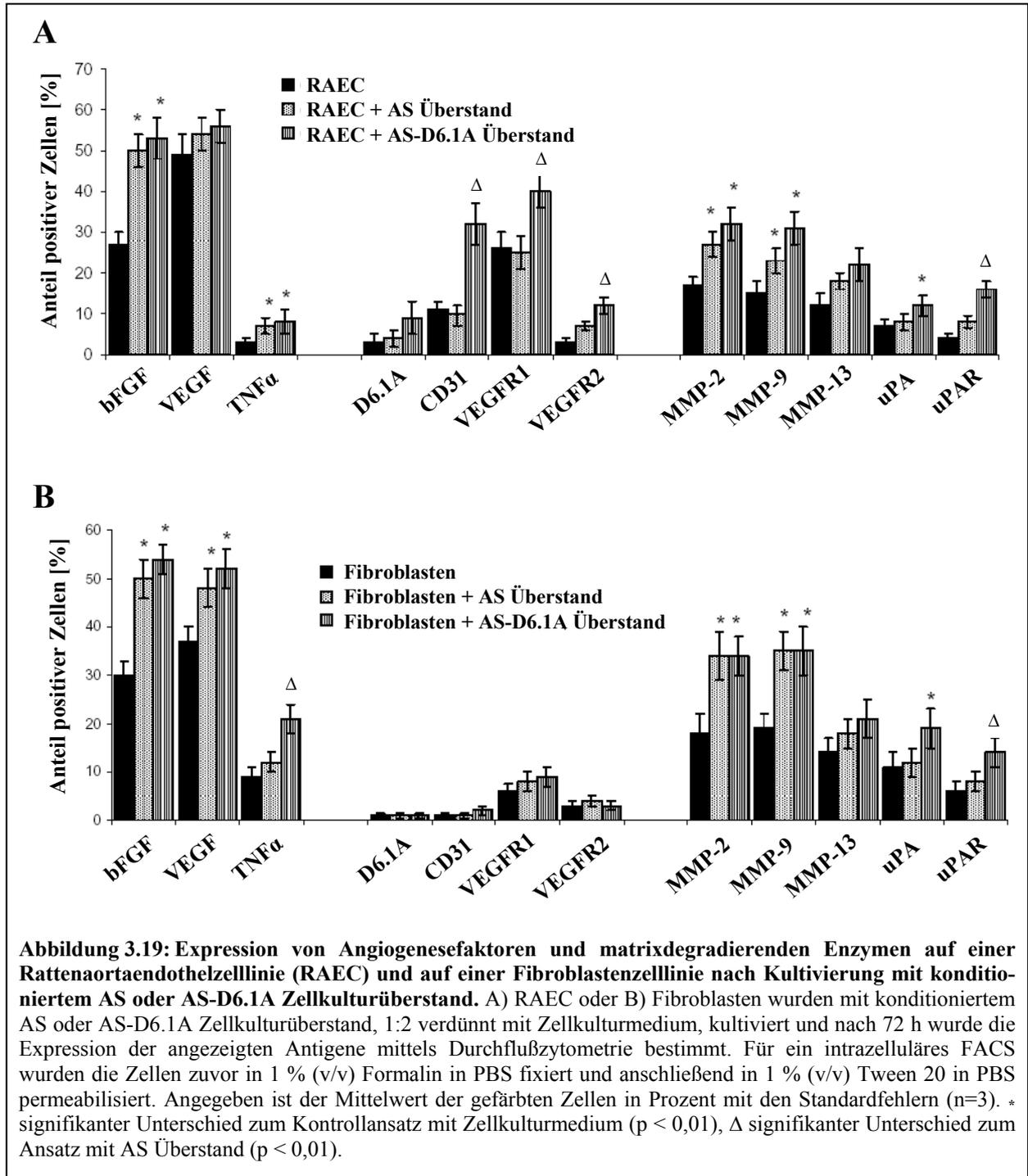


Abbildung 3.18: Expression von Angiogenesefaktoren auf den Mesenterien der Ratten nach Applikation der Tumorzellen. 5×10^6 AS oder AS-D6.1A Tumorzellen wurden intraperitoneal pro Ratte injiziert und nach sieben Tagen wurden die Mesenterien tiefgefroren und davon Gewebeschnitte ($5 \mu\text{m}$ Schnittdicke) angefertigt. Die Schnitte wurden mit anti-VEGF, anti-bFGF, anti-VEGFR1, anti-VEGFR2, anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-MMP-13, anti-TIMP-2, anti-uPA oder anti-uPAR als Primärantikörper inkubiert. Nach einer Inkubation mit dem jeweiligen Biotin-markierten Sekundärantikörper wurden die Schnitte einer AEC-Färbung unterzogen. Die Expression der Proteine ist an der rost-braunen Färbung der Zellen zu erkennen. Maßstab: $500 \mu\text{m}$.



4 Diskussion

Der Proteinfamilie der Tetraspanine werden vielfältige Funktionen zugeschrieben. Dies lässt sich u.a. darauf zurückführen, dass Tetraspanine sowohl untereinander als auch mit weiteren Transmembranmolekülen, wie z.B. mit Integrinen, interagieren. Sie bilden ein Netzwerk an Proteinen in Membranmikrodomänen aus, die speziell für die Einleitung von Signaltransduktionskaskaden geeignet sind. Bei der Vielzahl der Protein-Proteininteraktionen und der speziellen Membranlokalisation erscheint es nicht verwunderlich, dass den Tetraspaninen auch bei Tumorprogression und Metastasierung eine wesentliche Rolle zukommt. Interessanterweise werden jedoch einzelnen Tetraspaninen metastasierungsfördernde (CD151, CO-029), anderen metastasierungssupprimierende (CD9, CD82) Eigenschaften zugeschrieben. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht bekannt. Wir haben die Arbeitshypothese aufgestellt, dass entweder selektive Integrinassoziationen oder D6.1A-spezifische Charakteristika für die metastasierungsfördernden/supprimierenden Eigenschaften verantwortlich sind. Die beiden Hypothesen schließen sich nicht wechselseitig aus. Ich konnte nachweisen, dass D6.1A im Gegensatz zu CD9 auf humanen Pankreasadenokarzinomzelllinien mit $\alpha 6\beta 4$ assoziiert, wobei diese Interaktion Metastasierung fördert. Darüber hinaus konnte ich erstmals zeigen, dass ein Tetraspanin Angiogenese induziert. Mögliche Ursachen für diese beiden Phänomene möchte ich kurz diskutieren.

4.1 Einfluss der Kolo-kalisation von Integrinen und Tetraspaninen auf die Motilität humaner Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien

Aufgrund der frühen und starken Metastasierung des Pankreasadenokarzinoms in den Peritonealraum und anschließender Ansiedelung der Metastasen in der Leber, haben Patienten mit diesem Tumor eine überaus schlechte Prognose (Rosenberg und Lipsett, 2003; Kleeff et al., 2000; Perugini et al., 1998). Mehrere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die Integrine $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ bei der Metastasierung von Tumoren beteiligt sind (Hood und Cheresch, 2002; Bogenrieder und Herlyn, 2003). In früheren Untersuchungen wurde in unserem Labor gezeigt, dass in einer stark metastasierenden Pankreasadenokarzinomzelllinie,

die aus der Ratte isoliert wurde, das Integrin $\alpha 6\beta 4$ mit D6.1A/CO-029 nach Aktivierung der Proteinkinase C mit PMA assoziiert. Nach erfolgter Internalisierung dieses Komplexes veränderten die Zellen ihren Phenotyp, aus einem sessilen wurde ein migrationsfähiger Phenotyp (Herlevsen et al., 2003). Aufgrund dieser Tatsache haben wir die Hypothese formuliert, dass die Koexpression und die Interaktion von Integrinen mit Tetraspaninen insbesondere die Interaktion von $\alpha 6\beta 4$ mit dem Tetraspanin D6.1A eine Schlüsselrolle in der Metastasierung von Pankreasadenokarzinomen einnehmen könnte.

4.1.1 Integrin und Tetraspanin Expressionsprofil

Das Integrin Expressionsprofil von Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Logsdon et al. (2003) zeigten in ihrer Studie, dass auf Pankreasadenokarzinomen im Vergleich zu gesundem Gewebe oder im Vergleich zu chronischer Pankreatitis $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 4$ signifikant hochreguliert ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem hier dokumentierten Integrinexpressionsprofil der Tumorzelllinien. In den untersuchten Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien war $\alpha 2$, $\alpha 6$ und $\beta 4$ hoch exprimiert. $\alpha 3$ war auf den untersuchten Pankreasadenokarzinomzelllinien stärker exprimiert als auf den Kolorektalkarzinomzelllinien. Auch die Expression einiger Mitglieder der Tetraspaninfamilie wurden auf Pankreas- und Kolorektalkarzinomen untersucht. Crnogorac-Jurcevic et al. (2001) verglichen die Proteinexpression von humanem Pankreaskarzinomgewebe mit gesundem Gewebe. Sie stellten eine Herunterregulation von CD9 im Karzinomgewebe gegenüber gesundem Gewebe fest. Sho et al. (1998) untersuchten die mRNA Expression von CD9, CD63 und CD82 in humanen Pankreasadenokarzinomen und verglichen die Expression mit der Tumorprogression. Die Expression von CD63 war in allen Proben unverändert, jedoch zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Expression von CD9 und CD82 und dem Tumorstatus. Die Überlebensrate der Patienten mit einer geringen Expression von CD9 im Tumor war signifikant niedriger als für die Patienten mit CD9-positiven Tumoren. Ebenso war die Überlebensrate der Patienten mit CD82-positiven Tumoren signifikant höher als für Patienten mit erniedrigter CD82 Expression. Die Transfektion von CD82 cDNA in die stark metastasierende Kolorektalkarzinomzelllinie Lovo führte zu einer verringerten Adhäsion an Komponenten der EZM und zu einer verringerten *in vitro* Zellinvasion (Liu et al., 2003). Im Gegensatz dazu führte die i.v. Injektion von CD82 transfizierten humanen Lungenkarzinomzelllinien in SCID Mäuse zu einer ausgeprägten multiorganen Metastasierung (Shinohara et al., 2001). Obwohl CD82 als ein Metastasierungssuppressorprotein be-

kannt ist, scheint es unter bestimmten Bedingungen die Metastasierung zu unterstützen. Eine eindeutige Korrelation zwischen der Expression von CD9 und CD82 auf den hier untersuchten Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien mit dem Metastasierungspotenzial konnte nicht festgestellt werden. Die nichtmetastasierende Pankreasadenokarzinomzelllinie BxPC3 exprimiert CD9 z.B. zu einem geringeren Niveau als die metastasierende Zelllinie Capan2. Dasselbe konnte für die Expression von CD82 festgestellt werden, so exprimiert die schwach metastasierende Zelllinie Panc1 CD82 viel stärker als die nichtmetastasierende Zelllinie MiaPaca1. Allerdings konnte eine Korrelation zwischen der Proteinexpression und dem Metastasierungspotenzial für das Tetraspanin CO-029 festgestellt werden. Das Integrin $\alpha 6\beta 4$ ist auf vielen invasiven und metastasierenden Tumoren, wie Brust-, Blasen- und Kolorektalkarzinomen hochreguliert (Mercurio und Rabinovitz, 2001). Jedoch konnte bei den hier untersuchten Karzinomzelllinien keine Korrelation zwischen der Expression von $\alpha 6\beta 4$ und dem Metastasierungspotenzial nachgewiesen werden. Die Expression der $\beta 4$ -Integrinkette ist sowohl auf metastasierenden als auch auf nichtmetastasierenden Tumorzelllinien hoch. Dies spricht dafür, dass nicht alleine die Expression von bestimmten Integrinen und Tetraspaninen für das Metastasierungspotenzial von Karzinomzelllinien ausschlaggebend ist, sondern vielmehr die unterschiedlichen Assoziationspartner und die Organisation dieser Moleküle in definierten Komplexen bei der Invasion und Metastasierung eine wichtige Rolle spielen.

