

**Einfluss des TGF- $\beta$ -TypIII-Rezeptors  
Endoglin auf  
das metastatische Verhalten  
von Karzinomzellen der Brust**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Daniel Oxmann

Kiel

2007

Referent : Prof. Dr. rer. nat. Rolf Mentlein

Korreferent : Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Schulz-Friedrich

Tag der mündlichen Prüfung : 13.07.2007

Zum Druck genehmigt : Kiel,

Der Dekan

In Erinnerung an meinen Vater

Werner Wilhelm Oxmann

25.10.42 - 27.11.06

*Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,  
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.*  
Albert Einstein

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Brustkrebserkrankungen	1
1.2 Die Entwicklung von Tumoren	2
1.3 Metastasierungsprozesse: Die metastatische Kaskade	5
1.4 MDA-MB-231-Brusttumorzellen als Modellsystem	8
1.5 Endoglin als potentieller Modulator metastatischer Prozesse	10
<b>1.5.1 Die Transforming Growth Factor (TGF)-<math>\beta</math> Superfamilie</b>	<b>10</b>
<b>1.5.2 Das TGF-<math>\beta</math>-Protein</b>	<b>11</b>
<b>1.5.3 Modulation der TGF-<math>\beta</math>-Signaltransduktion durch Endoglin</b>	<b>13</b>
1.6 Eigenschaften des Endoglin-Proteins (CD105)	16
1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Materialien	22
<b>2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Wachstumsfaktoren</b>	<b>22</b>
<b>2.1.2 Vektoren</b>	<b>24</b>
<b>2.1.3 Kommerziell erhältliche Testsysteme</b>	<b>24</b>
<b>2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterial</b>	<b>25</b>
<b>2.1.5 Medien und Lösungen für die in-vitro-Kultur</b>	<b>27</b>
2.1.5.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur	27
2.1.5.2 Medien für die Bakterienkultur und –Transformation	27
<b>2.1.6 Allgemeine Lösungen und Puffer</b>	<b>28</b>
<b>2.1.7 Zellen und Bakterien</b>	<b>31</b>
2.1.7.1 Kompetente Bakterien	31
2.1.7.2 Zellen humaner Herkunft	31
2.2 Methoden	32
<b>2.2.1 Zellkultur</b>	<b>32</b>
2.2.1.1 Kultivierung von Brusttumor- und Gliomazelllinien	32
2.2.1.2 Kultivierung von humanen Nabelschnur-Endothelzellen	32
2.2.1.3 Subkultivierung von Zellen	33

2.2.1.4 Einfrieren, Lagern und Auftauen von Zellen	34
2.2.2 Zellzahlbestimmungen in der NEUBAUER-Zählkammer	34
2.2.3 Beschichtung von Glasoberflächen für die Zellkultur	35
2.2.4 Herstellung der Vektoren	36
2.2.4.1 Konstruktion der Endoglin-Expressionsvektoren	36
2.2.4.2 Konstruktion des Endoglin-shRNA-Vektors	37
2.2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA im „Mini“-Maßstab	38
2.2.4.4 Analytische und präparative Restriktionshydrolysen	39
2.2.4.5 Analytische Agarosegelelektrophorese	39
2.2.4.6 Agarosegelelektrophorese im präparativen Maßstab	40
2.2.4.7 Reinigung von DNA durch Mikrodialyse	40
2.2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten	40
2.2.4.9 Plasmidpräparation mittels Anionen-Austauschersäulen	40
2.2.5 Etablierung der Klone	42
2.2.5.1 Lipid-vermittelte Transfektion der MDA-MB-231-Zellen	42
2.2.5.2 Zeocin-Selektion transfizierter MDA-MB-231-Zellen	43
2.2.6 Methoden zur Genexpression-Analyse	44
2.2.6.1 „First-Strand“-cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	44
2.2.6.2 Quantitative (Real-time) -RT-PCR	45
2.2.6.3 Isolierung von Proteinen	49
2.2.6.4 Disk-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
2.2.7 Immunogold-Elektronenmikroskopie	54
2.2.8 Immuncytochemische Färbungen	55
2.2.9 Mikrochemotaxis-Kammer (Boyden-Kammer)	56
2.2.10 Proliferationsversuche	58
2.2.11 Verletzungsinduzierte Migration („Scratch-Test“)	61
2.2.12 Markierung von Zellen mit Fluoreszenz-Vitalfarbstoffen	61
2.2.13 Herstellung von Sphäroid-Aggregatkulturen	62
2.2.14 Sphäroid-Aggregat-Konfrontation und Detektion	63
2.2.15 In-vitro-Test auf vaskulogene Mimikry und Röhrenbildung	63
3. Ergebnisse	65
3.1 Promotor-Aktivität des Hypoxia-Response-Elements	65
3.2 Erzeugung von Zelllinien mit modifizierter CD105-Expression	66
3.2.1 Herstellung des L-Endoglin-Expressionsvektors	67
3.2.2 Herstellung des S-Endoglin-Expressionsvektors	70
3.2.3 Herstellung des Endoglin-shRNA-Vektors	71

<b>3.2.4 Sequenzierung der Klone</b>	<b>73</b>
<b>3.2.5 Stabile Transfektion der MDA-MB-231-Zelllinien</b>	<b>75</b>
3.3 Endoglin-Expressionsniveau der MDA-MB-231-Zelllinien	76
<b>3.3.1 Endoglin-Expression in MDA-MB-231-Zelllinien         und Vergleichszellen (Real-time-RT-PCR)</b>	<b>76</b>
<b>3.3.2 Immunocytochemische Darstellung von Endoglin und ZRP-1</b>	<b>79</b>
<b>3.3.3 Endoglin-Expression in MDA-MB-231 Zellen (Western-Blot)</b>	<b>81</b>
3.4 Elektronenmikroskopische Darstellung subzellulärer Details	83
<b>3.4.1 Metastasierungs-relevante Strukturen: Invadopodien und         Membranvesikel</b>	<b>83</b>
<b>3.4.2 Subzelluläre Lokalisation von Endoglin im Klon L-End-3</b>	<b>85</b>
3.5 Die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion in MDA-MB-231-Zellen	86
<b>3.5.1 Einfluss des Endoglin-Proteins auf die Expression von         Zielgenen des TGF-<math>\beta</math>/ALK-1-Signaltransduktionsweges</b>	<b>86</b>
3.5.1.1 Einfluss von Endoglin auf die Id1-Expression	86
3.5.1.2 Dosisabhängigkeit der TGF- $\beta$ 1-bedingten Id1-Induktion	87
3.5.1.3 Dosisabhängigkeit der TGF- $\beta$ 1-bedingten Tie-1-Induktion	89
<b>3.5.2 Einfluss des Endoglin-Proteins auf die Expression von         Zielgenen des TGF-<math>\beta</math>/ALK-5-Signaltransduktionswegs</b>	<b>91</b>
<b>3.5.3 Endoglin-modulierte Expression von Matrix-Metalloproteinasen</b>	<b>92</b>
3.6 Proliferationsverhalten der MDA-MB-231-Zelllinien	93
3.7 Untersuchung der Läsions-induzierten Zellmigration	96
3.8 Invasivität der verschiedenen MDA-MB-231-Zelllinien	97
<b>3.8.1 Bestimmung der in-vitro Invasivität mittels         Mikrochemotaxis-Kammer</b>	<b>97</b>
<b>3.8.2 In-vitro Invasivität in einem dreidimensionalen System:         Sphäroid-Konfrontations-Assay</b>	<b>100</b>
3.9 Einfluss von Endoglin auf vaskulogene Mimikry (VM) und die Ausbildung tubulärer Strukturen	106
<b>3.9.1 Matrigel-induzierte Bildung von VM-Strukturen</b>	<b>106</b>
<b>3.9.2 Wachstum von Endothelzellen (HUVEC) auf         Extrazellulär-Matrix-Protein-beschichteten Oberflächen</b>	<b>110</b>
<b>3.9.3 Ausbildung tubulärer Strukturen bei MDA-MB-231-Zellen</b>	<b>111</b>

4. Diskussion	113
4.1 Die „seed and soil“-Theorie der metastatischen Tumorzell-Disseminierung	113
4.2 Organspezifische Metastasierung	114
4.3 Prometastatische Faktoren	115
<b>4.3.1 Der Epithel-Mesenchym-Übergang</b>	<b>115</b>
<b>4.3.2 Einfluss von Proteinasen auf die Metastasierung</b>	<b>117</b>
4.3.2.1 Matrix-Metalloproteinasen	117
4.3.2.2 Plasmin-assoziierte Proteinase: PAI-1 und uPA	122
<b>4.3.3 Potentielle molekulare Grundlagen der Migrations- und Invasionssteigerung</b>	<b>123</b>
4.3.3.1 Modulation der Zellmigration durch das Zytoskelettprotein ZRP-1	123
4.3.3.2 Der Transkriptionsfaktor Id1 als Zielgen des TGF- $\beta$ /ALK-1-Wegs	124
<b>4.3.4 Einfluss von Invadopodien auf die Tumorzellinvasion</b>	<b>126</b>
<b>4.3.5 Freisetzung von Membranvesikeln durch MDA-MB-231-Tumorzellen</b>	<b>130</b>
<b>4.3.6 Metastasierungsförderung durch Angiogenese-ähnliche Prozesse</b>	<b>135</b>
4.3.6.1 Vaskulogene Mimikry (VM)	135
4.3.6.2 In-vitro-Röhrenbildung bei MDA-MB-231-Brustkarzinomzellen	137
4.3.6.3 Das Phänomen der Pseudo-Vaskulogenese	138
Abbildungsverzeichnis	165
Tabellenverzeichnis	168

## Zusammenfassung

Die Zellen der Brustkarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 sind zwar epithelialen Ursprungs, haben aber im Laufe der Tumorprogression wesentliche Merkmale mesenchymaler Zellen angenommen. Werden sie in eine immundefiziente Maus transplantiert, so erfolgt innerhalb von ein bis zwei Monaten eine metastatische Kolonisierung von Knochengewebe, sowie Lunge, Leber und Hirn. Während einer Studie wurden mittels mehrmaliger in-vivo-Passage Zelllinien erzeugt, die ausschließlich in das Hirngewebe absiedeln. Bei der Analyse dieser Zelllinien konnten mit Hilfe eines cDNA-Mikro-Arrays Gene identifiziert werden, die in den hirnmetastasierenden Zellen (MDA-MB-231-Brain) und denen der Ausgangszelllinie (MDA-MB-231-Parental) differentiell exprimiert werden. Relevante Expressionsunterschiede zeigten sich besonders im Fall des TGF- $\beta$ -Typ-III-Rezeptors Endoglin, weshalb die Bedeutung von Endoglin für Metastasierungsvorgänge dieser Karzinomzellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte.

Hierfür wurden zunächst Klone mit modulierter Endoglin-Expression erzeugt. Da Endoglin in zwei verschiedenen „Splice“-Variaten auftritt, wurden sowohl L-Endoglin-, als auch S-Endoglin-überexprimierende Klone der parentalen MDA-MB-231-Zelllinie erzeugt (Linien: L-End-3 und S-End-8). Während S-Endoglin in-vivo vermutlich nur eine untergeordnete Rolle spielt, eignet es sich in-vitro als exzellentes „molekulares Werkzeug“ bei der Funktionsaufklärung von Endoglin. In einem gegensätzlichen Ansatz wurde zusätzlich die Endoglin-Expression der hirnmetastasierenden Zelllinie unter Verwendung eines shRNA (small-hairpin-RNA)-Vektors gesenkt (Linie: MDA-MB-231-PSU-7).

Bei der Charakterisierung der Zellen zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung zwischen L-End-3- und MDA-MB-231-Brain-Zellen. So weisen beide Linien, im Vergleich zu parentalen MDA-MB-231-Zellen, ein höheres in-vitro Invasions-Potential auf und sind zudem mit weiteren Metastasierungs-relevanten Eigenschaften ausgestattet. Unter Serum-freien Bedingungen vermehren sich nur diese Zellen, während die Zellpopulationen der Linien MDA-MB-231-Parental und MDA-MB-231-S-End-8 sogar schrumpfen. Desweiteren ist die künstliche Reduktion der Endoglin-Synthese in der Zelllinie PSU-7 mit einer verringerten Überlebensfähigkeit assoziiert. L-Endoglin scheint demnach die Proliferationsrate zu erhöhen oder die Apoptoserate zu senken.

Die L-Endoglin-überexprimierenden Zellen zeigten darüber hinaus im Wundheilungs („Scratch“)-Test eine gesteigerte Zellmotilität. Im Klon L-End-3 konnte eine veränderte Lokalisation des Endoglin-Interaktionsproteins ZRP (Zyxin related protein)-1 festgestellt werden, wobei derartigen ZRP-1-Translokationen eine Migrations-fördernde Wirkung zugeschrieben wird. Eine Reduktion der Endoglin-Expression in MDA-MB-231-Brain-Zellen führte demgegenüber zu einer gehemmten Motilität (MDA-MB-231-PSU7).

Das invasive Verhalten der Zellen wurde zunächst in der Mikrochemotaxis-Kammer, dann in einem neu etablierten 3-dimensionalen Sphäroid-Konfrontations-Test, bestimmt. In der Mikrochemotaxis-Kammer wiesen L-End-3-Zellen eine höhere, S-End-8-Zellen hingegen eine niedrigere Invasivität auf, als Zellen der Ursprungslinie. Da die Zellen während des Experiments eine Beschichtung aus extrazellulär-Matrix (ECM) -Proteinen passieren mussten, deuten die Ergebnisse auf

eine gesteigerte proteolytische Aktivität der L-Endoglin-exprimierenden Zellen hin. Entsprechend durchquerten Endoglin-reduzierte PSU-7-Zellen die ECM-Barriere in einem geringeren Ausmaß als unveränderte MDA-MB-231-Brain-Zellen.

Da es sich bei dem letztgenannten Versuch um ein sehr reduziertes Testsystem handelt, sollte das invasive Verhalten zusätzlich in einem dreidimensionalen Versuchsansatz, dem Sphäroid-Konfrontations-Test, überprüft werden. Hierbei werden fluoreszenzmarkierte Sphäroide zweier Zelltypen in unmittelbare Nachbarschaft zueinander gebracht. Im vorliegenden Fall dienten U343-Glioblastoma-Zellen als in-vitro-Modell für Hirngewebe. Aufgrund der unterschiedlichen Markierung beider Zelltypen konnte mittels dieses Tests gezeigt werden, dass L-Endoglin-exprimierende MDA-MB-231-Zellen unter den gewählten Versuchsbedingungen sehr schnell dissoziieren, dann in Richtung der U343-Zellen wandern und schließlich in deren Zellverband einwandern. Während die Gliomazellen offenbar keinen chemotaktischen Reiz auf parentale MDA-MB-231-Zellen ausüben, lagerten sich S-Endoglin-exprimierende MDA-MB-231-Zellen zwar an U343-Zellverbände an, zeigten aber kein invasives Verhalten.

Eine weitere Endoglin-abhängige Eigenschaft von MDA-MB-231-Brusttumorzellen ließ sich mit Hilfe eines, im Rahmen dieser Arbeit etablierten, Tests auf vaskulogene Mimikry (VM) und in-vitro-Röhrenbildung demonstrieren. Die Zellen wurden zunächst mit Fluoreszenzfarbstoffen beladen und dann wahlweise auf Matrigel oder einem Matrigel / Kollagen-Typ-I-Gemisch kultiviert. Auf einem Untergrund aus Matrigel organisierten sich MDA-MB-231-L-End-3 und -Brain-Zellen in Form VM-typischer Netzwerke, während parentale MDA-MB-231-Zellen sind hierzu nicht befähigt waren. In Anwesenheit von Kollagen-Typ-I bildeten L-End-3-Zellen röhrenförmige Strukturen. Mit Hilfe dieses Phänomens wird die Fähigkeit von Endothelzellen zur Ausbildung von Gefäßen beurteilt. Werden L-End-3 und Endothelzellen unterschiedlich markiert und dann kokultiviert, so zeigt sich eine Kooperation beider Zelltypen, wobei die röhrenförmigen Strukturen ein mosaikartiges Aussehen aufweisen.

Es ist bekannt, dass an der Ausbildung derartiger Strukturen Gene beteiligt sind, die über den TGF- $\beta$ /ALK-1-Weg induziert werden. Es handelt sich hierbei um einen Signaltransduktionsweg der hauptsächlich in Endothelzellen vorkommt und in Konkurrenz zum weit verbreiteten TGF- $\beta$ /ALK-5-Weg tritt.

Eine Überexpression des Endoglin-Proteins erhöht also das invasive Potential der Zellen, die Überlebensfähigkeit unter serumfreien Bedingungen und die Fähigkeit, an Angiogenese-ähnliche Prozessen teilzunehmen. Diese Eigenschaften beeinflussen den metastatischen Charakter von Zellen in direkter Weise und erklären die klinische Erfahrung, dass eine erhöhte Endoglin-Expression mit der Ausbildung von Fernmetastasen und schlechter Prognose bei Brustkrebs assoziiert ist.

# 1. Einleitung

## 1.1 Brustkrebserkrankungen

Brusttumore gehören zu den häufigsten malignen Erkrankungen in der Bevölkerung, wobei nahezu jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens eine Brustkrebserkrankung entwickelt. Im Jahre 1990 starben weltweit nachweislich etwa 325.000 Frauen an Brusttumoren. In den industrialisierten Ländern ist diese Art der Erkrankung für 16% aller Krebs-bedingten Todesfälle verantwortlich (Parkin et al., 1992). Trotz der hohen Inzidenz sind bislang nur wenige Faktoren bekannt, die das Risiko für eine Ausbildung von Brusttumoren beeinflussen.

Vor allem das Alter gilt als der bedeutendste Risikofaktor, eine entscheidende Rolle bei der Auslösung von Brustkrebs scheinen aber auch Östrogene und Progesterone zu spielen (Levi et al., 1996). Die Rezeptoren beider Steroidhormone sind im gesamten Brustgewebe, also auch im Epithel von Ausführungsgängen und Drüsenendstücken, vertreten. Die Liganden regulieren hier über ihre entsprechenden Rezeptoren die Zellproliferation im Rahmen des Menstruationszyklus (Henson und Tarone, 1994; Gusterson et al., 1996; Osborne, 1996). Während Östrogene die Proliferation steigern, wirkt Progesteron in der zweiten Hälfte des Menstruationszyklus in gegensätzlicher Weise.

Da es sich nur bei einem Prozent der Brustkrebserkrankten um Männer handelt (Levi et al., 1996) und zudem Frauen mit niedrigem Östrogen-Spiegel ebenfalls nur sehr selten betroffen sind, scheinen Brusttumore generell in einem Hormon-abhängigen Kontext zu entstehen (Lupulescu, 1993). Obwohl Östrogen als einer der Hauptfaktoren bei der Entstehung von Brusttumoren angesehen wird, gilt der Östrogen-Rezeptor im Fall einer bestehenden Brustkrebserkrankung als Marker für eine positive Prognose (Mansour et al., 1994; McGuire und Clarke, 1992). Dies liegt daran, dass die Expression des Östrogen-Rezeptors im Laufe der Tumorprogression eingestellt wird, weshalb sich Östrogen-Rezeptor-negative Brusttumore bereits in einer fortgeschrittenen, aggressiven Phase der Erkrankung befinden. In diesem Stadium haben die betreffenden Zellen genetische Veränderungen erworben, die ein Hormon-unabhängiges Wachstum ermöglichen. Dieses kann über eine Induktion von Onkogenen (*myc*, *int-2*, *c-erbB2*) oder eine Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen (*p53*, *brca1*, *mst1*) erfolgen. Möglicherweise kann der Östrogen-Rezeptor auch Hormon-unabhängig durch MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen aktiviert werden. Auf diese Weise sollen beispielsweise EGF, IGF-1 (insulin-like growth factor-1) und Heregulin (Her-2/neu, Gen: *c-erbB2*) den Phosphorylierungs-Status des Östrogen-Rezeptors beeinflussen können (Kato et al., 1995).

Dementsprechend ist auch eine Überexpression von *egf-R*, *c-erbB-2* und *ras* mit schlechter Prognose assoziiert. Eine übermäßige Aktivierung des Her-2/neu-Signaltransduktionswegs hat zum Teil dramatische Auswirkungen auf die Zellproliferation, Apoptose-Resistenz, Migration und Invasion (Yarden und Slikowski, 2001). Trastuzumab (Herceptin; Genentech, San Franzisko, Ca, USA), ein rekombinanter, humanisierter Antikörper (monoklonal) gegen die extrazelluläre Domäne von Heregulin (Her-2/neu) wurde bereits bei Patientinnen mit metastasierenden Brusttumoren eingesetzt und verlängerte hier die mittlere Überlebensdauer nach Diagnostizierung der Erkrankung (Slamon et al., 2001).

Zudem sind etwa 5-10% der Brustkrebserkrankungen erblich bedingt, wobei der größte Anteil der genetischen Vorbelastungen mit den Genen *brca-1* und *brca-2* assoziiert ist. Von Keimbahnmutationen sind zudem oft Gene betroffen, die für p53 und die Rezeptoren von Östrogen und Androgenen kodieren. Abnormale p53-Proteine von Tumorzellen besitzen häufig die Fähigkeit, Promotoren zu aktivieren, die vom Wildtyp-p53-Protein nicht induziert werden. Auf diese Weise kann die Transkription von Genen aktiviert werden, die für den EGF (Epidermal growth factor)-Rezeptor (Deb et al., 1994), c-Myc (Frazier et al., 1998) und c-Fos (Preuss et al., 2000) kodieren. MDA-MB-231-Zellen synthetisieren große Mengen einer mutierten Form des p53-Proteins (Hui et al., 2006), welches in der Aminosäure 280 ein Lysin, anstelle eines Arginins, aufweist (Bartek et al., 1990).

## 1.2 Die Entwicklung von Tumoren (Karzinogenese)

Die Tumorbildung ist ein komplexer Prozess, bestehend aus einer Reihe von einzelnen Schritten, in denen Zellen bestimmte, tumorfördernde/transformierende Funktionen erwerben (Hanahan und Weinberg, 2000). Diese Eigenschaften sind bei Zellen beinahe jeder menschlichen Krebserkrankung anzutreffen und beinhalten: Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Faktoren, Proliferation in Abwesenheit von exogenen Wachstumsfaktoren, keine Begrenzung des Replikationspotentials, Sicherung der eigenen Blutversorgung durch Angiogenese, Inhibierung von Apoptose, Umgehen einer Immunantwort und die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (Elliot und Blobel, 2005).

Der Erwerb dieser Tumormerkmale wird durch ein generelles Kennzeichen von Krebszellen gefördert, ihrer genomischen Instabilität. Entsprechende Prozesse sollen im folgenden Abschnitt dargestellt werden.

### Das Mehrstufenkonzept der Karzinogenese

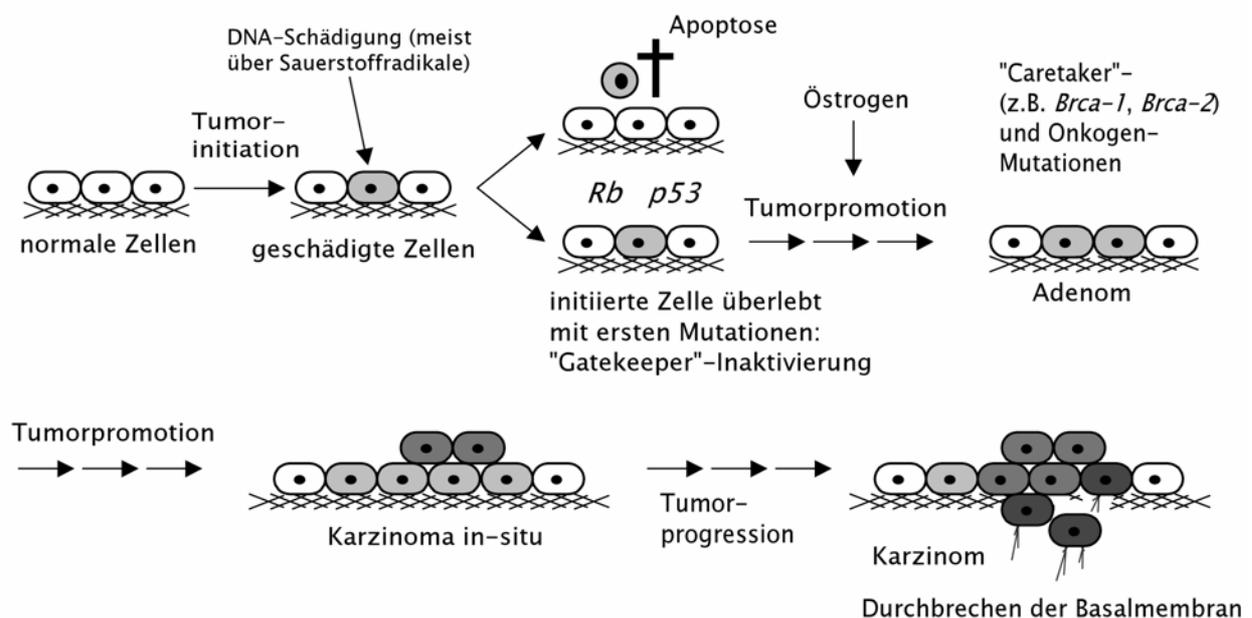
#### Initiation der Karzinogenese

Bei der Entstehung eines Tumors handelt es sich um einen komplexen Vorgang, der aus einer Abfolge mehrerer Stadien besteht und sich in der Regel über einen Zeitraum von Jahren erstreckt. Der Prozess wird sowohl durch erbliche Faktoren (genetische und epigenetische Mechanismen) als auch durch Umweltfaktoren beeinflusst. Durch das Einwirken von Umweltfaktoren, wie z.B. ionisierende Strahlung, kanzerogene (genotoxische) Substanzen und Viren erfolgt eine Schädigung zellulärer DNA (Initiation der Kanzerogenese). Zellen mit veränderter DNA, so genannte initiierte Zellen, werden meist aus dem Zellverband abgestoßen und gehen über den Mechanismus der Apoptose zugrunde. Sie können aber auch jahrelang inaktiv fortbestehen oder über die Entwicklungsstufen der Promotion, Transformation und klonalen Expansion selektiv zum Tumor weiterwachsen (siehe Abb. 1.1).

Im Laufe der Evolution haben sich in Zellen Mechanismen entwickelt, die einer Krebsentwicklung entgegenwirken. Die hierbei beteiligten Tumorsuppressoren werden derzeit in zwei Kategorien klassifiziert, die so genannten „Gatekeeper“- und „Caretaker“-Suppressoren (Kinzler und Vogelstein, 1997).

„Gatekeeper“-Proteine limitieren auf direktem Wege das Tumorwachstum, indem sie eine Wachstumsinhibition oder Apoptose-Induktion herbeiführen. Die Wirkung von „Gatekeeper“-Proteinen ist oft Gewebe-spezifisch, woraus in der Regel eine besondere Form der Krebsdisposition resultiert. Beispiele hierfür sind das *apc* (*Adenomatöse Polyposis Coli*)-Gen des Dickdarmkarzinoms, das *wt* (*Wilms-Tumor*)-Gen für Nierenkarzinome und das *rb* (*Retinoblastoma*)-1-Gen des Retinoblastoms.

Ein weiteres Gen dieser Gruppe ist das Tumorsuppressor-Gen *p53*. In mehr als 50% aller humanen Krebserkrankungen weist das *p53*-Gen Mutationen auf, es ist damit das am häufigsten mutierte Gen bei der malignen Entartung von Zellen (Hainaut und Hollstein, 2000). Während bei anderen Tumorsuppressor-Genen, wie *apc* und *rb*, meist Mutationen mit Funktionsverlust auftreten, handelt es sich bei den genetischen Veränderungen des *p53*-Gens in der Regel um missense-Mutationen (Hainaut und Hollstein, 2000). Während der Initiation der Tumorentwicklung erwerben meist „Gatekeeper“-Gene genetische Veränderungen und verursachen nun in den betroffenen Zellen eine Erhöhung der Proliferationsrate, was wiederum weitere Mutationsereignisse fördert. „Caretaker“-Genmutationen (s.u.) bilden hingegen in der normalen Bevölkerung nur selten das initiierende Ereignis der Karzinogenese.



**Abb. 1.1** Krebserkrankungen entstehen schrittweise durch Akkumulation von genetischen Veränderungen. Einzelne Zellen des Tumors häufen unterschiedliche Mutationen und dadurch möglicherweise auch Wachstumsvorteile an, so dass sie in einem Prozess klonaler Evolution zum dominanten Zelltyp des entstehenden Tumors aufsteigen können („Multi-Hit-Modell“; Fearon und Vogelstein, 1990). Infolge der Inaktivierung eines „Gatekeeper“-Tumorsuppressorgens beginnen sich die Zellen zu teilen. „Gatekeeper“-Proteine sind Schlüsselmoleküle der Tumorentwicklung, da sie den Zellzyklus kontrollieren bzw. dessen Frequenz begrenzen. Meist übt ein einziges Protein maßgeblich diese Funktion aus, es kann von Zelltyp zu Zelltyp variieren. Die gesteigerte Zellproliferation begünstigt weitere Mutationen. Ein Verlust von „Caretaker“-Suppressoren erhöht die genetische Instabilität und somit auch die Wahrscheinlichkeit für eine Überexpression bzw. Veränderung von Onkogenen. Eigenschaften, die den invasiven Charakter fördern, werden von Tumorzellen generell erst in einem späten Stadium der Tumorprogression erworben.

Während der Initiation der Tumorentwicklung erwerben meist „Gatekeeper“-Gene spontane genetische Veränderungen und verursachen nun in den betroffenen Zellen eine Erhöhung der Proliferationsrate, was wiederum weitere Mutationsereignisse fördert. „Caretaker“-Genmutationen (s.u.) hingegen bilden in der normalen Bevölkerung nur selten das initiiierende Ereignis der Karzinogenese.

### **Tumorpromotion**

Tumorsuppressoren vom „Caretaker“-Typ unterstützen das Tumorwachstum nicht direkt, sondern beeinflussen vielmehr das Genom einer Zelle, indem sie DNA-Schäden vorbeugen oder diese reparieren (DNA-Reparaturenzyme). Die Inaktivierung von „Caretaker“-Tumorsuppressoren, wie BRCA1 (breast cancer susceptibility gene-1; Rosen et al., 2005), verringert nochmals die genetische Integrität, was zu einer Akkumulation von Mutationen und somit indirekten Förderung der Tumorentwicklung führt. Hierbei werden wachstumsfördernde Onkogene (wie *ras*, *myc*, *egf* und *c-erbB2*) aktiviert und Apoptose-fördernde sowie Krebs-supprimierende Gene inaktiviert. Besonders die zentralen Signalübertragungsproteine der Ras-Familie werden in dieser Entwicklungsphase oft genetisch verändert. Ras-Proteine nehmen einen wichtigen Stellenwert beim Wachstum, der Teilung und dem Überleben von Zellen ein. Die beschriebenen Vorgänge führen zur Ausbildung von *Adenomen*. In diesem prämaligen Stadium liegt die Läsion noch lokal begrenzt vor und kann meist operativ entfernt werden.

### **Transformation**

Im Verlauf der Tumorprogression lässt sich meist eine weitere Form der genetischen Instabilität nachweisen, der so genannte „Verlust der Heterozygotie“ (LOH, loss of heterozygoty). Wird ein Allel eines Tumorsuppressor-Gens mutiert, so existiert das Gen eine zeitlang in heterozygotem Zustand, bevor das funktionelle Wildtyp-Allel dann ebenfalls inaktiviert wird. LOH-Ereignissen sind typisch für invasive Karzinome von Ausführungsgängen der Brustdrüse (IDC, invasive ductal carcinoma; Beckmann et al., 1997) und Metastasen (Yokota, 2000). Neben diesem DNA-Verlust tritt während der Karzinogenese auch oft eine Vervielfältigung bestimmter DNA-Bereiche auf. Diese Amplifikation chromosomaler Regionen ist ein bedeutender Mechanismus, durch den in Brusttumorzellen häufig eine Überexpression von Onkogenen hervorgerufen wird. Ein Beispiel hierfür ist die Region 8q24, die bei bis zu 20% aller Brustkrebserkrankungen von Amplifizierungsprozessen betroffen ist, wobei die erhöhte Kopienzahl mit einer schlechteren Prognose für den Patienten assoziiert ist (Aulmann et al., 2006). Innerhalb dieses Chromosomenabschnitts befindet sich das Gen, welches für das Kernprotein c-Myc kodiert. c-Myc spielt eine bedeutende Rolle bei der Progression des Zellzyklus.

Neben den genetischen Veränderungen, wie Punktmutationen, Deletionen und Amplifikationen, können auch epigenetische Veränderungen an der Progression von Brustkarzinomen beteiligt sein. So wird eine Reihe von Promotoren, Phänotypbestimmenden Gene, in Mesenchym-artigen Brusttumorzellen hypermethyliert und dementsprechend supprimiert. Hierzu gehören beispielsweise die Promotoren von Genen des Östrogen- und Progesteron-Rezeptors, sowie des E-Cadherins (Lacroix und Leclercq, 2004).

Die maligne Entartung normaler Zellen während der Brusttumorentwicklung lässt sich demnach grob in drei Abschnitte einteilen, Hyperplasie (übermäßige

Zellvermehrung) des Gewebes, prämaliges Stadium (Adenom) und in-situ Karzinoma (Beckmann et al., 1997). Dies sind die histologischen Korrelate der weiter oben beschriebenen molekularen Vorgänge.

Während der Kanzerogenese erwerben Tumorzellen bestimmte Funktionen, die ihr einen Wachstumsvorteil gegenüber dem umliegenden Gewebe verschaffen. Von normalen Zellen unterscheiden sie sich durch wichtige Eigenschaften, wie dem unkontrollierten Wachstum, dem nicht-limitierten Replikationspotential, dem Verlust der Kontaktinhibition und der Reduktion des Differenzierungsgrads. Weiterhin sind Tumorzellen in der Lage Immunantworten auszuweichen und apoptotische Signale zu unterdrücken (Thompson, 1994; El-Ashry und Lippman, 1994). Erwirbt eine Zelle diese Fähigkeiten, stellt sie möglicherweise den monoklonalen Ursprung eines malignen Krankheitsherds dar. Obwohl sich manche hyperplastischen Läsionen auf eine einzelne Zelle zurückführen lassen, ist für fortgeschrittene Tumore stets eine molekulare und morphologische Heterogenität (Rosen, 1996) charakteristisch.

### 1.3 Metastasierungsprozesse: Die metastatische Kaskade

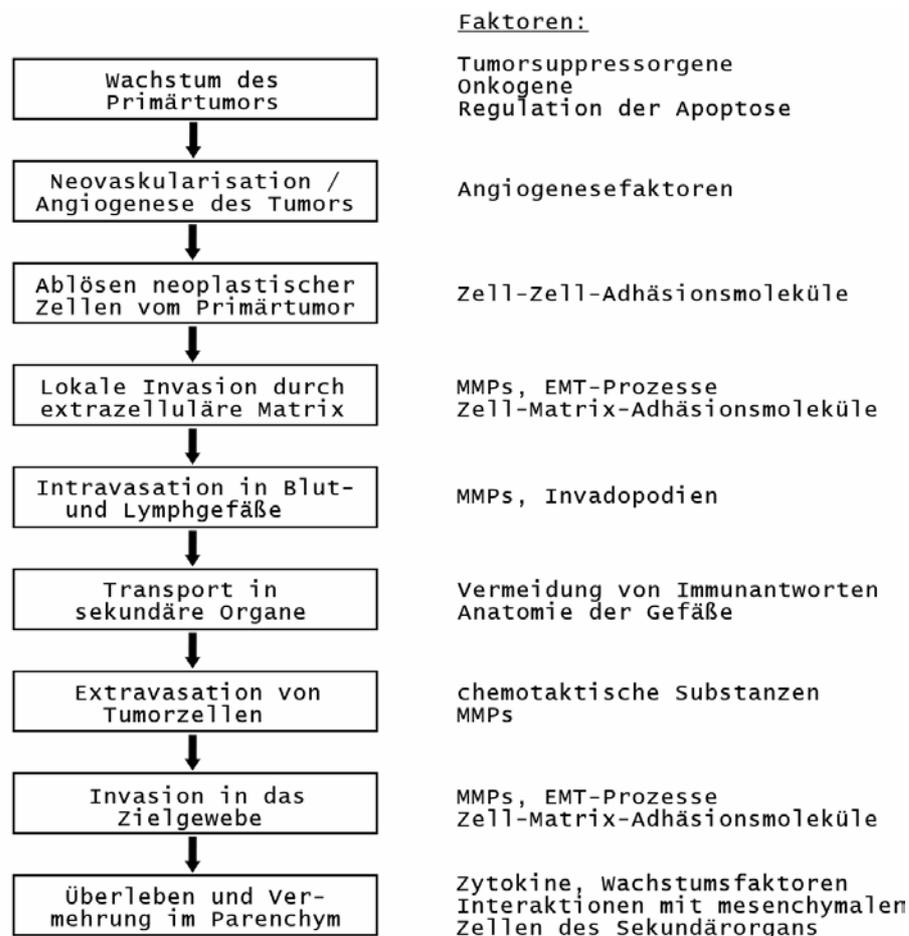
Ein Krebspatient verstirbt in der Regel nicht an den unmittelbaren Folgen des Primärtumors, sondern vielmehr an Komplikationen infolge Metastasenbildung. Bei lokalen, auf das Brustgewebe beschränkten, Krebserkrankungen liegen die Heilungsraten bei über 90%. Tritt eine Disseminierung von Tumorzellen ein, sinkt die langfristige Überlebensrate in Abhängigkeit vom Metastasierungsort und –Ausmaß. Absiedlungen in viszerale Organe und das Hirn sind am lebensbedrohlichsten, wobei weniger als 20% der Patienten die ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung überleben (American Cancer Society: Cancer statistics 1998). Um die Lebenserwartung von Patientinnen mit Brusttumoren zu erhöhen, ist sowohl die Prävention der Metastasierung als auch eine effektivere Behandlung bereits bestehender Metastasen unumgänglich. Die Realisierung beider Behandlungsansätze setzt jedoch ein detailliertes Wissen über die molekularbiologischen und biochemischen Abläufe während der Krebszell-Disseminierung voraus.

Bei der Metastasierung von Primärtumor-Zellen in distale Organe handelt es sich um einen komplexen Vorgang, bei dem mehrere, voneinander unabhängige Prozesse zusammenspielen müssen. Der Absiedelungsvorgang setzt voraus, dass bestimmte Zellen eines heterogenen Tumors Metastasierungs-steigernde Funktionen erwerben. Dies erfolgt in unterschiedlichen Foci und während eines späten Stadiums der Erkrankung. Es ist hierbei festzustellen, dass Karzinogenese-fördernde Eigenschaften nicht zwangsläufig auch die Metastasierung begünstigen. Die einzelnen Schritte des Metastasierungsgeschehens sind vielmehr von adhäsiven, proteolytischen und migratorischen Merkmalen abhängig und lassen sich in Form der so genannten metastatischen Kaskade zusammenfassen (siehe Abb. 1.2). Die Disseminierung von Tumorzellen beginnt mit der Ablösung einer metastatisch-aktiven Subpopulation aus dem Zellverband, dem Durchbrechen der Basalmembran, der Invasion in das umliegende Gewebe, sowie dem Eintritt in die Blut- oder Lymphbahn (Mundy, 1997).

