

**„Molekulare Grundlagen des Beitrags
varianter CD44-Isoformen zur Apoptoseresistenz und
Präparation einer prämetastatischen Nische“**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom Lebensmittelchemiker

Thorsten Jung

aus

Rastatt

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Margot Zöller

Koreferent: Prof. Dr. Tilman Lamparter

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2010

„Halte immer an der Gegenwart fest. Jeder Zustand, ja jeder Augenblick ist von unendlichem Wert, denn er ist der Repräsentant einer ganzen Ewigkeit.“

(Johann Wolfgang von Goethe, 1749-1832)

Zum Andenken an meinen Vater (1949-2001)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Pankreaskarzinom	1
1.2 Metastasierung	1
1.2.1 Metastasierungskaskade.....	2
1.2.2 Metastasierungsmarker.....	3
1.3 CD44 als Metastasierungsmarker	5
1.3.1 Struktur.....	5
1.3.2 Interaktion/Funktion von CD44.....	7
1.4 Tumorzell/Wirt-Interaktion	13
1.4.1 Tumorstroma (Mikroumgebung).....	13
1.4.2 Präparation der Nische.....	14
1.4.3 Exosomen-Stroma Reaktion.....	15
1.5 BSp73 Tumormodell	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien.....	21
2.1.2 Enzyme.....	24
2.1.3 Inhibitoren.....	24
2.1.4 Nukleotid- und Proteinstandards.....	24
2.1.5 Kits.....	24
2.1.6 Primer.....	25

Inhaltsverzeichnis

2.1.7	siRNA	26
2.1.8	Antikörper	26
2.1.8.1	Primärantikörper	26
2.1.8.2	Sekundärantikörper	30
2.1.9	Zelllinien	31
2.1.10	Tiere	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1.1	RNA-Isolation und Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)	33
2.2.1.2	siRNA-Transfektion.....	34
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	34
2.2.2.1	Zellkulturbedingungen.....	34
2.2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	35
2.2.2.3	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen.....	35
2.2.2.4	Reklonierung transfizierter Zellen	35
2.2.2.5	Untersuchung von konditioniertem Zellkulturüberstand.....	35
2.2.2.6	Stimulation mit HA, HGF, Laminin-5 sowie anti-CD44v6	36
2.2.2.7	Adhäsions-Assay	36
2.2.2.8	Proliferations-Assay.....	37
2.2.2.9	Migrations-Assay (Boyden-Chamber)	37
2.2.2.10	Behandlung mit Cis-Platin.....	37
2.2.2.11	Zytotoxizitätstests	38
2.2.2.12	Kristallviolett-Färbung von adhärenen Zellen	39
2.2.2.13	FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorter).....	40
2.2.2.14	Immunfluoreszenz-Färbung der adhärenen-Matrix.....	40
2.2.2.15	ELISA.....	40
2.2.2.16	Kryo-Schnitte von Tumor Gewebe	41
2.2.2.17	Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten.....	41
2.2.3	Tierexperimente	42
2.2.4	Protein Biochemie.....	43
2.2.4.1	Biotinylierung von Membranproteinen	43

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.2	Quervernetzung von Proteinen.....	43
2.2.4.3	Zellyse für SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	43
2.2.4.4	Proteinbestimmung nach Bradford	44
2.2.4.5	Immunpräzipitation (IP).....	44
2.2.4.6	In-Vitro-Kinase-Assay	45
2.2.4.7	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	45
2.2.4.8	Western-Blot (WB).....	47
2.2.4.9	2-Dimensionale-Gelelektrophorese (2D)	48
2.2.4.10	Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen	49
2.2.4.11	MMP-Aktivitäts Assay (Zymographie)	49
2.2.4.12	Coomassie-Färbungen.....	50
2.2.4.13	Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberständen.....	50
2.2.4.14	Konzentrationen von Proteinen aus Exosomen-depletierten Zellkulturüberständen	51
2.2.4.15	Proteinanalyse mittels Massenspektrometrie	51
2.2.4.16	Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	51
2.2.4.17	Live-Zell-Imaging.....	52
3	Ergebnisse	53
3.1	ASML^{wt}-konditioniertes Medium unterstützt die Metastasierung von ASML^{kd}-Zellen	53
3.2	Die ASML^{wt}-lösliche Fraktion kooperiert bei der Präparation einer prämetastatischen Nische mit Exosomen.....	58
3.3	Der Einfluss von CD44v6 auf die Genexpression, Proteinsekretion und Exosomen-Abgabe.....	61
3.4	Der Einfluss das kM auf potentielle Zielzellen.....	66
3.5	Unterschiede in der Matrix von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen und deren Einfluss auf die Mobilität dieser Zellen.....	74
3.5.1	Unterschiede in der Größe von HA.....	74
3.5.2	ASML ^{wt} -Matrix stimuliert die Migration CD44v6-exprimierender Tumorzellen	76
3.5.3	CD44v6 assoziiert in ASML ^{wt} -Zellen mit c-Met und $\alpha 6\beta 4$	79
3.5.4	CD44v6, c-Met und $\alpha 6\beta 4$ beeinflussen die Migration von ASML ^{wt} -Zellen.....	80
3.6	Molekulare Mechanismen HA-vermittelter Zellbewegung in Abhängigkeit von CD44v6.....	82

Inhaltsverzeichnis

3.6.1	HA, HGF und LN5 aktivieren c-Met.....	83
3.6.2	Stimulation mit HA führt zur Assoziation und Aktivierung von ERM	83
3.6.3	Stimulation mit HA führt zur Assoziation und Aktivierung von Src und FAK	85
3.7	Die ASML^{wt}-Matrix unterstützt das Überleben von ASML-Zellen.....	90
3.8	Aktivierung anti-apoptotischer Moleküle durch HA, HGF und LN5	93
3.9	Der Apoptoseschutz von ASML-Zellen wird über PI3K/Akt- und den MAPK-Signalweg initiiert.....	96
4	Diskussion	101
4.1	Unterschiedliche Proteinexpression von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Lysaten, löslicher Fraktion und Exosomen	101
4.1.1	ASML ^{wt} -IF vs ASML ^{kd} -IF.....	101
4.1.2	ASML ^{wt} -Exosomen vs ASML ^{kd} -Exosomen	103
4.1.3	ASML ^{wt} -Matrix vs ASML ^{kd} -Matrix.....	105
4.2	Kooperation von Exosomen mit der löslichen Fraktion und der Einfluss auf die Zielzellen.....	107
4.3	Einfluss der Tumormatrix auf die CD44v6-vermittelte Migration und Apoptoseresistenz.....	109
4.3.1	Matrix-initiierte Migration	109
4.3.2	Apoptoseresistenz durch CD44-abhängige Aktivierung des MAPK- und PI3K/Akt-Signalweges	110
4.4	Perspektiven.....	114
5	Zusammenfassung.....	115
6	Literatur.....	116
	Danksagung.....	133
	Publikationsliste	134
	Lebenslauf.....	135

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazol
AFM	„Atomic force microscopy“
Akt	Proteinkinase B
ALDH	Aldehyddehydrogenase
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	BSp73AS, Pankreastumorzelllinie der Ratte
ASML ^{wt}	BSp73ASML wilytp, Pankreastumorzelllinie
ASML ^{kd}	BSp73ASML CD44v „knockdown“, Pankreastumorzelllinie
ASZ	adulte Stammzelle
BAD	Bcl-2 verwandtes Protein
Bax	Ko-faktor des Tumorsuppressors p53
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, anti-apoptotisches Protein
Bcl-Xl	anti-apoptotisches Protein, gehört zur Familie der Bcl-2 Proteine
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C3	Komplementkomponente C3
CD	„cluster of differentiation“
CD44v	CD44-Variante
CD44s	CD44-Standard
CHAPS	3-[(3-Chloramidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfat
Ci	Curie
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
DBL	Mcf2, Familie der „GDP-GTP exchange factor“

Abkürzungsverzeichnis

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DTSSP	3,3-Dithiobis(sulfosuccinimidyl-Propionat)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EBV	Ebstein-Bar-Virus
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	“early Endosomes“
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
EMT	epitheliale-mesenchymale Transformation
EpCAM	“epithelial cell adhesion molecule“
ERBB	Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGFR)
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
ESCRT	“endosomal sorting complex required for transport“
ESZ	Embryonale Stammzelle
Exo	Exosomen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
FAS	Todesrezeptor
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
GAG	Glykosaminoklykan
GDI	Rho-GDP-dissoziations Inhibitor
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hyaluronsäure

Abkürzungsverzeichnis

HAS	Hyaluronsäuresynthase
HB-EGF	heparinbindender-epidermaler Wachstumsfaktor
HER2/neu	ERBB2
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HGFR	“hepatocyte growth factor receptor”, c-Met
HRP	„horse-radish-peroxidase“
HSP	„heat shock protein“
HYAL	Hyaluronidase
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
k	Kilo
IF	lösliche Fraktion
m	milli
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
M-CSF1	Makrophagen Kolonie-Stimulationsfaktor1
Merlin	„Moein-Ezrin-Radixin-like Protein“
MFG-E8	„milcfat-globule EGF-factor 8“
min	Minute
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
miRNA	„mikro“ RNA
MMP	Matrixmetalloproteinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MVB	„multi vesicular body“
MWCO	„molecular weight cut off“
n	nano
OD	optische Dichte

Abkürzungsverzeichnis

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBG	Phosphat-gepufferte Glukose
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
PDGF	“platelet-derived growth factor”
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTK	Protein-Tyrosin Kinase
p53	Tumorsuppressor
Rab	“Ras-related in brain”
Rac1	“Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1”
Raf	“rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma”, Proteinkinase
RAS	proto-Onkogen
Rho	Familie der GTPasen
RNAse	Ribonuklease
ROK	“Rho-associated serine/threonine kinase”
rpm	“random per minute”
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute”, Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin Kinase
SDF-1	“stromal-derived factor 1”
SDS	Natriumdodekylsulfat
siRNA	“small interfering” RNA
Src	Protein-Tyrosinkinase
TEM	“tetraspanin-enriched microdomain”

Abkürzungsverzeichnis

TEMED	Tetramethylethylenediamine
THP-1	“Human acute monocytic leukemia cell line“
TIAM	“T-lymphoma invasion and metastasis-inducing <i>protein</i> ”
TIMP	“tissue inhibitor of metalloproteinases”
TIZ	Tumor-induzierende Zelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TY	Thyroglobulin
U	unit
V-ATPase	“Vacuolar type H ⁺ -ATPase”
Vav	“guanine nucleotide exchange factors”
VN	Vitronektin
WB	Western Blot

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2.1:	Metastasierungskaskade	2
Abbildung 1.3.1.1:	CD44-Isoformen	5
Abbildung 1.3.1.2:	Struktur von CD44	6
Abbildung 1.3.2:	Struktur von Hyaluronsäure	7
Abbildung 1.4.3:	Freisetzung von Exosomen	17
Abbildung 3.1.1:	Der Einfluss von Tumorzell-konditioniertem Medium auf die Metastasierung	54
Abbildung 3.1.2:	Der Einfluss von Tumorzell-konditioniertem Medium auf die Metastasierung (Immunhistologie I)	55
Abbildung 3.1.3:	Der Einfluss von Tumorzell-konditioniertem Medium auf die Rekrutierung von Leukozyten in den drainierenden Lymphknoten	55
Abbildung 3.1.4:	Der Einfluss von Tumorzell-konditioniertem Medium auf die Metastasierung (Immunhistologie II).....	57
Abbildung 3.2.1:	Der Einfluss von Tumor-sezernierten Exosomen auf die Metastasierung	59
Abbildung 3.3.1:	Unterschiede in den Bestandteilen der Matrix von ASML-Zellen	62
Abbildung 3.3.2:	Unterschiede in der Expression von Proteinen in Lysaten, IF und Exosomen von ASML-Zellen	63
Abbildung 3.3.3:	Unterschiede in den Bestandteilen der Matrix und IF von ASML-Zellen	64
Abbildung 3.3.4:	Expression von Krebsstammzellmarkern auf ASML-Zellen.....	65
Abbildung 3.4.1:	Der Einfluss des kM auf die Adhäsion der Zielzellen	68
Abbildung 3.4.2:	Der Einfluss des kM auf die Migration von Zielzellen.....	69
Abbildung 3.4.3:	Der Einfluss des kM auf die Apoptoseresistenz der Zielzellen	70
Abbildung 3.4.4:	Der Einfluss des kM auf die Apoptoseresistenz der Zielzellen unter Cis-Platin.....	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.4.5:	Der Einfluss des kM auf die Proliferation der Zielzellen	72
Abbildung 3.4.6:	Der Einfluss des kM auf die Proliferation der Zielzellen	73
Abbildung 3.5.1.1:	Unterschiede in der Menge und Größe von HA in der Matrix von ASML-Zellen	75
Abbildung 3.5.1.2:	Bestimmung von HAS und HYAL im Lysat und in der Matrix von ASML-Zellen	76
Abbildung 3.5.2.1:	ASML ^{wt} -Matrix stimulierte Migration.....	77
Abbildung 3.5.2.2:	Bewegung von ASML-Zellen auf der Matrix	78
Abbildung 3.5.3:	Koimmunpräzipitation von CD44v6 mit c-Met und $\alpha 6\beta 4$ in ASML-Zellen	79
Abbildung 3.5.4.1:	Anti-CD44v6, anti- $\alpha 6\beta 4$ und anti-c-Met inhibiert die Migration von ASML ^{wt} -Zellen	81
Abbildung 3.5.4.2:	Tumormatrix und deren Bedeutung für die Zellmigration.....	82
Abbildung 3.6.1:	ASML ^{wt} -Matrix, HA, HGF und LN5 aktivieren c-Met	83
Abbildung 3.6.2:	Assoziierte und aktivierte ERM-Proteine nach Stimulation mit HA.....	84
Abbildung 3.6.3.1:	Aktivierung zweier Proteine mit der Masse 125 und 55 kDa und Assoziation von Src mit CD44v6.....	85
Abbildung 3.6.3.2:	Aktivierung der PTK Src und FAK und Assoziation von FAK mit Src	86
Abbildung 3.6.3.3:	Kolokalisation von CD44v6 mit $\alpha 6\beta 4$ in ASML ^{wt} -Zellen.....	87
Abbildung 3.6.3.4:	Kolokalisation von CD44v6 mit Ezrin, FAK und Phalloidin in ASML ^{wt} -Zellen	88
Abbildung 3.6.3.5:	Kolokalisation von CD44v6 mit Ezrin, FAK und c-Met in Capan2- und 8.18-Zellen	89
Abbildung 3.7.1:	Die ASML ^{wt} -Matrix unterstützt die Apoptoseresistenz von ASML-Zellen	91
Abbildung 3.7.2:	Die ASML ^{wt} -Matrix unterstützt die Vitalität und Proliferation von ASML-Zellen	92
Abbildung 3.7.3:	Die Capan2-Matrix unterstützt die Apoptoseresistenz	92

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.8.1:	Stimulation mit HA, HGF und LN5 bewirkt eine Aktivierung von Caspase-9 und -3	94
Abbildung 3.8.2:	Stimulation mit HA, HGF und LN5 inaktiviert BAD.....	95
Abbildung 3.8.3:	Stimulation mit HA, HGF und LN5 aktiviert STAT3, PKC und Src sowie eine Interaktion von c-Met mit Gab1	96
Abbildung 3.9.1:	Stimulation mit HA, HGF und LN5 aktiviert den PI3K/Akt- und den MAPK-Signalweg	97
Abbildung 3.9.2:	Fehlen von $\alpha 6\beta 4$ und c-Met blockt die Aktivierung des PI3K/Akt- und des MAPK-Signalweg.....	98
Abbildung 3.9.3:	Einfluss des c-Met-Inhibitors (SU11224), des PI3K-Inhibitors (Ly294002) und des c-Raf-Inhibitors (GW5074) auf die Aktivierung des PI3K/Akt- und des MAPK-Signalweg	100
Abbildung 4.2:	Hypothese der Beteiligung von CD44v an der Präparation der prämetastatischen Nische	108
Abbildung 4.3:	CD44v-vermittelte Signaltransduktion	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.1:	Darstellung der verwendeten Chemikalien unter Angabe des Herstellers..	21
Tabelle 2.1.2:	Darstellung der verwendeten Enzyme unter Angabe des Herstellers	24
Tabelle 2.1.3:	Darstellung der verwendeten Inhibitoren unter Angabe des Herstellers.....	24
Tabelle 2.1.4:	Darstellung der verwendeten Nukleotid- und Proteinstandards unter Angabe des Herstellers	24
Tabelle 2.1.5:	Darstellung der verwendeten Kits unter Angabe des Herstellers.....	24
Tabelle 2.1.6:	Darstellung der verwendeten Primer unter Angabe der Sequenz	25
Tabelle 2.1.7:	Darstellung der verwendeten siRNA unter Angabe der Sequenz	26
Tabelle 2.1.8.1:	Darstellung der verwendeten Primärantikörper unter Angabe der Verwendung und des Herstellers.....	26
Tabelle 2.1.8.2:	Darstellung der verwendeten Sekundärantikörper unter Angabe der Verwendung und des Herstellers.....	30
Tabelle 2.1.9:	Darstellung der verwendeten Pankreasadenokarzinom-Zelllinien unter Angabe des Ursprungs und der Referenz.	31
Tabelle 3.2.1:	Der Einfluss von Tumor-sezernierten Exosomen auf die Metastasierung..	60
Tabelle 3.4.1:	Der Einfluss von kM und den einzelnen Fraktionen auf die Genexpression von potentiellen Zielzellen	67

1. Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom nimmt in Europa innerhalb der Tumorerkrankungen den 13. Platz ein, liegt aber bei der Sterblichkeitsrate auf Platz 5 (Duffy et al., 2010). Jährlich erkranken weltweit etwa 232.000 Menschen neu an einem Pankreaskarzinom. Mit 227.000 Sterbefällen pro Jahr gleicht die krankheitsspezifische Todesrate ungefähr der Inzidenz, sodass nach wie vor kaum ein Langzeitüberleben erreicht werden kann. Dementsprechend hat das Pankreaskarzinom die geringste 5-Jahres-Überlebensrate (Welsch et al., 2008). Die hohe Sterblichkeitsrate liegt an der extrem frühen Metastasierung und der relativ späten Diagnose. Hinzu kommt die Resistenz gegenüber systemischen Therapien wie Bestrahlung und Chemotherapie (Ho et al., 2007, Nieto et al., 2008) sowie eine erhöhte Apoptoseresistenz (Simon et al., 2009). Es wird diskutiert, ob die Apoptoseresistenz auf die extreme Stromadysplasie beim Pankreaskarzinom zurückzuführen ist, die auf verstärkte Kommunikation des Tumors mit dem umliegenden Gewebe zurückzuführen sein könnte (Hernández-Munoz et al., 2008).

1.2 Metastasierung

Die Metastasierung ist die Ursache für 90% aller Todesfälle durch Krebs. Sie ist ein extrem komplexer Prozess, der in mehreren Schritten abläuft. Dabei lösen sich die Zellen aus dem Zellverbund des Primärtumors. Sie wandern, hauptsächlich in Blut- und Lymphgefäße, durch den Körper um sich dann entfernt niederzulassen und Metastasen auszubilden (Mehlen und Puisieux, 2006, Yilmaz et al., 2007).

1.2.1 Metastasierungskaskade

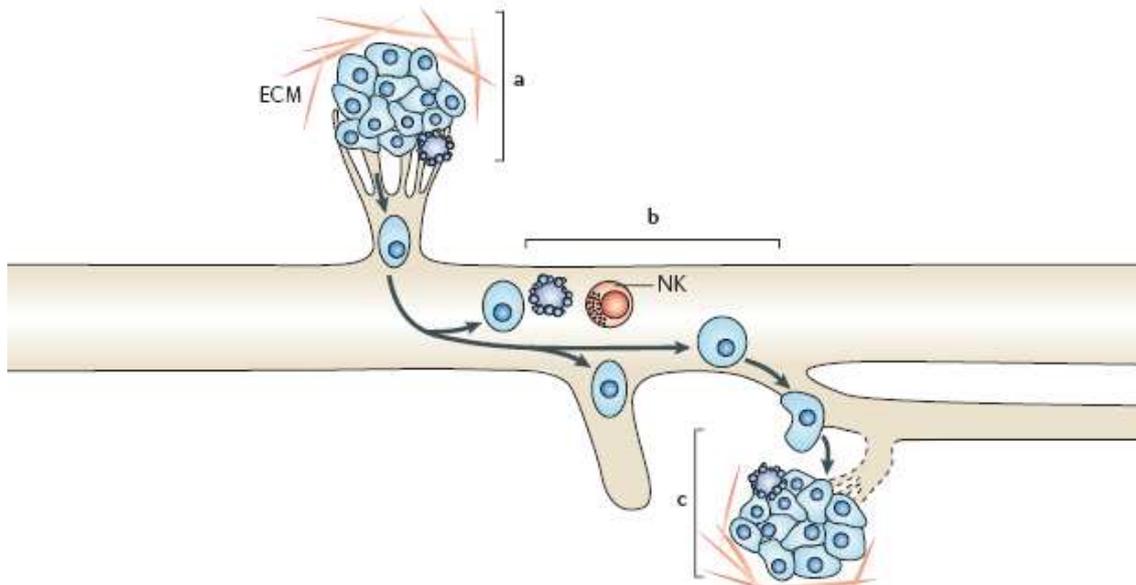


Abbildung 1.2.1:

Metastasierungskaskade: a) Ablösen der Tumorzellen von Nachbarzellen und der extrazellulären Matrix, b) Invasion in Blut- und Lymphgefäße, c) Extravasation und Ansiedlung von Tumorzellen, aus: „Metastasis: a question of life or death“ (aus „Nature Reviews“)

Im ersten Schritt der Metastasierung müssen sich die Tumorzellen zuerst von Nachbarzellen und der extrazellulären Matrix (EZM) lösen und migratorische und invasive Eigenschaften entwickeln. Dies geschieht durch Veränderung in der Genexpression und – Funktion, wie zum Beispiel dem Wechsel von einem epithelialen- zu einem mesenchymalen Phänotyp, was als „epithelial-mesenchymal Transition“ (EMT) bezeichnet wird (Brabletz et al., 2005).

Die isolierte Tumorzelle durchdringt die Kapsel des Tumors und dringt in umliegendes Gewebe ein und gelangt so in die Blut- und Lymphgefäße. Alternativ gelangen sie über die im Tumor befindlichen Gefäße direkt in den Kreislauf. Dieser Schritt der Metastasierung wird dadurch erleichtert, dass die Krebszellen Proteasen wie zum Beispiel Matrix-Metalloproteasen (MMPs) exprimieren oder die Expression von Inhibitoren (TIMPs) unterdrücken. Tumorzellen können auch umliegende Stromazellen zur Produktion Invasionsfördernden Faktoren anregen (Kessenbrock et al., 2010).

Nach erfolgreicher Intravasation in Blut- und Lymphgefäße, müssen die Krebszellen in diesen überleben und dabei das Phänomen der Anoikis (Zelltod durch Verlust der Zelladhäsion) überwinden (Zhu et al., 2001). Darüber hinaus muss sich die Tumorzelle während der Metastasierung der Kontrolle durch das Immunsystem entziehen (Jakobisiak et al., 2003). Verglichen mit den Blutgefäßen zeichnen sich die Lymphgefäße durch niedrigeren Druck und aufgrund des Fehlens von Blutplättchen, durch fehlende Gerinnung aus (Alitalo und Carmeliet, 2002). Dies sind möglicherweise Gründe für die bevorzugte lymphatische Metastasierung. Die metastasierenden Krebszellen streuen nun über den ganzen Körper aus, erkennen spezielle Zielorgane und extravasieren in eine neue Umgebung, wo sie Kolonien ausbilden können.

Um aus den Gefäßen zu extravasieren müssen sie neue adhäsive Eigenschaften entwickeln. Dies bedeutet, dass die metastasierende Tumorzelle sich ein fremdes Milieu ihren Bedürfnissen anpassen muss (Yilmaz et al., 2007).

1.2.2 Metastasierungsmarker

Tumore setzen sich in der Regel aus heterogenen Zellpopulationen zusammen, die sich in ihrer Invasivität und metastatischen Kompetenz unterscheiden. Wobei weniger als 0,1% der Tumorzellen die Fähigkeit zur Metastasierung besitzt. Die zur Metastasierung fähigen Tumorzellen werden auch als Tumorstammzellen oder Tumor-initiiierende Zellen (TIZ) definiert (Fidler, 2002). In den letzten Jahren gelang es, diese TIZ aufgrund von Markern zu charakterisieren (Al-Hajj et al., 2003). Beim Pankreaskarzinom zählen zu diesen Markern CD133 (Ho et al., 2007, Eramo et al., 2008), $\alpha 6\beta 4$ (Gilcrease et al., 2009), CD24, EpCAM und CD44 (Li et al., 2007). Für meine Arbeit sind insbesondere $\alpha 6\beta 4$ und CD44v von Bedeutung, so dass ich diese beiden Stammzellmarker kurz einführen möchte.

$\alpha 6\beta 4$

Das Integrin $\alpha 6\beta 4$ ist ein Rezeptor für viele Laminin-Isoformen. Die stärkste Affinität besitzt es gegenüber Laminin-5, einer Komponente der epidermalen Basalmembran (Niessen et al., 1994) und Hauptbestandteil von Hemidesmosomen (Dowling et al., 1996). $\alpha 6\beta 4$ interagiert im Vergleich zu anderen Integrinen mit Intermediärfilamenten aus Keratin, welche durch eine Assoziation mit Plectin und BP230 in Hemidesmosomen vermittelt wird (Niessen et al., 1997).

Anfangs ging man davon aus, dass $\alpha\beta4$ während der Tumorinvasion durch das Auflösen von Hemidesmosomen und durch den Verlust der Polarität von Tumorzellen während der Tumorprogression, herunterreguliert wird (Rabinovitz und Mercurio, 1996). Kimmel und Carey (1986) wiesen jedoch $\beta4$ als ein tumorassoziertes Antigen nach. Zusätzlich ist ein Anstieg in der Motilität und Invasivität bei Karzinomzelllinien gezeigt worden. Hierbei kommt es durch EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) über die Bindung an EGFR zur Aktivierung von PKC, die wiederum die Integrin- $\beta4$ -Kette phosphoryliert, was zum Auflösen der Hemidesmosomen, der Assoziation von $\alpha\beta4$ mit F-Aktin (Rabinovitz et al., 1999) und zur Sekretion von MMP-2 (Daemi et al., 2000) führt.

Mercurio und Rabinovitz (2001) berichteten, dass eine Phosphorylierung der $\beta4$ -Kette zum Anschalten weiterer Signaltransduktionskaskaden führt. Hierbei kommt es zur Aktivierung der PI3K, die wiederum an der Regulation von Rho GTPasen beteiligt ist. Schließlich kommt es durch die Veränderung des Aktinzytoskeletts zur Initiation der Migration von Tumorzellen. $\alpha\beta4$ assoziiert mit c-Met und CD44v6 (Bertotti und Comoglio, 2003, Orian-Rousseau et al., 2007, Tremmel et al., 2009). Herlevsen et al. (2003) zeigte, dass $\alpha\beta4$ während der Tumorprogression durch Assoziation mit dem Tetraspanin D6.1A von einem Adhäsions-unterstützenden zu einem Migrations-fördernden Protein wechselt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die invasive Front verschiedener Tumoren sehr stark mit Integrin-Liganden wie Laminin-1 und Laminin-5 angereichert ist (Rabinovitz und Mercurio, 1996).

CD44

Der „lymphocyte homing receptor“, wie der Stammzellmarker CD44 ursprünglich von Gallatin et al. (1983) beschrieben wurde, erregte besondere Aufmerksamkeit, als der Transfer von CD44 Spleißvarianten in lokal wachsende Tumorzellen genügte um dem Tumor metastasierendes Potential zu verleihen (Günthert et al., 1991). CD44, ein Transmembran-Glykoprotein, gehört zur Familie der Adhäsionsmoleküle und ist in eine Vielzahl von Prozesse wie Entwicklung, Wundheilung, Entzündung, Hämatopoese, Immunantwort und Tumorprogression (Naor et al., 2008, Ponta et al., 2003, Marhaba und Zöller, 2004) involviert.

1.3 CD44 als Metastasierungsmarker

1.3.1 Struktur

Das Glykoprotein CD44 wird durch nur ein einziges Gen kodiert (Screaton et al., 1992). Die entsprechende mRNA besteht aus 20 Exons, die an der Struktur des Proteins beteiligt sind. Sowohl die ersten fünf als auch die letzten fünf Exons sind konstant, wohingegen die dazwischen liegenden 10 Exons alternativem Spleißen unterzogen werden können. Dies führt zur Generierung variabler Regionen. Die unterschiedliche Ausnutzung der zehn variablen Exons, wie auch die N- oder O-Glykosylierung führt zur Bildung von mehreren Isoformen. Mindestens 20 verschiedene Isoformen von CD44, mit einem Molekulargewicht von 85–230 kDa sind bekannt (Naor et al., 1997). Das kleinste CD44 Molekül (85-95 kDa) ist die Standardisoform (CD44s), welche auf einer Vielzahl von Geweben und verschiedensten Zellen exprimiert ist (König et al., 1996). Die CD44 Isoform, die die letzten drei variablen Exons enthält, wird als epitheliale Isoform (CD44v8-v10) bezeichnet und ist vorzugsweise auf epithelialem Gewebe exprimiert (Naor et al., 1997) (Abb. 1.3.1.1).

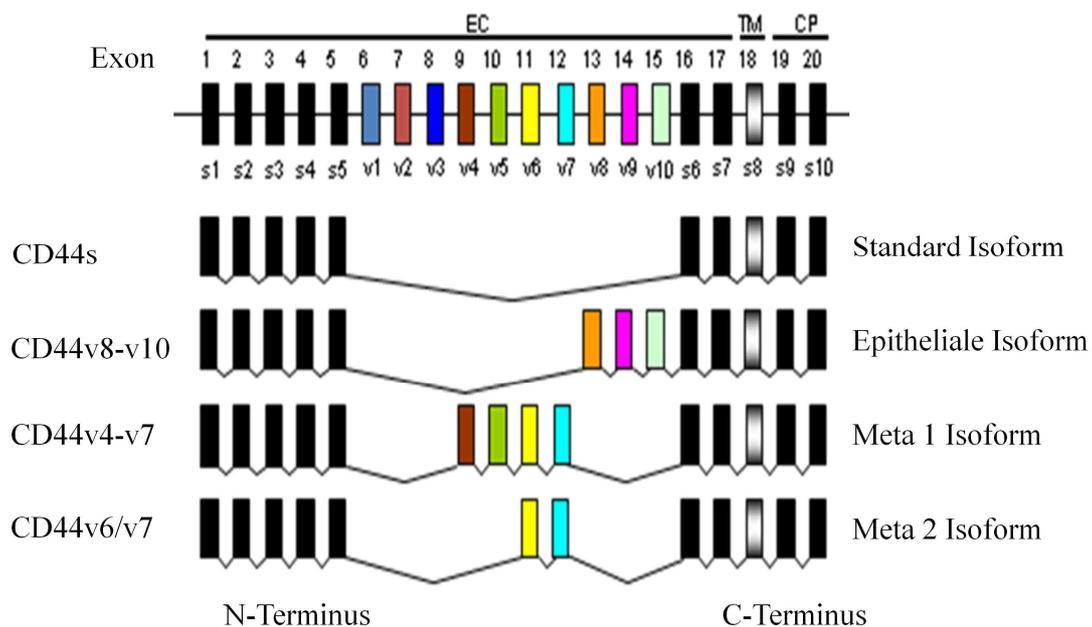


Abbildung 1.3.1.1:

CD44-Isoformen aus: „CD44 in cancer progression: Adhesion, migration and growth regulation“ (aus “Journal of Molecular Histology”)

Das Adhäsionsmolekül CD44 besteht aus einer langen extrazellulären-, einer transmembran-, sowie einer zytoplasmatischen-Domäne. Letztere kann kurz (kodiert durch Exon 9) oder lang (kodiert durch Exon 10) sein (Goldstein und Butcher, 1990). Die extrazelluläre Domäne enthält eine Bindungsstelle für HA und andere Glykosaminoglykane (GAG) (Naor et al., 1997) (Abb. 1.3.1.2). Die zytoplasmatische Domäne hingegen ist sowohl für Migration als auch für Signaltransduktion von Bedeutung. Beide Funktionen sind auf assoziierte Partnermoleküle angewiesen. Als einer der ersten zytoplasmatischen Partner von CD44 wurde Ankyrin beschrieben, welches HA-vermittelte Zelladhäsion und Migration vermittelt (Lokeshwar und Bourguignon, 1991). Weitere CD44-assoziierte Partner sind ERM-(Ezrin, Radixin, Moesin) Proteine und das Moesin-Ezrin-Radixin-like Protein (Merlin). ERM-Proteine regulieren die Zellmigration und die Zellform (Bretscher et al., 2002).

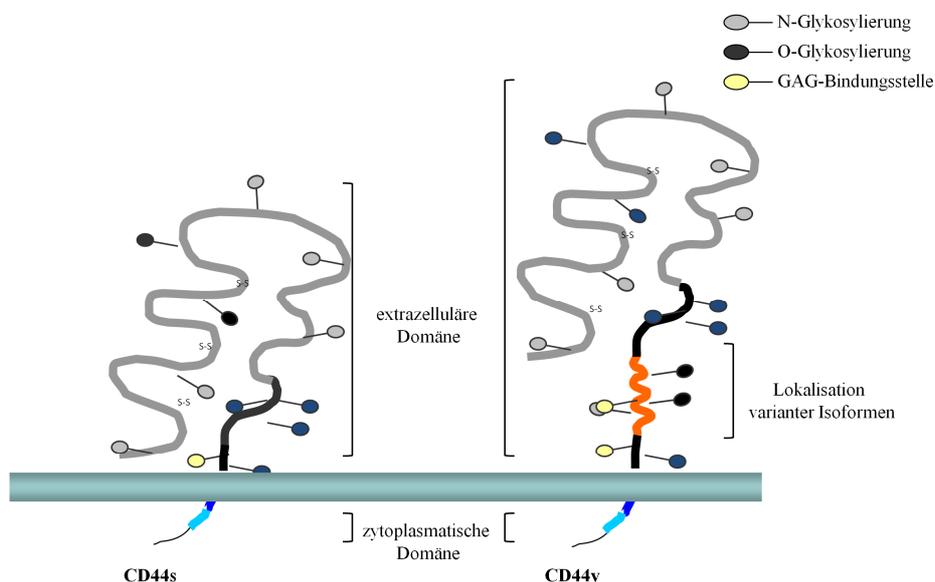


Abbildung 1.3.1.2:

Struktur von CD44 aus: „CD44 in cancer progression: Adhesion, migration and growth regulation” (aus “Journal of Molecular Histology”)

1.3.2 Interaktion/Funktion von CD44

Oberflächenrezeptor

In seiner Rolle als Oberflächenrezeptor bindet CD44 eine Reihe von Matrixproteinen wie Kollagen, Laminin (Ishii et al., 1993) und Fibronectin (Lokeshwar et al., 1994), aber auch andere Glykosaminoklykane (GAGs). Der Hauptligand von CD44 ist Hyaluronsäure (HA) (Culty et al., 1990). Die entsprechende Bindungsstelle für HA ist im extrazellulären Teil von CD44 lokalisiert. HA bindet an CD44s, aber auch an CD44v, was wiederum einen Einfluss auf die Affinität der HA-CD44-Bindung hat (Sleeman et al., 1996).

Die HA ist ein negativ geladenes, unverzweigtes Polymer, bestehend aus dem sich wiederholendem Disaccharid von Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin [$-\beta(1,4)\text{-GlcUA-}\beta(1,3)\text{-GlcNAc-}$] (Abb. 1.3.2). Unter physiologischen Bedingungen besteht HA aus 2.000-25.000 Disacchariden. Dies entspricht einer Molekularmasse von $10^6\text{-}10^7$ und einer Länge von 2-25 μm . Die HA gehört wie auch Heparansulfat und Chondroitinsulfat zu der Gruppe der Glykosaminoglykanen. Im Gegensatz zu allen anderen Glykosaminoglykanen wird die HA nicht im endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat zusammengesetzt, sondern von integralen Membranproteinen wie der Hyaluronsynthase gebildet. In Wirbeltieren wurden drei Typen von Hyaluronsynthasen nachgewiesen, HAS1, HAS2 und HAS3 (Toole, 2004).

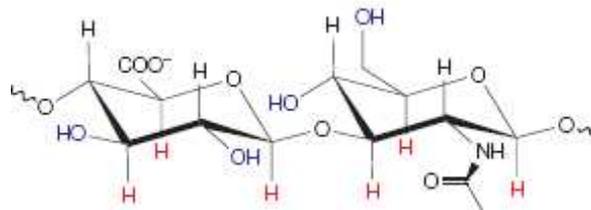


Abbildung 1.3.2:

Struktur von Hyaluronsäure aus: „Hyaluronan from extracellular glue to pericellular cue“ (aus “Nature, Reviews, Cancer”)

Kommt es zur Wechselwirkung von HA mit CD44, so interagiert die zytoplasmatische Domäne von CD44 mit dem Zytoskelett-Protein Ankyrin, oder mit verschiedenen anderen onkogenen Signalmolekülen wie Tiam1, Rho-aktiviertes ROK oder der c-Src Kinase. Dadurch können Signalwege, wie das Tumorwachstum, die Migration aber auch Apoptoseresistenz beeinflusst und gesteuert werden (Bourguignon, 2001).

Yu und Stamenkovic (1999) zeigten an Brusttumorzellen der Maus sowie an humanen Tumorzellen, dass CD44 mit der proteolytisch-aktiven Form der Metalloproteinase-9 (MMP-9) an der Zelloberfläche interagiert. Diese Interaktion führt zum Abbau von Kollagen IV und unterstützt damit das invasive Verhalten von Tumorzellen. Die Interaktion von CD44 mit Heparansulfat-Proteoglykanen führt zur Rekrutierung von proteolytisch-aktivem MMP-7, das auf der Zelloberfläche den heparinbindenden epidermalen Wachstumsfaktor (HB-EGF) spaltet. Daraufhin aktiviert freigesetztes HB-EGF den Rezeptor ErbB4, was zum Überleben der Zelle führt (Yu et al., 2002). Weiterhin interagieren auch der Hepatozyten Wachstumsfaktor/Scatterfaktor (HGF/SF) mit CD44 (Su et al., 2004).

Ko-Rezeptor

CD44 kann auch als Ko-Rezeptor für Rezeptor-Tyrosin Kinasen (RTK) wie den Hepatozyten Wachstumsfaktor-Rezeptor (HGFR/c-Met) fungieren. Für eine Aktivierung von c-Met durch HGF wurde sowohl in humanen als auch in Pankreastumorzellen der Ratte gezeigt, dass CD44v6 benötigt wird (Orian-Rousseau et al., 2002, Orian-Rousseau und Ponta, 2008). Weitere RTK, welche nur mit CD44v6 nicht aber CD44s Komplexe bilden, sind Mitglieder der Familie der ERBB-RTK, wie der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und ERBB1.

Außerdem wurden Interaktionen zwischen CD44 und HER2/neu (ERBB2), ERBB3 und ERBB4 beschrieben (Bourguignon et al., 1997, Sherman et al., 2000). Die Assoziation von CD44 und ERBB2 oder ERBB3 unterstützt die Heterodimerisierung und Aktivierung der Rezeptoren in Abhängigkeit von Neuregulin. Die Interaktion von CD44 und ERBB4 ist wahrscheinlich indirekt. Wie schon beschrieben, bindet CD44v3, welches mit Heparansulfat modifiziert ist, die Proform des heparinbindenden epidermalen Wachstumsfaktor (HB-EGF) (Yu et al., 2002). Durch die Rekrutierung und damit verbundene Aktivierung von MMP-7 durch CD44, kommt es zur Spaltung der Proform und zur Aktivierung des Rezeptors. Aber auch andere Transmembranproteine ohne katalytische Funktion können mit CD44 assoziieren. Das Tetraspanin D6.1A (Tspan8) und EpCAM (Schmidt et al., 2004, Kuhn et al., 2007) sowie das Integrin $\alpha 6\beta 4$ (Herlevsen et al., 2003) seien als Beispiele genannt.

Zytosolische Interaktion

Verschiedene intrazelluläre signal-transduzierende Proteine assoziieren mit der zytoplasmatischen Domäne von CD44. Die Reihe umfasst die Protein-Tyrosin Kinase (PTK) Src, Rho GTPase, Rho Kinase, Rho GDP-dissoziations Inhibitor (GDI), T-Lymphom Invasions- und metastasierungs-induzierendes Protein (TIAM1), VAV2, PKC und das proto-Onkogen DBL (Ponta et al., 2003). Weiterhin besteht eine indirekte Interaktion mit dem Aktinzytoskelett. Dies geschieht über die Bindung an Ankyrin und Mitglieder der ERM-Protein Familie (Tsukita et al., 1994, Bourguignon und Jin, 1995). Die ERM-Proteine spielen hauptsächlich eine Rolle in der Organisation der Zellmembran, bei der Migration von Zellen, der Phagozytose und der Apoptose (Tsukita und Yonemura, 1999) sowie bei der Signaltransduktion (Orian-Rousseau et al., 2007).

Physiologische/pathologische Funktion

CD44 ist in eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse involviert (Marhaba und Zöller, 2004). In Mäusen mit einer gezielten Deletion von CD44 konnte gezeigt werden, dass Morphogenese und Organogenese nicht beeinträchtigt waren. Die Mäuse waren fruchtbar und zeigten nur geringe Auffälligkeiten bei der Hämatopoese und der Lymphozyten-Aktivierung (Schmits et al., 1997, Protin et al., 1999).

Während der embryonalen Entwicklung wird CD44 auf Axonen exprimiert (Stretavan et al., 1994). CD44 Spleißvarianten sind zusammen mit dem Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) auf Zellen der apikalen Ektodermleiste exprimiert und spielen in der Entwicklung von Extremitäten eine entscheidende Rolle bei der Signalweiterleitung. Dabei befördern sie proliferations-fördernde Signale von der apikalen Ektodermleiste über die Basalmembran hin zu Zellen des Mesenchyms indem sie den Mesenchymzellen FGF präsentieren und so die Proliferation anregen (Sherman et al., 1998). Weiterhin wurde gezeigt, dass CD44 und variante CD44-Isoformen wie zum Beispiel CD44v6 während der Embryogenese auf epithelialen- und hämatopoetischen Zellen exprimiert ist (Wirth et al., 1993, Terpe et al., 1994, Weber et al., 1996), während sich die Expression in erwachsenen Tieren auf Haut, Darmepithel sowie Subpopulationen hämatopoetischer Zellen beschränkt (Kennel et al., 1993, Wirth et al., 1993, Fox et al., 1994, Hirano et al., 1994). Antikörper-Blockade führte zu einer Entwicklungshemmung (Zöller, 1996).

CD44 spielt auch bei der Zellmigration eine wesentliche Rolle. Dies wird insbesondere bei entzündlichen Reaktionen deutlich (Puré und Cuff, 2001). Welche wichtige Rolle CD44 bei Autoimmunkrankheiten zukommt, wurde u. a. auch bei Arthritis gezeigt (Brennan et al., 1997). Während der Entzündungsreaktion extravasieren Leukozyten vom Blut zum Entzündungsherd. In der Regel wird eine erhöhte Expression von CD44 auf Leukozyten beobachtet, das mit HA auf Endothelzellen interagiert. Die Aktivierung der T-Zellen erhöht die Bindung an HA und unterstützt somit die CD44-vermittelte Adhäsion. Hierbei kommt es zu einer schwachen Bindung von Leukozyten an das Endothel der Gefäßwand (De Grendele et al., 1997), wobei die Leukozyten auf den Endothelzellen entlang wandern. Dieser Prozess wird als „Rolling“ bezeichnet und leitet die Extravasation von Leukozyten ein (Albelda et al., 1994).

Matrixassembly

Als Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix kommt der HA eine wesentliche Rolle bei der Stützung von Geweben zu. Die HA wird wie schon erwähnt von integralen Membranproteinen gebildet (Toole, 2004). Zur Degradierung von HA in Oligosacharide oder größere Fragmente tragen Hyaluronidasen (HYAL) bei (Stern und Jedrzejak, 2006). In Knorpelzellen wurde gezeigt, dass CD44 als Rezeptor von HA den Aufbau der Matrix zusammen mit anderen Proteoglykanen und extrazellulären Proteinen unterstützt (Knudson, 1996). Studien berichteten über einen Zusammenhang zwischen Gehalt an HA und Invasivität von Tumoren, aber auch von einer Anreicherung der HA im Stroma (Toole et al., 1979, Bertrand et al., 1992). Andere wiederum zeigten, dass die HA-Produktion durch Stromazellen aufgrund von Interaktionen mit Tumorzellen stimuliert wird (Knudson et al., 1984, Asplund et al., 1993). In Patienten mit Brust- und Ovarialkarzinomen konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des Gehalts an HA mit einer niedrigeren Überlebenschance einher geht (Anttila et al., 2000, Auvinen et al., 2000).

Tumorprogression

Eine weitere wichtige Rolle von CD44 ist die Mitwirkung an der Tumorprogression (Naor et al., 2002, Ponta et al., 2003, Marhaba und Zöller 2004). Die Assoziation von CD44 mit Src erlaubt es CD44, in eine Reihe von Signalwegen einzugreifen, die Zellzykluskontrolle, Zellproliferation, Differenzierung und das Überleben von Zellen beeinflussen können (Thomas und Brugge, 1997). Die Interaktion zwischen CD44 und HA wurde als prinzipieller Vermittler der Proliferation von Tumorzellen beschrieben (Ahrens et al., 2001), wie zum Beispiel beim Brustkarzinom-, Gliom- und malignem Mesotheliom (Peterson et al., 2000, Akiyama et al., 2001, Nasreen et al., 2002). Wie schon erwähnt kann CD44 die Proliferation von Tumorzellen als Ko-Rezeptor unterstützen. Dies geschieht durch die Aktivierung von ERBB-Rezeptoren (Bourguignon et al., 2001) sowie die Aktivierung von c-Met (Orian-Rousseau et al., 2002). CD44v6 kann aber auch direkt die Proliferation von Tumorzellen durch Aktivierung des MAPK-Signalweges beeinflussen (Marhaba et al., 2005). Zum Wachstumsverlust von Tumorzellen kann es aufgrund der Zelldichte, aber auch durch die Assoziation von CD44 mit Merlin, ein ERM-ähnliches Protein welches ebenfalls mit der ERM-Bindestelle von CD44 interagieren kann, kommen (Morrison et al., 2001). Im inaktiven, gefalteten Zustand binden ERM-Proteine weder an die Plasmamembran noch an das Zytoskelett. Erst nach Aktivierung fungieren ERM-Proteine als „Cross-linker“, indem sie mit der N-terminale Domäne an der Plasmamembran und mit der C-terminale Domäne an das Zytoskelett binden. Die Bindung von Merlin und ERM-Proteinen an Transmembranproteine hängt von der jeweiligen Phosphorylierung ab. Die Assoziation von Merlin mit CD44 bzw. die Dissoziation nach Phosphorylierung von Merlin hat auf metastasierende Tumorzellen signifikante Auswirkungen. Dabei kommt es bei hoher Zelldichte zu Wachstumsinhibierung indem dephosphoryliertes Merlin mit CD44 interagiert. Im Zustand niedriger Zelldichte ist Merlin phosphoryliert und inaktiv. Die ERM-Proteine wiederum befinden sich in einem phosphoryliertem, aktiven Zustand, was zum Zellwachstum führt.