4.1.2 Kolokalisation von Integrinen und Tetraspaninen

Tetraspanine bilden auf Plasmamembranen ein ausgedehntes Netzwerk und sind Bestandteil von multimolekularen Komplexen. In diesen Komplexen assoziieren sie mit anderen Transmembranmolekülen. Assoziationen von Tetraspaninen mit Integrinen wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Maecker et al., 1997; Sincock et al., 1999; Yauch et al., 1998). Das Tetraspanin CD151 assoziiert mit $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ (Yauch et al., 1998; Berditchevski et al., 2001; Sterk et al., 2000). CD9 assoziiert vor allem mit $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ (Charrin et al., 2001; Kawakami et al., 2002). CD81 bildet Komplexe mit z.B. $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 4\beta 1$ (Charrin et al., 2001; Stipp und Hemler, 2000). Das Rattenhomolog von CO-029 (D6.1A) assoziiert mit $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ und nach Auflösung der Hemidesmosome mit $\alpha 6\beta 4$ (Claas et al., 1998; Herlevsen et al., 2003). Die Ergebnisse der Kolokalisation von Tetraspaninen und Integrinen der humanen Pankreasadeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien stimmen mit den hier beschriebenen Eigenschaften überein. $\alpha 3\beta 1$ kolokalisierte häufig mit den Tetraspaninen CD9, CD81 und CD151. Im Gegensatz dazu kolokalisierte $\alpha 6\beta 4$ mit den Tetraspaninen

CD151 und CO-029. Die Ergebnisse der Kolo-kalisation konnten durch die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation bestätigt werden. Sterk et al. (2000) konnten CD151 in $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ Immunkomplexen nach erfolgter Lysis der Zellen in 1 % CHAPS nachweisen. Nach der Lysis mit einer stringenteren Detergenz, 1 % NP-40, war CD151 nur noch in $\alpha 3\beta 1$ Immunkomplexen zu finden. Auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Karzinomzelllinien konnte CD151 sowohl mit $\alpha 3$ als auch mit $\beta 4$ unter der Lysisbedingung von 1 % Brij96 koimmunpräzipitiert werden. CO-029 koimmunpräzipitierte unter der schwachen Lysisbedingung von 1 % Brij58 mit $\alpha 3$ und $\beta 4$, aber unter der stringenteren Lysisbedingung von 1 % Brij96 war es nur in $\alpha 3$ Koimmunpräzipitaten zu detektieren. Herlevsen et al. (2003) zeigte, dass das Rattenhomolog von CO-029 (D6.1A) nach der Lysis mit 1 % CHAPS mit $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 4$ koimmunpräzipitiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Aktivierung der PKC durch PMA zu einer Internalisierung von D6.1A und $\alpha 6\beta 4$ führt und beide Moleküle wieder an den Lamellipodien exprimiert werden. Da Tetraspanine auch untereinander in Wechselwirkung treten (Hemler, 2001), kann man davon ausgehen, dass CO-029 nicht direkt, sondern über das Tetraspanin CD151 mit dem $\alpha 6\beta 4$ Integrin assoziiert. Mehrere Ergebnisse bestätigen diese Hypothese. Das Profil der Koimmunpräzipitation von CO-029 mit $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ stimmt mit dem Profil von CD151 überein. CD9 koimmunpräzipitierte mit $\alpha 3$, aber nicht mit $\beta 4$. Die Kolo-kalisation von CD9 mit $\alpha 3\beta 1$ wurde hauptsächlich an Zell-Zell Kontakten dokumentiert, wo $\alpha 6\beta 4$ /CD151 und $\alpha 6\beta 4$ /CO-029 Komplexe nur geringfügig vorhanden waren. Eine Behandlung mit PMA verstärkte die Wechselwirkung von $\alpha 6\beta 4$ mit CD151 bzw. mit CO-029, aber schwächte die Assoziation von CD9 mit $\alpha 3$. Die PMA bedingte Internalisierung von CD151, CO-029 und $\beta 4$ ähnelte sich, während sich aber Unterschiede mit der Internalisierung von CD9 und $\alpha 3$ zeigten.

CD151- $\alpha 3\beta 1$ Komplexe widerstehen starken Detergenzien und treten in hoher Stöchiometrie auf (Hemler, 2001). Die Beobachtung, dass CD151 eine Assoziation mit $\alpha 6\beta 4$ bevorzugte, könnte mit den Ergebnissen von Sterk et al. (2000) erklärt werden. Sie zeigten, dass CD151 in Hemidesmosomen mit $\alpha 6\beta 4$ assoziiert und nur ein geringerer Teil mit $\alpha 3\beta 1$ assoziiert bleibt und in die Fokalkontaktstellen umgelagert wird. Sie konnten zusätzlich zeigen, dass CD9 von den CD151- $\alpha 6\beta 4$ Komplexen ausgeschlossen bleibt. Dies konnte in dieser Arbeit für die CD151-CO-029- $\alpha 6\beta 4$ Komplexe bestätigt werden, nur die Zelllinie SW707 stellte eine Ausnahme dar. Hier konnte CD9 auch mit $\beta 4$ koimmunpräzipitiert werden. Man könnte deshalb davon ausgehen, dass in Abwesenheit von $\alpha 6\beta 4$ oder Laminin 5, $\alpha 3\beta 1$ sich in Komplexen mit CD151, CD9 und CO-029 befindet. Im Gegensatz dazu führt die gleichzeitige Expression von $\alpha 6\beta 4$ zu einer Umorganisation der Tetraspanin-Integrin-Komplexe. In den CD151- $\alpha 6\beta 4$ Kom-

plexen assoziiert CO-029 über CD151 mit $\alpha 6\beta 4$, während CD9 hauptsächlich mit $\alpha 3\beta 1$ assoziiert bleibt. Die Ursache dieser Umlagerung ist noch nicht vollständig aufgeklärt und benötigt weitere Untersuchungen. Ein möglicher Grund könnte eine Konkurrenz der Integrine um Laminin 5 sein oder Unterschiede in den cytoplasmatischen Regionen der Tetraspanine. So besitzen z.B. CO-029 und CD151, aber nicht CD9, ein Tyrosin-basierendes Internalisierungssignal (Berditchevski, 2001). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass CO-029-CD151- $\alpha 6\beta 4$ Komplexe in internalisierten Vesikel auftauchen, die später an der Migrationsfront wieder mit der Plasmamembran verschmelzen.

4.1.3 Auswirkung der Tetraspanin-Integrin-Komplexe auf die Zellmotilität

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Tetraspanine durch die Interaktion mit Integrinen einen Einfluss auf die Zelladhäsion und damit auch auf die Migration haben. Winterwood et al. (2006) zeigten, dass eine Herunterregulation der CD151 Expression durch retrovirale RNA Interferenz in epidermalen Karzinomzellen zu einer geringeren Motilität auf Laminin 5 führt. Weiterhin wurden die Assoziation von $\alpha 3\beta 1$ mit Tetraspaninmikrodomänen und die Internalisierung von $\alpha 3\beta 1$ bei auf Laminin 5 migrierenden Zellen beeinträchtigt. Die $\alpha 3\beta 1$ - und $\alpha 6\beta 4$ -vermittelte Adhäsion an Laminin 5 war ebenfalls verringert. Penas et al. (2000) zeigten eine Beteiligung von $\beta 1$ -Integrinen an der Adhäsion und Migration von Keratinozyten. Sie fanden eine Akkumulation von CD9, CD81 und CD151 zusammen mit $\alpha 3$ und $\beta 1$ -Integrinketten an interzellulären Verknüpfungspunkten. Antikörper gegen CD9, CD81, $\beta 1$ und $\alpha 3$ hemmten die Migration, anti-CD151 hemmte dagegen nur zu einem geringeren Ausmaß. In dieser Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass $\alpha 3\beta 1$ hauptsächlich mit CD9 an Zell-Zell-Kontaktstellen kolokalisiert. Eine Kolokalisation von CD151 und CO-029 mit $\alpha 6\beta 4$ konnte an diesen Zell-Zell-Kontaktstellen kaum nachgewiesen werden. Zum anderen führte die PMA induzierte Internalisierung zu einer unterschiedlichen Relokalisation der CD151-CO-029- $\alpha 6\beta 4$ und der CD9- $\alpha 3\beta 1$ Komplexe. Diese Unterschiede in der Relokalisation von Tetraspanin-Integrin-Komplexen könnte eine wesentliche Rolle bei der Migration haben. Mit Ausnahme von Panc89 und WIDR führt eine Behandlung mit PMA zu einer gesteigerten Migration auf Laminin 5. Unabhängig davon, ob eine PMA-Behandlung einen Einfluss auf die Migration hatte, wurde in allen untersuchten Zellen durch PMA eine verstärkte Internalisierung der $\alpha 3/CD9$ Komplexe festgestellt. Unterschiede zeigten sich allerdings bei den $\beta 4/CD151$ und bei den $\beta 4/CO-029$ Komplexen. Die Karzinomzelllinien, die ihr Migrationsverhalten durch eine PMA-Behandlung nicht veränderten, wiesen keine

Internalisierung der $\beta 4$ /CD151 und $\beta 4$ /CO-029 Komplexe auf. Die Internalisierung der $\beta 4$ /CD151/CO-029 Komplexe scheinen also wesentlich an der PMA-induzierten Migration beteiligt zu sein. Die PMA-induzierte Migration ist auf eine geringere Adhärenz der Zellen an Laminin 5 zurückzuführen. Anti- $\beta 4$ führte, wie die Behandlung mit PMA, in allen untersuchten Karzinomzelllinien zu einer geringeren Adhärenz an Laminin 5. Im Gegensatz dazu hatte anti- $\alpha 3$ nicht in allen untersuchten Zelllinien einen Einfluss auf die Adhärenz. Auch dieses Ergebnis deutet auf eine wesentliche Beteiligung der $\beta 4$ -Tetraspanin Komplexe im Vergleich zu $\alpha 3$ -Tetraspanin Komplexe an der Migration der Karzinomzelllinien hin. Insgesamt kann man sagen, dass die PMA-induzierte Komplexbildung von CD151, CO-029 und $\alpha 6\beta 4$ und die gesteigerte Internalisierung mit einer erhöhten Migration und einer verminderten Adhäsion der Zelllinien an Laminin 5 korrelierte. Die Pankreasadenokarzinomzelllinie Panc89 migrierte unabhängig von einer PMA-Behandlung sehr gut auf Laminin 5. Vor und nach einer PMA-Behandlung waren die $\beta 4$ /CD151 und $\beta 4$ /CO-029 Komplexe gleich stark auf der Zelloberfläche exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass es neben der Internalisierung von Integrin-Tetraspanin-Komplexen noch weitere Mechanismen geben muss, die der Zelle ein hohes Migrationsverhalten ermöglichen.