Damit Tumorzellen den Zellverband verlassen können, muss die Anzahl an zellu-

lären Adhäsionsmolekülen (CAMs) reduziert sein. Eine prominente Rolle scheint hier E-Cadherin zu spielen. Ein niedriges Expressionsniveau dieses Adhäsionsmoleküls ist ein Charakteristikum vieler invasiver Karzinome und korreliert mit einer Erhöhung des metastatischen Potentials und schlechter Prognose für den Patienten (Kinsella et al., 1994). Die Zellen der aggressiven Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 weisen dementsprechend ebenfalls eine herabgesetzte E-Cadherin-Expression auf (Sommers et al., 1991). Um in Gefäßsysteme zu gelangen, müssen Tumorzellen zunächst die Basalmembran und dann benachbartes Gewebe durchqueren. Am hierfür notwendigen Abbau extrazellulärer Matrix sind vor allem Integrine (Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle) und Proteinase, wie Serin- und Matrix-Metalloproteinasen, maßgeblich beteiligt (Matrisian, 1992). Invasionsprozesse setzen zudem eine aktive Beweglichkeit der metastasierenden Zellen voraus. Es handelt sich hierbei um eine pseudopodiale Vorwärtsbewegung, die durch autokrine und parakrine Faktoren stimuliert wird (Price et al., 1997).

Im Blutstrom überlebt nur etwa ein Prozent der metastasierenden Karzinomzellen, weil dieses Zirkulationssystem relativ ungeeignet für adhärenzte Zellen ist. Da



**Abb. 1.2 Die metastatische Kaskade (Ahmad und Hart, 1996). Die Metastasierung beinhaltet eine Vielzahl essentieller Schritte, bei denen Tumorzellen mit dem lokalen Mikromilieu des Wirtsgewebes reagieren. Bereits die Blockierung eines einzigen Schrittes könnte den gesamten Absiedlungsprozess hemmen.**

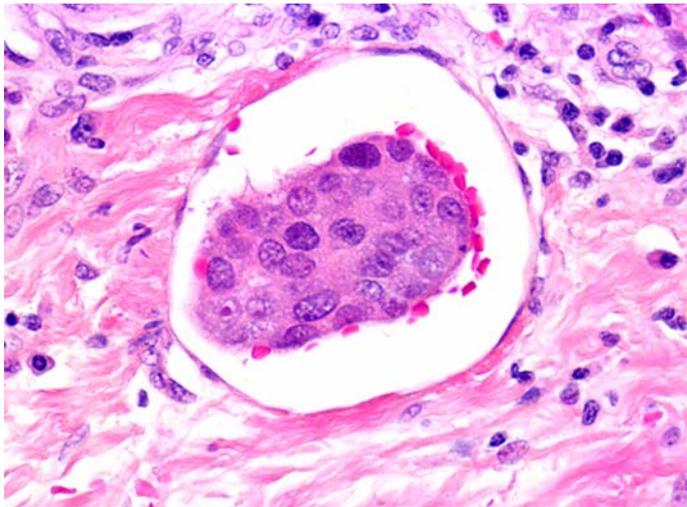
geeignete Adhäsionskontakte nicht in ausreichender Anzahl zur Verfügung stehen, wird in den Tumorzellen eine besondere Form der Apoptose gefördert (Anoikis). Dieser Effekt wird teilweise dadurch kompensiert, dass Tumorzellen in Form von Emboli oder im Verband mit Blutplättchen, Erythrozyten oder anderen Blutzellen durch die Gefäße strömen. Antikoagulantien vom Cumarin-Typ könnten deshalb unter Umständen auch in Metastasierungsprozesse hemmend eingreifen (Smorenburg und Van Noorden, 2001).

Die hohe Fließgeschwindigkeit des Blutstroms erzeugt außerdem relativ starke Scherkräfte und erschwert eine Anlagerung von Tumorzellen an die Gefäßwände. Aus diesen Gründen disseminieren Karzinomzellen bevorzugt über lymphatische Wege. Dies gilt besonders für Karzinome der Brustdrüse (Lauria et al., 1995), da das benachbarte Gewebe mit einem ausgedehnten lymphatischen Netzwerk, sowie Ansammlungen von Lymphknoten, ausgestattet ist. Aufgrund der geringen Fließgeschwindigkeit und des größeren Querschnitts der Gefäße, treten im Lymphsystem allenfalls geringe Scherkräfte auf. Zudem werden die Zellen hier durch Bestandteile der Lymphflüssigkeit, insbesondere Hyaluronsäure, geschützt. Mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 konnte demonstriert werden, dass sich Tumorzellen nach dem Eintritt in Lymphgefäße weiterhin teilen, wodurch die Effektivität dieses Ausbreitungsweges nochmals gesteigert wird (Weinberg, 2007).

MDA-MB-231-Brusttumorzellen metastasieren sowohl hämatogen als auch lymphogen (siehe Abb. 1.3). Im Bereich des Zielorgans treten die Zellen aus der Gefäßbahn aus. Dies erfolgt über Mechanismen, die schon an der Intravasation der Tumorzellen mitgewirkt haben. Während die Ablösung von Zellen aus dem Primärtumor eine Reduzierung von zellulären CAMs erforderte, ist für die Anhaftung und Erkennung der Zielregion wiederum eine erhöhte Expression adäquater Adhäsionsmoleküle nötig (Mundy, 1997). So spielen Integrine vermutlich auch bei der hämatogenen Aussaat von Tumorzellen eine bedeutende Rolle, indem sie das Anheften an die extrazelluläre Matrix unterstützen (Hynes, 1992).

Im Zielgewebe angelangt, bilden Tumorzellen zunächst Mikrometastasen, welche aus einzelnen Zellen, beziehungsweise kleinen Zellverbänden bestehen. Hierbei entwickelt sich nur ein kleiner Teil der detektierten Mikrometastasen zu klinisch manifesten Sekundärtumoren, da das Mikromilieu des fremden Gewebes in der Regel kein wachstumsförderndes Umfeld bietet (siehe „Seed and Soil“-Theorie, Abschnitt 4.1). bzw. den Tumorzellen die passenden Rezeptoren für lokale Wachstumsfaktoren fehlen. Die endgültige Kolonisierung des Sekundärorgans, durch Umformung von Mikro- in Makrometastasen, hängt vom proliferativen und angiogenem Potential der neu entstandenen Läsion ab.

Brusttumore metastasieren in Lymphknoten, Knochen, Lunge, Leber und Hirn (siehe Abschnitt 4.1). Die Absiedlung ins zentrale Nervensystem (ZNS) ist generell ein Merkmal sehr fortgeschrittener Metasen-assoziiierter Erkrankungen. Meist handelt es sich um intracerebrale Kolonisierungen (92% der Fälle), es können aber auch die Leptomeningen (sowohl Pia als auch Arachnoidea) betroffen sein (Evans et al., 2004). Während bei Parenchym-Metastasen von einem hämatogenen Ursprung ausgegangen wird, kann die Besiedlung der Hirnhäute auf mehreren Wegen erfolgen, nämlich hämatogen, lymphatogen und entlang von Nervenfasern (Weil et al., 2005). Sobald Meningen besiedelt sind, können sich die Tumorzellen über die cerebrospinale Flüssigkeit (CSF) ausbreiten.



**Abb. 1.3 Brusttumorzell-Thrombus in einem lymphatischen Gefäß (Aus: „The Biology of Cancer“, Robert Weinberg, Garland Science, 2007).**

### **Suppressoren von Metastasierungsprozessen**

Bislang wurden sechs Proteine bzw. Proteinfamilien identifiziert, welche die Metastasierungsvorgänge bei Brusttumoren effektiv unterdrücken. Sie üben verschiedenste Funktionen aus, beispielsweise Blockierung von EMT-Prozessen (E-Cadherin), Inaktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (TIMPs) und Hemmung der Zellmotilität (KAI1). Diese und weitere Proteine sind in der Tabelle 1.1 gelistet. Die Effektivität wurde in allen Fällen durch Überexpression der entsprechenden Gene in MDA-Brusttumorzellen (MDA-MB-231 und MDA-MB-435) verifiziert.

**Tabelle 1.1 Metastasierungs-Suppressoren von Brusttumorzellen**

<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	<b>Literatur</b>
BRMS1	Inhibierung der NF $\kappa$ B-Aktivierung, wodurch die Expression von uPA supprimiert wird	Cicek et al., 2005
E-Cadherin	Hemmung der Invasion durch Blockierung der EM-Transition	Berx und Van Roy, 2001
KAI1	Hemmung der Zellmigration, Induktion von Seneszenz-Prozessen	Yang et al., 2001
KiSS-1	Differentielle Regulation von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)	Lee und Welch, 1997
NM23	Kontrolle des Zellzyklus und der Histidin-abhängigen Phosphorylierung von Proteinen	Welch et al., 2000
TIMPs	Hemmung der Invasion durch Inhibition der Funktion von MMPs	Yoneda et al., 1997

**BRMS1: Breast Cancer Metastasis Suppressor 1; E-Cadherin: Epitheliales Cadherin; TIMPs: Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen**

## 1.4 MDA-MB-231-Tumorzellen als Modellsystem für metastasierende Karzinome der Brust

Die Fähigkeit, Hypothesen aufstellen und überprüfen zu können, steigt mit der Verfügbarkeit relevanter Modellsysteme. Die Anzahl verfügbarer Brusttumorzelllinien

ist relativ begrenzt. Viele der aktuell verwendeten Linien wurden in den späten 70'er Jahren des letzten Jahrhunderts etabliert, wobei nur drei von ihnen, nämlich MDA-MB-231, MCF-7 und T-47D in mehr als  $\frac{2}{3}$  aller Brustkrebs-Studien Verwendung fanden (Lacroix und Leclercq, 2004). Die Frage nach der Eignung und Relevanz der eingesetzten Brusttumorzelllinien wurde in vielen Übersichtsartikeln diskutiert (Lacroix und Leclercq, 2004). Aufgrund ihrer Reinheit und Uniformität, spiegeln die klonalen Populationen der Brusttumorzelllinien die Heterogenität eines Brusttumors eher nicht wider. Dennoch besitzen sie weitgehend die gleichen Eigenschaften wie Brustkrebszellen in-vivo (Lacroix und Leclercq, 2004).

Im Rahmen von Arbeiten zur Hirn- Metastasierung haben besonders die Brusttumorzellen MDA-MB-231 und MDA-MB-435 eine bedeutende Rolle erlangt. MDA-MB-231-Brusttumorzellen wurden ursprünglich aus Flüssigkeitsansammlungen im Pleuraraum einer Patientin mit weit verbreiteten Metastasen eines invasiven Karzinoms der Brust (IDC, invasive ductal carcinoma) isoliert (Cailleau et al., 1978). Es handelt sich um hochinvasive, metastatisch-aktive Zellen, mit teilweise mesenchymalem Charakter. Trotz ihres fibroblastenähnlichen Phänotyps sind sie epithelialen Ursprungs, was an einer signifikanten Expression der Zytokeratine 8, -18 und -19 ersichtlich ist. Vermutlich haben Zellen dieser Linie eine so genannte Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) vollzogen (siehe Abschnitt 4.3.1). Dieser Prozess, bei dem Zell-Zell-Adhäsionsproteine, wie E-Cadherin verloren gehen und mesenchymale Proteine wie Vimentin (ein Intermediärfilamentprotein) hinzugewonnen werden, steigert das invasive Potential von Zellen beträchtlich. Der Verlust an E-Cadherin geht hierbei mit einem Verlust der Zellpolarität einher (siehe Abschnitt 4.3.1). Neben mesenchymalen Proteinen weisen MDA-MB-231-Zellen zusätzlich auch eine Reihe von Endothel-Marker-Proteinen, wie den Thrombin-Rezeptor, Tie2, CD31 (PECAM-1), VEGF und bc-48, auf (Hendrix et al., 2000).

Im Gegensatz zu den wenig invasiven Epithel-förmigen MCF-7 Brusttumorzellen exprimieren MDA-MB-231-Zellen weder den Estrogen- (ER), noch den Progesteron-Rezeptor (PR) in signifikanter Menge (Bamberger et al., 1998). Der Verlust des Estrogen-Rezeptor (ER) - $\alpha$  korreliert bei Brusttumorzellen generell mit einer Überexpression des EGF (Epidermal growth factor)- und Her-2/neu-Rezeptors, gesteigerter Invasivität und schlechter Heilungsprognose für den Patienten (Fabbro et al., 1986). Beim Her-2/neu-Protein handelt es sich um einen Vertreter der EGF-Rezeptor-Superfamilie. Es wird in jedem vierten Brustkarzinom infolge von Genamplifikation überexprimiert, wobei die Syntheserate mit schlechter Prognose des Krankheitsverlaufs korreliert (Slamon et al., 1987).

MDA-MB-231-Brusttumorzellen besitzen eine aktivierende Mutation des K-Ras-Gens in Codon 13 (Kozma et al., 1987), so dass die Zellen, unabhängig von Serumanwesenheit und anderen Wachstumsbedingungen eine konstitutiv erhöhte Ras-Aktivität aufweisen (von Lintig et al., 2000). Aktivierende Ras-Mutationen kommen bei Brusttumoren relativ selten vor, jedoch scheint der Ras-Signalweg bei diesen Krebserkrankungen oft durch flussaufwärts liegende Mechanismen stimuliert zu sein. So sind mehrere, den Ras-Weg-aktivierende Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGF-Rezeptor, Her-2/neu-Rezeptor, s.o.) bei Brusttumoren überexprimiert (von Lintig et al., 2000).

Werden MDA-MB-231-Zellen in das Fettgewebe der Mamma von Nacktmäusen implantiert so bilden sie reproduzierbar einen Primärtumor aus, welcher dann

innerhalb von zwei Monaten Metastasen in Lunge, Leber und Hirn hervorruft (Thompson et al., 1992). Um die metastatischen Vorgänge bei einer Brusttumorerkrankung möglichst realitätsnah nachzuempfinden, eignet sich vor allem dieser Transplantationsort, da die spezifische Tumor-Stroma-Interaktion bei der Krebsprogression von entscheidender Bedeutung ist (Clarke, 1996; Price, 1996). Eine nicht-orthotope Transplantation kann die metastatische Streuung von Tumorzellen signifikant steigern und zugleich die Absiedelung in bestimmte Organe fördern. (Tabelle 1.2; Lacroix und Leclercq, 2004).

**Tabelle 1.2 Abhängigkeit des Metastasierungsverhaltens vom Ort der Brusttumorzell-Injektion bei in-vivo-Maus-Experimenten**

Injektionsort der Brusttumorzell-Suspensionen	bevorzugte Orte der Tumorzell-Absiedelung	Literatur
Fettgewebe der Mamma oder subkutan	Lunge (Leber, Hirn)	(1)
Laterale Schwanzvene	Lunge	(2)
Niere	Leber	(1)
Carotis	Hirn	(1)
Linker Herzventrikel	Knochenmark und -gewebe	(2)

1: Lacroix und Leclercq, 2004; 2: Sloan und Anderson, 2002

## 1.5 Endoglin als potentieller Modulator metastatischer Prozesse

### 1.5.1 Die Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ Superfamilie

Transformierende Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie dienen unter normalen physiologischen Bedingungen der Aufrechterhaltung der Homöostase. Sie regulieren im Organismus ein breites Spektrum von elementarsten zellulären und physiologischen Prozessen, einschließlich Zellzykluskontrolle, Apoptose, Differenzierung, Adhäsion, Invasivität, Angiogenese und Embryonalentwicklung. Sie sind im Tierreich hoch konserviert und man findet ihre Vertreter von *Caenorhabditis elegans* bis zum Menschen.

Besonders der Prototyp dieser Proteinfamilie, TGF- $\beta$ , gilt als potenter Inhibitor der Zellproliferation und steht im Zusammenhang mit vielen pathologischen Prozessen. So ist die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion ein wichtiger Aspekt bei jeglicher Form von Krebs. Das Zytokin moduliert die Progression und –wie vor kurzem veröffentlicht– die gewebsspezifische Metastasierung von Tumoren.

Man teilt die Familie in zwei Untergruppen ein. Die TGF- $\beta$ /Activin-Gruppe umfasst TGF- $\beta$ , Activin, Inhibin, Nodal und GDF-1 (Growth/Differentiation Factor-1), die BMP-Gruppe (Bone Morphogenetic Protein-Gruppe) BMPs, GDF-5, MIS (Müllerian inhibiting substance) und –zelltypspezifisch– auch TGF- $\beta$ . Die intrazellulären Signale werden bei beiden Gruppen durch unterschiedliche Mediatorproteine, die Smad (Small mothers against decapentaplegic, siehe weiter unten) -Proteine vermittelt. An

Tab. 1.3 Die Vertreter der TGF- $\beta$  Superfamilie

Ligand	Typ II Rezeptor	Typ I Rezeptor	R-Smads	Beispiele für Funktionen
TGF- $\beta$	TGF- $\beta$ RII	TGF- $\beta$ RI (ALK5 oder ALK1) <sup>*)</sup>	Smad2/3 oder Smad1/5/8 <sup>*)</sup>	Antiproliferative Effekte auf Epithelzellen, Differenzierungsprozesse, EMT, Induktion von ECM-Proteinen
ActivinA	ACVR-II	ACVR-IB (ALK4)	Smad2/3	Mesoderminduktion, Antiproliferative Effekte auf Brusttumorzellen, Schutz von Nervenzellen
Nodal	ACVR-IIIB	ACVR-IB (ALK4), ACVR-IC (ALK7)	Smad2/3	Herzentwicklung, Links-rechts Asymmetrie
GDF1	ACVR-II	ACVR-IB (ALK4)	Smad2/3	Links-rechts-Asymmetrie
GDF11	ACVR-IIIB	ACVR-IB (ALK4)	Smad2/3	Musterbildung des Axialskeletts
GDF5	ACVR-II	BMPR-IB (ALK6)	Smad1/5/8	Knochen u. -Knorpelbildung, Zellzyklusstopp und Apoptose in murinen B-Lymphozyten
BMP2	BMPR-II	BMPR-IA (ALK3), BMPR-IB (ALK6)	Smad1/5/8	Induktion der Knochen- u. Extremitätenentwicklung, Apoptose, antiproliferative Effekte
BMP4	BMPR-II; ACVR-II	BMPR-IA (ALK3), BMPR-IB (ALK6)	Smad1/5/8	Induktion der Knochenentwicklung, Zellzykluskontrolle, Einfluß auf c-myc-Expression
BMP7	BMPR-II; ACVR-II	BMPR-IA (ALK3), BMPR-IB (ALK6); ALK2	Smad1/5/8	Knochen-, Nieren- u. Augenentwicklung,
MIS	AMHR-II	BMPR-IB (ALK6)	Smad1/5/8	Proliferationsinhibierung u. Apoptoseinduktion bei Ovariakarzinomzellen

**\*) TGF- $\beta$  kann in Anwesenheit von Endoglin zusätzlich den Smad1/5/8-Weg aktivieren**

der Signaltransduktion der TGF- $\beta$ /Activin-Gruppe sind Smad2 und Smad3 beteiligt, in der BMP-Gruppe hingegen wird das Signal durch Aktivierung von Smad1, Smad5 oder Smad8 weitergegeben (siehe Tabelle 1.3). Die beiden Gruppen von Smad-Proteinen induzieren unterschiedliche Sets von Zielgenen. TGF- $\beta$  nimmt innerhalb der TGF- $\beta$ -Superfamilie einen Sonderstatus ein, da es bei Anwesenheit des akzessorischen Rezeptors Endoglin Smad-Proteine der BMP-Gruppe aktiviert.

### 1.5.2 Das TGF- $\beta$ -Protein

TGF- $\beta$  wird während der Embryonalentwicklung und auch in adulten Geweben ubiquitär exprimiert. Das pleiotrope Zytokin reguliert viele fundamentale Zellprozesse, wie Proliferation, Migration, Adhäsion, Angiogenese, Differenzierung, Apoptose und Immunantwort (Siegel und Massague, 2003). Die Effekte von TGF- $\beta$  sind meist zelltyp-spezifisch und werden stark von Wachstumsbedingungen beeinflusst. So kann das Zytokin, je nach physiologischen Status der Zelle, oft gegensätzlich wirkende Antworten, wie Stimulation oder Inhibition der Proliferation bzw. Differenzierung induzieren und pro- oder anti-apoptotische Signalwege einleiten. Bisher durchgeführte Experimente legen nahe, dass nicht TGF- $\beta$  primär seine Wirkung bestimmt, sondern vielmehr der zelluläre Kontext.

Um die offensichtliche Diskrepanz in den biologischen Effekten zu erklären, muss man drei wichtige Aspekte der TGF- $\beta$  Signalverarbeitung berücksichtigen:

### **1. Expression von akzessorischen Rezeptorkomponenten**

In den meisten Zelltypen besteht der TGF- $\beta$  Rezeptorkomplex aus zwei ALK-5 Proteinen (Activin-Like Kinase-5, TGF- $\beta$  TypI Rezeptor) und zwei TGF- $\beta$  TypII Rezeptoren (T $\beta$ R-II). Endothelzellen besitzen neben den üblichen TGF- $\beta$  Rezeptoren vom TypI (T $\beta$ R-I) und TypII eine zusätzliche akzessorische Komponente, das Endoglin. Endoglin rekrutiert den zweiten Vertreter von T $\beta$ R-I Proteinen (ALK-1) in den Rezeptorkomplex, welcher dann einen der beiden ALK-5 Rezeptoren ersetzt. Da die T $\beta$ R-I eine sehr hohe Spezifität für ihre jeweiligen Smad-Proteine aufweisen, bestimmen sie, welche R-Smads vom aktivierten Rezeptorkomplex phosphoryliert werden. Das Endoglin-vermittelte Auswechseln eines ALK-5 Rezeptors durch einen ALK-1 Rezeptor hat zur Folge, dass anstelle des Smad2/3-Kanals nun der Smad1/5/8-Kanal aktiviert wird. Mit Hilfe der akzessorischen Rezeptoren vom TypIII sind Zellen also in der Lage, die Wirkung von TGF- $\beta$  schon auf der Ebene der Rezeptoren zu trennen.

### **2. Expression von Co-Faktoren der Smad-Proteine**

Der TGF- $\beta$  Signaltransduktionsweg ist im Grundprinzip auffallend einfach gehalten. Das Zytokin aktiviert in seinen membranständigen Rezeptoren eine Kinasedomäne, welche dann cytoplasmatische Mediatorproteine, die R-Smads (Rezeptor-regulierte Smads) phosphoryliert. Im aktivierten Zustand können diese R-Smads in den Zellkern gelangen, dort an Smad-spezifische Elemente der DNA binden und so Gene aktivieren bzw. inaktivieren. Wie eine Zelle das TGF- $\beta$ -Signal interpretiert, hängt vom Vorhandensein transkriptionaler Co-Faktoren ab. Diese assistieren den R-Smads bei der Aktivierung oder Repression von Genen und modulieren hierbei entscheidend die zelluläre Antwort auf das Zytokin. Smad-Proteine besitzen per se eine relativ geringe Spezifität bei der DNA-Bindung, die nötige Spezifität erreichen sie erst im Zusammenspiel mit den Co-Faktoren. Deren Expressionshöhe ist zellspezifisch und steht im Zusammenhang mit einer phänotypischen Veränderung der Zelle, der so genannten Epithel-Mesenchym-Transition (EMT). Im Laufe dieses Prozesses ändern Zellen das Expressionsprofil bestimmter Smad Co-Faktoren und erwerben hierdurch migratorische Fähigkeiten.

### **3. Einfluss der TGF- $\beta$ -Konzentration**

Die zellulären Antworten auf eine Stimulation mittels TGF- $\beta$  hängen stark von der Konzentration des Liganden ab. TGF- $\beta$  ist an der Induktion angiogenetischer Prozesse beteiligt, indem es die Expression und Aktivierung proangiogener Moleküle, wie VEGF (Vascular endothelial growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor) moduliert. Dieser Einfluss wurde im Fall von Wund-induzierter Migration und der Aussprossung von Gefäßen während angiogenetischer Vorgänge nachgewiesen (Pepper, 1997). Obwohl niedrige Konzentrationen an TGF- $\beta$  die VEGF- und bFGF-induzierte Migration und Invasion steigern, wirken hohe TGF- $\beta$ -Dosen hemmend. Eine Konzentrationsabhängigkeit zeigte sich auch bei anderen zellulären Effekten, wie Proliferationsinhibition und ECM-Produktion. Diese Beobachtungen lassen sich durch eine differentielle Beteiligung zweier unabhängiger TGF- $\beta$ -Signaltransduktionswege erklären. Während bei niedrigen Ligandenkonzentrationen in Endothelzellen der ALK-1-Weg (s.u.) dominiert, wird durch hohe

TGF- $\beta$ -Dosen hauptsächlich der ALK-5-Smad2-Weg stimuliert (Goumans et al., 2002).

### 1.5.3 Modulation der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion durch Endoglin

In Endothelzellen existieren zwei voneinander unabhängige Smad-Protein-abhängige Signaltransduktions-Wege. Den TGF- $\beta$ /ALK-5-Weg findet man ubiquitär auch in vielen anderen Zelltypen, wohingegen der TGF- $\beta$ /ALK-1-Weg zunächst als rein endothelspezifisch galt. Während der ALK-5-Weg an der Einführung und Stabilisierung eines ruhenden Endothels beteiligt ist, vermittelt der ALK-1-Weg eine Aktivierung der Zellen. Die Aktivierungsphase ist mit einer Expression von Genen assoziiert, die eine Steigerung der Proliferation, Migration und Angiogenese bewirken (Goumans et al., 2002). Demgegenüber besteht die zelluläre Antwort des TGF- $\beta$ /ALK-5-Weges aus einer Hemmung der genannten Effekte.

In Endoglin-freien Zellen ist der dieser Weg der dominierende, wenn nicht alleinige, Smad-Protein-abhängige TGF- $\beta$ -Signaltransduktionsweg. Mit steigenden zellulären Konzentrationen an Endoglin erfolgt ein Wechsel vom TGF- $\beta$ /ALK-5-Weg zum TGF- $\beta$ /ALK-1-Weg. Endoglin ist demnach ein molekularer Schalter, mit dessen Hilfe das Zytokin zwei unabhängige Sätze von Genen ansprechen kann.

#### **Der TGF- $\beta$ /ALK-5-Weg**

Die Haupteffekte des inhibitorischen ALK-5-Weges bestehen aus einer Blockierung des Zellwachstums, der Zellmigration und der Ausbildung tubulärer Netzwerke, sowie einer Induktion der ECM-Produktion und der Expression von Differenzierungsmarkern, wie SM22 $\alpha$  (Goumans et al., 2002; Ota et al., 2002).

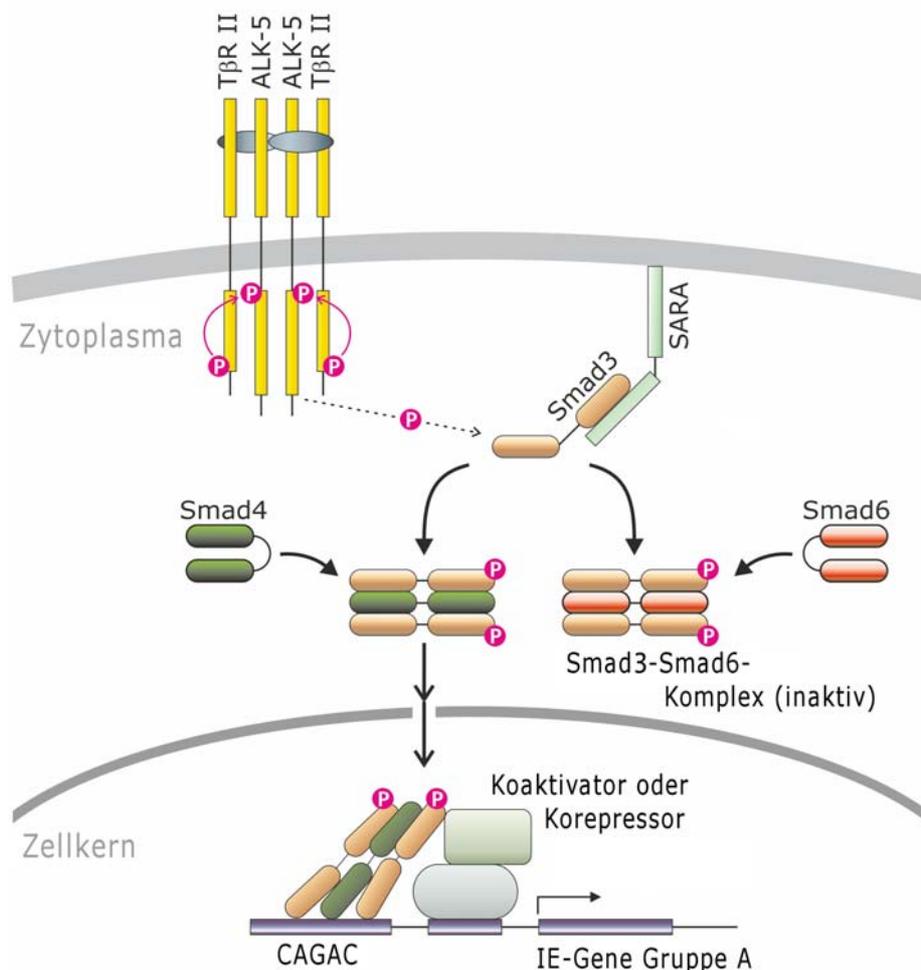
Infolge der Ligand-Bindung entsteht ein Rezeptorkomplex, der aus jeweils zwei TGF- $\beta$ -Rezeptoren vom TypII (T $\beta$ RII) und TypI (T $\beta$ RI) besteht. Die konstitutiv phosphorylierten TypII-Rezeptoren aktivieren hierauf die ALK-5-Rezeptoren (TGF- $\beta$  TypI-Rezeptoren), welche dann so genannte Rezeptor-regulierte Smad-Proteine (R-Smads) phosphorylieren können. Während die TypI-Rezeptoren relativ flexibel in Bezug auf ihre jeweiligen Liganden sind (siehe Tabelle 1.3), weisen sie gegenüber ihren Smad-Substraten eine sehr hohe Spezifität auf. So werden ALK-5-vermittelte Signale nur über die Proteine Smad2 und Smad3 weitergegeben. Mit Hilfe des Smad4-Proteins translozieren die R-Smads in den Zellkern und regulieren hier die Transkription von Genen. Aufgrund der kurzen Erkennungssequenz (CAGAC) binden Smad2 und Smad3 selbst relativ unspezifisch, die Spezifität des Transkriptionskomplexes wird jedoch durch Einbeziehung gewebespezifischer Koaktivatoren und Korepressoren deutlich erhöht.

Zu den Zielgenen des TGF- $\beta$ /ALK-5-Weges gehören unter anderem die Gene *pai-1* (*plasminogen activator inhibitor-1*), *p21* (*CDKN2B*), *p15* (*CDKN1A*), *Kollagen TypI*, *connexin 37*, *Smad7* und die Gene der prometastatisch wirkenden Proteine PTH-rP (Parathyroid hormone related protein), CTGF und IL-11 (Wilson et al., 2005; Lindemann et al., 2001; Yin et al., 1999; Kang et al., 2003).

Auch in Epithelzellen inhibiert TGF- $\beta$  die Proliferation, indem es die Expression der Kontrollproteine p15 (bzw. INK4B) und p21 (bzw. WAF1 oder CIP1) über den ALK5/Smad3-Weg aktiviert und so den Zellzyklus in der G1 Phase zum Stillstand bringt (Siegel und Massague, 2003; Hannon und Beach, 1994; Reynisdottir et al.,

1995; Datto et al., 1995). Die Blockade des Zellzyklus wird durch eine TGF- $\beta$  vermittelte Repression von proliferationsfördernden Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc, ID1, ID2 oder ID3, unterstützt.

Im Laufe einer Tumorprogression kann TGF- $\beta$  jedoch seine Funktion wechseln und vom Inhibitor zum Stimulator des Epithelwachstums werden (Vilar et al., 2006). Während die antiproliferative und apoptosefördernde Wirkung in frühen Stadien der Erkrankung mit bisher bekannten Wirkungsweisen von TGF- $\beta$  übereinstimmt, lässt sich der wachstumsfördernde Einfluß in späten Erkrankungsphasen noch nicht ausreichend erklären. Bisherige Theorien favorisieren einen indirekten Mechanismus. Viele Krebserkrankungen beim Menschen sind mit einer gestörten TGF- $\beta$  Signaltransduktion, oft durch Mutagenese einzelner Komponenten des Signalweges, assoziiert.

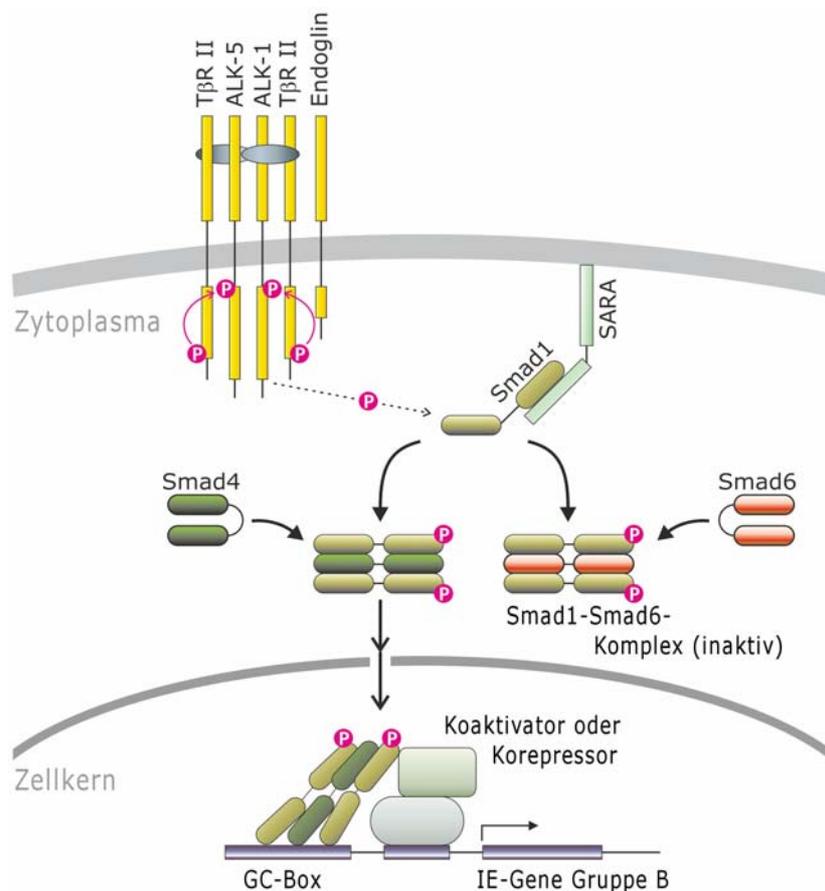


**Abb. 1.4** Der TGF- $\beta$ /ALK-5-Signaltransduktionsweg. Bei Anwesenheit von TGF- $\beta$  erfolgt eine Rekrutierung von Typl-Rezeptoren in den TGF- $\beta$ -Rezeptor-Komplex. Diese werden von den konstitutiv phosphorylierten TGF- $\beta$ -TyplI-Rezeptoren aktiviert. Die Typl-Rezeptoren phosphorylieren nun ihrerseits cytoplasmatische Mediatoren der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion, die Rezeptor-regulierten Smad (small mothers against decaplegic) -Proteine (R-Smads). Für die Regulation von Genen werden zudem Smad4, ein Hilfs-Smad-Protein und zusätzliche Koaktivatoren oder Korepressoren benötigt. SARA: Smad Anchor for Receptor Activation; Smad6: Inhibitorisches Smad-Protein (I-Smad), CAGAC: Erkennungssequenz innerhalb der jeweiligen Promotoren (SBE, Smad binding element), IE-Gene: „immediate-early“-Gene.

Mutationen von TGF- $\beta$  Rezeptoren oder Smad-Proteinen wurden bei Kolon-, Ovar- und Bauchspeicheldrüsenkrebs, sowie beim hepatozellulärem Karzinom (HCC) nachgewiesen (Levy und Hill, 2006). Selbst bei unveränderten Hauptkomponenten der Signaltransduktion weisen bestimmte Tumore eine Resistenz gegenüber TGF- $\beta$  vermittelter Wachstumshemmung auf. Produzieren solche Tumore TGF- $\beta$ , hemmen sie TGF- $\beta$  sensible Nachbarzellen und erwerben hiermit einen Selektionsvorteil. Darüber hinaus induziert das Zytokin tumorfördernde Prozesse, wie Angiogenese, Immunsuppression und Epithel-Mesenchym-Transitionen (EMT) (Levy und Hill, 2006; Derynck et al., 2001).

### Der TGF- $\beta$ /Alk-1-Weg

Aufgrund der Endoglin-Wirkung bildet sich ein Rezeptor-Komplex mit gemischter Typl-Rezeptor-Paarung (Alk1/Alk5, siehe Abb. 1.5). Durch diesen Komplex wird ein anderer Satz von Smad-Proteinen (Smad1/5/8) und demzufolge auch anderen Genen aktiviert. Zu den spezifischen Zielgenen des TGF- $\beta$ /ALK-1-Wegs gehören vor allem die Gene der proliferationsfördernden Proteine Id1 (Inhibitor of DNA binding 1) und c-Myc, sowie Gene, die für Endoglin, Smad6 und IL1RL1 (Interleukin 1 receptor-



**Abb. 1.5** Der TGF- $\beta$ /ALK-1-Signaltransduktionsweg. Aufgrund erhöhter Endoglin-Konzentrationen lagert sich ein TGF- $\beta$ -Rezeptor-Komplex mit gemischter Typl-Rezeptor-Paarung zusammen (ALK-5/ALK-1), welcher einen abweichenden Satz von Smad-Proteinen (Smad1, Smad5 und Smad8) aktivieren kann. Diese Transkriptionsfaktoren erkennen einen GC-reichen Abschnitt in den Promotoren bestimmter Gene und induzieren dementsprechend andere Gene. Weitere Erläuterungen beinhaltet die Abb. 1.4.

like 1; Goumans et al., 2003) kodieren. Das c-myc-Protein hemmt generell die Expression von Genen, die an der Zellzyklus-Blockade (p15 und p21) und Zelladhäsion beteiligt sind (Dang et al., 2006). Während das IL1RL1-Protein mit Zellwachstum assoziiert ist (Goumans et al., 2003), stimuliert Id1 die Migration, Proliferation und Angiogenese.