Neben der CD44-vermittelten Proliferation ist die Apoptoseresistenz ein wesentliches Charakteristikum von Tumorzellen. Der Vorgang der Apoptose lässt sich in zwei Wege unterteilen: extrinsischer- und intrinsischer-Weg. Der extrinsische Weg wird eingeleitet durch die Bindung eines Liganden an sogenannte Todesrezeptoren, was durch Signalweitergabe in der Aktivierung der Caspase-8 endet.

Diese löst ihrerseits die sogenannte Caspasen-Kaskade aus, wodurch in einer signalverstärkenden Rückkopplung weitere Caspase-8-Moleküle aktiviert werden. Beim intrinsischen Weg kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium in das Cytoplasma. Dieser Weg kann ausgelöst werden durch Tumor-Suppressoren, wie beispielsweise p53, einem Transkriptionsfaktor, der durch Schädigung der DNA aktiviert wird. p53 stimuliert die Expression pro-apoptotisch wirkender Mitglieder der Bcl-2 Familie (z.B. Bax, Bad).

Diese führen dann zur Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren – wie etwa Cytochrom C aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Auch hier kommt es zur Signaltransduktion und zur Aktivierung der Caspase-9. Analog zu Caspase-8 initiiert aktive Caspase-9 die Caspasen-Kaskade. Eine Signalverstärkung dieses Weges wird innerhalb der Caspasen-Kaskade durch Caspase-7 vermittelt, welche nicht nur Substrate spaltet, die an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind, sondern ihrerseits auch die Caspase-9 aktiviert (Oren, 1992). Apoptose wird in Lymphom- und Thymuszellen durch die CD44-Liganden Interaktion, und die damit verbundene Hochregulation von Bax und Runterregulation von Bcl-XI, induziert (Guy et al., 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Quervernetzung von CD44 auf Tumorzellen die Runterregulation von FAS initiiert (Yasuda et al., 2001). Es wurde aber auch beschrieben, dass CD44 zum Überleben der Zellen beiträgt, indem es die Induktion von Apoptose unterbindet (Bates et al., 1998, Allouche et al., 2000). In den meisten Fällen geschieht dies nach CD44/Liganden Interaktion und Assoziation mit der PI3K. Damit verbunden ist die BAD Phosphorylierung und Hochregulation von Akt (Bates et al., 2001, Ghatak et al., 2002) sowie die Aktivierung und Hochregulation anti-apoptotischer Gene wie Bcl-XI und Bcl-2 (Khan et al., 2002, Marhaba et al., 2003).

Auch über seine migrationsunterstützenden Eigenschaften ist CD44 in den Prozess der Tumorprogression involviert. So kann die CD44-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts über die Aktivierung von Rac1 verlaufen. Demzufolge konnte in einer Brustepithelzelllinie der Maus die Bildung von Lamellipodien nach HA-Behandlung durch anti-CD44 blockierende Antikörper, aber auch durch die Transfektion einer dominant-negativen Mutante von Rac1 inhibiert werden (Oliferenko et al., 2000), wobei aktiviertes Rac1 auch mit Ezrin ko-lokalisiert und in die Aktivierung von PTK involviert ist (Cywes und Wessels, 2001). In T-Lymphozyten führt die Aktivierung von CD44 zum Spreizen, dass von einer F-Aktin Polymerisierung begleitet wird, wobei die F-Aktin Polymerisierung über die Aktivierung durch CD44 eingeleitet wird (Föger et al., 2001).

Ein weiterer Vermittler in der CD44-initiierten Signalweitergabe ist RhoA und sein Effektor die Rho-Kinase (ROK). ROK ist eine Serin-Threonin Kinase, die mit Rho interagiert. Diese Interaktion ist abhängig von GTP (Matsui et al., 1996) und reguliert die Funktion des Zytoskeletts durch Phosphorylierung verschiedener Reglatoren wie zum Beispiel von Myosin (Amano et al., 1999).

1.4 Tumorzell/Wirt-Interaktion

1.4.1 Tumorstroma (Mikroumgebung)

Tumorepithelzellen sind umgeben vom Tumorstroma, welches aus der extrazellulären Matrix (EZM) und verschiedenen nicht transformierten Zellen besteht. Diese nicht transformierten Zellen sind entweder im Organ bereits vorhanden und werden durch den Tumor moduliert oder sie werden durch den Tumor bzw. vom Tumor abgegebene Faktoren rekrutiert. Dabei handelt es sich u. a. um Endothelzellen, fibroblastoide Zellen (Fibroblasten, Myofibroblasten) sowie Entzündungsmediatoren wie Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und Lymphozyten. Die EZM von desmoplastischem Tumorgewebe unterscheidet sich von der EZM gesunden Gewebes unter anderem in der Menge an Fibrin, welches aus dem Blutplasma stammt, aber auch Fibronektin, Proteoglykane sowie Kollagene (I, III, VI, XV, XVIII) sind in erhöhter Menge im Tumorgewebe vorhanden (Stewart et al., 2004). Eine Reihe von Daten weisen darauf hin, dass das Tumorstroma die Proliferation, das Überleben, die Polarität, die Differenzierung sowie die invasive und metastatische Eigenschaft von Tumorzellen beeinflussen kann (Frisch und Francis, 1994, Weaver et al., 1996, Aboseif et al., 1999, Vaccariello et al., 1999).

So konnte gezeigt werden, dass Zellen des Primärtumors mit aus dem Knochenmark eingewanderten Stromazellen, interagieren können. Als Antwort auf den vom Tumor-abgegebenen Faktor M-CSF 1 (Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor 1) kommt es zur Proliferation von Tumor-assoziierten Makrophagen und weiter zur Produktion von Wachstumsfaktoren (FGF; Fibroblasten-Wachstumsfaktor, PDGF; Thrombozyten-wachstumsfaktor; EGFR, epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor Liganden) und Proteasen (MMPs und Cathepsine) (Joyce, 2005, Lewis und Pollard, 2006).

Daraufhin aktivieren die Tumor-assoziierten Makrophagen Myofibroblasten, welche das Chemokin SDF-1 („stromal-derived-factor 1“) sezernieren. Dies wiederum befähigt die Myofibroblasten endotheliale Progenitorzellen anzulocken (Orimo et al., 2005).

1.4.2 Präparation der Nische

Schon 1978 wurde diskutiert, dass Stammzellen eine Nische zu ihrer Erhaltung und zum Überleben benötigen (Schofield, 1978). Die Stammzellnische stellt die äußere Kontrolleinheit für das Überleben, die Selbsterneuerung und die Differenzierung der Stammzelle dar. Dies vermittelt sie über lokale und systemische Signale (Spradling et al., 2008). Für viele adulte Stammzellen ist die entsprechende Nische noch schlecht definiert. Die meisten bisher zur Verfügung stehenden Informationen wurden im Kontext hämatopoetischer Stammzellen und ihrer Nische erhoben. Auch Tumorgewebe enthält Zellen mit Stammzell-Potential, welche als Krebsstammzellen bezeichnet werden (Iwasaki et al., 2009). Krebsstammzellen sind für das Wachstum des Primärtumors, aber auch für die spätere Metastasierung essentiell (Sales et al., 2007). Eigenschaften der Krebsstammzellen sind Chemo- und Strahlenresistenz sowie die Fähigkeit zur Neubildung von Tumoren. Weiterhin können sich Krebsstammzellen durch Selbsterneuerung reproduzieren (Kang, 2009, Dalerba und Clark, 2007) und sind durch Krebsstammzell-Marker charakterisiert. Diese wurden bei Leukämien, Sarkomen und Karzinomen beschrieben (Papathanasiou et al., 2009, Marhaba et al., 2008). Krebsstammzellen haben einige der Marker, wie auch funktionelle Eigenschaften mit embryonalen- (ESZ) und adulten- (ASZ) Stammzellen gemeinsam, einschließlich der Signalwege, welche die Stammzelleigenschaften regulieren (Kucia et al., 2005, Vescovi et al., 2006).

Die Nische setzt sich aus extrazellulären Matrixproteinen, Stroma-Zellen, löslichen Faktoren sowie Blut- und Lymphgefäßen zusammen. Erstere sind für die Struktur und Organisation der Nische verantwortlich (Khaldoyanidi, 2008). Man geht davon aus, dass die Verankerung der Stammzelle mit der EZM und den Stromazellen positiv zur Selbsterneuerung und zum Apoptoseschutz der Stammzelle beiträgt (Ghotra et al., 2009). Es ist bekannt, dass eine Interaktion der Tumorzelle mit der Matrix zur Veränderung der Zellform und zur Weitergabe von Signalen führen kann. Dies beeinflusst wiederum das Zellwachstum und kann zu einer gestörten Genexpression führen (Wang et al., 2009). Es wurden sowohl für ESZ, wie auch für ASZ Nischen nachgewiesen. Auch die Krebsstammzellen sind auf das Vorhandensein von

Nischen angewiesen (Johnson, 2009), die im Kontext der Tumorprogression und Metastisierung ihre Bedeutung finden (Bhowmick et al., 2004, Bissell et al., 2005). Kaplan et al. (2005) zeigte, dass die Nische im Organ lange bevor der Tumor sich einlagert, vorbereitet wird. Dies geschieht wie schon beschrieben u.a. über Fibroblasten, welche durch vom Tumor sezernierte Wachstumsfaktoren und über einwandernde hämatopoetische Zellen stimuliert werden.

Wir haben Hinweise gefunden, dass neben der Sezernierung von Matrixproteinen noch ein weiteres Kommunikationssystem im Kontext der prämetastatischen Nische von Bedeutung ist. Hierbei handelt es sich um Exosomen.

1.4.3 Exosomen-Stroma Reaktion

Exosomen sind Membranvesikel mit einem Durchmesser von 30-100nm (Johnstone, 2006), welche von vielen Geweben u. a. Lymphzyten und Darmepithelzellen, aber besonders reichhaltig von Tumorzellen an das extrazelluläre Milieu abgegeben und systemisch in allen Körperflüssigkeiten wie Urin, Serum, Speichel und Milch (Admyre et al., 2007, Keller et al., 2009, Palanisamy et al., 2010) nachgewiesen werden können. Die Generierung von Exosomen wird über Endozytose eingeleitet. Hierbei werden entweder Clathrin „coated pits“, Proteinkluster in „Lipid-Rafts“ oder von Tetraspanin-angereicherten Membranmikrodomänen (TEMs) zusammen mit der Membran eingestülpt. Nach Abschnürung und einem Schneidprozess kommt es zur Bildung von sogenannten frühen Endosomen („early endosomes“, EE). Durch weitere Einstülpungen und Prozesse, an denen Enzyme wie die V-ATPase mitbeteiligt ist (Lafourcade et al., 2008), bilden sich aus EE dann sogenannte multivesikuläre Körperchen („multi vesicular bodies“, MVB).

Dieser Prozess wird durch ubiquitäre Rab-Proteine und die ESCRT („endosomal sorting complex required for transport“)-Maschinerie unterstützt. Entweder kommt es dann zur Degradierung von Proteinen durch Fusionierung der MVB mit dem Lysosom, oder unter Beteiligung von Rab7-Proteinen zur Freisetzung in das Zytoplasma, oder durch die Fusion der MVB mit der Membran zur Freisetzung von Exosomen in den extrazellulären Raum (Théry et al., 2002) (Abb. 1.4.3a). Ursprünglich als Müllabfuhr erachtet weiß man heute, dass die Freisetzung der Exosomen in den extrazellulären Raum vornehmlich der interzellulären

Kommunikation dient. Die Zusammensetzung der Exosomenproteine ist ursprungsabhängig. Es gibt eine Reihe von Proteinen die auf allen Exosomen nachgewiesen wurden.

Zu ihnen gehören zytosolische Proteine wie Rab's, welche das Andocken von Exosomen und die Membranfusion unterstützen. Auch Annexin I, II, V und VI wurde auf allen Exosomen nachgewiesen. Verschiedenste Adhäsionsmoleküle wie CD146, der milk-fat-globule EGF-Faktor VIII (MFG-E8), aber auch CD18, CD11a, CD11b, CD11c und CD166 sind auf Exosomen identifiziert worden. Weiterhin lassen sich Hsp60, 70 und 90 auf Exosomen nachweisen. Ein weiteres Charakteristikum von Exosomen ist die Expression von Tetraspaninen. Zu ihnen zählen CD9, CD63, CD81 und CD82 (Abb. 1.4.3c). Es gibt auch Proteine auf Exosomen, welche Zelltyp spezifisch exprimiert werden. Zu ihnen gehören die MHC-Moleküle, die auf Exosomen antigen-präsentierender Zellen detektiert werden. Exosomen von Enterozyten beinhalten Enzyme aus dem Darm (Lie et al., 2005). Nicht nur Proteine sind auf Exosomen exprimiert, sondern auch Lipide von denen Lysophosphatidylcholin, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin sowie Cholesterol und Diglyceride auf Exosomen angereichert sind (Schorey und Bhatnagar, 2008). Exosomen enthalten keine DNA, aber mRNA und miRNA.

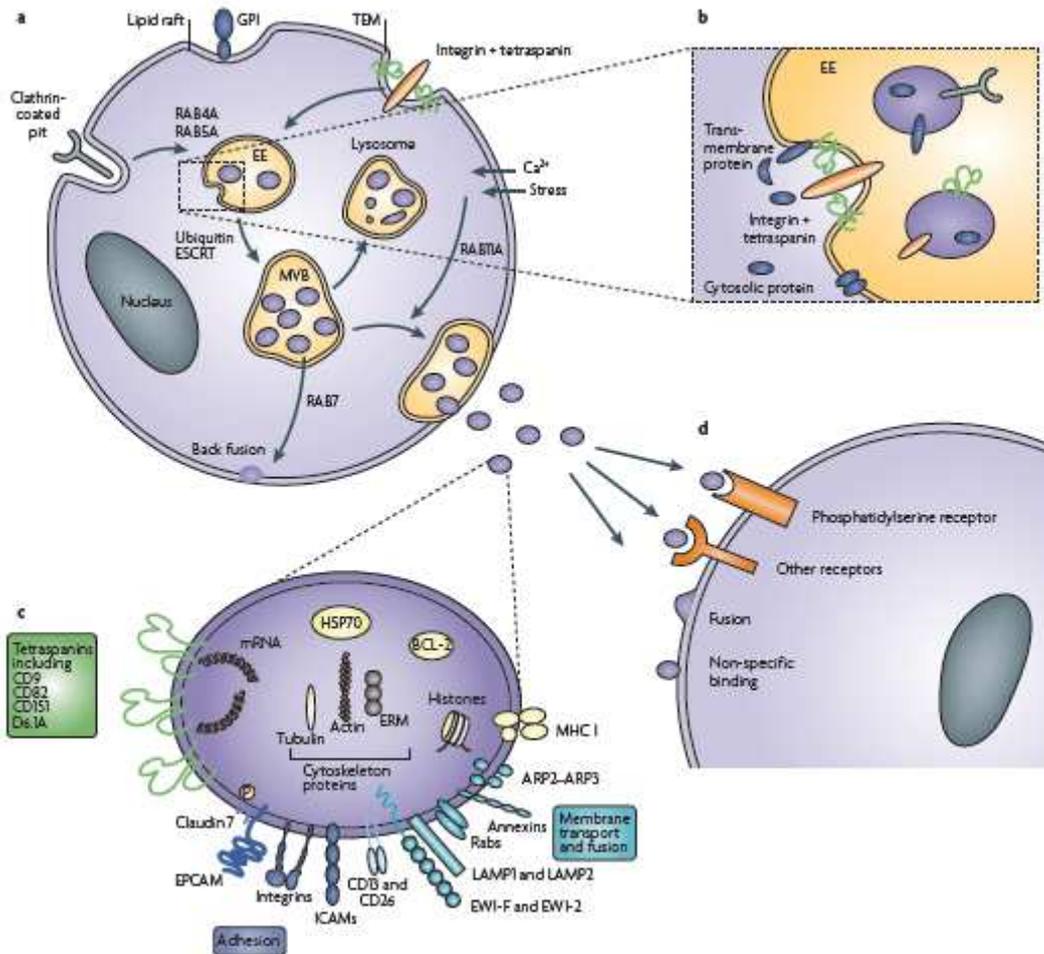


Abbildung 1.4.3:

Freisetzung von Exosomen aus: „Tetraspansins: push and pull in suppressing and promoting metastasis“ (aus “Nature Review Cancer”)

Exosomen erweitern das Spektrum interzellulärer Kommunikation auf eine ungeahnte Weise. Exosomen agieren als Morphogene in der Onkogenese. Sie können Antigen-präsentierende Zellen ersetzen und eine Immunantwort initiieren. Exosomen können aber auch onkogenes Material übertragen und Viren und Parasiten können sich dieser Modalität bei der Ausbreitung in einem Organismus zunutze machen. Die Potenz der Exosomen ist darauf zurückzuführen, dass sie der Zielzelle nicht nur einen einzelnen Stimulus sondern eine Vielzahl von Stimuli anbieten. Exosomen können über Ligandenbindung aber auch durch Fusion mit der Zielzelle aktiv werden und nicht zuletzt durch den Transfer von mRNA die Translation von Proteinen in Gang setzen, bzw. über mikroRNA kann eine gezielte Ausschaltung von Genen erfolgen. Dieses Potential wird in der Tumorimmunologie bereits klinisch genutzt. Exosomen als hoch effizienter Gentransporter werden diskutiert.

So können Exosomen verschiedene Kombinationen von Liganden beinhalten, welche simultan mit entsprechenden Zell-Rezeptoren interagieren können. Dies ist gleichzusetzen mit der Interaktion zweier Zellen. Exosomen können aber auch an Zielzellen binden und so „neue“ Oberflächenproteine präsentieren, was zu neuen adhäsiven Eigenschaften führen kann. Oder aber Exosomen fusionieren mit den Zielzellen und transferieren so zytosolische- und Membranproteine in die Zielzelle (Abb. 1.4.3d). Es existiert eine Reihe von Daten, die die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten von Exosomen *in vitro* aufzeigen. Über mögliche funktionelle Eigenschaften *in vivo* ist aber nur wenig bekannt (Théry et al., 2002). So wurde gezeigt, dass Exosomen aus Zellkulturüberständen, welche von aktivierten humanen CD4+ T-Zellen stammten sowohl die Cholesterol-Akkumulation, als auch die TNF- α Produktion in kultivierten humanen Monozyten und THP-1-Zellen anregen (Zakharova et al., 2007). Raposo et al. (1997) zeigte, dass Exosomen, die von EBV-tranformierten B-Zellen sezerniert wurden, humane CD4+ T-Zellen antigen-spezifisch stimulieren. Exosomen, die von antigenpräsentierenden Zellen abgegeben werden, sind in der Lage eine Immunantwort hervorzurufen, wohingegen Tumorzell-sezernierte Exosomen in der Lage sind immunsuppressiv zu wirken (Bausero et al., 2005, Mallegol et al., 2005, Valenti et al., 2007). Abschließend ist zu sagen, dass Exosomen, welche von Tumorzellen oder dendritischen Zellen, die zuvor mit Tumorantigenen in Kontakt kamen und sezerniert wurden, ein nützliches Werkzeug für die Immuntherapie darstellen (Mignot et al., 2006).

1.5 BSp73-Tumormodell

Tumorzelllinien, die von einer gemeinsamen Parentalzelllinie abstammen, sich aber massiv in ihrer Metastasierungsfähigkeit unterscheiden, stellen ein geeignetes System dar, um für die Metastasierung essentielle Faktoren zu definieren. Ein solches Modell ist das BSp73 Tumormodell. Aus einem spontan aufgetretenen Adenokarzinom des Pankreas (BSp73) einer BDX Ratte wurde die Parentallinie etabliert (Zoller et al., 1978). Nach mehrmaligem in vivo passagieren über subkutane Transplantation, wurden Tumore beschrieben, die unterschiedliches metastasierendes Potential aufwiesen und als BSp73AS (AS) und BSp73ASML (ASML) bezeichnet wurden. Nach Injektion in die Fusspfote von syngenem Ratten zeigen AS-Zellen schwach metastasierende Eigenschaften. Sie wachsen vornehmlich lokal und erreichen nur die drainierenden Lymphknoten.

Die ASML Schwesterlinie zeigt kaum lokales Tumorstadium und breitet sich sehr schnell durch das Lymphsystem aus und bildet eine Unzahl kleinster Metastasenknötchen in der Lunge, an der nun die Tiere letztendlich sterben (Matzku et al., 1983). Im Unterschied zu AS-Zellen, deren Morphologie denen von Epithelien gleicht, zeigen ASML-Zellen eine runde Form ohne sichtbares Ausspreizen. ASML-Zellen, im Gegensatz zu AS-Zellen binden nur schwer an Substrate wie Laminin, Fibronectin und Kollagen (Matzku et al., 1985). Durch Generierung von monoklonalen Antikörpern, die nur mit der ASML-Zelllinie interagieren, konnten metastasierungsassoziierte Antigene identifiziert werden. (Matzku et al., 1989). Dabei handelt es sich um eine variante Isoform des Hyaluronsäurerezeptors CD44 (Günthert et al., 1991), C4.4A (Rösel et al., 1998) ein Molekül mit Ähnlichkeit zum uPAR, EpCAM (Würfel et al., 1999), das Integrin $\alpha\beta4$ (Herlevsen et al., 2003) sowie das Tetraspanin D6.1A (Claas et al., 1998). Mittels „Affimetrix GeneChip Array“-Technologie wurden mittlerweile mehrere hundert Proteine identifiziert, die auf beiden Sublinien differentiell exprimiert werden (Tarbé et al., 2002).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der frühen und fulminanten Metastasierung haben Patienten mit einem Pankreaskarzinom eine überaus schlechte Prognose. Variante CD44 Isoformen (CD44v) tragen einen wesentlichen Beitrag zur lymphogenen Metastasierung von Tumoren bei. Dieser ursprünglich in einem Rattentumormodell erhobene Befund konnte in vielen klinischen Studien bestätigt werden. Es gelang stabile CD44v knockdown Klone der metastasierenden Tumورlinie BSp73ASML zu generieren. Der Verlust der Expression varianter CD44 Isoformen geht mit einem Verlust der Metastasierungsfähigkeit einher. Weiterführende Untersuchungen haben aufgezeigt, dass die BSp73ASML-CD44v knockdown (BSp73 ASML CD44v^{kd}) Klone durch einen signifikanten Verlust der Apoptoseresistenz gekennzeichnet sind und die Fähigkeit verloren haben, eine Matrix zu sezernieren, die einen Apoptoseschutz darstellt, sowie die Adhäsion von Tumorzellen unterstützt. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass CD44v an der Sekretion oder Aufbereitung einer peritumoralen Matrix beteiligt ist und über die Bindung der Tumorzellen an diese Matrix Signale in der Tumorzelle aktiviert werden, die die Zellen vor apoptotischem Zelltod schützen. Ziel meiner Dissertation war daher die Beantwortung folgender Fragen:

1. In welchem Ausmaß sind CD44v Isoformen an der Sekretion oder der Aufbereitung einer die Metastasierung unterstützenden Matrix beteiligt?
2. Welche Komponenten der Tumormatrix sind für die Präparation einer prämetastatischen Nische und/oder für Apoptoseresistenz verantwortlich?
3. Welche Signalwege werden über CD44 zum Schutz vor Apoptose aktiviert?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1.1: Darstellung der verwendeten Chemikalien unter Angabe des Herstellers

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetoacetat	Merck, Darmstadt
Agar	Fluka, Buchs, Schweiz
Agarose	Sigma, Seelze
3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC)	Sigma, Seelze
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Seelze
³² P-ATP	Amersham Pharmacia, Freiburg
Biotin-X-NHS	Calbiochem, Darmstadt
Brilliant Blau G-Colloidal Konzentrat	Sigma, Seelze
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	PAA, Östreich
Chaps	Applichem, Darmstadt
Chloroform	Sigma, Seelze
Cisplatin (cis-Diaminplatinum(II)dichlorid)	Sigma, Seelze
Coomassie R250	Gerbu-Biotechnik, Gaiberg
DEPC	Applichem, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
DTSSP	Sigma, Seelze
DTT	Sigma, Seelze

Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Seelze
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma, Seelze
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glycerol	Appllichem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Seelze
Hyaluronsäure (Rooster Comb)	Sigma, Seelze
HA-bindendes-Protein	Callbiochem, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth,, Karlsruhe
Kaliumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe
Lubrol MX (17A17)	Serva, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mayer´s Häkalaun	AppliChem, Darmstadt
B-Mercaptoethanol	Sigma, Seelze
Mowiol	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma, Seelze

Natriumdodekylsulfat (SDS)	Sigma, Seelze
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumtetrathionat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Seelze
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Seelze
Penizilin	Sigma, Seelze
Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostik, Mannheim
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Poly-L-Lysin	Sigma, Seelze
Ponceau-S-Lösung	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Mix)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	Sigma, Seelze
TEMED	Sigma, Seelze
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (MTT)	Roth, Karlsruhe
TRIS	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Roth, Karlsruhe
³ H-Thymidin	Amersham Bioscience, Freiburg
Triton X-100	Sigma, Seelze
Trypsin	Sigma, Seelze
Tween 20	Serva, Heidelberg
Urea	Sigma, Seelze

Alle anderen Chemikalien, welche nicht aufgelistet sind, entsprechen analytischer Reinheit und wurden von Sigma (Seelze), Calbiochem (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Applichem (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Tabelle 2.1.2: Darstellung der verwendeten Enzyme unter Angabe des Herstellers

Enzym	Hersteller
RNAase	Promega, Mannheim
Hyaluronidase type IV-S (bovine testis)	Sigma, Seelze

2.1.3 Inhibitoren

Tabelle 2.1.3: Darstellung der verwendeten Inhibitoren unter Angabe des Herstellers

Inhibitor	Hersteller
Ly29004 (PI3K-Inhibitor)	Calbiochem, Darmstadt
Wortmanin (PI3K-Inhibitor)	Calbiochem, Darmstadt
SU 11274 (c-Met-Inhibitor)	Sigma, Seelze
GW 5074 (Raf-Inhibitor)	Sigma, Seelze

2.1.4 Nukleotid- und Proteinstandards

Tabelle 2.1.4: Darstellung der verwendeten Nukleotid- und Proteinstandards unter Angabe des Herstellers

Nukleotid- und Proteinstandard	Hersteller
100 bp Gene Ruler	MBI Fermentas, St. Leon Rot
1 kb Gene Ruler	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Rot

2.1.5 Kits

Tabelle 2.1.5: Darstellung der verwendeten Kits unter Angabe des Herstellers

Kit	Hersteller
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Bioscience, Freiburg

Vectastain ABC kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
2D-Clean-Up-Kit	Amersham, Bioscience, Freiburg

2.1.6 Primer

Tabelle 2.1.6: Darstellung der verwendeten Primer unter Angabe der Sequenz

Primer	Sequenz
CD133-sense	5'-AGCCAAGACACCTTCAATGC-3'
CD133-antisense	5'-ACGGTGTGAGT TCCCTGTC -3'
CD166-sense	5'-AACCTGGAGAGTCAGGAGCA-3'
CD166-antisense	5'-TGCGAGCTGTGATTTGTT TC-3'
CD24-sense	5'-ACATCGGTTGCACCATTTTC-3'
CD24-antisense	5'-GAGAGAGAGGGCCAG GAGAC-3'
GAPDH-sense	5'-GACCCCTTCATTGACCTCAAC-3'
GAPDH-antisense	5'-CTTCTCCAT GGTGGTGAAGAC-3'
Rs5'	5'-CGACCCTTTTCCAGAGGGCGACTA-3'
Rs3'	5'-CGTCTCCAATCGTGCTGTCTTTTC-3'
Rat C13	5'-AAGACATCGATGCCTCAAAC-3'
ratC2A	5'-GGCACTACACCCCAATCTTC-3'
rat pv4	5'-TGCAACTACTCCATGGGTTT-3'
rat pv5	5'-TATAGACAGAAACAGCACCA-3'
rat pv6	5'-TGGGCAGATCCTAATAGCAC-3'
rat pv7	5'-CTGCCTCAGCCCACAACAAC-3'
rat pv8	5'-CCAGTCATAGTACAACCCTT-3'

2.1.7 siRNA

Tabelle 2.1.7: Darstellung der verwendeten siRNA unter Angabe der Sequenz

siRNA	Sequenz
c-Met (Konstrukt 1)	5'- AACGGCGGCGAGCTAAATATA-3'
c-Met (Konstrukt 2)	5'- ACCATGTACTCTTGACGTCTA-3'
β 4 (Konstrukt 1)	5'- AGGCGCCTACACCCAGTATAA-3'
β 4 (Konstrukt 2)	5'- TACAGACAAGTCAACGGCGTA-3'
Kontrolle (Alexa Fluor 488)	5'- AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primärantikörper

Tabelle 2.1.8.1: Darstellung der verwendeten Primärantikörper unter Angabe der Verwendung und des Herstellers

Antikörper	Verwendung	Hersteller
$\alpha\beta$ 4 clone B5.5	FACS, WB, IP, Immunfluoreszenz	Klon B5.5 (Matzku et al. 1989)
Actin	WB	BD, Heidelberg
Akt	WB	BD, Heidelberg
p-Akt	WB	BD, Heidelberg
Annexin5	WB	Santa Cruz, Heidelberg
BAD	WB	BD, Heidelberg
p-BAD	WB	BD, Heidelberg
Bcl-2	WB	BD, Heidelberg
Bcl-Xl	WB	Cell Signaling, Frankfurt
bFGFR	FACS	Oncogene, Bosten, USA
C3	WB	MP Biomed, Eschwege
Caspase-3	WB	Cell Signaling, Frankfurt

Caspase-8	WB	BD, Heidelberg
Caspase-9 cleaved	WB	Cell Signaling, Frankfurt
Caveolin	WB	Santa Cruz, Heidelberg
C4.4A	FACS, Immunhistologie	Klon C4.4 (Matzku et al., 1989)
Caveolin	WB	BD, Heidelberg
CD44s	FACS, Immunfluoreszenz	Klon Ox50 (EAACC)
CD44v6	FACS, WB, Immunfluoreszenz	Klon A2.6 (Matzku et al., 1989)
CD104 (β 4)	FACS, WB, Immunfluoreszenz	BD, Heidelberg
CD106	FACS	Biozol, Eching
CD11a	FACS	BD, Heidelberg
CD11b	FACS, Immunhistologie	Klon Ox42 (EAACC)
CD11c	FACS	Klon Ox41 (EAACC)
CD13	WB	Chang et al., 2005
CD151	WB	Claas et al., 1998
CD18	FACS	BD, Heidelberg
CD24	WB	Santa Cruz, Heidelberg
CD29	FACS	BD, Heidelberg
CD31	FACS, Immunhistologie	BD, Heidelberg
CD49b	FACS	BD, Heidelberg
CD49c	FACS, Immunhistologie	BD, Heidelberg
CD49d	FACS, Immunhistologie	BD, Heidelberg
CD49e	FACS	BD, Heidelberg
CD49f	FACS	Abcam, Cambridge, UK
CD54	FACS, Immunhistologie	Biozol, Eching
CD81	WB	Santa Cruz, Heidelberg

CD9	WB	BD, Heidelberg
Claudin-7	WB	Langbein et al., 2003
c-Met	FACS, Immunfluoreszenz, WB, IP	Cell Signaling, Frankfurt
p-c-Met	WB	Cell Signaling, Frankfurt
c-Raf	WB	BD, Heidelberg
Kollagen I	Immunfluoreszenz, WB	Rockland, Gilbertsville, PA
Kollagen II	Immunfluoreszenz, WB	Lab Vision, Fremont, CA
Kollagen III	Immunfluoreszenz, WB	ARB, Golden, CO
Kollagen IV	Immunfluoreszenz, WB	Rockland, Gilbertsville, PA
Cytochrom C	WB	BD, Heidelberg
D6.1A	WB	Klon D6.1A (Matzku et al., 1989)
ERK ½	WB	Santa Cruz, Heidelberg
p-ERK ½	WB	Santa Cruz, Heidelberg
EpCAM	WB	Klon D5.7 (Matzku et al., 1989)
EWI-F	WB	Orlicky et al., 1998
EGFR	FACS	Santa Cruz, Heidelberg
Ezrin	WB, Immunfluoreszenz	Sigma, Seelze
p-Ezrin	WB	Cell Signaling, Frankfurt
FAK	WB, Immunfluoreszenz	Santa Cruz, Heidelberg
p-FAK	WB	Cell Signaling, Frankfurt
Fibronectin	WB	BD, Heidelberg
Gab1	WB	Cell Signaling, Frankfurt
HAS3	WB	Abcam, Cambridge, UK
HSP-1	WB	Santa Cruz, Heidelberg
HYAL1	WB	Santa Cruz, Heidelberg

Hyaluronan	WB	Rockland, Gilbertsville, PA
INS-2	WB	Santa Cruz, Heidelberg
Laminin-1	WB, Immunfluoresznez	Rockland, Gilbertsville, PA
Laminin-5	WB, Immunfluoresznez	BD, Heidelberg
MMP13	Immunfluoresznez	Dianova, Hamburg
MMP2	WB	Dianova, Hamburg
MMP9	WB	Dianova, Hamburg
Moesin	WB	BD, Heidelberg
mTOR	WB	Cell Signaling, Frankfurt
Osteopontin	WB	Santa Cruz, Heidelberg
PDGF	FACS	BD, Heidelberg
PDGFR	FACS	BD, Heidelberg
PGK-1	WB	Santa Cruz
PI3K	WB, IP	BD, Heidelberg
PKC	WB	BD, Heidelberg
p-PKC	WB	Cell Signaling, Frankfurt
S100A4	WB	Abcam, Cambridge, UK
SDF-1	FACS, WB	Abcam, Cambridge, UK
Src	WB, IP	Cell Signaling, Frankfurt
p-Src	WB	Cell Signaling, Frankfurt
STAT3	WB	BD, Heidelberg
p-STAT3	WB	BD, Heidelberg
TGF β	FACS	Santa Cruz, Heidelberg
Trombospondin	FACS, WB	Santa Cruz, Heidelberg
TNF α	FACS	BD, Heidelberg
p-Tyrosine	WB	BD, Heidelberg

Ras	WB	BD, Heidelberg
uPA	FACS, WB	Calbiochem, Darmstadt
uPAR	FACS, Immunhistologie	Calbiochem, Darmstadt
VEGF	FACS	Biotrend, Köln
VEGFR1	FACS, Immunhistologie	Biotrend, Köln
VEGFR2	FACS, Immunhistologie	Biotrend, Köln
Vitronectin	FACS, WB	Biotrend, Köln
vWF	FACS, WB	Abcam, Cambridge, UK

2.1.8.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2.1.8.2: Darstellung der verwendeten Sekundärantikörper unter Angabe der Verwendung und des Herstellers

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Anti mouse-IgG-TxRED	Immunfluoreszenz	dianova, Hamburg
Ant-mouse-IgG-Cy2	Immunfluoreszenz	Rockland, Gilbertsville, USA
Ant-mouse-IgG-Cy3	Immunfluoreszenz	dianova, Hamburg
Anti mouse-IgG-biotin	Immunhistologie	dianova, Hamburg
Anti mouse-IgG-HRP	WB	Rockland, Gilbertsville, USA
Anti goat-IgG-HRP	WB	Rockland, Gilbertsville, USA
Anti rabbit-IgG-HRP	WB	Rockland, Gilbertsville, USA
Extravidin-Peroxidase	WB	Sigma, Seelze
Anti mouse-IgG-PE	FACS	dianova, Hamburg
Anti mouse-IgG-APC	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
Anti mouse-IgG-FITC	FACS	dianova, Hamburg
Anti rabbit-IgG-PE	FACS	dianova, Hamburg
Anti hamster-IgM-FITC	FACS	dianova, Hamburg

Streptavidin-AP	ELISA	dianova, Hamburg
Streptavidin-HRP	WB	dianova, Hamburg
Phalloidin	Immunfluoreszenz	Sigma, Seelze

2.1.9 Zelllinien

Tabelle 2.1.9: Darstellung der verwendeten Pankreasadenokarzinom-Zelllinien unter Angabe des Ursprungs und der Referenz

Zelllinie	Ursprung	Referenz
BSp73ASML	Pankreas Adenokarzinom, BDX Rattenstamm	Matzku et al., 1983
BSp73ASML-CD44v6 ^{kd}	Pankreas Adenokarzinom, BDX Rattenstamm, BSp73 ASML Zellen, bei denen CD44v4-v7 und CD44v6/v7 runterreguliert wurden	Klingbeil et al., 2007
BSp73AS	Pankreas Adenokarzinom, BDX Rattenstamm	Matzku et al., 1983
BSp73AS-14	Pankreas Adenokarzinom, BDX Rattenstamm, BSp73 AS Zellen, die mit CD44v4-v7 cDNA transfiziert wurden	Gunthert et al., 1991
Fibroblasten	BDX Ratten, immortalisierte Lungenfibroblasten	Weth, 2000
ST-A4	Rattus norvegicus, immortalisierte Lymphknoten Stromazellen	LeBedis et al., 2002
ST-B12	BDX Ratten, immortalisierte Lymphknoten Stromazellen	LeBedis et al., 2002
Endothelzellen	BDX Ratten, Ratten Aorta Endothelzellen (RAEC)	isoliert aus dem Wistar Rattenstamm, Cell lining, Berlin
Capan-2	Humane Pankreas-karzinomlinie, vom	Fogh et al., 1977

	Primärtumor	
8.18	Humane Pankreas- karzinomlinie, Aszites	Lehnert et al., 2001
Pt45P1	Humane Pankreas- karzinomlinie, vom Primärtumor	Moore et al., 2001

2.1.10 Tiere

BDX Ratten vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) wurden unter pathogen freien Bedingungen gehalten und mit sterilisiertem Futter und Wasser gefüttert.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe von „TRI Reagenz“ (Sigma, Seelze) durchgeführt. Es wurden 5×10^6 Zellen mit 1 ml TRI Reagenz lysiert. Danach wurde 0,2 ml Chloroform dazugegeben und zentrifugiert (13.000 rpm, 15 Minuten, 4°C). Die wässrige Phase wurde abgenommen und die RNA mit Isopropanol ausgefällt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet mit Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und mit DEPC behandeltem Wasser aufgenommen.

Die cDNA wurde mit Hilfe von „ImProm II“ (Promega, Mannheim) und mit oligo Primern nach der Bedienungsanleitung hergestellt. Als Template für die PCR wurden 2,0 µl des reverse Transkriptions-Produkts benutzt.

Pipettierschema:

A	<u>Lösung</u>	<u>Volumen</u>
	RNA	2,0 µl
	oligo dT	1,0 µl
	dH ₂ O	2,0 µl
	<u>Gesamtvolumen</u>	<u>5,0 µl</u>

1. 70°C 5 min.
2. 4°C 5 min.

B	<u>Lösung</u>	<u>Volumen</u>
	5xPuffer	4,0 µl
	MgCl ₂	1,5 µl
	dnTP's	0,5 µl
	Rev Trans	0,5 µl
	dH ₂ O	8,5 µl
	<u>Gesamtvolumen</u>	<u>15,0 µl</u>
	Gesamtvolumen (A+B)	20,0 µl

2.2.1.2 siRNA-Transfektion

Für die Transfektion von BSp73ASML wildtyp- bzw. BSp73ASML-CD44v-knockdown-Zellen wurden 5×10^4 Zellen pro well (24-well-Platte) ausplattiert. Die Transfektion der Zellen mit siRNA (c-Met, $\beta 4$, Qiagen, Hilden) erfolgte am nächsten Tag. Hierzu wurde nach Vorschrift (HiPerfect-Reagent-Protokol, Qiagen, Hilden) vorgegangen. Die Transfektion erfolgte in verschiedenen siRNA-Konzentrationen (0; 1; 2,5; 5; 10; und 20nM) für 24, 48 und 70 Stunden. Die Expression der Proteine wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem WB kontrolliert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkulturbedingungen

PBS: 137mM NaCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 2,7mM KCl, 1,5mM KH₂PO₄, pH 7,4

RPMI: 10% Hitze inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 100U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin

Die BSp73ASML wildtyp-, BSp73ASML-CD44v-knockdown-, BSp73AS-, BSp73AS-14-Zellen, die ST-A4, ST-B12, Fibroblasten, RAEC, sowie die humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien Capan-2, 8.18 und Pt45P1 wurden in RPMI 1640-Medium im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 90% Luftfeuchte unter sterilen Bedingungen kultiviert. Diese Zellen wurden ab 80 %iger Konfluenz in neue Zellkulturflaschen passagiert. Für das Passagieren wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin (w/v)/5mM EDTA in PBS von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst, nach der Zentrifugation in der gewünschten Dichte im Medium aufgenommen und entsprechend in Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde mit einer „Neubauer Zählkammer-improved-“ bestimmt. Hierfür wurden 50 µl einer Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau gemischt, was einer Verdünnung von 1:2 entsprach. Durch auszählen von 25 Quadranten unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl pro Milliliter berechnet.

$$\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.2.3 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

1×10^7 Zellen wurden unter sterilen Bedingungen trypsiniert, mit frischem RPMI 1640-Medium gewaschen und in eiskaltem FCS/10% DMSO resuspendiert. Die Zellen blieben über Nacht im Gefrierschrank bei -80°C und wurden anschließend in den Stickstofftank überführt.

2.2.2.4 Reklonierung transfizierter Zellen

Transfizierte BSp73ASML-CD44v-knockdown-Zellen wurden mittels WB auf die Expression von CD44v6 hin überprüft. Die Zellen wurden mit einer Verdünnung von 1-5 Zellen/well in eine 96-well Platte ausgesät. Nach 4-6 Wochen wurden die einzelnen Klone mittels WB analysiert und für eine zweite Reklonierung ausgesät um sicherzugehen, dass das Expressionslevel von CD44v6 niedrig genug war.

2.2.2.5 Untersuchung von konditioniertem Zellkulturüberstand

BSp73ASML- sowie BSp73ASML-CD44v-knockdown-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 90% für 24 Stunden in serumfreien RPMI1640-Medium gehalten. Danach wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und zentrifugiert (3000rpm, 10 Minuten). Der zellfreie Überstand (lösliche Fraktion) wurde durch ein Filter (0,2µm) filtriert und mit Hilfe einer „Vivaspin 6 column“ (50.000 MWCO) (Sartorius, Goettingen) aufkonzentriert (siehe 2.2.4.14 Konzentration von Proteinen aus Exosomen-depletierten Zellkulturüberständen).

Der aufkonzentrierte Überstand wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem WB auf die Expression verschiedener Proteine hin analysiert. Um die adhäsive Matrix (Bestandteil der löslichen Fraktion) zu analysieren, wurde der Zellkulturüberstand für 24 Stunden in einer 6-well Platte (für spätere 2-D-Gelelektrophorese) oder in einer 96-well Platte (für Adhäsions-Assays) inkubiert. Die Platten wurden danach mit PBS gewaschen. Für weitere Untersuchungen wurde die Matrix in einem geeigneten Puffer aufbewahrt.

2.2.2.6 Stimulation mit HA, HGF, Laminin-5 sowie anti-CD44v6

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

PBST: PBS, 0,1% Tween 20

Proteine binden unter alkalischen Bedingungen an Plastikoberflächen. Bicarbonatpuffer wurde als Bindungspuffer für HA [10µg/ml], HGF [5ng/ml], Laminin-5 [2µg/ml] sowie den Antikörper CD44v6 (A2.6) [10µg/ml] benutzt. Die Beschichtung wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Platten mit PBS gewaschen und mit BSA (1% (v/W) in PBST) für eine Stunde bei 37°C geblockt. Anschließend wurden die Platten erneut mit PBS gewaschen und für weitere Untersuchungen in einem geeigneten Puffer aufbewahrt.

2.2.2.7 Adhäsions-Assay

Kristallviolett: Kristallviolett in 10% Ethanol

Der Adhäsions-Assay wurde in 96-Well Platten durchgeführt. Dafür wurden die jeweiligen Zellen mit EDTA (5mM in PBS, pH 8,0) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, mit PBS gewaschen und ausgezählt. 4×10^4 Zellen wurden auf die adhäsive-Matrix von BSp73ASML wildtyp- sowie auf die adhäsive-Matrix von BSp73ASML-CD44v-knockdown-Zellen ausgesät und für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nicht adhärenente Zellen wurden vorsichtig mit PBS abgewaschen, wohingegen die adhärenenten Zellen mittels 1%iger Kristallviolettlösung angefärbt wurden (siehe 2.2.2.12 Kristallviolett-Färbung von adhärenenten Zellen).

2.2.2.8 Proliferations-Assay

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden 5×10^4 Zellen in eine 96-well Platte in RPMI1640-Medium ausgesät. Die Zellen wurden mit konditioniertem Medium, der löslichen Fraktion sowie Exosomen der jeweiligen BSp73ASMLwildtyp- bzw. BSp73ASML-CD44v-knockdown –Zellen stimuliert. Während der letzten 16 Stunden wurde ^3H -Thymidin ($10 \mu\text{Ci/ml}$) zugegeben. Danach wurden die Zellen geerntet und die ^3H -Thymidin-Aufnahme mit Hilfe eines flüssig Szintillationszählers bestimmt. Alternativ wurden 5×10^4 Zellen wie zuvor ausgesät und mittels MTT (siehe 2.2.2.11c MTT-Färbung zur Messung metabolisch aktiver Zellen) quantifiziert.

2.2.2.9 Migrations-Assay (Boyden-Chamber)

Die jeweiligen Zellen wurden in $30 \mu\text{l}$ RPMI/0,1% BSA aufgenommen und in die obere Kammer pipetiert. Im unteren Teil der Kammer befanden sich $30 \mu\text{l}$ RPMI/0,1% BSA, konditioniertes Medium, die lösliche Fraktion oder die Exosomen. Getrennt wurde die Kammer durch eine Polycarbonat-Membran (Neuroprobe, Gaithersburg, MD). Unterschieden wurde durch die Porengröße der Membran, $8 \mu\text{m}$ für adhärenente Zellen und $5 \mu\text{m}$ für nicht adhärenente Zellen. Diese wurden nach 4 Stunden Inkubation im Inkubator mittels Trypanblau angefärbt und ausgezählt. Die migrierten adhärenente Zellen wurden auf der Unterseite der Membran mittels Kristallviolett angefärbt (siehe 2.2.2.12 Kristallviolett-Färbung von adhärenente Zellen) und ausgewertet.

2.2.2.10 Behandlung mit Cis-Platin

Die jeweiligen Zellen wurden in 96-well-Platten mit RPMI1640-Medium und Cis-Platin (cis-Diaminplatinum(II)dichloride; Sigma, Seelze) behandelt. Gleichzeitig wurden die Zellen mit konditioniertem Medium, der löslicher Fraktion und den Exosomen inkubiert, um den Effekt der einzelnen Fraktionen auf die Apoptoseresistenz der Zellen zu untersuchen. Nach 48 Stunden wurde die Überlebensrate mittels AnnexinV/PI und durch Messung der sub-G1-Zellfraktion bestimmt. Die Vitalität wurde mittels MTT-Assay bestimmt (siehe 2.2.2.11c MTT-Färbung zur Messung metabolisch aktiver Zellen).