Die Pankreasadenokarzinomzelllinien AsPC1, Capan1, Colo357 und 818 sowie die Kolorektalkarzinomzelllinie HT29 sind als metastasierende bzw. als stark metastasierende Zelllinien beschrieben worden. Diese Zelllinien gewannen an Motilität nach Aktivierung der Proteinkinase C durch PMA. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei WIDR oder Panc89 um eine schwach bzw. nicht metastasierende Zelllinie. Die Vermutung liegt nahe, dass die stimulationsbedingte Internalisierung von CD151/CO-029 und $\alpha 6\beta 4$ zu einer erhöhten Tumorzellmotilität führen könnte und damit einen Beitrag an der starken Metastasierung von Pankreas- und Kolorektalkarzinomen haben könnte. Neben der Beteiligung der Tetraspanin-Integrin-Komplexe gibt es noch weitere Moleküle, die einen wesentlichen Beitrag an der Invasion und Metastasierung von Pankreas- und Kolorektalkarzinomen haben. Tzanakakis et al. (2003) beschrieben einen Zusammenhang zwischen dem Metastasierungspotenzial und der Aktivität von Cathepsin B, einer lysosomalen Cysteinprotease. Je größer das Metastasierungspotenzial einer humanen Pankreaskarzinomzelllinie war, desto höher war die Aktivität von Cathepsin B. Jimenez et al. (2000) konnten zeigen, dass der Matrixmetalloproteinaseinhibitor BB-94 bei den zwei untersuchten Pankreasadenokarzinomzelllinien *in vitro* zu einer geringeren Invasion der Tumorzellen führte und *in vivo* die Überlebensrate der Tiere erhöht wurde. Zusätzlich wurden weniger Metastasen bei Behandlung mit BB-94 im Vergleich zu den Kontrolltieren dokumentiert. In einer weiteren Studie wurden 9 humane

Kolorektalkarzinomzelllinien auf Tumorigenität, Wachstums- und Metastasierungsverhalten nach subkutaner Applikation oder nach Applikation in die Darmwand untersucht. Zusätzlich wurde das Invasionsverhalten *in vitro*, die Expression von E-Cadherin *in vivo* und *in vitro* und die Produktion von uPA und tPA *in vitro* dokumentiert (de Vries et al., 1995). Sie fanden, dass das Invasionsverhalten *in vitro* nicht mit dem Invasionsverhalten *in vivo* korrelierte, ebenfalls unterschied sich die Expression von E-Cadherin *in vivo* und *in vitro* und das nicht-invasive Verhalten der Zelllinien *in vitro* stand in Zusammenhang mit einer homogenen Expression von E-Cadherin und mit einer geringeren Produktion von uPA. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die Umgebung des Tumors einen wesentlichen Einfluss auf das invasive und metastatische Verhalten von Tumoren hat und dass *in vitro* Ergebnisse mögliche Mechanismen und Wege aufklären können, aber letztendlich diese Ergebnisse *in vivo* überprüft werden müssen.

4.2 Einfluss des Tetraspanins D6.1A und des Integrins $\alpha 6\beta 4$ auf die Neoangiogenese von Pankreasadenokarzinomen

Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass CO-029 zusammen mit $\alpha 6\beta 4$ und CD151 in Komplexen vorhanden ist, diese Komplexe nach Aktivierung der PKC durch PMA internalisiert werden und die Internalisierung dieser CO-029/CD151/ $\alpha 6\beta 4$ Komplexe einen wesentlichen Beitrag an der Migration der Tumorzellen auf Laminin 5 haben. Neben dem Einfluss der Tetraspanin-Integrin-Komplexe auf die Migration von Tumorzellen, wird ebenfalls ein Einfluss der Tetraspanine auf die Angiogenese vermutet. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil der Arbeit im Metastasenmodell in der Ratte der Einfluss des Tetraspanins D6.1A (CO-029) in Wechselwirkung mit dem Integrin $\alpha 6\beta 4$ auf die zelluläre Morphogenese und Tumorangio-genese untersucht.

4.2.1 Rolle des Tetraspanins D6.1A bei der zellulären Morphogenese

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen, die D6.1A exprimieren, auf Matri-gel kabelstrukturartig wachsen und die gleichzeitige Expression von $\alpha 6\beta 4$ einen inhibitorischen Effekt auf die D6.1A-induzierte Kabelstruktur hat. Zhang et al. (2002) konnten dies ebenfalls für ein weiteres Tetraspanin nachweisen. CD151 überexprimierende NIH3T3 Zellen

zeigten auf Matrigel ein kabelstrukturartiges Wachstum. Diese Kabelstruktur war auf die Assoziation von $\alpha 6\beta 1$ mit CD151 zurückzuführen. Sowohl anti- $\alpha 6\beta 1$ als auch anti-CD151 blockierte die Ausbildung der Kabelstruktur. Sie konnten zusätzlich zeigen, dass eine Deletion von 8 Aminosäuren vom C-Terminale Ende des Tetraspanins keinen Einfluß auf die Assoziation von CD151 mit $\alpha 6\beta 1$ hatte, vielmehr aber wurde das „outside-in“ Signal des Integrins nach Ligandenbindung unterbunden. Im Gegensatz dazu führt die Expression von CD82 zu einer Inhibition der Kabelstruktur in Du145 Prostatakarzinomzellen (He et al., 2005). Weder anti-CD9, anti-CD81 oder anti-CD151 konnten die Kabelstruktur unterbinden. Die Inhibition der Kabelstruktur durch CD82 wird auf eine verringerte Expression von $\alpha 6\beta 1$ auf der Zelloberfläche zurückgeführt. Die D6.1A-induzierte Kabelstruktur konnte durch D6.1 und anti- $\alpha 3$, aber nicht durch anti- $\alpha 6$, anti-CD9, anti-CD81 und anti-CD151 blockiert werden. D6.1A assoziiert mit $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ und nach Auflösung der Hemidesmosome mit $\alpha 6\beta 4$ (Claas et al., 1998; Herlevsen et al., 2003). Durch die gleichzeitige Expression von D6.1A und $\alpha 6\beta 4$, tritt D6.1A in Komplexen zusammen mit $\alpha 6\beta 4$ auf, wodurch dies zu einer Umorganisation der bestehenden Tetraspanin-Integrin-Komplexe führt. Diese Umorganisation der Tetraspanin-Integrin-Komplexe könnte den hemmenden Einfluss von $\alpha 6\beta 4$ auf die D6.1A-induzierte Kabelstruktur erklären.

Die morphologischen Eigenschaften der Tetraspanine unterscheiden sich, auch wenn die Zellen ein ähnliches Tetraspaninprofil vorweisen. Die genauen Mechanismen, welche diesem Phänomen zugrunde liegen, sind noch nicht bekannt, jedoch kann man davon ausgehen, dass das zelltypische Expressionsprofil der Integrine und die Wechselwirkung der Integrine mit den Tetraspaninen eine wichtige Rolle bei der Morphogenese haben.

4.2.2 Das Tetraspanin D6.1A induziert die Tumorangiogenese

Durch die *in vivo* Experimente konnte gezeigt werden, dass in D6.1A-exprimierenden AS Tumoren signifikant mehr Kapillaren vorhanden sind, als in AS Tumoren, die kein D6.1A exprimieren. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die D6.1A-induzierte Angiogenese durch die gleichzeitige Expression von $\alpha 6\beta 4$ gehemmt werden konnte. Dieses Ergebnis bestätigt den Einfluss von D6.1A und $\alpha 6\beta 4$ auf die zelluläre Morphologie; auch bei diesen Versuchen führte die gleichzeitige Expression von $\alpha 6\beta 4$ zu einer Inhibition der D6.1A-induzierten Kabelstruktur der Tumorzellen auf Matrigel. Bei der Induktion der Angiogenese durch D6.1A handelt es sich um einen D6.1A spezifischen Effekt, denn D6.1, aber nicht der Antikörper gegen ein anderes Tetraspanin, anti-CD151, konnte die Tumorangiogenese blockieren.

Der Antikörper D6.1 inhibierte nicht nur die D6.1A-induzierte Angiogenese, sondern auch die wesentlich schwächere Angiogenese in den AS Tumoren. Eine mögliche Erklärung für die Inhibition der Angiogenese in AS Tumoren durch D6.1 ist die Tatsache, dass neugebildete Kapillaren D6.1A hochregulieren. Diese Expression von D6.1A auf den Endothelzellen könnte einen wesentlichen Beitrag an der Aufrechterhaltung der Angiogenese spielen. Die Blockierung von D6.1A auf den Endothelzellen könnte damit die Inhibition der Tumorangiogenese erklären.

Um auszuschließen, dass die D6.1A induzierte Angiogenese auf ein schnelleres Tumorwachstum von AS-D6.1A Tumoren zurückzuführen ist, wurde die Proliferation der Tumorzellen überprüft. Die AS Tumorzellen proliferierten sogar schneller als die AS-D6.1A Tumorzellen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Angiogenese auf die Expression von D6.1A und nicht auf ein schnelleres Tumorwachstum zurückzuführen ist. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass der hemmende Effekt von D6.1 auf die Angiogenese nicht auf einer Hemmung des Tumorwachstums beruht. Weder D6.1, anti-CD151 oder anti-CD9 hatte einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Tumorzelllinien.

4.2.3 Exosome von AS-D6.1A Tumorzellen enthalten D6.1A und induzieren die Neoangiogenese

Die AS-D6.1A-induzierte Angiogenese war unabhängig von direkten Zell-Zell-Kontakten zwischen Tumorzellen und Endothelzellen. Allein der Überstand der Tumorzellen reichte aus, um im *in vitro* Modell Angiogenese zu induzieren. Daher wurde konditionierter Überstand von AS und AS-D6.1A Tumorzellen auf das Vorhandensein wesentlicher angiogenetischer und anti-angiogenetischer Faktoren untersucht. Jedoch wurden nur geringfügige Unterschiede in den sekretierten angiogenetischen Faktoren dokumentiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass D6.1A im Überstand vorhanden sein muß und maßgeblich an der Angiogeneseinduktion beteiligt ist. Tetraspanine werden bekanntermaßen in Vesikeln, den sogenannten Exosomen, von den Tumorzellen abgegeben (Caby et al., 2005; Andre et al., 2002; Escola et al., 1998). In der Tat war das von den AS-D6.1A Tumorzellen abgegebene D6.1A ausschließlich in den Exosomen nachzuweisen, während VEGF nur im Überstand der Tumorzellen detektiert wurde. Die von den AS-D6.1A Tumorzellen isolierten Exosomen wurden noch nicht vollständig auf ihre Proteinzusammenstellung untersucht, aber es konnte gezeigt werden, dass die AS bzw. AS-D6.1A Exosome ein unterschiedliches Proteinprofil aufweisen. Interessanterweise sind die Exosomen allein in der Lage Angiogenese zu induzieren, obwohl sie kein VEGF

enthalten. Da Tetraspanine in multimolekularen Komplexen mit einer Vielzahl von Transmembranmolekülen interagieren, könnte man vermuten, dass das Tetraspanin D6.1A als Adapter fungiert und auf diese Weise andere Moleküle, die in dem Prozess der Angiogenese involviert sind, in die Exosomen vermehrt transportiert. Das Vorhandensein von D6.1A in den Exosomen stellt eine weitere mögliche Erklärung für die Inhibition der Angiogenese durch den Antikörper D6.1 dar, der sowohl die durch AS-D6.1A Überstand als auch die durch AS-D6.1A Exosomen induzierte Angiogenese blockiert. D6.1 könnte also auch direkt das D6.1A in den Exosomen blockieren und eine mögliche Interaktion mit den Endothelzellen unterbinden. Ein weiterer Hinweis für die Unabhängigkeit der Angiogenese von Zell-Zell-Kontakten ist das Vorhandensein der Angiogenese nach intraperitonealer Applikation der AS-D6.1A Tumorzellen in einem entfernten Organ, dem Pankreas. Es wäre also möglich, dass D6.1A auf den Exosomen mit den Endothelzellen interagiert, auf eine noch unbekannt Art und Weise die Endothelzellen aktiviert und dadurch die Angiogenese auslöst.