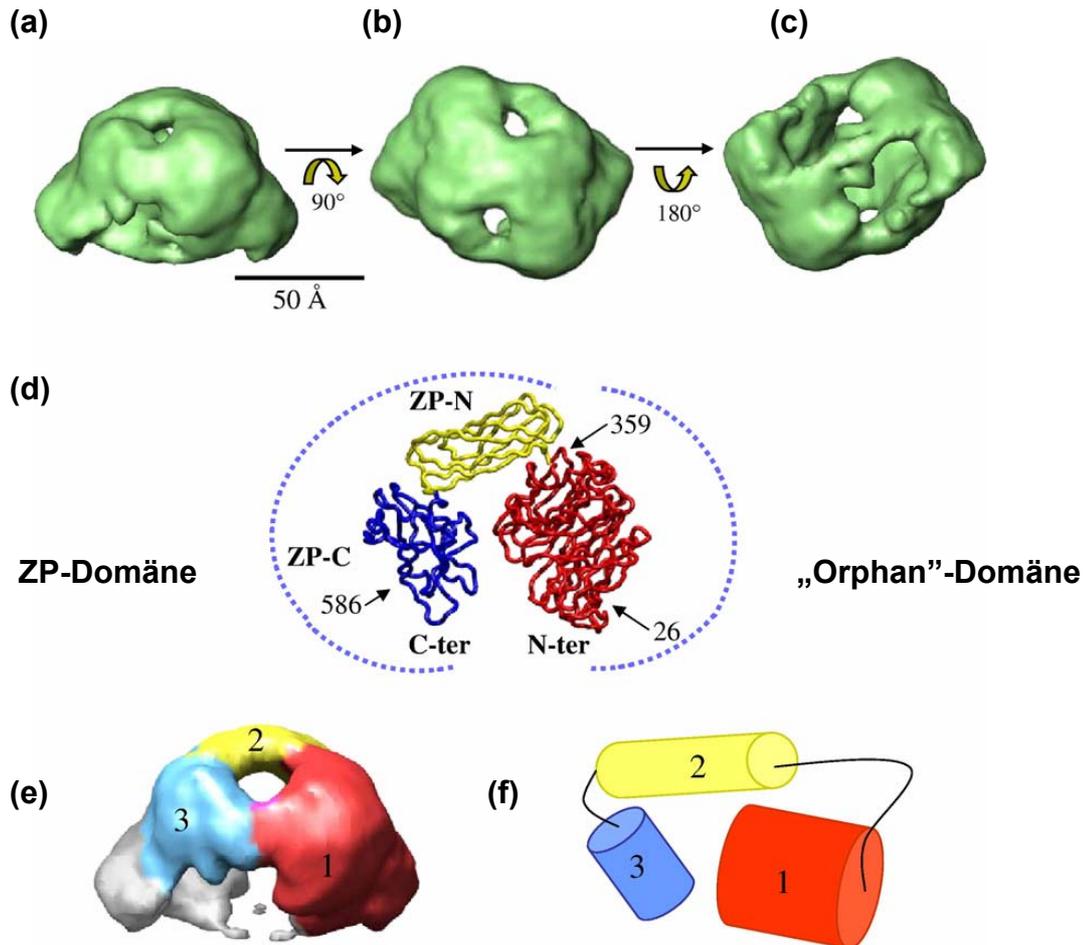
Der TGF- $\beta$ /ALK-1-Weg ist nicht auf Endothelzellen beschränkt. Auch in neuronalen Zellen können zwei parallele Smad-Wege beschriftet werden. Die Stimulation von Neuronen des Hippocampus mittels TGF- $\beta$  führt über den ALK-1/Smad1-Weg zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B, wodurch ein neuroprotektiver und antiapoptotischer Effekt erzielt wird (König et al., 2005; Strozyk und Kulms, 2005). Eine Koexpression von Endoglin und ALK-1 wurde auch bei Epidermiszellen der Haut und einigen Hautanhangsgebilden wie Haarfollikeln und Schweißdrüsen beschrieben (Beger et al., 2006; Perez-Gomez et al., 2005; Quintanilla et al., 2003). Ob es sich um einen funktionstüchtigen TGF- $\beta$ /ALK-1-Signaltransduktionsweg handelt steht allerdings noch in Frage. Vermutlich verfügt auch die epitheliale Brusttumorzelllinie MDA-MB-231 neben dem ALK-5-Weg auch über einen aktivierbaren ALK-1-Weg (Dumont und Arteaga, 2003). Dieser vermittelt zweifelsohne Eigenschaften, die in direkter Weise das metastatische Potential von Zellen fördern.

## 1.6 Eigenschaften des Endoglin (CD105)-Proteins

### **Allgemeine Eigenschaften**

Endoglin ist ein homodimeres Typ I Transmembranprotein, welches hauptsächlich auf der Oberfläche von Endothelzellen vorkommt. Es wird als TGF- $\beta$  Typ III Rezeptor (T $\beta$ RIII) klassifiziert und besitzt auf Aminosäureebene eine signifikante Ähnlichkeit zum zweiten bislang beschriebenen T $\beta$ RIII, dem Betaglycan (Cheifetz et al., 1992). Das Endoglin Gen befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 9 (Location:9q33-q34.1) und besteht aus 14 Exons (Duff et al., 2003; McAllister et al., 1995). Der Endoglin-Promotor weist neben einer Bindestelle für den Transkriptionsfaktor SP1, welcher für die basale Endoglin-Expression verantwortlich ist, stromabwärts des Transkriptionsstarts ein funktionales HRE auf. Unter Hypoxiebedingungen lagert sich hier ein HIF-1 $\alpha$ -Komplex an und induziert den Promotor.

Durch Klonierung der humanen Endoglin cDNA und anschließender Expression in murinen Fibroblasten konnte die Existenz von zwei verschiedenen Proteinvarianten gezeigt werden, die durch alternatives *splicing* entstehen (Bellon et al., 1993). Die dominant exprimierte Isoform, das L-Endoglin (Zugangs-Nr.: BC014271), hat eine Molekülmasse von etwa 180 kDa und setzt sich aus Proteinuntereinheiten von 95 kDa zusammen. Die Untereinheiten werden durch Disulfid-Brücken verbunden und bestehen beim L-Endoglin aus 633 Aminosäuren (AS). Von diesen ragen 561 AS in den Extrazellulärraum hinaus, 25 AS bilden eine hydrophobe integrale Transmembrandomäne und weitere 47 AS sind im Zytoplasma gelegen. Ein Modell der extrazellulären Domäne des Endoglins ist in der Abb. 1.6 dargestellt. Beim S-Endoglin (Zugangs-Nr.: X72012) besteht der cytoplasmatische Teil des Proteins nur aus 14 AS, wodurch sich die Molekülmasse auf 85 kDa pro Untereinheit und 160 kDa für



**Abb. 1.6** Die Struktur der extrazellulären Domäne (Aminosäurereste Glu26 bis Leu587) von Endoglin (CD105) nach Llorca et al. (2007). (a) bis (c) 3D-Rekonstruktion der extrazellulären Domäne in verschiedenen Ansichten; (d) vorausgesagtes Atommodell für Endoglin, die drei unterscheidbaren Domänen sind verschiedenfarbig dargestellt; (e) Seitenansicht, nur die Domänen einer Untereinheit des Proteindimers wurden angefärbt; (f) „Cartoon“-Modell, das die strukturelle Organisation der jeweiligen Endoglin-Monomere wiedergibt (nach Llorca et al., 2007). Das Endoglin-Dimer weist eine kuppelförmige Struktur auf.

das gesamte Protein verringert (Gougos und Letarte, 1988). Auf der extrazellulären Seite weist das Protein, nahe der Membran-durchspannenden Domäne, eine so genannte Zona pellucida Domäne auf. Zona pellucida Domänen findet man auch beim Betaglycan und bei Spermium Rezeptoren. Ihnen wird eine Funktion bei der Polymerisation von extrazellulären Proteinen zugeschrieben (Jovine et al., 2002). Bestätigt wird die Rolle dieses Bereiches bei Protein-Protein-Interaktionen dadurch, dass man hier eine RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) Sequenz findet. RGD-Motive sind wichtige Schlüsselstrukturen mit deren Hilfe Integrine extrazelluläre Matrixproteine (ECM-Proteine) erkennen und binden können. Beispiele für solche ECM-Proteine sind Fibronectin, Vitronectin, von Willebrand Faktor (vWF), Typ-I-Kollagen und Fibrinogen. Es wird vermutet, dass Endoglin mittels seiner RGD Sequenz die zelluläre Adhäsion von Zellen beeinflussen kann (Cheifetz et al., 1992).

### **Funktionen von L-Endoglin**

Endoglin spielt eine wichtige Rolle bei Entwicklungs- und Reparaturprozessen (Guerrero-Esteo et al., 1999), darüber hinaus ist es ein essentieller Faktor bei der Angiogenese (Fonsatti et al., 2003; Tanaka et al., 2001). Die Bedeutung von Endoglin wird besonders offensichtlich, wenn Mutationen im *endoglin*-Gen auftreten und die Menge an funktionstüchtigem Protein herabgesetzt ist. In diesem Fall kommt es zum so genannten Rendu-Osler-Weber Syndrom (Hereditäre Hämorrhagische Teleangiektasie Typ I, HHT1). Bislang kennt man über 30 verschiedene Mutationen in *endoglin*-Gen, wovon die meisten Mutationen die extrazelluläre Domäne betreffen und Leseraster-Verschiebungen (frame shifts) und vorzeitige Stopp-Codons hervorrufen.

Da infolge der Mutationen oft große Teile des Proteins entfernt sind und sich die entsprechende mRNA von einigen Mutationen gar nicht erst nachweisen lässt, geht man davon aus, dass die meisten Mutationen im *endoglin*-Gen Null-Allelen darstellen und der HHT-Phänotyp eine Folge von Haploinsuffizienz ist (Gallione et al., 1998; Shovlin et al., 1997). HHT ist eine autosomal dominante systemische Erkrankung der Gefäße, bei der es durch Fehlbildungen von Kapillaren und Venen zu hämorrhagischen Teleangiektasien kommt. Von den vaskulären Dysplasien können verschiedene Organe wie Lunge, ZNS, Haut, Leber und Gastro-Intestinal-Trakt betroffen sein. Die pulmonalen Gefäßmalformationen stellen wohl die größte Gefahr für den HHT Patienten dar (FERENCE et al., 1994). Sehr häufig sind Blutgefäße der Nase betroffen, so dass es bei über 90% der Betroffenen zu rezidivierendem Nasenbluten kommt und die Krankheit hierdurch erst erkannt wird (Zhu et al., 2003; Lamouille et al., 2002; Torsney et al., 2002). Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 1:10000, die Mortalitätsrate bei etwa 10%.

Das Endoglin-Protein lässt sich hauptsächlich an der Oberfläche von Endothelien nachweisen, wobei die basale Expression selbst in Endothelzellen relativ niedrig ist. Eine Induktion der CD105-Synthese erfolgt im Kontext von Entzündungs- und Neoangiogenese-Vorgängen, beispielsweise im Rahmen von rheumatoider Arthritis (Li et al., 2000; Szekanecz et al., 1995), Infarkten (Zhu et al., 2003) und Wundheilungsprozessen (Torsney et al., 2002). Dem entsprechend weisen auch stark proliferierende Endothelzellen in der Zellkultur sehr hohe Endoglinmengen auf. Eine hohe Expression konnte zudem in Synzytiotrophoblasten der Plazenta (Duff et al., 2003; Gougos et al., 1992), Chondrozyten (Parker et al., 2003), sowie mesenchymalen Zellen während der Embryonalentwicklung des Herzens gezeigt werden (Botella et al., 2001; Arthur et al., 2000; Qu et al., 1998). Das Protein mit der CD (cluster of differentiation) –Nummer 105 wurde erstmals bei der Pre-B-Leukämiezelllinie HOON identifiziert (Gougos und Letarte, 1988), dann jedoch auch in Linien anderer hämatopoietischer Zellen nachgewiesen (Buhring et al., 1991).

Eine starke Überexpression ist auch bei der Neoangiogenese von Tumoren verschiedenster Histotypen zu beobachten (Burrows et al., 1995; Sanchez-Elsner et al., 2002; Letarte et al., 1995). Bei immunhistochemischen Färbungen mit Anti-CD105-Antikörpern reagiert nur das Endothel des peri- und intratumoralen Gefäßsystems (Bodey et al., 1998; Seon et al., 1997; Burrows et al., 1995; Wang et al., 1993), Gefäße außerhalb dieser Region färben sich nicht an. Auch im Blutserum von Patienten mit soliden Tumoren konnten signifikant erhöhte CD105-Mengen nachgewiesen werden (Takahashi et al., 2001; Li et al., 2000).

Im Fall von Brustkarzinomen kann die Endoglin-Expression als Marker für hohes Metastaserisiko und schlechte Zukunftsprognose des Patienten dienen (Dales et al., 2004; Dales et al., 2003). Besonders Patienten, die weit entfernte Metastasen ausgebildet, haben hohe Endoglin-Konzentrationen im Plasma (Li et al., 2000). Die Herkunft des gemessenen Endoglinvorkommens im Blutserum ist noch nicht ausreichend geklärt. Laut Paquet et al. (2001) handelt es sich um CD105 aus Membranpartikeln, welche vom Gefäßendothel abgegeben werden.

### **Funktionen von S-Endoglin**

Beide Endoglin-Isoformen sind in der Lage TGF- $\beta$  zu binden (Bellon et al., 1993), unterscheiden sich aber in dem Ausmaß ihrer Phosphorylierung und in dem Vermögen, bestimmte TGF- $\beta$ -abhängige Signale zu regulieren (Lastres et al., 1996). Homozygote Endoglin-knockout-Mäuse sterben bereits am Embryonaltag 10 bis 10,5 im Uterus aufgrund von vaskulären und kardiovaskulären Defekten (Arthur et al., 2000; Bourdeau et al., 1999; Li et al., 1999). Die letale Wirkung des Endoglin-knockouts kann hierbei nicht durch eine Überexpression von S-Endoglin kompensiert bzw. aufgehoben werden (Perez-Gomez et al., 2005). Der cytoplasmatischen Domäne des L-Endoglins kommt demnach eine essentielle Bedeutung bei der korrekten Entwicklung von Gefäßen zu.

Betrachtet man den Einfluss von Endoglin auf die tumorbedingte Neoangiogenese, so ist eine gegensätzliche Wirkung beider Isoformen festzustellen, während L-Endoglin eine proangiogene Funktion aufweist (Li et al., 2000), hemmt S-Endoglin die Vaskularisierung von Tumoren (Perez-Gomez et al., 2005).

S-Endoglin konnte bislang nur in wenigen Zelltypen nachgewiesen werden und hier nur in erheblich geringerer Menge als die L-Isoform. Die Klonierung und Charakterisierung von S-Endoglin cDNA gelang erstmals aus einer humanen monozytären Zelllinie, in der die Endoglinsynthese durch PMA-Behandlung gesteigert wurde (Bellon et al., 1993). In Membranisolierungen von HAECs (Human Aortic Endothelial Cells) liegt Endoglin zu etwa 90% als L-Endoglin vor, die S-Isoform macht hier nur einen kleinen Teil aus (Tang et al., 2005). Eine signifikante Expression fand man bei der Maus nur im Endothel und Geweben aus Leber und Lunge (Perez-Gomez et al., 2005). Obwohl die in-vivo Relevanz von S-Endoglin noch unklar ist, erwiesen sich Transfektionsversuche mit S-Endoglin-Expressionsvektoren als nützlich, um den Einfluss der cytosolischen Domäne auf zelluläre Funktionen und die TGF- $\beta$  Signaltransduktion zu untersuchen (Letamendia et al., 1998; Lastres et al., 1996). Endoglin wird in Endothelzellen konstitutiv phosphoryliert, wobei L-Endoglin 8-fach höher phosphoryliert wird als S-Endoglin (Lastres et al., 1994).

Dem S-Endoglin fehlt das Klasse I PDZ-Binde-Motiv (Aminosäuresequenz: SSMA), welches an den carboxyterminalen Enden von L-Endoglin und Betaglykan zu finden ist (Perez-Gomez et al., 2005). Diesem Motiv wird eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung von Betaglykan auf der Zelloberfläche zugeschrieben (Blobe et al., 2001).

## 1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen einer Studie zum Metastasierungsverhalten von Brusttumorzellen wurden MDA-MB-231-Zellen angereichert, die selektiv in das Knochengewebe oder das Hirn von Versuchstieren absiedelten (Yoneda et al., 2001). Hierfür injizierte man parentale MDA-MB-231-Zellen (MDA-MB-231-P) in die linke Herzkammer weiblicher Nacktmäuse und entnahm nach 3 bis 4 Wochen Streuherde aus den jeweiligen Organen. Die Zellen wurden nun mittels Zellkultur expandiert und erneut in-vivo inokuliert. Durch wiederholte (etwa 12-malige) Passage der Zellen in den Nacktmäusen konnten Zelllinien etabliert werden, die ausschließlich in Knochen oder Hirngewebe metastasieren.

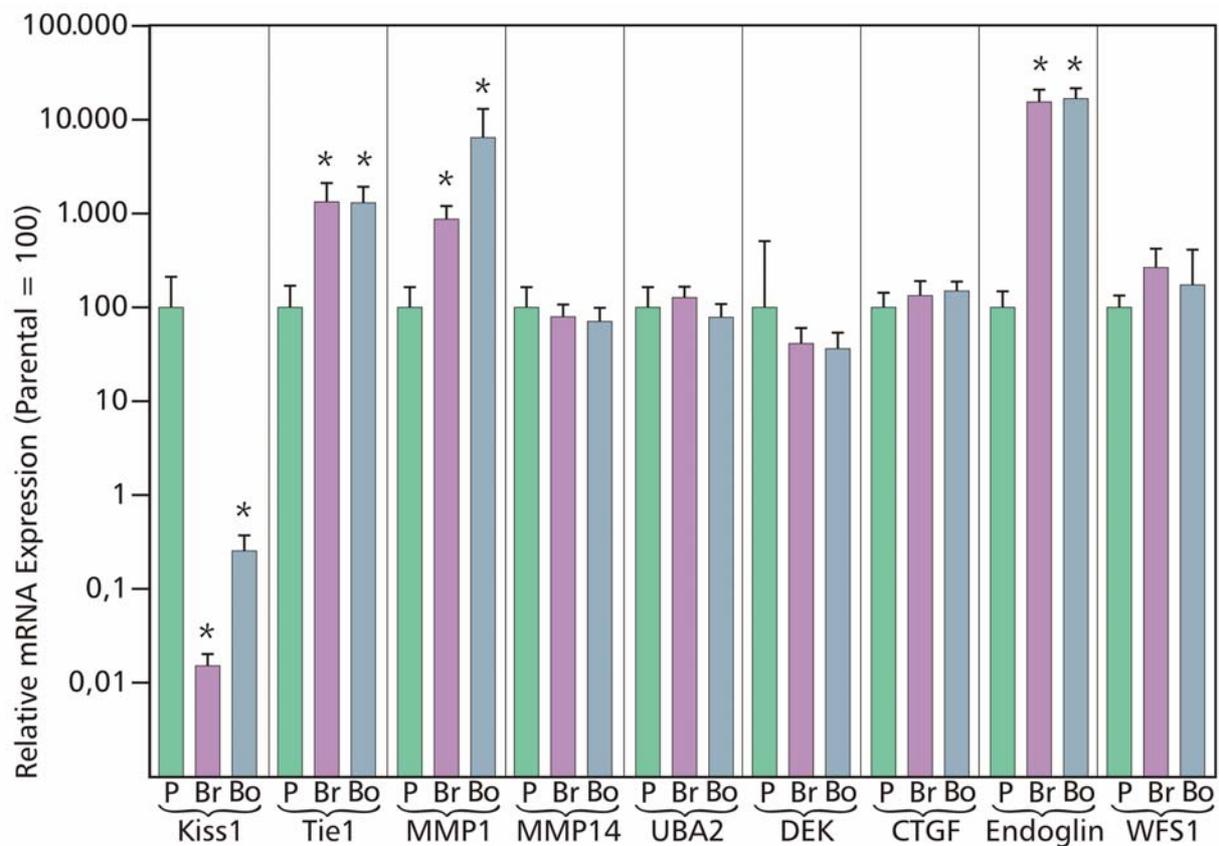
Hierbei zeigte sich, dass die Knochen-metastasierenden MDA-MB-231-Zellen (MDA-MB-231-Bo) größere Mengen an PTH-rP (Parathyroid hormone-related protein) synthetisieren als parentale Zellen der Linie. Nach einem aktuellen Modell zur Knochen-spezifischen Brusttumormetastasierung aktivieren Karzinomzellen der Brust mit Hilfe von PTH-rP Osteoblasten. Hierbei werden Osteoklasten erzeugt, die nach Aktivierung Bereiche der Knochenmatrix abbauen und auf diese Weise Raum für Tumorzellen schaffen. Da die Knochenmatrix selbst viel TGF- $\beta$  aufweist, wird die parakrine Stimulation der Osteoblasten durch PTH-rP aufrechterhalten bzw. gesteigert.

Während die Knochen-spezifische Metastasierung relativ gut verstanden ist, lässt sich der Hirn-spezifische Absiedlungsprozess noch nicht erklären. In einem Vorversuch zur vorliegenden Arbeit wurden mittels 16k cDNA Mikro-Array Gene identifiziert, die in den Zelllinien MDA-MB-231-P, MDA-MB-231-Br (Hirn-metastasierende Zellen) und MDA-MB-231-Bo differentiell exprimiert werden. Gene, bei denen sich deutliche Unterschiede im jeweiligen Expressionsniveau zeigten, wurden anschließend mittels real-time-RT-PCR auf tatsächliche Relevanz hin überprüft (Abb. 1.7). Signifikante Unterschiede ließen sich lediglich bei vier Genen nachweisen, nämlich *Kiss1*, *Tie1*, *MMP-1* und *Endoglin*.

Da das Genprodukt von *Kiss1* bereits als Suppressor von Metastasierungsprozessen beschrieben wurde und die Unterschiede in den Expressionshöhen von *Tie1* und *MMP1* geringer ausfielen, sollte in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der *Endoglin*-Überexpression für das metastatische Verhalten der Zellen untersucht werden. Hierfür wurden zunächst MDA-MB-231-P-Zelllinien mit künstlich erhöhter L- oder S-*Endoglin*-Synthese, sowie Hirn-metastasierende MDA-MB-231-Br-Zelllinien mit reduzierter Expression dieses TGF- $\beta$ -TyplII-Rezeptors erzeugt. Anschließend sollten potentielle Veränderungen in der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion und im invasiven Charakter der Zellen nachgewiesen werden. Im Rahmen der Signaltransduktions-Analyse wurde die Expression von Zielgenen der beiden Smad-abhängigen TGF- $\beta$ -Signaltransduktionswege quantifiziert.

Das invasive Potential der Zellen wurde unter Verwendung von Testsystemen zur in-vitro-Invasion bestimmt. Hierzu zählen Boyden-Kammer-Versuche und der Sphäroid-Konfrontations-Assay. Für die Beurteilung des angiogenen Potentials der Zellen wurden Matrigel-basierte Tests zur vaskulogenen Mimikry und in-vivo-Röhrenbildung („Tube-formation“) etabliert, bei denen die zu untersuchenden Zellen zuvor mittels fluoreszierenden Vitalfarbstoffen angefärbt wurden.

Das Ziel der Arbeit bestand zusammenfassend darin, mit Hilfe gentechnischer „Werkzeuge“ und in-vitro-Tests zur Zellinvasion und –angiogenese, den Einfluss der Endoglin-Expression auf Metastasierungs-relevante Eigenschaften von Brust-Karzinomzellen zu charakterisieren. Aufgrund der hohen Inzidenz und der gleich bleibend schlechten Prognose für Patientinnen mit metastasierenden Brusttumoren, sind Kenntnisse über Absiedlungsmechanismen dieser Krebszellen von großem Interesse. Ein detailliertes Wissen über die Rolle des Endoglin-Proteins bei dieser Erkrankung zeigt eventuell Ansatzmöglichkeiten für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente auf.



**Abb. 1.7 Molekulares Profil der selektiv metastasierenden MDA-MB-231-Brusttumorzellen. Gene, die im Rahmen eines 16k cDNA Mikro-Arrays durch differentielle Expression in den jeweiligen Zelllinien auffielen, wurden mittels real-time-RT-PCR näher überprüft.**

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Wachstumsfaktoren

##### Chemikalien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Artikel-Nr.</u>
Aceton	Roth	5025.5
Agar-Agar	Roth	5210.3
Agarose NEEO Ultra	Roth	2267.4
Ampicillin	Roth	K029.1
BSA (Bovine Serum Albumin)	Biomol	01399-1
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck	2382
CFDA-SE	Molecular Probes	V12883
Cyclo-RGD-Peptid	Bachem	H-2574
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D2650
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	106586
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth	6908.1
ECM (Extrazellulär-Matrix)-Gel	Sigma-Aldrich	E1270
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck	108418
Eisessig	Merck	100063
Ethanol	Merck	100983
Ethidiumbromid	Merck	111608
Fluorescent Mounting Medium	Dako	S3023
Glucose (D+) –Monohydrat	Merck	108342
(L-)Glutamin	Roth	3772.1
Glycin	Roth	3908.2
Glycerin	Roth	3783.1
Kaliumacetat	Roth	4986.1
Kaliumchlorid	Merck	104936
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	104873
Hefeextrakt	Roth	2363.3
HEPES	Sigma-Aldrich	H3375
Lipofectin	Invitrogen	18292-011
Isopropanol	Merck	109634
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck	105833
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck	105886
Methanol	Roth	8388
Methylzellulose	Sigma-Aldrich	M-0512
MOPS	Roth	6979.3
Natronlauge 1N Maßlösung	Roth	K021.1
Natriumchlorid	Merck	106404
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck	6498.1000
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL Invitrogen	15140-122
PIPES	Sigma-Aldrich	P-1851

Salzsäure 1N Maßlösung	Roth	K025.1
Sodiumdodecylsulfate ultra pure	Roth	2326.1
SNARF-1	Molecular Probes	S22801
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane)	Sigma-Aldrich	T1378
Triton X-100	Merck	108603
Trypton/Pepton (aus Casein)	Roth	8952.3
Zeocin	Cayla	ant-zn-1

## DNA- und Proteinstandards

### DNA-Standards

GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas	#SM0338
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas	#SM0328
1kb DNA Step Ladder	Promega	G6941

### Protein-Standards

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas	#SM0671
--------------------------------------	-----------	---------

## Sequenzierprimer

T7 Sequenzierprimer	5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'
BGH reverse Sequenzierprimer	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

## Enzyme

### Restriktionsnukleasen

<i>Afl</i>	New England Biolabs	R0520S
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs	R0101S
<i>BamHI</i>	Fermentas	#ER0051
<i>HindIII</i>	New England Biolabs	R0104S
<i>HpaI</i>	Fermentas	#ER0511
<i>PvuI</i>	Roche Applied Science	650137
<i>SalI</i>	Fermentas	#ER0641
<i>SacI</i>	Fermentas	#ER1131
<i>SnaBI</i>	Promega	R679A
<i>SpeI</i>	New England Biolabs	R0133L
<i>XbaI</i>	New England Biolabs	R0145S
<i>XhoI</i>	Fermentas	#ER0691

### Weitere Enzyme

DNase RQ1 (RNase-frei)	Promega	M6101
Ligase, T4 DNA Ligase (High Conc.)	Promega	M179A
Pfu DNA Polymerase	Fermentas	#EP0501
Revert Aid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas	#EP0451
RNase A (DNase-frei)	Sigma-Aldrich	R6513
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems	4326708
Trypsin	Sigma-Aldrich	T4799

## Wachstumsfaktoren und Antikörper

Wachstumsfaktoren

Rekombinantes humanes TGF- $\beta$ 1	PeptoTech Inc.	100-21C
--------------------------------------	----------------	---------

Antikörper

Anti-Endoglin (H-300)	Santa Cruz Biotech	sc-20632
Anti-GAPDH-Antikörper (FL-335)	Santa Cruz Biotech	sc-25778
Anti-I $\delta$ 1 (C-20)	Santa Cruz Biotech	sc-488
Anti-PAI-1-Antikörper (H-135)	Santa Cruz Biotech	sc-8979
Anti-Tie-1-Antikörper (C-18)	Santa Cruz Biotech	sc-342
Anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörper [2E6]	Abcam	ab647-100
Anti-ZRP-Antikörper	BD Biosciences	612254
Alexa Fluor 488 Ziege-Anti-Kaninchen	Molecular Probes	31627
Alexa Fluor 555 Ziege-Anti-Mouse	Molecular Probes	A31621
Schwein-Anti-Kaninchen, biotinyliert	Dako	E0353
Ziege-Anti-Kaninchen, Gold-konjugiert	British BioCell	EM.GAR1

## 2.1.2 Vektoren

**Tabelle 2.1 Für Klonierungs- und Transfektionsexperimente verwendete Vektoren**

Vektor	cDNA	eukaryotischer Resistenzmarker	Quelle
pcDNA3.1/Zeo(-)	nicht vorhanden	Zeocin (Sh ble –Gen)	Invitrogen
pcEXV-EndoL	L-Endoglin	nicht vorhanden	Dr. Carmelo Bernabeu, Madrid
pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoL	L-Endoglin	Zeocin (Sh ble –Gen)	eigenes Konstrukt
pcEXV-EndoS	S-Endoglin	nicht vorhanden	Dr. Carmelo Bernabeu, Madrid
pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoS	S-Endoglin	Zeocin (Sh ble –Gen)	eigenes Konstrukt
pSUPER-EndoEx4	entfällt	nicht vorhanden	Dr. Carmelo Bernabeu, Madrid
pSUPER-Zeo	entfällt	Zeocin (Sh ble –Gen)	Dr. Vera Bianchi, Padova, Italien
pSUPER-Zeo-EndoEX4	entfällt	Zeocin (Sh ble –Gen)	eigenes Konstrukt

## 2.1.3 Kommerziell erhältliche Testsysteme

TaqMan Gene Expression Assay (siehe Tab. 2.4)	Applied Biosystems
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega E2920

## 2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte

ABI PRISM®-7000 Sequence Detection System Real-Time PCR Gerät	Applied Biosystems
Analysewaage L610	Sartorius Laboratory
Begasungsbrutschrank B 5060 EC / CO <sub>2</sub>	Heraeus
Elektronenmikroskop EM900, TEM	Zeiss
Elektrophoresekammer GNA-100 (AGE)	Pharmacia Biotech
Elektrophoresis Power Supply EPS600 (AGE)	Pharmacia Biotech
Filmkassette Hypercassette™ 18×24cm	GE Healthcare
Fluoreszenzspektrometer F-2000	Hitachi
Heißluft-Sterilisator UT 5050 EK	Heraeus
Heizblock	Eppendorf
Hochdruckdampf-Sterilisator	Schütt
Inkubator Innova 4200 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Luminometer Veritas™	Turner Biosystems
Magnetrührer MR 2000	Heidolph
Mikrochemotaxis-Kammer	Neuro Probe Inc.
Mikroprozessor pH-Meter 762	Knick
Mikroskop Axiovert 200M + Apotome	Zeiss
Mikrowellengerät	Panasonic
Semi-Dry-Blotter Trans-Blot® SD	Bio-Rad
Schüttler	Gerhardt
Sterile Werkbank	Heraeus
Thermocycler T Gradient	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
UV-Illuminator mit Dokumentationssystem	Herolab
UV/VIS-Spektrometer U-2000	Hitachi
Vertikal-Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Vortex-Mixer VF2	Janke & Kunkel
Wasserbad	Memmert
Zählkammer	Assistent
Zentrifuge Sorvall RC-5B Superspeed	Thermo Electron
-Centrifuge mit Rotor SS-34	Thermo Electron

VerbrauchsmaterialBakterien- und Zellkultur

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Artikel-Nr.</u>
Einmalkanüle Fine-Ject (0,7×30mm)	Henke Sass Wolf	
Einmalspritzen, Terumo Syringe	Terumo	
Kryoröhrchen CryoTube™ Vials	Nunc	379418
Petrischalen 35×10mm	Sarstedt	83.1800

Petrischalen 100×20mm	Sarstedt	83.1802
Petrischalen 150×20mm	Sarstedt	83.1803
Pipetten, Serologische (5 ml)	Sarstedt	86.1253.001
Pipetten, Serologische (10 ml)	Sarstedt	86.1254.001
Pipetten, Serologische (25 ml)	Sarstedt	86.1685.001
Röhrchen mit Belüftungsstopfen (13 ml)	Sarstedt	62.515.028
Röhrchen (30 ml)	Sarstedt	60.543.001
Sterilfilter Filtropur 0,20µm	Sarstedt	83.1826.001
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup> Vented Cap	Sarstedt	83.1813.002
Zellkulturflaschen 25cm <sup>2</sup> Vented Cap	Sarstedt	83.1810.302
Zellkulturplatten (6-Well)	TPP	92006
Zellkulturplatten (24-Well)	Costar Corporation	3524
Zellkulturplatten (96-Well)	TPP	92096
Zellkulturplatten (96-Well, U-shape)	greiner bio-one	650185
Zellschaber 24cm	TPP	99002
Zentrifugenröhrchen 10ml	Sarstedt	62.9924.284
Zentrifugenröhrchen 50ml	Sarstedt	62.547.254
<u>Dual-Glo™ Luciferase Assay System</u>		
Luminometer-Zellkulturplatten 96-Well	NUNC	136101
<u>Molekularbiologie</u>		
Dialysefilter, MF Membranfilter	Millipore	VSWP025
Skalpell, Einmalskalpell	neoLab	11568
<u>Immuncytochemie</u>		
AEC Substrate Chromogen	Dako	K3464
Dako® Protein Block Serum-Free	Dako	X0909
Deckgläser 22×22mm	Menzel-Gläser	BB022022A1
Objektträger Superfrost, 76×26mm	Roth	1879
<u>Western-Blot</u>		
Blottingpapier, extra dick, Protean®	Bio-Rad	1703969
Filme Hyperfilm ECL, 18×24cm	GE Healthcare	RPN3103K
PVDF-Membran Hybond-P	GE Healthcare	RPN1416F
PE-Schlauchfolie	Eydam	14012
Ultrafiltrationsmembran, YM10	Amicon® Millipore	13622
<u>Real-Time PCR</u>		
96-Well Real-Time PCR Platten	Sarstedt	72.1978.502
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt	95.1994
<u>Migrationstest</u>		
Membranen mit 5µm Poren	Neuro Probe Inc.	PFB5

## 2.1.5 Medien und Lösungen für die in-vitro-Kultur

## 2.1.5.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur und -Transfektion

**Medien:**

Astrozytenmedium: DMEM	Gibco BRL Invitrogen	42430
Endothelzellmedium, Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell	C-22210
Supplement Mix (für Endothelzellmedium)	PromoCell	C-39215
FKS Foetal Bovine Serum (Gold)	PAA	A15-649
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL Invitrogen	15140-122
OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium	Gibco BRL Invitrogen	11058-021

**Lösungen:**

BSA (Bovine Serum Albumin) -Stammlösung		10%ig (w/v) in PBS ansetzen, aliquotieren, bei -20°C einfrieren
PBS (Phosphate Buffered Saline)- Puffer pH 7,2	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(→ 136 mM) (→ 2,7 mM) (→ 1,8 mM) (→ 10 mM) ad 1 L mit H <sub>2</sub> O bidest, autoklavieren
Trypsin/EDTA-Lösung für das Passagieren von Zellen	24 ml PBS 1 ml 2,5 % Trypsin 37 mg EDTA	(→ 1500 Units/ml) (→ 4 mM) steril filtrieren, bei -20°C lagern
DNase-Lösung	1 mg DNase	in 5 ml H <sub>2</sub> O bidest, steril filtriert

## 2.1.5.2 Medien für die Bakterienkultur und -Transformation

LB (Lysogeny Broth) Medium pH 7,4 (Sambrook <i>et. al.</i> , 1989)	10 g Trypton / Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl	(→ 171 mM) ad 1 L mit H <sub>2</sub> O bidest, autoklavieren
---	---	---

,Low Salt' LB-Medium pH 7,5 (für Zeocin Selektion)	10 g	Trypton / Pepton	
	5 g	Hefeextrakt	
	5 g	NaCl	(→ 85,5 mM)
	ad 1 L mit H <sub>2</sub> O bidest, autoklavieren		
SOB-Medium (Hanahan, 1987)	20 g	Trypton / Pepton	
	5 g	Hefeextrakt	
	0,5 g	NaCl	(→ 8,6 mM)
	0,2 g	KCl	(→ 2,7 mM)
	2,0 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	(→ 9,8 mM)
	1,2 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	(→ 4,8 mM)
	ad 1 L mit H <sub>2</sub> O bidest		
SOC-Medium	20 ml	sterile 1 M Glukose	(→ 20 mM)
	ad 1 L mit sterilem SOB-Medium nicht autoklavieren		

Für die Herstellung von Unterschichtagar wurde den Medien 1,5% (w/v) Agar-Agar (15 g/l) zugefügt. Selektiven Bakterienmedien wurden die Antibiotika nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C als sterile Lösungen in folgenden Konzentrationen zugegeben:

**Tabelle 2.2 Für die Vektoramplifikation und Klonselktion in Prokaryoten (*E. coli*) verwendete Antibiotika-Konzentrationen**

Antibiotikum	Stamm-Lösung	Verdünnung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml	1:500	100 µg/ml (269 µM)
Zeocin	100 mg/ml	1:4000	25 µg/ml (16 µM)

### 2.1.6 Allgemeine Lösungen und Puffer

#### Membranisolierung:

Lysispuffer pH7,4 (Zellmembranen)	5 mM	HEPES
	2 mM	Vanadat (Natriummetavanadat)
Aufnahmepuffer pH7,4 (Zellmembranen)	20 mM	HEPES
	140 mM	NaCl
	2 mM	Vanadat (Natriummetavanadat)

#### Zellhomogenatisierung:

Tritonlysispuffer	50 mM	Tris pH 7,8
	100 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1%	Triton-X-100
	2 mM	Vanadat (Natriummetavanadat)

**SDS-PAGE und Western-Blot:**

Probenpuffer (SDS-Ladepuffer)	0,23 g 1,25 ml 1 ml 0,5 ml 7,25 ml	SDS Gelpuffer II Glycerin 2-Mercapto-Ethanol H <sub>2</sub> O bidest	(→ 80 mM)  (→ 10% v/v) (→ 5% v/v)
Probenpuffer (~4×) für geringe Proteinkonzentrationen	1 g 6,3 ml 5 ml 2,5 ml	SDS Gelpuffer II Glycerin 2-Mercapto-Ethanol	(→ 251 mM)  (→ 36% v/v) (→ 18% v/v)
Elektrodenpuffer pH 8,2 – 8,3	15,2 g 72 g 5 g	Tris pH 8,2 – 8,3 Glycin SDS ad 5 L mit H <sub>2</sub> O bidest	(→ 25 mM) (→ 0,19 M) (→ 3,5 mM)
Gelpuffer I pH 8,8	1,5 M 0,4 %	Tris/HCl SDS	
Gelpuffer II pH 6,8	0,5 M 0,4 %	Tris/HCl SDS	
Lauffrontanzeiger		gesättigte Bromphenolblaulösung	
Transferpuffer pH9,0	25 mM 192 mM 10% (v/v)	Tris Glycin Methanol	
TBST (Tris-buffered Saline Tween) pH7,5	50 mM 150 mM 1 mM 0,1 % (v/v)	Tris NaCl EDTA Tween	
„Strip“-Puffer pH2,5	0,1 M	Glycin	
„Strip“-Waschpuffer pH7,5	0,1 M	Tris	
TAE-Stammlösung (10x)	48,4 g 20 ml 11,4 ml	Tris 0,5 M EDTA Eisessig pH 8,0 einstellen ad 1 L mit H <sub>2</sub> O bidest	(→ 40 mM) (→ 1 mM) (→ 0,2 M)
Auftragspuffer (6x)	25 µl 25 µl 1,5 ml	Bromphenolblau Xylencyanol Ficoll ad 10 ml mit H <sub>2</sub> O bidest	(→ 0,25%) (→ 0,25%) (→ 15%)

**Weitere Lösungen und Puffer**

Ampicillin-Stammlösung (50 mg/ml)	500 mg	Ampicillin ad 10 ml mit H <sub>2</sub> O bidest	(→ 0,135 M)
--------------------------------------	--------	--	-------------

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert (FP30/0, 2 CA-S Filtereinheit, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) und bei -20°C gelagert.