2.2.2.11 Zytotoxizitätstests

a) Bestimmung der Apoptosefrequenz durch sub-G1-Messung

Die Apoptosefrequenz wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Messung der sub-G1-Zellfraktion basiert auf der Beobachtung, dass der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen unterhalb des DNA-Gehalts einer Zelle in der G1-Phase liegt (Fraker et al., 1995). Entsprechend behandelte und nichtbehandelte Zellen wurden durch Trypsin von der Oberfläche abgelöst und zentrifugiert (1600rpm, 5 Minuten, 4°C). Nach einmaligem Waschen mit PBS (1600rpm, 5 Minuten, 4°C) erfolgte für 30 Minuten die Fixierung der Zellen in 70%igem Ethanol auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation (1600rpm, 5 Minuten, 4°C) wurde das Zellsediment angefärbt (RNAase [0,1mg/ml], Propidiumjodid (PI) [10µg/ml]). Die Färbung dauerte 15 Minuten. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung der Zellen mittels Durchflußzytometer analysiert (Auswertung: CellQuest Software, Becton Dickinson).

b) Apoptose-Assay (AnnexinV/PI)

Bindungspuffer: 10mM HEPES/NaOH pH 7,4, 140mM NaCl, 2,5mM Ca₂Cl

Die jeweiligen Zellen wurden mit Cis-Platin in der Konzentration von 30µg/ml zusammen mit konditioniertem Medium oder den entsprechenden Fraktionen kultiviert. Nach 48 Stunden wurde das Überleben mit AnnexinV/PI gemessen. Hierbei wird der Effekt ausgenutzt, dass Phosphatidylserin (PS) sich auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle befindet. Während der Apoptose (dem "programmierten Zelltod") wird nun PS auf die Außenseite der Membran transloziert. AnnexinV bindet an PS. Durch Markierung von Zellen mit einem APC-AnnexinV kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen. Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann APC-AnnexinV in die Zellen eindringen und sich an die Innenseite der Membran binden. Daher können bei alleiniger Färbung von Zellen mit APC-AnnexinV apoptotische nicht von nekrotischen unterschieden werden. Man kombiniert daher die APC-AnnexinV Markierung mit einer Propidiumiodidfärbung. Das Propidiumiodid (PI) dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen ein. Lebende Zellen sind daher Annexin-negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-positiv.

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (1600rpm, 5 Minuten, 4°C). Die Zellen wurden anschließend in 50µl Bindungspuffer resuspendiert, welcher 0,5µl APC-AnnexinV und 1µg/ml PI enthielt. Die Färbung wurde bei RT für 15 Minuten im Dunklen durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Zellen in 150µl Bindungspuffer aufgenommen und mittels Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung geschah mit der CellQuest Software (Becton Dickinson). Alternativ wurden die Zellen wie zuvor ausgesät und mittels MTT-Assay ausgewertet (siehe 2.2.2.11c MTT-Färbung zur Messung metabolisch aktiver Zellen).

c) MTT-Färbung zur Messung metabolisch aktiver Zellen

Mit Hilfe des MTT-Reagenz (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) kann die Proliferationsaktivität (Vitalität) von Zellen bestimmt werden. Grundlage dieses Assays ist, dass das Tetrasoliumsals MTT von zellulären Enzymen je nach metabolischer Aktivität der Zellen zu dunkelrotem Formazan umgesetzt wird, welches photometrisch detektiert werden kann. Eine 5mg/ml MTT-Lösung wurde 1:5 direkt in das Medium, in dem die Zellen ausgesät wurden, verdünnt. Es wurde für 30-40 Minuten bei 37°C inkubiert. Nicht-adhärenente Zellen wurden mittels Zentrifugation (1600rpm, 5 Minuten, 4°C) an die Oberfläche präzipitiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in DMSO resuspendiert und lysiert. Die Auswertung fand am ELISA-Reader (Thermo Scientific, Langenselbold) bei 560nm statt.

2.2.2.12 Kristallviolett-Färbung von adhärenente Zellen

Adhärenente Zellen wurden gewaschen und für 4 Minuten bei RT mit 4% Formalin fixiert. Danach wurde das Formalin abgesaugt und durch eine 1%ige Kristallviolett-Lösung ersetzt. Inkubiert wurde bei RT für 4 Minuten. Anschließend wurden die Platten mehrmals mit dH₂O gewaschen und getrocknet. Die Zellen wurden in 10%iger Essigsäure resuspendiert und in einem ELISA-Reader (Thermo Scientific, Langenselbold) bei 595nm ausgewertet.

2.2.2.13 FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorter)

Zur Detektion von Oberflächenmolekülen mittels FACS wurden die Zellen zuerst trypsiniert und für 2 Stunden in den Brutschrank gestellt. Die Färbung erfolgte in U-shaped 96-well Platten. Es wurden pro well $1-2 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Der Erstantikörper sowie der Zweitantikörper wurden in den entsprechenden Konzentrationen mit PBS verdünnt und jeweils für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter Lichtabschluß. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurden die Platten drei Mal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (1600rpm, 4 Minuten). Gemessen wurde am `FACSCalibur` (Becton Dickinson, Heidelberg) und ausgewertet mit der Software `CellQuestPro`.

2.2.2.14 Immunfluoreszenz-Färbung der adhären-Matrix

PBG: PBS, 0,2% (v/v) Gelatine, 0,5% (w/v) BSA

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

Die adhäsive-Matrix wurde mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 25 Minuten auf Eis fixiert. Anschließend wurde drei Mal mit PBS/200mM Glycin und drei Mal mit PBG gewaschen. Der Erstantikörper wurde für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurde drei Mal mit PBG gewaschen, bevor mit dem Zweitantikörper, welcher mit Texas-Red konjugiert war, für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert wurde. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Die adhäsive-Matrix wurde mit dH₂O nachgespült, an der Luft getrocknet und mit Elvanol behandelt. Fluoreszenzbilder wurden am Mikroskop (Leica DMRBE) durchgeführt, welche mit einer SPOT CCD Kamera (Diagnostic Instruments, MI) ausgerüstet war. Dokumentiert wurde alles mit der Software SPOT 2.1.2.

2.2.2.15 ELISA

HYAL-Puffer: 0,1 M Natriumformat; 0,15 M NaCl; pH 4,2; 0,2 mg/ml BSA

Zur Bestimmung der Hyaluronidase (HYAL), sowie der Menge an Hyaluronsäure (HA) in Zellkulturüberständen wurde der ELISA (Stern und Stern, 1992) durchgeführt

Dazu wurde eine 96-well-Platte mit 200µg/ml HA beschichtet und für mindestens 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Zellkulturüberstand in HYAL-Puffer inkubiert. Zur Quantifizierung der Menge an HYAL wurden definierte Mengen des Enzyms benutzt. Nach 16 Stunden Inkubation wurden die Platten gewaschen um abgebaute HA zu entfernen. Die HA, welche im well zurückblieb, wurde mit Hilfe eines biotinylierten HA-bindenden-Proteins und Streptavidin-AP detektiert. Die HYAL-Konzentration (mU/ml) wurde durch die Kalibriergerade berechnet und auf das Gesamtprotein normalisiert. Zur Bestimmung von HA wurden ebenfalls das HA-binde-Protein und Streptavidin-AP benutzt. Hierbei wurde eine 96-well-Platte mit definierten Mengen an HA bzw. dem Zellkulturüberstand beschichtet. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer Kalibriergeraden.

2.2.2.16 Kryo-Schnitte von Tumor Gewebe

Nach der Präparation der Rattenorgane wurden diese auf Kork-Plättchen mit Einbettmedium `Neg-50` (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo) überschichtet, in flüssigem Stickstoff eingetaucht und bis zum Schneiden bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurden von den einzelnen Geweben mit einem Kryotom von Reichert Jung `2800-FRIGOCUT E` Schnitte von 8µm Schichtdicke angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger überführt.

2.2.2.17 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten

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 500µl Dimethylformamid gelöst.

Die Schnitte wurden mit eiskaltem Aceton für 4 Minuten fixiert und über Nacht bei RT getrocknet. Die fixierten Schnitte wurden mit einem Fettstift (Dako-Pen, Hamburg) umrandet. Die Schnitte wurden mit PBS/2%BSA geblockt und mit je 10µl Primärantikörper in PBS/2% BSA für 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Die Schnitte wurden drei Mal in PBS/1% BSA gewaschen, getrocknet und mit je 10µl Biotin-gekoppelten

Sekundärantikörper in PBS/2% BSA für 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS/1% BSA wurden die Schnitte getrocknet und mit je 10µl Vectastatin-Lösung für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte drei Mal in PBS/1% BSA gewaschen und getrocknet. AEC-Lösung 1 und 2 wurden vermischt und mit 5µl 30%iger H₂O₂ versetzt. Je 10µl der AEC-Lösung wurden pro Schnitt aufgetragen und für 5-20 Minuten in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/1% BSA wurden die Schnitte getrocknet, mit Mayers Hämalaunlösung 5 Minuten 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 (Diagnostic Instruments, MI) und der Software SPOT 2.1.2 ausgewertet.

2.2.3 Tierexperimente

Für die in vivo Experimente wurden 10 bis 14 Wochen alte weibliche BDX-Ratten verwendet. Den Tieren wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils 150µg/25µl Kontrollmedium, konditioniertes Medium, die lösliche Fraktion bzw. Exosomen in die hintere Fußpfote appliziert. Am fünften Tag wurden zusätzlich die Tumorzellen (1×10^6) injiziert. Bis zur Tötung wurden zwei Mal pro Woche die einzelnen Komponenten gespritzt. Nach 4-28 Tagen wurden die Lymphknoten, das Knochenmark und die Lunge entnommen und für die weiteren Untersuchungen schockgefroren bzw. Zellsuspensionen hergestellt.

2.2.4 Protein Biochemie

2.2.4.1 Biotinylierung von Membranproteinen

HEPES-Puffer: 25mM HEPES, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0,05% NaN₃ pH 7,4

Die Biotinylierung von Proteinen an der Plasmamembran stellt eine weit verbreitete biochemische Methode zur Identifizierung von Proteinen an der Zelloberfläche dar. Für die Biotinylierung werden in der Regel n-Hydroxysuccinimid (NHS)-ester von Biotin benutzt, die stabile Amidbindungen mit primären Aminogruppen in den Seitenketten von Lysinen und den N-Termini von Polypeptidketten ausbilden. Nach der Lyse der so behandelten Zellen können die biotinylierten Proteine durch die hoch affine Bindung von Biotin an immobilisiertes Avidin oder Streptavidin isoliert und durch Western Blot-Analyse identifiziert werden.

Die zu biotinylierenden adhärennten Zellen wurden trypsiniert, für 2 Stunden in RPMI in den Inkubator gestellt und anschließend zwei Mal mit HEPES-Puffer gewaschen. Danach wurde für 30 Minuten bei 4°C mit 0,1mg/ml Biotin-X-NHS (Calbiochem, Darmstadt) in HEPES-Puffer auf einem Schüttler inkubiert. Zur Bindung des überschüssigen Biotins wurden die Zellen drei Mal mit eiskaltem PBS/200mM Glycin gewaschen und anschließend lysiert, bzw. weiter mit DTSSP behandelt (siehe 2.2.4.2 Quervernetzung von Proteinen).

2.2.4.2 Quervernetzung von Proteinen

Zur Quervernetzung von Membranproteinen wurde der nicht Membran-permeable „Cross-Linker“ DTSSP verwendet. Nach der Biotinylierung wurden die Zellen in HEPES-Puffer gewaschen und für 30 Minuten bei RT mit DTSSP (1mM/dH₂O) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit eiskaltem PBS/200mM Glycin gestoppt und die Zellen lysiert.

2.2.4.3 Zellyse für SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Lyse-Puffer: 25mM HEPES, 1x Proteaseinhibitor-Mix (PI), 1mM PMSF, 1mM NaV, 1% Triton X 100

Zur Proteinisolierung von adhären Zellen wurden 1×10^6 Zellen zunächst mit Trypsin aus der Zellkulturflasche gelöst und für 2 Stunden in den Brutschrank gestellt. Die Zellyse erfolgte in 500ml Lysepuffer für 45 Minuten bei 4°C . Durch Zugabe von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zum Lysepuffer wurde ein Proteinabbau bzw. die Dephosphorylierung durch die bei der Zellyse frei gesetzten intrazellulären Proteasen und Phosphatasen verhindert. Daraufhin wurde das Lysat für 15 Minuten bei 4°C und 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Proteingehalt im Lysat wurde mit der „Bradford-Methode“ bestimmt.

2.2.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung wurde das Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München) verwendet. Dabei wurde das Bradford-Reagenz 1:10 mit dH_2O verdünnt. Von der untersuchenden Proteinlösung wurden $1\mu\text{l}$ in eine 96-Loch-Platte, in der $99\mu\text{l}$ verdünntes Bradford-Reagenz vorgelegt wurden pipettiert. Als Standard dienten definierte BSA-Verdünnungen ($0 - 2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in PBS. Die Ansätze wurden für 10 Minuten inkubiert und die Absorption bei 595nm am ELISA-Reader (Thermo scientific, Langenselbold) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit EXCEL unter zur Hilfenahme einer Kalibriergeraden.

2.2.4.5 Immunpräzipitation (IP)

Lyse-Puffer: 25mM HEPES, 1xPI, 1mM PMSF, 1mM NaV, 1% Lubrol

Lämmli-Puffer: 25mM Tris-HCl, 192mM Glycin, 0.1%SDS, pH 8.3

Zum Nachweis einer möglichen direkten Interaktion von CD44 und anderen Membran- bzw. zytosolischen Proteinen wurden je 1×10^7 Zellen von der Zellkulturflasche abtrypsiniert und für 2 Stunden in den Brutschrank gestellt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellysierung erfolgte für 45 Minuten bei 4°C in 1ml Lysepuffer. Die Lysate wurden daraufhin für 15 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Die gereinigten Lysate wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, $2\mu\text{g}/\text{ml}$ Antikörper zugegeben und für 1 Stunde bzw. über Nacht in einem über-Kopf-Rotierer inkubiert. Anschließend wurde zum Reaktionsansatz 5% Protein-G-Sepharose (Amersham; Pharmacia, Freiburg) zugegeben und für eine weitere Stunde bei 4°C in einem

über-Kopf-Rotierer inkubiert. Die Sepharose wurde danach durch Zentrifugation bei 13.000rpm für 15 Minuten bei 4°C pelletiert. Es folgten drei Wachschrritte mit kaltem Lysepuffer, jeweils gefolgt von einem Zentrifugationsschritt bei 13.000rpm für 1 Minute bei 4°C. Das Sepharosepellet wurde dann für 5 Minuten bei 95°C in 50µl 6x SDS-Probenpuffer (Leamli-Puffer) aufgeköcht und anschließend eingefroren oder direkt in einer SDS-PAGE weiter verarbeitet.

2.2.4.6 In-Vitro-Kinase-Assay

Kinase-Assay-Puffer: 25mM HEPES pH 7,2; 100mM NaCl; 5mM MgCl₂; 5mM MnCl₂;
Phosphatase- und Proteaseinhibitoren

Lyse-Puffer: 25mM HEPES, 1x Proteaseinhibitor-Mix (PI), 1mM PMSF, 1mM NaV,
1% Lubrol

Für einen in-vitro Kinase-Assay wurde zunächst eine IP durchgeführt, wobei alle Puffer konsequent phosphatfrei gehalten wurden. Danach wurde die Protein-G-Sepharose drei Mal mit Lyse-Puffer, ein Mal mit Lyse-Puffer ohne Detergenz und ein Mal mit Kinase-Puffer gewaschen. Das Präzipitat wurde anschließend mit 30µl Kinase-Assay-Puffer, der 10µCi [³²P]γ-ATP enthält, inkubiert. Die Reaktion wurde für 15 Minuten bei 37°C durchgeführt und anschließend durch Leamli-Puffer gestoppt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Danach wurden die Proben einer SDS-PAGE unterzogen. Es folgte die Trocknung des Gels unter Vakuum und die Autoradiographie.

2.2.4.7 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Lauf-Puffer (1x): 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Da Proteine je nach Aminosäuresequenz eine gewisse Eigenladung besitzen, muss zunächst die Ladung der Proteine mit ihrer Größe korreliert werden. Dazu wird das Proteingemisch mit Natriumdodecylsulfat (SDS), einem stark negativen Detergenz, behandelt. SDS besitzt zwei Funktionen in der SDS-PAGE: Zum einen bindet es an die aufzutrennenden Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung. Je größer

das Protein, desto mehr SDS-Moleküle binden daran, wodurch die Eigenladung des Proteins maskiert wird. Nun besitzen alle Proteine dieselbe Ladung proportional zu ihrer Größe, so dass während der Auftrennung im Gel nur das Molekulargewicht eine Rolle spielt (Shapiro et al., 1967). Die Zweite Funktion der SDS-Binding ist die Entfaltung der Proteine und damit die Zerstörung von Proteinaggregaten und -multimeren. Häufig wird diese Eigenschaft durch Zugabe von β -Mercaptoethanol unterstützt, das Disulfidbrücken innerhalb von und zwischen Proteinen reduziert, wodurch die Entfaltung der Proteine verstärkt wird. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins kann sein Laufverhalten durch die Porengröße des Gels beeinflusst werden. Das Gel unterteilt sich dabei in das obere Sammelgel mit niedriger Acrylamidkonzentration und einem pH-Wert von 6,8, indem sich die Proteine zu einer schmalen Bande konzentrieren, sowie in das Trenngel, dessen Acrylamidkonzentration und pH-Wert (8,8) höher ist, so dass die Proteine gemäß ihres Molekulargewichts getrennt werden (Laemmli, 1970). Die Lösung für das Trenngel wurde in Gelapparatur gegossen und zur Begrädigung mit dH_2O überschichtet.

Pipettierbeispiel (10% Trenngel):

<u>Lösung</u>	<u>Volumen</u>
dH ₂ O	4,0 ml
1,5M TRIS-HCl pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
Bis-Acrylamid 30%	3,35ml
10% NH ₄ -persulfat	0,05ml
<u>TEMED</u>	<u>0,005ml</u>
Gesamtvolumen	10,0 ml

Nach Polymerisation des Trenngels (45-60 Minuten) wurde die Wasserschicht mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Sammelgel gegossen, in das sofort der Probenkamm eingesetzt wurde. Nach der Polymerisation (30 Minuten) wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Es wurden 25-30 μ g Protein mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und in die Taschen pipetiert. Außerdem wurde ein Molekulargewichtsmarker (MBI Fermentas, St. Leon Rot) mit aufgetragen. Die Elektrophorese der Proteine erfolgte zu Beginn bei 60 V, bis die Proben das Trenngel erreicht haben. Danach wurde die Spannung auf 100-120 V erhöht.

2.2.4.8 Western-Blot (WB)

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

Der Western Blot dient dem Nachweis Membran-gebundener, aber auch zytosolischer Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper im Anschluss an eine SDS-PAGE. Zunächst wurde ein Elektro-Naßkammerblot durchgeführt, um die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham, Freiburg) zu transferieren. Dazu wurden vier Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran für 10 Minuten in dH₂O und anschließend für weitere 10 Minuten in Transfer-Puffer getränkt. Das Gel wurde ebenfalls in Transfer-Puffer kurz gewaschen. Die Kammer wurde nun so aufgebaut, dass zuerst zwei Filterpapiere, dann die Nitrozellulosemembran mit dem Gel und zuletzt wieder zwei Filterpapiere in die Kassette eingelegt wurden. Dabei musste die Nitrozellulosemembran in Richtung der positiven Elektrode schauen. Der Transfer erfolgte bei 60V für 2 Stunden bei 4°C, bzw. bei 30V über Nacht bei 4°C. Die Effizienz des Proteintransfers wurde durch Färbung der Membran in einer 10%igen Ponceau S-Lösung/Ethanol und anschließender Entfärbung in dH₂O überprüft. Zur Absättigung der freien, unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Transfer, wenn nicht anders beschrieben, mit 5% Magermilch/PBS/0,1% Tween 20 für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper, der meist in 5% Magermilch/PBS/0,1% Tween 20 verdünnt wurde, für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1% Tween 20 für jeweils 15 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in PBS/0,1% Tween 20 für 1 Stunde. Anschließend wurde nochmals drei Mal 15 Minuten mit PBS/0,1% Tween 20 gewaschen. Zur Detektion der Proteinbanden wurde ein Chemilumineszenz-Substrat (ECL, Amersham, Freiburg) verwendet. Dieses Substrat enthielt Luminol, welches in Gegenwart von H₂O₂ in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion oxidiert wurde. Dabei wurde Energie in Form von Licht emittiert. Auf diese Weise konnten Proteine, die über den Zweitantikörper indirekt mit Peroxidase markiert waren, durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die Membran detektiert werden. Der Blot wurde für 1 Minute mit je 1ml der Detektionsreagenzien 1 und 2 (ECL, Amersham, Freiburg) pro Membran inkubiert. Anschließend wurde in der Dunkelkammer je nach Stärke des erwarteten Signals für eine gewisse Zeit ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) aufgelegt.

2.2.4.9 2-Dimensionale-Gelelektrophorese (2D)

Rehydratisierungs-Puffer: 8 M Urea, 2% (w/v) Chaps, Bromphenolblau, DTT (3mg/ml) und linearem IPG-Puffer pH 4-7 (Amersham Bioscience, Freiburg)

SDS-Equilibrations-Puffer: (50mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M Urea 30% (w/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, Bromphenolblau und DTT (10mg/ml)

Die 2D Gelelektrophorese ist eine weit verbreitete Methode zur Analyse von Proteinen aus Zellextrakten sowie aus Zellkulturüberständen. Sie besteht aus zwei Schritten bzw. zwei Dimensionen. In der ersten Dimension werden die Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen isoelektrischen Punkts aufgetrennt (Isoelektrische Fokussierung „IEF“). Da Proteine amphotere Moleküle sind, besitzen sie je nach pH-Wert ihrer Umgebung eine negative oder positive Ladung bzw. sind neutral. Die Gesamtladung eines Proteins ist daher die Summe aller Einzelladungen der Aminosäurenketten. In der zweiten Dimension werden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt (SDS-PAGE). Jeder Spot auf dem resultierenden zweidimensionalen Gel entspricht potentiell einem Protein in der Probe. Somit können über 1000 Proteine auf einmal analysiert werden. Die Durchführung der IEF gliederte sich in mehrere Schritte. Im ersten Schritt wurde die zu untersuchende Probe (150-200µg Gesamtprotein) mit Hilfe des 2-D Clean-Up Kit's (Amersham Bioscience, Freiburg) auskonzentriert und von störenden Stoffen (Detergentien, Salze, Lipide und Nukleinsäuren) befreit. Anschließend wurde die aufgereinigte Probe über Nacht in einem Rehydratisierungs-Puffer zusammen mit dem Gel rehydratisiert. Gelstreifen und Probe wurden mit „IPG-Cover-Fluid“ (Amersham Bioscience, Freiburg) in eine dafür vorgesehene Vorrichtung dünn bedeckt. Dadurch wurde eine mögliche Auskristallisation verhindert. Danach wurde der 13 cm lange Gelstreifen in eine Keramikform platziert und diese auf die jeweiligen Elektroden der Elektrophorese-Einheit gestellt. Zur Elektrophorese der ersten Dimension wurde ein „Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System“ mit den Einstellungen S1 500Vh, S2 1000Vh und S3 16000Vh verwendet. Nach der ersten Auftrennung wurde der Gelstreifen in einem SDS-Equilibrations-Puffer für 15 Minuten equilibriert.

Für die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurde ein 10%iges SDS-PAGE Gel gegossen, auf das der Gelstreifen mit Hilfe von Agarose fixiert wurde.

2.2.4.10 Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen

Fixier-Lösung:	30% Ethanol/10% Essigsäure
Inkubations-Lösung:	0,3% Natriumtetrathionat, 0,5 M Kaliumacetat und 30%igem Ethanol
Entwicklungs-Lösung:	3% Kaliumcarbonat, 31µl Na ₂ S ₂ O ₃ -5H ₂ O (10%), 75ml Formalin (37%)

Nach der Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE (eindimensionale- bzw. 2D) wurden die Gele über Nacht bei 4°C in einer Fixierlösung behandelt. Am nächsten Tag wurden die Gele für 45 Minuten bei Raumtemperatur in einer Inkubations-Lösung für die anschließende Silberfärbung vorinkubiert. Die Gele wurden sechs Mal mit dH₂O für jeweils 10 Minuten gewaschen. Danach wurden die Gele in einer 0,2%igen Silbernitrat-Lösung für 1 Stunde inkubiert. Nach der Färbung erfolgte die Entwicklung der Gele in einer Entwicklungs-Lösung. Gestoppt wurde die Entwicklung mit 330mM TRIS/2% Essigsäure. Bis zur Analyse mittels MALDI-TOF wurden die Gele bei 4°C in dH₂O aufbewahrt.

2.2.4.11 MMP-Aktivitäts Assay (Zymographie)

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

Die gelatinolytische Aktivität von Zelllysaten, konditionierten Zellkulturüberständen und Exosomen wurde durch Zymographie dargestellt. Bei dieser Methode werden die Proteinhaltigen Lösungen auf ein SDS-PAGE aufgetragen, das Gelatine enthält. Gelatin-lösende Enzyme – hier MMP-2 und MMP-9 – verdauen ihr entsprechendes Substrat an der Position, die sie auf Grund ihres Molekulargewichts während der Elektrophorese erreichen. Die kann durch Färbung und Entfärbung des Gels mit Coomassie-Färbelösung, die in erster Linie das Substrat im Gel anfärbt, sichtbar gemacht werden.

Das Zellysat, konditioniertes Medium sowie Exosomen wurden in SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) aufgenommen, für 15 Minuten bei 37°C erhitzt und auf das Zymographiegel (10% Acryamid/1mg/ml Gelatine) aufgetragen. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel mit der Lösung 2 gewaschen und für 1 Stunde zur Renaturierung der Metalloproteasen inkubiert. Das renaturierte Gel wurde zwei Mal in 50mM TRIS/HCl (pH 7,4) gewaschen und für 18 Stunden bei 37°C in Entwicklungspuffer inkubiert. Es folgte die Färbung des Gels mit Coomassie-Färbelösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur sowie die anschließende Entfärbung.

2.2.4.12 Coomassie-Färbungen

Die Färbung mit Coomassie (Brilliant) Blue R-250 ist eines der am häufigsten verwendeten Verfahren zur Visualisierung von Proteinen nach einer SDS-PAGE. Zunächst musste das Gel nach der Gelelektrophorese fixiert werden, da der Coomassie-Farbstoff ein saures Milieu benötigte, um an Proteine binden zu können. Die Proteine wurden dabei denaturiert und in einem Methanol/Acetoacetat/Wasser-Gemisch (3:1:6) fixiert. Das Gel wurde dann in einer Färbelösung inkubiert. Diese Lösung enthielt den Farbstoff in verdünnter Acetoacetat-/Ethanol-Lösung. Überschüssige Farbe wurde in 5% Acetoacetat, 10% Methanol auswaschen, bis der Hintergrund klar war.

2.2.4.13 Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberständen

Exosomen aus konditionierten Zellkulturüberständen wurden durch eine Reihe von Zentrifugationsschritten isoliert. Um restliche Zellen aus dem Überstand zu sedimentieren, wurden diese von den Zellen abgenommen und zunächst für 10 Minuten bei 1.600rpm und 4°C zentrifugiert,. Die Überstände wurden nun für weitere 10 Minuten bei 2.000rpm, 20 Minuten bei 3.500rpm und 30 Minuten bei 10.000rpm und 4°C zentrifugiert, um restliche Zelltrümmer zu entfernen. Die gereinigten Überstände wurden je nach Volumen der Überstände in geeignete Zentrifugenröhrchen überführt (Steinbrenner, Wiesenbach). Die Isolation der enthaltenen Exosomen erfolgte durch Ultrazentrifugation (Beckmann-Ultrazentrifuge) bei 30.000rpm und 4°C für 2,5 Stunden.

Die Exosomen-depletierten Überstände wurden bei -20°C eingefroren, die Exosomen-Pellets in PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.2.4.14 Konzentration von Proteinen aus Exosomen-depletierten Zellkulturüberständen

Zur Konzentration von Proteinen aus Exosomen-depletierten Zellkulturüberständen wurden sogenannte „Vivaspin 6 column“ (3.000 MWCO, 10.000 MWCO, 50.000 MWCO) (Sartorius, Göttingen) mit einem Ausschlussvolumen von 3, 10 bzw. 50kDa verwendet. Die Überstände wurden in die Zentrifugenbehälter eingefüllt, der in einen Sammelbehälter eingesetzt war. Die Filtration erfolgte durch Zentrifugation bei 2000rpm und 4°C. Moleküle mit einem höheren Molekulargewicht als 50kDa bzw. 10kDa und 3kDa blieben im oberen Kompartiment, während kleinere Moleküle durch den Filter in den Sammelbehälter gepresst wurden. Die Dauer der Zentrifugation wird durch das gewünschte Endvolumen des Filtrats bestimmte.

2.2.4.15 Proteinanalyse mittels Massenspektrometrie

Zur Analyse von Proteinen durch Massenspektrometrie wurden die Proteinbanden im Gel mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Differenziell Unterschiedliche Proteine wurden mit einem speziellen Skalpell ausgeschnitten und mittels eines „Reflex II time-of-flight“ Massenspectrometers (Bruker-Daltonics GmGH, Bremen) in Kooperation mit der Abteilung „Proteinanalyse“ am DKFZ untersucht.

2.2.4.16 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie kurz AFM (Atomic Force Microscopy) genannt, basiert auf der Abtastung einer Oberfläche mit Hilfe eines Silikonmessfühlers. Hierbei werden topographische, 3-dimensionale Bilder einer Oberfläche im Nanometermaßstab erstellt. Dazu wurden BSp73ASML- sowie BSp73ASML-CD44v-knockdown-Zellen auf 22mm Glasplättchen ausgesät um ihre individuelle Matrix zu sezernieren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mittels EDTA von ihrer Matrix abgelöst und entweder auf ihre Matrix (wt Zellen

auf die wt-Matrix, kd-Zellen auf die kd-Matrix) oder auf die unterschiedliche Matrix (wt-Zellen auf kd-Matrix bzw. kd-Zellen auf wt-Matrix) gesät. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen für 15 Minuten mit Glutaraldehyd (0,5% in PBS) fixiert und bei 4°C in einer Glutaraldehyd-Lösung (0,1% in PBS) aufbewahrt. Die Bilder wurden mit NanoWizard II (JPK-Instruments, Berlin,) gemacht. Das AFM war an einem Invertmikroskop befestigt (Axiovert 200, Zeiss, Oberkochen, Germany). Die Proben wurden im Kontakt-Modus und mit DNP-Spitzen (Federkonstante 0,06 N/m, Veeco, Santa Barbara, USA) sowie einer Abtastrate von 0,3Hz abgetastet. Die Berechnungen der optischen Bilder wurden durch interne Programm durchgeführt. (DirectOverlay™, JPK-Instruments, Berlin).

2.2.4.17 Live-Zell-Imaging

Zur Beobachtung von Zellbewegungen auf unterschiedlichen Matrizes, wurde ein "live-cell-imaging" durchgeführt. Hierzu wurden 5×10^4 Zellen in einer speziell dafür vorgesehenen Kammer (ibidi, Martinsried) am Tag vor der Messung pipetiert. Am Tag der Messung wurden die Zellen von ihrer Matrix abgelöst (PBS/5 mM EDTA) und auf die Matrix der anderen Zellen ausgesät. Die Zellen wurden mit DMEM-Medium überschichtet, der Zellkern mit Hoechst33342 angefärbt und im DAPI-Kanal (2ms Exposition) des Mikroskops aufgenommen. Pro Ansatz wurden 2 Bilder im Abstand von 15 Minuten über 12 Stunden gemacht bei einer 20-fachen Vergrößerung. Die Messung erfolgte an einem IX81 Invers-Mikroskop (Olympus, Hamburg) und einer CCD-Kamera (Hamamatsu, Hersching am Ammersee). Gesteuert wurde das Mikroskop mit der „Scan^R Acquisition“-Software (Olympus, Hamburg). Die Auswertung der Zellbewegung erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ (NIH; Manual_cell_tracing: F.P. Cordelière, Centr de Recherché de l'Institut Curie).

3. Ergebnisse

3.1 ASML^{wt}-konditioniertes Medium unterstützt die Metastasierung von ASML^{kd}- Zellen.

Überexpression von CD44v6 unterstützt die Bildung von Metastasen (Günthert et al., 1991). Dies konnte durch einen selektiven knockdown von CD44v4-v7 oder CD44v6/v7 in der stark metastasierenden Pankreasadenokarzinom-Zelllinie BSp73ASML (ASML^{wt}) bestätigt werden (Klingbeil et al., 2009). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Einbettung metastasierender Tumorzellen in bestimmte Organe durch die Bildung einer speziellen Nische erleichtert wird. Da ASML^{kd}-Zellen die Fähigkeit zur Metastasierung verloren haben, bot sich das ASML^{wt/kd}-Modell zur Überprüfung dieser Hypothese an.

Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Kontrolle der Effizienz des CD44v4-v7 knockdowns (ASML^{kd}) in der ASML^{wt}-Linie mittels WB und RT-PCR (Abb. 3.1.1A und B). Es konnte kein CD44v6 in den ASML^{kd}-Zellen nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob ASML-Zellen ebenfalls Faktoren sezernieren, die die Ausbildung einer prämetastatischen Nische erleichtern, wurden BDX Ratten 150µg konditioniertem Medium (kM) in die Fußpfote injiziert. Die Injektionen in die Fusspfote der Tiere erfolgten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen. Am fünften Tag wurden zusätzlich zum kM entweder ASML^{wt}- oder ASML^{kd}-Zellen injiziert. Weitere Injektionen des kM erfolgten zweimal pro Woche. Nach 4-28 Tagen wurden die Ratten getötet um drainierende Lymphknoten (LK) und Lungen für in vitro Untersuchungen zu asservieren. Bereits nach 14 Tagen konnte ein Anstieg der Zellzahl in den poplitealen Lymphknoten der ASML^{kd}-Tiere, welche ASML^{wt}-kM erhielten, beobachtet werden. In der Lunge wurde ein signifikanter Anstieg der Zellzahl von ASML^{kd}-Tieren, welche das ASML^{wt}-kM erhielten, erst nach 28 Tagen festgestellt. In Kontroll-Tieren wurden keine Tumorzellen in der Lunge nachgewiesen (Abb.3.1.1C).

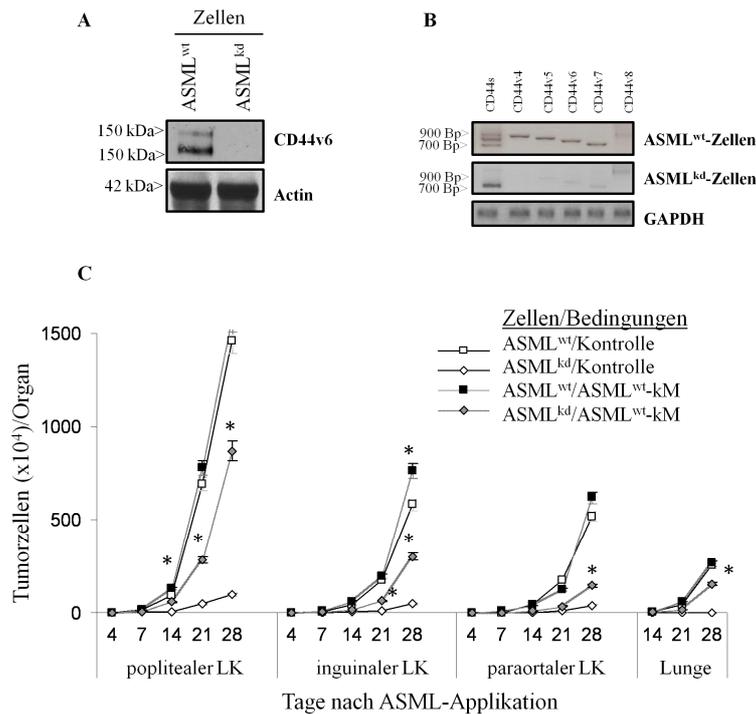


Abbildung 3.1.1:

Der Einfluss von Tumorzell-konditioniertem Medium auf die Metastasierung. (A) ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10 %igem Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit dem spezifischen Antikörper gegen CD44v6 sowie einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Als Kontrolle diente Actin. (B) Expression von CD44-Isoformen in ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen mittels RT-PCR. (C) BDX-Ratten wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen kM oder Kontrollmedium in die Fusspfote gespritzt. Am fünften Tag wurden zusammen mit dem kM oder Kontrollmedium die Tumorzellen (ASML^{wt} und ASML^{kd}) injiziert. Danach wurde die Injektion von kM und Kontrollmedium zweimal die Woche wiederholt. Die Ratten wurden 4 bis 28 Tage nach der Tumorapplikation getötet und die Anzahl an Tumorzellen in den Lymphknoten und der Lunge mittels des Metastasierungsmarker C4.4 erfasst. Es wurden die Mittelwerte \pm STAB von 3 Ratten pro Gruppe gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen kM und Kontrollmedium sind mit * gekennzeichnet. Hierbei wurde die Zahl der Tumorzellen als Produkt der Gesamtzahl der Zellen (Organ x prozentualer Anteil (C4.4+, Durchflusszytometrie) errechnet. Tumorzellen immunhistologisch (C4.4).

Zusätzlich zur Einzelzellanalyse mittels FACS wurden potentielle Metastasen-Organeschockgefroren um 5 μ m dicke Schnitte zu erstellen, die mit dem Metastasierungsmarker (C4.4) angefärbt und ausgewertet wurden (Abb.3.1.2). Auch immunhistologisch konnte ein Anstieg von ASML^{kd}-Zellen, in Lymphknoten und Lunge nach Applikation von ASML^{wt}-kM nachgewiesen werden.

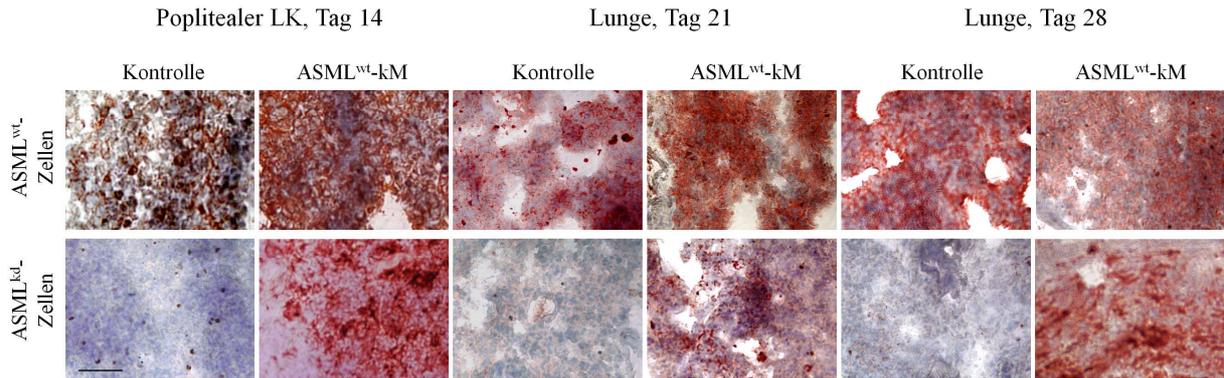


Abbildung 3.1.2: Der Einfluss von Tumorzell-konditioniertem Medium auf die Metastasierung. Tierbehandlung siehe Abb. 3.1.1. Immunhistologische Färbung (C4.4⁺) von Tumorzellen in Lymphknoten und Lunge am Tag 14, 21 bzw. 28 sind zu sehen. Maßstab 0,5 μ m.

Wesentlich ist insbesondere der Befund, dass auch in Ratten, welche ASML^{kd}-Zellen und ASML^{wt}-kM erhielten, eine erhöhte Anzahl an Leukozyten gemessen wurde (Abb.3.1.3) Das ASML^{wt}-kM scheint somit für die Rekrutierung von Leukozyten in den drainierenden Lymphknoten sowie deren Aktivierung verantwortlich zu sein.

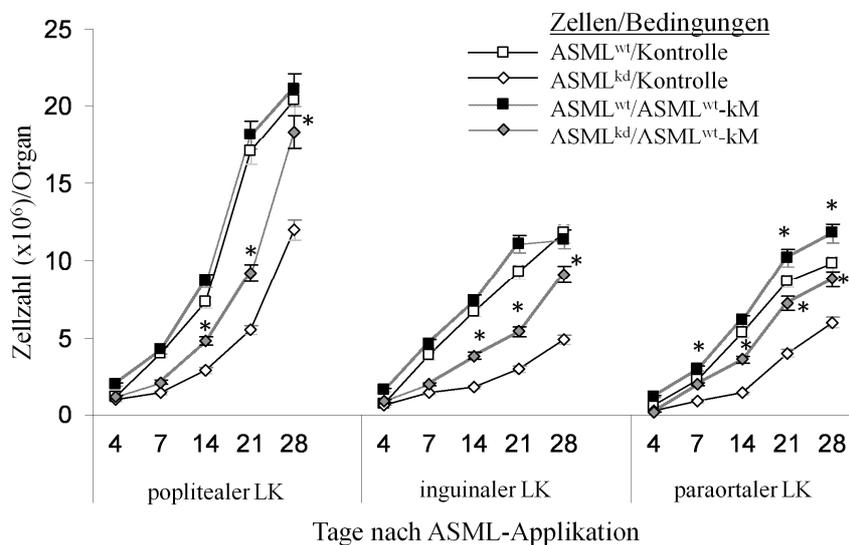


Abbildung 3.1.3: Der Einfluss von Tumorzell-konditioniertem Medium auf die Rekrutierung von Leukozyten in den drainierenden Lymphknoten. Tierbehandlung siehe Abb. 3.1.1. Anzahl der Mittelwerte \pm STAB an drainierenden Lymphozyten, welche durch Subtraktion der Tumorzellen errechnet wurden, sind gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen kM und Kontrollmedium sind mit * gekennzeichnet.

Weiterhin wurde in poplitealen Lymphknoten und in der Lunge eine Zunahme der Expression von CD49c, CD49d, CD54 beobachtet sowie eine merkliche Zunahme des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor (uPAR) und der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptoren 1 und 2 (VEGFR1 und VEGFR2). Dies war eher unerwartet, da ASML-Zellen kaum Angiogenese induzieren. Lymphknoten enthielten wenige, jedoch stark CD31⁺ Kapillaren. Auch in der Lunge war CD31 hochreguliert. Der auffälligste Befund hingegen war, dass in Lymphknoten und wenngleich schwächer in der Lunge, CD11b⁺-Zellclusters beobachtet wurden (Abb. 3.1.4).

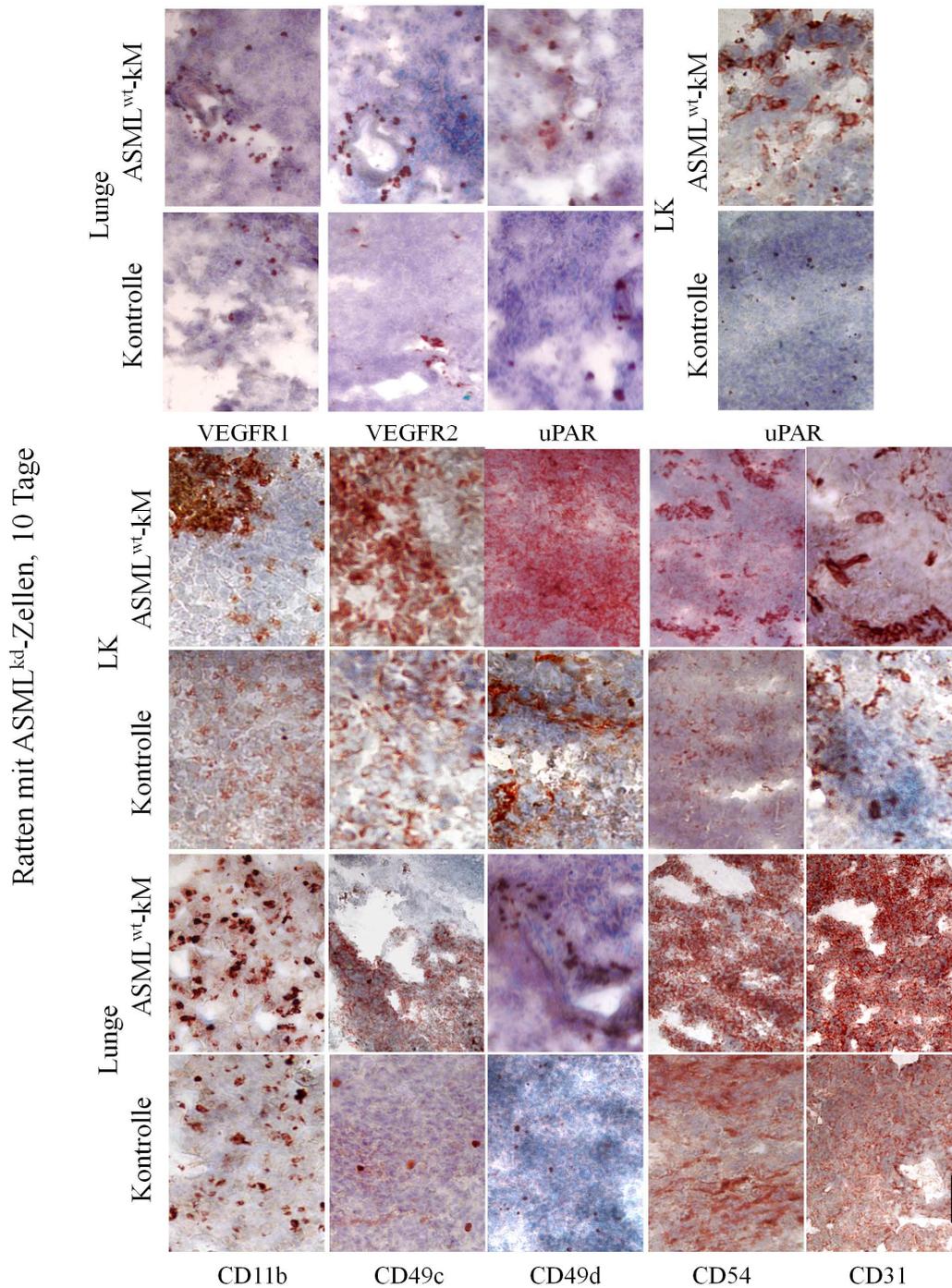


Abbildung 3.1.4:

Der Einfluss von Tumorzell-konditioniertem Medium auf die Metastasierung. Tierbehandlung siehe Abb. 3.1.1. Repräsentative Immunhistologische Färbung mit den angegebenen Antikörpern in Lymphknoten und den Lungen sind zu sehen. Maßstab 0,5 µm.

Das kM der ASML^{wt}-Zellen enthält Faktoren, die zu signifikanten Veränderungen in Lymphknoten und Lunge beitragen. Diese Veränderungen decken sich mit den für eine prämetastastische Nische beschriebenen Befunden weiterer Gruppen und erlaubten es einer schwach metastasierenden Tumorzelllinie (ASML^{kd}) die drainierenden Lymphknoten und die

Lunge zu erreichen, sich dort anzusiedeln und zu wachsen. Da eine Tumorzelllinie auf dem Weg der Metastasierung eine Reihe von Barrieren überwinden musste, gingen wir davon aus, dass ein einzelner Faktor kaum für die Nischenbildung ausreichend sein kann. Um unsere Hypothese zu überprüfen wurde in einem ersten Schritt das ASML^{wt}-kM in eine „lösliche Fraktion“ und eine „vesikuläre“ Fraktion (Exosomen) unterteilt.