4.2.4 Einfluss von D6.1A auf die Tumorumgebung

In der Tat üben die AS-D6.1A Zellen bzw. der AS-D6.1A Überstand ihren Einfluss nicht nur auf die Endothelzellen aus, sondern auch benachbarte Zellen werden aktiviert und zur Sekretion von angiogenetischen Faktoren und von Enzymen angeregt, die aktiv an der Angiogenese beteiligt sind. Die Peritonealmakrophagen stellen offensichtlich nicht den Hauptangriffspunkt der AS-D6.1A Tumorzellen dar. Ein signifikanter Unterschied zwischen den AS-D6.1A und den AS Tumorzellen bestand nur in der Hochregulation von uPA und uPAR. Dies war jedoch für die Mesenterialzellen anders. Die Expression von mehreren Angiogenesegenen, wie bFGF, VEGF, MMP-2 und MMP-9 wurden sowohl in der Gegenwart von AS als auch von AS-D6.1A Tumorzellen hochreguliert. Jedoch wurde die Expression von folgenden Genen, CD31, D6.1A und VEGFR, durch AS-D6.1A Zellen bzw. Überstand gegenüber den AS Zellen bzw. Überstand signifikant hochreguliert. Die Hochregulation dieser endothelialen Zellmarker wurde durch die Kokulturversuche der Rattenaortaendothelzelllinie (RAEC) mit AS oder AS-D6.1A Überstand bestätigt. In der Tat ist die Hochregulation von D6.1A ein generelles Phänomen neu gebildeter Kapillaren, unabhängig davon, ob die Tumorzellen D6.1A exprimieren oder nicht. Die Angiogenese ist jedoch bei der Abwesenheit von D6.1A in den Tumorzellen schwächer ausgeprägt. Man kann davon ausgehen, dass die D6.1A abhängige Hochregulation der Gene nicht direkt auf D6.1A zurückzuführen ist, sondern eine Art Endeffekt darstellt. D6.1A induziert nicht direkt die Transkription von mehreren Genen, son-

dem aktiviert die Angiogenese durch einen Mechanismus, der bis jetzt noch nicht aufgeklärt ist. Die Tatsache, dass der Überstand von AS-D6.1A Tumorzellen auf die etablierten Zelllinien einen geringeren Effekt ausübt als auf die Mesenterien im *in vitro* Kokulturmodell, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass eine Interaktion nicht nur zwischen den Tumorzellen bzw. den von den Tumorzellen abgegebenen Exosomen und den Endothelzellen besteht, sondern dass auch eine Interaktion zwischen dem Tumor und dem umgebenden Stroma vorhanden sein muss. Zusätzlich könnte die starke Expression von D6.1A auf den neu gebildeten Kapillaren einen sogenannten „angiogenetischen Loop“ bilden, der wiederum die Angiogenese unterstützt und aufrechterhält.

Weiterhin ist folgendes festzuhalten, die Induktion der Angiogenese durch D6.1A ist unabhängig vom Sauerstoffangebot, d.h. die Angiogenese wird nicht durch eine Hypoxie ausgelöst. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass erstens im *in vitro* Kokulturmodell bereits nach 72 h unter normalem Atmosphärensauerstoffgehalt die Angiogenese induziert wurde und zweitens in den *in vivo* Experimenten die Angiogenese in einem Tumor-freien Organ angeschaltet wurde.

Die biochemischen Mechanismen, die der D6.1A induzierten Angiogenese zugrunde liegen, sind noch nicht aufgeklärt. Da D6.1A auf sprossenden Kapillaren stark exprimiert wird und der Antikörper D6.1 die Angiogenese inhibiert, und zwar sogar dann, wenn der Tumor kein D6.1A exprimiert, liegt die Vermutung nahe, dass die Expression von D6.1A auf den Endothelzellen einen frühen Prozess in der D6.1A induzierten Tumorangiogenese darstellt. Die Expression von D6.1A auf den Endothelzellen könnte damit die Aufrechterhaltung der Angiogenese unterstützen.

4.2.5 D6.1A-induzierte Angiogenese und mögliche involvierte biochemische Signaltransduktionswege

Tetraspanine, u.a. auch das Tetraspanin D6.1A, sind in Glykolipid-reichen Membranmikrodomänen lokalisiert (Zhang et al., 2001). Diese Membranmikrodomänen dienen als Plattform für Signaltransduktionsmoleküle (Levy und Shoham, 2005; Wright et al., 2004; Hemler, 2003). Einige Tetraspanine assoziieren mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren und beeinflussen dadurch die Signaltransduktion über heterotrimere G-Proteine (Little et al., 2004). Obwohl eine Assoziation von D6.1A mit einem G-Protein gekoppelten Rezeptor noch nicht bekannt ist, konnte Claas et al. (2005) eine Assoziation mit dem Prostaglandin F_{2α} Rezeptor regulatorischen Protein nachweisen, welche die Bindung von Liganden zu G-Protein gekop-

pelten Rezeptoren reguliert (Orlicky et al., 1996). Außerdem ist bekannt, dass D6.1A mit der PKC und der Typ II Phosphoinositol-4-Kinase assoziiert, welche die Signaltransduktion über die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolzweiphosphat einleitet (Claas et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit wäre die Aktivierung von assoziierten Integrinen (Levy und Shoham, 2005; Hemler et al., 2003). D6.1A assoziiert mit $\alpha 3$ (Claas et al., 1998), das während der D6.1A-induzierten Angiogenese - ähnlich wie die Expression von $\alpha 4$ - auf Endothelzellen stark hochreguliert wird. Sowohl für $\alpha 3$ als auch für $\alpha 4$ wurde ein Einfluss auf die Expression von MMPs beschrieben. $\alpha 3\beta 1$ reguliert die MMP-9 Expression über die Stabilisierung der MMP-9 mRNA (Iyer et al., 2005) und Kubota et al. (1997) konnten zeigen, dass der aktivierende Antikörper anti- $\alpha 3$ ein Signaltransduktionsweg auslöst, der in einer erhöhten Sekretion und Aktivierung von proMMP-2 endet. Auf der anderen Seite führte der blockierende Antikörper anti- $\alpha 4$ zu einer reduzierten MMP-2 und MMP-9 Produktion (Esparza et al., 1999). Es gibt also mehrere Mechanismen, wie D6.1A einen Beitrag an der Transkription und Aktivierung von Angiogenese fördernden Molekülen haben kann. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den genauen Signaltransduktionsweg aufzuklären.

4.2.6 Interaktion von D6.1A mit Endothelzellen

Schließlich bleibt die Frage zu beantworten, wie D6.1A mit den Endothelzellen interagieren kann. Eine Möglichkeit wäre, dass diese Interaktion von D6.1A assoziierten Transmembranmolekülen vermittelt wird und/oder von Molekülen, die in D6.1A enthaltenen Exosomen angereichert vorliegen. Clayton et al. (2004) konnten zeigen, dass sezernierte Exosome von B-Zellen Integrine beinhalten und die Exosome über diese Integrine mit Komponenten der EZM und mit Cytokin-aktivierten Fibroblasten interagieren. Es wäre also gut möglich, dass die Interaktion mit den Endothelzellen von Integrinen vermittelt wird, die in den Exosomen enthalten sind, und dass diese Integrine durch das Tetraspanin D6.1A vermehrt in die Exosomen eingebaut werden. Die proteinsortierenden Eigenschaften der Tetraspanine wurde bereits für die immunologische und die sogenannte infektiöse Synapse beschrieben und wären eine mögliche Erklärung für eine sogenannte Transaktivierung der Endothelzellen durch die Exosome. So ist z.B. das Tetraspanin CD81 auf B-Zellen im Signaltransduktionskomplex mit CD19, CD21 und Leu-13 enthalten. Man vermutet, dass CD81 als ein Adaptormolekül fungiert und den B-Zell Korezeptorkomplex in Signaltransduktionskomplexe in Lipid Rafts einschleußt und dort stabilisiert (Tarrant et al., 2003). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Dendritische Zellen beim Kontakt mit T-Zellen intrazelluläres HIV-1 zusammen mit CD9 und

CD81 in die infektiöse Synapse translokalisieren (Garcia et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Exosomen mit den Endothelzellen fusionieren. Für CD9 wurde eine wesentliche Rolle in der Fusion von Spermatozoen mit der Eizelle und in der Fusion von Myoblasten beschrieben. CD9 knockdown Mäuse produzieren Eizellen, die nicht mehr in der Lage sind mit einem Spermatozoon zu fusionieren (Le Naour et al., 2000). Zhu et al. (2002) konnte zeigen, dass die Interaktion von CD9 mit anderen Proteinen in der Eizellmembran eine wesentliche Rolle bei der Eizellfusion spielt und dass drei Aminosäuren in der großen extrazellulären Domäne an dieser Interaktion beteiligt sind. Schwander et al. (2003) zeigten, dass $\beta 1$ zusammen mit CD9 an der Fusion von Myoblasten beteiligt sind. $\beta 1$ -defiziente Myoblasten sind nicht mehr in der Lage zu fusionieren und CD9 wird nicht mehr an der Zelloberfläche exprimiert. Weitere Untersuchungen sind nötig, um den genauen Mechanismus aufzuklären, wie die Exosome mit den Endothelzellen bzw. mit den Stromazellen interagiert, um den sogenannten „angiogenic switch“ zu induzieren.

4.2.7 Perspektiven

Ausgehend von dem Befund, dass die Expression von D6.1A zu einer erhöhten Tumorangio-genese führt und sezernierte Exosome ausreichen, um Angiogenese zu induzieren, ergeben sich eine Reihe notwendiger, weiterführender Studien, deren Resultate Hinweise für eine therapeutische Relevanz geben können. Als erstes sollte die Frage geklärt werden, welche Proteine in den AS-D6.1A Exosomen vorhanden sind und auf welche Weise die Exosomen mit den Endothelzellen bzw. Fibroblasten interagieren. Unterschiede im Proteinprofil der AS und AS-D6.1A Exosome können Aufschluss geben, welche weiteren Moleküle auf den Exosomen an der Angiogeneseinduktion beteiligt sein könnten. Das Integrinprofil und/oder das Profil von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen, die auf den Exosomen vorhanden sind, können Hinweise auf eine mögliche Interaktion der Exosomen mit den Endothelzellen geben. Die Generierung von AS Zellen, die mit chimären Molekülen aus D6.1A und CD151 transfiziert wurden, liefert einen weiteren Ansatzpunkt, um Aufschluß über an der Angiogeneseinduktion beteiligter Domänen von D6.1A zu bekommen. Die Kokultur von farbstoffmarkierten Exosomen mit Endothelzellen bzw. mit Fibroblasten könnte Hinweise auf die Art der Interaktion der Exosomen mit den Zielzellen geben. Das Wissen der beteiligten Domänen und das Wissen der über diese Domänen assoziierten Moleküle könnten wiederum dazu beitragen, die zweite Fragestellung zu beantworten, über welche Signaltransduktionskaskaden die transkriptionelle Aktivierung u.a. von D6.1A auf Endothelzellen eingeleitet wird. Experimente hierzu

könnten einen grundlegenden Beitrag zum Verständnis des Mechanismus leisten, durch den das Tetraspanin D6.1A Tumorprogression und Metastasierung fördert und durch den der Antikörper D6.1 die Angiogenese blockiert.