Glukose-Stammlösung (2M, 40% w/v)	200 g 500 ml	Glukose H <sub>2</sub> O bidest, bei 60°C im Wasserbad gelöst.	(→ 2,0 M)
--------------------------------------	-----------------	--	-----------

MgCl <sub>2</sub> -Stammlösung (1 M)	20,33 g	MgCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O bidest	(→ 1,0 M)
---	---------	---	-----------

Kaliumacetat-Stammlösung (3 M) pH 5,5	29,44 g	Kaliumacetat ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O bidest	(→ 3,0 M)
--	---------	---	-----------

EDTA-Stammlösung pH8,0 (0,5M)	186,1 g 800 ml 20 g	EDTA H <sub>2</sub> O bidest NaOH-Plätzchen pH 8,0 einstellen ad 1 L mit H <sub>2</sub> O bidest	(→ 0,5 M)
----------------------------------	---------------------------	--	-----------

GTE-Puffer (nach Birnboim & Doly, 1979)	2,5 ml	2M Glucose-Stammlsg.	(→ 50 mM)
	2,5 ml	Tris/HCl-Lsg. pH8	(→ 25 mM)
	2,0 ml	EDTA-Lsg. pH8 ad 100ml mit H <sub>2</sub> O bidest, autoklavieren	(→ 10 mM)

NaOH-Lysispuffer	2,0 ml	10N NaOH Stammlsg.	(→ 0,2N)
	10 ml	SDS-Stammlsg. ad 100ml mit H <sub>2</sub> O bidest	(→ 1%)

Tris/HCl-Stammlösungen (1 M) pH 6,8 bzw. 7,6	121,1 g	Tris	(→ 1 M)
	800 ml	H <sub>2</sub> O bidest pH 7,6 bzw. pH 6,8 einstellen ad 1 L mit H <sub>2</sub> O bidest	

Kaliumacetat-Puffer	60 ml	5M Kaliumacetat-Lsg.	(→ 3 M)
	11,5 ml	Eisessig	(→ 2M)
	28,5 ml	H <sub>2</sub> O bidest	

TE-Puffer	1 ml	Tris/HCl-Stammlsg.	(→ 10 mM)
	200 µl	EDTA-Stammlsg. pH 8,0 einstellen, ad 100 µl mit H <sub>2</sub> O bidest	(→ 1 mM)

Phenol/Lösung	gesättigt mit 3 M NaCl
Chloroform/Isoamylalkohol	24:1 (v/v)-Mischung

## 2.1.7 Zellen und Bakterien

### 2.1.7.1 Kompetente Bakterien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Artikel-Nr.</u>
Library Efficiency <sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> Competent Cells	Invitrogen	18263-012

### 2.1.7.2 Zellen humaner Herkunft

<u>Bezeichnung</u>	<u>Quelle/Hersteller</u>
MDA-MB-231-Brusttumorzelllinien	Toshiyuki Yoneda, University of Texas, San Antonio
U343-Gliomazelllinie	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
U118-Gliomazelllinie	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
Glioblastom (Grad IV)-Primärzellen	Neurochirurgie der Universität Kiel
HUVEC, primäre Endothelzellen	PromoCell GmbH, Heidelberg
HEK-293, embryonale Nierenzelllinie	CCS Cell Culture Service, Hamburg
THP-1, monozytäre Zelllinie	National Institutes of Health, Bethesda
C28/I2, Chondrozytenzelllinie	Dr. Mary B. Goldring, Harvard Institutes of Medicine, Boston

Bei der MDA-MB-231-Brusttumorzelllinie handelt es sich um eine 1974, aus einer Patientin (Alter: 51, Abstammung: kaukasisch) mit einem Adenokarzinom der Brustdrüse, gewonnene Zelllinie (Cailleau et al., 1974). Die Zellen wurden aus einer pleuralen Blutung isoliert. Sie wachsen im Rahmen der Zellkultur adhärent auf den Kulturgefäßböden und weisen eine epithelförmige Gestalt auf. MDA-MB-231-Zellen sind annähernd triploid, die normalen Chromosomen N8 und N15 fehlen jedoch.

Die Gewebeproben aus humanen Hirntumoren wurden freundlicherweise von PD Dr. Janka Held-Feindt (Neurochirurgie der Universität Kiel) zur Verfügung gestellt. Sie stammten aus erforderlichen Resektionen und wurden mit dem Einverständnis der Ethikkommission der Universität Kiel verwendet, wobei die ethischen Standards der Helsinki-Vereinbarung von 1975 berücksichtigt wurden.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Brusttumor- und Gliomazelllinien

Die Kultivierung dieser adhärent wachsenden Zellen erfolgte in Inkubatoren bei 37°C in 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Als Kulturgefäße dienten meist TC-75CN Gewebekulturflaschen (Sarstedt). Sowohl MDA-MB-231-Zellen als auch die Gliomzelllinien U343 und U118 wachsen sehr gut in einem Medium, welches für Astrozyten verwendet wird.

Das hier verwendete Astrozytenmedium setzt sich folgendermaßen zusammen:

DMEM-A-Medium:	DMEM-Medium	(Invitrogen)
	+ 10% FKS (Gold)	(PAA)
	+ 3% Glutamin	(Roth)
	+ 1% Penicillin/Streptomycin	(Invitrogen)

Das Medium wird als 500ml Lösung angesetzt, die Zusätze werden sterilfiltriert und dann hinzugegeben. Eine 500ml Flasche Astrozytenmedium ist bei einer Temperatur von 4°C 2-3 Wochen lagerfähig. Sobald der Zellrasen in den Kulturgefäßen optische Konfluenz erreichte, wurden die Zellen subkultiviert oder für Versuche ausgesät. Die Subkultivierung erfolgte 1-2-mal pro Woche.

#### 2.2.1.2 Kultivierung weiterer Zelltypen

Die HUVE (Human Umbilical Vein Endothelial)-Zellen wurden von der Firma PromoCell (PromoCell GmbH, Heidelberg) in proliferierender Form a 500000 Zellen in einer TC-75CN-Kulturflasche bezogen. Sie sind bereits vom Hersteller negativ auf das Vorhandensein von Bakterien, Pilzen und humanpathogenen Viren, wie HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet worden. Die Zellen erhielten sofort nach Ankunft frisches Endothelzellmedium (s.u.) und konnten bereits nach 2 Tagen im Verhältnis 1:3 subkultiviert werden. In Kultur lassen sich primäre HUVE-Zellen nur bis zur Subkultur 12-13 halten, für Versuche sollten jedoch ausschließlich Zellen verwendet werden, die sich in einer Passage <10 befinden.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>-Konzentration und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre, wobei die Zellen alle zwei Tage frisches Medium erhielten. Für die kontinuierliche Haltung der Zellen wurden kleine Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet, bestimmte Arbeitsschritte, beispielsweise Zellmembranisolierungen für Western-Blots, erforderten jedoch eine Kultur auf großen Kulturflaschen (ebenfalls Sarstedt). Als Wachstumsmedium diente das Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell, Artikel-Nr. C-22010), welches mit einer Zusatzlösung (SupplementMix, PromoCell, Artikel-Nr. C-39215) ergänzt wurde. Nach Zugabe der Lösung weist das Nährmedium folgende Wachstumsfaktoren auf:

ECGS/H	(Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin)	0,4 % (v/v)
FKS	(Fötale Kälberserum)	2,0 % (v/v)
EGF	(Epidermal Growth Factor)	0,1 ng/ml

Hydrocortison	1,0 µg/ml
Basic Fibroblast Factor	1,0 ng/ml

Es hat sich gezeigt, dass die Vitalität der Zellen am längsten erhalten bleibt, wenn sie nicht häufiger als 1× pro Woche subkultiviert werden.

### HEK-293-Zelllinie

Die Kultivierung dieser embryonalen Nierenzelllinie erfolgte wie im Fall von MDA-MB-231- und Gliomazellen. Als Medium diente wiederum DMEM-A-Medium.

### Chondrozyten- und monozytäre Zelllinien

Immortalisierte Chondrozyten (C28/12-Zelllinie) aus dem Rippenknorpel und monozytäre Zellen (THP-1-Zelllinie) wurden, wie bei Pufe et al., 2007 und Pufe et al., 2003 beschrieben, kultiviert. Der Zelltyp der THP-1-Zelllinie ist als monozytäre Leukämie einzustufen (Tsuchiya et al., 1982).

### **2.2.1.3 Subkultivierung von Zellen**

#### Subkultivierung von nicht-endothelialen Zellen

Zunächst temperierte man Wachstumsmedium, PBS und Trypsinlösung in einem Wasserbad bei 37°C für 20 min. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen einmal mit 5-10ml warmen PBS gespült. Überschüssiger Puffer wurde mit Hilfe der Vakuumpumpe abgesaugt. In jede kleine Kulturflasche (TC-75, Sarstedt) pipettierte man nun 3ml, in jede große (TC-75, Sarstedt) 5ml warme Trypsin/EDTA-Lösung. Es handelt sich hierbei um PBS-Puffer mit einem Zusatz von 0,1% Trypsin (1500 BAEE Units/ml, Sigma-Aldrich) und 0,2% EDTA (Fluka). Die Lösung wurde durch Schwenken der Flasche gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt und nach 15 Sekunden wieder sorgfältig abgesaugt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Konzentration im Brutschrank. Die Zellen konnten jetzt in 5ml FKS-haltigen A-Medium aufgenommen werden. Bestandteile des FKS inaktivieren Trypsin, so dass eine Trypsin-Neutralisierungslösung hier nicht notwendig ist. Die Zellen wurden in der NEUBAUER-Kammer gezählt, auf die gewünschte Zellzahl verdünnt und wieder ausgesät.

#### Subkultivierung von HUVE-Zellen

Die Subkultivierung von HUVE-Zellen erfolgte prinzipiell entsprechend der o.g. Vorgehensweise. Da diese Zellen jedoch empfindlicher als die übrigen eingesetzten Zellen sind, musste das Protokoll leicht abgeändert werden.

HUVE-Zellen bilden auf den Plastikoberflächen der Kulturbedälter keinen geschlossenen Zellrasen. Es ist daher wichtig, die Zellen bereits bei einer optischen Konfluenz von höchstens 80% zu subkultivieren. Vor der Trypsinbehandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen (s.o.). Die 5-minütige Inkubation in Gegenwart von Trypsin erfolgte bei Raumtemperatur (eine Inkubation bei 37°C hat sich als unvorteilhaft erwiesen), wobei wiederum schon nach 15 Sekunden überschüssige Trypsinlösung sorgfältig entfernt wurde. Die Endothelzellen wurden im Verhältnis 1:3 bis 1:5 in frischem serumhaltigen HUVEC-Medium ausgedünnt („gesplittet“) und dann ausgesät.

### **2.2.1.4 Einfrieren, Lagern und Auftauen von Zellen**

#### **Einfrieren und Lagern von Zellen**

Wurden bestimmte Zellen oder Zelllinien vorübergehend nicht benötigt, so wurden sie bis zum späteren Gebrauch eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zu diesem Zweck ließ man die Zellen zunächst bis zum Erreichen der optischen Konfluenz wachsen. Die Kultivierung erfolgte bevorzugt in großen Kulturflaschen, da die Zellen in Aliquots von 2 Millionen (besser: 4 Millionen) Zellen eingefroren werden. Eine große Kulturflasche mit optisch dichtem Zellrasen weist durchschnittlich etwa 10 Millionen Zellen auf. Die Zellen wurden zunächst mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung, entsprechend dem Vorgehen bei der Subkultivierung, von den Flaschenböden abgelöst.

Die Aufnahme der Zellen erfolgte in 2ml (bei kleinen Flaschen) bzw. 5ml (bei großen Flaschen) FKS-haltigem Medium. Nun wurde in einer NEUBAUER-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1000 UPM (Umdrehungen pro Minute, Tischzentrifuge Biofuge pico, Heraeus) in 10ml (bzw. in seltenen Fällen in 50ml) Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden (Sarstedt). Das Sediment wurde nun in DMSO-haltigen (9% v/v) Astrozytenmedium aufgenommen. Das Volumen wurde so gewählt, dass die erhaltene Zellsuspension eine Zellzahl von 2 Millionen (bzw. 4 Millionen, s.o.) Zellen pro 1,8ml aufwies. Die auf diese Weise vorbereiteten Ansätze wurden in 1,8ml Kryoröhrchen (NUNC) pipettiert und sogleich in einen auf -80°C temperierten Kühlschrank gegeben. Nach 24 Stunden erfolgte zur endgültigen Lagerung eine Überführung in flüssigen Stickstoff.

#### **Auftauen von Zellen**

Die Lagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Die 1,8ml Kryoröhrchen (NUNC) wiesen jeweils 2 (bzw. 4) Millionen Zellen in 1,8 Milliliter DMSO-haltigen (9% v/v) Mediums auf. Nach einem schnellen Auftauen der Zellsuspension im Wasserbad bei 37°C wurden die Zellen in ein 10ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) mit 5ml Astrozytenmedium +10% (v/v) FKS überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000 UPM für 5 min (Tischzentrifuge Biofuge pico, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 3ml Astrozytenmedium + 10% (v/v) FKS aufgenommen. Nun wurden die Zellen in kleine Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät und bei 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>-Konzentration und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Inkubator kultiviert. Nach 24h wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und gegen frisches ersetzt. Das Auftauen eingefrorener HUVEC Zellen erfolgte auf dieselbe Art und Weise, nur dass anstelle des Astrozytenmediums hier das bereits beschriebene Endothelzellmedium zum Einsatz kam.

### **2.2.2 Zellzahlbestimmungen in der NEUBAUER-Zählkammer**

Um eine genaue Kontrolle des Zellwachstums gewährleisten zu können, sollten Zellen vor der Aussaat immer gezählt werden. Dies ist nicht nur für die kontinuierliche Kultur der Zellen, sondern auch besonders bei Aussaaten für Experimente von entscheidender Bedeutung. Die Zellzählung erfolgte in einer NEUBAUER-Zählkammer (Assistent, Sondheim). Von der Zellsuspension wurden 30µl abgenommen

und mit 30µl Trypanblau (Sigma-Aldrich) in 0,9% (w/v) NaCl-Lösung gemischt. Bereits abgestorbene Zellen lassen sich durch Trypanblau anfärben und gehen nicht mit in die Zählung ein. Die Zellsuspension wurde durch Auf- und Abpipettieren in einen homogenen Zustand gebracht und in die mit einem Deckgläschen versehene Zählkammer gefüllt. Unter dem Mikroskop erfolgte nun das Auszählen von fünf Gruppenquadraten der Kammer. Da die fünf Gruppenquadrate ein Volumen von 0,02µl aufweisen und die Zellen durch die Trypanblau-Lösung 1:2 verdünnt werden, lässt sich die Zellzahl nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Zellzahl in fünf Gruppenquadraten} \times 10^5 = \text{Zellen pro ml Medium}$$

### 2.2.3 Beschichtung von Glasoberflächen für die Zellkultur

#### Poly-D-Lysin (PDL)-Beschichtung von Deckgläsern

Für immuncytochemische Nachweismethoden und den Sphäroid-Aggregat-Konfrontationstest wurden die Zellen bzw. Sphäroide auf Deckgläsern ausgesät. Um eine bessere Adhäsion der Zellen zu gewährleisten, beschichtete man die Deckgläser vorher mit Poly-D-Lysin. Die Deckgläser wurden zunächst in Petrischalen in 100%igem Ethanol gewaschen. Nach Abgießen des Ethanols wurde jedes Deckgläschen mit 100µl sterilfiltrierter PDL-Lösung (Sigma-Aldrich; 0,002% Stammlösung) bedeckt und anschließend für 30 bis 60 min bei Raumtemperatur unter der Sterilwerkbank inkubiert. Nach der Inkubation spülte man die Deckgläser zweimal mit Aqua bidest und ließ sie ca. eine Stunde lang trocknen. Die auf diese Weise vorbereiteten Deckgläser wurden bis zum Einsatz in sterilen Petrischalen aufbewahrt.

#### Matrigelbeschichtung von Objektträgern

Für den Test auf in-vitro Pseudogefäßbildung kultivierte man die Zellen auf Glas-Objektträgern, die mit einer Beschichtung aus Extrazellulär-Matrix-Proteinen versehen waren. Für die Beschichtung wurde Extracellular Matrix (ECM, „Matrigel“) Gel der Firma Sigma (Sigma, Saint Louis, Artikel-Nr. E1270) verwendet. Das Gel wird aus einem Engelbreth Holm-Swarm (EHS) Maus Sarkom nach dem Protokoll von Kleinman et al (Kleinman et al., 1993) gewonnen. Die Hauptkomponenten sind Laminin, Kollagen Typ IV, Heparan-sulfat Proteoglycan und Entactin. Die Protein-Konzentration des Gels liegt bei 8 bis 12 mg/ml. ECM Gel wird bei -20°C gelagert und muss sollte vor der Verwendung über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufgetaut werden. Bei Temperaturen von 20-40°C polymerisiert das Matrigel aus und bildet dann eine rekonstituierte Basalmembran.

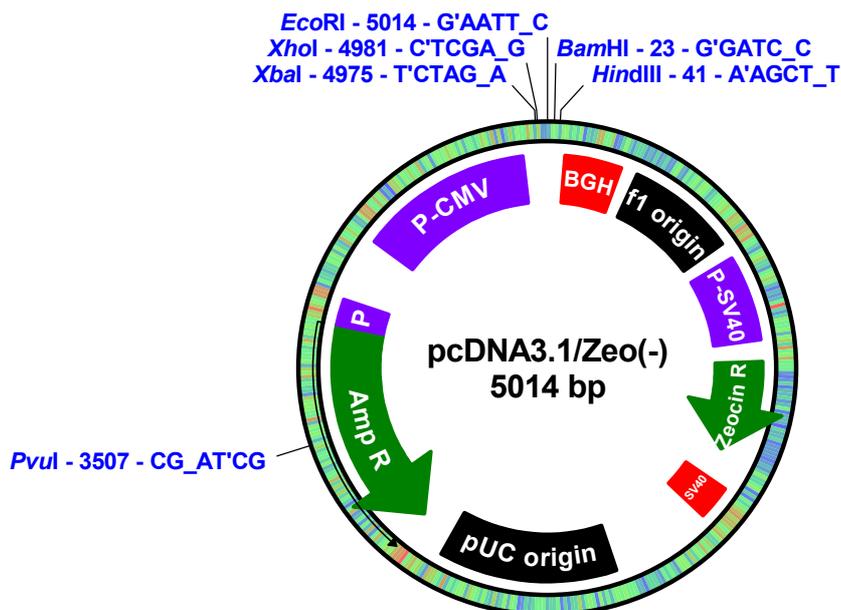
Die Objektträger wurden zunächst, entsprechend dem Vorgehen bei den Deckgläsern, mit PDL beschichtet und unter Wahrung der Sterilität im Kühlschrank (4°C) vorgekühlt. Nun tropfte man unter der Werkbank mit Hilfe einer vorgekühlten, sterilen Spritze (0,4×20mm Kanüle) etwa 50-100µl kaltes Matrigel in die Mitte der beschichteten Seite des Objektträgers. Hierbei wurde auf eine gleichmäßige Beschichtung geachtet. Die Objektträger wurden in sterile große Petrischalen gegeben, in denen das Matrigel 30min bei Raumtemperatur polymerisieren konnte.

## 2.2.4 Herstellung der Vektoren

### 2.2.4.1 Konstruktion der Endoglin-Expressionsvektoren

Die L-Endoglin-cDNA und S-Endoglin-cDNA enthaltenden Vektoren pcEXV-Endo-L und pcEXV-Endo-S wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Carmelo Bernabeu (Centro de Investigaciones Biologicas, Madrid) zur Verfügung gestellt, der kommerziell erhältliche Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(-) stammt von Invitrogen. Im Folgenden wird exemplarisch die Herstellung des Plasmids pcDNA3.1/Zeo(-)-Endo-L beschrieben, die Konstruktion von pcDNA3.1/Zeo(-)-Endo-S erfolgte auf gleiche Weise, allerdings wies das S-Endoglin cDNA-enthaltende *EcoRI*-Fragment eine Größe von 2,4kb auf. Zur Kontrolle korrekter Klone wurden die gleichen Restriktionsenzyme verwendet, mit denen auch der Vektor pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoL überprüft wurde.

Zunächst wurden die Plasmide pcEXV-Endo-L und pcDNA3.1/Zeo(-) in kompetente *Escherichia coli* Bakterien (Library Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> Competent Cells, Invitrogen) eingeschleust und in diesen vermehrt. Nun isolierte man die Plasmid-DNA beider Vektoren mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Präparationssystems.



**Abb. 2.1** Der Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(-) der Fa. Invitrogen GmbH (Karlsruhe). Die Expression einer klonierten cDNA erfolgt in Säugetierzellen konstitutiv mit Hilfe einer Enhancer-Promotor-Sequenz des humanen Cytomegalovirus (P-CMV) und Transkriptions-Terminations-Sequenzen des bovinen Wachstumshormons (BGH). Die flankierenden T7- und BGH-Primerbindungsstellen (in Abbildung nicht dargestellt) erlauben eine Sequenzierung der integrierten cDNA. Das Plasmid besitzt eine Zeocin-Kassette, bestehend aus einem SV40-Promotor (P-SV40), der Zeocin-cDNA (Zeocin R) und dem Poly-Adenylierungssignal des Simian Virus 40 (SV40, ein onkogener Polyomavirus, welcher sowohl in Affen, als auch im Menschen vorkommt), so dass es sich zur stabilen Transfektion mittels Zeocin-Reagenz (Cayla, Toulouse, Frankreich) eignet. Für die Vermehrung und Selektion innerhalb *E. coli*-Bakterien stehen ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR; samt prokaryotischen Promotor, P) sowie der Replikationsursprung des pUC-Plasmids (pUC origin) zur Verfügung.

Jeweils 6µg der Plasmide pcEXV-Endo-L und pcDNA3.1/Zeo(-) wurden in 20µl Ansätzen mit 4 Units *EcoRI* verdaut. Es folgten Agarosegelelektrophoresen im präparativen Maßstab. Hierbei ergaben sich für den pcEXV-Endo-L –Verdau zwei Banden (2,3kb und 3,0kb) und für den pcDNA3.1/Zeo(-) –Verdau eine Bande (5kb). Gelbereiche, in denen sich das 2,3kb große pcEXV-Endo-L-Fragment (enthält L-Endoglin cDNA) oder der linearisierte Vektor befanden, wurden mit einem frischen Skalpell in Form eines kleinen Gelblöckchens ausgeschnitten.

Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „MinElute Gel Extraktion Kit“ (Qiagen, Hilden) aus der Agarose eluiert und gereinigt. Die anschließende Ligation der beiden Fragmente erfolgte bei einem molaren cDNA-Vektor -Verhältnis von 3:1. Etwa 280ng Endoglin cDNA und 200ng linearisierter pcDNA3.1/Zeo(-)-Vektor wurden mit 10 Units Ligase (T4 DNA Ligase, High Conc., 20Units/µl) in einem Volumen von 20µl 1× Ligase-Puffer inkubiert. Die Ligationsreaktion erfolgte für 18 Stunden bei 15°C. Nun verdünnte man den Ansatz 1:2 in 10mM Tris-HCl pH7,5 und 1mM EDTA und setzte in der folgenden Transformation jeweils 1µl der Verdünnung (12ng) pro 100µl Bakteriensuspension (*E. coli*, Library Efficiency<sup>®</sup> DH5α<sup>™</sup> Competent Cells) ein.

Die Transformationsprozedur erfolgte nach Protokoll des Herstellers (Invitrogen). Am nächsten Tag zeigten sich auf den Ampicillin-haltigen (100µg/ml) LB-Platten Bakterienkolonien, von denen dann Plasmide im „Mini“-Maßstab isoliert wurden. Die vorläufige Kontrolle der jeweiligen Plasmide erfolgte zunächst durch Restriktionsanalyse mit Hilfe der Enzyme *EcoRI*, *BamHI*, *XhoI*, *NotI* und *SacI*. Von einer Kolonie, dessen Plasmid bei den Restriktionsanalysen korrekte Bandenmuster aufwies, wurden Plasmid-Präparationen im Midi-Maßstab durchgeführt. Der fehlerfreie Einbau der L-Endoglin-cDNA wurde nun endgültig durch Sequenzierung (Seq-Lab Sequence Laboratories, Göttingen; Primer: T7 und BGH reverse -Sequenzierprimer) überprüft. Die auf diese Weise erhaltene Plasmid-DNA wurde durch Ethanol-Fällung weiter aufgereinigt und dann für Transfektionsversuche eingesetzt.

### 2.2.4.2 Konstruktion des Endoglin-shRNA-Vektors

Mit Hilfe von shRNA-Vektoren lässt sich die Expression einzelner Gene dauerhaft und spezifisch reduzieren. Das System basiert auf der intrazellulären Synthese von siRNA. Hierbei wird eine zur Ziel-mRNA komplementäre, und sorgfältig ausgewählte DNA-Sequenz stromabwärts eines speziellen Promotors (H1-Promotor) kloniert. Nach erfolgter Transfektion in eine eukaryotische Zelle kann die zelluläre RNA-Polymerase III an den H1-Promotor binden und die entsprechende shRNA synthetisieren. Diese bildet aufgrund ihrer Basenzusammensetzung spontan eine Haarnadelstruktur und wird dann vom zelleigenen DICER-Komplex zu siRNA (21-mer doppelsträngige RNA) prozessiert. Mit Hilfe der siRNA und des so genannten RISC (RNA-induced silencing complex) erfolgt nun der spezifische Abbau der entsprechenden mRNA. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete pSUPER-Zeo-EndoEx4 Vektor erzeugt innerhalb von Zellen siRNA, die gegen das Exon4 der Endoglin-mRNA gerichtet ist.

Um die MDA-MB-231-Zellen stabil mit dem Vektor transfizieren zu können, wurde das ursprüngliche Plasmid mit einer Zeocin-Resistenz ausgestattet. Als Ausgangsmaterial zur Herstellung des Vektors pSUPER-Zeo-EndoEx4 dienten die Plasmide pSUPER-EndoEx4 (Quelle: Prof. Carmelo Bernabeu (Centro de

Investigaciones Biologicas, Madrid) und pSUPER-Zeo (Quelle: Dr. Vera Bianchi, Department of Biology, University of Padova, Italy). Die Zeocin-Resistenz wurde als komplette Kasette (Gen samt Promotor) in den Vektor pSUPER-EndoEx4 subkloniert. Da die Zeocin-Kasette auch über einen bakteriellen Promotor verfügte, ließen sich resistente Klone durch Selektion in Anwesenheit von Zeocin (25µg/ml) auf einem speziellen salzreduzierten LB-Agar („Low Salt Agar“) erhalten.

Die einzelnen Arbeitsschritte der Vektorkonstruktion entsprachen denen der pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoL und pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoS –Herstellung. Die Vektoren wurden zunächst in *E. coli*-Bakterien vermehrt, im Midi-Maßstab isoliert und dann mit dem Restriktionsenzym *Sall* geschnitten. Bei beiden Restriktionsreaktionen wurden jeweils 5µg Plasmid-DNA und 3Units *Sall* eingesetzt. Die Reaktionen wurden nach 2 Stunden durch Enzyminaktivierung bei 65°C (für 20min) abgestoppt. Die Spaltprodukte der Restriktionsreaktion wurden in einer Agarosegelelektrophorese (präparativer Maßstab, 80V, 2h) aufgetrennt. Die Isolierung des linearisierten pSUPER-EndoEx4-Plasmids (3 kb) und der, aus dem Vektor pSUPER-Zeo herausgeschnittenen, Zeocin-Resistenz-Kasette (1070bp) erfolgte wiederum mit Hilfe des „MinElute Gel Extraktion Kit“ (Qiagen, Hilden).

In der anschließenden Ligationsreaktion wurden jeweils 250ng gereinigtes pSUPER-EndoEX4- und pSUPER-Zeo- *Sall*-Fragment eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte für 18h bei 15°C und Anwesenheit von 10 Units Ligase (Reaktionsvolumen: 20µl). Nun wurden kompetente *E.coli* DH5α mit Verdünnungen des Ligationsansatzes transformiert und auf Zeocin-haltigem (25µg/ml) LB-Agar ausplattiert. Mit Material von Bakterienkolonien, die sich innerhalb von 24h bildeten, wurden jeweils 2ml LB-Flüssigkulturen (25µg/ml Zeocin) angeimpft. Nach Isolierung der Plasmid-DNA im „Mini“-Maßstab erfolgte eine Überprüfung mittels Restriktionsanalyse. Hierbei kamen die Enzyme *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sac*I, *Sall*, *Xba*I und *Xho*I zum Einsatz. Ein fehlerfreies Plasmid wurde wiederum im „Midi“-Maßstab hergestellt und isoliert, dann sequenziert und schließlich für Transfektionsversuche eingesetzt.

### 2.2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA im „Mini“-Maßstab

Diese Methode wurde zur schnellen Analyse von Plasmiden aus Bakterienkolonien eingesetzt, wobei die Reinheit der isolierten Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen ausreichend war. Der Zellaufschluss erfolgt mittels alkalischer Lyse. Hierbei kommt eine Lösung aus NaOH und SDS zum Einsatz. Das SDS solubilisiert die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellmembran, so dass die Zelle lysiert und Zellinhaltsstoffe austreten können. Natriumhydroxid denaturiert chromosomale DNA, Plasmid-DNA und Proteine. Bei der anschließenden Neutralisation mit 3M Kaliumacetat-Lösung (pH5,5) fällt Kaliumdodecylsulfat aus. Hierbei erfolgt eine Kopräzipitation von Zelltrümmern, chromosomaler DNA und denaturierten Proteinen, während kovalent-geschlossene, zirkuläre Plasmid-DNA korrekt renaturiert und bei der anschließenden Zentrifugation in Lösung bleibt.

#### Prozedur

Eine entsprechende Anzahl an Kulturröhrchen (13ml Röhrchen mit Belüftungstopfen, Sarstedt) wurden mit jeweils 2ml warmen, antibiotikahaltigen LB-Medium befüllt. Nun wurde mit Hilfe steriler Zahnstocher von jeweils einzelnen Bakterien-

kolonien der Agarplatte etwas Material aufgenommen und in die vorbereiteten Kulturröhrchen gegeben. Nachdem auf diese Weise alle Kulturröhrchen angeimpft waren, wurden sie luftdurchlässig verschlossen und bei 37°C und kräftigem Schütteln über Nacht inkubiert (Innova 4200 Incubator shaker, New Brunswick Scientific). Am nächsten Tag entnahm man von diesen Kulturen jeweils 1,5ml Bakteriensuspension und überführte sie in frische 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße, der Rest der Kultur wurde bei 4°C gelagert.

Es folgte eine Zentrifugation bei 12000×g und 4°C für 30 Sekunden (Kühlzentrifuge 5417R). Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet in 100µl eiskaltem GTE-Puffer (nach Birnboim und Doly, 1979) durch vortexen resuspendiert. Jetzt fügte man 150µl frisch angesetzten NaOH/SDS-Lysispuffer (0,2N NaOH, 1% (v/v) SDS) hinzu und mischte die Eppendorf-Reaktionsgefäße durch fünfmaliges Invertieren. Jede Probe wurde nun mit 150µl eiskaltem Kaliumacetatpuffer versetzt. Beim anschließenden Vortexen wurde darauf geachtet, dass der Puffer gleichmäßig im zähen Lysat verteilt wird. Nach vierminütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 5min bei 12000×g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Nun erfolgte das Ausfällen der Plasmid-DNA bei Raumtemperatur durch Zugabe des doppelten Volumens (800µl) an reinem Ethanol. Die Ansätze wurden gevortext und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12000×g und 4°C für 5min entfernte man die Überstände vorsichtig aber gründlich. Das Sediment wurde mit kaltem (4°C) 70%igem Ethanol gewaschen. Wenn sich Teile des Pellets lösten, erfolgte eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur für ca. 10min getrocknet. Es folgte ein Resuspendieren der Pellets in 50µl TE-Puffer. Der Puffer enthielt 20µl/ml DNase-freie RNase. Die Plasmid-DNA konnte nun durch Restriktionsverdau und anschließende Agarosegel-Elektrophorese analysiert werden.

#### **2.2.4.4 Analytische und präparative Restriktionshydrolysen**

Die Restriktionshydrolysen erfolgten im, dem jeweiligen Enzym zugeordneten, 1 x Reaktionspuffer. Für 1µg DNA wurden im Allgemeinen 0,5-2 Units Restriktionsenzym verwendet. Die Inkubationsdauer lag meist zwischen 1–2 h, die Inkubationstemperatur wurde laut Herstellerangaben, dem jeweiligen Restriktionsenzym entsprechend, gewählt. Auf diese Weise verdaute DNA konnte anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert werden. Bei präparativen Restriktionsreaktionen zur Vektorkonstruktion wurden jeweils 6µg DNA mit Hilfe von 4Units Restriktionsenzym gespalten. Nach einer Reaktionsdauer von zwei Stunden erfolgte eine Inaktivierung der Restriktionsenzyme durch 20-minütige Hitzedenaturierung bei 65°C.

#### **2.2.4.5 Analytische Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegele (100 x 76mm, 11-Well) wurden mit Agarose (Agarose NEEO Ultra, Roth), 1 x TAE-Puffer und Ethidiumbromid-Lösung hergestellt. Die Konzentration des Gels richtete sich nach der Größe der zu analysierenden DNA-

Fragmente. Im Allgemeinen wurden 0,8%ige (w/v) Agarosegele (4g Agarose auf 500ml TAE-Puffer) verwendet. Vor dem Auftrag der Proben auf das Agarosegel wurde ein Vorlauf durchgeführt (bei 70 V für 5 min; Electrophoresis Power Supply EPS600, Pharmacia Biotech). Die Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen an 6x Auftragspuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 80V (5V/cm Elektrodenabstand) für 60 bis 120 min durchgeführt. Wenn die Herstellung der Gele ohne Ethidiumbromid erfolgte, diente eine Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) zur Anfärbung der DNA. Die DNA wurde für 20 min (bei DNA-Fragmenten größer 500 bp) oder für 30min (bei DNA-Fragmenten kleiner 500 bp) angefärbt. Die Entfärbung erfolgte für 20 min in deionisiertem Wasser. Die Visualisierung und Fotografie wurde mit UV-Licht (302 nm; Fluo Link, Biometra) durchgeführt.

### **2.2.4.6 Agarosegelelektrophorese im präparativen Maßstab**

Mit Restriktionsenzymen hydrolysierte DNA wurde über Agarosegelelektrophorese (AGE) in Fragmente definierter Größe aufgetrennt. Das Bandenmuster konnte anschließend mit Hilfe von Ethidiumbromid auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht werden. Fragmente, die in Ligationsreaktionen Verwendung finden sollten, wurden mit einem frischen, sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Eluierung und Aufreinigung der DNA diente das „MinElute Gel Extraktion Kit“ der Firma Qiagen (Hilden). Die einzelnen Schritte der Prozedur erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 20 µl 10mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) vom Silikat-Säulchen des Extraktionssystems eluiert.

### **2.2.4.7 Reinigung von DNA durch Mikrodialyse**

DNA-Lösungen wurden vor einer Restriktionshydrolyse oder Ligationsreaktion für 20 min einer Dialyse gegen Aqua bidest unterzogen. Die Dialyse erfolgte auf Millipore Filtern (Typ VSWP; 0,025 µm).

### **2.2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten**

Vor der Ligation wurde die DNA stets einer Mikrodialyse (Millipore VSWP Filter) gegen H<sub>2</sub>O bidest unterzogen. Die Reaktion erfolgte innerhalb von 18h bei 16°C im 1x konzentrierten Ligationspuffer. Pro Ligationsansatz (20µl) wurden 500ng DNA und 10Units Ligase (high conc) eingesetzt. Das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu inserierenden DNA-Fragment betrug 1:3.

### **2.2.4.9 Plasmidpräparation mittels Anionen-Austauscher-Säulen**

Diese Methode diente der Gewinnung hochreiner Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung, zur Transfektion von eukaryotischen Zellen und für Restriktionsreaktionen im präparativen Maßstab eingesetzt wurde.

Die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Purification Midi Systems (Qiagen, Hilden). Das Protokoll basiert auf einer alkalischen Lyse der

Bakterien, gefolgt von einer Reinigung der Plasmid-DNA mittels Anionen-Austauscher-Säulen. Für den alkalischen Zellaufschluss benutzt man eine Lösung aus 200mM NaOH und 1% (w/v) SDS (Puffer P2 des kommerziell erhältlichen Systems). Bei der anschließenden Neutralisation mit 3M Kaliumacetat-Lösung (pH5,5; Puffer P3) fallen unerwünschte Zellbestandteile zusammen mit Kaliumdodecylsulfat aus (s.o.) und können durch Zentrifugation beseitigt werden. Der Überstand samt Plasmid-DNA wird auf eine Anionen-Austauscher-Säule gegeben, wobei die negativ geladenen Phosphatreste der DNA unter den entsprechenden niedrigen Salz- und pH-Bedingungen mit positiv geladenen DEAE-Gruppen der Säulenmatrix wechselwirken, die Plasmid-Moleküle also binden. RNA, Proteine und weitere Verunreinigungen werden durch einen Waschschrift bei mittleren Salzkonzentrationen entfernt. Anschließend kann die gereinigte Plasmid-DNA mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert werden. Es folgt eine Konzentrierung und Entsalzung der DNA durch Isopropanol-Präzipitation und Reinigung mittels 70%igem Ethanol.

### Prozedur

Eine einzelne Bakterienkolonie, welche nachweislich das korrekte Plasmid aufwies, wurde mit einem sterilen Zahnstocher von einer antibiotikahaltigen LB-Medium-Platte aufgenommen und in 5ml LB-Flüssigmedium mit gleichem Antibiotikum überführt. Unter kräftigem Schütteln (300 rpm, Innova 4200 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) erfolgte nun eine Inkubation bei 37°C für 8 Stunden. Die Starterkultur wurde 1:500 in 100ml selektives LB-Medium verdünnt und erneut inkubiert (12 Stunden, 37°C, 300 rpm). Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 15min bei 6000×g und 4°C geerntet (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Rotor SS-34, Thermo Electron).

Die Zellen wurden in 4ml RNase A enthaltenden Puffer P1 resuspendiert, dann mit 4ml Puffer P2 (Lysis-puffer) für 5min bei Raumtemperatur lysiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Ansatz mit 4ml Puffer P3 (Neutralisationspuffer) gemischt und für 15min auf Eis inkubiert. Nun folgte eine Zentrifugation bei  $\geq 20000\times g$  und 4°C für 30min. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und einer erneuten Zentrifugation unterzogen ( $\geq 20000\times g$ , 15min, 4°C). Währenddessen erfolgte die Äquilibrierung der Qiagen-Säulen mit jeweils 4ml Puffer QBT des Isolationssystems. Der Zentrifugationsüberstand wurde jetzt auf eine äquilibrierte Säule gegeben. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule zweimalig mit 10ml Waschpuffer (Puffer QC) gespült. Die Eluierung der Plasmid-DNA erfolgte mit 5ml Hochsalzpuffer (Puffer QF). Die eluierte DNA wurde mittels Zugabe von 3,5ml Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert. Nun folgte unmittelbar eine weitere Zentrifugation bei  $\geq 15000\times g$  und 4°C für 30min. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und das Sediment mit 2ml 70%igem Ethanol (unvergällt) bei Raumtemperatur gewaschen. Nach Entfernen des Ethanol wurde das DNA-Pellet 5min unter der sterilen Werkbank getrocknet und dann in 25 bis 50µl TE-Puffer (pH8.0) aufgenommen.

Die auf diese Weise isolierte Plasmid-DNA in Sequenzierungen und präparativen Restriktionsreaktionen zum Einsatz. Für Transfektionen wurden die Plasmide durch Ethanol-Präzipitation weiter aufgereinigt.

## 2.2.5 Etablierung der Klone

### 2.2.5.1 Lipid-vermittelte Transfektion der MDA-MB-231-Zellen

Für die Transfektion eukaryotischer Zellen werden relativ große DNA-Mengen benötigt, etwa 0,1 bis 0,5 µg pro cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche (Konfluenz der Kultur zum Transfektionszeitpunkt etwa 30-60%). Die optimale DNA-Menge ist jedoch vom zu transfizierenden Zelltyp, Wahl des Transfektionsreagenzes und Art der Transfektion (transient oder stabil) abhängig. Neben der Menge ist auch vor allem die Qualität der DNA entscheidend. Um hohe Transfektionsraten zu erzielen, sollte diese frei von Protein, RNA und chemischen Kontaminationen sein. Es empfiehlt sich, nur Plasmid-DNA zu verwenden, welche in Spektrophotometer ein Absorptionsverhältnis von  $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$  von mindestens 1,8 aufweist.