3.2 Die ASML^{wt}-lösliche Fraktion kooperiert bei der Präparation einer prämetastatischen Nische mit Exosomen.

Um herauszufinden, welche Fraktion für die Vorbereitung der prämetastatischen Nische verantwortlich war, wurde die lösliche Fraktion (IF) von der Exosomen-Fraktion (Exo) separiert. Die Trennung erfolgte mittels Ultrazentrifugation. Den Tieren wurden 150µg kM, IF sowie Exo in die Fußpfote injiziert. Getestet wurden am Tag 7, 10 bzw. 14 nach Tumorzellapplikation. Es konnte gezeigt werden, dass die Ansiedlung von ASML^{kd}-Zellen und die Rekrutierung von Leukozyten stärker von ASML^{wt}-Exo, als von der ASML^{wt}-IF hervorgerufen wurde. Weder die IF, noch die Exo erreichte den Effekt des ASML^{wt}-kM. Da offensichtlich beide Fraktionen die Metastasierung beschleunigten, war es von Interesse zu sehen, ob auch beide von einer metastasierenden Tumorzelllinie generiert sein mussten. Um die Tumorzell-Rekrutierung in drainierenden Lymphknoten zu beobachten, wurden ASML^{kd}-kM, ASML^{kd}-IF und ASML^{kd}-Exo den Tieren injiziert. Dabei wurde festgestellt, dass ASML^{kd}-kM und ASML^{kd}-Exo nicht aber die ASML^{kd}-IF die Tumorzellanlagerung, wenn auch schwächer unterstützt. Eine Mischung aus IF und Exo von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen bestätigte, dass ASML^{kd}-Exo mit der ASML^{wt}-IF kooperieren konnten (Abb.3.2.1).

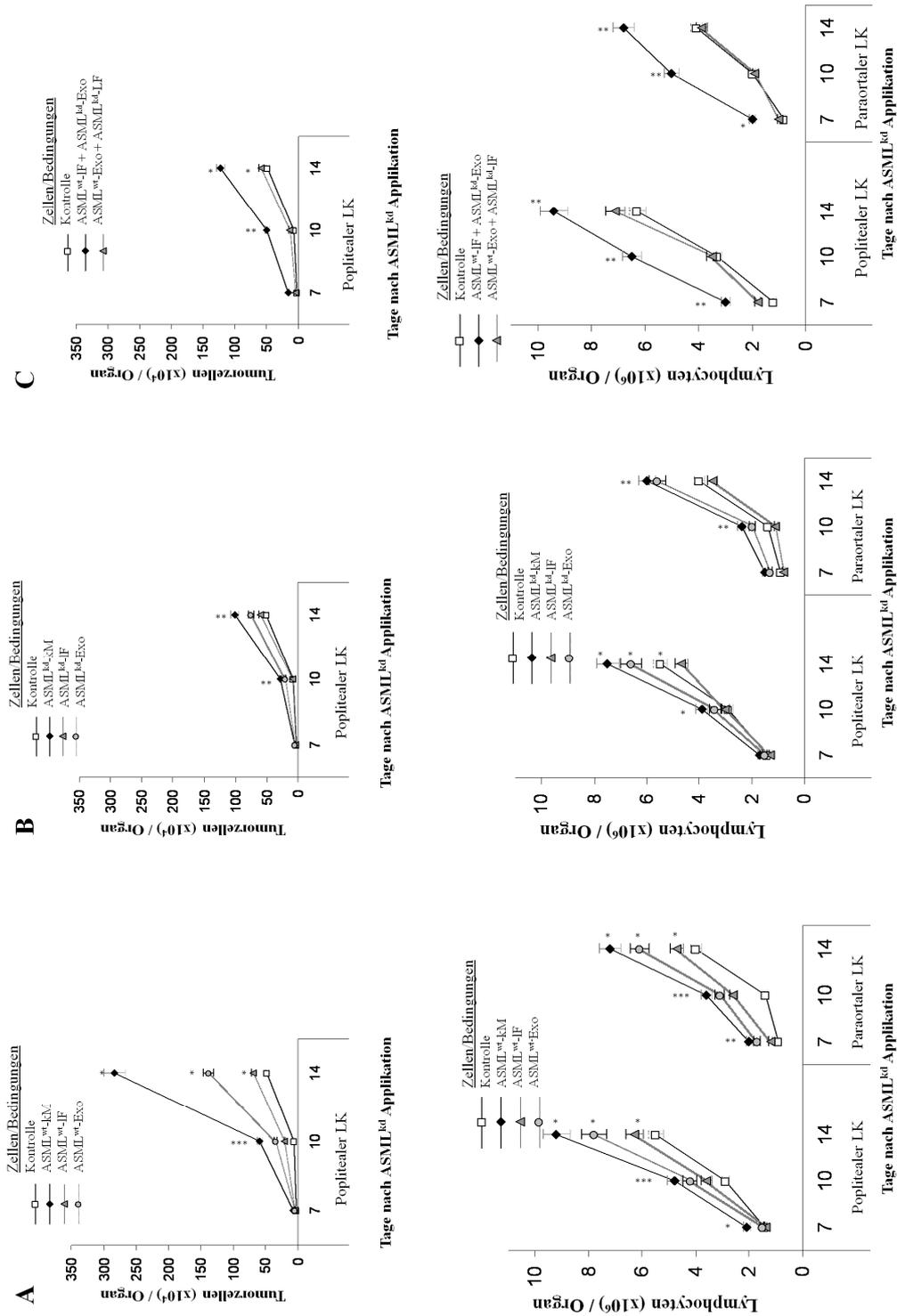
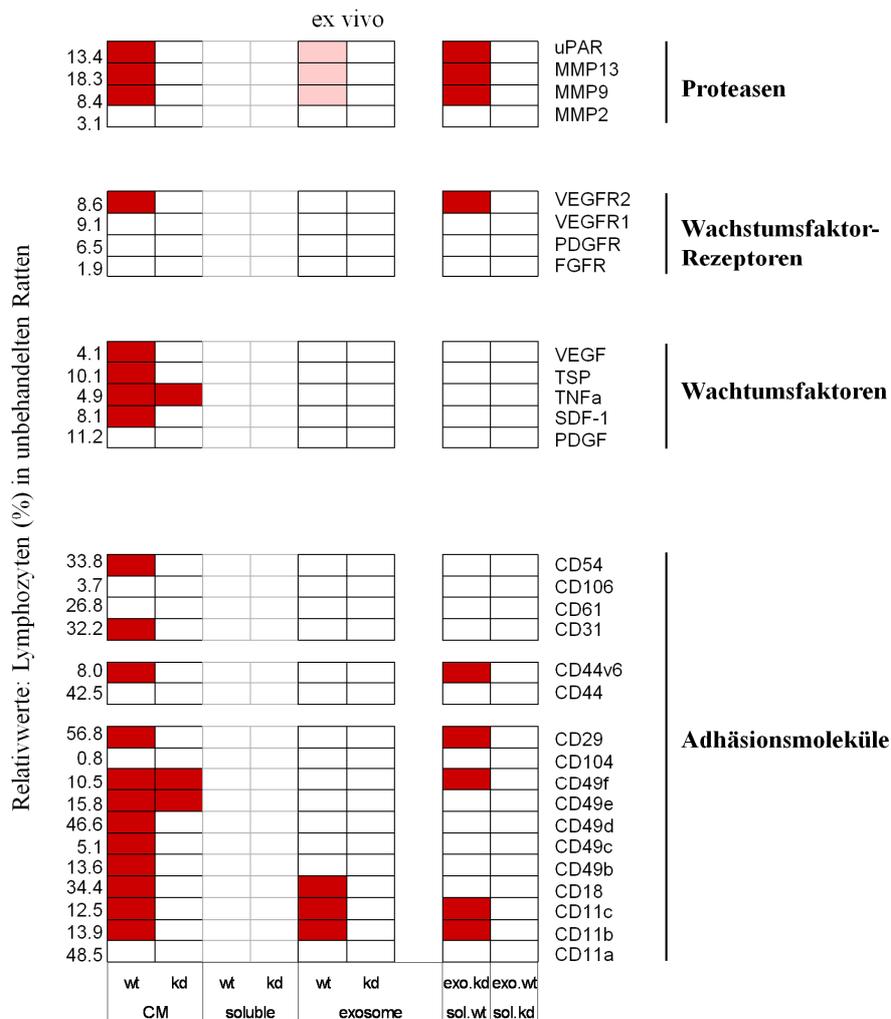


Abbildung 3.2.1:

Der Einfluss von Tumor-sezernierten Exosomen auf die Metastasierung. BDX-Ratten wurden wie in Abb.3.1.1 mit dem Kontrollmedium, kM, IF, Exosomen von (A) ASML^{wt} oder (B) ASML^{kd} oder (C) ASML^{wt}-IF und ASML^{kd}-IF und Exosomen konditioniert. Am fünften Tag erhielten alle Ratten ASML^{kd}-Zellen in die Fusspfote. Die Injektion der einzelnen Fraktionen wurde zweimal die Woche wiederholt. Die Ratten wurden am Tag7, 10 bzw. 14 nach Tumorapplikation getötet. Die Mittelwerte \pm STAB der Tumorzellen (C4.4⁺) in den poplitealen Lymphknoten und die Anzahl an Leukozyten in den poplitealen und paraortalen Lymphknoten (Berechnung siehe Abb. 3.1.1) sind gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollmedium und dem kM oder den Fraktionen sind mit * gekennzeichnet.

Die *ex vivo* Untersuchung von Leukozyten zeigte eine starke Aktivierung/Expansion von hematopoetischen Zellen in den (pre)metastasierenden Organen nach Behandlung mit ASML^{wt}-kM; jedoch nicht mit ASML^{kd}-kM. Die ASML^{wt}-IF zeigte keinen und die ASML^{wt}-Exo nur einen sehr schwachen Effekt in Bezug auf die Aktivierung hämatopoetischer Zellen. Zumindest förderte das ASML^{wt}-kM und ein wenig auch die ASML^{wt}-Exo die Expression von CD49b, CD49c, CD49d, des „stromal derived“ Faktors 1 (SDF-1), MMP9, MMP13 und uPAR, wohingegen die ASML^{wt}-IF keinen Einfluss auf die Expression dieser Proteine hatte (Tab. 3.2.1).

Tab. 3.2.1: Der Einfluss von Tumor-sezernierten Exosomen auf die Metastasierung. Zusammenfassung des Einflusses von kM und den einzelnen Fraktionen auf die Genexpression in drainierenden Lymphknoten 10 Tage nach Tumorzell-Applikation. Dunkle Farben bedeuteten starke Steigung und helle Farben schwache Steigung.



Weder die ASML^{wt}-IF noch die ASML^{wt}-Exo alleine waren in der Lage eine Umgebung zu schaffen, die eine Ansiedlung von schwach metastasierenden ASML^{kd}-Zellen unterstützte. Nur das ASML^{wt}-kM genügte diesen Ansprüchen. Wohingegen die ASML^{wt}-IF mit ASML^{kd}-Exo kooperieren konnte, aber nicht vice versa. Dieser Befund deutete darauf hin, dass Exosomen eine die Metastasierung unterstützende Botschaft enthielten, welche die ASML^{wt}-IF für die Erfüllung dieser Abgabe benötigten. Somit erschien es von besonderem Interesse Unterschiede zwischen den löslichen Fraktionen, aber auch zwischen Exosomen von ASML^{wt}- versus ASML^{kd}-Zellen, aufzudecken.

3.3 Der Einfluss von CD44v6 auf die Genexpression, Proteinsekretion und Exosomen-Abgabe.

Ich habe zuerst die lösliche Fraktion untersucht. Dies schließt innerhalb der löslichen Fraktion eine Adhäsion-unterstützende Subfraktion ein. Diese Subfraktion von ASML^{wt}-, nicht aber ASML^{kd}-Zellen, unterstützte die Adhäsion von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen (Klingbeil, 2007). In einem ersten Versuch wurde diese Matrix auf Matrixproteine, Wachstumsfaktoren und Proteasen, welche häufig in der extrazellulären Matrix vorkommen, untersucht. Es konnte mittels Immunfluoreszenz und WB Unterschiede in der Strukturierung der Hyaluronsäure in der ASML^{wt}-Matrix im Vergleich zur ASML^{kd}-Matrix beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich, dass die ASML^{wt}-Matrix mit HGF, der Matrixmetalloproteinase MMP2-, -9 und -13 sowie dem Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) angereichert war (Abb. 3.3.1).

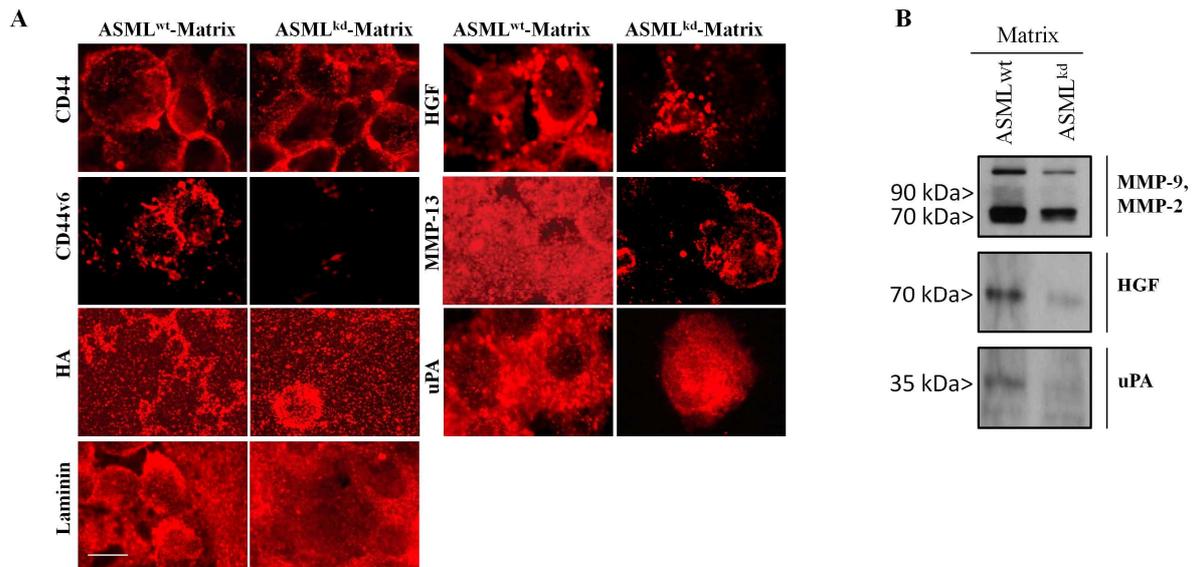


Abbildung 3.3.1: **Unterschiede in den Bestandteilen der Matrix von ASML-Zellen.** (A) ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät. Nach 48h wurden die Zellen entfernt und die Matrix mit den entsprechenden Primärantikörpern und TxR-markiertem Sekundärantikörper angefärbt. Maßstab 1,5 µm. (B) Die Matrix wurde in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10 %igem Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern gegen MMP-2, MMP-9, HGF und uPA sowie einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert.

Ein direkter Vergleich von Zelllysaten ergab eine deutliche Abnahme von c-Met, uPAR, HAS3 und eine schwache Reduktion der $\alpha 6\beta 4$ Expression in ASML^{kd}-Zellen im Vergleich zu ASML^{wt}-Zellen. CD44v6 und c-Met konnten nicht in der ASML^{kd}-IF und nicht auf Exosomen nachgewiesen werden. UPAR und $\alpha 6\beta 4$ hingegen wurden nicht in der ASML^{kd}-IF und schwächer auf den ASML^{kd}-Exo detektiert. HAS3 konnte nicht in der ASML^{kd}-IF nachgewiesen werden (Abb. 3.3.2).

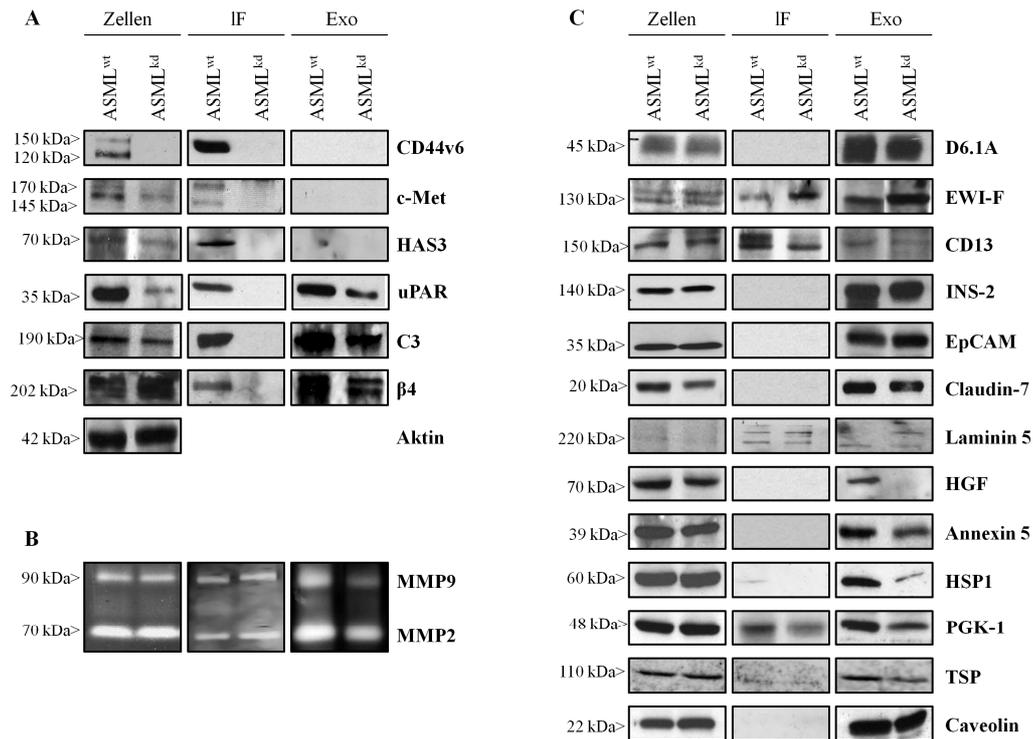


Abbildung 3.3.2:

Unterschiede in der Expression von Proteinen in Lysaten, IF und Exosomen von ASML-Zellen. (A und C) Lysate, IF und Exosomen von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10 %igem Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern sowie einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Als Kontrolle diente Aktin. Besonderes Augenmerk wurde auf die IF (A) und auf die Exosomen (C) gerichtet. (B) Aktivität von MMP-9 und MMP-2 wurde mittels Zymographie bestimmt.

Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D), anschließender Peptidisolierung und Sequenzierung über MALDI-TOF konnten in der ASML^{kd}-Matrix und der ASML^{kd}-IF eine Reduktion der Proteine HDGF (Abb. 3.3.3A), HRTA-Serinpeptidase (Abb. 3.3.3B+C), Enolase-1 (Abb. 3.3.3D), Clusterin (Abb.3.3.3E), ECM-Protein 1 (Abb. 3.3.3F), Sarcoglycan (Abb. 3.3.3G+H) sowie von Laminin B1 (Abb. 3.3.3I) beobachtet werden.

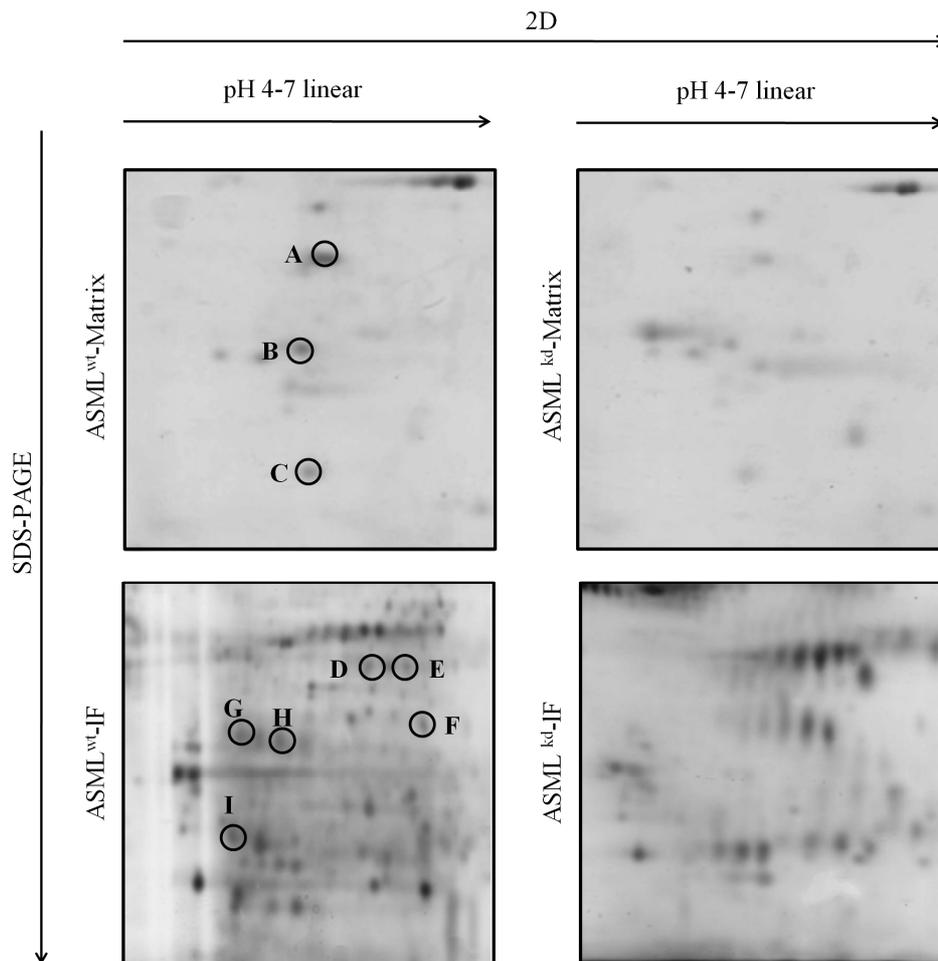


Abbildung 3.3.3:

Unterschiede in den Bestandteilen der Matrix und IF von ASML-Zellen. Die Matrix, sowie die IF von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden mittels 2D-Gelelektrophorese und anschließender Silber-Färbung analysiert. Die Detektion von (A) HDGF, HRTA-Serinpeptidase (B+C), Enolase-1 (D), Clusterin (E), ECM-Protein 1 (F), Sarcoglycan (G+H) sowie von Laminin B1 (I) geschah mittels MALDI-TOF.

Weiterhin konnte mittels MALDI-TOF und WB eine Abnahme der Expression von HGF, Annexin5, des Heat-Shock-Protein-1 (HSP-1) und der Phosphoglycerat-Kinase-1 (PGK-1) in ASML^{kd}-Exosomen nachgewiesen werden. Exosome sind Vesikel, welche stark angereichert sind mit Tetraspaninen und Tetraspanin-assoziierten Molekülen. Dies gilt auch für Glykosylphosphatidylinositol verankerte und andere sogenannten „raft-assoziierte“ Moleküle. Das Tetraspanin D6.1A und D6.1A-assoziierte Moleküle wie das „F2 alpha receptor regulatory Protein“, CD13, Intersectin 2 (INS-2), das epitheliale Zell-Adhäsions-Protein (EpCAM) und das EpCAM-assoziierte Protein Claudin-7, sowie CD49c, und CD104 waren auf ASML^{kd}-Zellen und ASML^{kd}-Exosomen nicht bzw. nur schwach verändert. Auch der Integrinligand Laminin-5 war auf Exosomen exprimiert. Thrombospondin (TSP) lag stark reduziert auf ASML^{kd}-Exosomen vor.

Wohingegen die Expression dieser Proteine auf den ASML^{kd}-Zellen im Vergleich zu den ASML^{wt}-Zellen unverändert waren. Die Aktivität der Metalloproteinase MMP9 war in ASML^{kd}-Exosomen reduziert, was durch das Zymogram bestätigt wurde (Abb. 3.3.2).

ASML^{wt}-Zellen zeigen verschiedene Merkmale von Krebsstammzellen zum Beispiel Präparation einer für das Überleben der Krebsstammzellen nötigen Nische und hohe Apoptoseresistenz. ASML-Zellen exprimieren Stammzellmarker. Auch hier konnte kein Unterschied zwischen ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen in der Expression der Krebsstammzellmarker EpCAM, $\alpha 6\beta 4$ (Abb.3.3.2A, WB) sowie CD24, CD133 und CD166 beobachtet werden (Abb.3.3.4, RT-PCR).

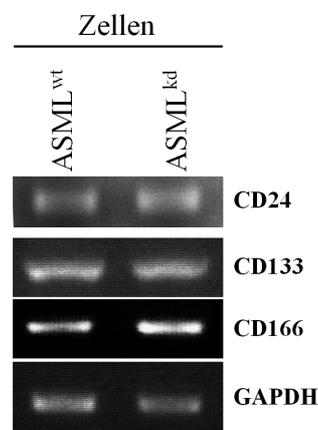


Abbildung 3.3.4:

Expression von Krebsstammzellmarkern auf ASML-Zellen. ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden mit der reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) auf die Expression der Krebsstammzellmarker CD24, CD133 und CD166 durchgeführt. Als Kontrolle diente GAPDH.

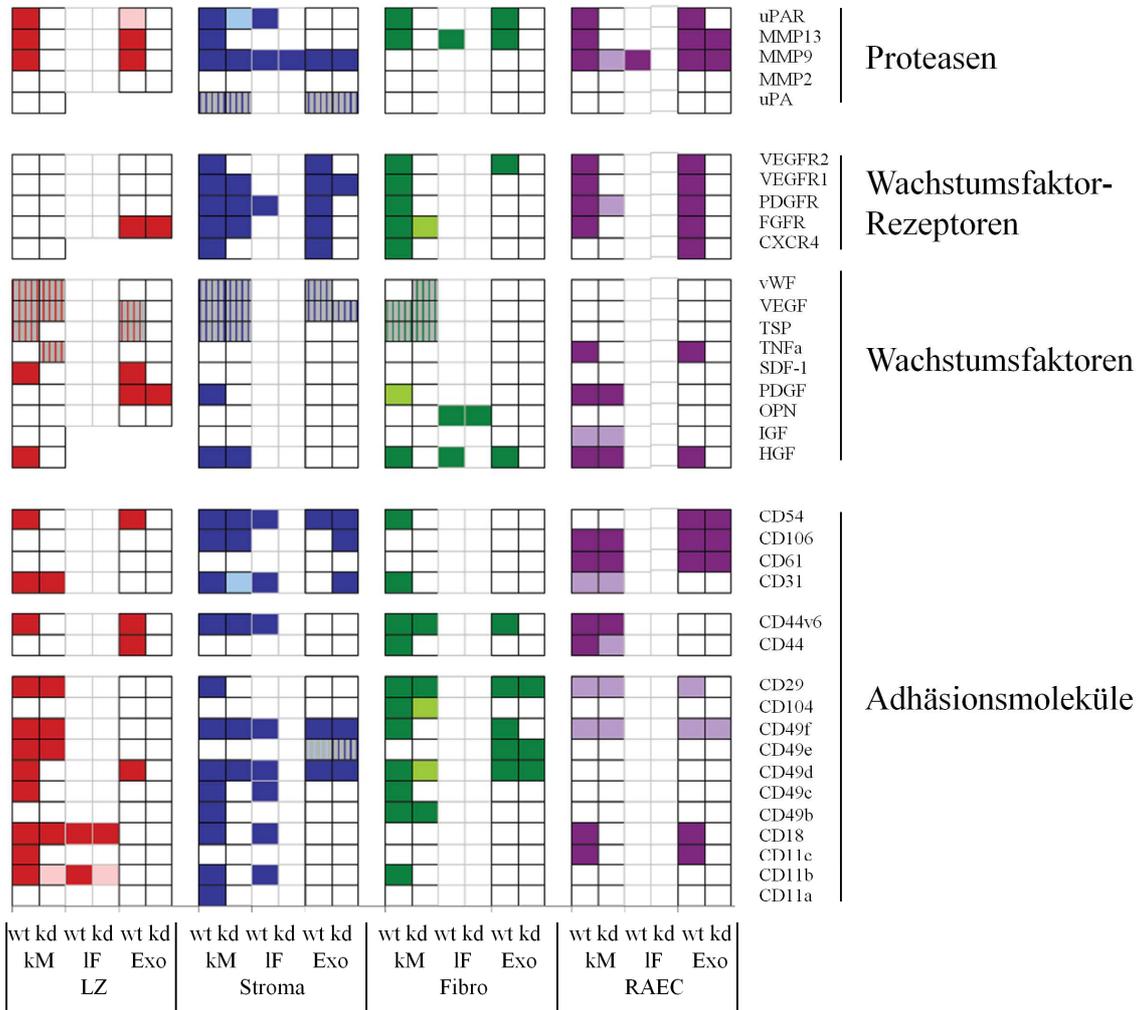
Zusammenfassend können diese Befunde in dem Sinne interpretiert werden, dass die Metastasierung unterstützenden Eigenschaften von ASML^{kd}-Exosomen wie die Expression von Tetraspaninen und Tetraspanin-assoziierte Moleküle unverändert vorlagen. Das Fehlen von HGF auf den ASML^{kd}-Exosomen sprach für die geringe Wirksamkeit der ASML^{kd}-Exosomen. Exosomen, als treibende Kraft, benötigten die lösliche Fraktion. Die ASML^{kd}-IF war durch das Fehlen von CD44v6, c-Met, uPAR, HAS3 und C3 charakterisiert. C-Met, uPAR sowie HAS3 waren ebenfalls auf den ASML^{kd}-Zellen reduziert.

3.4 Der Einfluss des kM auf potentielle Zielzellen.

Um die Hypothese, wonach die lösliche Fraktion und die Exosomen verschiedene Aufgaben in der Präparation der prämetastatischen Nische einnahmen, weiter zu unterstützen, wurde der Einfluss der ASML^{wt}- und ASML^{kd}-IF und Exosomen im Hinblick auf Adhäsion, Migration, Apoptoseresistenz und Proliferation auf potentiellen Zielzellen *in vitro* untersucht. Bei der präferentiellen Ansiedlung von ASML-Zellen in Lymphknoten und Lunge kamen als vornehmliche Zielzelle Lymphknoten-Stroma-Zellen und Lungen-Fibroblasten (Fibro) in Frage. Daneben Endothelzellen, Lymphozyten und hämatopoetische Progenitorzellen aus dem Knochenmark. Neben den funktionellen Analysen, habe ich den Einfluss der IF und der Exosomen auf die Expression von Adhäsionsmolekülen, Proteasen, Chemokine/Zytokine und deren Rezeptoren auf den genannten Zielzellen untersucht.

Wie erwartet, hatten die IF als auch die Exosomen einen wesentlichen Einfluss auf die Genexpression auf den Zielzellen nach Ko-Kultivierung. Im Vergleich zu den *ex vivo* Ergebnissen, zeigte allerdings die Ko-Kultur mit ASML^{kd}-kM, deutliche wenngleich schwächer ausgeprägte Effekte. Darüber hinaus konnten beide –die IF aber auch die Exosomen– die Genexpression auf den Zielzellen *in vitro* verändern. ASML^{wt}-kM im Vergleich zu ASML^{kd}-kM unterstützt die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Lymphozyten und Lymphknoten-Stroma-Zellen. Die ASML^{wt}-IF zeigt deutlich reduzierte Effekte. In die Veränderung der Expression von Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren sind vor allem Exosomen involviert, was auch für Proteasen gilt. Jedoch gab es erhebliche Unterschiede in der Empfänglichkeit der unterschiedlichen Zielzellpopulationen (Tab. 3.4.1).

Tab. 3.4.1: Der Einfluss von kM und den einzelnen Fraktionen auf die Genexpression von potentiellen Zielzellen. Lymphozyten (LZ), Fibroblasten, Stroma- und Endothel-Zellen (RAEC) wurden für 48h in Gegenwart von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-kM, sowie mit den einzelnen Fraktion kultiviert. Die Expression von Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren, sowie deren Rezeptoren und Proteasen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Dunkle Farben bedeuteten starke Steigung und helle Farben schwache Steigung.



Diese Ergebnisse bestätigten, dass sowohl die IF als auch die Exosomen einen Einfluss auf Zielzellen potentieller Metastasenorgane hatten, wobei offensichtlich beide unterschiedliche Aufgaben in der Zielzellstrukturierung einnahmen. Zusätzlich sei zu bemerken, dass in den *in vitro* Untersuchungen die Exosomen die Expression einer ganzen Reihe von Genen beeinflussten. Dies konnte *in vivo* nicht beobachtet werden und könnte daran liegen, dass *in vivo* die lösliche Matrix für den Exosomen-Transport benötigt wird. Die schwach ausgeprägte Wirkung von Exosomen *in vivo* im Vergleich zu denen *in vitro*, könnte sich zusätzlich auf eine ineffiziente Targetierung beziehen. Dies spiegelt sich auch in der unterschiedlichen funktionellen Einflussnahme von IF/Exo auf die einzelnen Zielzellpopulationen wieder.

Die Einflussnahme auf die Genexpression spiegelt sich auch in veränderten funktionellen Aktivitäten der Zielzellen wieder. Lymphknoten-Stroma-Zellen, Lungen-Fibroblasten und Endothelzellen adhärten stark an die ASML^{wt}-adhäsive Fraktion, nicht aber Lymphozyten und Zellen des Knochenmarks (Abb. 3.4.1).

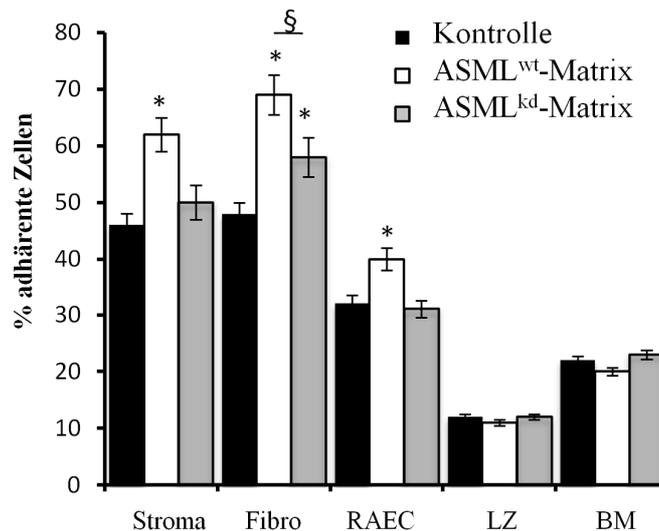


Abbildung 3.4.1:

Der Einfluss des kM auf die Adhäsion der Zielzellen. Lymphozyten, Knochenmarkszellen, Fibroblasten, Stroma- und Endothelzellen wurden in Triplikaten in 96-well-Platten ausgesät, welche zuvor mit Medium oder mit der ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Matrix beschichtet wurden. Nach 30 min. bei 37°C wurden die Platten gewaschen und die adhärenzten Zellen wurden mit Kristallviolett angefärbt, lysiert und bei OD_{595nm} gemessen. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Mediumkontrolle sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen ASML^{wt}- und ASML^{kd}-kM oder den einzelnen Fraktionen sind mit § gekennzeichnet.

Dies könnte bedeuten, dass sich die ASML^{wt}-Matrix an das Stromagewebe, einschließlich an die Fibroblasten, aber auch an Endothelzellen anlagert und die Abgabe von Signalen und/oder das Andocken von Exosomen ermöglicht. ASML^{wt}- und wenn auch schwächer, ASML^{kd}-kM unterstützte die Migration von Lymphknoten-Stroma-Zellen, Lungen-Fibroblasten, Endothelzellen und Lymphozyten, die von Knochenmarks-Zellen hingegen weniger. Die Migration war beschränkt auf die IF, wohingegen die Exosomen keinen Einfluss zeigten (Abb. 3.4.2).

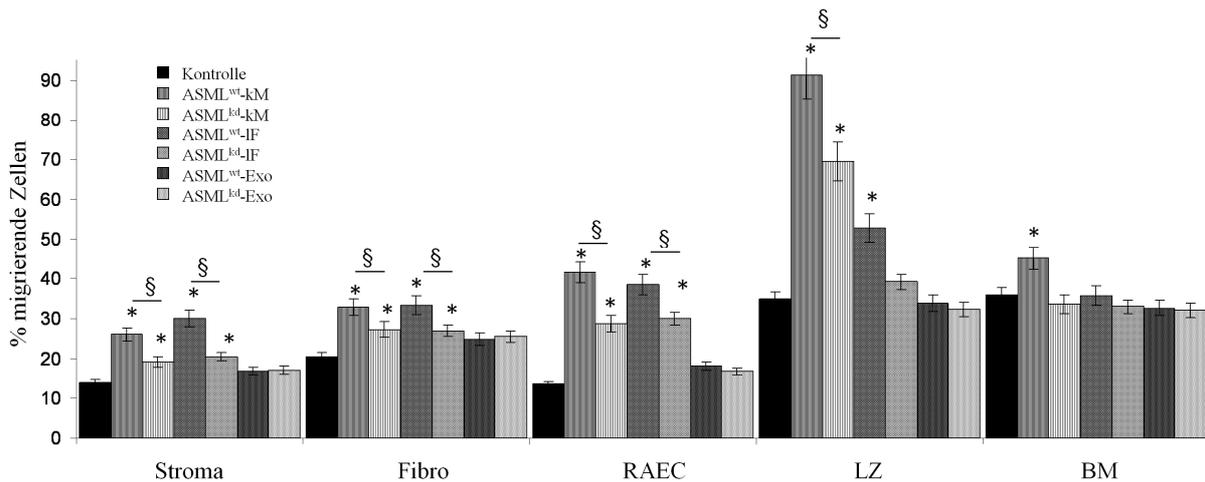


Abbildung 3.4.2:

Der Einfluss des kM auf die Migration von Zielzellen. Die Zellen wie in (Abb. 3.4.1) wurden in den oberen Teil einer Boyden-Kammer pipettiert. Im unteren Teil der Boyden-Kammer befanden sich Medium/0,1 % BSA sowie die einzelnen Fraktionen. Fibroblasten, Stroma- und Endothelzellen wurden für 16h bei 37°C, die Lymphozyten und Knochenmarkszellen für 4h bei 37°C inkubiert. Lymphozyten und Knochenmarkszellen wurden ausgezählt, Fibroblasten, Stroma- und Endothelzellen auf der Unterseite der Membran mit Kristallviolett angefärbt, lysiert und bei OD_{595nm} gemessen. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Mediumkontrolle sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen ASML^{wt}- und ASML^{kd}-kM oder den einzelnen Fraktionen sind mit § gekennzeichnet.

Ein weiterer wesentlicher Faktor ist die Apoptoseresistenz metastasierender Tumorzellen. ASML^{wt}-Zellen sind stark Apoptose-Resistent. Die Apoptoseresistenz von ASML^{kd}-Zellen ist deutlich vermindert (Klingbeil, 2007). Die Überprüfung, ob das kM von ASML^{wt}-Zellen Fibroblasten, Stroma- und Endothelzellen, Lymphozyten und Knochenmarkszellen vor Apoptose schützt, ergab dass kM und IF die Apoptose-Resistenz von Fibroblasten, Stroma- und Endothelzellen, Lymphozyten und Knochenmarkszellen schützt (Abb. 3.4.3). Ein signifikanter Anstieg in der Cis-Platin-Resistenz durch Ko-Lokalisation mit dem ASML^{wt}-kM und der ASML^{wt}-IF wurde in Lymphozyten, Knochenmarkszellen und Fibroblasten beobachtet. Exosomen schützten nicht vor Apoptose (Abb.3.4.4). Ich komme speziell auf diesen Befund zurück.

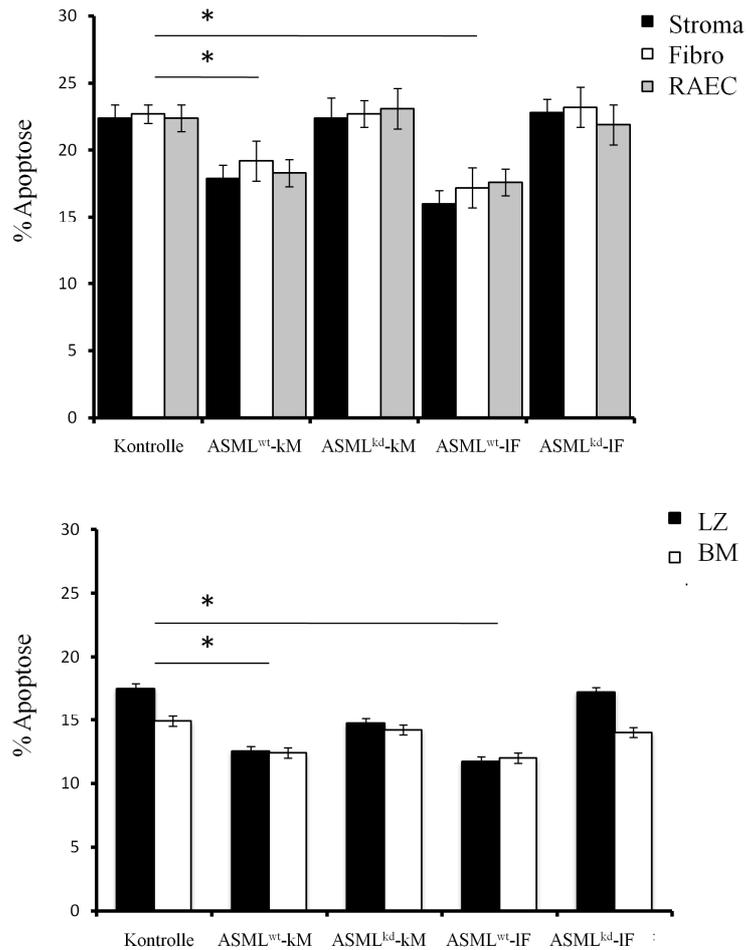


Abbildung 3.4.3:

Der Einfluss des kM auf die Apoptoseresistenz der Zielzellen. Lymphozyten, Knochenmarkszellen, Fibroblasten, Stroma- und Endothelzellen wurden für 48h mit kM oder den einzelnen Fraktionen kultiviert. Es sind die Mittelwerte \pm STAB aus Triplikaten der apoptotischen Zellen (AnnexinV-APC/PI) gezeigt. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Mediumkontrolle sind mit * gekennzeichnet.

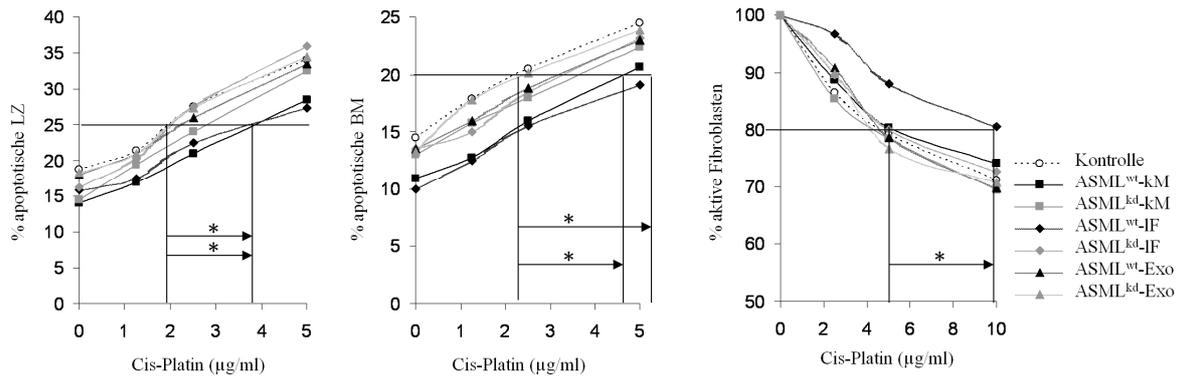


Abbildung 3.4.4: Der Einfluss des kM auf die Apoptoseresistenz der Zielzellen unter Cis-Platin. Lymphozyten, Knochenmarkszellen und Fibroblasten wurden in Gegenwart von ASML^{wt} und ASML^{kd}-Fraktionen, sowie mit titrierten Mengen an Cis-Platin behandelt. Der relative Anteil (Mittelwerte \pm STAB aus Triplikaten) an vitalen Zellen im Vergleich zu Cis-Platin unbehandelten Zellen wird aufgezeigt (apoptotische Zellen (AnnexinV-APC/PI) links und in der Mitte, Vitalität (MTT-Assay) rechts). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Mediumkontrolle sind mit * gekennzeichnet.

Die Expression von c-Met war in ASML^{kd}-Zellen reduziert und fehlte in der IF dieser Zellen. Zusätzlich enthielten ASML^{kd}-Exosomen kein HGF, was die Zellzyklus-Abfolge beeinträchtigen kann. Tatsächlich war die Proliferation von Fibroblasten, Stroma- und Endothelzellen, als auch von Lymphozyten und Knochenmarkszellen als Antwort auf die Kultivierung mit ASML^{wt}-kM (nicht aber mit ASML^{kd}-kM) gesteigert. Die Stimulation mit der ASML^{wt}-löslichen Fraktion zeigte nur einen geringen Effekt auf die Proliferation der einzelnen Zellen. In Fibroblasten, Stroma- und Endothelzellen, sowie in Lymphozyten rufen die ASML^{wt}-Exosomen (die ASML^{kd}-Exosomen weniger) die stärkste Antwort hervor. Bemerkenswerter Weise verstärkte die Mischung aus ASML^{wt}-IF mit ASML^{kd}-Exosomen signifikant die Proliferation (Abb. 3.4.5).

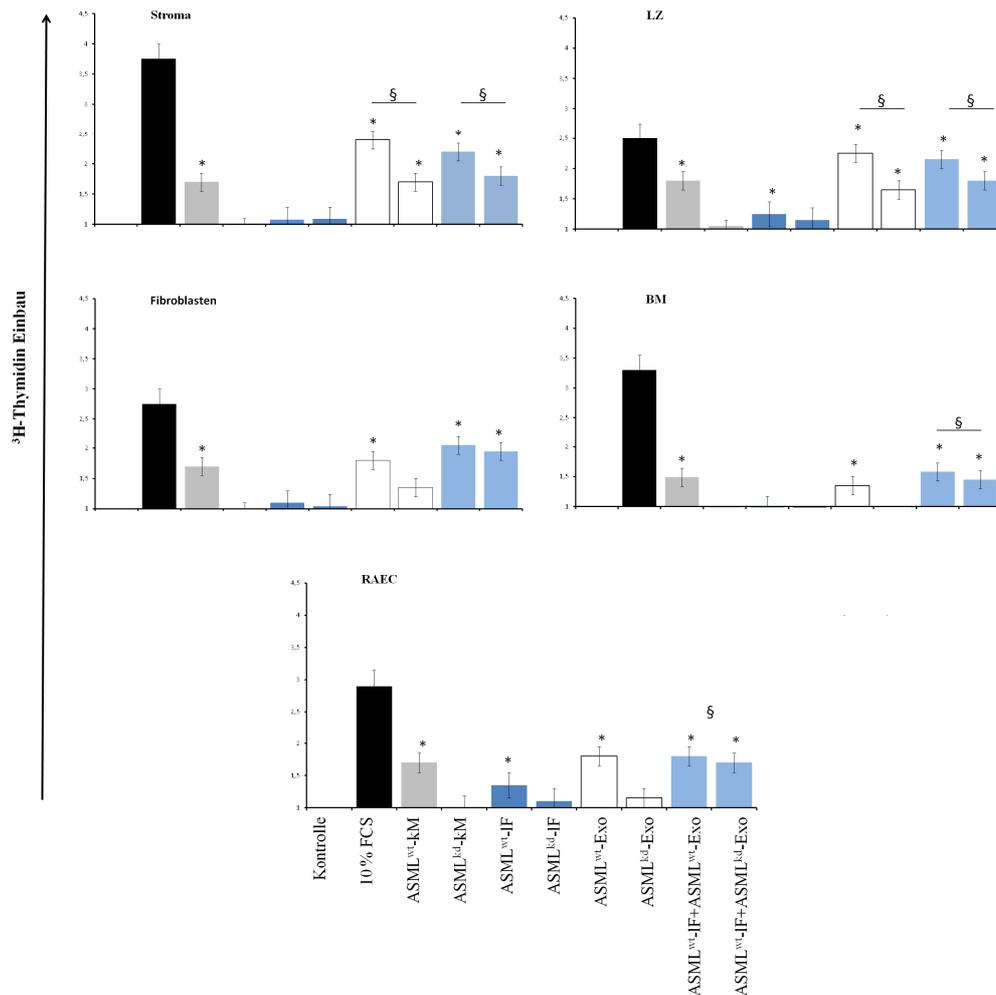


Abbildung 3.4.5:

Der Einfluss des kM auf die Proliferation der Zielzellen. Lymphozyten, Knochenmarkszellen, Fibroblasten, Stroma- und Endothelzellen wurden für 48h mit kM oder den einzelnen Fraktionen kultiviert. Gezeigt ist der relative Anstieg (Mittelwert \pm STAB aus Triplikaten) des ^3H -Thymidin-Einbaus. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Mediumkontrolle sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen ASML^{wt}- und ASML^{kd}-kM oder den Fraktionen davon sind mit § gekennzeichnet.