5 Zusammenfassung

Integrine und Tetraspanine können Metastasierung fördern oder inhibieren. Inwieweit das Zusammenspiel von Integrinen und Tetraspaninen für die Metastasierung von Tumoren verantwortlich ist, wurde bisher noch nicht untersucht. Ein Metastasenmodell in der Ratte lieferte Hinweise, dass möglicherweise eine Assoziation zwischen D6.1A und $\alpha 6\beta 4$ als metastasierungsfördernde Einheit agiert. Im ersten Teil der Arbeit wurde auf humanen Pankreas- adeno- und Kolorektalkarzinomzelllinien der Einfluss von Tetraspanin-Integrin-Komplexen auf die Tumorzellmigration untersucht. $\alpha 3\beta 1$ kolokalisierte mit CD9, CD81 und CD151, während $\alpha 6\beta 4$ nur mit CD151 und CO-029 kolokalisierte. Die Aktivierung der Proteinkinase C stärkte die Kolokalisation von CD151 und CO-029 mit $\beta 4$. Gleichzeitig führte dies zu einer Internalisierung dieser Tetraspanin-Integrin-Komplexe, verbunden mit einer verringerten Adhäsion an Laminin 5 und einer erhöhten Tumorzellmigration. Die Expression von $\alpha 6\beta 4$ ist in pankreatischen und kolorektalen Tumoren hochreguliert und die Assoziation von $\alpha 6\beta 4$ mit CD151 und CO-029 korreliert mit einer erhöhten Tumorzellmotilität.

Die Überexpression von D6.1A in einer pankreatischen Tumorzelllinie führte, nach Injektion dieser Tumorzellen in Ratten, zu einer lethalen Verbrauchskoagulopathie. Dieser Befund deutet auf eine Beteiligung von D6.1A an der Tumorangiogenese hin. Im zweiten Teil der Arbeit wurde deshalb der Einfluss von D6.1A auf die Tumorangiogenese untersucht. D6.1A-überexprimierende Tumorzellen induzieren Angiogenese *in vivo* und sowohl die Tumorzellen als auch die von den Tumorzellen sezernierten D6.1A-enthaltenden Exosome induzieren endotheliales Zellwachstum *in vitro*. D6.1A stimuliert die Transkription angiogenetischer Faktoren, so ist unter anderem die Expression von TNF α und uPAR in Fibroblasten und die Expression von VEGFR1, VEGFR2 und D6.1A auf sprossenden Kapillaren erhöht. D6.1A könnte somit einen „angiogenetischen Loop“ induzieren. Der Antikörper D6.1 blockierte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Angiogenese. Die Antikörperblockade war unabhängig davon, ob der Tumor D6.1A exprimiert oder nicht. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Expression von D6.1A auf sprossenden Kapillaren hochreguliert ist. Die Fähigkeit des Tetraspanins CO-029/D6.1A, das Tumorstadium zu fördern, könnte somit auf der Induktion der Angiogenese beruhen. Aufgrund der Hochregulation von D6.1A auf sprossenden Kapillaren kann Tumorangiogenese selektiv durch einen anti-Tetraspanin Antikörper blockiert werden.

6 Literatur

- Adachi,M., Taki,T., Konishi,T., Huang,C.I., Higashiyama,M., and Miyake,M. (1998) Novel staging protocol for non-small-cell lung cancers according to MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 gene expression. *J. Clin. Oncol.* **16**: 1397-1406.
- Andre,F., Schartz,N.E., Chaput,N., Flament,C., Raposo,G., Amigorena,S. et al. (2002) Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine* **20 Suppl 4**: A28-A31.
- Aplin,J.D., Hey,N.A., and Graham,R.A. (1998) Human endometrial MUC1 carries keratan sulfate: characteristic glycoforms in the luminal epithelium at receptivity. *Glycobiology* **8**: 269-276.
- Ashkenazi,A. and Dixit,V.M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 255-260.
- Auerbach,R., Lewis,R., Shinnars,B., Kubai,L., and Akhtar,N. (2003) Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin. Chem.* **49**: 32-40.
- Bachelder,R.E., Ribick,M.J., Marchetti,A., Falcioni,R., Soddu,S., Davis,K.R., and Mercurio,A.M. (1999) p53 inhibits alpha 6 beta 4 integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB. *J. Cell Biol.* **147**: 1063-1072.
- Belkin,A.M. and Stepp,M.A. (2000) Integrins as receptors for laminins. *Microsc. Res. Tech.* **51**: 280-301.
- Berditchevski,F. (2001) Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J. Cell Sci.* **114**: 4143-4151.
- Berditchevski,F., Odintsova,E., Sawada,S., and Gilbert,E. (2002) Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* **277**: 36991-37000.
- Bick,R.L. (1992) Coagulation abnormalities in malignancy: a review. *Semin. Thromb. Hemost.* **18**: 353-372.
- Birnboim,H.C. and Doly,J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bogenrieder,T. and Herlyn,M. (2003) Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22**: 6524-6536.
- Boucheix,C., Perrot,J.Y., Mirshahi,M., Giannoni,F., Billard,M., Bernadou,A., and Rosenfeld,C. (1985) A new set of monoclonal antibodies against acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* **9**: 597-604.

- Boucheix,C., Benoit,P., Frachet,P., Billard,M., Worthington,R.E., Gagnon,J., and Uzan,G. (1991) Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 117-122.
- Boucheix,C., Duc,G.P., Jasmin,C., and Rubinstein,E. (2001) Tetraspanins and malignancy. *Expert Rev Mol Med.* **31**:1-17.
- Boucheix,C. and Rubinstein,E. (2001) Tetraspanins. *Cell Mol. Life Sci.* **58**: 1189-1205.
- Bouck,N., Stellmach,V., and Hsu,S.C. (1996) How tumors become angiogenic. *Adv. Cancer Res.* **69**: 135-174.
- Brooks,P.C., Clark,R.A., and Cheresh,D.A. (1994) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* **264**: 569-571.
- Brown,D.A. and London,E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 111-136.
- Bryan,T.M., Englezou,A., Gupta,J., Bacchetti,S., and Reddel,R.R. (1995) Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* **14**: 4240-4248.
- Bryan,T.M. and Cech,T.R. (1999) Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 318-324.
- Butt,A.J., Firth,S.M., and Baxter,R.C. (1999) The IGF axis and programmed cell death. *Immunol. Cell Biol.* **77**: 256-262.
- Caby,M.P., Lankar,D., Vincendeau-Scherrer,C., Raposo,G., and Bonnerot,C. (2005) Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* **17**: 879-887.
- Cajot,J.F., Sordat,I., Silvestre,T., and Sordat,B. (1997) Differential display cloning identifies motility-related protein (MRP1/CD9) as highly expressed in primary compared to metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **57**: 2593-2597.
- Cavallaro,U., Schaffhauser,B., and Christofori,G. (2002) Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett.* **176**: 123-128.
- Charrin,S., Le Naour,F., Oualid,M., Billard,M., Faure,G., Hanash,S.M. et al. (2001) The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J. Biol. Chem.* **276**: 14329-14337.
- Chen,W.H., Horoszewicz,J.S., Leong,S.S., Shimano,T., Penetrante,R., Sanders,W.H. et al. (1982) Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. *In Vitro* **18**: 24-34.
- Christofori,G. and Semb,H. (1999) The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 73-76.
- Claas,C., Herrmann,K., Matzku,S., Moller,P., and Zoller,M. (1996) Developmentally regulated expression of metastasis-associated antigens in the rat. *Cell Growth Differ.* **7**: 663-678.

- Claas,C., Seiter,S., Claas,A., Savelyeva,L., Schwab,M., and Zoller,M. (1998) Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. *J. Cell Biol.* **141**: 267-280.
- Claas,C., Stipp,C.S., and Hemler,M.E. (2001) Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* **276**: 7974-7984.
- Claas,C., Wahl,J., Orlicky,D.J., Karaduman,H., Schnolzer,M., Kempf,T., and Zoller,M. (2005) The tetraspanin D6.1A and its molecular partners on rat carcinoma cells. *Biochem. J.* **389**: 99-110.
- Claffey,K.P. and Robinson,G.S. (1996) Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **15**: 165-176.
- Clayton,A., Turkes,A., Dewitt,S., Steadman,R., Mason,M.D., and Hallett,M.B. (2004) Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J.* **18**: 977-979.
- Correa,P. and Haenszel,W. (1978) The epidemiology of large-bowel cancer. *Adv. Cancer Res.* **26**: 1-141.
- Counter,C.M., Avilion,A.A., LeFeuvre,C.E., Stewart,N.G., Greider,C.W., Harley,C.B., and Bacchetti,S. (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* **11**: 1921-1929.
- Crnogorac-Jurcevic,T., Efthimiou,E., Capelli,P., Blaveri,E., Baron,A., Terris,B. et al. (2001) Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene* **20**: 7437-7446.
- Datto,M.B., Hu,P.P., Kowalik,T.F., Yingling,J., and Wang,X.F. (1997) The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol. Cell Biol.* **17**: 2030-2037.
- de Vries,J.E., Dinjens,W.N., De Bruyne,G.K., Verspaget,H.W., van der Linden,E.P., de Bruine,A.P. et al. (1995) In vivo and in vitro invasion in relation to phenotypic characteristics of human colorectal carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **71**: 271-277.
- Doll,R. and Peto,R. (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**: 1191-1308.
- Dong,J.T., Lamb,P.W., Rinker-Schaeffer,C.W., Vukanovic,J., Ichikawa,T., Isaacs,J.T., and Barrett,J.C. (1995) KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* **268**: 884-886.
- Dower,W.J., Miller,J.F., and Ragsdale,C.W. (1988) High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Drewinko,B., Romsdahl,M.M., Yang,L.Y., Ahearn,M.J., and Trujillo,J.M. (1976) Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.* **36**: 467-475.

- Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **273**: 20121-20127.
- Esparza, J., Vilardell, C., Calvo, J., Juan, M., Vives, J., Urbano-Marquez, A. et al. (1999) Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways. *Blood* **94**: 2754-2766.
- Fedi, P., Tronick, S.R., and Aaronson, S.A. (1997) Growth factors. In: *Cancer Medicine*. Edited by: Holland, J.F., Bast, R.C., Morton, D.L., Frei, E., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. Williams and Wilkins: Baltimore, pp 41-64.
- Felding-Habermann, B., Fransvea, E., O'Toole, T.E., Manzuk, L., Faha, B., and Hensler, M. (2002) Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* **19**: 427-436.
- Fevrier, B. and Raposo, G. (2004) Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**: 415-421.
- Fidler, I.J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**: 453-458.
- Fogh, J., Wright, W.C., and Loveless, J.D. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**: 209-214.
- Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**: 27-31.
- Folkman, J. (1997) Tumor angiogenesis. In: *Cancer Medicine*. Edited by: Holland, J.F., Bast, R.C., Morton, D.L., Frei, E., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. Williams and Wilkins: Baltimore, pp 181-204.
- Fynan, T.M. and Reiss, M. (1993) Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit Rev. Oncog.* **4**: 493-540.
- Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J.F., Blot, G. et al. (2005) HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic*. **6**: 488-501.
- Geary, S.M., Cambareri, A.C., Sincock, P.M., Fitter, S., and Ashman, L.K. (2001) Differential tissue expression of epitopes of the tetraspanin CD151 recognised by monoclonal antibodies. *Tissue Antigens* **58**: 141-153.
- Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science* **285**: 1028-1032.
- Giordano, F.J. and Johnson, R.S. (2001) Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**: 35-40.
- Gorrin Rivas, M.J., Arii, S., Furutani, M., Harada, T., Mizumoto, M., Nishiyama, H. et al. (1998) Expression of human macrophage metalloelastase gene in hepatocellular carcinoma:

- correlation with angiostatin generation and its clinical significance. *Hepatology* **28**: 986-993.
- Gourgues,M., Clergeot,P.H., Veneault,C., Cots,J., Sibuet,S., Brunet-Simon,A. et al. (2002) A new class of tetraspanins in fungi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**: 1197-1204.
- Green,D.R. and Reed,J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312.
- Gunthert,U., Hofmann,M., Rudy,W., Reber,S., Zoller,M., Haussmann,I. et al. (1991) A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* **65**: 13-24.
- Hagedorn,H.G., Bachmeier,B.E., and Nerlich,A.G. (2001) Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). *Int. J. Oncol.* **18**: 669-681.
- Hanahan,D. and Folkman,J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Hannon,G.J. and Beach,D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**: 257-261.
- Harris,C.C. (1996) p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* **17**: 1187-1198.
- Hashida,H., Takabayashi,A., Tokuhara,T., Hattori,N., Taki,T., Hasegawa,H. et al. (2003) Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br. J. Cancer* **89**: 158-167.
- Hayflick,L. (1997) Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc.)* **62**: 1180-1190.
- He,B., Liu,L., Cook,G.A., Grgurevich,S., Jennings,L.K., and Zhang,X.A. (2005) Tetraspanin CD82 attenuates cellular morphogenesis through down-regulating integrin alpha6-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **280**: 3346-3354.
- Hemler,M.E. (2001) Specific tetraspanin functions. *J. Cell Biol.* **155**: 1103-1107.
- Hemler,M.E. (2003) Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 397-422.
- Herlevsen,M., Schmidt,D.S., Miyazaki,K., and Zoller,M. (2003) The association of the tetraspanin D6.1A with the alpha6beta4 integrin supports cell motility and liver metastasis formation. *J. Cell Sci.* **116**: 4373-4390.
- Hiddemann,W., Huber,H., Feuring-Buske,M., Lindner,L.H., and Bartram,C.R. (2004) Was ist Krebs? In: Die Onkologie. Edited by: Hiddemann,W., Huber,H., and Bartram,C.R. Springer Verlag: Berlin, pp 3-15.

- Ho,H.K., Jang,J.J., Kaji,S., Spektor,G., Fong,A., Yang,P. et al. (2004) Developmental endothelial locus-1 (Del-1), a novel angiogenic protein: its role in ischemia. *Circulation* **109**: 1314-1319.
- Hood,J.D. and Cheresch,D.A. (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* **2**: 91-100.
- Hotta,H., Ross,A.H., Huebner,K., Isobe,M., Wendeborn,S., Chao,M.V. et al. (1988) Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res.* **48**: 2955-2962.
- Huber,M.A., Kraut,N., and Beug,H. (2005) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**: 548-558.
- Huerta,S., Harris,D.M., Jazirehi,A., Bonavida,B., Elashoff,D., Livingston,E.H., and Heber,D. (2003) Gene expression profile of metastatic colon cancer cells resistant to cisplatin-induced apoptosis. *Int. J. Oncol.* **22**: 663-670.
- Hynes,R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-687.
- Ikeyama,S., Koyama,M., Yamaoko,M., Sasada,R., and Miyake,M. (1993) Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J. Exp. Med.* **177**: 1231-1237.
- Imai,T., Fukudome,K., Takagi,S., Nagira,M., Furuse,M., Fukuhara,N. et al. (1992) C33 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T cell leukemia virus type 1-induced syncytium formation is a member of a new family of transmembrane proteins including CD9, CD37, CD53, and CD63. *J. Immunol.* **149**: 2879-2886.
- Imai,T. and Yoshie,O. (1993) C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells. *J. Immunol.* **151**: 6470-6481.
- Iyer,V., Pumiglia,K., and DiPersio,C.M. (2005) Alpha3beta1 integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression. *J. Cell Sci.* **118**: 1185-1195.
- Jechlinger,M., Grunert,S., and Beug,H. (2002) Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* **7**: 415-432.
- Jimenez,R.E., Hartwig,W., Antoniu,B.A., Compton,C.C., Warshaw,A.L., and Fernandez-Del Castillo,C. (2000) Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis: an additive strategy for cancer control. *Ann. Surg.* **231**: 644-654.
- Jin,H. and Varner,J. (2004) Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br. J. Cancer* **90**: 561-565.
- Johnson,J.P. (1991) Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* **10**: 11-22.

- Kaiser,U., Auerbach,B., and Oldenburg,M. (1996) The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* **20**: 389-395.
- Kanetaka,K., Sakamoto,M., Yamamoto,Y., Yamasaki,S., Lanza,F., Kanematsu,T., and Hirohashi,S. (2001) Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **35**: 637-642.
- Kanetaka,K., Sakamoto,M., Yamamoto,Y., Takamura,M., Kanematsu,T., and Hirohashi,S. (2003) Possible involvement of tetraspanin CO-029 in hematogenous intrahepatic metastasis of liver cancer cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**: 1309-1314.
- Karaduman,H. (2002) Generierung und Charakterisierung eines polyklonalen Antiserums gegen das Metastasierungs-assoziierte Tetraspanin der Ratte CD151. Diplomarbeit, Universität Heidelberg.
- Katayama,M., Sanzen,N., Funakoshi,A., and Sekiguchi,K. (2003) Laminin gamma2-chain fragment in the circulation: a prognostic indicator of epithelial tumor invasion. *Cancer Res.* **63**: 222-229.
- Kawakami,Y., Kawakami,K., Steelant,W.F., Ono,M., Baek,R.C., Handa,K. et al. (2002) Tetraspanin CD9 is a "proteolipid," and its interaction with alpha 3 integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside, leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility. *J. Biol. Chem.* **277**: 34349-34358.
- Kazarov,A.R., Yang,X., Stipp,C.S., Sehgal,B., and Hemler,M.E. (2002) An extracellular site on tetraspanin CD151 determines alpha 3 and alpha 6 integrin-dependent cellular morphology. *J. Cell Biol.* **158**: 1299-1309.
- Kieser,A., Weich,H.A., Brandner,G., Marme,D., and Kolch,W. (1994) Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* **9**: 963-969.
- Kim,S., Bell,K., Mousa,S.A., and Varner,J.A. (2000a) Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am. J. Pathol.* **156**: 1345-1362.
- Kim,S., Harris,M., and Varner,J.A. (2000b) Regulation of integrin alpha vbeta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **275**: 33920-33928.
- Kim,S., Bakre,M., Yin,H., and Varner,J.A. (2002) Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A. *J. Clin. Invest* **110**: 933-941.
- Kimmel,K.A. and Carey,T.E. (1986) Altered expression in squamous carcinoma cells of an orientation restricted epithelial antigen detected by monoclonal antibody A9. *Cancer Res.* **46**: 3614-3623.
- Kinzler,K.W. and Vogelstein,B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-170.
- Kleeff,J., Friess,H., Berberat,P.O., Martignoni,M.E., Z'graggen,K., and Buchler,M.W. (2000) Pancreatic cancer--new aspects of molecular biology research. *Swiss. Surg.* **6**: 231-234.

- Kubota,S., Ito,H., Ishibashi,Y., and Seyama,Y. (1997) Anti-alpha3 integrin antibody induces the activated form of matrix metalloprotease-2 (MMP-2) with concomitant stimulation of invasion through matrigel by human rhabdomyosarcoma cells. *Int. J. Cancer* **70**: 106-111.
- Kuphal,S., Bauer,R., and Bosserhoff,A.K. (2005) Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **24**: 195-222.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Le Naour,F., Rubinstein,E., Jasmin,C., Prenant,M., and Boucheix,C. (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* **287**: 319-321.
- Lehnert,L., Lerch,M.M., Hirai,Y., Kruse,M.L., Schmiegel,W., and Kalthoff,H. (2001) Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin in vitro. *J. Cell Biol.* **152**: 911-922.
- Leibovitz,A., Stinson,J.C., McCombs,W.B., III, McCoy,C.E., Mazur,K.C., and Mabry,N.D. (1976) Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* **36**: 4562-4569.
- Levy,S. and Shoham,T. (2005) The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 136-148.
- Lieber,M., Mazzetta,J., Nelson-Rees,W., Kaplan,M., and Todaro,G. (1975) Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int. J. Cancer* **15**: 741-747.
- Little,K.D., Hemler,M.E., and Stipp,C.S. (2004) Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Galpha q/11 association. *Mol. Biol. Cell* **15**: 2375-2387.
- Liu,L., Wu,D.H., Li,Z.G., Yang,G.Z., and Ding,Y.Q. (2003) Effects of KAI1/CD82 on biological behavior of human colorectal carcinoma cell line. *World J. Gastroenterol.* **9**: 1231-1236.
- Löffler,G. (1998) Replikation und Gentechnik. In: Biochemie und Pathobiochemie. Edited by: Löffler,G. and Petrides,P.E. Springer Verlag: Berlin, 6.Auflage, pp 205-237.
- Logsdon,C.D., Simeone,D.M., Binkley,C., Arumugam,T., Greenson,J.K., Giordano,T.J. et al. (2003) Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res.* **63**: 2649-2657.
- Lotem,J. and Sachs,L. (1996) Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia* **10**: 925-931.
- Maecker,H.T., Todd,S.C., and Levy,S. (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* **11**: 428-442.
- Marken,J.S., Schieven,G.L., Hellstrom,I., Hellstrom,K.E., and Aruffo,A. (1992) Cloning and expression of the tumor-associated antigen L6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**: 3503-3507.

- Markowitz,S., Wang,J., Myeroff,L., Parsons,R., Sun,L., Lutterbaugh,J. et al. (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* **268**: 1336-1338.
- Matrisian,L.M. (1999) Cancer biology: extracellular proteinases in malignancy. *Curr. Biol.* **9**: R776-R778.
- Matzku,S., Komitowski,D., Mildenerger,M., and Zoller,M. (1983) Characterization of BSp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Invasion Metastasis* **3**: 109-123.
- Matzku,S., Wenzel,A., Liu,S., and Zoller,M. (1989) Antigenic differences between metastatic and nonmetastatic BSp73 rat tumor variants characterized by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **49**: 1294-1299.
- Mercurio,A.M., Bachelder,R.E., Chung,J., O'Connor,K.L., Rabinovitz,I., Shaw,L.M., and Tani,T. (2001) Integrin laminin receptors and breast carcinoma progression. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* **6**: 299-309.
- Mercurio,A.M. and Rabinovitz,I. (2001) Towards a mechanistic understanding of tumor invasion--lessons from the alpha6beta 4 integrin. *Semin. Cancer Biol.* **11**: 129-141.
- Miyake,M., Nakano,K., Ieki,Y., Adachi,M., Huang,C.L., Itoi,S. et al. (1995) Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res.* **55**: 4127-4131.
- Mizejewski,G.J. (1999) Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **222**: 124-138.
- Moore,P.S., Sipos,B., Orlandini,S., Sorio,C., Real,F.X., Lemoine,N.R. et al. (2001) Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch.* **439**: 798-802.
- Morgan,R.T., Woods,L.K., Moore,G.E., Quinn,L.A., McGavran,L., and Gordon,S.G. (1980) Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **25**: 591-598.
- Moses,H.L., Yang,E.Y., and Pietenpol,J.A. (1990) TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* **63**: 245-247.
- Niessen,C.M., Hogervorst,F., Jaspars,L.H., de Melker,A.A., Delwel,G.O., Hulsman,E.H. et al. (1994) The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp. Cell Res.* **211**: 360-367.
- Niessen,C.M., Hulsman,E.H., Rots,E.S., Sanchez-Aparicio,P., and Sonnenberg,A. (1997) Integrin alpha 6 beta 4 forms a complex with the cytoskeletal protein HD1 and induces its redistribution in transfected COS-7 cells. *Mol. Biol. Cell* **8**: 555-566.
- Noguchi,P., Wallace,R., Johnson,J., Earley,E.M., O'Brien,S., Ferrone,S. et al. (1979) Characterization of the WIDR: a human colon carcinoma cell line. *In Vitro* **15**: 401-408.
- O'Reilly,M.S., Boehm,T., Shing,Y., Fukai,N., Vasios,G., Lane,W.S. et al. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**: 277-285.