Zur Transfektion der MDA-MB-231-Brusttumorzellen wurden ausschließlich Lipid-basierte Transfektionsreagenzien herangezogen. Die synthetischen, kationischen Lipide bilden mit der DNA spontan Komplexe mit positiver Nettoladung. Diese Liposomen können von der Zelle über den Vorgang der Endozytose aufgenommen werden. In Vorversuchen wurde die Wirksamkeit der Lipidformulierungen Lipofectin (Invitrogen), Effectene (Qiagen, Hilden) und Fugene (Roche Diagnostics, Basel) zur Transfektion der Brusttumorzellen überprüft. Als Reporter-DNA diente ein GFP-Expressionsplasmid (pcDNA3.1-eGFP). Hierbei erwiesen sich Effectene und Fugene als ungeeignet, weshalb für alle weiteren Transfektionsexperimente Lipofectin als Trägersystem genutzt wurde.

Lipofectin ist ein wässriges Liposomengemisch (1:1 w/w) aus dem kationischen Lipid N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-n,n,n-Trimethylammoniumchlorid (DOTMA) und dem neutralen Helfer-Lipid Dioleoyl-phosphatidylethanolamin (DOPE). In Anwesenheit von DNA bildet DOTMA spontan Lipid-DNA-Komplexe mit einer multilamellaren Struktur. Bei positiver Nettoladung sind die Komplexe in der Lage, in Zellen einzudringen und dort die Nukleinsäuren wieder freizusetzen. Die Aufnahme erfolgt wahrscheinlich über einen rezeptorvermittelten Endozytosevorgang (Zabner et al., 1995; Friend et al., 1996). Innerhalb der Zelle begünstigt das Phospholipid die Freisetzung der DNA aus dem Lipid-Komplex, so dass diese in den Zellkern transferieren kann.

#### Optimierung der Transfektionsparameter

Um möglichst hohe Transfektionsraten zu gewährleisten wurden zunächst die optimalen DNA- und Lipofectin-Mengen bestimmt. Hierfür wurden jeweils 0,5 Millionen MDA-MB-231 Parental –Zellen in einem Volumen von 2 ml A-Medium (10% FKS) in die Vertiefungen von 6-Wells ausgesät. Am nächsten Tag wiesen die Kulturen eine optische Konfluenz von etwa 70% auf und wurden mit jeweils einem Milliliter Transfektionsansatz versehen. Als Reporter-DNA diente wiederum das pcDNA3.1-GFP-Plasmid (Reinheit der DNA:  $OD_{260}:OD_{280} = 1,83$ ). Die DNA-Menge wurde in den unterschiedlichen Wells zwischen 1 µg und 10 µg variiert, die Lipofectin-Menge zwischen 2,0 µl und 50 µl. Nach 24h erfolgte eine Analyse der Transfektionsraten mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops. Die höchsten Transfektionsraten wurden mit 10 µg DNA und einer Lipofectin-Menge von 20 µl Lipofectin erzielt. Die anschließenden stabilen Transfektionsexperimente erfolgten in kleinen 25cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen, weshalb die Mengen hier dementsprechend angepasst wurden.

### Prozedur

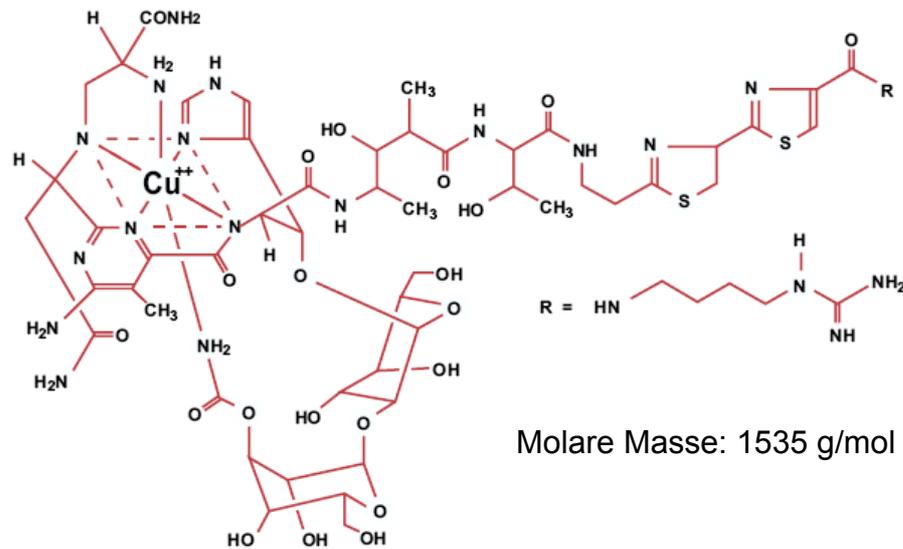
In einer kleinen Zellkulturflasche wurden 400000 MDA-MB-231-Zellen in 5ml antibiotikafreiem DMEM-A-Medium (10% FKS v/v) ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Überstände entfernt und die Zellen zweimal mit warmem OptiMEM-Medium gespült. Nun pipettierte man in jede Kulturflasche 2ml frisches OptiMEM-Mediums und inkubierte die Kulturflaschen während der Vorbereitung des Transfektionsansatzes im Brutschrank. Pro Transfektionsansatz wurden 17µg gereinigte Plasmid-DNA und 34µl Lipofectin in jeweils 340µl und 170µl OptiMEM-Medium verdünnt. Beide Lösungen wurden 30min bei Raumtemperatur stehengelassen, dann vereinigt und nach Durchmischen erneut bei Raumtemperatur inkubiert (für 10 min). Nun wurden 500µl OptiMEM-Medium zugegeben und der Ansatz sehr vorsichtig auf die vorbereiteten Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 18h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) wurde der Transfektionsüberstand durch frisches DMEM-A-Medium ersetzt. Weitere 24 Stunden später erfolgte ein Wechsel auf selektives (zeocinhaltiges) DMEM-A-Medium.

#### **2.2.5.2 Zeocin-Selektion transfizierter MDA-MB-231-Zellen**

Zeocin (Cayla, Toulouse, Frankreich) ist der kommerzielle Name einer Formulierung, die das Antibiotikum Phleomycin D1 enthält. Es handelt sich hierbei um ein, aus *Streptomyces verticillus* gewonnenes, Glykopeptid, in welchem ein Kupfer-Ion chelatartig gebunden ist (Molekulare Masse: 1535 g/mol). Der Kupfer-Peptid-Komplex ist zunächst inaktiv. Gelangt das Antibiotikum in die Zelle, so wird das Kupfer-Kation reduziert ( $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$ ) und anschließend durch Sulfhydryl-Verbindungen der Zelle entfernt. Die Kupfer-freie Form des Antibiotikums ist aktiv und kann an DNA binden. Hierdurch werden Strangbrüche in der Nukleinsäure hervorgerufen, was ein Absterben der jeweiligen Zelle zur Folge hat.

Eine Resistenz gegen Zeocin kann durch das *Sh ble*-Gen des Bakteriums *Streptoalloteichus hindustanus* vermittelt werden. Das *sh ble*-Protein zeigte in vielen Zellen, die das Gen exprimierten, keine erkennbare Toxizität. Es bindet Antibiotika der Phleomycin-Familie mit hoher Affinität und verhindert so deren Aktivierung durch Eisenionen und Sauerstoff. Auf diese Weise ist das Antibiotikum nicht mehr in der Lage mit DNA zu interagieren und wird verliert seine Wirksamkeit.

Etwa 36h nach der Transfektion wurden die Zellüberstände entfernt und durch 5ml Zeocin-haltigen (1000µg/ml, entspricht 650µM) DMEM-Mediums ersetzt. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Konzentration, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) im Inkubator kultiviert, wobei das Zeocin-haltige Medium alle 24Stunden gewechselt wurde. Nach einer Woche Selektion zeigten sich zeocinresistente Zell-Inseln. Diese wiesen nach weiteren drei Tagen eine Größe auf, die ein vereinzeln der Klone auf neue kleine Flaschen ermöglichte. Zunächst wurde die obere Abdeckung der Kulturflasche mit einem sterilen, glühenden Skalpell beseitigt. Nach Entfernen des Überstandes konnten die einzelnen Zellinseln mit einem kleinen Volumen Trypsinlösung (20µl) versehen werden. Nach 15 Sekunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen der einzelnen Klone mit jeweils 20µl FKS-haltigem DMEM-Medium aufgenommen und in eine 35mm Zellkulturschale überführt.



**Abb. 2.2** Das Zeocin-Selektionsreagenz. Es gehört zur Familie der Bleomycin / Phleomycin-Antibiotika und wird aus dem Bakterium *Streptomyces verticillus* isoliert. Im inaktiven Zustand enthält Zeocin ein chelatartig gebundenes Kupfer-II-Ion.

Um mehrere Kolonien auf derselben Kulturflasche zu isolieren, war es zwischen dem Ablösen einzelner Kolonien notwendig, wiederholt mit PBS zu spülen, damit die verbliebenen Inseln nicht austrockneten. Nach 10-tägiger Kultur konnten die Klone auf kleine Kulturflaschen vermehrt werden, später auch auf große. Die Konzentration des Selektionsreagenz wurde nun auf 250µg/ml (163µM) herabgesetzt. Diese Restmenge wurde beibehalten, um die Region in der der Vektor eingebaut wurde und somit auch den Promotor der eingebrachten cDNA, aktiv zu halten.

## 2.2.6 Methoden zur Genexpressionsanalyse

### 2.2.6.1 „First-Strand“-cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Für die „First-Strand“-cDNA-Synthese diente jeweils 1 µg der isolierten RNA-Probe als Matrize. Zunächst erfolgte der Abbau genomischer DNA, da die entsprechende Sequenz auf der genomischen DNA in der später durchgeführten Real-time RT-PCR ebenfalls amplifiziert werden könnte, wodurch sich zu hohe Expressionsraten ergeben würden. Eine zweite Maßnahme, um die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern, basiert auf der Wahl der Primersequenzen (siehe Abschnitt Real-time RT-PCR). Der Ansatz wurde mit Nuklease-freiem Aqua bidest auf ein Volumen von 8µl aufgefüllt. Nun wurde 1 µl RNasefreier 10× DNase-Puffer (400mM Tris-HCL, 100mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH8,0; RQ1 DNase 10× Reaction Buffer; Promega) und 1µl RNase freie DNase (1 Unit/µl; RQ1 DNase; Promega) zugegeben. Der DNA-Verdau erfolgte bei 37°C für 15 Minuten und wurde nach Ablauf dieser Zeit durch Zugabe von 1µl einer 20mM EDTA-Lösung (RQ1 DNase Stop Solution; Promega) gestoppt. Es folgte eine Hitze-Inaktivierung der DNase bei 65°C für 10 Minuten. Die Proben wurden nun auf Eis gestellt.

Als Primer für die Reverse-Transkriptase-Reaktion dienten Random Hexamer Primer (pd(N)<sub>6</sub> Random Hexamer 5'-Phosphate, Sodium Salt; GE Healthcare; Prod.Nr.: 27-2166-01). Die Proben wurden 5 min bei 70°C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. Nun erfolgte eine Zugabe von 4µl 5× Reverse-Transkriptase Reaktionspuffer (5× Reaction Buffer for M-MuLV RT; Fermentas) und 2µl dNTP-Mix (10mM für jedes dNTP; Fermentas; #R0192). Die Ansätze wurden 5 min bei 25°C inkubiert, dann gab man 1µl Reverse Transkriptase (RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase; 200u/µl; Fermentas; #EP0451) hinzu. Die Ansätze wurden in einem Thermocycler 10min bei 25°C (Annealing der Primer), 60min bei 42°C (cDNA-Synthese) und 10min bei 70°C (Stoppen der Reaktion) inkubiert.

Die auf diese Weise erhaltenen cDNA-Proben können einige Wochen bei -20°C gelagert werden und sind direkt in PCR-Reaktionen einsetzbar.

### 2.2.6.2 Quantitative (Real-time) RT-PCR

Im Gegensatz zu quantitativen RT-PCR-Methoden bei denen die Menge des amplifizierten Produkts am Endpunkt bestimmt wird, misst man bei der Real-time RT-PCR die Menge des gebildeten Amplikons nach jedem PCR-Zyklus. Dies geschieht über Detektion und Quantifizierung eines Fluoreszenz-Reporters. Das Fluoreszenzsignal nimmt hierbei proportional mit der Menge des gebildeten PCR-Produkts zu. Durch die Quantifizierung der Fluoreszenzemission in Echtzeit („in real time“) ist es möglich die PCR-Reaktion während der exponentiellen Amplifizierungsphase zu verfolgen.

Diese Phase liefert die aussagekräftigsten Informationen über die Reaktion, wobei die erste signifikante Zunahme der Amplikonmenge mit der zu Beginn eingesetzten Menge an Template-cDNA korreliert. Je größer die Kopienzahl der Zielsequenz zu Beginn der Reaktion ist, umso früher erreicht die Fluoreszenzintensität einen vorher definierten Schwellenwert (Threshold). Der Amplifizierungszyklus, bei dem die jeweilige Probe den Fluoreszenz-Schwellenwert erreicht, wird als „Threshold Cycle“ (C<sub>T</sub>) bezeichnet. Hier hebt sich die Reporterfluoreszenz erstmals signifikant von der Hintergrundfluoreszenz ab. Soll die Real-time RT-PCR nur zur relativen Quantifizierung genutzt werden, ist das Erstellen einer Standardkurve überflüssig. In diesem Fall genügt es, die Differenz aus dem C<sub>T</sub>-Wert des Zielgens, und dem eines endogenen Kontrollgens anzugeben („comparative C<sub>T</sub> method“). Eine perfekte endogene Kontrolle sollte die cDNA Menge in jeder Probe reflektieren. Hierfür werden meist Haushalts- („house-keeping“) Gene, wie das der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der Glykolyse verwendet. Das Expressionsniveau ist aber auch bei Haushaltsgenen nicht immer konstant, so wird die GAPDH-Expression beispielsweise durch Hypoxie beeinflusst.

Die Ausbeute einer PCR-Reaktion ergibt sich aus der Formel (siehe Livak und Schmittgen, 2001):

$$x_n = x_0 \times (1 + E_x)^n$$

hierbei ist  $x_n$ =Kopienzahl beim Zyklus  $n$ ;  $x_0$ =Ausgangs-Kopienzahl;  $E_x$ =Amplifikations-Effizienz und  $n$ =Anzahl der PCR-Zyklen.

Die Anzahl der Zyklen, die für eine 10-fach höhere Kopienzahl notwendig sind, ergibt sich (bei Annahme einer 100%igen Amplifikationseffizienz) aus:

$$10=2^n$$

$$n=\log_2(10) = \ln(10) / \ln(2) = 3,32$$

Das PCR-Produkt verzehnfacht sich also unter o.g. Annahme alle 3,32 Zyklen.

Es stehen generell drei Fluoreszenz-basierte Reportersysteme zur Verfügung, um die stetige Akkumulation des PCR-Produkts zu verfolgen: (1) DNA-bindende Moleküle (z.B. SYBR Green 1), (2) Hybridisierungs sonden, und (3) 5' Nuklease-Assay (Taq-Man-Assay).

### (1) DNA-bindende Moleküle

Diese Reporter moleküle interkalieren sequenzunabhängig an die kleine Furche doppelsträngiger (ds) DNA. SYBR Green 1 weist in Lösung nur eine geringe Fluoreszenz auf, das Signal nimmt bei Bindung an dsDNA jedoch stark zu. Da das Reagenz sequenzunabhängig bindet, wird auch durch nichtspezifische Amplifikation und Primer-Dimere ein Signal erzeugt, so dass Versuchsoptimierungen und eine nachfolgende Analyse des Amplikons (z.B. Schmelzpunktanalyse) notwendig werden.

### (2) Hybridisierungs sonden

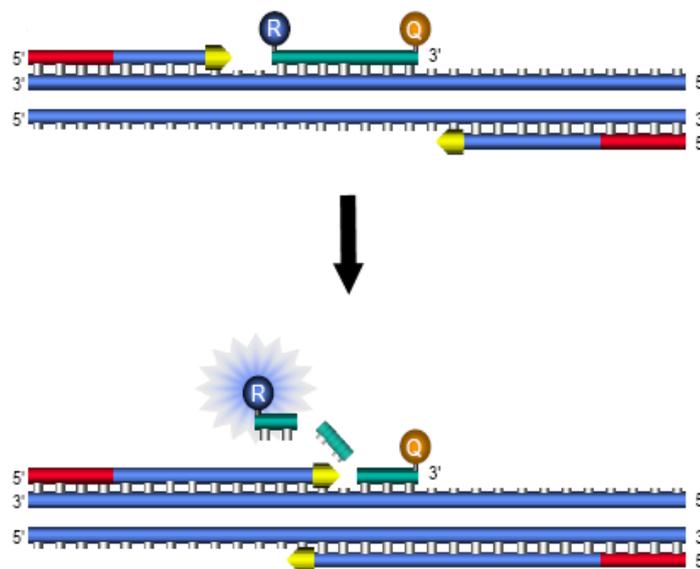
Bei dem HybProbe® Format für LightCycler®-Geräte handelt es sich um ein System aus zwei einfach-markierten, für die Ziel-DNA sequenzspezifischen, Sonden. Die weiter stromaufwärts bindende Sonde (Donor Probe) ist an ihrem 3'-Ende mit Fluorescein konjugiert, die Akzeptor-Sonde hingegen trägt an ihrem 5'-Ende einen weiteren Fluoreszenzfarbstoff (beispielsweise LightCycler Red 640). Ein Fluoreszenzsignal wird nur dann erzeugt, wenn sich beide Fluorophore in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Wird das Fluorescein durch blaues Licht ( $\lambda_{\text{Max}}$ Anregung = 470nm) angeregt, gibt es seine Energie über den Vorgang des Fluoreszenz (bzw. Förster) Resonanz Energie Transfers (FRET; Förster, 1948; Clegg, 1995) an den Fluoreszenzfarbstoff der zweiten Sonde ab. Dieser emittiert Licht längerer Wellenlänge, welches dann detektiert wird. Die Sequenz der Sonden sollte so gewählt werden, dass sie in kleinstmöglichem Abstand (1-5 Nukleotide) zueinander an der Ziel-DNA binden. Die Hybridisierung der Sonden erfolgt reversibel und nur während der Annealing-Phase der PCR, da die DNA hier einzelsträngig vorliegt und so für die Sonden zugänglich ist. Damit die stromabwärts bindende Sonde nicht durch die Polymerase verlängert wird, ist deren 3'-Ende durch Phosphorylierung blockiert.

### (3) 5'-Nuklease-Methode (TaqMan System)

Im Rahmen dieser Arbeit kam für Quantifizierungen mittels Realtime RT PCR ausschließlich diese Fluoreszenz-Methode zum Einsatz. Hierbei wird eine zweifach markierte Oligonukleotidsonde verwendet, welche innerhalb des Amplikons binden kann. Typischerweise trägt sie an ihrem 5'-Ende Fluorescein (FAM<sup>TM</sup>) und ist an ihrem 3'-Ende mit einem Fluoreszenzauslöcher, dem so genannten Quencher versehen. Wird der Fluoreszenzreporter bei intakter Sonde durch Licht der entsprechenden Wellenlänge angeregt, so gibt er seine Energie nicht in Form von

Fluoreszenzstrahlung ab, sondern mittels FRET (s.o.) an den Quencher weiter. Auf diese Weise wird vom Real-time PCR-Gerät kein Signal registriert. Während der Annealing-Phase bindet die Sonde an die komplementäre Sequenz des PCR-Produkts. Repliziert die Polymerase eine Matrize mit bereits gebundener TaqMan Sonde, so baut die 5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms die Sonde ab. Der Quencher verliert hierdurch seine unmittelbare Nachbarschaft zum Reporter, wodurch dessen Fluoreszenz mit vollständiger Intensität an die Umgebung abgegeben werden kann.

Da ein hoher Gehalt an genomischer DNA zu inakkuraten Bestimmungen führen kann, wurde diese vor Durchführung der PCR mittels DNase degradiert. Da ein solcher Abbau aber in der Regel nicht quantitativ erfolgt, werden TaqMan Primer meist so gewählt, dass einer der beiden Primer an eine Exon-Exon-Grenzen bindet und so zwischen cDNA und genomischer DNA diskriminiert. Auf der genomischen DNA befinden sich an diesen Stellen Introns, weshalb ein solcher Primer hier nicht oder nur schlecht bindet.



**Abb. 2.3** Das Prinzip der Real-time-RT-PCR mittels 5'-Nuklease-Methode (TaqMan-Sonden, Applied Biosystems). Während der Polymerase-Kettenreaktion werden an Matrizen-DNA gebundene Sonden degradiert. Hierbei verlieren Sonden-konjugierte Quencher-Moleküle ihre direkte Nachbarschaft zu Fluoreszenz-Reporter-molekülen, wodurch diese ihre Energie nun in Form von Fluoreszenzlicht an die Umgebung abgeben können. Die Fluoreszenz steigt proportional zur gebildeten Amplifikatmenge an.

#### Durchführung der Realtime-RT-PCR

Die PCR erfolgte in einem Applied Biosystems ABI PRISM 7000 Sequence Detection System im 96-Well-Format. Zunächst wurden die synthetisierten cDNA-Proben 1:10 mit Aqua bidest auf eine Konzentration von etwa 5ng/µl verdünnt. Je Vertiefung der 96-Well-Platte (96 Well Multiply PCR Plate, Sarstedt, Prod.Nr. 72.1979.202) wurden nun 2µl (10ng) cDNA-Lösung vorgelegt und 18µl einer

vorbereiteten Master-Mix-Lösung zugegeben. Für den Master-Mix wurden pro Well 1µl 20× Primer-Mix (beinhaltet ungelabelte PCR Primer und die TaqMan® MGB (minor groove binder) Sonde, FAM™ gelabelt), 7µl Aqua bidest und 10µl 2× TaqMan Universal PCR Master Mix kalkuliert.

**Tab. 2.3** Das, in Rahmen der Real-time-RT-PCR verwendete, Thermocycler-Programm. Die Uracil N-Glycosylase (UNG) degradiert vor dem Start der Kettenreaktion potentielle Syntheseprodukte vorangegangener PCRs, wodurch „Carry-Over“-Kontaminationen verhindert werden.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [mm:ss]	Bemerkung
1	50.0	2:00	UNG-Verdau
2	95.0	10:00	Taq-Polymerase-Aktivierung, UNG-Inaktivierung
3	95.0	0:15	
4	60.0	1:00	goto 3, 40×

Der Universal PCR Master Mix besteht aus der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, AmpErase® Uracil N-Glycosylase (UNG), dNTPs mit dUTP, einer passiven Referenz (ROX™ Farbstoff) und optimierten Pufferkomponenten. Mittels Uracil N-Glycosylase lassen sich Kontaminationen von Syntheseprodukten vorangegangener PCR-Reaktionen entfernen, wenn bei der Synthese nicht dTTP sondern dUTP zugegen war. Das Enzym spaltet Uracil-Reste von Polynukleotide ab, die resultierenden abasischen Polynukleotide können anschließend durch Hitze abgebaut.

**Tab. 2.4** TaqMan-Gen-Expressionssysteme für die quantitative RT-PCR

TaqMan Gene Expression Assay	Sonden-Sequenz (5'→3')	Reporter / Quencher	Exon-Begrenzung
Endoglin <i>Hs00164438_m1</i>	TCCCAACGGGCCCGTCACAGCTGGA	FAM / NFQ	2-3
GAPDH <i>Hs99999905_m1</i>	GCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTT	FAM / NFQ	3-3
PAI-1 <i>Hs00167155_m1</i>	GATTCAAGATTGATGACAAGGGCAT	FAM / NFQ	2-3
MMP-1 <i>Hs00233958_m1</i>	AAAGACAGATTCTACATGCGCACAA	FAM / NFQ	6-7
MMP-14 <i>Hs01037009_g1</i>	GGCAGCGATGAAGTCTTCACTTACT	FAM / NFQ	9-10
MMP-19 <i>Hs00275699_m1</i>	GGATCCAGGCTCTCTATGGCAAGAA	FAM / NFQ	3-4

Die 96-Well-Platte wurde mit Hilfe einer Folie (Sealing Tape, optically clear, Sarstedt, Artikel-Nr. 95.1994) und eines Andruckkissens (Optical Film Compression Pad, Applied Biosystems) nach oben hin abgedichtet und in das Gerät eingesetzt. Nun wurde die Steuerungssoftware (Sequence Detector Software Version 1.1) gestartet. Nach Eingabe des Platten-Pipettierschemas und der PCR-Parameter erfolgte der Start der PCR.

### **2.2.6.3 Isolierung von Proteinen**

#### **Isolierung von Zellmembranproteinen**

Die Zellen wuchsen in einer kleinen Kulturflasche, bis sie einen konfluenten Monolayer bildeten. Wahlweise wurden sie nun für 6 Stunden mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert und anschließend geerntet. Hierfür entfernten wir das Nährmedium und spülten die Zellen mit PBS. Die Zellen wurden durch Zugabe von 500 $\mu$ l hypotonem Lysispuffer (5mM HEPES, pH7,5) aufgeschlossen. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem Zellschaber von den Kulturgefäßböden abgekratzt und in sterile, eisgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate wurden mit Hilfe eines Vortexers gründlich durchgemischt. Nun folgte ein Zentrifugationsschritt bei 800 $\times$ g und 4°C für 10 Minuten. Jeweils 900 $\mu$ l des Überstandes wurden mit 100 $\mu$ l 200mM HEPES 1,4M NaCl pH7,5 versetzt und dann eine Stunde bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Sediment wurde je nach Größe in etwa 20 $\mu$ l 20mM HEPES 0,14M NaCl aufgenommen. Nach anschließender Proteinbestimmung wurden 5 $\mu$ g Protein in 20 $\mu$ l SDS-Probenpuffer gelöst und dann für 5min auf 95°C erhitzt. Die Proben konnten nun in Western-Blot-Analysen eingesetzt oder für ca. 2 Wochen bei -20°C gelagert werden.

#### **Isolierung von Zellhomogenaten**

Um cytosolische Proteine zu untersuchen, erfolgte eine Gewinnung von Gesamt-Zelllysaten. Die wahlweise stimulierten Zellen wurden mit 500 $\mu$ l Tritonlysispuffer versetzt und von den Kulturgefäßböden abgeschabt. Nach Überführung in Eppendorf-Reaktionsgefäße, mussten die Lysate etwa 30min auf Eis gelagert werden. Anschließend wurden sie gemischt und dann 2min bei 11500 $\times$ g und 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Nun erfolgte wiederum eine Bestimmung des Proteingehalts. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 5 $\mu$ g Protein in 20 $\mu$ l SDS-Probenpuffer verdünnt und bei 95°C gekocht. Sie eigneten sich nun für Western-Blot-Analysen.

#### **Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Durch die Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 an positiv geladene Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465nm nach 595nm. Für die Messung wurden jeweils 5 $\mu$ l der Proteinprobe mit 795 $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest und 200 $\mu$ l Bio-Rad Protein-Assay-Lösung versetzt. Nach 15minütiger Inkubation bestimmt man die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595nm. Die Proteinmenge ergab sich durch den Vergleich mit einer Rinderserumalbumin-Standardreihe.

#### 2.2.6.4 Disk-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Disk-SDS-PAGE) wird standardmäßig als diskontinuierliche (Disk) Elektrophorese durchgeführt. Diese Methode verhindert das Aggregieren von Proteinen beim Eintritt in das Gel und man erhält schärfere Banden. Die Gelmatrix wird hierbei in zwei Bereiche eingeteilt: das weitporige Sammelgel und das engporige Trenngel. Das Sammelgel enthält 0,5 M Tris/HCl pH6,8. Dieser pH-Wert liegt nahe beim isoelektrischen Punkt des Glycins im Probenpuffer. Dadurch weist das Glycin zu Beginn der Trennung eine sehr geringe elektrophoretische Mobilität auf, es wird zum Folge-Ion. Die Chloridionen hingegen besitzen eine sehr hohe Mobilität und führen die Ionenfront an (Leit-Ion). Die Aufgetragenen Proteine wandern beim Anlegen eines elektrischen Feldes im Sammelgel zwischen dem Leit-Ion und Folge-Ion. Im Bereich der Ionen mit hoher Mobilität stellt sich hierbei eine niedrige Feldstärke ein, im Bereich der Folge-Ionen hingegen automatisch eine sehr hohe Feldstärke.

Aufgrund dieses Feldstärkegradienten, in dem die Proteine wandern, tritt ein Stapeleffekt ein: Proteine mit hoher Mobilität folgen dem Leit-Ion, Proteine mit geringer Mobilität werden vor dem Folge-Ion hergeschoben. Erreichen die Proteinstapel die Grenzschicht zum engporigen Trenngel, verringert sich hier plötzlich ihre Migrationsgeschwindigkeit. Durch diesen Stau werden die Proteinstapel aufkonzentriert, was letztendlich zu schärferen Proteinbanden führt. Das niedermolekulare Glycin ist von diesem Stauereffekt nicht beeinflusst, es überholt an der Grenzschicht die Proteine. Hierdurch befinden sich die Proteine nun in einem homogenen Puffer, weshalb sich der Proteinstapel auflöst. Im engporigen Trenngel hat die Molekülgröße einen entscheidenden Einfluss auf die Mobilität, so dass die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden.

Da die Mobilität von Proteinen in einem elektrischen Feld auch von anderen Faktoren, wie ihrer Eigenladung oder Molekülform beeinflusst werden kann, müssen diese Effekte weitestgehend reduziert werden. Dies geschieht durch SDS (sodium dodecyl sulfate), ein anionisches Detergens, welches die Eigenladungen der Proteine so effektiv überdeckt, dass Micellen mit einheitlich negativer Ladung entstehen. Gleichzeitig löst es Sekundär- und Tertiärstrukturen, indem es Wasserstoffbrücken aufspaltet. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen können durch Zugabe reduzierender Thiolverbindungen, wie Dithiothreitol oder  $\beta$ -Mercaptoethanol gespalten werden.

#### **Polyacrylamid-Gel-Herstellung**

Zunächst wurden die Glasscheiben der Elektrophoresekammer mit 70%igem Ethanol gereinigt und in die Gießrahmen eingespannt. Nun setzte man ein Trenngel geeigneter Porengröße (siehe Tabelle 2.6) an. Die Zusammensetzung des Gels ist aus der Tabelle 2.5 ersichtlich, es enthält außer einem Puffer, H<sub>2</sub>O und Acrylamid noch APS (Ammoniumperoxodisulfat, Roth, Artikel-Nr. 9592.2) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Roth, Artikel-Nr. 2367.1). APS ist ein Radikalbildner und TEMED ein Katalysator für die Acrylamid-Polymerisation. Die verwendete Acrylamid/Bis-Lösung 29:1 (30%, w/v, 3.3% C, Artikel-Nr. 10687.01) stammte von Serva. Bis ist ein so genannter cross-linker, der Gehalt an Bis bestimmt ebenso wie der Acrylamid-Gehalt die Porengröße des Gels. Alle Komponenten

**Tab. 2.5 Gel-Zusammensetzung bei Verwendung von Acrylamid-Bis-Lösung (29:1) von Serva**

	Trenngel				Sammelgel
	10 %	12,5 %	15 %	7 %	4,5 %
Gelpuffer I	2,6 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
Gelpuffer II	-	-	-	-	2,6 ml
Acrylamid+Bis	3,33 ml	4,17 ml	5,0 ml	2,33 ml	1,67 ml
H <sub>2</sub> O	4,03 ml	3,29 ml	2,46 ml	5,03 ml	5,79 ml
APS (10 %)	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

wurden in ein Schraubdeckelröhrchen pipettiert (TEMED zuletzt), gemischt, und dann in die Gelkammer gefüllt.

Nun erfolgte eine Überschichtung mit 100%igem Isopropanol, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern und eine glatte Gel- Kante zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels (mindestens 10-15 min) wurde das Sammelgel hergestellt (siehe Tabelle 2.4). Man entfernte das Isopropanol, befüllte die Kammer vollständig mit Sammelgel und setzte die Kämme ein. Nach Aushärten des Sammelgels wurde die Kämme wieder entfernt und die Geltaschen mit H<sub>2</sub>O bidest gespült, um Gelreste zu entfernen. Das Befüllen mit Sammelgel erfolgte erst unmittelbar vor der Elektrophorese, weil ansonsten die Ionen ineinander diffundieren würden.

### **Durchführung der Elektrophorese**

Die mit Polyacrylamid-Gel befüllten Gelkammern konnten nun in die Elektrophoreseapparatur (BioRAD Mini-Protean 3 Cell) eingespannt werden. Pro Geltasche wurde jetzt 20µl Proteinlösung (etwa 5µg Gesamtprotein, Konzentrationsbestimmung: siehe 2.2.6.3) bzw. 5-10µl Marker (meist PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, Artikel-Nr. SM0671) aufgetragen. Sowohl Geltaschen als auch inneres Kompartiment wurden nun vollständig mit Laufpuffer befüllt. In das innere Kompartiment (anodischer Teil der Kammer) wurde zusätzlich noch ein Tropfen Bromphenolblau, welches als Lauffrontanzeiger dient, gegeben. Die Elektrophorese dauerte etwa 40min und erfolgte bei einer konstanten Spannung von 400V (GE Healthcare Electrophoresis Power Supply- EPS1001, 340mA, 25W). Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 5min in eiskaltem Transferpuffer äquilibriert, was ein Schrumpfen beim Protein-Transfer verhindert.

### Blotvorgang (Protein-Transfer)

Der Protein-Transfer erfolgte über das so genannte „semi-dry blotting“. Die semidry-Apparatur besteht aus horizontal angeordneten Plattenelektroden, zwischen denen sich ein Sandwich aus puffergetränkten Filterpapieren (Blottingpapier s.u.), Gel, Blot-Membran und wiederum puffergetränkten Filterpapieren befindet. Über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld werden nun die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten und zu einer Bande fokussierten Proteine auf eine Polymer-Membran transferiert. Bei der Übertragung sollten die Proteine in derselben geometrischen Anordnung erscheinen, wie sie nach Auftrennung im Gel vorlagen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden PVDF-Membranen (PVDF Transfer Membrane Hybond-P, Hydrophobes Polyvinylidendifluorid, 0,45 µm Porengröße, GE Healthcare Life Sciences, Artikel-Nr. RPN303F) verwendet. Transferierte Proteine werden aufgrund hydrophober Wechselwirkung an der Membran gebunden. Damit die hydrophobe Membran überhaupt mit Puffer benetzt wird, muß sie zunächst „aktiviert“ werden. Hierfür gibt man die Membranen 1-2min in 100% Methanol und äquilibriert sie dann in eiskaltem Transferpuffer (ca. 20 min, oder 10min auf Schüttler). Methanol im Transferpuffer dient dazu, das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die hydrophobe Membran zu erhöhen.

Zunächst benetzte man die Elektroden der Blot-Apparatur mit Transferpuffer. Ein Stapel aus vier Lagen Blottingpapier (Extra Thick Blot Paper, BioRAD, Artikel-Nr. 170-3965) wurde nun in Transferpuffer gewässert und auf die Anodenplatte gelegt. Auf das Blottingpapier wurden nacheinander die aktivierte PVDF-Membran, das Polyacrylamid-Gel und schließlich vier weitere Lagen Transferpuffer-getränktes Blottingpapier aufgeschichtet. Hierbei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen den Transfer stören können. Eventuell vorhandene Luftblasen lassen sich durch vorsichtiges Rollen eines Glasstabes über die einzelnen Schichten entfernen. Nun konnte die Kathode aufgelegt, und die Apparatur geschlossen werden.

Der Blot erfolgte bei konstanter Stromstärke von 170mA (1mA pro cm<sup>2</sup> Blotfläche) für etwa 45min. Die Stromspannungen liegen dann zwischen 5V (zu Beginn) und 25V (am Ende des Transfers).

### Detektion der Ziel-Proteine

Vor der Detektion spezifischer Proteinbanden mit Hilfe von Antikörpern muss die Polymer-Membran zunächst in einer Blockierungslösung inkubiert werden. Die Proteine der Lösung sättigen auf der Membran alle unspezifischen Proteinbindungsstellen ab. Hierfür eignen sich konzentrierte Lösungen von beispielsweise BSA, Milchpulver, Ovalbumin, Myoglobin und Hämoglobin.

Um Gelreste zu entfernen, wurde die Membran zunächst für 5min in TBST-Puffer gewässert. Die Membran wurde in ein Gefäß mit Blockierungslösung (2,5% v/v ECL Advance<sup>TM</sup> blocking agent in TBST) überführt und eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Nun wurde eine geeignete Verdünnung des Primärantikörpers (siehe Tab. 2.7) in einem Milliliter 5%iger BSA-Lösung hergestellt. Die Membran wurde mit der Antikörperlösung in eine Schlauchfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend musste die Membran dreimal für 15min in TBST-Puffer (>4ml Puffer /cm<sup>2</sup> Membranfläche) gewaschen werden. Währenddessen wurde eine geeignete Verdünnung des Sekundärantikörpers (Meerrettichperoxidase-gekoppelt) in TBST-Puffer angesetzt. Es folgte die Inkubation in Gegenwart des

Sekundärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Membran wurde kurz mit TBST gespült und dann dreimal für 15min mit frischem TBST gewaschen.

Die Detektion der Protein-Antikörper-Konjugate erfolgte mit dem ECL-Chemilumineszenz-System („ECL“ =“Enhanced-Chemiluminescence“, ECL Advance Western Blotting Detection Kit, GE Healthcare). Das Nachweissystem besteht aus zwei Komponenten, dem Substrat für die Sekundärantikörper-konjugierte Meerrettichperoxidase und Phenolen. Als Substrat fungiert das zyklische Diacylhydrazin Luminol. Es wird unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert, wobei es in einen angeregten Zustand übergeht. Bei Rückkehr in den Grundzustand wird Energie in Form von Licht freigesetzt. Phenole verstärken diese Reaktion um das 1000-fache.

Die beiden Lösungen des Nachweissystems, Solution A und Solution B wurden auf Raumtemperatur erwärmt und dann im Verhältnis 1:1 gemischt. Das komplette Detektionsreagenz wurde nun auf die proteinbeladene Seite der Membran pipettiert (0,1ml Detektionsreagenz /cm<sup>2</sup> Blotmembran) und mit einer Pipettenspitze gleichmäßig verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 5min entfernte man überschüssiges Reagenz. Die Blotmembran wurde nun in dünne Folie eingeschlagen und in eine Filmkassette (Hypercassette™, GE Healthcare) gelegt. In einer Dunkelkammer wurde ein hochempfindlicher, speziell für die Biolumineszenz-Detektion entwickelter Film (Hyperfilm ECL, High Performance Chemiluminescence Film, 18×24cm, GE Healthcare) aufgelegt. Die Belichtung dauerte etwa 20 Sekunden. Nun wurde der Film einige Minuten lang entwickelt (Dauer nach Sicht), im Wassertank kurz gespült und schließlich fixiert. Die entwickelten Filme wurden mit einem Scanner eingelesen und dann mit Hilfe des Programms PCBAS (Version 2.09g, Raytest, Straubenhardt) densitometrisch ausgewertet.

#### **Auftragskontrolle („Reblot“)**

Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein Reblot durchgeführt. Hierbei kam ein gegen humane GAPDH gerichteter Antikörper zum Einsatz. Zunächst mussten jedoch die bereits an die Blotmembran gebundenen Antikörper entfernt werden („strippen“ der Membran), wobei die auf der Membran immobilisierten Proteine möglichst wenig beeinflusst werden sollten.