Diese Befunde zeigen, dass die schwache Induktion der Proliferation von ASML^{kd}-Exosomen nicht ausschließlich auf dem Fehlen von HGF beruhen konnte. Tatsächlich wurde die Proliferation von Stromazellen und Lymphozyten durch Zugabe von HGF, unabhängig davon, ob ASML^{wt}- oder ASML^{kd}-Exosomen vorhanden waren, gesteigert. Stattdessen konnte nur in der Ko-Kultur aus ASML^{kd}-Exosomen mit HGF ein schwacher Anstieg in der Proliferation von Fibroblasten, Endothelzellen und Knochenmarkszellen gesehen werden (Abb. 3.4.6). Neben HGF müssen folglich noch weitere Faktoren an der Proliferations-unterstützenden Eigenschaft der ASML^{wt}-Exosomen beteiligt sein. Die *in vitro* Auswertung bestätigte die beeindruckende Stärke des konditionierten Mediums im Vergleich mit der löslichen Fraktion und den Exosomen.

Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Zusammenarbeit von löslicher Fraktion *versus* Exosomen, und bekräftigt die *in vivo* Beobachtungen. Die Präparation einer prämetastatischen Nische war CD44v abhängig und beruhte auf einer Kooperation der von der Tumorzelle abgegebenen löslichen Fraktion mit den Exosomen,

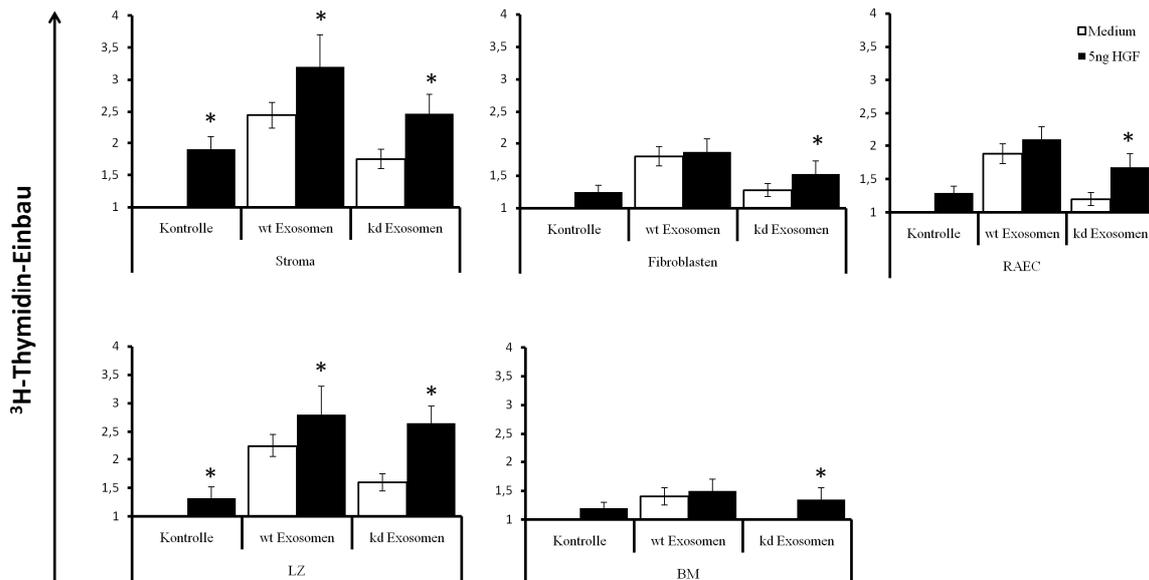


Abbildung 3.4.6: Der Einfluss des kM auf die Proliferation der Zielzellen. Lymphozyten, Knochenmarkszellen, Fibroblasten, Stroma- und Endothelzellen wurden für 48h mit Exosomen von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen in Gegenwart von 5 ng HGF kultiviert. Gezeigt ist der relative Anstieg (Mittelwert ± STAB aus Triplikates) des ³H-Thymidin-Einbaus. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Mediumkontrolle sind mit * gekennzeichnet.

Da die Unterschiede ASML^{wt} im Vergleich ASML^{kd} deutlicher in der löslichen Matrix als in Exosomen zu beobachten war, habe ich mich im Weiteren insbesondere der Charakterisierung der Matrix zugewandt. Wie im Folgenden ausgeführt, bestätigten diese Untersuchungen die zentrale Rolle von CD44v6 bei der Generierung einer Metastasierung-fördernden Matrix. Darüberhinaus ist CD44 die zentrale Schaltstelle zur Untersuchung der Matrix-vermittelten Informationen. Begonnen habe ich mit der Charakterisierung der Matrixkomponente HA, da HA zum einen maßgeblich an der Strukturierung der Matrix beteiligt ist, zum anderen einen zentralen Rezeptor für CD44 darstellt.

3.5 Unterschiede in der Matrix von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen und deren Einfluss auf die Mobilität dieser Zellen.

Ich hatte ausgeführt, dass die stark metastasierenden ASML^{wt}-Zellen eine Matrix generieren, welche die Bildung von Metastasen unterstützt. Dies könnte bedeuten, dass die Matrix nicht nur mit dem umgebenden Gewebe sondern möglicherweise auch mit der Tumorzelle kommuniziert. Um diese Arbeitshypothese zu unterstützen wurde in einer ersten Versuchsreihe der Einfluss der Matrix auf die Mobilität von ASML-Zellen evaluiert.

3.5.1 Unterschiede in der Größe von HA.

Es ist bekannt, dass die Länge der HA für die Kommunikation der Matrix mit der Tumorzelle von Bedeutung ist (Toole et al., 2004). Um den Einfluss von HA auf die Bildung einer Matrix, welche die Metastasierung unterstützt zu untersuchen, wurde die Größe der HA mittels ELISA bestimmt. Dazu wurde die lösliche Fraktion (im folgenden Matrix) zuvor durch Filtration in verschiedene Größen separiert. Die Filtration erfolgte durch Zentrifugation, wobei Moleküle mit einem Molekulargewicht von ≥ 50 kDa bzw. 10-50kDa und 3-10kDa, entstanden. Es konnte gezeigt werden, dass die HA in der ASML^{wt}-Matrix nur im Bereich von ≥ 50 kDa vorliegt, wohingegen die HA in der ASML^{kd}-Matrix auch in einem Bereich von 10-50 kDa nachzuweisen ist. Im Bereich von 3-10 kDa konnte weder in der ASML^{wt}-, noch in der ASML^{kd}-Matrix HA nachgewiesen werden (Abb. 3.5.1.1).

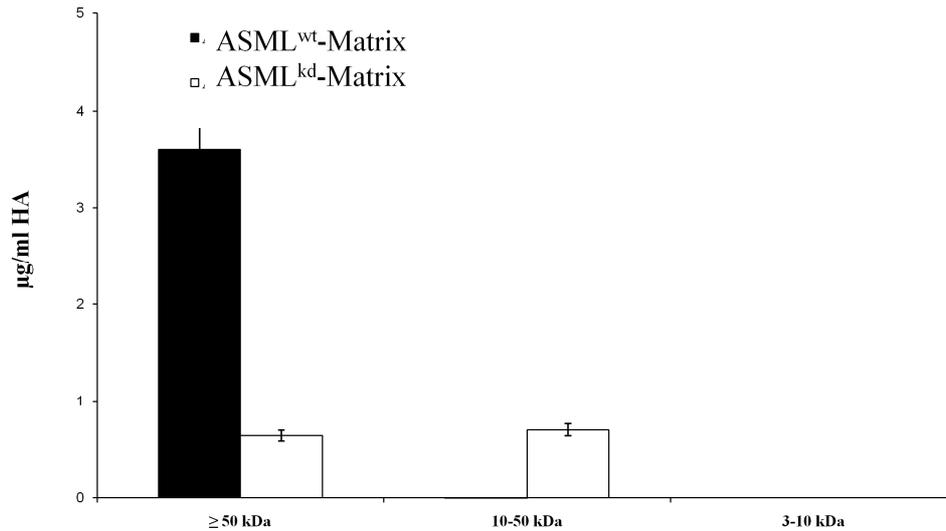


Abbildung 3.5.1.1: Unterschiede in der Menge und Größe von HA in der Matrix von ASML-Zellen. Die Menge und Größe der HA in der Matrix von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurde mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm STAB aus Triplikaten.

Die erhöhte Menge an HA in der ASML^{wt}-Matrix im Vergleich zu der ASML^{kd}-Matrix könnte an der Hyaluronsynthese (HAS) liegen, welche für die Bildung von HA verantwortlich ist, die Größenunterschiede müssten auf Hyaluronidaseaktivität (HYAL), die für die Degradierung von HA zuständig ist, zurückzuführen sein. Hierzu wurden ASML^{wt}- wie auch ASML^{kd}-Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE und WB auf die Expression von HAS3 sowie HYAL1 hin untersucht. Auch die Matrix der jeweiligen Zellen wurde mit einbezogen. Die HYAL-Aktivität wurde mit dem ELISA bestimmt. ASML^{wt}-Zellen exprimierten mehr HAS3 als ASML^{kd}-Zellen und es konnte mehr HAS3 in der Matrix von ASML^{wt}-Zellen nachgewiesen werden. Andererseits konnte mehr HYAL1 sowohl in der ASML^{kd}-Matrix mittels WB, als auch eine erhöhte HYAL-Aktivität in der ASML^{kd}-Matrix mittels ELISA nachgewiesen werden (Abb. 3.5.1.2).

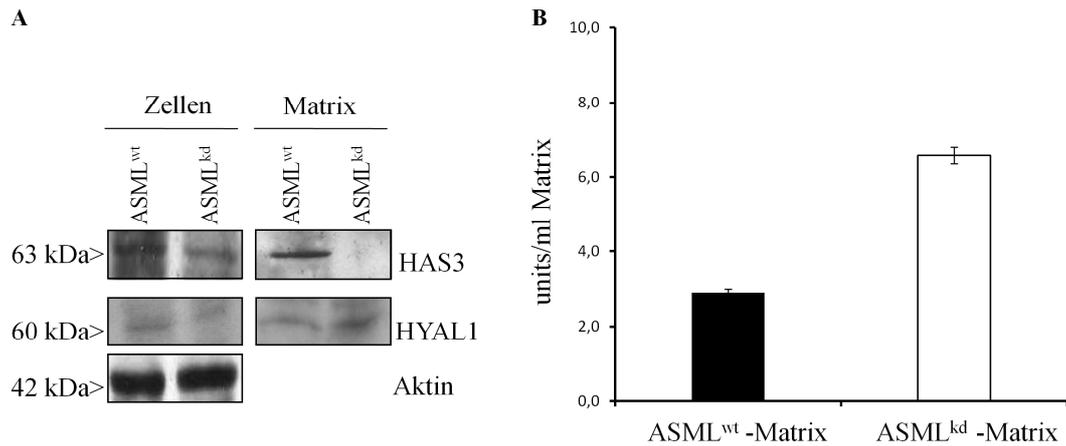


Abbildung 3.5.1.2: Bestimmung von HAS und HYAL im Lysat und in der Matrix von ASML-Zellen. (A) ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen sowie die Matrix beider Zelllinien wurden in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10 %igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern gegen HAS3 und HYAL1, sowie einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Als Kontrolle diente Aktin. (B) Die Aktivität von HYAL in der ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Matrix wurde mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm STAB aus Triplikaten.

3.5.2 ASML^{wt}-Matrix stimuliert die Migration CD44v6-exprimierender Tumorzellen.

Diese Unterschiede in der Zusammensetzung der Matrix von Tumorzellen nahmen einen signifikanten Einfluss auf die Mobilität von Tumorzellen. ASML^{wt}-, ASML^{kd}-, AS-(CD44s⁺, CD44v⁻) und AS-14- Zellen (CD44s⁺, CD44v4-v7⁺) wurden jeweils mit der ASML^{wt}-Matrix, der ASML^{kd}-Matrix als auch mit HA stimuliert und der Anteil migrierender Zellen mit Hilfe der Boyden Kammer bestimmt. Sowohl in ASML^{wt}-Zellen, als auch in AS-14-Zellen konnten nach Stimulation mit der ASML^{wt}-Matrix, nicht aber mit der ASML^{kd}-Matrix, ein Anstieg in der Migration beobachtet werden (Abb. 3.5.2.1).

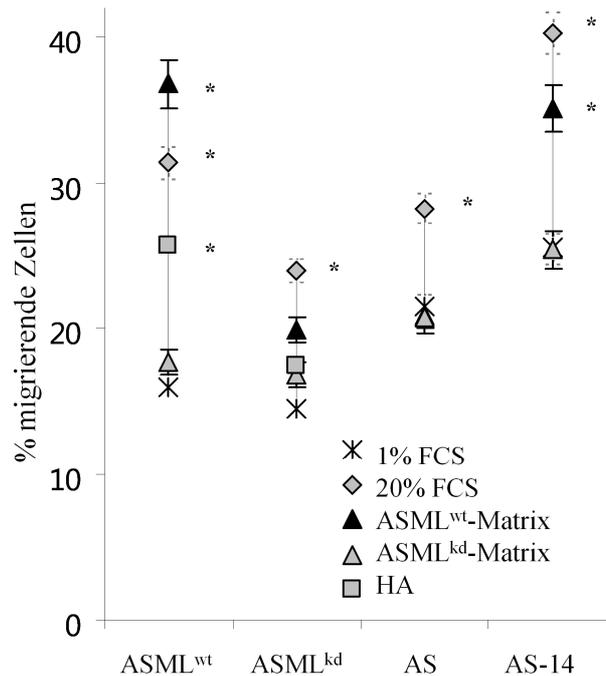


Abbildung 3.5.2.1: **ASML^{wt}-Matrix stimulierte Migration.** Migration von ASML^{wt}-, ASML^{kd}-, AS- und AS-14-Zellen in Richtung FCS, HA, ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Matrix in der Boyden-Kammer. Die Anzahl an migrierenden Zellen wurde nach 18h bestimmt und als % migrierender Zellen (Mittelwert \pm STAB von Triplikaten) dargestellt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich ASML^{wt}-Zellen viel schneller auf ihrer eigenen Matrix als auf der ASML^{kd}-Matrix bewegen (Abb. 3.5.2.2A). Die ASML^{wt}-Matrix unterstützt zwar in eingeschränktem Maße die ASML^{kd}-Zell-Migration, allerdings nur in den ersten 6-8 Stunden nach Aussaat der Zellen auf die Matrix. Danach kam es zu keiner Steigerung der Migration von ASML^{kd}-Zellen auf der ASML^{wt}-Matrix. Während der letzten drei Stunden der Messung konnten sich weder ASML^{wt}-, noch ASML^{kd}-Zellen auf der ASML^{kd}-Matrix bewegen (Abb. 3.5.2.2B). Diese Befunde zeigen, dass die Migrations-unterstützende Funktion der ASML^{wt}-Matrix von CD44v6 abhängig ist. Mittels „Atomic Force Microscopy“ (AFM) konnte ein weiterer Unterschied zwischen der ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Matrix beobachtet werden. So bilden im Gegensatz zu den ASML^{wt}-Zellen auf deren Matrix ASML^{kd}-Zellen auf ihrer eigenen Matrix keine sogenannten „Spikes“ aus. Allerdings können ASML^{kd}-Zellen, wurden sie auf die ASML^{wt}-Matrix ausgesät, „Spikes“ ausbilden. (Abb. 3.5.2.2C und D).

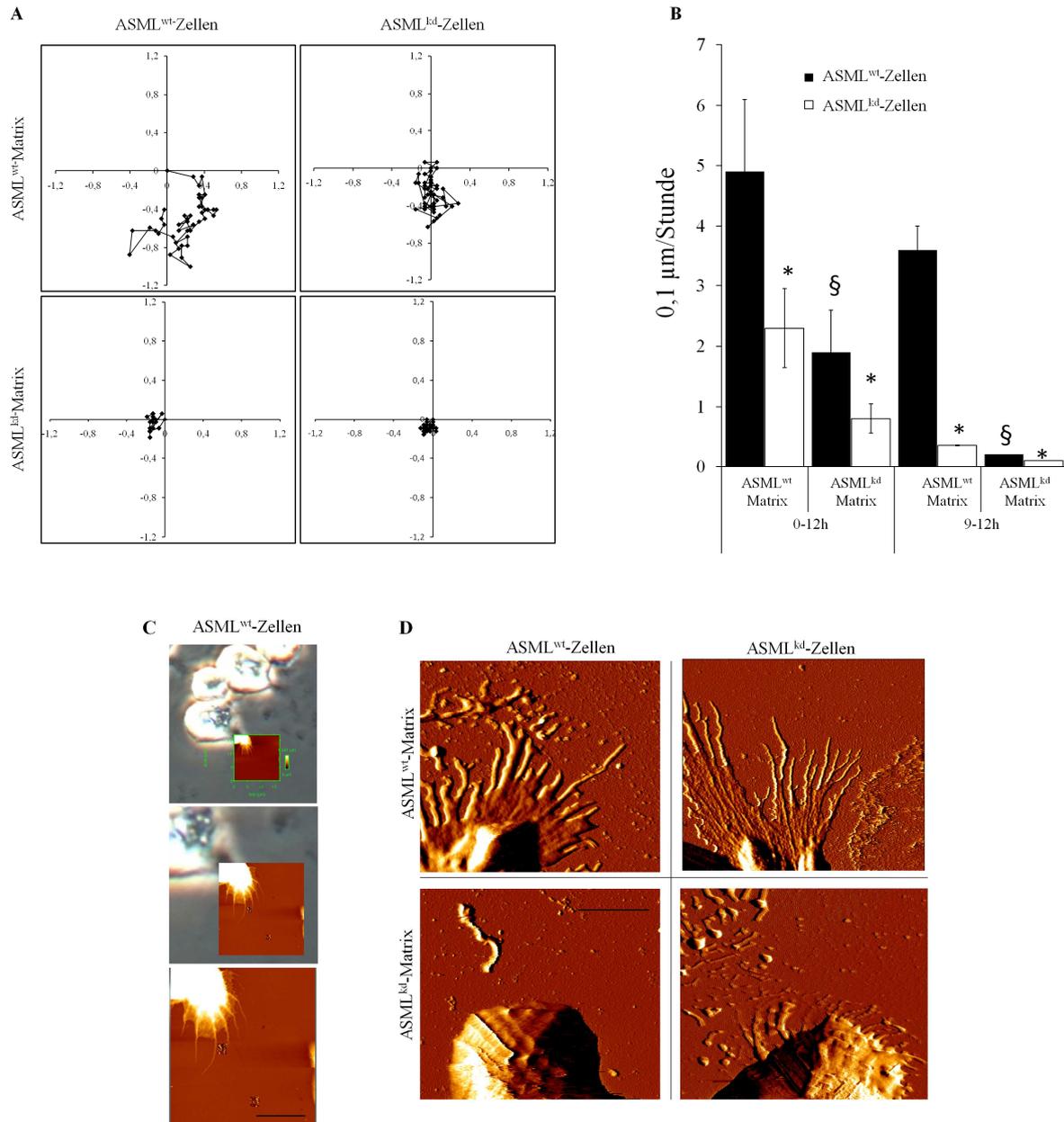


Abbildung 3.5.2.2:

Bewegung von ASML-Zellen auf der Matrix. (A und B) Zu sehen ist die Bewegung von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen auf der Matrix von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen mittels Video-Mikroskopie. Es wurden über einen Zeitraum von 12h alle 15 min. Bilder gemacht. (A) Individuelle Zellbewegung über 12h. (B) Durchschnittliche Bewegung \pm STAB von 20 Zellen während der vollen 12h, sowie der letzten 3h. Signifikante Unterschiede in der Zellbewegung auf der ASML^{wt}-Matrix im Vergleich zu der ASML^{kd}-Matrix sind mit § gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen sind mit * gekennzeichnet. (C und D) Morphologische Bilder von ASML-Zellen mittels AFM. (C) Repräsentative Bilder von ASML^{wt}-Zellen auf ihrer eigenen Matrix. (D) Repräsentative Bilder von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen auf der ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Matrix. Maßstab 5 μ m.

Da sich ASML^{kd}-Zellen auf der ASML^{wt}-Matrix wenngleich in reduziertem Masse bewegen können, bedeutet dies, dass neben CD44 weitere Membranmoleküle involviert sind, wobei sich zwei Proteine anbieten, die eine wesentliche Rolle bei der Tumorzellmobilität spielen und darüberhinaus mit CD44/CD44v6 assoziieren können.

3.5.3 CD44v6 assoziiert in ASML^{wt}-Zellen mit c-Met und $\alpha 6\beta 4$.

CD44v6 assoziiert mit c-Met und $\alpha 6\beta 4$ (Orlan-Rousseau et al., 2002) und c-Met assoziiert mit $\alpha 6\beta 4$ (Trusolino et al., 2001). Diese Befunde galt es zuerst für ASML-Zellen zu bestätigen. Dabei wurden ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen lysiert und anschließend mit anti- $\alpha 6\beta 4$ (B5.5) und anti-CD44v6 (A2.6) präzipitiert. ASML^{wt}-Zellen exprimierten weniger c-Met als ASML^{kd}-Zellen (Abb. 3.3.2). $\alpha 6\beta 4$ assoziierte in ASML^{wt}-Zellen mit c-Met und CD44v6. In ASML^{kd}-Zellen hingegen war die Interaktion von $\alpha 6\beta 4$ mit c-Met geringer, auch aufgrund der verminderten Expression von $\alpha 6\beta 4$ (Abb. 3.3.2). Die Assoziation von CD44v6 mit c-Met konnte darüber hinaus in ASML^{wt}-Zellen bestätigt werden, die erwartungsgemäß in ASML^{kd}-Zellen nicht beobachtet wurden. CD44v6 assoziierte verstärkt in ASML^{wt}-Zellen mit $\alpha 6\beta 4$ und c-Met (Abb. 3.5.3).

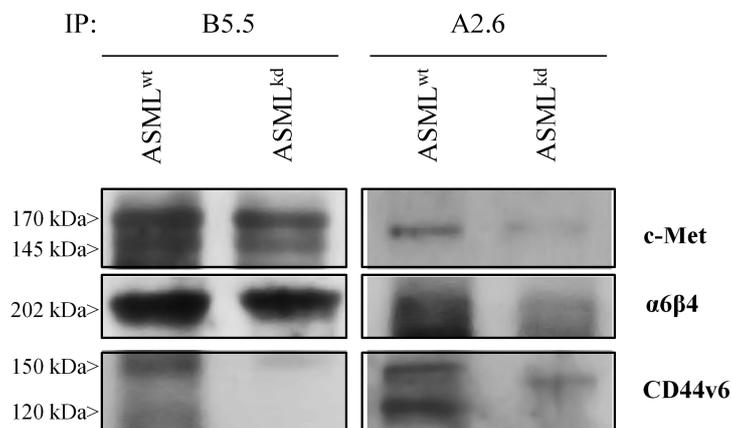


Abbildung 3.5.3:

Koimmunpräzipitation von CD44v6 mit c-Met und $\alpha 6\beta 4$ in ASML-Zellen. ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden in Lysispuffer mit 1 % Lubrol lysiert um Immunkomplexe mit anti- $\alpha 6\beta 4$ (B5.5) und anti-CD44v6 (A2.6) zu präzipitieren. Die Immunkomplexe wurden in einem 10 %igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern gegen c-Met, $\alpha 6\beta 4$ und CD44v6 und HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert.

3.5.4 CD44v6, c-Met und $\alpha6\beta4$ beeinflussen die Migration von ASML^{wt}-Zellen.

Um den Einfluss von CD44v6, c-Met und $\alpha6\beta4$ auf die Migration von ASML-Zellen zu untersuchen, wurden ASML^{wt}-, ASML^{kd}-, AS (CD44s⁺, CD44v⁻, c-Met⁺, $\alpha6\beta4$ ⁻) und AS-14 (CD44s⁺, CD44v4-v7⁺, c-Met⁺, $\alpha6\beta4$ ⁻) Zellen mit anti-panCD44 (Ox50), anti-CD44v6 (A2.6), anti-c-Met und anti- $\alpha6\beta4$ (B5.5) inkubiert, um die Migration in Richtung der ASML^{wt}-Matrix in der Boyden-Kammer zu beobachten. In ASML^{wt}-Zellen konnte die Migration zur ASML^{wt}-Matrix mit anti-panCD44, anti-CD44v6, anti-c-Met und anti- $\alpha6\beta4$ signifikant gehemmt werden. Dasselbe wurde mit anti-panCD44 und anti-CD44v6 bei AS-14-Zellen beobachtet. Dagegen beeinflusste anti-panCD44 nicht die Migration von AS-Zellen. Die Migration von ASML^{kd}-Zellen (CD44v6⁻, $\alpha6\beta4$ ⁺) zur ASML^{wt}-Matrix wurde nur schwach durch anti-panCD44, anti- $\alpha6\beta4$ und anti-c-Met inhibiert (Abb. 3.5.4.1A). Dies bedeutete, dass offensichtlich ein Komplex aus CD44v6, c-Met und $\alpha6\beta4$ an der Migration von ASML^{wt}-Zellen beteiligt ist, wobei CD44v6 eine zentrale Rolle zukommt.

Um dies zu bestätigen, wurden ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen mit HA, HGF, LN5 sowie der ASML^{kd}-Matrix stimuliert und die Migration in der Boyden-Kammer beobachtet. Es wurde gezeigt, dass die Migration von ASML^{wt}-Zellen in Richtung HA, HGF und LN5 signifikant durch anti-CD44v6, anti- $\alpha6\beta4$ und anti-c-Met inhibiert werden konnte. Eine eher schwache Migration zur ASML^{kd}-Matrix konnte nur mit anti-c-Met signifikant verringert werden. Die Migration von ASML^{kd}-Zellen in Richtung HA, HGF, LN5 und der ASML^{kd}-Matrix konnte nur durch anti- $\alpha6\beta4$ und anti-c-Met signifikant reduziert werden (Abb. 3.5.4.1B)

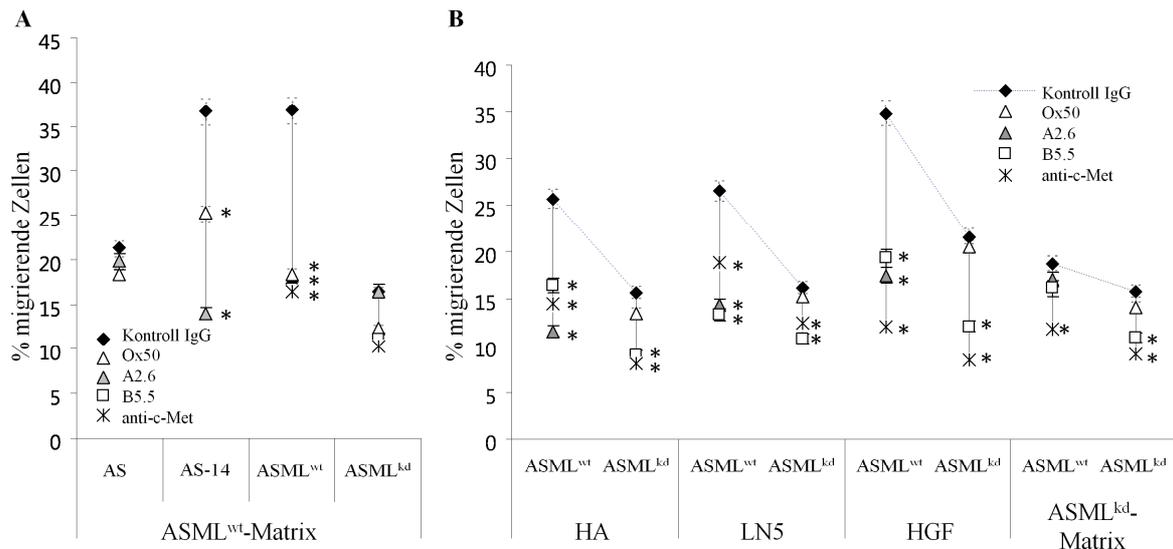


Abbildung 3.5.4.1: Anti-CD44v6, anti- $\alpha6\beta4$ und anti-c-Met inhibiert die Migration von ASML^{wt}-Zellen. (A und B) ASML^{wt}-, ASML^{kd}-, AS-, und AS-14-Zellen wurden zusammen mit anti-panCD44 (Ox50), anti-CD44v6 (A2.6), anti- $\alpha6\beta4$ (B5.5) sowie anti-c-Met inkubiert. (A) Gezeigt ist die Migration in Richtung der ASML^{wt}-Matrix (B) und in Richtung HA, LN5, HGF und der ASML^{kd}-Matrix. Die Anzahl an migrierenden Zellen wurde nach 18h bestimmt und als % migrierender Zellen (Mittelwert \pm STAB von Triplikaten) dargestellt. Signifikante Antikörperinhibierung ist mit * gekennzeichnet.

Um Hinweise auf die generelle Gültigkeit der mit ASML Tumorzellen erhobenen Befunde zu erhalten, wurden drei humane Pankreastumorzelllinien auf die Expression von CD44v6, $\alpha6\beta4$ und c-Met hin untersucht und deren Einfluss auf die Migration nach Inkubation von anti-CD44v6, anti- $\alpha6\beta4$ und anti-c-Met beobachtet. HA, HGF und LN5 konnten die Migration von Capan2-Zellen (CD44v6⁺, c-Met⁺, $\alpha6\beta4$ ⁺) unterstützen. Entsprechend wurde die Migration durch anti-CD44v6, anti- $\alpha6\beta4$ und anti-c-Met stimulationsunabhängig inhibiert. Im Gegensatz zu HA konnten LN5 und HGF die Migration von 8.18-Zellen (CD44v6⁺, $\alpha6\beta4$ ⁺) nicht stimulieren und nur anti-CD44v6 nicht aber anti- $\alpha6\beta4$ und anti-c-Met verringerte signifikant die Migration. Die Migration von Pt45P1-Zellen (CD44v6⁻, c-Met⁻, $\alpha6\beta4$ ⁺) konnte weder durch HA noch durch HGF oder LN5 stimuliert werden und wurde nur schwach durch anti- $\alpha6\beta4$ inhibiert (Abb. 3.5.4.2A und B).

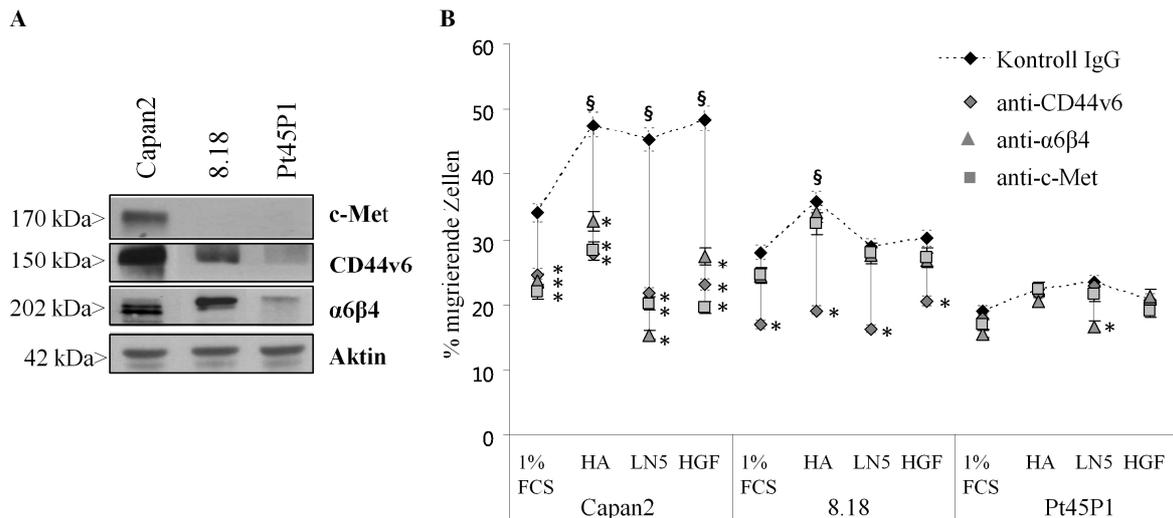


Abbildung 3.5.4.2:

Tumormatrix und deren Bedeutung für die Zellmigration. (A) Humane Capan2-, 8.18- und Pt45P1-Pankreaskarzinomzelllinien wurden in Lysispuffer mit 1 % Triton X 100 lysiert. Die Lysate wurden in einem 10 %igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern gegen c-Met, $\alpha 6\beta 4$ und CD44v6 und HRP-markiertem Sekundäntikörper detektiert. Als Kontrolle diente Aktin. (B) Humane Capan2-, 8.18- und Pt45P1-Pankreaskarzinomzelllinien wurden zusammen mit anti-CD44v6, anti- $\alpha 6\beta 4$ sowie anti-c-Met inkubiert. Gezeigt ist die Migration in Richtung HA, LN5, HGF. Die Anzahl an migrierenden Zellen wurde nach 18h bestimmt und als % migrierender Zellen (Mittelwert \pm STAB von Triplikaten) dargestellt. Signifikante Unterschiede in der Migration von Capan2, 8.18 und Pt45P1 in Richtung HA, HGF und LN5 im Vergleich zur Kontrolle sind mit § gekennzeichnet. Signifikante Antikörperinhibierung ist mit * gekennzeichnet.

3.6 Molekulare Mechanismen HA-vermittelter Zellbewegung in Abhängigkeit von CD44v6.

Diese Untersuchungen zeigten, dass in Abhängigkeit von CD44v6 und der damit verbundenen HAS3-Transkription eine Matrix generiert wird, welche die Migration von Tumor-Zellen unterstützte. Darüberhinaus scheint sowohl die Interaktion von CD44v6, $\alpha 6\beta 4$ und c-Met mit der Matrix, als auch das Zusammenspiel der drei Moleküle untereinander das migratorische Potenzial zu unterstützen. Diese Befunde galt es durch den Nachweis der Aktivierung der beteiligten Komponenten zu unterstützen.

3.6.1 HA, HGF und LN5 aktivieren c-Met.

Ich habe mit dem Nachweis der Aktivierung von c-Met über die ASML^{wt}-, ASML^{kd}-Matrix bzw. HA, HGF und LN5 Stimulation begonnen und die Aktivierung von c-Met mittels SDS-PAGE und WB evaluiert. Sowohl die ASML^{wt}-Matrix, HA und HGF, als auch LN5 führten zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von c-Met, wobei die mit HGF stimulierten Zellen am stärksten aktiviert wurden. Es konnte keine Steigerung der c-Met-Aktivität in ASML^{kd}-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.6.1). Dies bestätigt den starken Einfluss von CD44v6 auf die Aktivierung von c-Met und zeigt, dass die Aktivierung von c-Met in ASML-Zellen maßgebend durch CD44v6 beeinflusst wird.

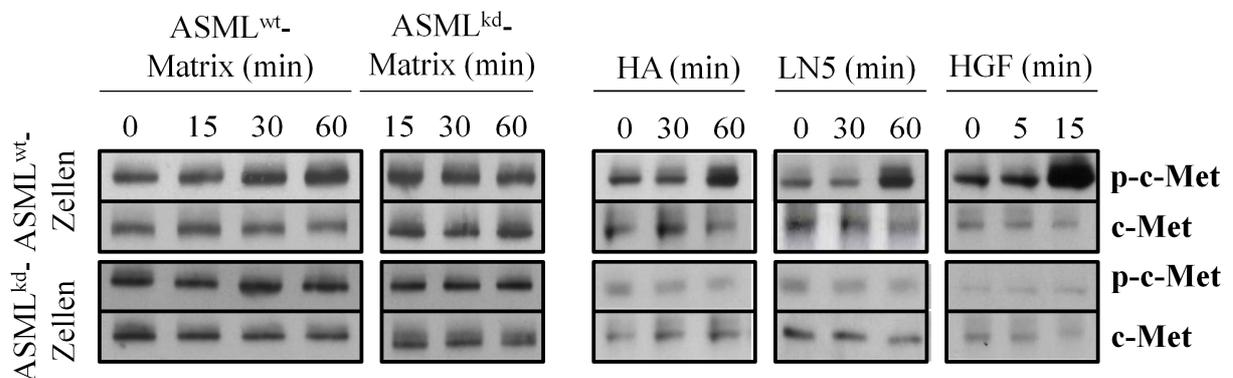


Abbildung 3.6.1:

ASML^{wt}-Matrix, HA, HGF und LN5 aktivieren c-Met. ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden mit der ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Matrix, HA [10µg/ml], LN5 [2µg/ml] und HGF [5ng/ml] stimuliert, in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10 %igem Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet und mit den spezifischen Antikörpern gegen p-c-Met und c-Met, sowie einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert.

3.6.2 Stimulation mit HA führt zur Assoziation und Aktivierung von ERM.

Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) gehören zu einer Familie von Proteinen, die nach Aktivierung das Zytoskelett mit der Plasmamembran verbinden. Hierbei kommt es zur Vernetzung der Aktinfilamente mit der Plasmamembran. Der C-Terminus dieser ERM-Proteine bindet nach Aktivierung durch Phosphoinoside an Aktinfilamente, wohingegen der N-Terminus über CD44 als Bindungspartner mit der Plasmamembran verbunden ist und zur Veränderung in der Zellbewegung kommt (Tsukita et al., 1997).

ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden mit HA stimuliert und sowohl die Aktivierung als auch eine mögliche Assoziation von CD44 mit ERM-Proteinen bestimmt. Hierzu wurden ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen für 15 bzw. 30 Minuten mit HA stimuliert und die Aktivität von ERM-Proteinen mittels SDS-PAGE und WB bzw. ihre Assoziation über Immunpräzipitation bestimmt. Nach Stimulation mit HA konnte in ASML^{wt}-, nicht aber mit ASML^{kd}-Zellen, eine Assoziation von CD44v6 mit Ezrin und Moesin und eine Aktivierung am Beispiel von Ezrin gezeigt werden. Keine Aktivierung und nur eine schwache Assoziation von Ezrin mit CD44s (Ox50) wurde nach Stimulation mit HA beobachtet, was die Notwendigkeit einer Beteiligung von CD44v6 zeigte (Abb. 3.6.2).

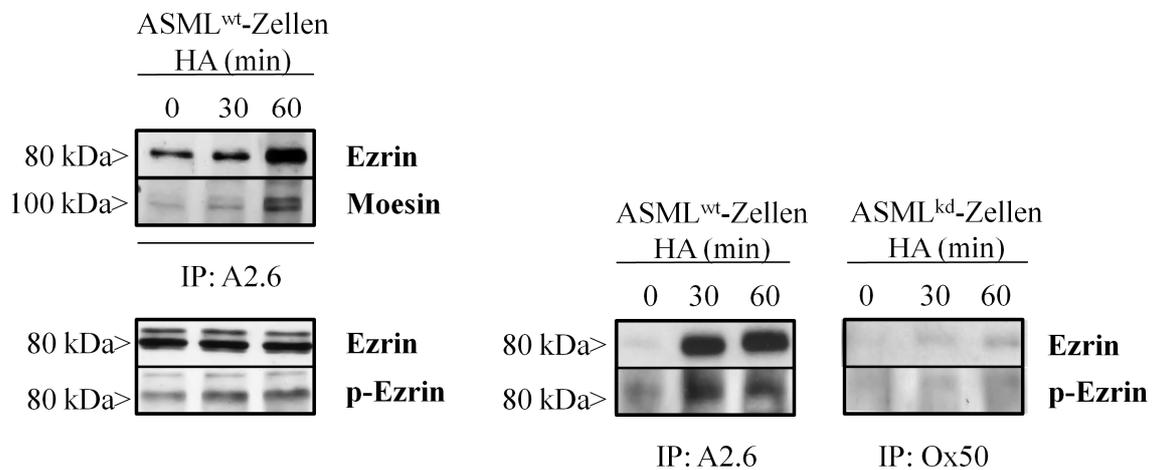


Abbildung 3.6.2:

Assoziierte und aktivierte ERM-Proteine nach Stimulation mit HA. ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden mit HA [10µg/ml] stimuliert, in 1% Lubrol lysiert. Die Immunkomplexe wurden mit anti-CD44v6 (A2.6) bzw. anti-panCD44 (Ox50) präzipitiert und in einem 10 %igem Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern gegen Ezrin und Moesin, sowie einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Die Lysate wurden in einem 10 %igem Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern gegen p-Ezrin und Ezrin, sowie einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert.

3.6.3 Stimulation mit HA führt zur Assoziation und Aktivierung von Src und FAK.

Nach Stimulation mit HA in ASML^{wt}-Zellen konnten zwei weitere phosphorylierte Proteine mit einer molekularen Masse von 55 und 125kDa detektiert werden (Abb. 3.6.3.1A). Hierzu wurden ASML^{wt}-Zellen für 30 bzw. 60 Minuten mit HA stimuliert, lysiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und mittels WB und mit anti-p-Tyrosin detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion mit anti-Aktin. Es handelt sich um zwei PTKs. Das 125kDa Protein wurde als FAK („focal adhesion kinase“) und das 55kDa Protein als Src identifiziert, welches sich nach Antikörper-Stimulation mit CD44 präzipitieren ließ (Abb. 3.6.3.1B). Die Aktivierung der Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) Src beeinflusst die Migration von Tumorzellen (Bourguignon et al., 2001).

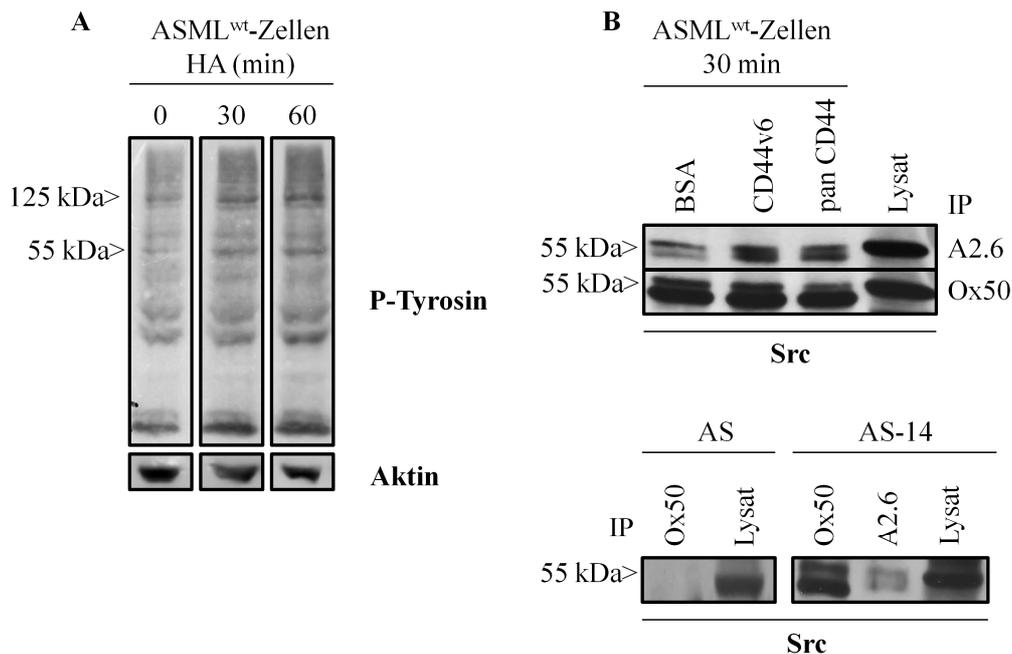


Abbildung 3.6.3.1:

Aktivierung zweier Proteine mit der Masse 125 und 55 kDa und Assoziation von Src mit CD44v6. (A) ASML^{wt}-Zellen wurden mit HA [10µg/ml] stimuliert, in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10 %igem Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit dem spezifischen Antikörper gegen p-Tyrosin sowie einem HRP-markiertem Sekundäntikörper detektiert. (B) ASML^{wt}-Zellen wurden mit anti-panCD44 oder anti-CD44v6 stimuliert, in 1% Lubrol lysiert und mit anti-CD44v6 (A2.6) und anti-panCD44 (Ox50) präzipitiert. Die Immunkomplexe wurden in einem 10 %igem Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit dem spezifischen Antikörper gegen Src sowie einem HRP-markiertem Sekundäntikörper detektiert. Als Kontrolle wurden AS- und AS-14-Zellen mit in 1% Lubrol lysiert und mit anti-CD44v6 (A2.6) und anti-panCD44 (Ox50) präzipitiert.

In AS-14- ($CD44s^+$, $CD44v4-v7^+$), nicht aber in AS-Zellen ($CD44s^+$, $CD44v^-$) konnte eine Interaktion von CD44s mit Src beobachtet werden (Abb. 3.6.3.1). Nach Stimulation mit HA konnte keine Zunahme an assoziiertem Src beobachtet werden, wenngleich eine signifikante Zunahme der Aktivität von Src und FAK nach Stimulation mit HA zu bemerken war. Eine Phosphorylierung und damit eine Aktivierung von Src und FAK nach Stimulation mit HA konnten nur in $ASML^{wt}$ -Zellen, nicht aber in $ASML^{kd}$ -Zellen, beobachtet werden (Abb. 3.6.3.2). Diese Unterschiede weisen auf die Notwendigkeit von CD44v6 hin.

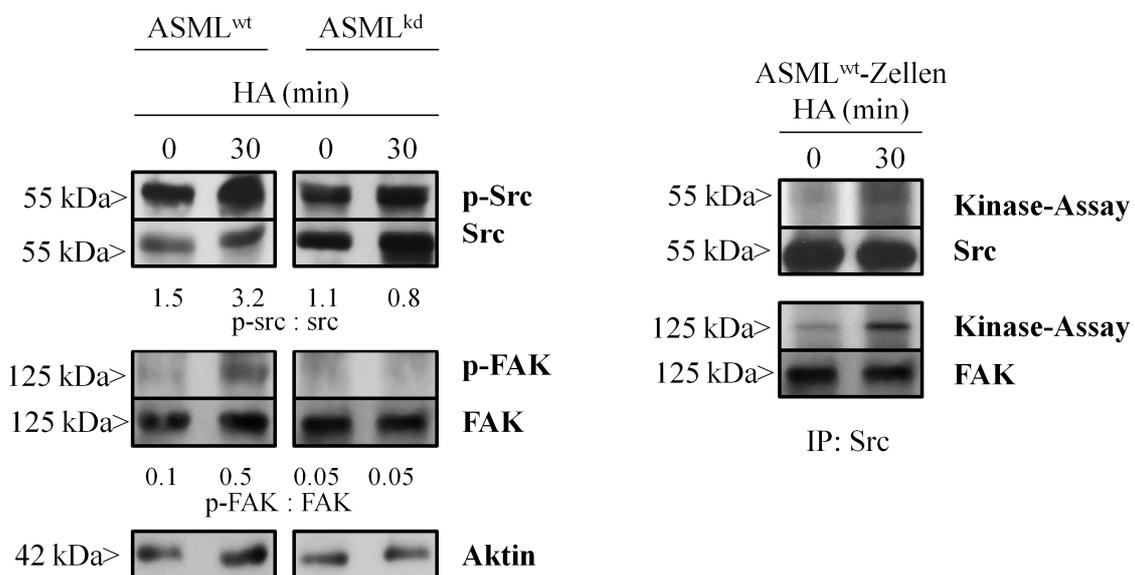


Abbildung 3.6.3.2:

Aktivierung der PTK Src und FAK und Assoziation von FAK mit Src. $ASML^{wt}$ - und $ASML^{kd}$ -Zellen wurden mit HA [10 μ g/ml] stimuliert, in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10 %igem Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit dem spezifischen Antikörpern gegen p-Src, Src sowie p-FAK und FAK und einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert (links). $ASML^{wt}$ -Zellen wurden mit HA [10 μ g/ml] stimuliert, in 1% Lubrol lysiert und mit anti-Src präzipitiert, die Präzipitate wurden mit 10 μ Ci-[³²P] γ -ATP markiert und in einem 10 %igem Gel aufgetrennt und mittels Radiographie detektiert oder auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit spezifischen Antikörpern gegen Src und FAK sowie einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert (rechts).