- Oft,M., Akhurst,R.J., and Balmain,A. (2002) Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat. Cell Biol.* **4**: 487-494.
- Okabe,T., Yamaguchi,N., and Ohsawa,N. (1983) Establishment and characterization of a carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cell line from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Cancer* **51**: 662-668.
- Ono,M., Handa,K., Withers,D.A., and Hakomori,S. (1999) Motility inhibition and apoptosis are induced by metastasis-suppressing gene product CD82 and its analogue CD9, with concurrent glycosylation. *Cancer Res.* **59**: 2335-2339.
- Oren,R., Takahashi,S., Doss,C., Levy,R., and Levy,S. (1990) TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol. Cell Biol.* **10**: 4007-4015.
- Orlicky,D.J. and Nordeen,S.K. (1996) Cloning, sequencing and proposed structure for a prostaglandin F2 alpha receptor regulatory protein. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **55**: 261-268.
- Pampori,N., Hato,T., Stupack,D.G., Aidoudi,S., Cheresch,D.A., Nemerow,G.R., and Shattil,S.J. (1999) Mechanisms and consequences of affinity modulation of integrin alpha(V)beta(3) detected with a novel patch-engineered monovalent ligand. *J. Biol. Chem.* **274**: 21609-21616.
- Pankov,R., Cukierman,E., Clark,K., Matsumoto,K., Hahn,C., Poulin,B., and Yamada,K.M. (2003) Specific beta1 integrin site selectively regulates Akt/protein kinase B signaling via local activation of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **278**: 18671-18681.
- Penas,P.F., Garcia-Diez,A., Sanchez-Madrid,F., and Yanez-Mo,M. (2000) Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration. *J. Invest Dermatol.* **114**: 1126-1135.
- Pepper,M.S. (1997) Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**: 21-43.
- Perugini,R.A., McDade,T.P., Vittimberga,F.J., Jr., and Callery,M.P. (1998) The molecular and cellular biology of pancreatic cancer. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **8**: 377-393.
- Petrides,P.E. (1998) Tumorgewebe In: Biochemie und Pathobiochemie. Edited by: Löffler,G. and Petrides,P.E. Springer Verlag: Berlin, 6.Auflage, pp 1089-1113.
- Pitti,R.M., Marsters,S.A., Lawrence,D.A., Roy,M., Kischkel,F.C., Dowd,P. et al. (1998) Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* **396**: 699-703.
- Quinn,L.A., Moore,G.E., Morgan,R.T., and Woods,L.K. (1979) Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions. *Cancer Res.* **39**: 4914-4924.
- Rabinovitz,I. and Mercurio,A.M. (1996) The integrin alpha 6 beta 4 and the biology of carcinoma. *Biochem. Cell Biol.* **74**: 811-821.

- Rabinovitz,I. and Mercurio,A.M. (1997) The integrin alpha6beta4 functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures. *J. Cell Biol.* **139**: 1873-1884.
- Rabinovitz,I., Toker,A., and Mercurio,A.M. (1999) Protein kinase C-dependent mobilization of the alpha6beta4 integrin from hemidesmosomes and its association with actin-rich cell protrusions drive the chemotactic migration of carcinoma cells. *J. Cell Biol.* **146**: 1147-1160.
- Radford,K.J., Mallesch,J., and Hersey,P. (1995) Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *Int. J. Cancer* **62**: 631-635.
- Rak,J., Mitsuhashi,Y., Bayko,L., Filmus,J., Shirasawa,S., Sasazuki,T., and Kerbel,R.S. (1995) Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **55**: 4575-4580.
- Ramos,D.M., But,M., Regezi,J., Schmidt,B.L., Atakilit,A., Dang,D. et al. (2002) Expression of integrin beta 6 enhances invasive behavior in oral squamous cell carcinoma. *Matrix Biol.* **21**: 297-307.
- Raposo,G., Nijman,H.W., Stoorvogel,W., Liejendekker,R., Harding,C.V., Melief,C.J., and Geuze,H.J. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**: 1161-1172.
- Ren,X.D., Kiosses,W.B., and Schwartz,M.A. (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* **18**: 578-585.
- Rosel,M., Claas,C., Seiter,S., Herlevsen,M., and Zoller,M. (1998) Cloning and functional characterization of a new phosphatidyl-inositol anchored molecule of a metastasizing rat pancreatic tumor. *Oncogene* **17**: 1989-2002.
- Rosenberg,L. and Lipsett,M. (2003) Biotherapeutic approaches to pancreatic cancer. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **3**: 319-337.
- Sakurai,Y., Sawada,T., Chung,Y.S., Funae,Y., and Sowa,M. (1997) Identification and characterization of motility stimulating factor secreted from pancreatic cancer cells: role in tumor invasion and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **15**: 307-317.
- Scheithauer,W. and Hahn,S.A. (2004) Pankreaskarzinom. In: Die Onkologie. Edited by: Hiddemann,W., Huber,H., and Bartram,C.R. Springer Verlag: Berlin, pp 983-1008.
- Schumacher,U. and Adam,E. (1997) Lectin histochemical HPA-binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in severe combined immunodeficient mice. *Histochem. J.* **29**: 677-684.
- Schutte,M., Hruban,R.H., Hedrick,L., Cho,K.R., Nadasdy,G.M., Weinstein,C.L. et al. (1996) DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res.* **56**: 2527-2530.
- Schwander,M., Leu,M., Stumm,M., Dorchies,O.M., Ruegg,U.T., Schittny,J., and Muller,U. (2003) Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell* **4**: 673-685.

- Schwartz-Albiez,R., Dorken,B., Hofmann,W., and Moldenhauer,G. (1988) The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein. *J. Immunol.* **140**: 905-914.
- Sela,B.A., Steplewski,Z., and Koprowski,H. (1989) Colon carcinoma-associated glycoproteins recognized by monoclonal antibodies CO-029 and GA22-2. *Hybridoma* **8**: 481-491.
- Senger,D.R., Claffey,K.P., Benes,J.E., Perruzzi,C.A., Sergiou,A.P., and Detmar,M. (1997) Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**: 13612-13617.
- Shah,V., Kumar,S., and Zirvi,K.A. (1994) Metastasis of human colon tumor cells in vivo: correlation with the overexpression of plasminogen activators and 72 kDa gelatinase. *In Vivo* **8**: 321-326.
- Shaw,L.M., Chao,C., Wewer,U.M., and Mercurio,A.M. (1996) Function of the integrin alpha 6 beta 1 in metastatic breast carcinoma cells assessed by expression of a dominant-negative receptor. *Cancer Res.* **56**: 959-963.
- Shay,J.W. and Bacchetti,S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* **33**: 787-791.
- Shinohara,T., Nishimura,N., Hanibuchi,M., Nokihara,H., Miki,T., Hamada,H., and Sone,S. (2001) Transduction of KAI1/CD82 cDNA promotes hematogenous spread of human lung-cancer cells in natural killer cell-depleted SCID mice. *Int. J. Cancer* **94**: 16-23.
- Sho,M., Adachi,M., Taki,T., Hashida,H., Konishi,T., Huang,C.L. et al. (1998) Transmembrane 4 superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **79**: 509-516.
- Simizu,S., Ishida,K., and Osada,H. (2004) Heparanase as a molecular target of cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* **95**: 553-558.
- Simons,K. and Ikonen,E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.
- Sincock,P.M., Fitter,S., Parton,R.G., Berndt,M.C., Gamble,J.R., and Ashman,L.K. (1999) PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 6)**: 833-844.
- Skobe,M. and Fusenig,N.E. (1998) Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 1050-1055.
- Slamon,D.J., Clark,G.M., Wong,S.G., Levin,W.J., Ullrich,A., and McGuire,W.L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**: 177-182.
- Sporn,M.B. (1996) The war on cancer. *Lancet* **347**: 1377-1381.
- Stapp,M.A., Spurr-Michaud,S., Tisdale,A., Elwell,J., and Gipson,I.K. (1990) Alpha 6 beta 4 integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**: 8970-8974.

- Sterk,L.M., Geuijen,C.A., Oomen,L.C., Calafat,J., Janssen,H., and Sonnenberg,A. (2000) The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J. Cell Biol.* **149**: 969-982.
- Sterk,L.M., Geuijen,C.A., van den Berg,J.G., Claessen,N., Weening,J.J., and Sonnenberg,A. (2002) Association of the tetraspanin CD151 with the laminin-binding integrins alpha3beta1, alpha6beta1, alpha6beta4 and alpha7beta1 in cells in culture and in vivo. *J. Cell Sci.* **115**: 1161-1173.
- Stipp,C.S. and Hemler,M.E. (2000) Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with alpha 3 beta 1 integrin, and selectively contribute to alpha 3 beta 1-dependent neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 11)**: 1871-1882.
- Stipp,C.S., Kolesnikova,T.V., and Hemler,M.E. (2001a) EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J. Biol. Chem.* **276**: 40545-40554.
- Stipp,C.S., Orlicky,D., and Hemler,M.E. (2001b) FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific. *J. Biol. Chem.* **276**: 4853-4862.
- Stipp,C.S., Kolesnikova,T.V., and Hemler,M.E. (2003) Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 106-112.
- Stoorvogel,W., Kleijmeer,M.J., Geuze,H.J., and Raposo,G. (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic.* **3**: 321-330.
- Szala,S., Kasai,Y., Steplewski,Z., Rodeck,U., Koprowski,H., and Linnenbach,A.J. (1990) Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**: 6833-6837.
- Takamori,H., Hiraoka,T., and Yamamoto,T. (1996) Expression of tumor-associated carbohydrate antigens correlates with hepatic metastasis of pancreatic cancer: clinical and experimental studies. *Hepatogastroenterology* **43**: 748-755.
- Tan,M.H., Nowak,N.J., Loor,R., Ochi,H., Sandberg,A.A., Lopez,C. et al. (1986) Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest* **4**: 15-23.
- Tanaka,F., Hori,N., and Sato,K. (2002) Identification of differentially expressed genes in rat hepatoma cell lines using subtraction and microarray. *J. Biochem. (Tokyo)* **131**: 39-44.
- Tarbe,N., Losch,S., Burtscher,H., Jarsch,M., and Weidle,U.H. (2002) Identification of rat pancreatic carcinoma genes associated with lymphogenous metastasis. *Anticancer Res.* **22**: 2015-2027.
- Tarrant,J.M., Robb,L., van Sriel,A.B., and Wright,M.D. (2003) Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol.* **24**: 610-617.
- Tennenbaum,T., Weiner,A.K., Belanger,A.J., Glick,A.B., Hennings,H., and Yuspa,S.H. (1993) The suprabasal expression of alpha 6 beta 4 integrin is associated with a high risk for malignant progression in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **53**: 4803-4810.

- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**: 4350-4354.
- Travis,G.H., Sutcliffe,J.G., and Bok,D. (1991) The retinal degeneration slow (rds) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein. *Neuron* **6**: 61-70.
- Turpeenniemi-Hujanen,T. (2005) Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* **87**: 287-297.
- Tzanakakis,G.N., Margioris,A.N., Tsatsakis,A.M., and Vezeridis,M.P. (2003) The metastatic potential of human pancreatic cell lines in the liver of nude mice correlates well with cathepsin B activity. *Int. J. Gastrointest. Cancer* **34**: 27-38.
- Uchida,S., Shimada,Y., Watanabe,G., Li,Z.G., Hong,T., Miyake,M., and Imamura,M. (1999) Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD82 expression inversely correlate with lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **79**: 1168-1173.
- van der Flier,A. and Sonnenberg,A. (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* **305**: 285-298.
- Varner,J.A. and Cheresch,D.A. (1996) Integrins and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 724-730.
- Vlodavsky,I., Goldshmidt,O., Zcharia,E., Atzmon,R., Rangini-Guatta,Z., Elkin,M. et al. (2002) Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Semin. Cancer Biol.* **12**: 121-129.
- von Kleist,S., Chany,E., Burtin,P., King,M., and Fogh,J. (1975) Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**: 555-560.
- Walz,T., Haner,M., Wu,X.R., Henn,C., Engel,A., Sun,T.T., and Aebi,U. (1995) Towards the molecular architecture of the asymmetric unit membrane of the mammalian urinary bladder epithelium: a closed "twisted ribbon" structure. *J. Mol. Biol.* **248**: 887-900.
- Weinberg,R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**: 323-330.
- Weitz,J., Schalhorn,A., Kadmon,M., Eble,M.J., and Herfarth,C. (2004) Kolon- und Rektumkarzinom. In: Die Onkologie. Edited by: Hiddemann,W., Huber,H., and Bartram,C.R. Springer Verlag: Berlin, pp 875-932.
- Werb,Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91**: 439-442.
- Weth,R. (2000) Vakzinierungsstrategien für die Therapie von Tumoren. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Whitelock,J.M., Murdoch,A.D., Iozzo,R.V., and Underwood,P.A. (1996) The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.* **271**: 10079-10086.

- Whittaker,C.A. and Hynes,R.O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell* **13**: 3369-3387.
- Wilhelmsen,K., Litjens,S.H., and Sonnenberg,A. (2006) Multiple functions of the integrin alpha6beta4 in epidermal homeostasis and tumorigenesis. *Mol. Cell Biol.* **26**: 2877-2886.
- Williamson,R.C. (1988) Pancreatic cancer: the greatest oncological challenge. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)* **296**: 445-446.
- Winterwood,N.E., Varzavand,A., Meland,M.N., Ashman,L.K., and Stipp,C.S. (2006) A critical role for tetraspanin CD151 in alpha3beta1 and alpha6beta4 integrin-dependent tumor cell functions on laminin-5. *Mol. Biol. Cell* **17**: 2707-2721.
- Wright,M.D., Moseley,G.W., and van Spruel,A.B. (2004) Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease. *Tissue Antigens* **64**: 533-542.
- Wu,X.R., Medina,J.J., and Sun,T.T. (1995) Selective interactions of UPIa and UPIb, two members of the transmembrane 4 superfamily, with distinct single transmembrane-domained proteins in differentiated urothelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 29752-29759.
- Wurfel,J., Rosel,M., Seiter,S., Claas,C., Herlevsen,M., Weth,R., and Zoller,M. (1999) Metastasis-association of the rat ortholog of the human epithelial glycoprotein antigen EGP314. *Oncogene* **18**: 2323-2334.
- Yang,X., Claas,C., Kraeft,S.K., Chen,L.B., Wang,Z., Kreidberg,J.A., and Hemler,M.E. (2002) Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol. Biol. Cell* **13**: 767-781.
- Yauch,R.L. and Hemler,M.E. (2000) Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochem. J.* **351 Pt 3**: 629-637.
- Yunis,A.A., Arimura,G.K., and Russin,D.J. (1977) Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int. J. Cancer* **19**: 128-135.
- Yunta,M. and Lazo,P.A. (2003) Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal.* **15**: 559-564.
- Zachary,I. (2003) VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 1171-1177.
- Zhang,X.A., Bontrager,A.L., and Hemler,M.E. (2001) Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J. Biol. Chem.* **276**: 25005-25013.
- Zhang,X.A., Kazarov,A.R., Yang,X., Bontrager,A.L., Stipp,C.S., and Hemler,M.E. (2002) Function of the tetraspanin CD151-alpha6beta1 integrin complex during cellular morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **13**: 1-11.

- Zhu,G.Z., Miller,B.J., Boucheix,C., Rubinstein,E., Liu,C.C., Hynes,R.O. et al. (2002) Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development* **129**: 1995-2002.
- Zoller,M., Matzku,S., and Goerttler,K. (1978) High incidence of spontaneous transplantable tumours in BDX rats. *Br. J. Cancer* **37**: 61-66.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Margot Zöller für meine Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung dieses interessanten Themas und die stets gewährten Hilfestellungen in allen Phasen der Anfertigung dieser Arbeit sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Claudia Paret, deren wissenschaftliche und moralische Unterstützung großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte.

Ein herzlicher Dank geht auch an Dr. Eduard Ryschich für die fruchtbare und konstruktive Kooperation und Igor Berezovskiy für seine hervorragende Arbeit und Hilfe bei der Intravitalmikroskopie.

Ein großes Dankeschön geht an Dagmar Hildebrand, Susanne Hummel und Mario Vitacolonna für ihre freundliche Unterstützung und Mithilfe bei der praktischen Durchführung.

Danken möchte ich ebenso Dr. Eberhard Amtmann, Mehdi Bourouba, Dr. Christoph Claas, Gerard Devitt, Frank Fries, Sonja Großkinsky, Pooja Gupta, Nicolás Herbert, Pamela Klingbeil, Daniela Knöfler, Cosima Kretz, Sebastian Kuhn, Markus Ladwein, Dr. Rachid Marhaba, Dr. Irina Nazarenko, Mohini Rajasagi, Nicole Stroh, Joachim Wahl und Katja Zimmermann für die angenehme Arbeitsatmosphäre, Ihre stete Hilfsbereitschaft und Ihre guten Ratschläge und Tipps.

Allen weiteren, die während der vier Jahre gekommen und gegangen sind, Doktoranden, Diplomanden und Praktikanten, sei ebenfalls gedankt. Ich hatte eine tolle und unvergessliche Zeit mit Euch. Danke!

Am Schluß möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, die mich durch all die Jahre, durch schöne und schwere Zeiten begleitet haben. Euer Zuspruch und Euer Vertrauen haben mir immer wieder aufs Neue die Kraft gegeben, die entbehrensreiche Zeit durchzustehen. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke!

Publikationsliste

Publikationen:

Gesierich S., Paret C., Hildebrand D., Weitz J., Zraggen K., Schmitz-Winnenthal F.H., Horejsi V., Yoshie O., Herlyn D., Ashman L.K. and Zöller M. (2005) Colocalization of the tetraspanins, CO-029 and CD151, with integrins in human pancreatic adenocarcinoma: impact on cell motility, *Clin Cancer Res.* 11(8):2840-52.

Gesierich S., Berezovskiy I., Ryschich E. and Zöller M. (2006) Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A / CO-029, *Cancer Res.* 66(14):7083-94.

Publizierte Abstracts:

Gesierich S., Paret C., Weitz J., Ashman L.K. and Zöller M. (2005) Co-localisation of $\alpha 6\beta 4$ with the tetraspanins CO-029 and CD151 in human pancreatic adenocarcinoma support tumor cell motility, *Eur. J. Cell Biol.* 84S1, Suppl. 55, 28th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, March 16-19, Heidelberg, Germany (poster presentation).

Gesierich S., Berezovskiy I., Ryschich E. and Zöller M. (2005) Involvement of $\alpha 6\beta 4$ and D6.1A in angiogenesis evaluated by intravital microscopy, *Eur. J. Cell Biol.* 84S1, Suppl. 55, 28th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, March 16-19, Heidelberg, Germany (short talk).

Gesierich S., Berezovskiy I., Ryschich E. and Zöller M. (2006) The Tetraspanin D6.1A induces the angiogenic switch, *Vascul. Pharmacol.* XIVth International Vascular Biology Meeting, June 6-10, Noordwijkerhout, The Netherlands (poster presentation).

Gesierich S., Berezovskiy I., Ryschich E. and Zöller M. (2006) The Tetraspanin D6.1A induces tumor angiogenesis, *Eur. J. Cancer Suppl.* 4(6), 2nd International Congress on Molecular Staging of Cancer, June 22-26, Heidelberg, Germany (poster discussion).

Nicht publizierte Abstracts:

Gesierich S., Paret C., Hildebrand D., Weitz J., Horejsi V., Ashman L.K. and Zöller M. (2004) Impact of $\alpha 6\beta 4$ -tetraspanin complex formation on tumor cell motility, 18th Meeting of the European Association for Cancer Research, July 3-6, Innsbruck, Austria (poster presentation).

Gesierich S., Paret C., Hildebrand D., Zraggen K., Schmitz-Winnenthal F., Weitz J. and Zöller M. (2004) Impact of $\alpha 6\beta 4$ -tetraspanin complex formation on tumor cell motility, Forschungssymposium des Tumorzentrums Heidelberg/Mannheim, November 29, Heidelberg, Germany (poster presentation)

Gesierich S., Paret C., Weitz J., Ashman L.K. and Zöller M. (2005) Impact of $\alpha 6\beta 4$ - CO-029 - CD151 complex formation on tumor cell motility, Keystone Symposia: Cell Migration and Adhesion, April 9-14, Snowbird Resort, Utah, USA (poster presentation).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sabine Petra Gesierich
Geburtsdatum: 11.11.1976
Geburtsort: Bietigheim-Bissingen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1983 – 1985 Grundschule in Walheim
1985 – 1987 Grundschule in Cleebromm
1987 – 1993 Progymnasium in Bönnigheim
1993 – 1996 Gymnasium in Lauffen am Neckar
06/1996 Abitur

Studium

10/1996-11/2002 Studium der Ernährungswissenschaft an der
Universität Hohenheim
09/1999 – 02/2000 Auslandssemester an der “University of Wales”
in Aberystwyth, Großbritannien
02/2002-11/2002 Diplomarbeit am Institut für biologische Chemie und
Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim
unter der Leitung von Prof. Dr. C. Bode
Thema: Auswirkungen von Ethanol auf die mRNA-Expression
der Cytochrom-P450-Unterklasse 26A1 (CYP26A1) und die
Bildung polarer Retinsäuremetabolite.

Promotion

12/2002-12/2006 Promotion am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in
Heidelberg in der Abteilung Tumorprogression und
Tumorabwehr unter der Leitung von Prof. Dr. M. Zöller