Die Blot-Membranen wurden aus der Filmkassette entfernt und erneut kurz in Ethanol äquilibriert. Nun wurden sie dreimal für 5min in 0,1 molarer Glycin-Lösung (pH2,5) und dreimal für 15min in 0,1 molarer Tris-HCl-Lösung (pH7,5) gewaschen. Es folgte eine Inkubation in 2,5%iger Blockierungslösung. In dieser Lösung wurde auch der GAPDH-Antikörper verdünnt und auf die Blotmembran aufgetragen. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Alle weiteren Arbeitsschritte entsprachen der bereits weiter oben beschriebenen Vorgehensweise.

**Tab. 2.6 Empfohlene Porengrößen für SDS-Polyacrylamid-Gele**

<b>Proteingröße [kDa]</b>	<b>Gehalt an Acrylamid+Bis (% , w/v)</b>
4-40	20
12-45	15
10-70	12,5
15-100	10
25-200	8

Tab. 2.7 Primär- und Sekundärantikörper für Immunoblots

Primärantikörper gegen humane(s)	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Endoglin (H-300), sc-20632 Kaninchen, polyklonal IgG, 200µg/ml Santa Cruz Biotechnology	1:250	Anti-Kaninchen-HRP Ziege, polyklonal IgG, Dako, P0260	1:20000
GAPDH (FL-335), sc-25778 Kaninchen, polyklonal IgG, 200µg/ml Santa Cruz Biotechnology	1 :250	Anti-Kaninchen-HRP Ziege, polyklonal IgG, Dako, P0260	1 :20000
Id1 (C-20), sc-488 Kaninchen, polyklonal IgG, 200µg/ml Santa Cruz Biotechnology	1:250	Anti-Kaninchen-HRP Ziege, polyklonal IgG, Dako, P0260	1 :20000
PAI-1 (H-135), sc-8979 Kaninchen, polyklonal IgG, 200µg/ml Santa Cruz Biotechnology	1:200	Anti-Kaninchen-HRP Ziege, polyklonal IgG, Dako, P0260	1 :20000
Tie-1 (C-18) sc342 Kaninchen, polyklonal IgG, 200µg/ml Santa Cruz Biotechnology	1:100	Anti-Kaninchen-HRP Ziege, polyklonal IgG, Dako, P0260	1 :20000

## 2.2.7 Immunogold-Elektronenmikroskopie

### Zellpräparation für die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Die Immunelektronenmikroskopie wurde im post-embedding Verfahren durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 10000 MDA-MB-231-Brusttumorzellen auf Poly-D-Lysin (PDL)- beschichteten Deckgläschen in A-Medium ausgesät und zwei Tage bei 37°C kultiviert (5 % CO<sub>2</sub>). Anschließend wurden die Zellen mit Sörensen-Phosphat-Puffer gewaschen, dann für 30 min mit 3% Glutaraldehyd in 0,05 M Phosphatpuffer (pH7,3-7,4; nach Sörensen) fixiert und wiederum mehrfach mit Phosphatpuffer gespült. Die Entwässerung der Zellen erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 2×5 min in 30, 50, 70, 80, 90, 96 und 100 % igem unvergällten Ethanol). Die Proben wurden nun für vier Stunden in eine 50:50 (v/v) -Mischung aus LR-White-Harz (London Resin, Basingstoke, UK) und Ethanol (100%, unvergällt) gelegt schließlich über Nacht reinem LR-White ausgesetzt. Beim LR-White-Harz handelt es sich um ein hydrophiles Acrylharz niedriger Viskosität.

Die Herstellung von Ultradünnschnitten erfolgte mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Leica EM UC6 ultramicrotome , Leica Microsystems, Wien, Österreich. Die Proben wurden auf ein Nickelgitter aufgebracht, mit normalem Ziegenserum (1:20) behandelt und über Nacht in Gegenwart des Primärantikörpers (1:100) inkubiert. Nach viermaligem Spülen mit Tris-NaCl-Puffer erfolgte die Sekundärantikörper-Inkubation. Hierbei kam ein, mit Gold-Kolloiden (10nm) konjugiertes, Anti-Kaninchen-Immunglobulin aus der Ziege zum Einsatz (1:30, British Biocell International, Cardiff, UK). Die Proben wurden mittels Osmiumtetroxid und Bleiacetat kontrastiert (Mentlein

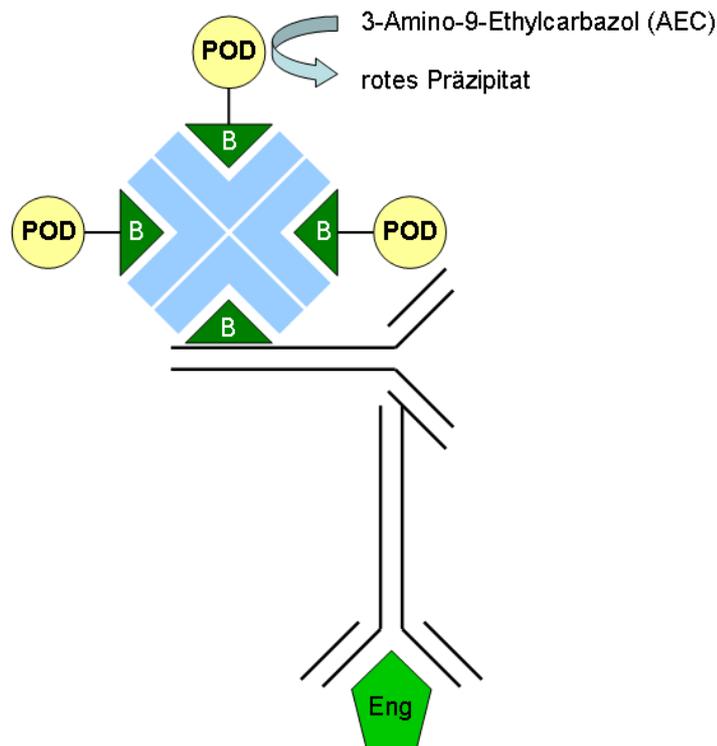
et al., 1990) und unter Verwendung eines Elektronenmikroskops (TEM-Mikroskop Zeiss EM900 mit Slow-Scan CCD-Camera, Carl Zeiss AG, Oberkochen) betrachtet und dokumentiert.

## 2.2.8 Immuncytochemische Färbungen der MDA-MB-231 Zellen

### Nachweis von Endoglin (CD105)

Zur Beurteilung der Endoglin-Expression in den verschiedenen MDA-MB-231-Zelllinien, sowie den von diesen Zellen abgeleiteten Klonen wurde neben quantitativen real-time RT-PCR und Immunoblot Experimenten auch die immuncytochemische Färbung hinzugezogen.

Hierbei wurde das Biotin-Streptavidin-System verwendet, welches auf der hohen Affinität von Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*) für das Vitamin Biotin basiert. Das Glykoprotein Streptavidin liegt als Tetramer vor und weist vier Bindestellen für das Vitamin Biotin auf (siehe Abb. 2.4). Beim Biotin-Streptavidin-System macht man sich dies zunutze. Es handelt es sich um eine indirekte Methode, bei der ein Sekundärantikörper, der mit Biotin konjugiert ist, an den Primärantikörper bindet. An den biotinylierten Sekundärantikörper kann wiederum ein mit Peroxidasen gekoppelter Streptavidin-Biotin-Komplex ansetzen. Der Meerrettich-Peroxidase / Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ )-Komplex des Streptavidin-Biotin-Systems nutzt das zugefügte AEC-Substrat (3-Amino-9-Ethylcarbazol) als Elektronendonator, welches durch die Oxidation zu einem roten Polymer (durch delokalisiertes  $\pi$ -Elektronensystem mesomeriestabilisiert) umgesetzt wird.



**Abb. 2.4** Das Biotin-Streptavidin-System für den Nachweis von Antigenen in der Immuncyto- und Immunhistochemie.

Auf einem, in einer Petrischale befindlichen und mit PDL-beschichteten Deckgläschen wurden ca. 10000 Zellen in 2 ml A-Medium (10% FKS) ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C für zwei Tage (5% CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigte Atmosphäre). Anschließend wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen gab man für 10 min ein eiskaltes Aceton-Methanol-Gemisch (Aceton-Methanol-Verhältnis: 1:1 v/v) auf das Deckgläschen. Dreimaliges Spülen mit PBS-T (jeweils für 10 min) entfernte das Aceton wieder. Da endogene Peroxidase-Aktivitäten Anlass zu falsch positiven Ergebnissen geben können, wurden die Deckgläschen 10 min lang mit frisch angesetzter 3%iger Wasserstoffperoxidlösung behandelt. Hierdurch wird endogene Peroxidase-Aktivität effektiv unterdrückt.

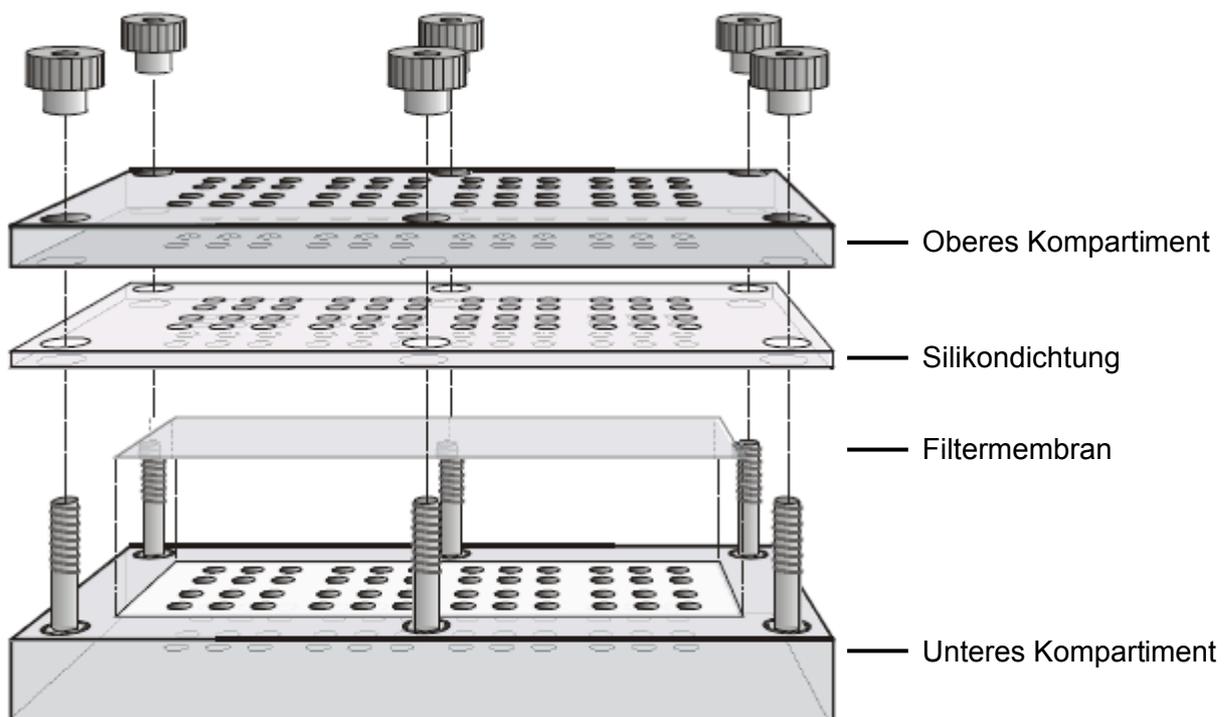
Nach weiteren Waschschritten (3× 10 min in PBS-T) wurden die Deckgläschen zur Reduktion des Hintergrund-Signals eine Stunde lang mit verdünntem Normalserum (1:100) vom Schwein blockiert (Raumtemperatur). Nun wurde der Anti-Endoglin Kaninchen-Antikörper (IgG, polyklonal, Santa-Cruz Biotech, sc-20632) in einer 1:100-Verdünnung in PBS-T angesetzt und auf jedes Deckgläschen gegeben (jeweils 50 µl). Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Die Deckgläschen wurden nun erneut mit PBS-T gespült und für 10 min in ein TBS-T Pufferbad gelegt. Die folgende Inkubation mit dem, 1:300 in PBS-T verdünnten, biotinylierten Schwein Anti-Kaninchen Antikörper (50µl) (IgG, polyklonal, Dako, Glostrup, Artikel-Nr. E0353) erfolgte für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nun spülte man wiederum dreimal mit PBS-T und gab auf die Biotin-gekoppelten Proben für 30min den Streptavidin-HRP-Komplex (Universal Immunostaining Kit Streptavidin-Peroxidase mit AEC, Immunotech, Hamburg). Die weitere Behandlung der Proben erfolgte mit Hilfe des Testsystems nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden schließlich mit H<sub>2</sub>O bidest gespült und zur Anfärbung der Zellkerne Hämalaun ausgesetzt (3min). Nach anschließendem Spülen mittels H<sub>2</sub>O bidest, Leitungswasser und wiederum H<sub>2</sub>O bidest, wurden die Proben eingebettet.

### 2.2.9 Mikrochemotaxis-Kammer (Boyden-Kammer)

Eine wichtige Eigenschaft metastasierender Zellen ist ihr invasiver Charakter. Sie müssen in der Lage sein, effizient die extrazelluläre Matrix von Geweben oder die endotheliale Gefäßwand zu durchwandern. Für in vitro Studien kann man zur Simulation dieser invasiven Vorgänge die Mikrochemotaxis Kammer verwenden (Falk et al., 1980; Harvath et al., 1980). Die eingesetzte Kammer AP48 stammt von Neuro Probe Inc. (Gaithersburg, USA) und besteht aus zwei separaten Acrylblöcken mit jeweils 48 einzelnen Wells. Die Wells des oberen und unteren Blocks werden in der komplett zusammengesetzten Apparatur durch eine Membran getrennt, so dass zwei Kompartimente entstehen. In das untere Kompartiment wird Medium gefüllt, das den chemotaktischen Stimulus enthält, während in das obere Kompartiment die zu untersuchende Zellsuspension gegeben wird. Im Laufe des Experiments migrieren die Zellen entlang des zwischen den Kompartimenten entstehenden Stimulusgradienten durch eventuell vorhandene Beschichtungen und die Poren der Membran und bleiben schließlich an der Unterseite der Membran haften.

### Vorbehandlung der Membran

In den hier durchgeführten Experimenten kamen Polycarbonat-Membranen mit einem Porendurchmesser von  $5\mu\text{m}$  zum Einsatz (Neuro Probe Inc.,  $25 \times 80\text{ mm}$ , Polyvinylpyrrolidon (PVP) -frei), welche in der Mehrzahl der Experimente mit einer Matrigelbeschichtung versehen wurden. Matrigel ist eine solubilisierete Basalmembran-Präparation des Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Sarkoms, eines Extrazellulär-Matrix (ECM) -reichen Tumors. Es kann als rekonstituierte Membran eingesetzt werden, welche, im Rahmen von in-vitro Experimenten, biologisch aktive ECM-Proteine und -Faktoren zur Verfügung stellt. Die Polycarbonatmembran wurde zunächst zur Entfettung für 20 min in Eisessig getaucht, dann unter Wahrung der Sterilität mehrfach mit Aqua bidest gespült und für mehrere Stunden unter der sterilen Werkbank getrocknet. Vor den meisten Chemotaxis-Experimenten erfolgte eine 1- bis 2-stündige Beschichtung der (glänzenden) Membranoberseite mit Matrigel (Sigma-Aldrich), welches zuvor 1:3 mit A-Medium verdünnt wurde. Die Beschichtung ließ man 30 min unter keimfreien Bedingungen an der Luft trocknen, die Stärke der Beschichtung lag bei etwa  $100\ \mu\text{g}$  Matrigel pro  $\text{cm}^2$  Membran. Bis zur Verwendung wurden die einsatzbereiten Membranen in Petrischalen gelagert.



**Abbildung 2.5 Die Mikrochemotaxis-Kammer AP48 von Neuro Probe Inc. (Gaithersburg, USA)**

### Durchführung der chemotaktisch stimulierten Migration

Als chemotaktisch aktives Agens diente FKS, welches 1:10 in A-Medium verdünnt und dann in die entsprechenden Vertiefungen des unteren Kompartiments der Kammer gegeben wurde. Pro Well (Volumen:  $25\text{ ml}$ ) wurden stets exakt  $28,5\mu\text{l}$  Medium pipettiert, so dass ein kleiner Konus über jedem Well entstand. Dieses

überschüssige Medium verhinderte beim anschließenden Auflegen der Membran den Einschluss von Luftblasen. Nachdem die Filtermembran, mit der Matrigelbeschichteten Seite nach oben gewandt, aufgelegt war, folgten die Silikondichtung und der obere Acrylblock. Die Chemotaxis-Kammer wurde nun mit Hilfe der Schrauben fixiert und im Brutschrank für 30 min äquibriert.

Die Zählung der Zellen erfolgte nach Anfärbung eines Aliquots der Zellsuspension mit Trypanblau unter dem Mikroskop. Gleichzeitig wurden die Zellen hierbei optisch auf ihre Vitalität hin überprüft. Die Zellen wurden jetzt in der Weise in serumfreien A-Medium (0,1 % w/v BSA, 1:100 der Stammlösung) verdünnt, dass jeweils 100 000 Zellen in einem Volumen von 50µl in die oberen Wells gefüllt werden konnten. Die unteren Wells wurden je zur Hälfte mit TGF-β1-freiem oder TGF-β1-haltigem serumfreiem Astrozytenmedium (0,1 % w/v BSA, 1:100 der Stammlösung) befüllt. Vor dem Beladen der Wells wurden die Zellsuspensionen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Die Inkubation der vollständig befüllten Kammern erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5%iger CO<sub>2</sub>- und gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre für 3h.

### Fixierung, Färbung und Quantifizierung der migrierten Zellen

Nach der dreistündigen Inkubation im Brutschrank wurde die Chemotaxis-Kammer auf den Kopf gestellt, um überschüssige Zellsuspension zu entfernen und konnte anschließend vorsichtig geöffnet werden. Zellen, die auf der Oberseite der Membran verblieben sind, wurden durch dreimaliges Auflegen der Membranoberseite auf PBS-Puffer und Abstreifen an einer Gummilippe entfernt. Die Fixierung der durch die Membran gewanderten Zellen erfolgte in 100%igem Methanol und dauerte 15 min. Die Membranen wurden mit Aqua bidest gespült und für 30 min in Hämalaunlösung (MAYER Hämalaunlösung, Merck) getaucht. Es folgte eine Wässerung unter Leitungswasser, wobei sich die Zellkerne der anhaftenden Zellen blau färbten. Für jedes der 48 wells entstand auf diese Weise ein Spot mit bestimmter Färbintensität. Die Membranen wurden nun erneut mit Aqua bidest gespült, auf einen Objektträger gelegt und mit Hilfe eines Deckglases und „Kaisers Glyceringelatine“ (Merck) auf diesem fixiert.

Um die Invasivität der unterschiedlichen Zellen quantitativ auswerten zu können, wurde anschließend die zelltragende, gefärbte Membranseite mit einem Scanner eingelesen und die optische Dichte der einzelnen Spots mit Hilfe der Software PCBAS (Raytest GmbH, Straubenhardt) bestimmt.

### 2.2.10 Proliferationsversuche

Methoden zur Bestimmung der Zellzahl sind ein wichtiges Werkzeug um Proliferationsraten und Gesundheitszustand einer Zellpopulation zu erfassen. Eine direkte Methode ist die Zellzählung in der NEUBAUER Zählkammer. Da die direkte Auszählung von Zellen aber zeitaufwendig und oft nicht genügend reproduzierbar ist, wählt man meist indirekte Methoden. Bei diesen Verfahren werden Parameter bestimmt, die mit hinreichender Übereinstimmung mit der Zellzahl korrelieren. Die Parameter können jedoch außer von der Zellzahl auch -in gewissem Rahmen- von anderen Faktoren beeinflusst werden. Gebräuchliche Proliferationstests, in denen beispielsweise DNA-Gehalt, DNA-Neusynthese und Stoffwechselaktivität gemessen werden, sind in der Tabelle 2.8 gelistet.

Tab. 2.8 Methoden zur Bestimmung der Zellzahlen

Parameter	Proliferationstest	Bemerkungen
DNA-Gehalt	Direkte DNA-Quantifizierung (CyQuant Cell Proliferation Assay, Molecular Probes)	Bestimmung der Fluoreszenzintensität des CyQuant GR Farbstoffs, mit dem die Nukleinsäuren markiert wurden
DNA-Synthese	<sup>3</sup> H-Thymidin-Einbau-Test	Bei diesem klassischen Test zur Proliferationsbestimmung wird den Zellen während der Kultur tritiummarkiertes Thymidin angeboten. Das <sup>3</sup> H-Thymidin wird von den Zellen aufgenommen und während der S-Phase anstelle des normalen Thymidins in die DNA eingebaut. Der Nachweis des inkorporierten <sup>3</sup> H-Thymidins erfolgt mit Hilfe eines Szintillationszählers.
	BrdU-Test (Cell Proliferation ELISA, BrdU, Boehringer Mannheim)	Ebenso wie der <sup>3</sup> H-Thymidin-Test beruht auch der BrdU-Test auf dem Einbau eines markierten Nukleotids (5-Bromo-2'-desoxyuridin), welches durch nachgeschaltete Reaktionen quantifizierbar gemacht wird.
Metabolische Aktivität	Tetrazolium-Salze enthaltende Tests (Cell Proliferation Assay Kit, Chemicon)	Tetrazoliumsalze werden durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen zu wasserunlöslichen, violetten Formazan Kristallen oxidiert. Die Kristalle werden durch Zugabe eines Detergens solubilisiert und bilden dann einen orangen Farbstoff, der photometrisch quantifiziert werden kann.

Zur Untersuchung des proliferativen Verhaltens der verschiedenen MDA-MB-231 Brusttumorzellen in serumhaltigen und –freien Nährmedium wurde das CyQuant Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes, C-7026) verwendet. Dieses eignet sich sowohl für Routinezellzählungen als auch für Proliferationsstudien, der lineare Detektionsbereich liegt bei 50 bis 50000 Zellen in 200µl Volumen. Der Test basiert auf der starken Zunahme der Fluoreszenz des CyQuant GR Farbstoffs, wenn dieser an zelluläre Nukleinsäuren bindet. Der an Nukleinsäuren gebundene Farbstoff weist im Fluoreszenzspektrometer ein Anregungsmaximum bei 480nm und ein Emissionsmaximum bei 520nm auf.

#### Zellkultur und -aufarbeitung für den Proliferationstest

In 35mm Kulturschalen (TPP) wurden 50000 bis 300000 Zellen in FKS-haltigen A-Medium ausgesät und für 8 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für drei Tage in Abwesenheit von Serum, aber ansonsten gleichen Bedingungen. Die Kulturüberstände wurden täglich durch frisches Medium ersetzt. Nach Ablauf der angegebenen Zeiten wurde das Nährmedium abgesaugt und die Kulturschalen samt Zellrasen bei -70°C eingefroren.

Die Zellaufarbeitung erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurde der Zelllysis-Puffer angesetzt. Hierfür wurde 1ml des Lysispufferkonzentrats mit 19 ml Nuklease-freiem RNase-Puffer (180mM NaCl, 1mM EDTA) verdünnt. Nun gab man 20 $\mu$ l einer 0,8 U/ $\mu$ l RNase enthaltenden Lösung (Sigma-Aldrich, R-6513) hinzu (Endkonzentration 0,8 Kunitz Einheiten pro ml Lösung). Auf die noch gefrorenen Kulturschalen wurden anschließend 250 $\mu$ l dieser Lösung gegeben. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei Raumtemperatur für 60min. Der Zellrasen wurde mit Zellschabern abgekratzt und die Suspension in frische, sterile Eppendorff-Reaktionsgefäße überführt.

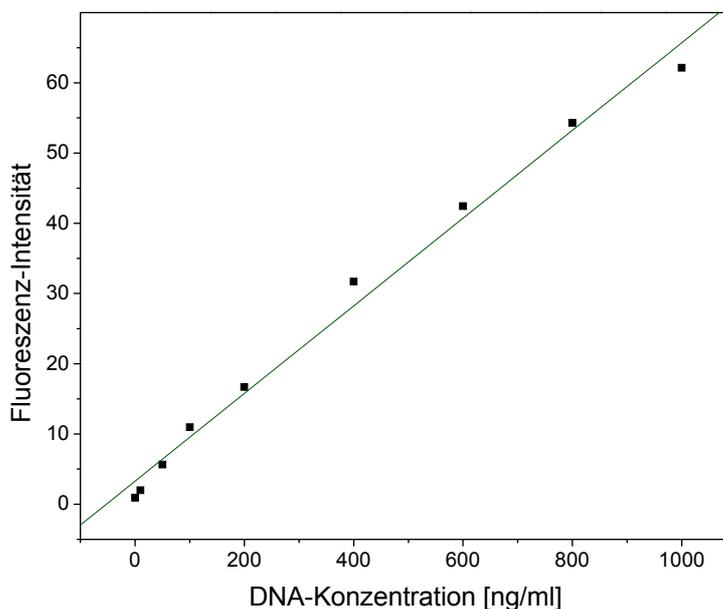
### Bestimmung des DNA-Gehalts der Proben

Der CyQuant GR Farbstoff wurde zunächst mit Lysispuffer zu einer 2-fach konzentrierten Lösung verdünnt (50 $\mu$ l CyQuant GR pro 10 ml Lysispuffer). Nun pipettierte man nacheinander 200 $\mu$ l RNase-haltigen Lysispuffer, 50 $\mu$ l Zellsuspension und 250 $\mu$ l der 2 $\times$  CyQuant GR Farbstofflösung in neue Eppendorff-Reaktionsgefäße. Als DNA-Standard diente eine 1:100 Verdünnung der Bakteriophage  $\lambda$  DNA des Testsystems. In drei Ansätze wurden jeweils 50 $\mu$ l dieser  $\lambda$  DNA-Verdünnung, anstelle der Zellsuspension zugegeben. Zusätzlich wurde auch ein Leerwert bestimmt (250 $\mu$ l Lysispuffer und 250 $\mu$ l Fluoreszenzlösung). Nach kurzem Durchmischen der Proben erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur, wobei die Proben vor Licht geschützt wurden.

Die Fluoreszenzmessungen wurden im Fluoreszenz-Spektrophotometer (HITACHI F-2000 Fluorescence Spectrophotometer) bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{Emission}} = 520\text{nm}$  durchgeführt. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs erfolgte mit Licht der Wellenlänge  $\lambda_{\text{Anregung}} = 480\text{nm}$ .

### Erstellen einer DNA Standard-Kurve

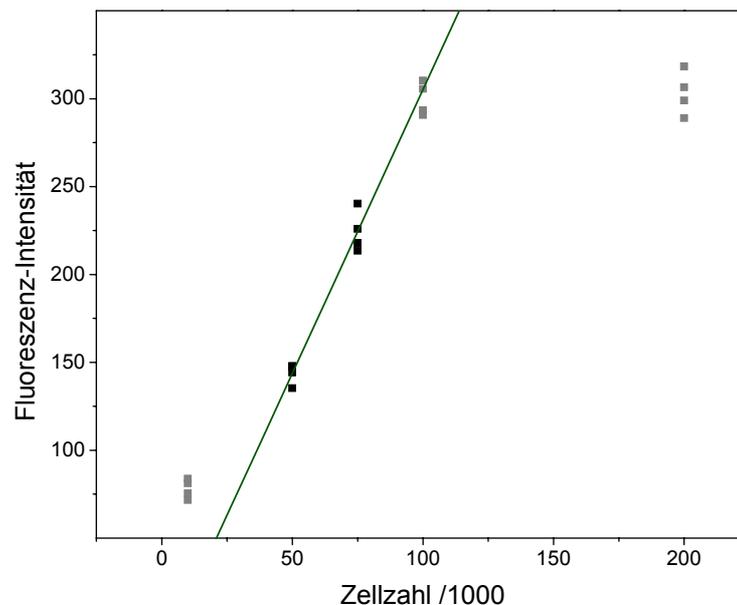
Wie aus der Abb. 2.6 hervorgeht, korreliert die gemessene Fluoreszenzintensität exakt mit der eingesetzten Menge an Bakteriophage  $\lambda$  DNA.



**Abb. 2.6** Mittels CyQuant-Test ermittelte DNA-Standard-Kurve. Die Fluoreszenzintensität nimmt proportional mit der Menge eingesetzter DNA zu.

### Erstellen einer Zellzahl-Standard-Kurve für MDA-MB-231-Zellen

Um von der gemessenen DNA-Menge auf die Zellzahl schließen zu können, wurde eine Zellzahl Standard-Kurve nach Angaben des Herstellers erzeugt. Hierfür wurden Zellsuspensionen mit einer Zellzahl von 50 bis 50000 in 200µl CyQuant GR Farbstoff / Zell-Lysis-Puffer hergestellt. Die Probenaufarbeitung und DNA-Messung erfolgte wie bereits weiter oben beschrieben.



**Abb. 2.7 Zellzahl-Standard-Kurve. Bei Messungen mit 50000 bis 100000 Zellen in 200µl Volumen korreliert die Fluoreszenzintensität sehr gut mit der Zellzahl.**

#### 2.2.11 „Verletzungsinduzierte“ Migration (Scratch-Test)

In die Vertiefung einer 6-Well-Kulturplatte (TPP) wurden 800000 MDA-MB-231-Zellen in 2 ml Astrozytenmedium (10% FKS) ausgesät und unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>; gesättigte Wasserdampfatosphäre) im Brutschrank bis zur optischen Konfluenz kultiviert. In den homogenen Zellmonolayer wurden nun mit einer sterilen 100 µl Pipettenspitze mehrere parallele, etwa 0,3mm breite Kratzer gesetzt. Um den Schalenboden möglichst nicht zu beschädigen, wurde die Pipette locker gehalten und ohne Druck über einen möglichst gleichförmigen Bereich des Zellrasens bewegt. Nun folgten zur Entfernung von abgelösten Zellen zwei Spülschritte mit warmen PBS. Die Kulturplatte wurde jetzt unter ein Axiovert 35M-Mikroskop mit Zellkulturkammer und heizbarem Objektisch (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, Luftbefeuchtung) gelegt und etwa 12 Stunden lang inkubiert. Die Dokumentation der Zellwanderung erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera.

#### 2.2.12 Markierung von Zellen mit Fluoreszenz-Vitalfarbstoffen

Das folgende Protokoll diente der Markierung verschiedener Zelllinien, um die gemischten Zellpopulationen in funktionalen Tests, wie dem Spheroid-Aggregat-Konfrontationstest und der in-vitro Pseudogefäßbildung, unterscheiden zu können.

Die MDA-MB-231 Brusttumorzellen wurden generell mit CFDA-SE (Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester; Molecular Probes, Leiden, Niederlande, Artikel-Nr. V12883) grün, HUVEC und U343 Glioblastoma-Zellen hingegen mit SNARF-1 (,Seminaphthorhodofluor', SNARF®-1-carboxylic acid, acetate, succinimidyl ester ,spezial packaging', Molecular Probes, Artikel-Nr. S22801) rot angefärbt. Die Succinimidylester-Gruppen der Farbstoffe reagieren effizient und irreversibel mit primären Aminen von Lysin-Seitenketten und N-terminalen Aminen zellulärer Proteine. SNARF-1 kann durch Wellenlängen zwischen  $\lambda_{\text{Anregung}} = 488\text{nm}$  und  $530\text{nm}$  angeregt werden, während die Fluoreszenzemission zwischen  $\lambda_{\text{Emission}} = 580\text{nm}$  und  $640\text{nm}$  gemessen wird. Beim CFDA-SE Fluoreszenzfarbstoff liegen die Anregungs- und Emissions-Maxima bei:  $\lambda_{\text{Anregung}} = 492\text{nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 517\text{nm}$ .

Die Detektion der unterschiedlich markierten Zellen erfolgte mit dem Zeiss-Mikroskop Axiovert 200M + Apotome (Carl Zeiss AG, Oberkochen). Bilder wurden mit der monochromen Kamera AxioCam MRm aufgenommen und mittels AxioVision-Software verarbeitet (AxioVision Rel. 4.5, Zeiss). Bei der Bildgebung kamen die Zeiss Filtersätze 38HE (für CFDA-SE) und 43HE (für SNARF-1) zum Einsatz.

### Vorgehensweise:

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen in T25CN-Zellkulturflaschen kultiviert und bei Erreichen einer subkonfluenten Wachstumsphase mittels Trypsin-Lösung von den Kulturgefäßböden gelöst. Nachdem man in der Neubauer-Kammer die Zellzahl ermittelte, wurden 1,8 bis 2 Millionen Zellen in einem 10ml Sarstedt-Röhrchen abzentrifugiert ( $800\times g$ , 5min). Das Sediment wurde in einem Milliliter warmen PBS aufgenommen. Die Markierung der Zellen erfolgte nun mit jeweils  $1,5\mu\text{l}$  CFDA-SE (MDA-MB-231) oder mit  $2,0\mu\text{l}$  SNARF-1 (U343, HUVEC). Die Zellen wurden gemischt und dann für 10min im Brutschrank inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Während dieser Zeit schüttelte man die Zellen zweimal leicht auf, so dass der Farbstoff alle Zellen gleichermaßen erreichen konnte. Nun wurde das gleiche Volumen an fötalem Kälberserum zugegeben, um überschüssigen Farbstoff zu binden. Es folgte eine Zentrifugation für 5min bei  $800\times g$ . Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in zwei Milliliter DMEM-A-Medium resuspendiert (10% v/v FKS). Nach erneuter Zentrifugation ( $800\times g$ , 5min) folgte ein weiterer Waschschrift in FKS-haltigem DMEM-Medium. Anschließend wurde das Zellsediment in 5ml DMEM-Medium (10% FKS) aufgenommen, in eine kleine Kulturflasche (TC75CN) ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).

### 2.2.13 Herstellung von Spheroid-Aggregatkulturen

Zunächst wurden 6 g Methylzellulose (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Artikel-Nr.: M0512) in einer 500ml Glasflasche autoklaviert und in 250ml DMEM-A-Medium bei  $60^\circ\text{C}$  unter Rühren innerhalb von 20min gelöst. Nun gab man 250ml raumtemperiertes DMEM-A-Medium hinzu und inkubierte den Ansatz, wiederum unter Rühren, eine Stunde lang bei  $4^\circ\text{C}$ . Das Methylzellulosehaltige Medium wurde nun in 50ml Röhrchen aliquotiert und für 90min bei  $5000\times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:5 in DMEM-Medium (0% FKS) verdünnt, wodurch man 0,24%iges (w/v) Methylzellulosemedium erhielt.

Die mit Fluoreszenz-Vitalfarbstoffen beladenen Zellen wurden trypsinisiert und in einem 10ml Sarstedtröhrchen komplett abzentrifugiert. Somit erhielt man je kleiner

Kulturflasche ein Sediment aus etwa  $2 \times 10^6$  Zellen, welches nun in 5ml 0,24%igen Methylzellulosemediums resuspendiert wurde. Jeweils 100µl der Zellsuspension wurden in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte mit gewölbten Böden (CELLSTAR Suspension Culture-Plate, U-Shape, with Lid, Greiner Bio-One GmbH, Essen, Artikel-Nr. 650185) ausgesät. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) für ein (MDA-MB-231-Aggregate) bis zwei (U343-Aggregate) Tage.

### 2.2.14 Spheroid-Aggregat-Konfrontation und Detektion

Das mit CFDA-SE grün markierte MDA-MB-231-Aggregat einer Vertiefung der 96-Well-Platte wurde mittels 1000µl-Pipette (blaue, abgeschnittene Pipettenspitze) vorsichtig entnommen und samt umgebenden Medium auf ein steriles, Poly-D-Lysin-beschichtetes Deckgläschen aufgebracht. Die rot markierten U343-Sphäroide wurden auf die gleiche Weise geerntet und in den Tropfen mit MDA-MB-231-Aggregat überführt. Je nach Testbedingungen erfolgte eine Zugabe von 200µl DMEM-A-Medium (5% FKS) oder 200µl Methylzellulosemedium, so dass der Ansatz ohne auszutrocknen 24 Stunden inkubiert werden konnte. In einigen Fällen wurde nun ein neutralisierender Anti-TGF-β1-Antikörper (Verdünnung 1:200) hinzugegeben (Anti-TGF-β1-Antikörper in 0,01M PBS, pH7, frei von Konservierungsstoffen; abcam, Artikel-Nr. ab647). Die Endkonzentration an Antikörper lag dann bei 5µg/ml.

Nach 24 Stunden erfolgte eine erneute Zugabe von 200µl des jeweils gleichen Mediums. Weitere 24 Stunden später wurden die Deckgläschen sehr vorsichtig mit vorgewärmten PBS-Puffer gespült und mit einem -20°C-kalten Aceton/Methanol (1:1) –Gemisch innerhalb von 10min fixiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS-Puffer gespült und dann mit Hilfe von Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Carpinteria, USA) eingedeckt. Nach Aushärtung des Eindeck-Reagenzes konnten die Präparate mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 200M Mikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen) betrachtet und fotografiert werden. Die Bilder wurden mit der monochromen Kamera AxioCam MRm aufgenommen und mittels AxioVision-Software verarbeitet (AxioVision Rel. 4.5, Zeiss AG, Oberkochen).

### 2.2.15 In-vitro-Test auf vaskulogene Mimikry und Röhrenbildung

Zunächst wurden mit Poly-D-Lysin beschichtete Objektträger zusätzlich mit einem Überzug aus Extrazellulär-Matrix-Proteinen (Matrigel) versehen (etwa 50-100 µl pro Objektträger). Das Beschichten mit Matrigel erfolgte mit Hilfe einer Spritze (2,5 ml) mit Einmalkanüle (0,7 × 30 mm), wobei auf ein gleichmäßiges Auftragen geachtet wurde. Die Proteinpräparation polymerisierte innerhalb von 20 min bei Raumtemperatur aus. Nun wurden die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Brusttumorzellen (CFDA-SE-markiert) und HUVE-Zellen (SNARF-1-markiert) in Form von Späroiden auf die Matrigelbeschichtung überführt. Um ein Trockenfallen der Zellen zu verhindern, wurden nun, und nach 24h, jeweils 200µl Medium (5% FKS, teilweise auch serumfrei) zugegeben. Das Medium enthielt in einigen Fällen das RGD-Peptid Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) (Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg, Konzentration: 100µM) oder Methylzellulose (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Konzentration 0,24%)

Die Inkubation der Objektträger erfolgte in sterilen großen Petrischalen für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>). Die Zellen wurden mittels Aceton-Methanol-Gemisch (1:1) fixiert und in Fluorescent Mounting Medium (Dako Cytomation, Carpinteria, USA) eingebettet. Die Ergebnisse wurden mit dem Mikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss AG, Oberkochen) betrachtet und über eine monochrome Kamera (AxioCam MRm) aufgenommen. Bei der Bildverarbeitung kam die Software Axio Vision (Release 4.5, Carl Zeiss AG, Oberkochen) zum Einsatz.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Promotor-Aktivität des Hypoxia-Response-Elements (HRE) in den MDA-MB-231 Zelllinien Parental und Brain

Es ist bekannt, dass Endoglin, ebenso wie VEGF, durch Hypoxie induziert wird. Da MDA-MB-231-Brain-Zellen ein höheres Endoglin-Expressionsniveau aufweisen als MDA-MB-231-Parental-Zellen, sollte im Folgenden geklärt werden, ob ein HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ ) –vermittelter Signalweg für die Endoglin Überexpression in MDA-MB-231-Brain Zellen verantwortlich ist. HIF-1 $\alpha$  ist ein durch Hypoxie induzierter Transkriptionsfaktor, welcher an cis-aktive Genelemente (HREs) entsprechender Promotoren bindet und sie auf diese Weise aktivieren kann.