Immunfluoreszenzuntersuchungen an $ASML^{wt}$ - und $ASML^{kd}$ -Zellen nach Stimulation mit $ASML^{wt}$ -Matrix, HA und LN5 bestätigten die Interaktion von CD44v6 mit $\alpha 6\beta 4$ (Abb. 3.6.3.3), FAK, Ezrin und gebündelten Aktin, nicht aber nach Interaktion mit der $ASML^{kd}$ -Matrix (Abb. 3.6.3.4).

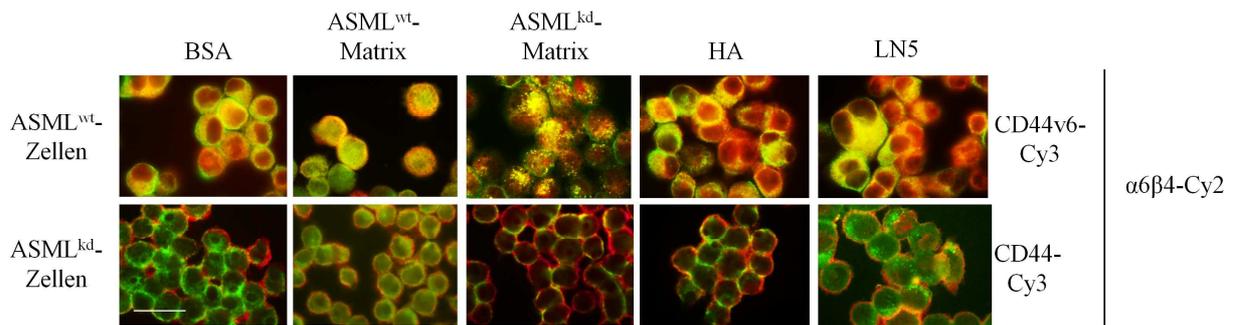


Abbildung 3.6.3.3: **Kolokalisation von CD44v6 mit $\alpha 6\beta 4$ in ASML^{wt}-Zellen.** ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-well-Platten, die mit BSA, HA, LN5, der ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Matrix markiert waren, ausgesät. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit anti-CD44v6-Cy3 oder anti-CD44-Cy3 sowie mit anti- $\alpha 6\beta 4$ -Cy2 gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Überlagerung der Einzelfärbungen sind dargestellt. Eine Kolokalisation wird durch eine Gelbfärbung bei Überlagerung der beiden Einzelfärbungen angezeigt. Maßstab 50 μm .

Die Stimulation mit HA, LN5 oder der ASML^{wt}-Matrix beeinflusste kaum die Kolokalisation von CD44 mit $\alpha 6\beta 4$, FAK, Ezrin oder von Aktinbündeln in ASML^{kd}-Zellen. Diese Beobachtungen wurden ebenfalls an den Pankreastumorlinien Capan2 und 8.18 bestätigt. CD44v6 interagiert mit $\alpha 6\beta 4$, Ezrin, c-Met und am stärksten mit FAK und Aktinbündeln in Capan2-Zellen. In 8.18-Zellen konnte nach Stimulation mit HA und LN5 eine Interaktion von CD44v6 mit $\alpha 6\beta 4$ und FAK beobachtet werden, wohingegen eine Kolokalisation von CD44v6 mit Aktinbündeln in 8.18-Zellen eher schwach war (Abb. 3.6.3.5).

CD44v6 übt einen signifikanten Einfluss auf die Organisation einer löslichen Tumormatrix aus. Nur die ASML^{wt}-Matrix unterstützt die Migration CD44v6-positiver Zellen. Durch die Interaktion von CD44v6 mit $\alpha 6\beta 4$ und c-Met in der Zellmembran kam es zur Weiterleitung von Signalen, welche vorzugsweise über CD44v6 und nicht über CD44s abliefen. Die Stimulation von $\alpha 6\beta 4$ und c-Met in ASML^{kd}-Zellen zeigte keine Reaktion, was wiederum die Notwendigkeit einer Interaktion mit CD44v6 belegte.

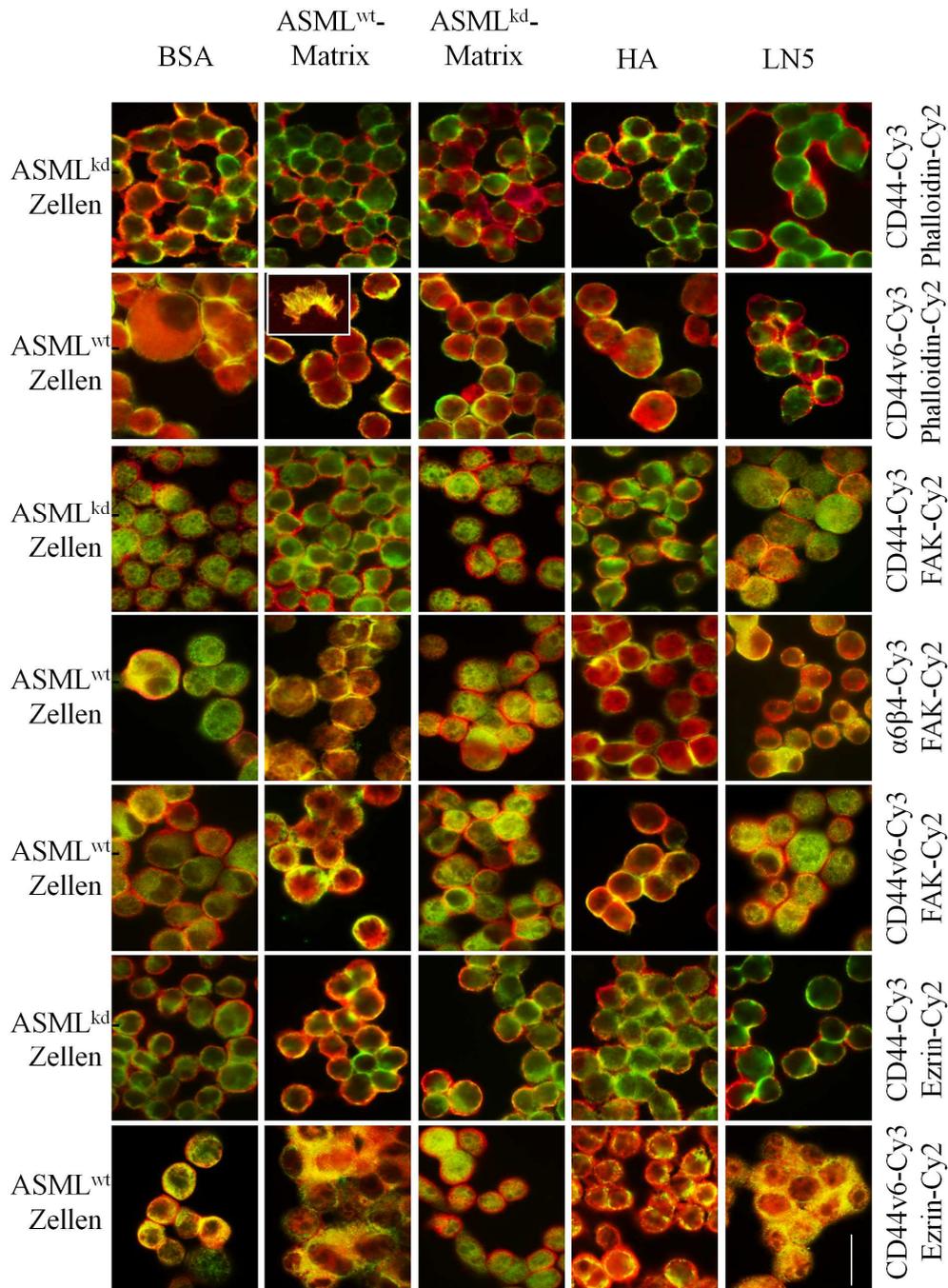


Abbildung 3.6.3.4:

Kolokalisation von CD44v6 mit Ezrin, FAK und Phalloidin in ASML^{wt}-Zellen. ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-well-Platten, die mit BSA, HA, LN5, der ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Matrix markiert waren, ausgesät. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit entsprechenden Primär- und Sekundär-Antikörpern gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Überlagerung der Einzelfärbungen ist dargestellt. Eine Kolokalisation wird durch eine Gelbfärbung bei Überlagerung der beiden Einzelfärbungen angezeigt. Ausschnitt: Membranfragmente wurden nur bei ASML^{wt}-Zellen, die auf die ASML^{wt}-Matrix ausgesät wurden, gesehen. Maßstab 50 μ m.

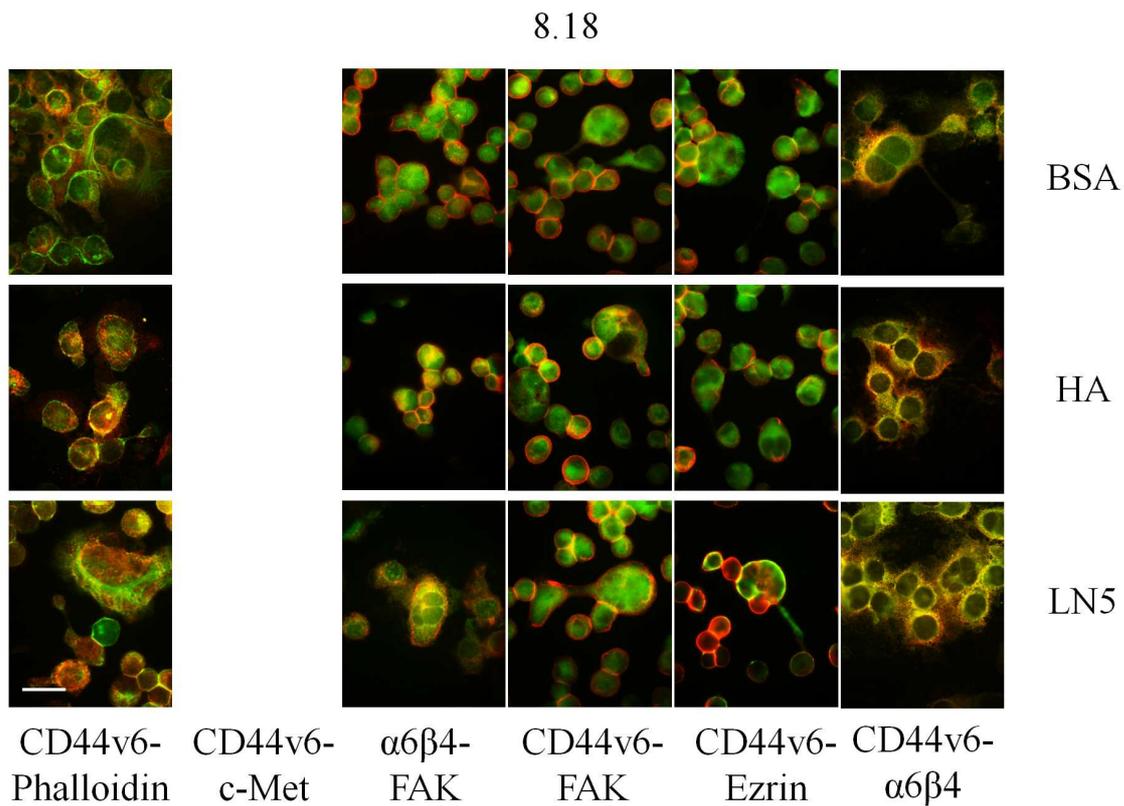
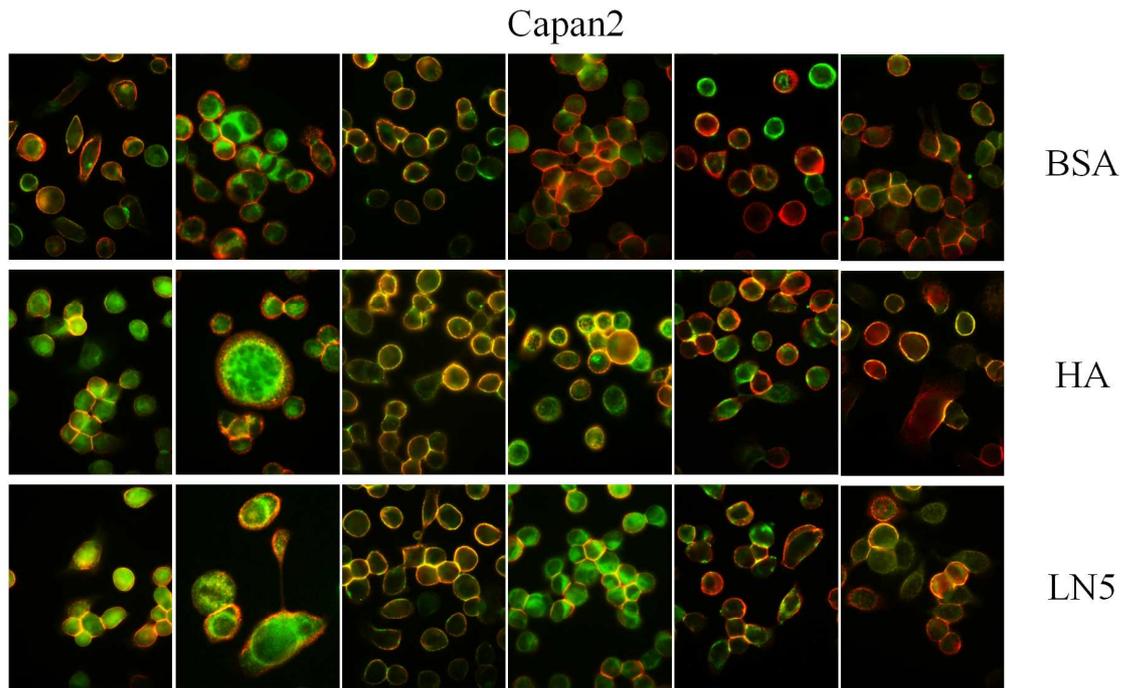


Abbildung 3.6.3.5:

Kolokalisation von CD44v6 mit Ezrin, FAK und c-Met in Capan2- und 8.18-Zellen. Capan2- und 8.18-Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-well-Platten, die mit BSA, HA, LN5 markiert waren, ausgesät. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit entsprechenden Primär- und Sekundär-Antikörpern gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Überlagerung der Einzelfärbungen sind dargestellt. Eine Kolokalisation wird durch eine Gelbfärbung bei Überlagerung der beiden Einzelfärbungen angezeigt. Maßstab 50 μ m.

3.7 Die ASML^{wt}-Matrix unterstützt das Überleben von ASML-Zellen.

Neben der Migration ist die Apoptoseresistenz ein wesentliches Merkmal metastasierender Tumorzellen. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass ASML^{wt}-Zellen gegenüber strahlungs- und Cis-Platin-induzierter Apoptose resistenter als ASML^{kd}-Zellen sind (Klingbeil et al., 2009). Um dies zu bestätigen und um herauszufinden in wie weit die ASML^{wt}-Matrix zum Apoptoseschutz von ASML-Zellen beiträgt, wurden ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen mit der ASML^{wt}- bzw. mit der ASML^{kd}-Matrix und in Gegenwart titrierter Menge an Cis-Platin kultiviert. Apoptotische Zellen wurden nach 48 Stunden durch AnnexinV/PI-Färbung, die Vitalität mittels MTT-Assay und die proliferative Aktivität mit Hilfe des ³H-Thymidin-Einbaus analysiert.

Die starke Apoptoseresistenz von ASML^{wt}-Zellen konnte durch Stimulation mit der ASML^{wt}-Matrix weiter erhöht werden, wohingegen die ASML^{kd}-Matrix keinen Einfluss auf die Apoptoseresistenz hatte. Das Überleben von ASML^{kd}-Zellen konnte nicht durch ihre eigene Matrix und nur schwach durch die ASML^{wt}-Matrix gesteigert werden (Abb. 3.7.1). Um zu untersuchen, ob auch die Apoptoseresistenz durch ein Zusammenspiel von CD44v6 mit $\alpha 6\beta 4$ und c-Met unterstützt wird, wurden transiente knockdown-Linien mittels siRNA generiert. Das Expressionslevel von c-Met und $\alpha 6\beta 4$ wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem WB überprüft (Abb. 3.7.1). Das Überleben der transienten c-Met-ASML^{wt}- und der c-Met-ASML^{kd}-Zelllinie wurde dadurch stark beeinflusst. Auch ohne Behandlung von Cis-Platin starben die Hälfte der c-Met-ASML^{wt}- und mehr als die Hälfte der c-Met-ASML^{kd}-Zellen. Weder mit noch ohne Cis-Platin konnte die ASML^{wt}-Matrix dem schützend entgegenwirken. Die Apoptoseresistenz von ASML-Zellen wurde durch den transienten knockdown von $\beta 4$ nicht beeinträchtigt. Der protektive Einfluss der ASML^{wt}-Matrix auf die $\beta 4$ -ASML^{wt}-Zellen war schwach (Abb. 3.7.1).

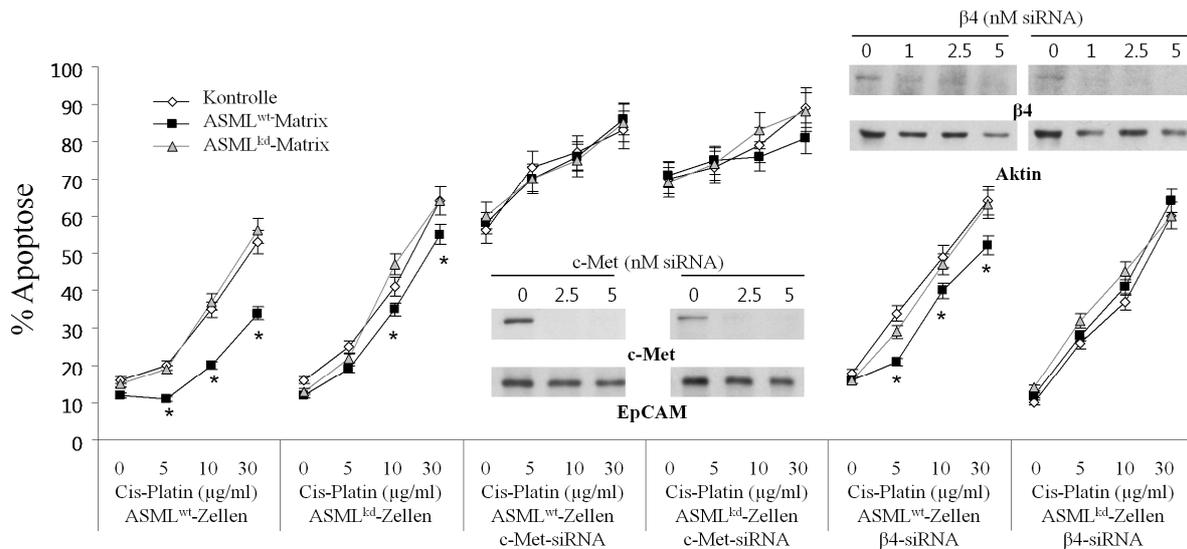


Abbildung 3.7.1:

Die ASML^{wt}-Matrix unterstützt die Apoptoseresistenz von ASML-Zellen. ASML^{wt}-, ASML^{kd}-, c-Met-ASML^{wt}-, c-Met-ASML^{kd}-, β4-ASML^{wt}- und β4-ASML^{kd}-Zellen wurden auf die ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Matrix ausgesät und mit titrierten Mengen an Cis-Platin für 48h bei 37°C behandelt. Gezeigt werden Mittelwerte ± STAB aus Triplikaten von apoptotischen Zellen. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Matrix sind mit * gekennzeichnet. Einlage: ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden mit siRNA (c-Met, β4) behandelt, in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10 %igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit spezifischen Antikörpern gegen c-Met und β4 sowie einem HRP-markiertem Sekundäntikörper detektiert. Als Kontrolle dienten EpCAM und Aktin.

Die ASML^{wt}-Matrix und HGF zeigten beide protektive Eigenschaften in Bezug auf die Vitalität von ASML^{wt}- und nur schwach von ASML^{kd}-Zellen, wohingegen HA und LN5 nur schwach protektiv auf ASML^{wt}-Zellen wirkten, jedoch bei hoher Cis-Platin-Konzentration ein signifikantes Maß an Protektion erreichte. Diese Ergebnisse bestätigten, dass CD44v6 auch im Bezug auf Apoptoseresistenz eine zentrale Rolle im Zusammenspiel mit α6β4 und c-Met spielt (Abb. 3.7.2).

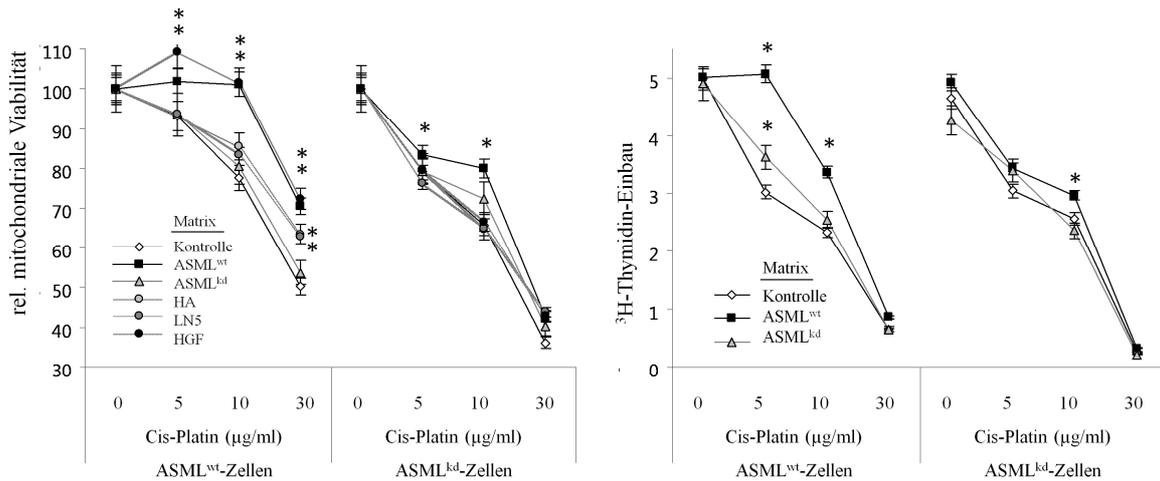


Abbildung 3.7.2: Die ASML^{wt}-Matrix unterstützt die Vitalität und Proliferation von ASML-Zellen. ASML^{wt}-, und ASML^{kd}-Zellen wurden auf BSA, HA, LN5, HGF und die ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Matrix ausgesät und mit titrierten Mengen an Cis-Platin für 48h bei 37°C behandelt. Gezeigt werden Mittelwerte ± STAB aus Triplikaten von vitalen Zellen (links) und die Proliferation (rechts). Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Matrix sind mit * gekennzeichnet.

Auch die Matrix der humanen Pankreastumorlinie Capan2 zeigte protektive Eigenschaften gegenüber 7,5 µg/ml Cis-Platin auf den Capan2-Zellen. 8.18-Zellen (CD44v6⁺) wurden ebenfalls durch die Capan2-Matrix vor Apoptose geschützt, wohingegen die Matrix von 8.18- und Pt45P1-Zellen keinen Einfluss auf das Überleben der drei Zelllinien hatte (Abb. 3.7.3).

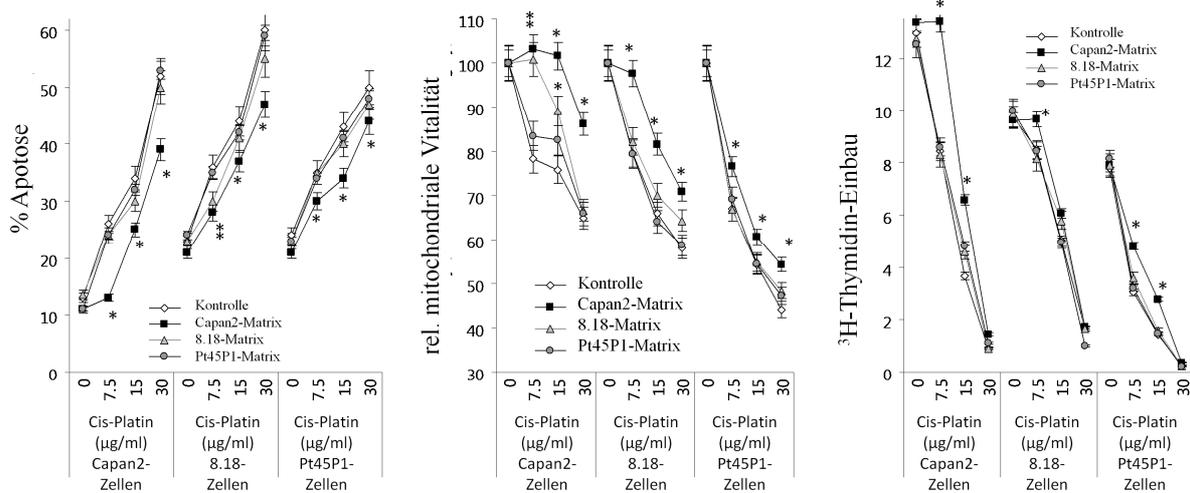


Abbildung 3.7.3: Die Capan2-Matrix unterstützt die Apoptoseresistenz. Capan2-, 8.18- und Pt45P1-Zellen wurden auf die Capan2-, 8.18- und die Pt45P1-Matrix ausgesät und mit titrierten Mengen an Cis-Platin für 48h bei 37°C behandelt. Gezeigt werden Mittelwerte ± STAB aus Triplikaten von apoptotischen Zellen (links), vitalen Zellen (Mitte) und die Proliferation (rechts). Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Matrix sind mit * gekennzeichnet.

CD44v6 Expression schützte Tumorzellen vor Apoptose, der Effekt wurde durch den Membrankomplex aus CD44v6, c-Met und $\alpha 6\beta 4$ verstärkt. Die hohe Apoptoserate transienter c-Met^{kd}-ASML-Zellen zeigt, dass auch c-Met eine zentrale Rolle am Überleben zukommt. Die ASML^{wt}-Matrix konnte zum Teil $\beta 4^{\text{kd}}$ -ASML^{wt}-Zellen vor Apoptose schützen nicht aber $\beta 4^{\text{kd}}$ -ASML^{kd}-Zellen. Dies wiederum belegt, dass auch bei der Apoptoseresistenz neben den individuellen Komponenten auch in dem Zusammenspiel von CD44v6 mit c-Met und $\alpha 6\beta 4$ eine wesentliche Rolle zukommt.

3.8 Aktivierung anti-apoptotischer Moleküle durch HA, HGF und LN5.

Eine Resistenz gegenüber Apoptose kann durch eine Vielzahl von Proteinen gesteuert werden wie z.B. über MDR-Gene. ASML-Zellen exprimieren diese Gene nicht und es gab auch keine Anzeichen für Rezeptor-vermittelte Apoptose (Klingbeil, 2007). Dies wurde über den Nachweis der Caspase-8 Aktivität in Cis-Platin-behandelten ASML-Zellen nochmals bestätigt. Die Aktivierung der Caspase-9 und eine damit verbundene Aktivierung der Caspase-3 wurden stärker in ASML^{kd}-, als in ASML^{wt}-Zellen beobachtet. Es konnte allerdings kein protektiver Effekt durch Stimulation mit HA, HGF oder LN5 nach 48 Stunden Cis-Platinbehandlung beobachtet werden (Abb. 3.8.1).

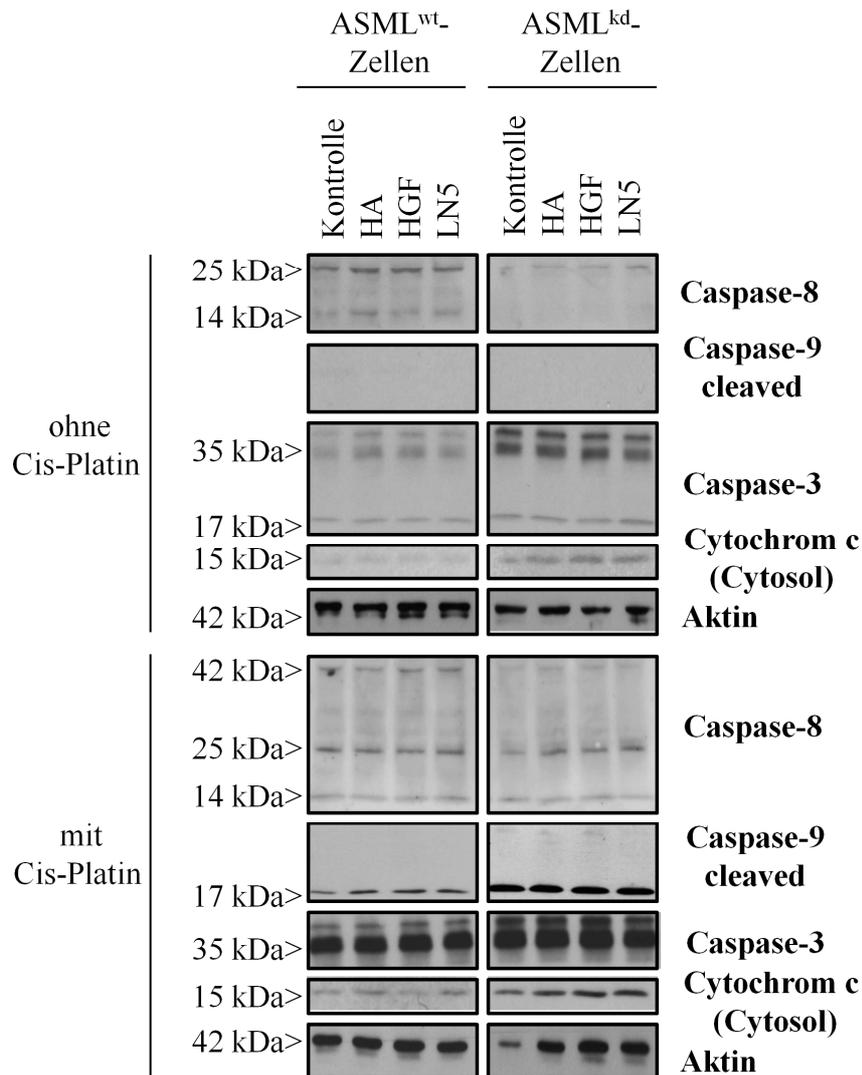


Abbildung 3.8.1:

Stimulation mit HA, HGF und LN5 bewirkt eine Aktivierung von Caspase-9 und -3. ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden mit HA, HGF und LN5 stimuliert und mit 30 µg/ml Cis-Platin für 48h bei 37°C behandelt. Die Zellen wurden in 1% Triton-X-100 lysiert sowie die zytosolische Fraktion isoliert und in einem 10 %igem Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern und einem HRP-markiertem Sekundäntikörper detektiert. Als Kontrolle diente Aktin.

Dagegen wurde nach Stimulation mit HA, HGF und LN5 eine Phosphorylierung und somit eine Inaktivierung von BAD beobachtet. In Folge dessen es zu einer starken Hochregulierung von Bcl-Xl und einer schwachen Hochregulierung von Bcl-2 in ASML^{wt}-Zellen nach Stimulation mit HA, HGF und LN5 kam (Abb. 3.8.2). In Gegenwart von Cis-Platin kam es in ASML^{kd}-Zellen vermehrt zur Ausschüttung von Cytochrom C ins Cytosol (Abb. 3.8.1) und Bcl-Xl konnte nur in ASML^{wt}-Zellen nach Stimulation durch HA, HGF und LN5 detektiert werden.

Dies bedeutet, dass die Stimulation durch HA, HGF und LN5 nur in ASML^{wt}-Zellen eine Aktivierung von anti-apoptotischen Molekülen in Gang setzten. Damit stellt sich die Frage welche Moleküle für die entsprechende Signalweitergabe verantwortlich sind.

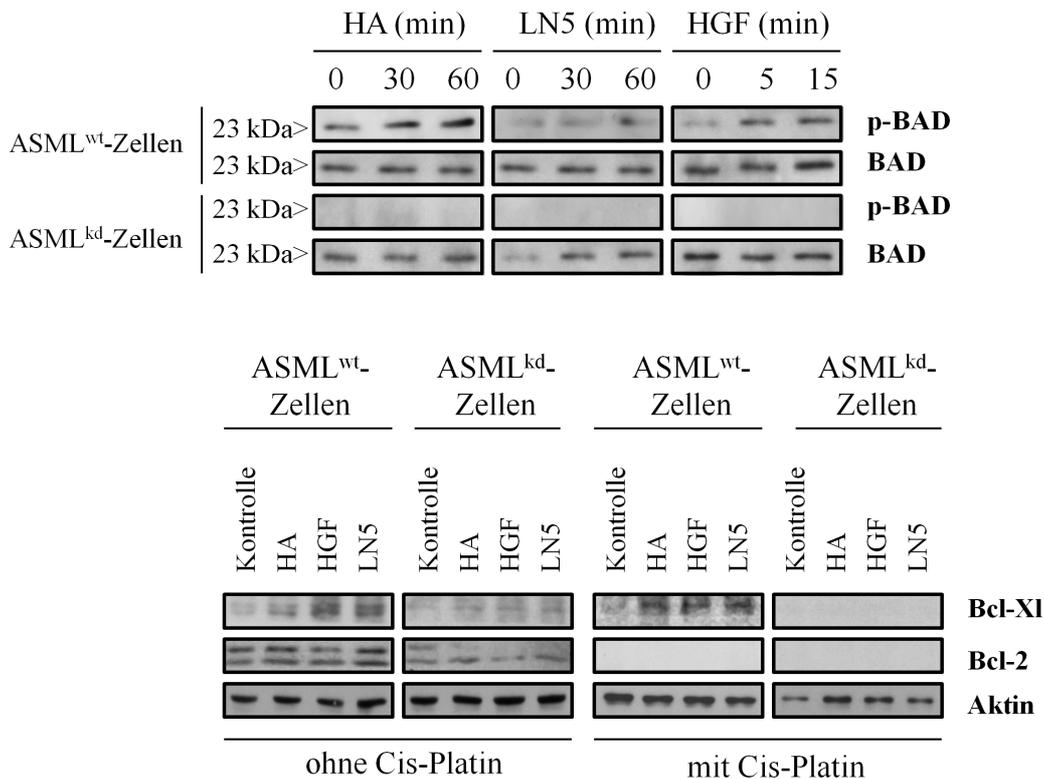


Abbildung 3.8.2:

Stimulation mit HA, HGF und LN5 inaktiviert BAD. ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden mit HA, HGF und LN5 stimuliert und mit 30µg/ml Cis-Platin für 48h bei 37°C behandelt. Die Zellen wurden in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10 %igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit dem spezifischen Antikörpern und einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Als Kontrolle diente Aktin.

Phosphoryliertes, aktiviertes c-Met assoziiert direkt mit Src, STAT3 und PKC und über Gab1 mit einer Vielzahl von Molekülen und Signalwegen. Es konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit HA, HGF und LN5 in ASML^{wt}-Zellen die Moleküle Src und STAT3 am stärksten über HGF stimuliert wurden. Die Phosphorylierung von PKC konnte mit allen drei Stimuli in Gang gesetzt werden, wenn gleich nur in ASML^{wt}-Zellen. Weiterhin unterstützt die Aktivierung mittels HA, HGF und LN5 die Interaktion von c-Met mit Gab1. Dieser Effekt war in ASML^{wt}-Zellen stärker als in ASML^{kd}-Zellen (Abb. 3.8.3).

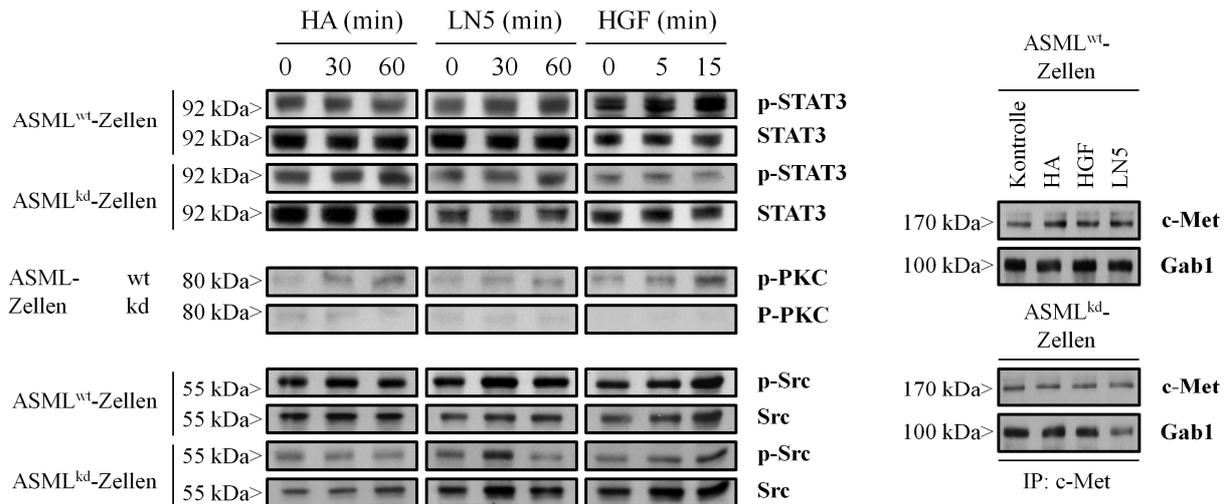


Abbildung 3.8.3:

Stimulation mit HA, HGF und LN5 aktiviert STAT3, PKC und Src sowie eine Interaktion von c-Met mit Gab1. ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden mit HA, HGF und LN5 stimuliert. Die Zellen wurden in 1% Triton-X-100 (für die IP in 1 % Lubrol) lysiert und in einem 10 %igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit spezifischen Antikörpern und einem HRP-markiertem Sekundäntikörper detektiert. Für die IP wurden die Lysate mit anti-c-Met präzipitiert und in einem 10 %igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern und einem HRP-markiertem Sekundäntikörper detektiert.

Die Apoptose-Resistenz von ASML^{wt}-Zellen beruht auf der Aktivierung anti-apoptotischer Moleküle. Ähnlich wie bei der ASML^{wt}-Matrix unterstützten Migration, weisen diese Daten daraufhin, dass CD44v6 für die Aktivierung anti-apoptotischer Moleküle benötigt wird, unabhängig davon ob die Aktivierung über CD44v6, c-Met oder $\alpha 6\beta 4$ gestartet wird.

3.9 Der Apoptoseschutz von ASML-Zellen wird über PI3K/Akt- und den MAPK-Signalweg initiiert.

Überleben kann direkt über die Aktivierung des PI3K/Akt-, aber auch über den Ras-Raf-MAPK-Signalweg laufen. Nach Stimulation mit HA, HGF und LN5 konnte eine Aktivierung von Akt und mTOR in ASML^{wt}- nicht aber in ASML^{kd}-Zellen beobachtet werden. Desweiteren konnte eine größere Menge an aktivierter PI3K nach Stimulation mit HA und HGF präzipitiert werden. In ASML^{wt}-Zellen, nicht aber in ASML^{kd}-Zellen wurde eine Interaktion der PI3K mit $\alpha 6\beta 4$ nachgewiesen.

Ähnlich zu der Aktivierung des PI3K-Signalweges, kam es nach Ligandenbindung an CD44v6, c-Met und $\alpha 6\beta 4$, zu einer Stimulation von Ras, c-Raf und der ERK 1,2 Proteine (Abb. 3.9.1).

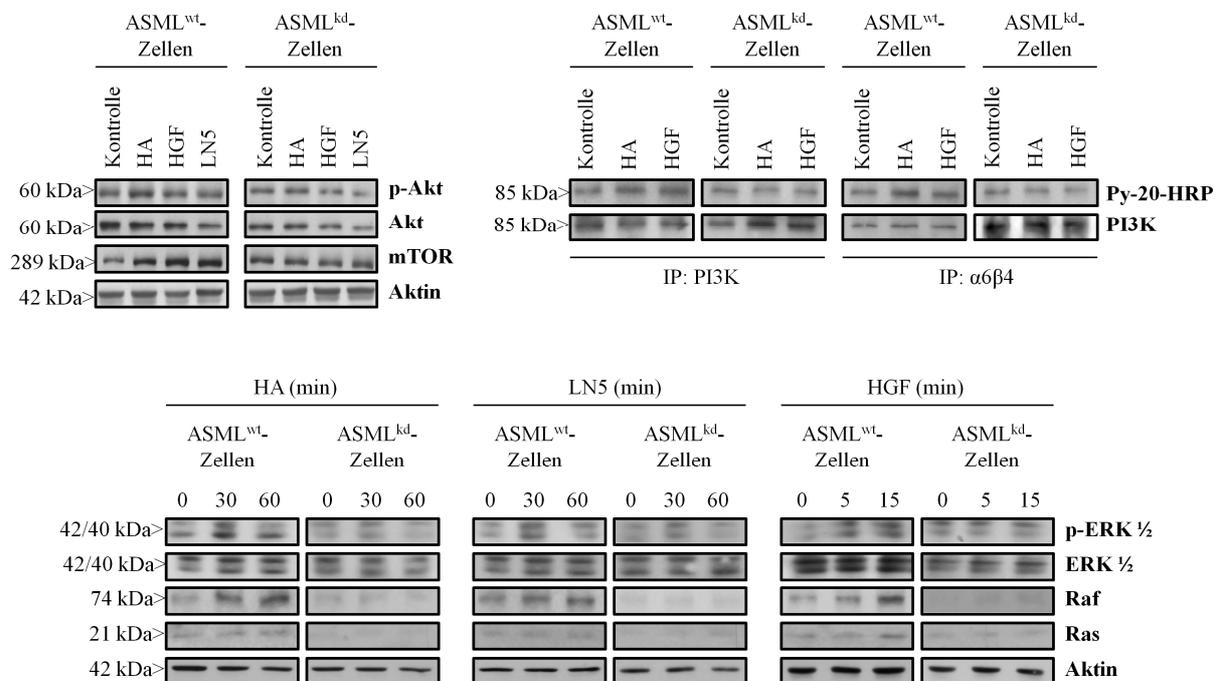


Abbildung 3.9.1:

Stimulation mit HA, HGF und LN5 aktiviert den PI3K/Akt- und den MAPK-Signalweg. ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden mit HA, HGF und LN5 stimuliert. Die Zellen wurden in 1% Triton-X-100 (für die IP in 1% Lubrol) lysiert und in einem 10%igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. Für die IP wurden die Lysate mit anti-PI3K oder anti- $\alpha 6\beta 4$ (B5.5) präzipitiert und in einem 10%igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert.

Im nächsten Schritt wurden ASML^{wt}-si-c-Met-Zellen und ASML^{wt}-si- $\beta 4$ -Zellen mit HA, HGF und LN5 stimuliert. Die Aktivierung führte zu keiner erkennbaren Hochregulation der Proteine Akt, ERK und mTOR sowohl in ASML^{wt}-si-c-Met-Zellen, als auch in ASML^{wt}-si- $\beta 4$ -Zellen (Abb. 3.9.2).

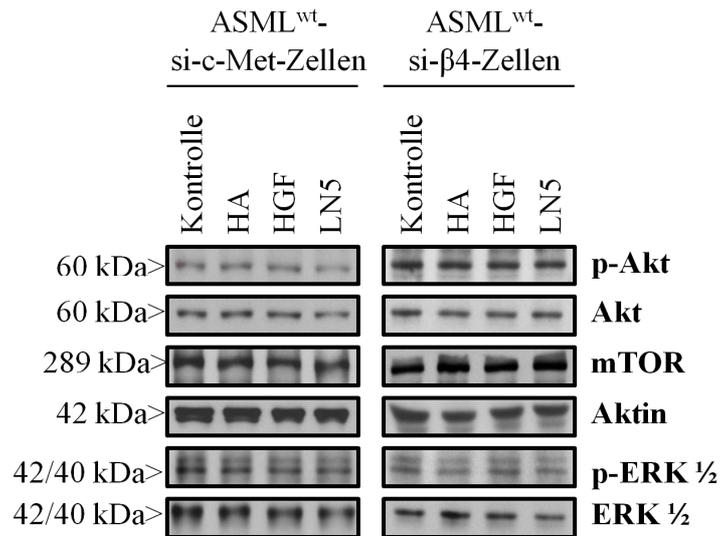


Abbildung 3.9.2:

Fehlen von $\alpha 6\beta 4$ und c-Met blockt die Aktivierung des PI3K/Akt- und des MAPK-Signalweg. ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen wurden mit siRNA (c-Met, $\beta 4$) behandelt und mit HA, HGF und LN5 stimuliert. Die Zellen wurden in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10%igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation von ASML^{wt}-Zellen mit HGF und unter Zugabe von 5 μ M des c-Met-Inhibitors SU11224 eine Verminderung der Aktivierung von c-Met und ERK zu beobachten war. Stattdessen wurde eine Aktivitätsabnahme von Akt teilweise erst mit 100 μ M c-Met-Inhibitor SU11224 erreicht. 10 μ M des c-Met-Inhibitors SU11224 zeigte keinen Effekt auf die Akt Phosphorylierung. Ähnliche Aussage ließen sich nach Stimulation von HA an ASML^{wt}-Zellen während der c-Met Inhibierung machen. Auch hier war eine Abnahme der Phosphorylierung von c-Met und ERK zu beobachten, aber nur teilweise von Akt (Abb. 3.9.3A).

Sowohl durch die Aktivierung des PI3K/Akt-, als auch durch den MAPK-Signalweg, kam es zu HA, HGF und LN5 stimulierter Apoptose-Resistenz und zur Aktivierung CD44v6-abhängiger anti-apoptotischen Signalmolekülen. Die CD44v6-vermittelte Signalweitergabe wurde durch die Assoziation mit $\alpha 6\beta 4$ verstärkt und benötigte essentiell die Hilfe von c-Met. Weiterhin wurde der grenzwertige Effekt der c-Met Inhibierung auf die Akt Phosphorylierung dadurch bekräftigt, dass zwar die Stimulierung durch HA, HGF und LN5 zur Aktivierung des PI3K/Akt- und MAPK-Signalweges führte, die beiden Signalwege aber nicht verbunden sind.