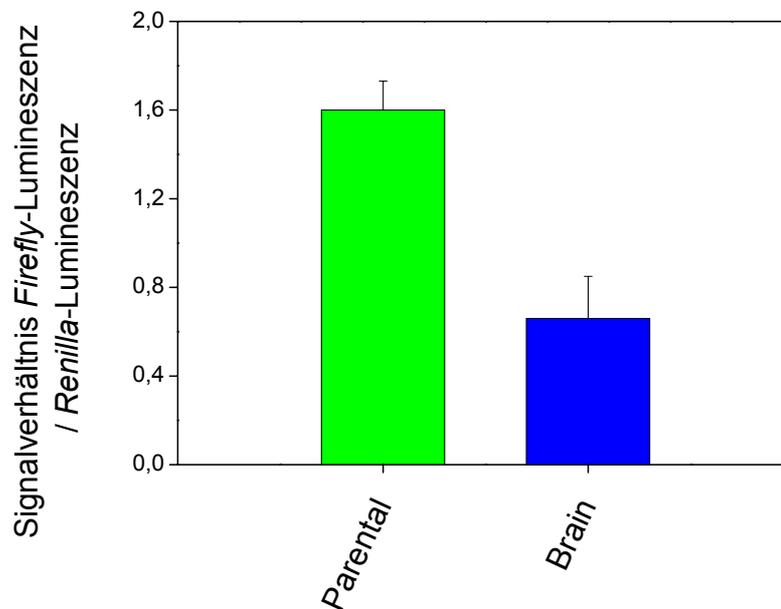
Die Aktivität von HIF-1 $\alpha$  in den verschiedenen MDA-MB-231-Zelllinien wurde mit Hilfe des Dual-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay Systems der Firma Promega (Mannheim) bestimmt. Das System nutzt zwei Vektoren, einen *Firefly*-Luciferase-Vektor (Reportervektor) und einen *Renilla*-Luciferase-Vektor (Kontrollvektor). Beim *Firefly*-Luciferase-Vektor kann stromaufwärts des Luciferase-Gens (*Firefly*-Luciferase aus dem „Leuchtkäfer“ *Photinus pyralis*) ein Genelement kloniert werden, dessen Regulierung im Rahmen des geplanten Experiments untersucht werden soll. Der *Renilla*-Luciferase-Vektor (*Renilla*-Luciferase aus der gemeinen Seefeder *Renilla reniformis*, einer Weichkoralle) dient lediglich als Normalisierungsvektor, mit welchem Schwankungen der Transfektionseffizienz ausgeglichen werden.

Schleust man beide Plasmide durch Co-Transfektion in die entsprechenden Zellen, so wird die *Firefly*-Luciferase in Abhängigkeit der Promotoraktivität des klonierten Genelements synthetisiert, während die Expression des *Renilla*-Luciferase-Gens konstitutiv erfolgt (SV40 Promotor). Die Aktivität der *Firefly*-Luciferase wird bestimmt, indem man das Dual-Glo<sup>TM</sup>-Luciferase-Reagenz hinzu gibt. Dieses bewirkt eine Lyse der Zellen und liefert zugleich das Substrat der *Firefly*-Luciferase. Das umgesetzte Substrat emittiert ein Lumineszenzsignal, welches im Luminometer detektiert werden kann. Durch Zugabe eines zweiten Reagenzes (Dual-Glo<sup>TM</sup> Stop & Glo<sup>®</sup>) wird die Lumineszenz des umgesetzten *Firefly*-Luciferase-Substrates unterdrückt und gleichzeitig das Substrat für die *Renilla*-Luciferase zur Verfügung gestellt, so dass auch deren Aktivität ermittelt werden kann.

Der im Rahmen des vorliegenden Experiments benutzte *Firefly*-Reporter-Vektor pGL3-HRE wies als Luciferase-Promotor das Hypoxia-Response-Element (HRE) des humanen *VEGF-A*-Gens auf und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Christoph Wruck (Pharmakologie, Kiel) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinien wurden in spezielle 96-Well-Zellkulturplatten aus weißem Kunststoff ausgesät und am nächsten Tag mit den Luciferase-Vektoren transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Zugabe der Test-Reagenzien, sowie die Messung der Lumineszenzsignale (Einheit: RLU, relative light units) im Luminometer (Veritas<sup>TM</sup> Luminometer, Turner Biosystems, Sunnyvale, Kalifornien). Luminometergeräte nutzen zur Detektion emittierten Lichts Photomultiplier-Röhren (PMTs, Photomultiplier Tubes). Bei der Messung wird die gesamte Lichtintensität über einen Spektralbereich von 350 bis 650nm summiert. Das *Firefly*-Luciferase-Signal wurde mittels *Renilla*-Luciferase-Lumineszenz normalisiert. Für die MDA-MB-231-Brusttumorzellen ergeben sich hierbei relative Promotoraktivitäten (dimensionslos) von 1,6

(Parental) und 0,66 (Brain). Da das Hypoxia-Resonse-Element in den hirnmetastasierenden Brusttumorzellen eine nur etwa halb so hohe Promotoraktivität aufweist, als in den parentalen Zellen (siehe Abb. 3.1), kann die Endoglin-Überexpression der MDA-MB-231-Brain-Zellen nicht durch eine gesteigerte Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  erklärt werden.



**Abb. 3.1** Relative Promotor-Aktivität des Hypoxia-Response-Elements (HRE) in parentalen MDA-MB-231 Zellen und der hirnmetastasierenden Linie MDA-MB-231-Brain. Die Aktivität des Promotors wurde mit Hilfe des Dual-Glo-Luciferase-Systems bestimmt. Hierbei wurden die Zellen mit zwei verschiedenen Luziferase-Reporter-Plasmiden transfiziert. Der *Firefly*-Reporter-Vektor enthielt als Luziferasepromotor das HRE des humanen VEGF-A-Gens, welches durch HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ ) induziert wird. Das zweite Plasmid dient als Normalisierungsvektor und führt innerhalb von Säugetierzellen zur konstitutiven Expression einer *Renilla*-Luziferase. 48 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen lysiert. Die bis zu diesem Zeitpunkt in der Zelle synthetisierten Enzyme setzen unterschiedliche Substrate um (D-Luziferin bzw. Coelenterazine), welche im gleichen Zelllysate unabhängig voneinander gemessen werden können. Aus dem Quotienten von *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase-Signal ergibt sich die dimensionslose relative Promotoraktivität. Da die Promotoraktivität des HRE in der MDA-MB-231-Brain-Zelllinie sogar niedriger ist, als in den parentalen Brusttumorzellen, kann die Endoglin-Überexpression in der hirnmetastasierenden Zelllinie nicht auf eine erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Aktivität zurückgeführt werden. Anzahl unabhängiger Einzelerperimente: n=10.

### 3.2 Konstruktion von MDA-MB-231-Zelllinien mit gentechnisch verändertem Endoglin-Expressionsniveau

Von der aggressiven Brusttumorzelllinie MDA-MB-231 wurden Zellen gewonnen, die selektiv in das Hirn und die Knochen metastasieren (Yoneda et al., 2001). Dies erfolgte durch wiederholte Applikation der Zellen in Nacktmäuse (Balb/c nu/nu-Stamm) und Entnahme der metastasierten Zellen aus den jeweiligen Organen. Diese

beiden Zelllinien, MDA-MB-231-Brain und -Bone überexprimierten den TypIII-TGF- $\beta$ -Rezeptor Endoglin. Um die Signifikanz dieser Überexpression zu untersuchen, wurden zunächst Klone der Ausgangszelllinie MDA-MB-231-Parental hergestellt, die den Rezeptor ebenfalls überexprimieren. Parallel hierzu wurde die Endoglin-Expression in den MDA-MB-231-Brain Zellen mit Hilfe eines shRNA-Vektors reduziert. Die Konstruktion der für diese Zwecke notwendigen Vektoren wird im Folgenden beschrieben.

#### Vorversuche zur Wahl der Klonierungsstrategie

Zunächst wurden zurzeit gebräuchliche lipidbasierte Transfektionsreagenzien (Lipofectin, Fugene und Effectene) auf ihre Eignung zur Transfektion der MDA-MB-231 Brusttumorzellen mit Plasmid-DNA hin überprüft. Als Reportervektor diente das Plasmid pcDNA3.1-eGFP. In eukaryotische Zellen transfiziert, erlaubt das Plasmid die konstitutive Expression einer modifizierten Variante (eGFP, enhanced Green Fluorescent Protein) des aus der Qualle *Aequorea victoria* stammenden green fluorescent protein. Bei Anregung mittels Licht der Wellenlänge ( $\lambda_{\text{Max}}$ Anregung = 488nm) zeigt das Protein eine Fluoreszenz im grünen Lichtspektrum ( $\lambda_{\text{Max}}$ Emission = 509nm), so dass mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops die Transfektionsrate bestimmt werden kann (Anzahl transfizierter Zellen / Gesamtzellzahl). Selbst nach umfangreichen Optimierungsexperimenten lagen die Transfektionsraten beim effektivsten Reagenz (Lipofectin) nur bei etwa 20%. Aus diesem Grund wurde entschieden, alle im Rahmen dieser Arbeit geplanten Experimente nur mit stabil transfizierten Zellen durchzuführen. Hierfür mussten zunächst Vektoren konstruiert werden, die sich für eine stabile Transfektion eignen.

#### 3.2.1 Herstellung des L-Endoglin-Expressionsvektors

Die bei der Klonierung verwendete L-Endoglin-cDNA wurde aus dem Expressionsvektor pcEXV-3-EndoL gewonnen, welcher freundlicherweise von Herrn Prof. Carmelo Bernabeu (Centro de Investigaciones Biologicas, Madrid) zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Vektor eignet sich vor allem zur transienten Expression einer integrierten cDNA, wobei der Promotor des SV40 Virus genutzt wird.

Das Plasmid weist jedoch kein Resistenzgen auf, das zur Selektion der transfizierten eukaryotischen Zellen genutzt werden könnte. Eine stabile Transfektion ist nur in Verbindung mit einem zweiten, Resistenzgen-tragenden Vektor als so genannte Kotransfektion möglich. Da hierbei aber viele Klone erhalten werden, die zwar die nötige Resistenz aufweisen, jedoch das entsprechende Gen nicht oder nur in geringem Maße exprimieren, wurde die Endoglin-cDNA aus dem Vektor pcEXV-3-EndoL in einen Expressionsvektor subkloniert, welcher selbst die Expression eines eukaryotischen Resistenzmarkers ermöglicht (pcDNA3.1/Zeo).

Für die Subklonierung wurden die Ausgangsvektoren pcEXV-3-EndoL und pcDNA3.1/Zeo(-) zunächst durch Hitzeschock-Transformation in kompetente *E. coli* Library Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> Zellen eingeschleust und innerhalb der Bakterien vermehrt. Die Isolierung beider Plasmide erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits. Bei der anschließenden Restriktionsreaktion mit dem Enzym *EcoRI* erhielt man aus dem Plasmid pcEXV-3-EndoL zwei Fragmente von jeweils 2300 und 3063

Basenpaaren Länge, was in Übereinstimmung mit den bekannten Sequenzen von pcEXV-3 und der L-Endoglin-cDNA (Zugangs-Nr. BC014271) lag (siehe Abb. 3.2).

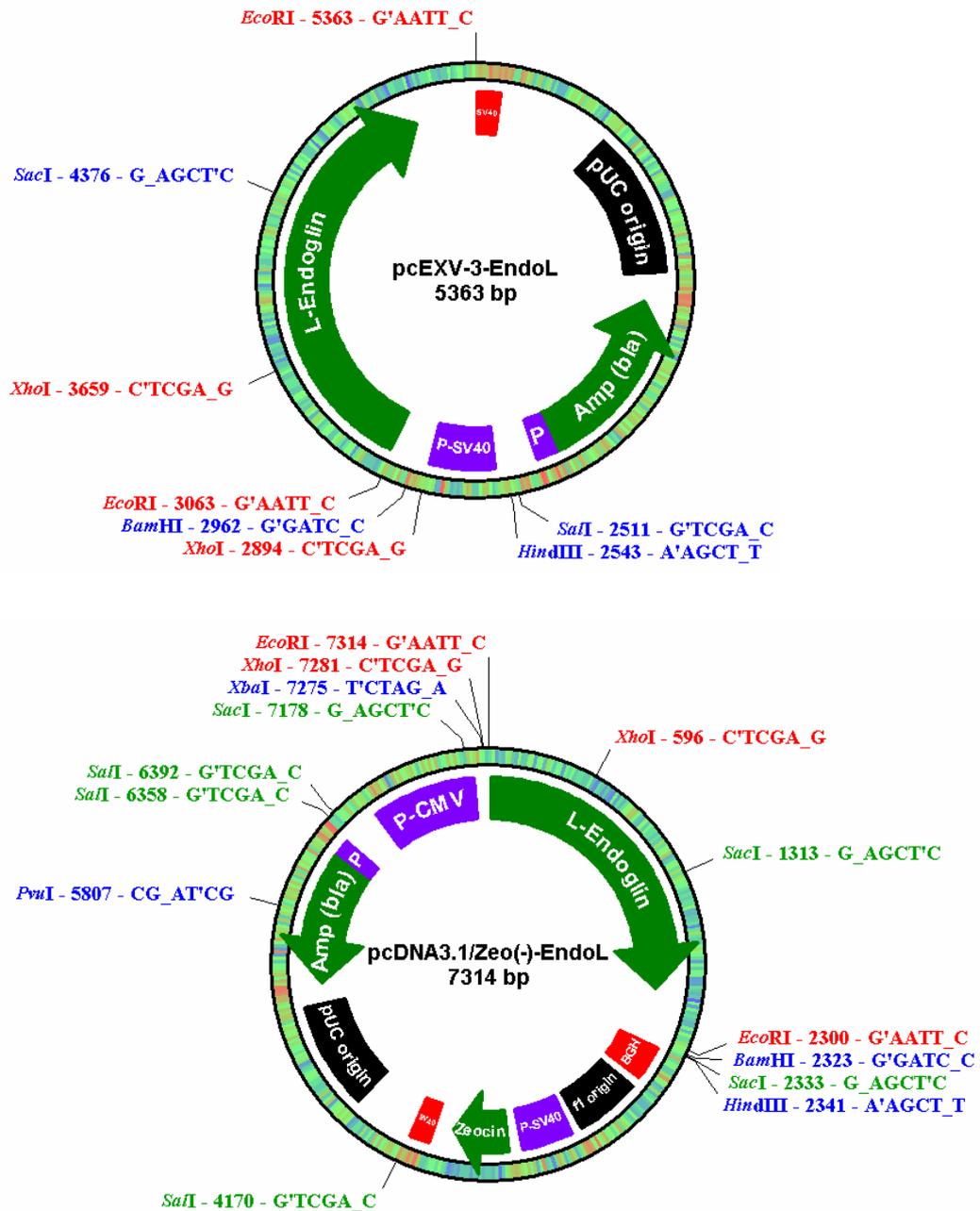
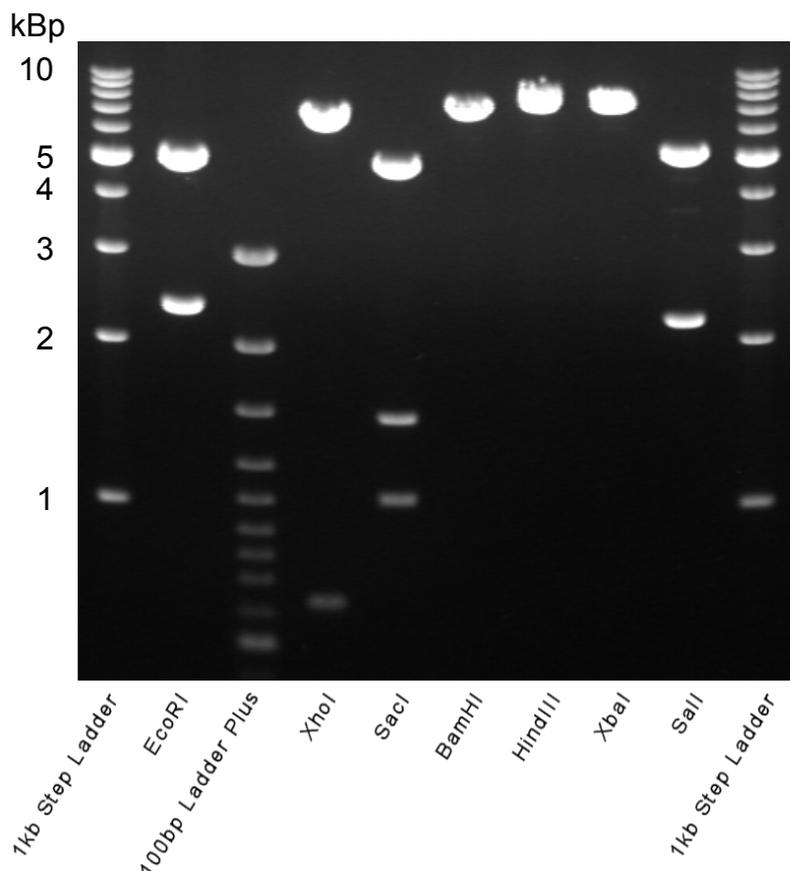


Abb. 3.2 Die Expressionsvektoren pcEXV-3-EndoL und pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoL. Da der Vektor pcEXV-3 kein eigenes Resistenzgen aufweist, wurde die Endoglin-cDNA in den Vektor pcDNA3.1/Zeo(-) subkloniert. Dieser weist ein Resistenzgen für das Selektionsreagenz Zeocin auf. Funktionelle Elemente der Vektoren sind durch Pfeile und Balken hervorgehoben. Promotoren: lila, ORFs (Open Reading Frames): grüne Pfeile, Poly-Adenylierungssignale: rot, Origins (Replikationsstartpunkte): schwarz. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind auf der Außenseite des Plasmidkreises unter Angabe der Position und Sequenz gekennzeichnet. Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenz 1x, 2x oder 3x innerhalb der Plasmid-DNA vorkommt, sind blau, rot und grün dargestellt.

Parallel hierzu wurde der Vektor pcDNA3.1/Zeo(-) mit dem gleichen Enzym linearisiert. Die DNA wurde mit Hilfe präparativer Agarose-Gelelektrophorese von unerwünschten DNA-Fragmenten, Enzymen und Salzen befreit. Das 2,3kb lange pcEXV-3-EndoL-Fragment (beinhaltet die L-Endoglin-cDNA) und der linearisierte pcDNA3.1/Zeo(-)-Vektor konnten nun in der folgenden Ligationsreaktion eingesetzt werden. Anschließend wurden kompetente *E. coli* Library Efficiency® DH5 $\alpha$ ™ Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert. Nach 24 Stunden zeigten sich auf den Ampicillin-haltigen (100 $\mu$ g/ml) LB-Platten Bakterienkolonien, die nun auf korrekten Einbau der cDNA hin überprüft werden konnten. Zu diesem Zweck wurden 30 Kolonien überimpft und bei 37°C in LB-Flüssigmedium (100 $\mu$ g/ml Ampicillin) über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte eine Plasmidisolierung im „Mini“-Maßstab (Birnboim und Doly, 1979). Eine erste Überprüfung der Kolonien erfolgte durch Restriktionshydrolysen, wobei die Enzyme *EcoRI*, *XhoI*, *SacI*, *BamHI*, *HindIII*, *XbaI* und *Sall* zum Einsatz kamen. Die Plasmid-DNA einer Kolonie (Kolonie 13) wies ein korrektes Bandenmuster auf (siehe Abb. 3.3), sämtliche Spaltprodukte der Restriktionsreaktionen stimmten mit den erwarteten Fragmentgrößen überein (siehe Tabelle 3.1). Dieses Plasmid wurde durch Sequenzierung endgültig überprüft und dann für Transfektionsreaktionen eingesetzt.



Tab. 3.1 Überprüfung des putativen pcDNA3.1-Zeo(-)-EndoL-Klons mittels Restriktionsanalyse

RE	Erwartete Fragmentgrößen (bp)
<i>EcoRI</i>	5014, 2300
<i>XhoI</i>	6685, 629
<i>SacI</i>	4845, 1449, 1020
<i>BamHI</i>	7314
<i>HindIII</i>	7314
<i>XbaI</i>	7314
<i>Sall</i>	5092, 2188, 34

Abb. 3.3 Überprüfung des pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoL-Klons. Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen (RE) *EcoRI*, *XhoI*, *SacI*, *BamHI*, *HindIII*, *XbaI* und *Sall* hydrolysiert. Die Spuren 1 und 10 enthalten den DNA-Standard 1kb DNA Step Ladder (Promega), Spur 3 weist den Marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas) auf. Die erhaltenen Spaltprodukte stimmen mit den erwarteten Fragmentgrößen vollständig überein.

### 3.2.2 Herstellung des S-Endoglin-Expressionsvektors

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung des Vektors pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoS dienten die Plasmide pcEXV-3-EndoS und pcDNA3.1/Zeo(-). Der Vektor pcEXV-3-EndoS wurde wiederum freundlicherweise von Herrn Prof. Carmelo Bernabeu (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid) zur Verfügung gestellt. Die einzelnen Schritte der Klonierung entsprachen denen der pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoS Konstruktion. Das in den Vektor pcDNA3.1/Zeo(-) subklonierte, S-Endoglin-cDNA enthaltende Fragment war hier allerdings 2,4kb lang. Die Vektorkarte des S-Endoglin-Expressionsvektors ist in Abb. 3.4 dargestellt. Der Ligationsansatz wurde in kompetente *E. coli* Library Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> Zellen transformiert, wobei innerhalb von 24 Stunden unter selektiven Bedingungen (Ampicillin-LB-Medium, 100 $\mu$ g/ml) Bakterienkolonien entstanden, die entsprechend obiger Vorgehensweise durch Restriktionshydrolyse überprüft wurden. Die Kolonie 2 wies ein Plasmid mit korrektem Bandenmuster auf (siehe Abb. 3.5), welches im Folgenden in *E. coli* Bakterien vermehrt und dann im „Midi“-Maßstab isoliert wurde. Nachdem die Fehlerfreiheit des Konstruktes durch Sequenzierung festgestellt wurde, fand die Plasmid-DNA dieser Kolonie in den folgenden Transfektionsexperimenten Verwendung.

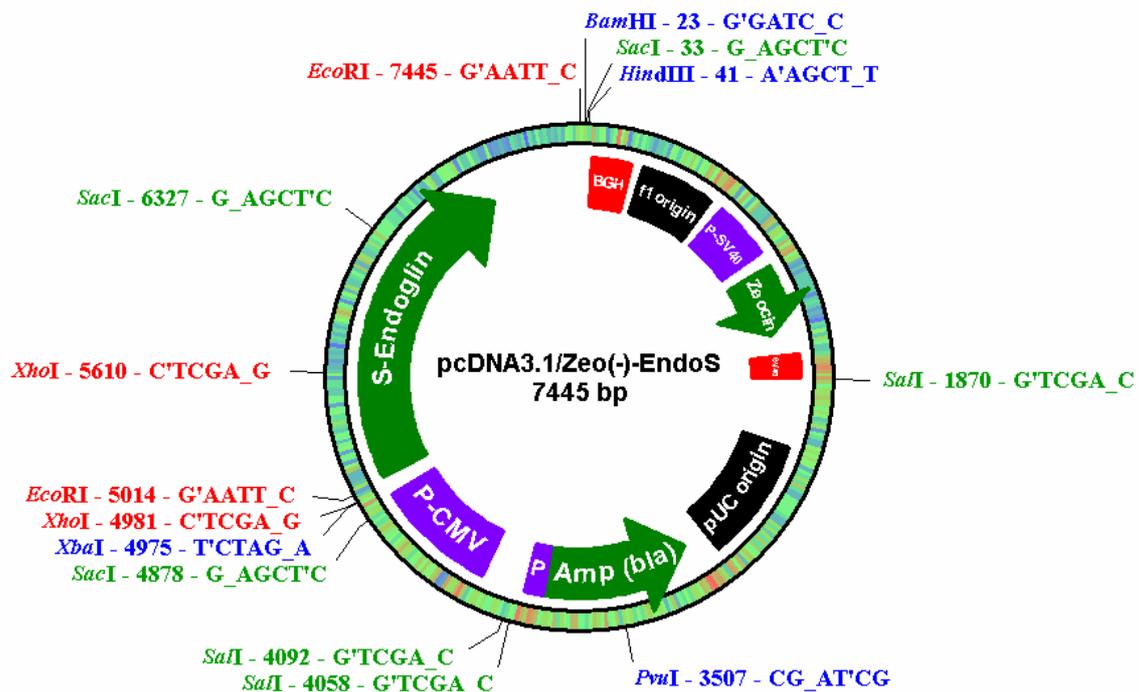
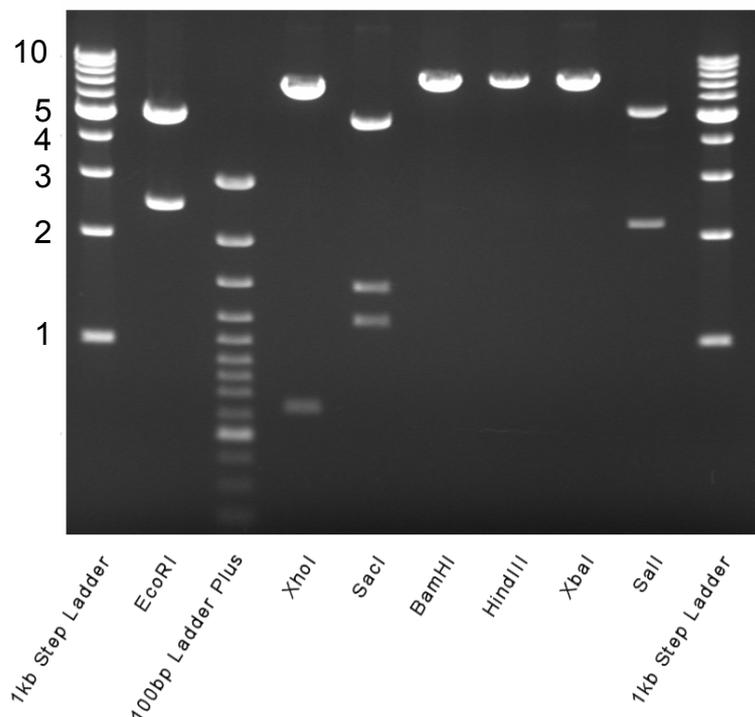


Abb. 3.4 Der Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoS. Funktionelle Elemente des Vektors sind durch Pfeile und Balken hervorgehoben. Promotoren: lila, ORFs (Open Reading Frames): grüne Pfeile, Poly-Adenylierungssignale: rot, Origins (Replikationsstartpunkte): schwarz. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind auf der Außenseite des Plasmidkreises unter Angabe der Position und Sequenz gekennzeichnet. Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenz 1x, 2x oder 3x innerhalb der Plasmid-DNA vorkommt, sind blau, rot und grün dargestellt.

Der S-Endoglin-Expressionsvektor ist, abgesehen von der Endoglin-cDNA, identisch mit dem L-Endoglin-Expressionsvektor. Daher kann der S-Endoglin-Klon S-End-8 unter bestimmten Voraussetzungen (nämlich dann, wenn eine zelluläre Reaktion von der cytosolischen Domäne des L-Endoglins abhängig ist) eine Kontroll-Transfektion mit leerem Vektor (empty vector control, mock control) ersetzen.

kBp



**Tab. 3.2 Überprüfung des putativen pcDNA3.1-Zeo(-)-EndoS-Klons mittels Restriktionsanalyse**

RE	Erwartete Fragmentgrößen (bp)
<i>EcoRI</i>	5014, 2431
<i>XhoI</i>	6816, 629
<i>SacI</i>	4845, 1449, 1151
<i>BamHI</i>	7445
<i>HindIII</i>	7445
<i>XbaI</i>	7445
<i>Sall</i>	5223, 2188, 34

**Abb. 3.5 Überprüfung des pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoS-Klons.** Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen (RE) *EcoRI*, *XhoI*, *SacI*, *BamHI*, *HindIII*, *XbaI* und *Sall* hydrolysiert. Die Spuren 1 und 10 enthalten den DNA-Standard 1kb DNA Step Ladder (Promega), Spur 3 weist den Marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas) auf. Die erhaltenen Fragmente entsprechen der Erwartung und stellen damit den korrekten Einbau sicher.

### 3.2.3 Herstellung des Endoglin-shRNA-Vektors

Um die hohe Endoglin-Expression der MDA-MB-231 Brain künstlich zu senken, wurde der Vektor pSUPER-Zeo-EndoEx4 konstruiert. Mit Hilfe von shRNA-Vektoren ist es möglich intrazellulär siRNA zu generieren, welche dann die Kopienzahl der jeweiligen mRNA in der Zelle reduzieren kann. Der Vektor pSUPER nutzt den humanen H1-RNA-Polymerase III-Promotor. An diesen Promotor kann die zelleigene RNA-Polymerase III binden und einen auf den Promotor stromabwärts folgenden DNA-Abschnitt transkribieren. Die entstandene RNA bildet aufgrund ihrer Basenzusammensetzung spontan eine Haarnadelstruktur. Diese small-hairpin-RNA wird durch den so genannten Dicer-Komplex zu doppelsträngiger, etwa 22bp langer RNA (siRNA; small-interfering RNA) prozessiert. Die 21bp lange RNA ist im Zusammenspiel mit dem zellulären RISC (RNA-induced silencing complex) für die Degradation der Ziel-mRNA verantwortlich.

Beim Vektor pSUPER-Zeo-EndoEx4 befindet sich stromabwärts des H1-Promotors ein DNA-Fragment, dessen Sequenz identisch ist mit einem Abschnitt aus dem Exon4 des Endoglin-Gens (AACACCACAGAGCTGCCATCCTT). Der Vektor wurde bereits mit Erfolg eingesetzt, um die Endoglin-Expression in HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) und HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells-1) –Zellen herabzusetzen (Sanz-Rodriguez et al., 2004; Blanco et al., 2005). Da der Vektor pSUPER-EndoEx4 jedoch kein Resistenzgen besitzt, eignet er sich nur zur transienten Transfektion. Um ihn zur stabilen Transfektion der MDA-MB-231-Brain-Zelllinie nutzen zu können, wurde er zunächst mit einem Zeocin-Resistenzgen ausgestattet (siehe Abb.3.6). Als Ausgangsmaterial zur Konstruktion des Vektors pSUPER-Zeo-EndoEx4 dienten die Vektoren pSUPER-Zeo (Quelle: Dr. Vera Bianchi, Department of Biology, University of Padova, Italy) und pSUPER-EndoEx4 (Quelle: Prof. Carmelo Bernabeu (Centro de Investigaciones Biologicas, Madrid). Die Vektoren wurden im *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> vermehrt und dann im „Midi“-Maßstab isoliert. Nun erfolgte ein Verdau beider Plasmide mit Hilfe des Restriktionsenzym *Sall*. Das 1072 bp lange *Sall*-Fragment von pSUPER-Zeo sowie der linearisierte pSUPER-EndoEx4-Vektor wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese im präparativen Maßstab gereinigt, und dann in einer Ligationsreaktion eingesetzt. Am darauf folgenden Tag wurden DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> -Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert. Das

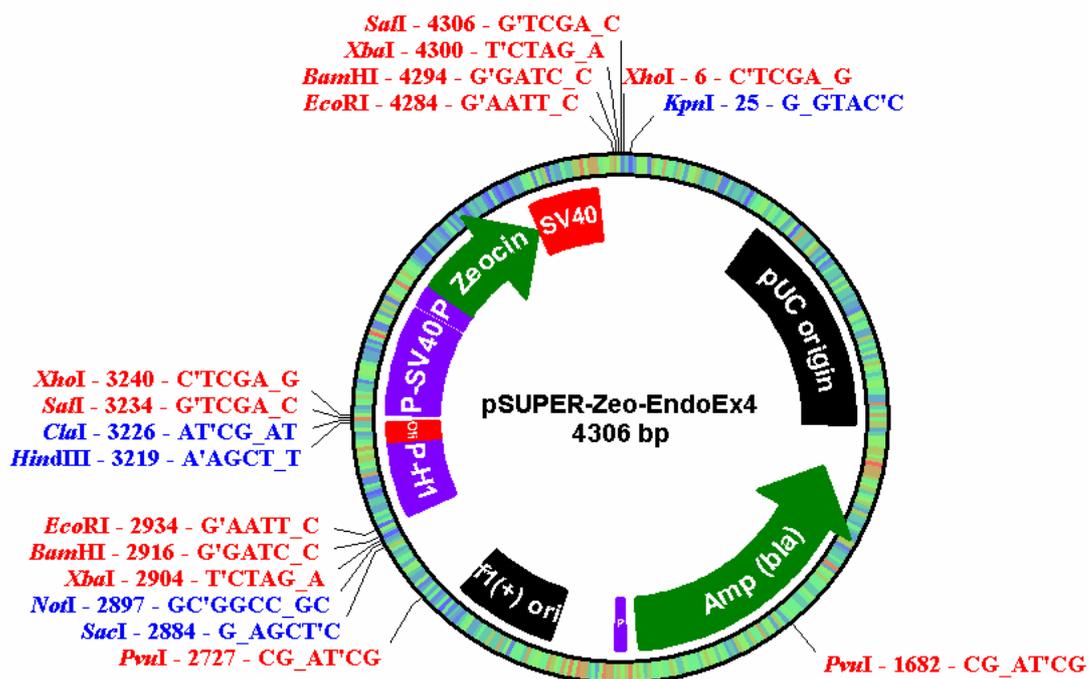
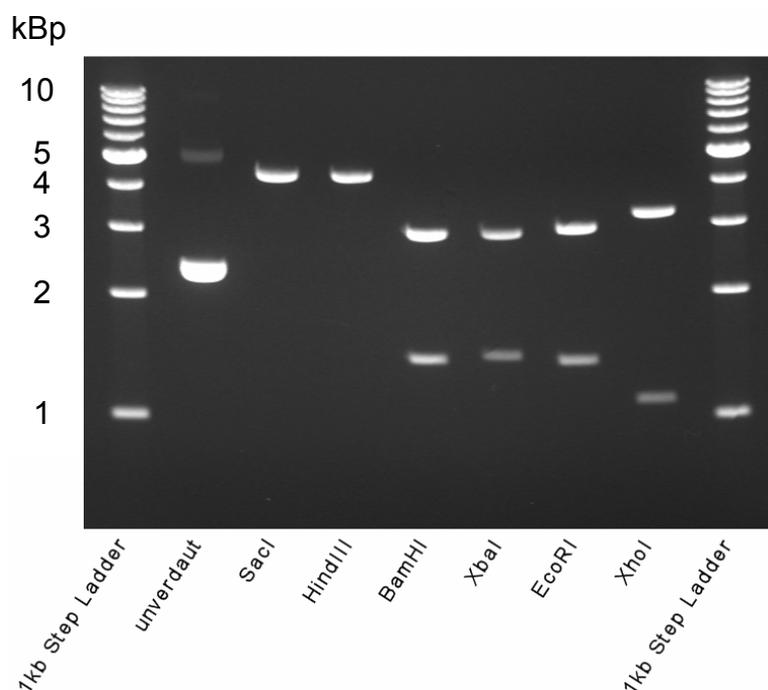


Abb. 3.6 Der shRNA (small-hairpin RNA) –Vektor pSUPER-Zeo-EndoEx4 zur Reduktion der Endoglin-Expression der MDA-MB-231-Brain-Zelllinie. Da sich stromaufwärts des Zeocin-Gens auch ein bakterieller Promotor befindet, konnte bei der Subklonierung der Zeocin-Kassette dieses Reagenz zur Selektion genutzt werden. Funktionelle Elemente des Vektors sind durch Pfeile und Balken hervorgehoben. Promotoren: lila, ORFs (Open Reading Frames): grüne Pfeile, Poly-Adenylierungssignale: rot, Origins (Replikationsstartpunkte): schwarz. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind auf der Außenseite des Plasmidkreises unter Angabe der Position und Sequenz gekennzeichnet. Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenz 1x, 2x oder 3x innerhalb der Plasmid-DNA vorkommt, sind blau, rot und grün dargestellt.

bei der Klonierung verwendete *SacI*-Fragment des pSUPER-Zeo-Vektors weist neben dem Zeocin-Resistenzgen, einem SV40-Promotor und dem SV40-Polyadenylierungssignal auch einen bakteriellen Promotor auf (siehe Abb. 3.6), so dass eine Selektion der transformierten Bakterien mit Hilfe von Zeocin (25µg/ml) auf speziellen Salz-reduzierten LB-Agarplatten erfolgen konnte. In der Tat wiesen alle mittels *HindIII*-Restriktionshydrolyse überprüften Bakterienkolonien ein Plasmid von 4,3kb Länge auf. Das Plasmid der Kolonie 1 wurde durch Restriktionshydrolyse weitergehend überprüft. Hierbei zeigten sich ausschließlich Fragmente erwarteter Größe (siehe Abb. 3.7 und Tab. 3.3), weshalb dieser Vektor zur stabilen Transfektion der MDA-MB-231-Brain-Zelllinie genutzt wurde.

Da das Zeocin-Resistenzgen in Form einer vollständigen Resistenz-Kassette, samt Promotor und PolyA-Signal, kloniert wurde, war die Orientierung des integrierten *SacI*-Fragments unerheblich und wurde daher nicht bestimmt.



**Tab. 3.2 Überprüfung des putativen pSUPER-Zeo-EndoEx4-Klons mittels Restriktionsanalyse**

RE	Erwartete Fragmentgrößen (bp)
<i>SacI</i>	4306
<i>HindIII</i>	4306
<i>BamHI</i>	2928, 1378
<i>XbaI</i>	2910, 1396
<i>EcoRI</i>	2956, 1350
<i>XhoI</i>	3234, 1072

**Abb. 3.7 Überprüfung des pSUPER-Zeo-EndoEx4 -Klons.** Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen (RE) *SacI*, *HindIII*, *BamHI*, *XbaI*, *EcoRI* und *XhoI* hydrolysiert. Die Spuren 1 und 9 enthalten den DNA-Standard 1kb DNA Step Ladder (Promega), Spur 2 weist den zirkulären Vektor pSUPER-Zeo-EndoEx4 auf. Das Fragmentierungsmuster belegt den korrekten Einbau der Zeocin-Kassette.

### 3.2.4 Sequenzierung der Klone

Um die Korrektheit der Klone pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoL und pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoS sicherzustellen, wurden die gereinigten Vektoren mit Hilfe der Standardprimer T7 und BGHreverse sequenziert. Die Sequenzen wurden anschließend mit den bereits veröffentlichten Sequenzen von L-Endoglin (Zugangs-Nr. BC014271) und S-Endoglin (Zugangs-Nr. X72012) abgeglichen. Hierbei zeigte sich eine vollständige Übereinstimmung der Daten, so dass die erzeugten Vektoren im Folgenden zur Transfektion der Brusttumorzelllinie MDA-MB-231 genutzt werden konnten.

Ergebnisse der Sequenzierungen:

In den angegebenen zwei Sequenzen sind folgende Elemente markiert: Zum Vektor gehörende Sequenzbereiche: blau, Startcodon: grün, Stoppcodon: rot, Spleiß-Donor/Akzeptor-Stellen: orange. Das in der S-Endoglin-Sequenz noch enthaltene Insertionselement (in S-Endoglin-Sequenz unterstrichen) besitzt ein eigenes Stoppcodon. Bei der in allen Geweben dominant exprimierten L-Endoglin-Isoform wird dieser Bereich in der entsprechenden mRNA durch alternatives Spleißen entfernt.