Um diesen Befund weiter zu untersuchen, wurden ASML^{wt}-Zellen mit HA und HGF stimuliert und in Gegenwart des PI3K-Inhibitors Ly294002 und des Raf Inhibitors GW5074 auf die unabhängige Aktivierung des PI3K/Akt- und des MAPK-Signalweges überprüft. Obwohl die Inhibierung von Akt deutlicher in HA, als in HGF stimulierten ASML^{wt}-Zellen zu beobachten war, genügten schon 50µM des PI3K Inhibitors Ly294002, um eine Aktivierung von Akt zu verhindern. Im Gegensatz konnte durch Ly 294002 nur eine teilweise Inhibierung von c-Met und ERK erzielt werden (Abb. 3.9.3B). Der Raf Inhibitor GW5074 unterdrückte bereits bei einer Dosis von 1,0µM c-Raf Expression und ERK Phosphorylierung. Die Aktivierung von Akt war nicht beeinträchtigt (Abb. 3.9.3C).

Die Aktivierung beider Signalwege, sowohl des PI3K/Akt, als auch des Ras-Raf-MAPK Pathways spielten eine Rolle beim Überleben von ASML^{wt}-Zellen und waren nicht miteinander verbunden. Die Aktivierung beider Signalwege verläuft teilweise über CD44v6, dass das Zusammenspiel mit $\alpha 6\beta 4$ und c-Met verstärkt.

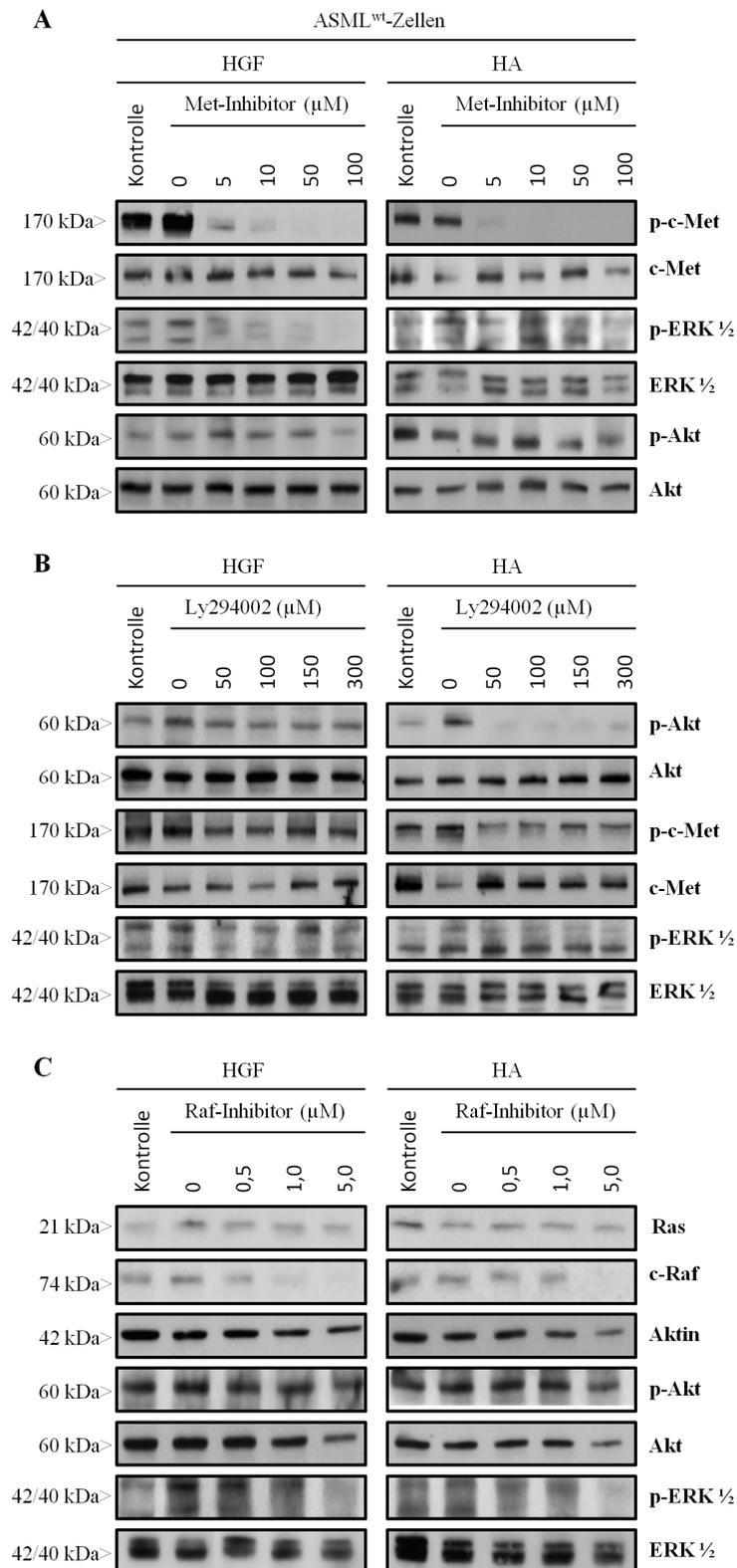


Abbildung 3.9.3:

Einfluss des c-Met-Inhibitors (SU11224), des PI3K-Inhibitors (Ly294002) und des c-Raf-Inhibitors (GW5074) auf die Aktivierung des PI3K/Akt- und des MAPK-Signalweg. ASML^{wt}-Zellen wurden mit HA oder HGF in Gegenwart der Inhibitoren stimuliert. Die Zellen wurden in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10 %igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert.

4. Diskussion

CD44 variante Isoformen (CD44v) können wesentlich zu lymphogener Metastasierung beitragen. Für meine Arbeit benutze ich stabile CD44v knockdown Klone der metastasierenden Tumorzelle BSp73ASML. Der Verlust der Expression varianter CD44 Isoformen geht mit einem Verlust der Metastasierungsfähigkeit einher, und ist durch einen signifikanten Verlust der Apoptoseresistenz gekennzeichnet. Weiterhin ist bekannt, dass die Bildung von Metastasen durch die Etablierung einer prämetastatischen Nische unterstützt werden kann (Bissell und Labarge, 2005, Yilmaz et al., 2007, Bidard et al., 2008). Ob einzelne Faktoren, welche von der Tumorzelle abgegeben werden, ausreichen um die Ausbildung einer prämetastatischen Nische einzuleiten, war ein weiterer Aspekt meiner Arbeit. Wir haben die Arbeitshypothese aufgestellt, dass CD44v-Isoformen Faktoren freisetzen, die an der Bereitstellung einer prämetastatischen Nische beteiligt sind. Ich zeigte, dass Tumorzellen in Abhängigkeit von CD44v6 eine Matrix bereitstellen, die zusammen mit Exosomen die Metastasierung erleichtern kann. Desweiteren wirkt diese Matrix auf die Tumorzelle zurück, so dass die Tumorzelle über ein gesteigertes Migrationspotential und erhöhte Apoptoseresistenz verfügt. Mögliche Ursachen dieser Beobachtungen und speziell die Rolle von CD44v6 bei diesen Prozessen möchte ich kurz diskutieren.

4.1 Unterschiedliche Proteinexpression von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Lysaten, löslicher Fraktion und Exosomen.

4.1.1 ASML^{wt}-IF vs. ASML^{kd}-IF

In früheren Untersuchungen wurde in unserem Labor gezeigt, dass die ASML^{wt}-IF eine adhäsive Subfraktion beinhaltet, welche vornehmlich Matrixproteine enthält die auch in der entsprechenden ASML^{kd}-Fraktion nachgewiesen wurden. Die entsprechende ASML^{kd}-Fraktion ist aber nicht adhäsiv (Klingbeil et al., 2009). Aufgrund dieser Beobachtung erschien es wichtig Unterschiede in der von ASML^{wt} und ASML^{kd} freigesetzten Matrix zu definieren. Als Kontrolle dienten Lysate der beiden Zelllinien. Darüberhinaus schloss ich in diese differentielle Analyse Exosomen mit ein.

Die deutlichsten Unterschiede traten in den löslichen Fraktionen auf. Ich konnte zeigen, dass in der ASML^{wt}-IF sowohl CD44v6 als auch c-Met, β 4, HAS3, C3 und uPAR vorkommen, nicht aber in der ASML^{kd}-IF.

Die funktionellen Unterschiede in der Migration und Apoptoseresistenz könnten zum einen durch die reduzierte HAS3 Expression in der ASML^{wt}-IF beruhen, und/oder durch die gesteigerte HYAL-Aktivität in der ASML^{kd}-IF unterstützt werden. Die Funktion der HA variiert sehr stark mit der Länge (Stern et al., 2006). Aufgrund der reduzierten Präsenz von MMP13, MMP9, MMP2 und uPA in der löslichen Fraktion und der Matrix von ASML^{kd}-Zellen, können wir zudem von einer veränderten Matrixbildung von ASML^{wt}- vs. ASML^{kd}-Zellen ausgehen. Auch die verringerte c-Met Expression auf ASML^{kd}-Zellen, sowie das Fehlen von c-Met in der ASML^{kd}-IF könnte für die geringe Metastasierung der ASML^{kd}-Zellen von Bedeutung sein. So wurde gezeigt, dass aktiviertes c-Met das Überleben von Zellen sowie EMT, Adhäsion und Migration unterstützt. Weiterhin trägt es zur Angiogenese von Tumoren bei (Comoglio et al., 2008). Orian-Rousseau et al. (2002) zeigte auch, dass CD44v6 die Aktivierung von c-Met über HGF einleiten kann. Dementsprechend kommt es durch den CD44v knockdown zu einer deutlich reduzierten Aktivierung von c-Met. Die Konsequenz daraus ist eine reduzierte Transkription von c-Met und c-Met-assoziiierter Gene. Eines der Gene, dessen Transkription von c-Met abhängig ist, ist uPAR. Die Expression von uPAR ist in ASML^{kd}-Zellen reduziert und in der löslichen Fraktion von ASML^{kd}-Zellen mittels WB nicht nachweisbar. Der CD44v knockdown kann auch aktiv zur reduzierten uPAR Expression beitragen, da die Bindung von HA an CD44 die uPAR Transkription reguliert (Kobayashi et al., 2002). uPAR ist über die Bindung an uPA in die Plasminogen-Aktivierung involviert und assoziiert mit verschiedenen Integrinen, dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), PDGR, Caveolin und Vitronektin (VN). Dadurch kommt es unter Mitwirkung von FAK, Src, Akt und Ras zur Initiierung von Signaltransduktionskaskaden (Mazar, 2008). Somit kann uPAR über die Bindung an uPA, das in der ASML^{kd}-Matrix mittels Immunfluoreszenz und WB nicht nachgewiesen werden konnte, zur Präparation der prämetastatischen Nische beitragen. Die Bindung von uPAR an Integrine und den EGFR unterstützt durch die Aktivierung von ERK die Migration (Mazzeri et al., 2006). In ASML^{wt}-Zellen konnte eine Ko-Immunpräzipitation von CD44v6 mit c-Met und uPAR nach Quervernetzung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde gehen mit der zuvor gestellten Arbeitshypothese einher und unterstützen die zentrale Rolle von CD44v6 bei der Generierung einer Tumorumgebung, die einen starken Einfluss auf die Präparation einer prämetastatischen Nische hat. C3 konnte, obwohl es auf Exosomen exprimiert ist, nicht in der ASML^{kd}-IF

nachgewiesen werden. C3a könnte als Anaphylatoxin für die Präparation einer prämetastatischen Nische wichtig sein. C3b kann Exosomen durch Bindung an den CD11b-Rezeptor zu Makrophagen rekrutieren (Wysoczynski et al., 2007).

In diesem Zusammenhang sei ganz besonders auf die CD11b⁺-Kluster in den prämetastatischen Organen konditionierter Tiere hingewiesen. Es wurde gezeigt, dass bei Brustkarzinomen Makrophagen für die Präparation der prämetastatischen Nische eine wichtige Rolle spielen (Erler et al., 2009). Mit Hilfe immunhistologischer Untersuchungen konnte ich eine Anreicherung von Makrophagen sowohl in drainierenden Lymphknoten als auch in der Lunge nachweisen. Es wird davon ausgegangen, dass Makrophagen durch Tumor-sezernierte Faktoren wie S100A8 und S100A9 angezogen werden (Hiratsuka et al., 2008). In unserem Modell könnten Makrophagen durch C3 rekrutiert werden. Diese Unterschiede zwischen ASML^{wt}- und ASML^{kd}-IF gehen mit dem Befund einher, dass vorzugsweise die ASML^{wt}-IF die Migration und Apoptoseresistenz der Zielzellen unterstützt.

4.1.2 ASML^{wt}-Exosomen vs. ASML^{kd}-Exosomen

Sowohl Janowska-Wieczorek et al. (2005) als auch Hao et al. (2006) zeigten, dass Exosomen bei der Bildung von Metastasen eine wichtige Rolle spielen können. Ich konnte zeigen, dass auch ASML^{wt}-Exosomen einen Beitrag zur Präparation einer prämetastatischen Nische leisten. Dies galt, wenn auch in abgeschwächter Form auch für ASML^{kd}-Exosomen. Deshalb gehen wir davon aus, dass CD44v nicht in die Expression von Exosomenproteinen, welche für die Präparation der Nische nötig sind, involviert ist. Dies schließt nicht aus, dass Komponenten betroffen sind, die die Effektivität der Exosomen verstärken. Ich möchte für die weiter Diskussion in Bezug auf die Nischenpräparation zwischen „essentiellen“ und „unterstützenden“ Exosomenproteinen unterscheiden. Die Analyse mittels WB ergab, dass sowohl die Expression der Tetraspanine CD9, CD151 (Daten nicht gezeigt) und D6.1A als auch die der D6.1A-assoziierten Proteine EWI-F, CD13, INS-2, CD49c (Daten nicht gezeigt), EpCAM und Claudin-7 auf ASML^{kd}-Exosomen unverändert war. Im Hinblick auf das unveränderte „Tetraspanin-web“ wird es wahrscheinlich, dass:

i) die Einstülpung von Caveolin- oder Clathrin-coated pits (Erler et al., 2009), nicht aber die von TEMs, durch CD44v^{kd} beeinflusst wird, aber

ii) TEM-abgeleitete Exosomen essentiell für die Präparation einer prämetastatischen Nische sind.

Es ist bekannt, dass Tetraspanine an Fusionsprozessen (Rubinstein et al., 2006, Zöller, 2009) beteiligt sind. Deshalb erscheint es möglich, dass sie in die Zielzelltargetierung involviert sind. Die unveränderte Expression von Integrinen einschließlich CD11b (Daten nicht gezeigt), der Integrinliganden Fibronectin (FN, Daten nicht gezeigt) und Laminin-5 in ASML^{kd}-Exosomen kann zusammen mit der ASML^{wt}-IF zusätzlich Metastasierung unterstützen. So scheint es, dass der CD44v^{kd} die Expression einiger nicht TEM-assoziiertes „unterstützender“ Exosomenproteine verändert. Da diese Proteine unverändert auf den ASML-Zellen vorliegen, würde dies bedeuten, dass Unterschiede in der Ausbildung von MVB zugrunde liegen. Ein Protein, welches auf ASML^{kd}-Exosomen reduziert ist, ist Annexin5. Dies bindet an Phosphatidylserin und spielt dabei eine wichtige Rolle in der apoptotischen Signalweitergabe (Reutelingsperger und Heerde, 1997). Aber auch Annexin2 (Daten nicht gezeigt), ein hoch affiner Rezeptor für Plasmin und Tenaskin (Sharma und Sharma, 2007), ist auf ASML^{kd}-Exosomen reduziert exprimiert. Weitere Proteine, die auf ASML^{kd}-Exosomen reduziert vorliegen, sind HSP, einschließlich HSP-1. Diese können Signalkaskaden durch Bindung an Toll-like- und andere Rezeptoren einleiten (Capello et al., 2008). Auch TSP, welches an der Inhibierung der Tumorangiogenese beteiligt ist und unkontrolliertes Wachstum fördert (Kazerounian et al., 2008, Kang und Watnick, 2008), war auf den Exosomen von ASML^{kd}-Zellen reduziert. Auch PGK-1 als „unterstützendes“ Exosomenprotein ist auf ASML^{kd}-Exosomen verringert exprimiert. Hochregulation von PGK-1, als Antwort auf oxidativen Stress, korreliert mit einer schlechten Prognose (Jang et al., 2008). Der auffälligste Befund ist das Fehlen von HGF auf den ASML^{kd}-Exosomen. Dies könnte wesentlich zur schwächeren Effektivität der ASML^{kd}-Exosomen beitragen. In der Tat konnte ein signifikanter Anstieg der Proliferation von Lymphknoten-Stroma-Zellen und Lymphozyten durch Zugabe von HGF beobachtet werden. Jedoch war der Anstieg bei den ASML^{kd}-Exosomen geringer als bei den ASML^{wt}-Exosomen. Des Weiteren fördert HGF nach Ko-Kultur mit ASML^{kd}-Exosomen auch die Proliferation von Fibroblasten, Endothel- und Knochenmarkszellen. Aufgrund der hohen Expression von HGF auf ASML^{wt}-Exosomen kann die Expression sowohl von Wachstumsfaktoren als auch deren Rezeptoren in potentiellen Zielzellen hochreguliert werden. Dabei kommt es zu einer Proliferationssteigerung. Ob an diesem Prozessen auch die Weitergabe und Translation exosomaler mRNA oder exosomalen siRNA „silencing“ (Zakharowa et al., 2007) beteiligt ist, muss noch geklärt werden. Ersteres könnte die VEGFR-Expression an Endothelzellen erklären.

Letzteres die Runterregulation des VEGF, des von Willebrand Faktors und TSP. Beides wurde nur nach Ko-Kultur mit Exosomen beobachtet. Die Runterregulation von VEGF könnte womöglich die schwache Vaskularisierung des ASML-Tumors erklären (Matzku et al., 1983), was aber weiterer Untersuchungen bedarf. In der Tat wurde nach Behandlung mit ASML^{wt}-kM ein auffälliger Anstieg der Vaskularisierung prämetastatischer Organe festgestellt.

Um diese und weitere Fragen zu beantworten, würde eine differentielle Analyse der ASML^{wt}- und ASML^{kd}- exosomalen mRNA und miRNA, aber auch der selektive knockdown weiterer interessanter Gene auf ASML^{wt}-Zellen helfen. Abschließend sei erwähnt, dass das unterschiedliche Ansprechverhalten der potentiellen Zielzellen wahrscheinlich durch Unterschiede im Aktivierungsstatus der Gene in den verschiedenen Zellen und/oder der selektiven Natur der Exosomen/Wirt-Interaktion bedingt ist (Fevrier und Raposo, 2004, Johnstone, 2006).

4.1.3 ASML^{wt}-Matrix vs ASML^{kd}-Matrix

Ich hatte aufgezeigt, dass die metastasierende Tumorzelle mit dem umliegenden Gewebe zur Vorbereitung einer prämetastatischen Nische kommunizieren kann. Dies deutete darauf hin, dass es nicht nur mit dem umgebenden Gewebe zu einem Kommunikationsaustausch kommt, sondern möglicherweise auch von der Matrix mit der Tumorzelle. Im Gegensatz zu den Exosomen, wird die Zusammensetzung der löslichen Matrix signifikant durch CD44v6 beeinflusst. Ich werde nun im Folgenden diskutieren, in wie weit der Aufbau der Matrix (lösliche Fraktion und adhäsive Subfraktion) von CD44v abhängt und wie diese CD44v-abhängige Matrix die Migration und Apoptoseresistenz von ASML^{wt}-Zellen beeinflusst. Ich hatte gezeigt, dass in ASML-Zellen durch einen CD44^{kd} die c-Met, uPAR und HAS3 Transkription und/oder Expression beeinflusst wird. Dementsprechend konnten diese drei Moleküle nicht in der ASML^{kd}-Matrix detektiert werden. Die Expression von $\alpha 6\beta 4$ ist auf den ASML^{kd}-Zellen reduziert und fehlt in der ASML^{kd}-Matrix. Eine ganze Reihe von Proteasen lagen in der ASML^{kd}-Matrix reduziert vor, wie die schon beschriebenen MMP13, 9, 2 und uPA, aber auch CD13, die 2 hrta Serinpeptidase und Chaperone, die für den Abtransport falsch gefalteter Proteine sorgt (Clausen et al., 2002).

Die reduzierte Expression all dieser Proteasen in der ASML^{kd}-Matrix, kann zu einer Veränderung des Aufbaus der Tumorzellmatrix beitragen.

Ein zusätzliches Protein, welches vermehrt in der ASML^{wt}-, nicht aber in der ASML^{kd}-Matrix vorkam, ist der Hepatoma-abgeleitete Wachstumsfaktor („hepatoma-derived growth factor“, HDGF). HDGF stimuliert das Wachstum von Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen. Weiterhin unterstützt es die Angiogenese, das Durchdringen von Matrigel, es schützt vor Apoptose und unterstützt die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen. Eine hohe Expression des Wachstumsfaktors HDGF wird in Pankreaskarzinomen mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht (Tsang et al., 2008). Weitere differentielle Unterschiede in der Matrix von ASML^{wt} vs. ASML^{kd}-Zellen, ist die Anreicherung von Enolase-1, Clusterin und des ECM Protein-1. Clusterin ist ein Chaperon-ähnliches Molekül, das vor Apoptose schützt. Die lösliche Form beeinflusst die Sekretion von Chemokinen und initiiert die Stromaentwicklung, was die interzelluläre Kommunikation verändert. ECM-1 ist ein Glykoprotein, das mit Perlecan, Fibulin-1C/D und MMP9 interagiert und in den Prozess der Angiogenese involviert ist (Sercu et al., 2008). Dies könnte neben dem schon erwähnten Einfluss von VEGF die schwache Vaskularisierung des ASML-Tumors erklären. Enolase-1 ist ein Plasminogenrezeptor, von dem an Mäusen und humanen Zellen gezeigt wurde, dass er die LPS-induzierte Invasion von Monozyten in die Lunge vermittelt (Plow und Das, 2009). Am wichtigsten ist jedoch der Befund, dass die ASML^{wt}-Matrix mehr HA enthält als die ASML^{kd}-Matrix. Dies entspricht der stärkeren Expression von HAS3 in den ASML^{wt}-Zellen. Von HAS3 ist bekannt, dass es den malignen Phänotyp bösartiger Tumoren begünstigt (Adamia et al., 2005). Die in der ASML^{wt}-Matrix nachgewiesene HA hat eine größere molekulare Masse, als die HA in der entsprechenden ASML^{kd}-Matrix. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass in der ASML^{kd}-Matrix eine höhere HYAL-Aktivität gemessen wurde. In diesem Zusammenhang möchte ich erwähnen, dass die funktionellen Eigenschaften von HA beträchtlich mit der Größe variieren (Stern et al., 2006). Die deutlich hervorgehobene Degradierung von HA in der ASML^{kd}-Matrix könnte im Vergleich zu der ASML^{wt}-Matrix zu deren Ineffizienz führen.

Neben der HA ist auch noch der Integrinligand Laminin-5 in der Matrix von ASML^{kd}-Zellen reduziert. Laminin-5 bindet entweder über $\alpha 3\beta 1$ Integrine an fokalen Adhäsionspunkten an die Zelle, oder aber interagiert mit $\alpha 6\beta 4$, was zu stabilen Verbindungen führt, welche Hemidesmosomen-Proteine enthalten.

Laminin-5 unterstützt durch die Bindung an $\beta 4$ -Integrine die RAC1-GTPase-vermittelte Migration und das Expressionslevel von Laminin-5 korreliert stark mit der Tumorzellinvasion. In einem humanen Plattenepithelkarzinom-Modell wurde ein essentieller Zusammenhang von Laminin-5, $\alpha 6\beta 4$ und Kollagen VII gezeigt, der die Tumorgenese über die Aktivierung der PI3K ansteuert. (Marinkovich, 2007).

4.2 Kooperation von Exosomen mit der löslichen Fraktion und der Einfluss auf die Zielzellen.

Die Bildung von Metastasen durch ASML^{kd}-Zellen wurde sehr stark durch das ASML^{wt}-kM und weniger effizient durch einen Mix aus ASML^{wt}-IF und ASML^{kd}-Exosomen unterstützt. Die *ex vivo* Analyse der drainierenden Lymphozyten bestätigte, dass kein signifikanter Unterschied in der Expression des Lymphozyten-Markerprofils durch ASML^{wt}-IF induziert wurde. Ausschließlich die ASML^{wt}-, aber nicht die ASML^{kd}-Exosomen begünstigen einige Veränderungen, wie zum Beispiel eine Erhöhung des Anteils an CD11b+ Zellen. Stattdessen hatte das ASML^{wt}-kM *in vivo* und *in vitro* einen ähnlichen Einfluss auf die Proteinexpression der Zielzellen. Dies bedeutet, dass Exosomen essentielle Botschaften für die Präparation der prämetastatischen Nische enthalten, welche, werden sie nicht durch die lösliche Fraktion oder Matrix unterstützt, nicht übermittelt werden oder die prämetastatischen Organe nicht erreichen können. Ich konnte zeigen, dass die ASML^{wt}-IF, im Gegensatz zu der ASML^{kd}-IF, CD44v6, c-Met, uPAR und C3 enthält, was wiederum die Adhäsion, Migration und Apoptoseresistenz *in vitro* unterstützt. Die Matrix kann als Speicher für Exosomen dienen. Dies wurde durch den Nachweis von HGF bekräftigt. Zum Erreichen des Ziels dienen Proteasen wie MMP2, 9, 13 und uPA, die reichhaltig in der löslichen Fraktion vorkommen. Die adhäsive Fraktion könnte, obwohl sie keine peritumorale Matrix ausbildet, sich an das lymphatische Endothelium anheften und dabei als Gleitschiene für Exosomen dienen.

In diesem Zusammenhang möchte ich bemerken, dass das ASML^{wt}-kM/die lösliche Fraktion plus die Exosomen Veränderungen im prämetastatischen Organ hervorrufen, welche sich weitgehend mit der Charakterisierung der prämetastatischen Nische in murinen Modellen decken. Den Einfluss der löslichen Fraktion und hier besonders von CD44v auf den Transport von Exosomen und deren Aktivität könnten weitere Experimente fördern.

Zusammenfassend möchte ich feststellen, dass die Metastasierungsfähigkeit durch einen selektiven knockdown von CD44v in einem stark metastasierenden Pankreasadenokarzinom erheblich reduziert wurde. Ich habe gezeigt, dass CD44v für den Aufbau einer löslichen Matrix, die in Kooperation mit Exosomen als Hauptakteure, die Aktivierung von Lymphozyten, Stroma- und Endothelzellen im prämetastatischen Organ unterstützt. Dabei sind die Exosomen essentiell auf Hilfe durch die lösliche Fraktion angewiesen, welche als Exosomenträger und/oder als Reservoir für Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Proteasen dienen kann (Abb. 4.2).

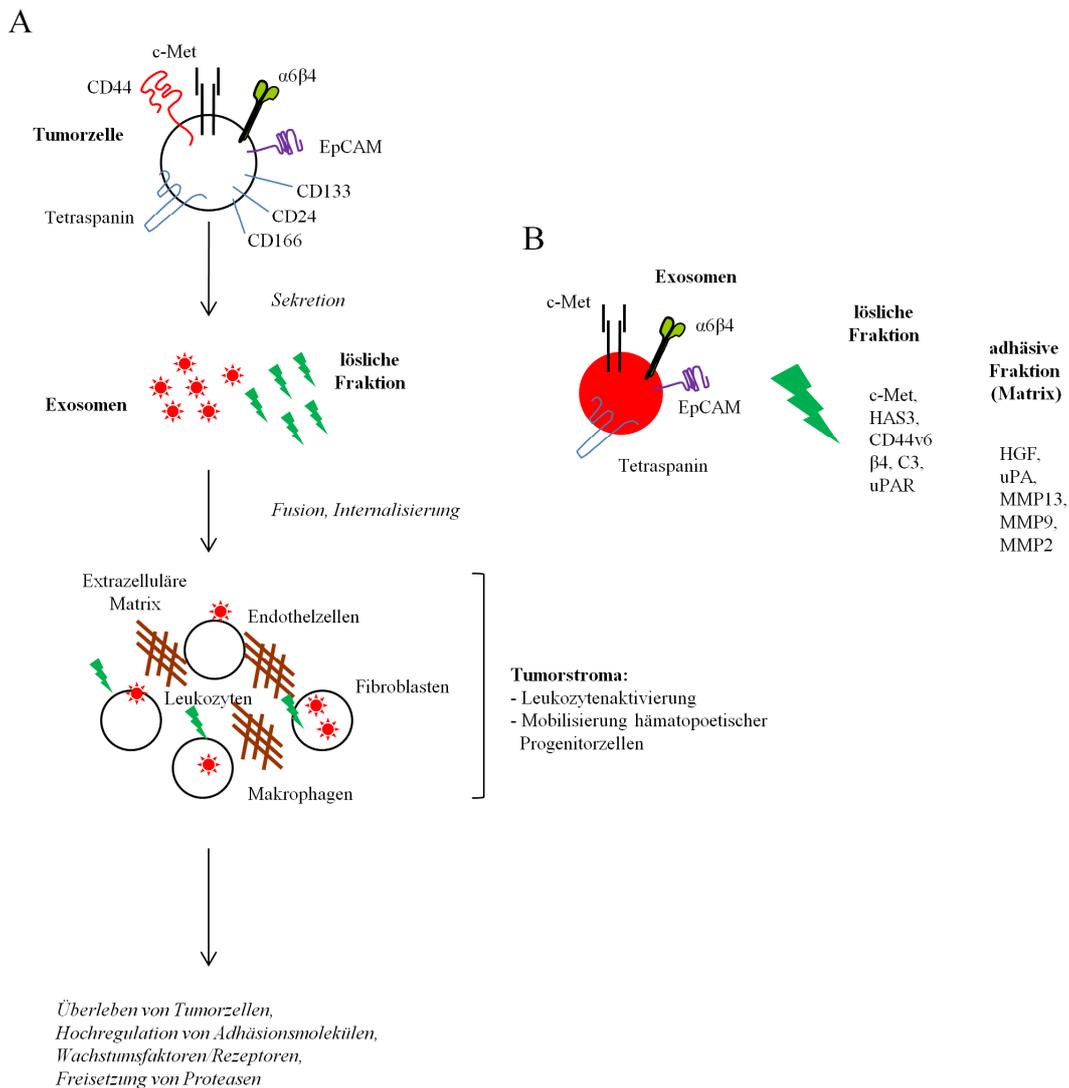


Abbildung: 4.2:

Hypothese der Beteiligung von CD44v an der Präparation der prämetastatischen Nische. A) CD44v-positive Tumorzelle sezerniert Exosomen und lösliche Faktoren die zuerst in die drainierenden Lymphknoten gelangen und so dort ihre Botschaft abgeben um die Proliferation der Stromazellen, die Leukozytenaktivierung sowie die Mobilisierung hämatopoetischer Progenitorzellen stimulieren. Dies führt zur Hochregulation von Wachstumsfaktoren/Rezeptoren und der Freisetzung von Proteasen. B) Exosomen und löslichen Fraktion, welche die adhäsive Fraktion (Matrix) enthält.

4.3 Einfluss der Tumormatrix auf die CD44v6-vermittelte Migration und Apoptoseresistenz.

4.3.1 Matrix-initiierte Migration

Eine adhäsive Subfraktion der ASML^{wt}-Matrix unterstützt die Adhäsion von ASML^{wt}- und ASML^{kd}-Zellen, wobei die Zellen über einen Integrinliganden, also CD44v6 unabhängig mit der Matrix interagieren (Klingbeil et al., 2009). Hingegen werden migratorische Stimuli der Matrix über CD44v6 vermittelt. Weder AS- noch ASML^{kd}-Zellen erhalten einen die Migration fördernden Stimulus über die ASML^{wt}-Matrix. Dennoch kann die Transwellmigration von ASML^{wt}-Zellen nicht nur über anti-CD44v6, sondern auch über anti-c-Met und anti- $\alpha 6\beta 4$ inhibiert werden. In umgekehrter Weise stimuliert HA, HGF und Laminin-5 die Migration von ASML^{wt}-, nicht aber von ASML^{kd}-Zellen. Dies bedeutet, dass die Liganden/Rezeptor-Interaktion von CD44v6, c-Met und $\alpha 6\beta 4$ zur Migration der Zellen beiträgt. Jedoch ist der Übergang zum migratorischen Phänotyp essentiell von CD44v6 abhängig. Die Signaltransduktion wird also durch das Zusammenwirken der drei Moleküle unterstützt, was ich mittels Ko-Immünpräzipitation nachweisen konnte. Aber auch andere Gruppen (Bertotti und Comoglio, 2003, Orian-Rousseau et al., 2007, Tremmel et al., 2009) haben die Assoziation von CD44v6, c-Met und $\alpha 6\beta 4$ sowie deren Bedeutung für die Signaltransduktion beschrieben. Unabhängig vom initiiierenden Stimulus verläuft die Signalweitergabe unterhalb von CD44v6 in Richtung einer Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von ERM-Proteinen ab, die mit einer Assoziation von CD44 und ERM Proteinen einhergeht. Des Weiteren habe ich Phosphorylierung der CD44-assoziierten Src-Kinase beobachtet, die von einer Rekrutierung und Phosphorylierung von FAK, begleitet wird.

Auch die Phosphorylierung der Integrin $\beta 4$ -Kette kann durch die Bindung der PTB (Phosphotyrosin-bindende)-Domäne von shc zur Migration beitragen. Aktiviertes shc rekrutiert Grb/SOS und aktiviert Ras (Pelicci et al., 1995, Dans et al., 2001). C-Met bindet direkt shc und src, was wiederum zur Aktivierung von FAK führt. Durch Gab1-Bindung kommt es zur Aktivierung vieler Signalkaskaden, wie zum Beispiel des MAPK-Signalweges (Bardelli et al., 1992, Sachs et al., 2000, Benvenuti und Comoglio, 2007, You und McDonald, 2008, Knudsen und Vande Woude, 2008). Meine Daten schließen einen direkten Beitrag von c-Met und $\alpha 6\beta 4$ zu Matrix-initiiertes Migration nicht aus. Sie veranschaulichen jedoch einen essentiellen Beitrag von CD44v6.

Ich konnte zeigen, dass nur ASML^{wt}-Zellen auf eine Stimulation von HA, HGF und LN5, sowie der ASML^{wt}-Matrix als der natürlichen Tumorzellumgebung, ansprechen (Abb. 4.3).

4.3.2 Apoptoseresistenz durch CD44-abhängige Aktivierung des MAPK- und PI3K/Akt-Signalweges.

Neben migratorischem Potential ist Apoptoseresistenz eine wesentliche Eigenschaft metastasierender Pankreaskarzinomzellen. Ich konnte in meiner Arbeit zeigen, dass CD44v6 positive Zellen nicht aber ASML-CD44v^{kd}-Zellen vor Cis-Platin-induzierter Apoptose durch die ASML^{wt}-Matrix geschützt werden. Jedoch wurde der Apoptoseschutz auf den ASML-Zellen durch einen selektiven knockdown von c-Met und β 4 mittels siRNA aufgehoben. Diese Befunde belegen einen essentiellen Beitrag von CD44v6 zur Apoptoseresistenz von ASML-Zellen, wobei als initiiierendes Agens c-Met von zentraler Bedeutung erscheint. Bevor ich diesen Befund im Detail diskutiere möchte ich darauf hinweisen, dass bekannt ist, dass ASML-Zellen keine MDR-Gene exprimieren (Klingbeil, 2007). Es war auch bekannt, dass CD44v6 zumindest in ASML-Zellen keinen Einfluss auf Rezeptor-medierte Apoptose ausübt. Dies konnte ich mittels der Aktivierung der Caspase-8 bestätigen.

Stattdessen kommt es unter Cis-Platin Behandlung in ASML^{kd}-Zellen zur vermehrten Ausschüttung von Cytochrom C ins Cytosol und der damit einhergehenden gesteigerten Aktivierung pro-apoptotischer Moleküle, wie der Caspase-9 und Caspase-3. Durch Stimulation von ASML^{wt}-Zellen mit HA, HGF und Laminin-5 wird hingegen die Aktivierung anti-apoptotischer Proteine in Gang gesetzt. So kommt es zu Phosphorylierung und dadurch zur Inaktivierung von BAD. Nicht phosphoryliertes, inaktives BAD ist an die anti-apoptotischen Moleküle Bcl-Xl und Bcl-2 gebunden. Aktivierung von Akt führt zur Phosphorylierung von BAD. Dadurch werden die anti-apoptotischen Moleküle Bcl-Xl und Bcl-2 freigesetzt, die die Apoptoseresistenz der Tumorzelle nachhaltig unterstützen (Datta et al., 1997). Ich möchte darauf hinweisen, dass in ASML^{wt}-Zellen Bcl-Xl so nachhaltig aktiviert wird, dass es selbst nach Cis-Platin Behandlung detektiert wird.

Es ist bekannt, dass die Aktivierung anti-apoptotischer Proteine nicht auf CD44v6 beschränkt ist, sondern auch durch Aktivierung von c-Met und α 6 β 4 eingeleitet werden kann. Die Phosphorylierung von direkt c-Met assoziiertem STAT3 (Bourguignon et al., 1998) und Src (Bardelli et al., 1992), welches auch mit CD44 interagiert (Bourguignon et al., 2001, Li et al.,

2001) war nach Stimulation von c-Met mit HGF, obgleich nur in ASML^{wt}-Zellen, am stärksten ausgeprägt. Die Aktivierung von PKC konnte mit allen drei Stimuli erzielt werden. Zusätzlich konnte ich zeigen, dass es durch Stimulation von CD44v6, c-Met und $\alpha 6\beta 4$ zu einer Assoziation von c-Met mit Gab1 kommt und dies verstärkt in ASML^{wt}-Zellen. Diese Befunde unterstützten unsere Hypothese, dass die Matrix-unterstützte Apoptoseresistenz über c-Met, aber auch über CD44v6 oder $\alpha 6\beta 4$ eingeleitet werden kann, die Signalwege aber konvergieren. Am Beispiel des MAPK- und PI3K-Signalweges, zweier Hauptsignalwege für den Apoptoseschutz, habe ich dies verdeutlicht. Mit Hilfe von Inhibitoren habe ich versucht, den Einfluss beider Signalwege auf das Überleben der Zellen zu untersuchen. Nach Stimulation durch HA und HGF wurde die Aktivierung von Akt nur geringfügig in Gegenwart des c-Met- und Raf-Inhibitors gemindert. Ähnliches wurde bei der Aktivierung von ERK in Gegenwart des PI3K-Inhibitors nach Stimulation mit HA und HGF beobachtet. Der PI3K-Inhibitor unterbindet am effizientesten die Aktivierung von Akt. Ich interpretiere diese Befunde in dem Sinne, dass sowohl der MAPK-Signalweg als auch der PI3K-Signalweg unabhängig voneinander nach Ligandenbindung an CD44v6, c-Met und $\alpha 6\beta 4$ zum Schutz vor Apoptose in ASML-Zellen aktiviert werden.

Unabhängig von der Aktivierung zwei anti-apoptotischer Pathways bestätigen diese Daten auch in Übereinstimmung mit Untersuchungen in weiteren Tumormodellen, dass über CD44v6, c-Met und $\alpha 6\beta 4$ (Orlan-Rousseau et al., 2002 und 2007, Bertotti und Comoglio, 2003, Tremmel et al., 2009) bzw. über c-Met und $\alpha 6\beta 4$ (Bertotti und Comoglio, 2003, Klosek et al., 2009) initiierte Signale koordiniert weiter geleitet werden. Der essentielle Beitrag von CD44v6 wird durch die Tatsache belegt, dass ASML^{kd}-Zellen weder durch die ASML^{wt}-Matrix, noch durch HA, HGF und Laminin-5 vor Apoptose geschützt werden können. Man weiss, dass TEMs Andockstellen für Kinasen und weitere Adaptorproteine darstellen (Hemmler, 2005, Lingwood und Simons, 2010). Ob nun die Bildung des Signaltransduktionskomplexes aus CD44v6, c-Met und $\alpha 6\beta 4$ in TEMs lokalisiert ist, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Unsere Hypothese wird dadurch bekräftigt, dass Tetraspanine, wie zum Beispiel das D6.1A (Tspan 8) mit c-Met, CD44 und $\alpha 6\beta 4$ assoziieren (Herlevsen et al., 2003, Kuhn et al., 2007, Klosek et al., 2009, Yáñez-Mó et al., 2009). CD44v6 trägt in vielen Malignomen zur Tumorprogression bei. In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass dies zumindest teilweise darauf zurückzuführen ist, dass CD44v6 eine essentielle Rolle bei der Bildung einer Tumormatrix spielt, welche in einer Art „feed back loop“ Tumorzellmigration und Apoptoseresistenz beeinflusst.

Bedingt durch die Assoziation der drei Moleküle CD44v6, c-Met und $\alpha 6\beta 4$, erhalten die Zellen die Initialzündung für den Übergang zu einem migratorischen Phänotyp, aber auch zur Hochregulation anti-apoptotischer Moleküle. Konvergierende Signale unterhalb von CD44v werden nur in CD44v6-positiven Tumorzellen effektiv aktiviert.

Letztlich bedeutet dies, dass CD44v6 die Aufbereitung einer Tumormatrix unterstützt, die Präparation einer prämetastatischen Nische einleitet und zum anderen CD44v6 über diese Matrix Signale empfängt, die Migration und Apoptoseresistenz der Tumorzellen unterstützen (Abb. 4.3).

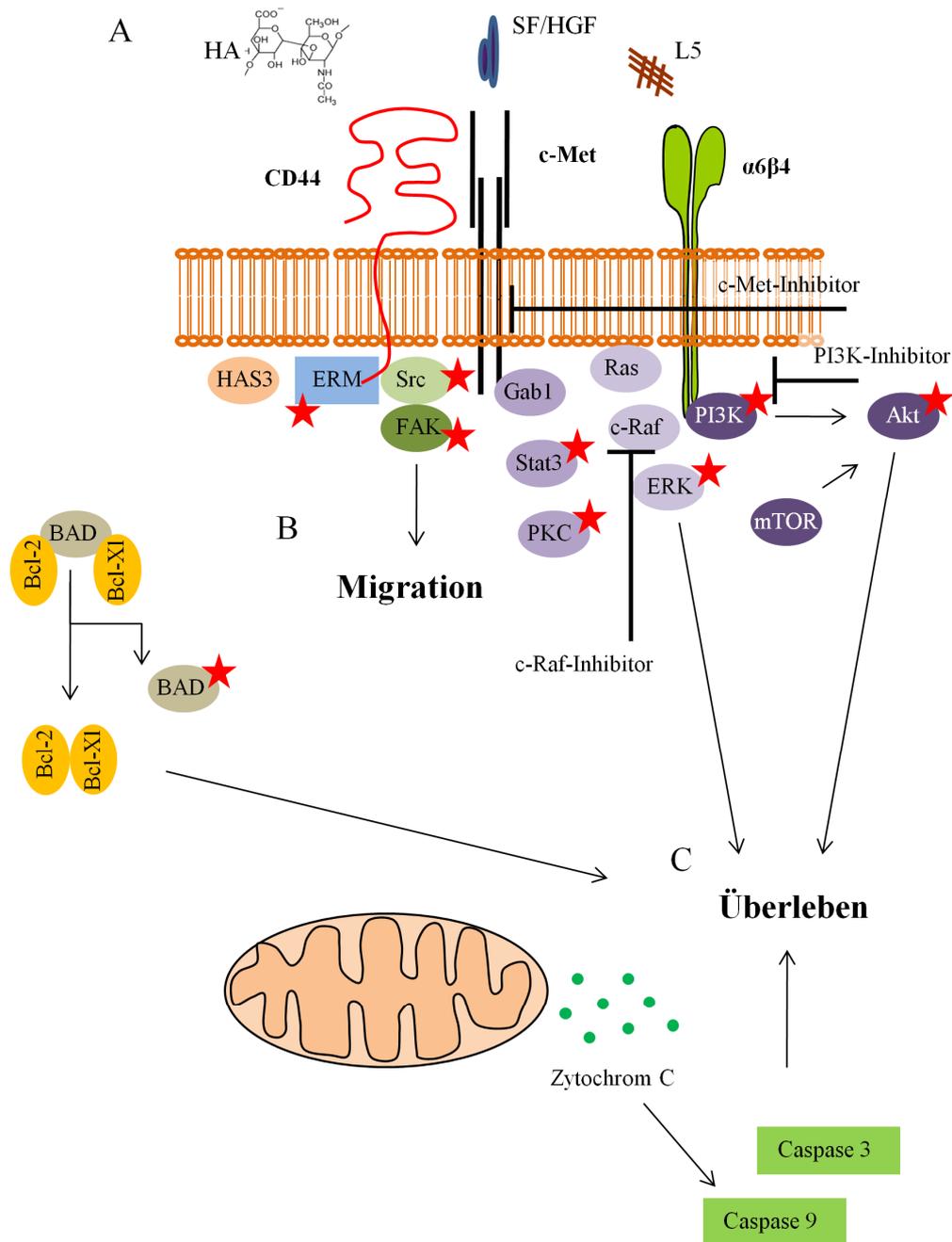


Abbildung: 4.3:

CD44v-vermittelte Signaltransduktion A) Bildung der Tumorzellmatrix B) Einfluss der Tumorzellmatrix auf die CD44v-initiierte Zellmigration C) Apoptoseresistenz durch CD44-abhängige Aktivierung des MAPK- und PI3K/Akt-Signalweges.

4.4 Perspektiven

Ausgehend von dem Befund, dass die Expression von CD44v6 zu einer erhöhten Metastasierung und Apoptoseresistenz von Tumorzellen führt, und sezernierte lösliche Faktoren in Kooperation mit Exosomen einer stark metastasierenden Tumorzelllinie ausreichen, um eine prämetastatische Nische zu bilden, ergeben sich eine Reihe notwendiger, weiterführender Studien, deren Resultate Hinweise für eine therapeutische Relevanz geben können. Als erstes sollte die Frage geklärt werden, welche mRNA und miRNA in den ASML-Exosomen vorhanden sind und auf welche Weise die Exosomen mit den Zielzellen interagieren. Auch die Frage welche Zielzellen bevorzugt von Exosomen angesteuert werden, sollte geklärt werden.

Wenngleich Exosomen als wesentliches Element des Datentransfers angesehen werden müssen, war ihre Effektivität *in vivo* essentiell von einer im Aufbau von CD44v6 bestimmten Matrix abhängig. Die von mir postulierte Transporterfunktion der Matrix ist bisher völlig ungeklärt. Der Aufbau dieser Matrix, das HA-Grundgerüst sowie Einbau und Freigabe von Proteasen, Wachstumsfaktoren oder auch Exosomen-fördernde Aufgabe sollten mit Hilfe neuester Hochauflösungsverfahren in Angriff genommen werden. Dies betrifft auch einen drei Fragenkomplex, wie nutzt die Tumorzelle ihre Matrix zur Verankerung, Motilität und Feedback Information. Selbst Techniken wie AFM können hierbei nur die Spitze des Eisbergs zur Klärung auf molekulare Ebene abdecken.

Ein letzter mir persönlich besonders wichtiger Aspekt ist, wie eine Spleißvariante eines Adhäsionsmoleküls ohne Signalfunktion eine so zentrale Rolle in der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen und in der Zusammenführung von Signalkaskaden zukommen kann. Dies ist umso bedeutender, da sich die zytosolische Domäne mit der potentiellen Bindungsstelle für Proteintyrosinkinasen zwischen CD44s und CD44v6 nicht unterscheidet und sich CD44-Isoformen nur durch zusätzlich eingeführte Exonprodukte in der extrazellulären Domäne unterscheiden.

5. Zusammenfassung

Ausgangspunkt meiner Arbeit war die Beobachtung, dass durch einen knockdown (ASML^{kd}) varianter CD44 Isoformen (CD44v) die Metastasierungskapazität der Ratten Pankreaskarzinomzelllinie BSp73ASML (ASML^{wt}) stark reduziert wird. Im ersten Teil meiner Arbeit überprüfte ich, ob sich dieser Befund auf eine Beteiligung von CD44v an der Vorbereitung einer prämetastatischen Nische zurückführen lässt. Wiederholte Applikation von ASML^{wt}-, nicht aber von ASML^{kd}-konditioniertem Medium, unterstützte die Absiedlung schwach metastasierender ASML^{kd}-Zellen in Lymphknoten und Lunge. Eine Fraktionierung des konditionierten Mediums ergab, dass nur eine ASML^{wt}-lösliche Fraktion, die CD44v6, c-Met und uPAR enthält, mit ASML^{wt}- aber auch ASML^{kd}-Exosomen kooperiert. Dies bedeutet, dass Exosomen CD44v-unabhängig als zentrale Vermittler bei der Bereitstellung einer prämetastatischen Nische agieren, jedoch eine lösliche CD44v-kompetente Matrix benötigen. ASML^{wt}-Exosomen unterstützen hauptsächlich Proliferation und Genexpression in Zielzellen. Da diese Veränderungen *in vivo* nur beobachtet wurden, wenn Exosomen durch die CD44v-kompetente Matrix unterstützt wurden, gehe ich davon aus, dass die CD44v-abhängige Matrix Transport- oder Speicherfunktionen übernimmt, die es Exosomen erlaubt eine prämetastatische Nische vorzubereiten.

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchte ich, ob die vom Tumor bereitgestellte Matrix auch die Apoptoseresistenz metastasierender Tumorzellen unterstützt. ASML^{wt}-Zellen enthalten mehr Hyaluronsynthase-3 und sezernieren größere Mengen hochmolekularer Hyaluronsäure als ASML^{kd}-Zellen. Nur die ASML^{wt}-Matrix unterstützt Migration und Apoptoseresistenz von Tumorzellen. Beide Prozesse können sowohl durch eine Ligandenbindung von CD44v6 als auch c-Met und $\alpha 6\beta 4$ eingeleitet werden, die unabhängig vom initiiierenden Stimulus von einer Aktivierung von FAK bzw. des PI3K/Akt- und MAPK-Signalweges begleitet werden. Da nur die ASML^{wt}-Matrix die Aktivierung von CD44v6, c-Met und $\alpha 6\beta 4$ einleitet und nur ASML^{wt}-, nicht aber ASML^{kd}-Zellen mit gesteigerter Migration bzw. Apoptoseresistenz auf die Interaktion mit der ASML^{wt}-Matrix reagieren bedeutet dies, dass c-Met und $\alpha 6\beta 4$ Aktivierung essentiell von der Assoziation mit CD44v6 abhängen. Entsprechende Resultate mit humanen Pankreaskarzinomzellen bestätigen die generelle Gültigkeit dieser Befunde.

Meine Daten belegen, dass CD44v6 essentiell an der Bereitstellung einer Tumormatrix beteiligt ist, die die Vorbereitung einer prämetastatischen Nische fördert und über CD44v6 eine kooperative Aktivierung Migrations- und Apoptose-unterstützender Stimuli einleitet.

6. Literatur

- Aboseif**, S, A El-Sakka, P Young, und G Cunha, 'Mesenchymal reprogramming of adult human epithelial differentiation', *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 65 (1999), 113-118.
- Adamia**, Sophia, Christopher A Maxwell, und Linda M Pilarski, 'Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer', *Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders*, 5 (2005), 3-14.
- Admyre**, Charlotte, Sara M Johansson, Khaleda Rahman Qazi, Jan-Jonas Filén, Riitta Lahesmaa, Mikael Norman, u. a., 'Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179 (2007), 1969-1978.
- Ahrens**, T, J P Sleeman, C M Schempp, N Howells, M Hofmann, H Ponta, u. a., 'Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid', *Oncogene*, 20 (2001), 3399-3408.
- Akiyama**, Y, S Jung, B Salhia, S Lee, S Hubbard, M Taylor, u. a., 'Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation', *Journal of Neuro-Oncology*, 53 (2001), 115-127.
- Albelda**, S M, C W Smith, und P A Ward, 'Adhesion molecules and inflammatory injury', *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8 (1994), 504-512.
- Al-Hajj**, Muhammad, Max S Wicha, Adalberto Benito-Hernandez, Sean J Morrison, und Michael F Clarke, 'Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (2003), 3983-3988.
- Alitalo**, Kari, und Peter Carmeliet, 'Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease', *Cancer Cell*, 1 (2002), 219-227.
- Allouche**, M, R S Charrad, A Bettaieb, C Greenland, C Grignon, und F Smadja-Joffe, 'Ligation of the CD44 adhesion molecule inhibits drug-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells', *Blood*, 96 (2000), 1187-1190.
- Amano**, M, K Chihara, N Nakamura, T Kaneko, Y Matsuura, und K Kaibuchi, 'The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity', *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (1999), 32418-32424.
- Anttila**, M A, R H Tammi, M I Tammi, K J Syrjänen, S V Saarikoski, und V M Kosma, 'High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer', *Cancer Research*, 60 (2000), 150-155.

- Asplund**, T, M A Versnel, T C Laurent, und P Heldin, 'Human mesothelioma cells produce factors that stimulate the production of hyaluronan by mesothelial cells and fibroblasts', *Cancer Research*, 53 (1993), 388-392.
- Auvinen**, P, R Tammi, J Parkkinen, M Tammi, U Agren, R Johansson, u. a., 'Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival', *The American Journal of Pathology*, 156 (2000), 529-536.
- Bardelli**, A, F Maina, I Gout, M J Fry, M D Waterfield, P M Comoglio, u. a., 'Autophosphorylation promotes complex formation of recombinant hepatocyte growth factor receptor with cytoplasmic effectors containing SH2 domains', *Oncogene*, 7 (1992), 1973-1978.
- Bates**, R C, N S Edwards, G F Burns, und D E Fisher, 'A CD44 survival pathway triggers chemoresistance via lyn kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt in colon carcinoma cells', *Cancer Research*, 61 (2001), 5275-5283.
- Bates**, R C, C A Elith, R F Thorne, und G F Burns, 'Engagement of variant CD44 confers resistance to anti-integrin antibody-mediated apoptosis in a colon carcinoma cell line', *Cell Adhesion and Communication*, 6 (1998), 21-38.
- Bausero**, Maria A, Robert Gastpar, Gabriele Multhoff, und Alexzander Asea, 'Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175 (2005), 2900-2912.
- Benvenuti**, Silvia, und Paolo M Comoglio, 'The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis', *Journal of Cellular Physiology*, 213 (2007), 316-325.
- Bertotti**, Andrea, und Paolo M Comoglio, 'Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor', *Trends in Biochemical Sciences*, 28 (2003), 527-533.
- Bertrand**, P, N Girard, B Delpuch, C Duval, J d'Anjou, und J P Dauce, 'Hyaluronan (hyaluronic acid) and hyaluronectin in the extracellular matrix of human breast carcinomas: comparison between invasive and non-invasive areas', *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 52 (1992), 1-6.
- Bhowmick**, Neil A, Eric G Neilson, und Harold L Moses, 'Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression', *Nature*, 432 (2004), 332-337.
- Bidard**, François-Clément, Jean-Yves Pierga, Anne Vincent-Salomon, und Marie-France Poupon, 'A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis?', *Cancer Metastasis Reviews*, 27 (2008), 5-10.
- Bissell**, Mina J, und Mark A Labarge, 'Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment?', *Cancer Cell*, 7 (2005), 17-23.
- Bourguignon**, L Y, 'CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 6 (2001), 287-297.

- Bourguignon, L Y, und H Jin,** 'Identification of the ankyrin-binding domain of the mouse T-lymphoma cell inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor and its role in the regulation of IP3-mediated internal Ca²⁺ release', *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (1995), 7257-7260.
- Bourguignon, L Y, D Zhu, und H Zhu,** 'CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression', *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 3 (1998), d637-649.
- Bourguignon, L Y, H Zhu, A Chu, N Iida, L Zhang, und M C Hung,** 'Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation', *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (1997), 27913-27918.
- Bourguignon, L Y, H Zhu, L Shao, und Y W Chen,** 'CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration', *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001), 7327-7336.
- Bourguignon, L Y, H Zhu, B Zhou, F Diedrich, P A Singleton, und M C Hung,** 'Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185(HER2) and induces Rac1 and Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth', *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001), 48679-48692.
- Brabletz, Thomas, Andreas Jung, Simone Spaderna, Falk Hlubek, und Thomas Kirchner,** 'Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression', *Nature Reviews. Cancer*, 5 (2005), 744-749.
- Brennan, F R, K Mikecz, T T Glant, P Jobanputra, S Pinder, C Bavington, u. a.,** 'CD44 expression by leucocytes in rheumatoid arthritis and modulation by specific antibody: implications for lymphocyte adhesion to endothelial cells and synoviocytes in vitro', *Scandinavian Journal of Immunology*, 45 (1997), 213-220.
- Bretscher, Anthony, Kevin Edwards, und Richard G Fehon,** 'ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3 (2002), 586-599.
- Cappello, Francesco, Everly Conway de Macario, Lorenzo Marasà, Giovanni Zummo, und Alberto J L Macario,** 'Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy', *Cancer Biology & Therapy*, 7 (2008), 801-809.
- Chang, Yu-Wen, Shu-Chuan Chen, Ee-Chun Cheng, Ya-Ping Ko, Yi-Chieh Lin, Yu-Rong Kao, u. a.,** 'CD13 (aminopeptidase N) can associate with tumor-associated antigen L6 and enhance the motility of human lung cancer cells', *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 116 (2005), 243-252.
- Claas, C, S Seiter, A Claas, L Savelyeva, M Schwab, und M Zöller,** 'Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy', *The Journal of Cell Biology*, 141 (1998), 267-280.

- Clausen**, Tim, Chris Southan, und Michael Ehrmann, 'The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate', *Molecular Cell*, 10 (2002), 443-455.
- Comoglio**, Paolo M, Silvia Giordano, und Livio Trusolino, 'Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7 (2008), 504-516.
- Culty**, M, K Miyake, P W Kincade, E Sikorski, E C Butcher, C Underhill, u. a., 'The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins', *The Journal of Cell Biology*, 111 (1990), 2765-2774.
- Cywes**, C, und M R Wessels, 'Group A Streptococcus tissue invasion by CD44-mediated cell signalling', *Nature*, 414 (2001), 648-652.
- Daemi**, N, N Thomasset, J C Lissitzky, J Dumortier, M F Jacquier, C Pourreyon, u. a., 'Anti-beta4 integrin antibodies enhance migratory and invasive abilities of human colon adenocarcinoma cells and their MMP-2 expression', *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 85 (2000), 850-856.
- Dalerba**, Piero, und Michael F Clarke, 'Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory', *Cell Stem Cell*, 1 (2007), 241-242.
- Dans**, M, L Gagnoux-Palacios, P Blaikie, S Klein, A Mariotti, und F G Giancotti, 'Tyrosine phosphorylation of the beta 4 integrin cytoplasmic domain mediates Shc signaling to extracellular signal-regulated kinase and antagonizes formation of hemidesmosomes', *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001), 1494-1502.
- Datta**, S R, H Dudek, X Tao, S Masters, H Fu, Y Gotoh, u. a., 'Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery', *Cell*, 91 (1997), 231-241.
- DeGrendele**, H C, P Estess, und M H Siegelman, 'Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site', *Science (New York, N.Y.)*, 278 (1997), 672-675.
- Dowling**, J, Q C Yu, und E Fuchs, 'Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival', *The Journal of Cell Biology*, 134 (1996), 559-572.
- Duffy**, M J, C Sturgeon, R Lamerz, C Haglund, V L Holubec, R Klapdor, u. a., 'Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report', *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21 (2010), 441-447.
- Eramo**, A, F Lotti, G Sette, E Pillozzi, M Biffoni, A Di Virgilio, u. a., 'Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population', *Cell Death and Differentiation*, 15 (2008), 504-514.
- Erler**, Janine T, Kevin L Bennewith, Thomas R Cox, Georgina Lang, Demelza Bird, Albert Koong, u. a., 'Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche', *Cancer Cell*, 15 (2009), 35-44.

- Février**, Benoit, und Graça Raposo, 'Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages', *Current Opinion in Cell Biology*, 16 (2004), 415-421.
- Fidler**, Isaiah J, 'Critical determinants of metastasis', *Seminars in Cancer Biology*, 12 (2002), 89-96.
- Föger**, N, R Marhaba, und M Zöller, 'Involvement of CD44 in cytoskeleton rearrangement and raft reorganization in T cells', *Journal of Cell Science*, 114 (2001), 1169-1178.
- Fogh**, J, J M Fogh, und T Orfeo, 'One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice', *Journal of the National Cancer Institute*, 59 (1977), 221-226.
- Fox**, S B, J Fawcett, D G Jackson, I Collins, K C Gatter, A L Harris, u. a., 'Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms', *Cancer Research*, 54 (1994), 4539-4546.
- Fraker**, P J, L E King, D Lill-Elghanian, und W G Telford, 'Quantification of apoptotic events in pure and heterogeneous populations of cells using the flow cytometer', *Methods in Cell Biology*, 46 (1995), 57-76.
- Frisch**, S M, und H Francis, 'Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis', *The Journal of Cell Biology*, 124 (1994), 619-626.
- Gallatin**, W M, I L Weissman, und E C Butcher, 'A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes', *Nature*, 304 (1983), 30-34.
- Ghatak**, Shibnath, Suniti Misra, und Bryan P Toole, 'Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway', *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002), 38013-38020.
- Ghotra**, Veerander P S, Jordi C Puigvert, und Erik H J Danen, 'The cancer stem cell microenvironment and anti-cancer therapy', *International Journal of Radiation Biology*, 85 (2009), 955-962.
- Gilcrease**, Michael Z, Shannan K Kilpatrick, Wendy A Woodward, Xiao Zhou, Marlo M Nicolas, Lynda J Corley, u. a., 'Coexpression of alpha6beta4 integrin and guanine nucleotide exchange factor Net1 identifies node-positive breast cancer patients at high risk for distant metastasis', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18 (2009), 80-86.
- Goldstein**, L A, und E C Butcher, 'Identification of mRNA that encodes an alternative form of H-CAM(CD44) in lymphoid and nonlymphoid tissues', *Immunogenetics*, 32 (1990), 389-397.
- Günthert**, U, M Hofmann, W Rudy, S Reber, M Zöller, I Haussmann, u. a., 'A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells', *Cell*, 65 (1991), 13-24.

- Guy, R, E Yefenof, D Naor, A Dorogin, und Y Zilberman**, 'CD44 co-stimulates apoptosis in thymic lymphomas and T cell hybridomas', *Cellular Immunology*, 216 (2002), 82-92.
- Hao, S, Z Ye, F Li, Q Meng, M Qureshi, J Yang, u. a.**, 'Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes', *Experimental Oncology*, 28 (2006), 126-131.
- Hemler, Martin E**, 'Tetraspanin functions and associated microdomains', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6 (2005), 801-811.
- Herlevsen, Mikael, Dirk-Steffen Schmidt, Kaoru Miyazaki, und Margot Zöller**, 'The association of the tetraspanin D6.1A with the alpha6beta4 integrin supports cell motility and liver metastasis formation', *Journal of Cell Science*, 116 (2003), 4373-4390.
- Hermann, Patrick C, Stephan L Huber, Tanja Herrler, Alexandra Aicher, Joachim W Ellwart, Markus Guba, u. a.**, 'Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer', *Cell Stem Cell*, 1 (2007), 313-323.
- Hernández-Muñoz, Inmaculada, Anouchka Skoudy, Francisco X Real, und Pilar Navarro**, 'Pancreatic ductal adenocarcinoma: cellular origin, signaling pathways and stroma contribution', *Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP)*, 8 (2008), 462-469.
- Hirano, H, G R Screaton, M V Bell, D G Jackson, J I Bell, und R J Hodes**, 'CD44 isoform expression mediated by alternative splicing: tissue-specific regulation in mice', *International Immunology*, 6 (1994), 49-59.
- Hiratsuka, Sachie, Akira Watanabe, Yoshiko Sakurai, Sachiko Akashi-Takamura, Sachie Ishibashi, Kensuke Miyake, u. a.**, 'The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase', *Nature Cell Biology*, 10 (2008), 1349-1355.
- Ho, Maria M, Alvin V Ng, Stephen Lam, und Jaclyn Y Hung**, 'Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells', *Cancer Research*, 67 (2007), 4827-4833.
- Immervoll, Heike, Dag Hoem, Per Øystein Sakariassen, Ole Johnny Steffensen, und Anders Molven**, 'Expression of the "stem cell marker" CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas', *BMC Cancer*, 8 (2008), 48.
- Ishii, S, R Ford, P Thomas, A Nachman, G Steele, und J M Jessup**, 'CD44 participates in the adhesion of human colorectal carcinoma cells to laminin and type IV collagen', *Surgical Oncology*, 2 (1993), 255-264.
- Iwasaki, Hiroko, und Toshio Suda**, 'Cancer stem cells and their niche', *Cancer Science*, 100 (2009), 1166-1172.
- Jakóbiak, Marek, Witold Lasek, und Jakub Gołab**, 'Natural mechanisms protecting against cancer', *Immunology Letters*, 90 (2003), 103-122.

- Jang**, Chan Ho, In Ae Lee, Young Ran Ha, Jinkyu Lim, Mi-Kyung Sung, Sung-Joon Lee, u. a., 'PGK1 induction by a hydrogen peroxide treatment is suppressed by antioxidants in human colon carcinoma cells', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72 (2008), 1799-1808.
- Janowska-Wieczorek**, Anna, Marcin Wysoczynski, Jacek Kijowski, Leah Marquez-Curtis, Bogdan Machalinski, Janina Ratajczak, u. a., 'Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer', *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 113 (2005), 752-760.
- Jimeno**, Antonio, Georg Feldmann, Ana Suárez-Gauthier, Zeshaan Rasheed, Anna Solomon, Gang-Ming Zou, u. a., 'A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development', *Molecular Cancer Therapeutics*, 8 (2009), 310-314.
- Johnston**, Laura A, 'Competitive interactions between cells: death, growth, and geography', *Science (New York, N.Y.)*, 324 (2009), 1679-1682.
- Johnstone**, Rose M, 'Exosomes biological significance: A concise review', *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 36 (2006), 315-321.
- Joyce**, Johanna A, Craig Freeman, Nicole Meyer-Morse, Christopher R Parish, und Douglas Hanahan, 'A functional heparan sulfate mimetic implicates both heparanase and heparan sulfate in tumor angiogenesis and invasion in a mouse model of multistage cancer', *Oncogene*, 24 (2005), 4037-4051.
- Kang**, Soo-Young, und Randolph S Watnick, 'Regulation of tumor dormancy as a function of tumor-mediated paracrine regulation of stromal Tsp-1 and VEGF expression', *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 116 (2008), 638-647.
- Kang**, Yibin, 'Analysis of cancer stem cell metastasis in xenograft animal models', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 568 (2009), 7-19.
- Kaplan**, Rosandra N, Rebecca D Riba, Stergios Zacharoulis, Anna H Bramley, Loïc Vincent, Carla Costa, u. a., 'VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche', *Nature*, 438 (2005), 820-827.
- Kazerounian**, S, K O Yee, und J Lawler, 'Thrombospondins in cancer', *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65 (2008), 700-712.
- Keller**, Sascha, Anne-Kathleen König, Frederik Marmé, Steffen Runz, Silke Wolterink, Dominique Koensgen, u. a., 'Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes', *Cancer Letters*, 278 (2009), 73-81.
- Kennel**, S J, T K Lankford, L J Foote, S G Shinpock, und C Stringer, 'CD44 expression on murine tissues', *Journal of Cell Science*, 104 (Pt 2) (1993), 373-382.
- Kessenbrock**, Kai, Vicki Plaks, und Zena Werb, 'Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment', *Cell*, 141 (2010), 52-67.

- Khaldoyanidi**, Sophia, 'Directing stem cell homing', *Cell Stem Cell*, 2 (2008), 198-200.
- Khan**, S A, C A Lopez-Chua, J Zhang, L W Fisher, E S Sørensen, und D T Denhardt, 'Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors', *Journal of Cellular Biochemistry*, 85 (2002), 728-736.
- Kimmel**, K A, und T E Carey, 'Altered expression in squamous carcinoma cells of an orientation restricted epithelial antigen detected by monoclonal antibody A9', *Cancer Research*, 46 (1986), 3614-3623.
- Klingbeil**, Pamela, Rachid Marhaba, Thorsten Jung, Robert Kirmse, Thomas Ludwig, und Margot Zöller, 'CD44 variant isoforms promote metastasis formation by a tumor cell-matrix cross-talk that supports adhesion and apoptosis resistance', *Molecular Cancer Research: MCR*, 7 (2009), 168-179.
- Klingbeil**, Pamela, Isoform-specific loss of CD44 interferes with different aspects of the metastatic process. *PhD Thesis, University of Heidelberg, Germany (2007)*.
- Klosek**, Sebastian K, Koh-ichi Nakashiro, Shingo Hara, Hiroyuki Goda, Hitoshi Hasegawa, und Hiroyuki Hamakawa, 'CD151 regulates HGF-stimulated morphogenesis of human breast cancer cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379 (2009), 1097-1100.
- Knudsen**, Beatrice S, und George Vande Woude, 'Showering c-MET-dependent cancers with drugs', *Current Opinion in Genetics & Development*, 18 (2008), 87-96.
- Knudson**, W, 'Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion', *The American Journal of Pathology*, 148 (1996), 1721-1726.
- Knudson**, W, C Biswas, und B P Toole, 'Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81 (1984), 6767-6771.
- Kobayashi**, Hiroshi, Mika Suzuki, Naohiro Kanayama, Takashi Nishida, Masaharu Takigawa, und Toshihiko Terao, 'CD44 stimulation by fragmented hyaluronic acid induces upregulation of urokinase-type plasminogen activator and its receptor and subsequently facilitates invasion of human chondrosarcoma cells', *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 102 (2002), 379-389.
- König**, H, J Moll, H Ponta, und P Herrlich, 'Trans-acting factors regulate the expression of CD44 splice variants', *The EMBO Journal*, 15 (1996), 4030-4039.
- Kucia**, Magda, Ryan Reza, Katarzyna Miekus, Jens Wanzeck, Wojtek Wojakowski, Anna Janowska-Wieczorek, u. a., 'Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 23 (2005), 879-894.

- Kuhn**, Sebastian, Moritz Koch, Tobias Nübel, Markus Ladwein, Dalibor Antolovic, Pamela Klingbeil, u. a., 'A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression', *Molecular Cancer Research: MCR*, 5 (2007), 553-567.
- Laemmli**, U K, 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227 (1970), 680-685.
- Lafourcade**, Céline, Komla Sobo, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Jérôme Garin, und F Gisou van der Goot, 'Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization', *PloS One*, 3 (2008), e2758.
- Langbein**, Lutz, Ulrich-Frank Pape, Christine Grund, Caecilia Kuhn, Silke Praetzel, Ingrid Moll, u. a., 'Tight junction-related structures in the absence of a lumen: occludin, claudins and tight junction plaque proteins in densely packed cell formations of stratified epithelia and squamous cell carcinomas', *European Journal of Cell Biology*, 82 (2003), 385-400.
- LeBedis**, Christina, Keguan Chen, Lucia Fallavollita, Tarek Boutros, und Pnina Brodt, 'Peripheral lymph node stromal cells can promote growth and tumorigenicity of breast carcinoma cells through the release of IGF-I and EGF', *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 100 (2002), 2-8.
- Lehnert**, L, M M Lerch, Y Hirai, M L Kruse, W Schmiegel, und H Kalthoff, 'Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin in vitro', *The Journal of Cell Biology*, 152 (2001), 911-922.
- Lewis**, Claire E, und Jeffrey W Pollard, 'Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments', *Cancer Research*, 66 (2006), 605-612.
- Li**, Chenwei, David G Heidt, Piero Dalerba, Charles F Burant, Lanjing Zhang, Volkan Adsay, u. a., 'Identification of pancreatic cancer stem cells', *Cancer Research*, 67 (2007), 1030-1037.
- Li**, R, N Wong, M D Jabali, und P Johnson, 'CD44-initiated cell spreading induces Pyk2 phosphorylation, is mediated by Src family kinases, and is negatively regulated by CD45', *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001), 28767-28773.
- Lie**, K-I, C M Press, P McCullagh, S J McClure, und T Landsverk, 'Differentiation of the follicle-associated epithelium in ileal Peyer's patch and production of 50-nm particles are maintained in B-cell-depleted fetal sheep', *Cell and Tissue Research*, 319 (2005), 395-404.
- Lingwood**, Daniel, und Kai Simons, 'Lipid rafts as a membrane-organizing principle', *Science (New York, N.Y.)*, 327 (2010), 46-50.
- Lokeshwar**, V B, und L Y Bourguignon, 'Post-translational protein modification and expression of ankyrin-binding site(s) in GP85 (Pgp-1/CD44) and its biosynthetic precursors during T-lymphoma membrane biosynthesis', *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (1991), 17983-17989.

- Lokeshwar**, V B, N Fregien, und L Y Bourguignon, 'Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function', *The Journal of Cell Biology*, 126 (1994), 1099-1109.
- Mallegol**, J, G van Niel, und M Heyman, 'Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes', *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 35 (2005), 11-16.
- Marhaba**, R, und M Zöller, 'CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation', *Journal of Molecular Histology*, 35 (2004), 211-231.
- Marhaba**, Rachid, Mehdi Bourouba, und Margot Zöller, 'CD44v6 promotes proliferation by persisting activation of MAP kinases', *Cellular Signalling*, 17 (2005), 961-973.
- Marhaba**, Rachid, Mehdi Bourouba, und Margot Zöller, 'CD44v7 interferes with activation-induced cell death by up-regulation of anti-apoptotic gene expression', *Journal of Leukocyte Biology*, 74 (2003), 135-148.
- Marhaba**, Rachid, Pamela Klingbeil, Tobias Nuebel, Irina Nazarenko, Markus W Buechler, und Margot Zoeller, 'CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers', *Current Molecular Medicine*, 8 (2008), 784-804.
- Marinkovich**, M Peter, 'Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma', *Nature Reviews. Cancer*, 7 (2007), 370-380.
- Matsui**, T, M Amano, T Yamamoto, K Chihara, M Nakafuku, M Ito, u. a., 'Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho', *The EMBO Journal*, 15 (1996), 2208-2216.
- Matzku**, S, D Komitowski, M Mildenerger, und M Zöller, 'Characterization of BSp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities', *Invasion & Metastasis*, 3 (1983), 109-123.
- Matzku**, S, A Wenzel, S Liu, und M Zöller, 'Antigenic differences between metastatic and nonmetastatic BSp73 rat tumor variants characterized by monoclonal antibodies', *Cancer Research*, 49 (1989), 1294-1299.
- Matzku**, S, H O Werling, C Waller, B Schmalenberger, und H Zankl, 'Clonal analysis of diversity in the BSp73 rat tumor', *Invasion & Metastasis*, 5 (1985), 356-370.
- Mazar**, Andrew P, 'Urokinase plasminogen activator receptor choreographs multiple ligand interactions: implications for tumor progression and therapy', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14 (2008), 5649-5655.
- Mazzieri**, Roberta, Silvia D'Alessio, Richard Kamgang Kenmoe, Liliana Ossowski, und Francesco Blasi, 'An uncleavable uPAR mutant allows dissection of signaling pathways in uPA-dependent cell migration', *Molecular Biology of the Cell*, 17 (2006), 367-378.
- Mehlen**, Patrick, und Alain Puisieux, 'Metastasis: a question of life or death', *Nature Reviews. Cancer*, 6 (2006), 449-458.

- Mercurio**, A M, und I Rabinovitz, 'Towards a mechanistic understanding of tumor invasion-lessons from the alpha6beta 4 integrin', *Seminars in Cancer Biology*, 11 (2001), 129-141.
- Mignot**, G, S Roux, Clotilde Thery, Elodie Ségura, und L Zitvogel, 'Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10 (2006), 376-388.
- Moore**, P S, B Sipos, S Orlandini, C Sorio, F X Real, N R Lemoine, u. a., 'Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4', *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 439 (2001), 798-802.
- Morrison**, H, L S Sherman, J Legg, F Banine, C Isacke, C A Haipek, u. a., 'The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44', *Genes & Development*, 15 (2001), 968-980.
- Naor**, D, R V Sionov, und D Ish-Shalom, 'CD44: structure, function, and association with the malignant process', *Advances in Cancer Research*, 71 (1997), 241-319.
- Naor**, David, Shlomo Nedvetzki, Itshak Golan, Lora Melnik, und Yoram Faitelson, 'CD44 in cancer', *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 39 (2002), 527-579.
- Naor**, David, Shulamit B Wallach-Dayana, Muayad A Zahalka, und Ronit Vogt Sionov, 'Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination', *Seminars in Cancer Biology*, 18 (2008), 260-267.
- Nasreen**, Najmunnisa, Kamal A Mohammed, Joyce Hardwick, Robert D Van Horn, Kerry Sanders, Hasmeena Kathuria, u. a., 'Low molecular weight hyaluronan induces malignant mesothelioma cell (MMC) proliferation and haptotaxis: role of CD44 receptor in MMC proliferation and haptotaxis', *Oncology Research*, 13 (2002), 71-78.
- Niessen**, C M, F Hogervorst, L H Jaspars, A A de Melker, G O Delwel, E H Hulsman, u. a., 'The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin', *Experimental Cell Research*, 211 (1994), 360-367.
- Niessen**, C M, E H Hulsman, E S Rots, P Sánchez-Aparicio, und A Sonnenberg, 'Integrin alpha 6 beta 4 forms a complex with the cytoskeletal protein HD1 and induces its redistribution in transfected COS-7 cells', *Molecular Biology of the Cell*, 8 (1997), 555-566.
- Nieto**, Jacqueline, Michael L Grossbard, und Peter Kozuch, 'Metastatic pancreatic cancer 2008: is the glass less empty?', *The Oncologist*, 13 (2008), 562-576.
- Oliferenko**, S, I Kaverina, J V Small, und L A Huber, 'Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth', *The Journal of Cell Biology*, 148 (2000), 1159-1164.
- Oren**, M, 'The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis', *Cancer Metastasis Reviews*, 11 (1992), 141-148.

- Orian-Rousseau**, Véronique, Linfeng Chen, Jonathan P Sleeman, Peter Herrlich, und Helmut Ponta, 'CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling', *Genes & Development*, 16 (2002), 3074-3086.
- Orian-Rousseau**, Véronique, Helen Morrison, Alexandra Matzke, Thor Kastilan, Giuseppina Pace, Peter Herrlich, u. a., 'Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin', *Molecular Biology of the Cell*, 18 (2007), 76-83.
- Orian-Rousseau**, Véronique, und Helmut Ponta, 'Adhesion proteins meet receptors: a common theme?', *Advances in Cancer Research*, 101 (2008), 63-92.
- Orimo**, Akira, Piyush B Gupta, Dennis C SgROI, Fernando Arenzana-Seisdedos, Thierry Delaunay, Rizwan Naeem, u. a., 'Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion', *Cell*, 121 (2005), 335-348.
- Orlicky**, D J, J G Lieber, C L Morin, und R M Evans, 'Synthesis and accumulation of a receptor regulatory protein associated with lipid droplet accumulation in 3T3-L1 cells', *Journal of Lipid Research*, 39 (1998), 1152-1161.
- Palanisamy**, Viswanathan, Shivani Sharma, Amit Deshpande, Hui Zhou, James Gimzewski, und David T Wong, 'Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes', *PloS One*, 5 (2010), e8577.
- Papathanasiou**, Peter, Joanne L Attema, Holger Karsunky, Naoki Hosen, Yovina Sontani, Gerard F Hoyne, u. a., 'Self-renewal of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells is regulated by Ikaros', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27 (2009), 3082-3092.
- Pellicci**, G, L Lanfrancone, A E Salcini, A Romano, S Mele, M Grazia Borrello, u. a., 'Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors', *Oncogene*, 11 (1995), 899-907.
- Peterson**, R M, Q Yu, I Stamenkovic, und B P Toole, 'Perturbation of hyaluronan interactions by soluble CD44 inhibits growth of murine mammary carcinoma cells in ascites', *The American Journal of Pathology*, 156 (2000), 2159-2167.
- Plow**, Edward F, und Riku Das, 'Enolase-1 as a plasminogen receptor', *Blood*, 113 (2009), 5371-5372.
- Ponta**, Helmut, Larry Sherman, und Peter A Herrlich, 'CD44: from adhesion molecules to signalling regulators', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4 (2003), 33-45.
- Protin**, U, T Schweighoffer, W Jochum, und F Hilberg, 'CD44-deficient mice develop normally with changes in subpopulations and recirculation of lymphocyte subsets', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163 (1999), 4917-4923.
- Puré**, E, und C A Cuff, 'A crucial role for CD44 in inflammation', *Trends in Molecular Medicine*, 7 (2001), 213-221.

- Rabinovitz, I,** und A M Mercurio, 'The integrin alpha 6 beta 4 and the biology of carcinoma', *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 74 (1996), 811-821.
- Rabinovitz, I,** A Toker, und A M Mercurio, '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', *The Journal of Cell Biology*, 146 (1999), 1147-1160.
- Raposo, G,** D Tenza, S Mecheri, R Peronet, C Bonnerot, und C Desaynard, 'Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation', *Molecular Biology of the Cell*, 8 (1997), 2631-2645.
- Reutelingsperger, C P,** und W L van Heerde, 'Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis', *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 53 (1997), 527-532.
- Rösel, M,** C Claas, S Seiter, M Herlevsen, und M Zöller, 'Cloning and functional characterization of a new phosphatidyl-inositol anchored molecule of a metastasizing rat pancreatic tumor', *Oncogene*, 17 (1998), 1989-2002.
- Rubinstein, Eric,** Ahmed Ziyat, Jean-Philippe Wolf, François Le Naour, und Claude Boucheix, 'The molecular players of sperm-egg fusion in mammals', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17 (2006), 254-263.
- Sachs, M,** H Brohmann, D Zechner, T Müller, J Hülsken, I Walther, u. a., 'Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo', *The Journal of Cell Biology*, 150 (2000), 1375-1384.
- Sales, Kevin M,** Marc C Winslet, und Alexander M Seifalian, 'Stem cells and cancer: an overview', *Stem Cell Reviews*, 3 (2007), 249-255.
- Schmidt, Dirk-Steffen,** Pamela Klingbeil, Martina Schnölzer, und Margot Zöller, 'CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM', *Experimental Cell Research*, 297 (2004), 329-347.
- Schofield, R,** 'The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell', *Blood Cells*, 4 (1978), 7-25.
- Schorey, Jeffrey S,** und Sanchita Bhatnagar, 'Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology', *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9 (2008), 871-881.
- Screaton, G R,** M V Bell, D G Jackson, F B Cornelis, U Gerth, und J I Bell, 'Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (1992), 12160-12164.
- Sercu, S,** L Zhang, und J Merregaert, 'The extracellular matrix protein 1: its molecular interaction and implication in tumor progression', *Cancer Investigation*, 26 (2008), 375-384.

- Shapiro**, A L, E Viñuela, und J V Maizel, 'Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28 (1967), 815-820.
- Sharma**, Mahesh C, und Meena Sharma, 'The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: a potential therapeutic target', *Current Pharmaceutical Design*, 13 (2007), 3568-3575.
- Sherman**, L, D Wainwright, H Ponta, und P Herrlich, 'A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth', *Genes & Development*, 12 (1998), 1058-1071.
- Sherman**, L S, T A Rizvi, S Karyala, und N Ratner, 'CD44 enhances neuregulin signaling by Schwann cells', *The Journal of Cell Biology*, 150 (2000), 1071-1084.
- Simon**, Peter O, Jonathan E McDunn, Hiroyuki Kashiwagi, Katherine Chang, Peter S Goedegebuure, Richard S Hotchkiss, u. a., 'Targeting AKT with the proapoptotic peptide, TAT-CTMP: a novel strategy for the treatment of human pancreatic adenocarcinoma', *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 125 (2009), 942-951.
- Sleeman**, J P, S Arming, J F Moll, A Hekele, W Rudy, L S Sherman, u. a., 'Hyaluronate-independent metastatic behavior of CD44 variant-expressing pancreatic carcinoma cells', *Cancer Research*, 56 (1996), 3134-3141.
- Spradling**, A C, T Nystul, D Lighthouse, L Morris, D Fox, R Cox, u. a., 'Stem cells and their niches: integrated units that maintain Drosophila tissues', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 73 (2008), 49-57.
- Sretavan**, D W, L Feng, E Puré, und L F Reichardt, 'Embryonic neurons of the developing optic chiasm express L1 and CD44, cell surface molecules with opposing effects on retinal axon growth', *Neuron*, 12 (1994), 957-975.
- Stern**, M, und R Stern, 'An ELISA-like assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors', *Matrix (Stuttgart, Germany)*, 12 (1992), 397-403.
- Stern**, Robert, Akira A Asari, und Kazuki N Sugahara, 'Hyaluronan fragments: an information-rich system', *European Journal of Cell Biology*, 85 (2006), 699-715.
- Stern**, Robert, und Mark J Jedrzejas, 'Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action', *Chemical Reviews*, 106 (2006), 818-839.
- Stewart**, Delisha A, Carlton R Cooper, und Robert A Sikes, 'Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer', *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 2 (2004), 2.
- Su**, Weiping, David H Gutmann, Arie Perry, Roger Abounader, John Lattera, und Larry S Sherman, 'CD44-independent hepatocyte growth factor/c-Met autocrine loop promotes malignant peripheral nerve sheath tumor cell invasion in vitro', *Glia*, 45 (2004), 297-306.

- Tarbé**, Nesrine, Stephanie Lösch, Helmut Burtscher, Michael Jarsch, und Ulrich H Weidle, 'Identification of rat pancreatic carcinoma genes associated with lymphogenous metastasis', *Anticancer Research*, 22 (2002), 2015-2027.
- Terpe**, H J, H Stark, P Prehm, und U Günthert, 'CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues', *Histochemistry*, 101 (1994), 79-89.
- Théry**, Clotilde, Laurence Zitvogel, und Sebastian Amigorena, 'Exosomes: composition, biogenesis and function', *Nature Reviews. Immunology*, 2 (2002), 569-579.
- Thomas**, S M, und J S Brugge, 'Cellular functions regulated by Src family kinases', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13 (1997), 513-609.
- Toole**, B P, C Biswas, und J Gross, 'Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (1979), 6299-6303.
- Toole**, Bryan P, 'Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue', *Nature Reviews. Cancer*, 4 (2004), 528-539.
- Tremmel**, Martina, Alexandra Matzke, Imke Albrecht, Anna M Laib, Vivienne Olaku, Kurt Ballmer-Hofer, u. a., 'A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis', *Blood*, 114 (2009), 5236-5244.
- Trusolino**, L, A Bertotti, und P M Comoglio, 'A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth', *Cell*, 107 (2001), 643-654.
- Tsang**, Tsun Yee, Wan Yee Tang, Wing Pui Tsang, Ngai Na Co, Siu Kai Kong, und Tim Tak Kwok, 'Downregulation of hepatoma-derived growth factor activates the Bad-mediated apoptotic pathway in human cancer cells', *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 13 (2008), 1135-1147.
- Tsukita**, S, K Oishi, N Sato, J Sagara, A Kawai, und S Tsukita, 'ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons', *The Journal of Cell Biology*, 126 (1994), 391-401.
- Tsukita**, S, und S Yonemura, 'Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins', *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (1999), 34507-34510.
- Vaccariello**, M, A Javaherian, Y Wang, N E Fusenig, und J A Garlick, 'Cell interactions control the fate of malignant keratinocytes in an organotypic model of early neoplasia', *The Journal of Investigative Dermatology*, 113 (1999), 384-391.
- Valenti**, Roberta, Veronica Huber, Manuela Iero, Paola Filipazzi, Giorgio Parmiani, und Licia Rivoltini, 'Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression', *Cancer Research*, 67 (2007), 2912-2915.
- Vescovi**, Angelo L, Rossella Galli, und Brent A Reynolds, 'Brain tumour stem cells', *Nature Reviews. Cancer*, 6 (2006), 425-436.

- Wang, Ning, Jessica D Tytell, und Donald E Ingber, 'Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10 (2009), 75-82.**
- Weaver, V M, A H Fischer, O W Peterson, und M J Bissell, 'The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using a unique human mammary epithelial cell model and a three-dimensional culture assay', *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 74 (1996), 833-851.**
- Weber, B, M Rösel, R Arch, P Möller, und M Zöller, 'Transient expression of CD44 variant isoforms in the ontogeny of the rat: ectoderm-, endoderm- and mesoderm-derived cells express different exon combinations', *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 60 (1996), 17-29.**
- Welsch, T, M W Büchler, und J Schmidt, '[Surgery for pancreatic cancer]', *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 46 (2008), 1393-1403.**
- Weth, R. Vakzinierungsstudien für die Therapie von Tumoren. *Dissertation, Universität Karlsruhe (2002).***
- Wirth, K, R Arch, C Somasundaram, M Hofmann, B Weber, P Herrlich, u. a., 'Expression of CD44 isoforms carrying metastasis-associated sequences in newborn and adult rats', *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 29A (1993), 1172-1177.**
- Würfel, J, M Rösel, S Seiter, C Claas, M Herlevsen, R Weth, u. a., 'Metastasis-association of the rat ortholog of the human epithelial glycoprotein antigen EGP314', *Oncogene*, 18 (1999), 2323-2334.**
- Wysoczynski, Marcin, Janina Ratajczak, Ryan Reca, Magda Kucia, und Mariusz Z Ratajczak, 'The third complement component as modulator of platelet production', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 598 (2007), 226-239.**
- Yáñez-Mó, María, Olga Barreiro, Mónica Gordon-Alonso, Mónica Sala-Valdés, und Francisco Sánchez-Madrid, 'Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes', *Trends in Cell Biology*, 19 (2009), 434-446.**
- Yasuda, M, K Nakano, K Yasumoto, und Y Tanaka, 'CD44: functional relevance to inflammation and malignancy', *Histology and Histopathology*, 17 (2002), 945-950.**
- Yilmaz, Mahmut, Gerhard Christofori, und François Lehenbre, 'Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis', *Trends in Molecular Medicine*, 13 (2007), 535-541.**
- You, Weon-Kyoo, und Donald M McDonald, 'The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis', *BMB Reports*, 41 (2008), 833-839.**
- Yu, Q, und I Stamenkovic, 'Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion', *Genes & Development*, 13 (1999), 35-48.**

- Yu, Wei-Hsuan, J Frederick Woessner, John D McNeish, und Ivan Stamenkovic, 'CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling', *Genes & Development*, 16 (2002), 307-323.**
- Zakharova, Liudmila, Maria Svetlova, und Alla F Fomina, 'T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor', *Journal of Cellular Physiology*, 212 (2007), 174-181.**
- Zhu, Z, O Sanchez-Sweatman, X Huang, R Wiltrout, R Khokha, Q Zhao, u. a., 'Anoikis and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells', *Cancer Research*, 61 (2001), 1707-1716.**
- Zöller, M, 'Joint features of metastasis formation and lymphocyte maturation and activation', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 213 (Pt 1) (1996), 215-247.**
- Zöller, M, S Matzku, und K Goertler, 'High incidence of spontaneous transplantable tumours in BDX rats', *British Journal of Cancer*, 37 (1978), 61-66.**
- Zöller, Margot, 'Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis', *Nature Reviews. Cancer*, 9 (2009), 40-55.**

Danksagung

Ich danke ...

- Frau Prof. Dr. Margot Zöller für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas sowie die engagierte und geduldige Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Herrn Dr. Rachid Marhaba und Herrn Dr. Tobias Nübel für die sehr gute Betreuung, die Anregungen und Diskussionen zur Unterstützung meiner Arbeit.
- Dem Land Baden-Württemberg für das zweijährige Promotionsstipendium nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz (LGFG).
- Frau Dr. Kamilla Malinowska, Herrn Dr. Donatello Castellana, Herrn Dr. Uwe Galli, Herrn Dr. Theron Johnson, Herrn Dr. Eberhard Amtmann, Herrn Dr. Tore Kempf, Herrn Dr. Robert Kirmse und Herrn Dr. Christoph Claas für die Unterstützung im Labor, bei der 2D-Elektrophorese, der AFM und dem Life-Cell-Imaging.
- Nicolás Herbert als „bench“-Nachbar für die schöne Zeit.
- den Doktoranden, den Diplomanten und Technikern der Arbeitsgruppe Zöller, für die angenehme Atmosphäre und Ihre stete Hilfsbereitschaft.
- meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden, die mir den Weg bis zu dieser Arbeit ermöglicht haben.
- meiner Freundin Sabine für alles!

Publikationsliste

Publikationen:

Klingbeil P., Marhaba R., **Jung T.**, Kirmse R., Ludwig T. and Zöller M.: CD44 Variant Isoform Promote Metastasis Formation by a Tumor Cell-Matrix Cross-talk That Supports Adhesion and Apoptosis Resistance, *Mol Cancer Res.* 2009; 7 (2) 168-179.

Jung T., Castellana D., Klingbeil P., Hernandez I.C., Vitacolonna M., Orlicky D.J., Roffler S. R., Brodt P. and Zöller M.: CD44v6 Dependence of Premetastatic Niche Preparation by Exosomes. *Neoplasia*, 2009; 11 (10) 1093-1105.

Jung T., Gross W. and Zöller M.: A Tumor Matrix Feedback Triggers via CD44v6 Tumor Cell Motility and Apoptosis Resistance (Submitted).

Abstracts:

Thorsten Jung, Pamela Klingbeil, Rachid Marhaba, Robert Kirmse, Thomas Ludwig and Margot Zöller (2008) Role of CD44v-isoforms in the preparation of metastasis supporting matrix, PhD-Poster-Presentation DKFZ (Heidelberg, November 2008).

Thorsten Jung and Margot Zöller (2008) Lymphogenic metastasis: role of CD44v-isoforms in the signaling of antiapoptotic pathways, 10th Young Scientist Meeting of the German Society for Cell Biology „Biology of Cell Division“ (Heidelberg, 23. – 25. September 2008).

Thorsten Jung, Donatello Castellana, Pamela Klingbeil, Ines Cuesta, Mario Vitacolonna and Margot Zöller (2009) The contribution of CD44v-isoforms, exosomes and soluble factors to pre-metastatic niche preparation, XIV. Graduate Seminar, PhD-Retreat (Weil der Stadt, 16. - 21. July 2009).

Thorsten Jung, Donatello Castellana, Pamela Klingbeil, Ines Cuesta and Margot Zöller (2009) CD44v6-dependence of pre-metastatic niche preparation by exosomes, 3rd European Conference on Tetraspanins “Tetraspanins as potential therapeutic targets” (Villejuif, 10. – 11. September 2009).

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Thorsten Jung
Geburtsdatum: 22. August 1977
Geburtsort: Rastatt
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1984 – 1988: Grund- und Hauptschule Muggensturm
1988 – 1994: Realschule Kuppenheim
1994 – 1997: Technisches Gymnasium Rastatt

Zivildienst:

1997 – 1998: AWO-Rastatt

Studium:

1998 – 2005: Studium der Lebensmittelchemie an der TH-Karlsruhe
2005 – 2006: Staatsexamen an der CVUA-Freiburg

Promotion:

12/2006 – 6/2010: Promotion am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) und am Universitätsklinikum Heidelberg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Margot Zöller

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Dissertation mit dem Thema

**„Molekulare Grundlagen des Beitrags varianter CD44-
Isoformen zur Apoptoseresistenz und
Präparation einer prämetastatischen Nische“**

selbständig und ohne Benutzung anderer, als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht und noch keinem Prüfungsausschuss vorgelegt worden. Die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung wurde beachtet.

Heidelberg, den 28.5.2010

Thorsten Jung