Sequenzierung des Vektors pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoL mit den Sequenzierprimern T7 und BGHreverse:

```

ggccctctagactcgagcggccgcccactgtgctggatatctgcagaattccgtggacagc
MCS von pcDNA3.1/Zeo (-)
1  atgaccgcggcagcgtccctctggctgttgccctgctgctggccagctgcagcctcagc
61  cccacaagtcttgcagaaacagtcattgtgaccttcagcctgtgggccccgagagggac
121  gaggtgacatataccactagccaggtctcgaagggctgcgtggctcaggcccccaatgcc
181  atccttgaagtccatgtcctcttctcctggagttcccaacgggcccgtcacagctggagctg
241  actctccagcatccaagcaaaatggcacctggccccgagaggtgcttctggtcctcagt
301  gtaaacagcagtgcttctcctgcatctccaggccctgggaatcccactgcacttggcctac
361  aattccagcctggtcaccttccaagagccccgggggtcaacaccacagagctgccatcc
421  tcccccaagaccagatccttgagtgggcagctgagaggggccccatcacctctgctgct
481  gagctgaatgacccccagagcatcctcctccgactgggccaagcccagggggtcactgtcc
541  ttctgcatgctggaagccagccaggacatgggcccgcacgctcgagtggcggccgcgtact
601  ccagccttgggtccggggctgccacttggaaaggcgtggccggccacaaggaggcgcacatc
661  ctgagggctcctgcccgggcccactcggccgggccccggacggtgacggtgaaggtggaactg
721  agctgcgcaccccggggatctcgaatgcccgtcctcatcctgcaaggtccccctacgtgtcc
781  tggctcatcgacgccaaccacaacatgcagatctggaccactggagaataactccttcaag
841  atctttccagagaaaaacattcgtggcttcaagctcccagacacacctcaaggcctcctg
901  ggggagggcccggatgctcaatgccagcattgtggcatccttctgtggagctaccgctggcc
961  agcattgtctcacttcatgcctccagctgcggtggtaggctgcagacctcaccgcaccg
1021  atccagaccactcctccaaggacacttgtagcccggagctgctcatgtccttgatccag
1081  acaaagtgtgccgacgacgcatgaccctggtactaaagaaagagcttgttgcgcatttg
1141  aagtgcaccatcacgggctgaccttctgggaccccagctgtgaggcagaggacaggggt
1201  gacaagtttgtcttgcgcagtgcttactccagctgtggcatgcaggtgtcagcaagtatg
1261  atcagcaatgaggcgggtggtcaatatcctgtcgagctcatcaccacagcggaaaaaggtg
1321  cactgcctcaacatggacagcctctcttccagctgggcctctacctagcccacacttc
1381  ctccaggcctccaacacccatcgagccggggcagcagagcttctgtcaggtcagagtgctc
1441  ccatccgtctccgagttcctgctccagttagacagctgccacctggacttggggcctgag
1501  ggaggcaccgtggaactcatccagggccggcgcccaagggcaactgtgtgagcctgctg
1561  tccccaaagccccgaggggtgaccgcgcttcagcttctcctcctcacttctacacagtacc
1621  atacccaaaaaccggcaccctcagctgcacggtagccctgcgtcccaagaccgggtctcaa
1681  gaccaggaagtccataggactgtcttcatgacctgaacatcatcagccctgacctgtct
1741  ggttgcacaagcaaaggcctcgtcctgcccggcgtgctgggcatcaccttgggtgccttc
1801  ctcatcggggccctgctcactgctgactctggtacatctactcgcacacggcgttcccc
1861  agcaagcgggagcccgtggtggcggtggtgccccggcctcctcgagagcagcagcacc
1921  aaccacagcatcgggagcaccagagcaccctcctgctccaccagcagcatggcagtagccc
1981  cggccccccgcgctcgcccagcaggagagactgagcagccgcccagctgggagcactgggtg
2041  tgaactcaccctgggagccagtcctcactcgaccagaatggagcctgctctccgcgcc
2101  tacccttcccgcctcctctcagaggcctgctgccagtgacgactggcttggacacc
2161  ttggggctccctccacccacagaacctcaaccagtggtctgggatatggctgccag
2221  gagacagaccacttgccacgctgttgtaaaaacccaagtccctgtcatttgaacctggat
2281  ccgaattccaccacactggactagtgatccgagctcggtagcacaagcttaagttaaacc
MCS von pcDNA3.1/Zeo (-)

```

### Sequenzierung des Vektors pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoS mit den Sequenzierprimern T7 und BGHreverse:

MCS von pcDNA3.1/Zeo(-)

```

1      ggcctctagactcgagcggccgactgtgctggatatctgcagaattc cgtggacagc
61     atggaccgcggcacgctccctctggctgttgccctgctgctggccagctgcagcctcagc
121    cccacaagtccttgcaaaaacagtcattgtgaccttcagcctgtgggccccgagagggac
181    gaggtgacataaccactagccaggtctcgaagggctgcgtggctcaggcccccaatgcc
241    atccttgaagtccatgtcctcttctggagttcccaacgggcccgtcacagctggagctg
301    actctccaggcatccaagcaaaaatggcacctggccccgagaggtgcttctggtcctcagt
361    gtaaacagcagtgcttctcctgcatctccaggccctgggaatcccactgcacttggcctac
421    aattccagcctggtcaccttccaagagccccgggggtcaacaccacagagctgccatcc
481    tcccccaagaccagatccttgagtgggcagctgagaggggccccatcacctctgctget
541    gagctgaatgacccccagagcatcctcctccgactggccaagcccagggggtcactgtcc
601    ttctgcatgctggaagccagccaggacatgggcccgcagctcgagtgccggccgcgact
661    ccagccttgggtccggggctgccacttggaaaggcgtggccggccacaaggaggcgacatc
721    ctgaggggtcctgcccgggcccactcggccgggccccggacggtgacggtgaagtggaactg
781    agctgcgcaccccgggatctcgatgcccgtcctcatcctgcagggtccccctacgtgtcc
841    tggctcatcgacgccaaccacaacatgcagatctggaccactggagaatactccttcaag
901    atctttccagagaaaaacattcgtggcttcaagctcccagacacacctcaaggcctcctg
961    ggggagggcccggatgctcaatgccagcattgtggcatccttctgtagctaccgctggcc
1021   agcattgtctcacttcatgcctccagctgcgggtggtaggctgcagacctcaccgcaccg
1081   atccagaccactcctccaaggacactttagcgggagctgctcatgtccttgatccag
1141   acaaagtgtgcccagcagccatgaccttctgggactaaagaaagagcttggtgccatttg
1201   gacagccatcacgggcccacttctcgggaccccagctgtgaggcagaggaggggtg
1261   gacaagtttgtcttggcagtgcttactccagctgtggcatgcaaggtgcaagtatg
1321   atcagcaatgaggcgggtggtcaatatcctgtcgagctcatcaccacagcggaaaaagggtg
1381   cactgcctcaacatggacagcctctctttccagctgggcctctacctcagcccacacttc
1441   ctccaggcctccaacaccatcgagccggggcagcagagctttagtgaggtcagagtgctcc
1501   ccatccgtctccgagttcctgctccagttagacagctgccacctggacttggggcctgag
1561   ggaggcaccggtggaactcatccaggccggggcggccaagggaactgtgtgagcctgctg
1621   tccccaaagccccgaggggtgaccgcgcttcagcttctcctccacttctacacagtacc
1681   atacccaaaaccggcaccctcagctgcacggtagccctgcgtcccaagaccgggtctcaa
1741   gaccaggaagtccataggactgtcttcatgcccgttgaacatcatcagccctgacctgtct
1801   ggttgcaaaagcaaggcctcgtcctgcccggcgtgctgggcatcaccttgggtgccttc
1861   ctcatcggggcccctgctcactgctgactctggtacatctactcgcacacgcgctgagtag
1921   cccagggccccacagtagcagatgcccgggcccctccatccacccgggggagcccagtgaag
1981   cctctgaggggattgagggggccctggcaggaccctgacctccgcccctgccccgctcccc
2041   ctcccaggttccccagcaagcgggagcccgtggtggcgggtggctgccccggcctcctcg
2101   gagagcagcagcaccacacagcatcgggagcaccacagagcaccctgctccaccagc
2161   agcatggca tagccccggccccccgcgctcgcccagcaggagagactgagcagccgcccag
2221   ctgggagcactgggtgtaactcaccctgggagccagtcctcctcactgcaccagaatggag
2281   cctgetctccgcgectacccttcccgcctcctctcagagggcctgctgccagtgcaagcca
2341   ctggttggaaacacttgggggtccctccacccccacagaaccttcaaccagtgggctggtg
2401   gatatggctgcccaggagacagaccacttggccagctgttgtaaaaacccaagtcctgt
catttgaaacctggatccgaattccaccacactggactagtggatccgagctcggtagcaaa

```

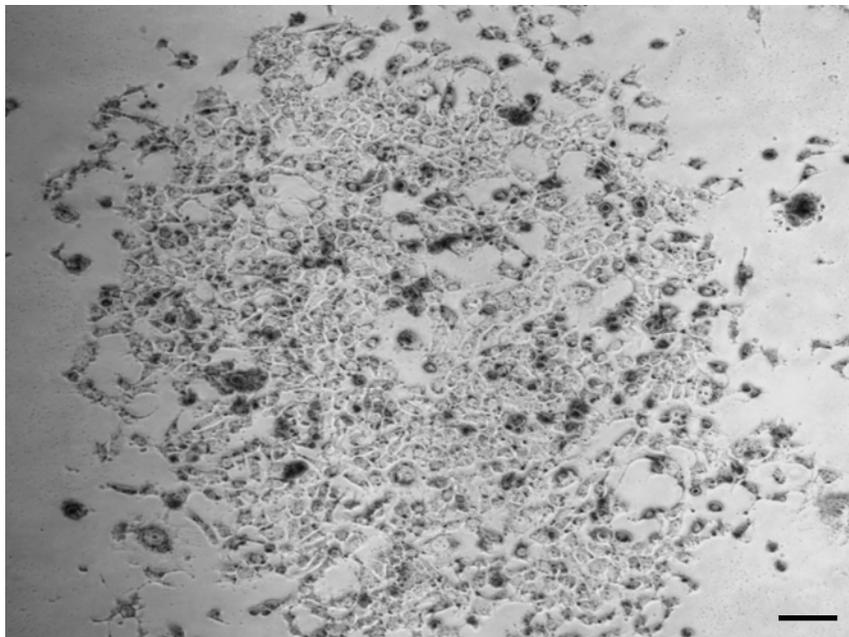
MCS von pcDNA3.1/Zeo(-)

#### 3.2.5 Stabile Transfektion der MDA-MB-231-Zelllinien

Um die hergestellten Konstrukte in MDA-MB-231-Brusttumorzellen einzuschleusen, wurde als Trägersystem Lipofectin benutzt. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Etwa eine Woche nach Transfektion der Brusttumorzellen und Kultivierung in Anwesenheit von Zeocin begannen die meisten Zellen abzusterben. Da die MDA-MB-231-Zellen in Vorversuchen eine intrinsische Resistenz gegen das übliche G418-Selektionsreagenz zeigten, wurde dieses Reagenz gewählt. Die optimale Zeocin-Konzentration (1000 µg/ml Zeocin) wurde mit Hilfe einer „kill-curve“ bestimmt.

In dieser Phase erfolgte ein täglicher Mediumwechsel, um kein totes Zellmaterial in den Kulturflaschen zu belassen. Nach weiteren drei Tagen unter Selektionsdruck verblieben auf den Böden der Kulturflaschen lediglich einzelne Zellkolonien (siehe Abb. 3.8). Da die Kolonien bereits eine ausreichende Größe aufwiesen, konnten sie nun mit Hilfe von Trypsin von den Flaschenböden gelöst werden. Die Zellen wurden mit einer gelben Pipettenspitze aufgenommen und in jeweils neue Kulturschalen ausgesät. Nach einer weiteren Woche wurde die Konzentration des Selektionsreagenzes auf ein Viertel reduziert. Bei stabilen Transfektionen sollte selbst nach Abschluss der Selektionsphase das Selektionsreagenz nicht vollständig abgesetzt werden. Hierdurch hält man die Region, in der das Plasmid im Rahmen der Transfektion integrierte transkriptional aktiv, so dass sich die Expression der klonierten cDNA nicht abschwächen sollte.



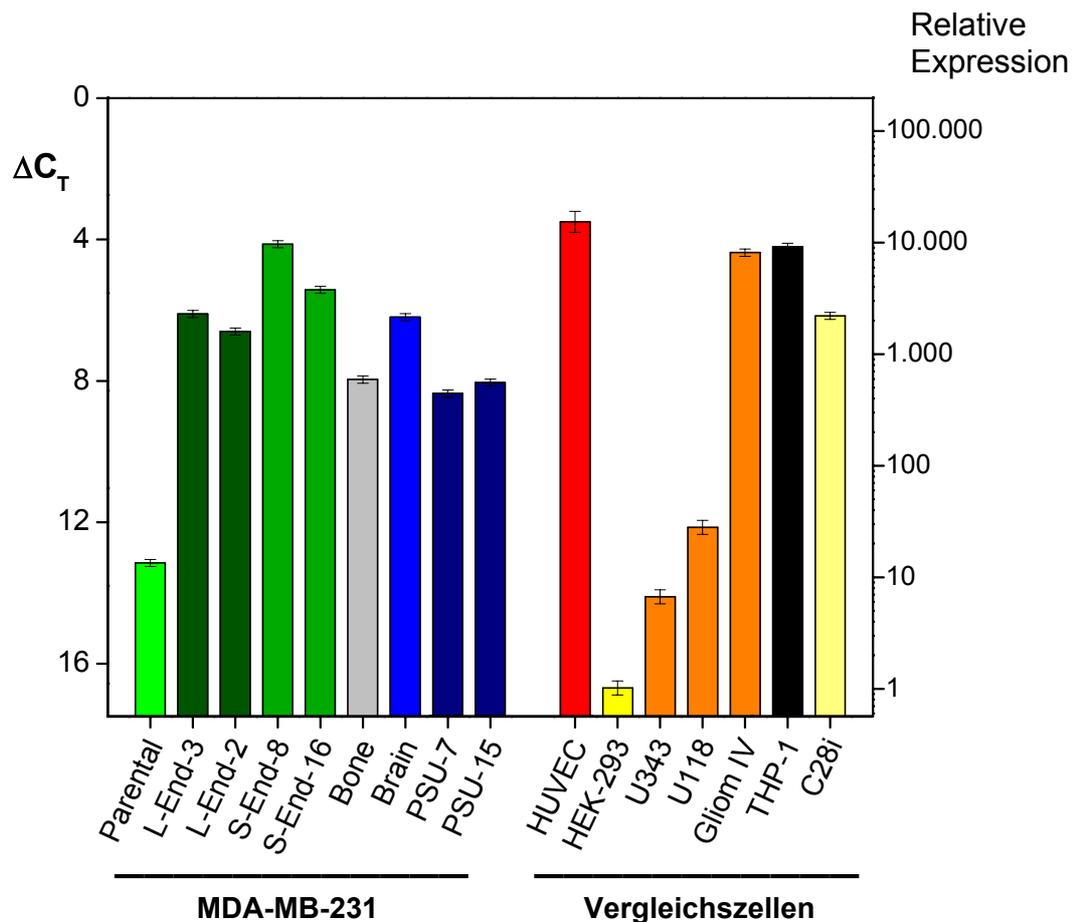
**Abb. 3.8** MDA-MB-231-Brain-Zellen nach Transfektion mit dem shRNA-Vektor pSUPER-Zeo-EndoEx4 und 10-tägiger Selektion mit Hilfe des Reagenzes Zeocin (1000 $\mu$ g/ml). Die entstandenen Zellkolonien waren nun bereits ausreichend groß, um in frische, neue Zellkulturflaschen expandiert zu werden. Vergleichbare Kolonien erhielt man auch bei der Generierung der L- und S-Endoglin-Klone. Der Balken entspricht einer Länge von 100 $\mu$ m.

### 3.3 Endoglin-Expressionsniveau der MDA-MB-231-Zelllinien

#### 3.3.1 Endoglin-Expression in MDA-MB-231-Zelllinien und einigen Vergleichszellen (Real-time RT PCR)

Nach erfolgter Etablierung der neu erzeugten MDA-MB-231-Klone, wurde die Expression des TypIII-TGF- $\beta$ -Rezeptors Endoglin (CD105) in den Klonen, den Ausgangszelllinien und einigen Vergleichszellen bestimmt. Zu diesem Zweck wurde

RNA der Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und dann in einer Real-time RT-PCR (Real-time Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) eingesetzt. Wie anhand der Abb. 3.9 ersichtlich ist, konnte die Kopienzahl der Endoglin-mRNA durch die stabile Transfektion der Linie MDA-MB-231-Parental mit den konstruierten Expressionsvektoren stark erhöht werden. Während der  $\Delta C_T$ -Wert der Ausgangszellen bei 13,2 liegt, weisen die L-Endoglin-Klone (L-End-3 und L-End-2) Werte von 6,1 bis 6,6 auf. Dies entspricht einer Steigerung der entsprechenden mRNA-Menge



**Abb. 3.9** Bestimmung der relativen Endoglin-Expression in verschiedenen MDA-MB-231 Zelllinien und Vergleichszellen mittels quantitativer RT-PCR. Die Endoglin-Expression der Zelllinie MDA-MB-231-Parental, sowie hiervon abgeleiteten Klone ist grün dargestellt, Ergebnisse für MDA-MB-231-Brain-Zellen und abgeleiteten Klone sind blau gezeichnet. Zum Vergleich wurden die Zelllinien HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), HEK-293 (Human Embryonic Kidney), U343 und U118 (humane Gliomazelllinie), THP-1 (Makrophagen-Zelllinie) und C28i (Chondrozyten-Zelllinie) hinzugezogen. Ebenso wurde das Endoglin-Expressionsniveau eines humanen Glioms Grad IV bestimmt, das vermutlich hochvaskularisiert ist. Der Erfolg der Transfektionsexperimente spiegelt sich in den jeweiligen Mengen an CD105-mRNA wider. Durch Transfektion der parentalen Zelllinie konnte die Kopienzahl der Endoglin-mRNA in diesen Zellen –wie beabsichtigt– auf das Niveau der hirnmastasierenden MDA-MB-231-Brain-Linie angehoben werden. Die, mit dem S-Endoglin-Expressionsvektor transfizierten, Klone S-End-8 und S-End-16 synthetisieren sogar erheblich größere Menge an entsprechender mRNA. Die Endoglin-mRNA-Expression in den MDA-MB-231-Brain-Zellen konnte mit Hilfe des shRNA-Vektors beim Klon PSU-7 um 78% gesenkt werden.

um den Faktor 137 (bei L-End-3-Zellen). Damit erreichen die L-Endoglin-Klone auf mRNA-Ebene etwa das CD105-Expressionsniveau der hirnmetastasierenden Zelllinie MDA-MB-231–Brain ( $\Delta C_T$  –Wert: 6,2; siehe Abb. 3.9). Die S-Endoglin-Klone S-End-8 und S-End-16 exprimieren die eingeschleuste cDNA noch stärker, mit  $\Delta C_T$  –Werten von 4,1 bis 5,4. Der verwendete TaqMan Gene Expression Assay für Endoglin (Applied Biosystems, Hs00164438\_m1) nutzt Primer, die nicht zwischen den beiden CD105-Isoformen diskriminieren. Die gentechnische Veränderung der MDA-MB-231–Brain-Zellen mittels shRNA-Vektor führte zu einer Abnahme der Endoglin-mRNA um bis zu 78%, der  $\Delta C_T$  –Wert erhöhte sich von 6,2 auf 8,05 (PSU-15) bzw. 8,35 (PSU-7) und lag hiermit etwa auf Höhe der als Referenz mitgeführten MDA-MB-231-Zelllinie Bone ( $\Delta C_T$  –Wert: 7,96).

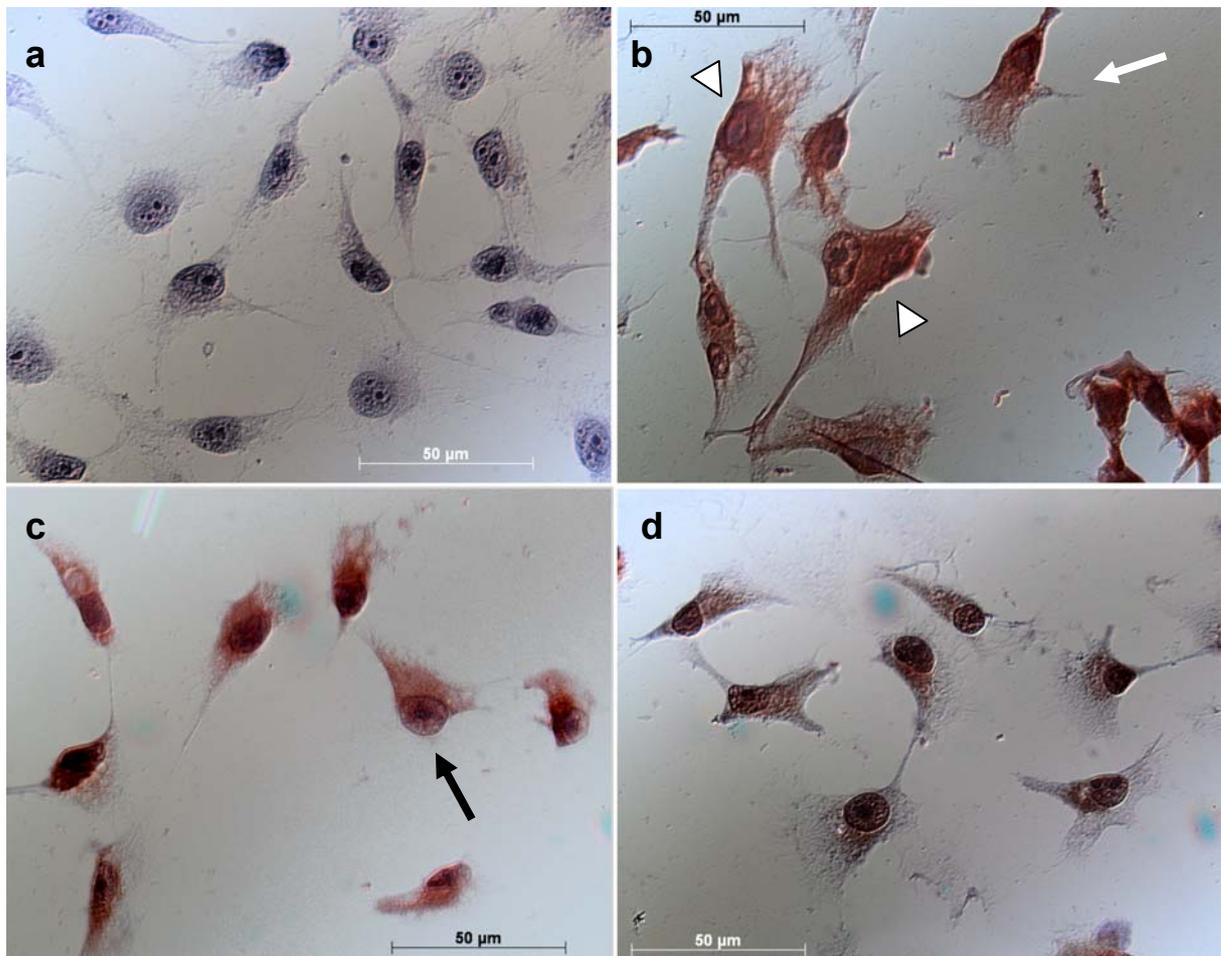
Zum Vergleich wurde auch die CD105-Expression weiterer Zellen bestimmt. HUVE-Zellen (PromoCell GmbH, Heidelberg) synthetisieren die mRNA, wie für proliferierende Endothelzellen zu erwarten war, in sehr hohem Maße ( $\Delta C_T$ -Wert: 3,50). Auch monozytäre Zellen (THP-1-Zelllinie;  $\Delta C_T$ -Wert: 4,20; Quelle: National Institutes of Health, Bethesda), Chondrozyten (C28i-Zelllinie;  $\Delta C_T$ -Wert: 6,16; Quelle: Dr. Mary B. Goldring, Boston), sowie das Homogenat eines hochmalignen Glioblastoms (WHO-Grad IV;  $\Delta C_T$ -Wert: 4,37; Neurochirurgie der Universität Kiel) exprimieren das Endoglin-Gen auf hohem Niveau (siehe Abb. 3.9). Vermutlich hat innerhalb des Glioms eine signifikante Angiogenese, mit Einsprossung Endoglin-produzierenden Endothels, stattgefunden, Zudem könnten Makrophagen aufgrund gestörter Integrität der Blut-Hirn-Schranke eingewandert sein. Die etablierten Gliomzelllinien U343 und U118 (bezogen über: Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) hingegen weisen die mRNA in deutlich geringerer Kopienzahl auf ( $\Delta C_T$ -Werte: 14,11 und 12,14). Die humane Nierenzelllinie HEK-293 (Human Embryonic Kidney, CCS Cell Culture Service, Hamburg) zeigt keine nennenswerte CD105-Expression.

Die Klone mit der jeweils höchsten (L-End3 und S-End-8) bzw. niedrigsten Endoglin-Expression (PSU-7) kamen in den weiter unten beschriebenen Experimenten zum Einsatz. Da MDA-MB-231-Brain- und L-End-3-Zellen die gleiche CD105-Expressionshöhe aufweisen, sollte der L-End-3-Klon die gleichen durch Endoglin hervorgerufenen Eigenschaften wie die Brain-Zelllinie besitzen. Beim S-Endoglin besteht die cytoplasmatische Domäne aus nur 14 Aminosäuren und kann im Gegensatz zu der des L-Endoglin (47 AS) nicht im Rahmen der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion phosphoryliert werden. S-Endoglin gilt deshalb als Gegenspieler des L-Endoglins und wird häufig als Werkzeug zur Untersuchung der Signaltransduktion dieses Zytokins eingesetzt.

Der S-Endoglin-Klon S-End-8 ist die MDA-MB-231-Zelllinie mit der höchsten Endoglin-Expression ( $\Delta C_T$  –Wert: 4,1). Effekte, die von der kurzen Isoform des Endoglins hervorgerufen werden, sollten bei diesem Klon also deutlich sichtbar sein. Auch die Endoglin-Reduktion um 78% in dem Klon PSU-7 erschien ausreichend, so dass darauf verzichtet wurde, weitere Klone zu entwickeln. Somit standen alle erforderlichen Werkzeuge zur Verfügung, um den Einfluss von Endoglin auf die Brusttumorzelllinie MDA-MB-231 zu untersuchen. Auch die Relevanz der Endoglin-Überexpression in der hirnmetastasierenden MDA-MB-231-Brain-Zelllinie sollte mit Hilfe der neuen Zelllinien beurteilt werden können.

### 3.3.2 Immuncytochemische Darstellung von Endoglin und ZRP-1 in MDA-MB-231-Zelllinien

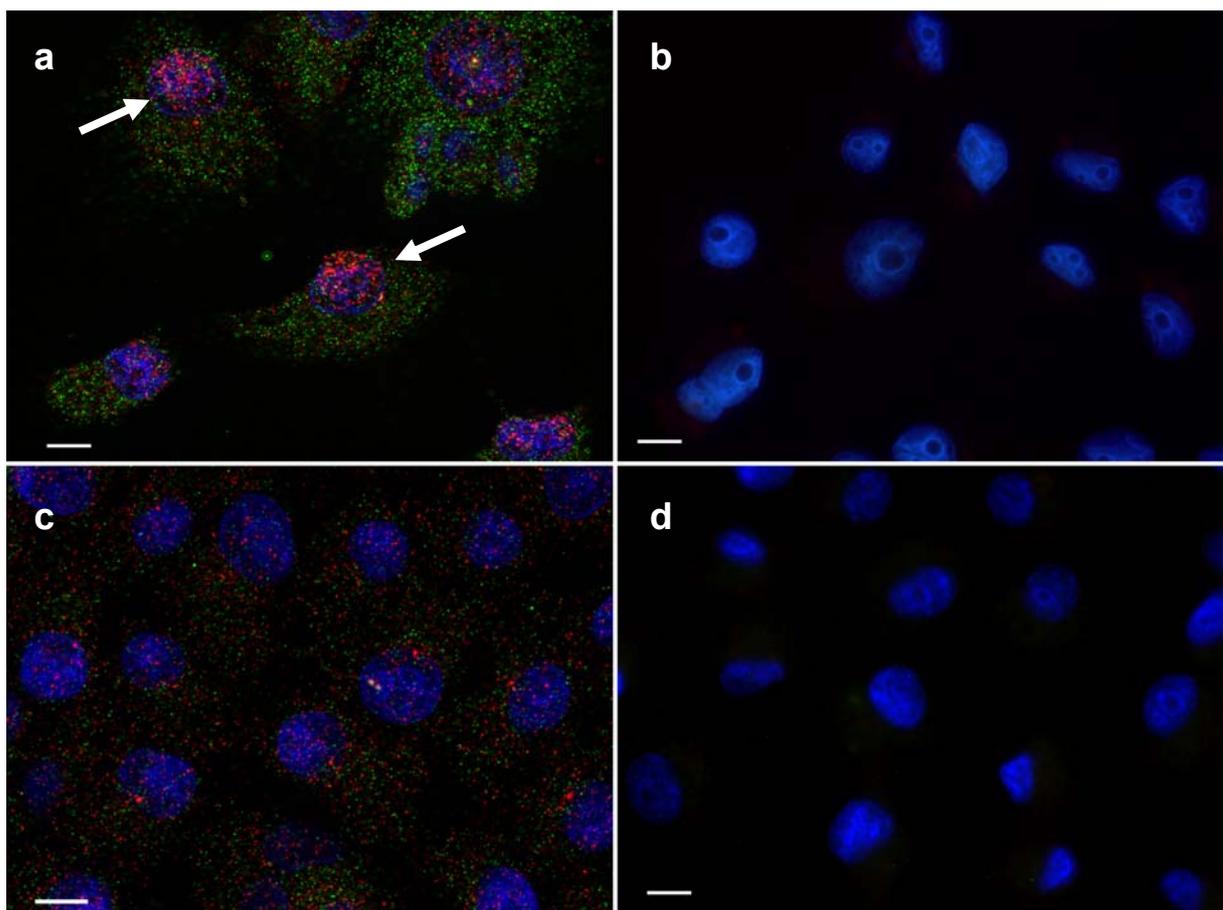
Nachdem der Erfolg der Transfektionsexperimente auf mRNA-Ebene mit Hilfe von Real-time RT PCR bestätigt worden war, musste nun sichergestellt werden, dass sich die künstlich erhöhte bzw. herabgesetzte Kopienzahl an Endoglin-mRNA auch in einer größeren bzw. geringeren Menge an akkumuliertem Protein in der Zelle widerspiegelt. Hierfür wurden immuncytochemische Färbungen der MDA-MB-231-Parental und –Brain-Zelllinien, sowie der von diesen Zellen abgeleiteten Klone L-End-3 und PSU-7 durchgeführt. Die Zellen wurden auf Poly-D-Lysin-beschichteten



**Abb. 3.10** Immuncytochemische Darstellung des TypIII-TGF $\beta$ -Rezeptors Endoglin in verschiedenen MDA-MB-231 Brusttumorzelllinien. a: MDA-MB-231-Parental, b: MDA-MB-231-Brain, c: MDA-MB-231-L-End-3 (MDA-MB-231 Parental-Zellen, stabil transfiziert mit pcDNA3.1/Zeo-EndoL), d: MDA-MB-231-PSU-7 (MDA-MB-231 Brain-Zellen stabil transfiziert mit pSUPER-Zeo-EndoEx4). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (10% FKS) kultiviert und dann mit einem Aceton-Methanol-Gemisch fixiert. Die Immuncytochemische Färbung erfolgte unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers gegen Endoglin (Verdünnung: 1:100) und des Streptavidin-Biotin-Systems. Die Wirkung der ins Genom integrierten Vektoren ist deutlich sichtbar. Während die Endoglin-Konzentration auf der Oberfläche der parentalen Zellen durch die stabile Transfektionsreaktion stark zunahm (a+c), sank sie in den transfizierten MDA-MB-231-Brain Zellen (b+d). Vergr. 630 $\times$ ; Kontrastierungsverfahren: DIC.

Deckgläschen ausgesät und unter Standardbedingungen in Anwesenheit von 10% FKS kultiviert. Die Fixierung erfolgte durch ein auf  $-20^{\circ}\text{C}$  abgekühltes Aceton-Methanol-Gemisch (im Verhältnis 1:1 v/v). Durch die Behandlung der Zellen mit Aceton/Methanol findet neben der Fixierung gleichzeitig eine vollständige Permeabilisierung der Zellen statt. Das Protein wurde mit Hilfe eines polyklonalen Anti-Endoglin Kaninchen-Antikörpers (IgG, Santa-Cruz Biotech, sc-20632) markiert und mittels Streptavidin-Biotin-System dargestellt. Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Anti-Kaninchen Antikörper aus dem Schwein.

Der Effekt der Transfektionsreaktionen ist deutlich zu erkennen. Während die Endoglin-Menge der parentalen Zelllinie nicht ausreicht, um eine sichtbare Färbung hervorzurufen, zeigt der L-End-3-Klon eine stark positive Reaktion (siehe Abb. 3.10). Auch die durch den Endoglin-shRNA-Vektor bedingte Abnahme der CD105-Proteinkonzentration auf der Oberfläche der MDA-MB-231-Brain Zellen ist evident. Die Verteilung des Farbpigments ist bei den angefärbten Zellen –wie für ein Membranprotein zu erwarten war– relativ homogen und reicht bis in die Zellausläufer. Aus diesem Grund sind auch die Zellgrenzen besser identifizierbar als in den schwach Endoglin-exprimierenden parentalen Zellen (Abb.3.10 a). Zum Zeitpunkt der Fixierung



**Abb. 3.11** Immunfluoreszenz-Darstellung von Endoglin (grün) und dem Endoglin-Interaktionsprotein ZRP-1 (Zyxin-related protein-1, rot). a: MDA-MB-231-L-End-3-Zellen; c: MDA-MB-231-Parental-Zellen; b+d: jeweilige Negative-Kontrolle von a und c (kein Primärantikörper). Die Überexpression von L-Endoglin moduliert die subzelluläre Lokalisation des Interaktionspartners ZRP-1 in L-End-3-Zellen. Es ist eine auffällige Konzentrierung im Bereich des Zellkerns sichtbar (a: Pfeile). Balken =  $10\mu\text{m}$

befanden sich offensichtlich viele der Brain- und L-End-3 -Zellen in einem migrierenden Zustand (siehe Abb. 3.10 b+c, Pfeile). Die MDA-MB-231-Brain Zelllinie ist im Gegensatz zur parentalen Linie morphologisch sehr heterogen, man findet viele Zellen mit ungewöhnlich großen Zellleib (Abb. 3.10 b, Pfeilspitzen).

Um einen potentiellen Einfluss der zellulären L-Endoglin-Konzentration auf die Lokalisation des Endoglin-Interaktionsproteins ZRP-1 zu untersuchen, wurden beide Proteine mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Technik dargestellt (Abb. 3.11). Die Zellen wurden zunächst, entsprechend obiger Vorgehensweise, auf PDL-beschichteten Deckgläschen kultiviert und mittels Aceton/Metanol (1:1)-Gemisch fixiert. Die Präinkubation erfolgte in Gegenwart von Anti-Endoglin (siehe oben) und Anti-ZRP-1 (Anti-ZRP-1, Kat.-Nr. 612254, BD Biosciences, Heidelberg) –Antikörpern. Als Sekundärantikörper dienten die Alexa-Fluoreszenzfarbstoff-markierten Immunglobuline Alexa Fluor 488 Ziege-Anti-Kaninchen (grün, Molecular Probes, Kat.-Nr. 31627) und Alexa Fluor 555 Ziege-Anti-Mouse (rot, Molecular Probes, Kat.-Nr. A31621).

Während sich das Vorkommen des ZRP-1-Proteins in parentalen Zellen gleichmäßig über den gesamten Zellleib erstreckt, führt eine hohe Endoglin-Expression zu einer Konzentrierung von ZRP-1 im Bereich des Nukleus. Derartige Translokationen von ZRP-1 sind in der Regel mit einer höheren Zellmotilität und einer modulierten Expression Invasions-steigernder Gene verbunden (siehe 4.3.3.1).

### 3.3.3 Endoglin-Expression in MDA-MB-231-Zellen (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblot)

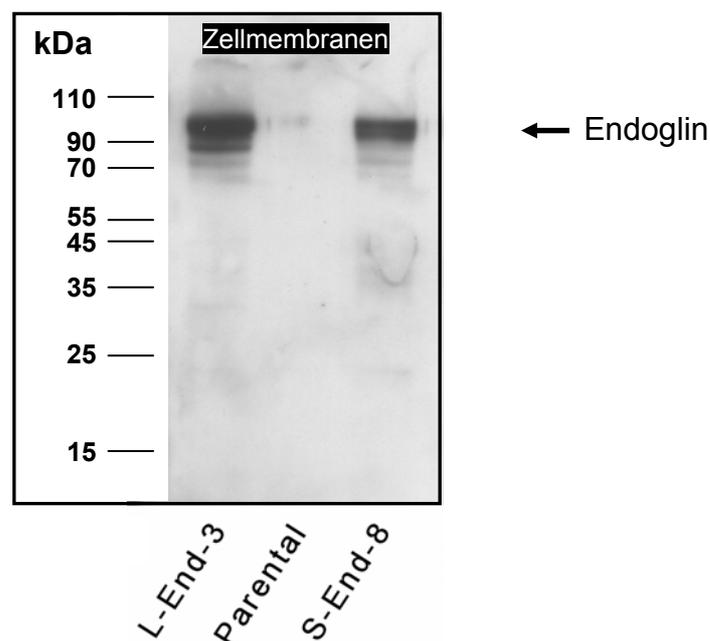
Um die Endoglin-Überexpression in den generierten Klonen MDA-MB-231-L-End-3 und -S-End-8 endgültig zu bestätigen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Immunoblot durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei Standardbedingungen unter Verwendung von FKS-haltigen (10%) A-Medium. Nach Ernte und Lysierung der verschiedenen MDA-MB-231-Linien wurden Membranfraktionen der Zellen isoliert, in Dithiothreitol-haltigem Probenpuffer 5min bei 90°C inkubiert und dann in einem SDS-Polyacrylamid-Gel der Größe nach aufgetrennt.

Beim Immunoblot kam ein, gegen das aminoterminal Ende des Endoglinproteins gerichteter, polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Santa-Cruz Biotechnology, sc-20632), sowie ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper zum Einsatz. Die Detektion der Protein-Antikörper-Konjugate erfolgte mit Hilfe des ECL-Chemilumineszenz Systems („ECL“ =“Enhanced-Chemiluminescence“, ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit, GE Healthcare). Der hierbei belichtete Spezialfilm (Hyperfilm ECL, High Performance Chemiluminescence Film, 18×24cm, GE Healthcare) wurde entwickelt, fixiert und dann mit einem Scanner eingelesen.

Endoglin ist ein homodimeres, integrales Membranprotein mit einer molekularen Masse von etwa 200kDa. Das Protein weist eine umfangreiche extrazelluläre Domäne von 591 Aminosäuren (As) auf, an die sich eine einzige Transmembrandomäne (10 As) und eine relativ kurze cytoplasmatische Domäne anschließt. Endoglin kommt in zwei Isoformen vor, die sich lediglich in ihrer cytoplasmatischen Domäne unterscheiden. Beim humanen L-Endoglin ist die cytoplasmatische Domäne 47 As lang, bei der kürzeren Spleiß-Variante beträgt die Kettenlänge 14 As. Unter reduzierenden Bedingungen migrieren die Untereinheiten

des humanen Endoglin im SDS-Polyacrylamidgel entsprechend einer Molekularmasse von etwa 102kDa (L-Endoglin) bzw. 97kDa (S-Endoglin; Bellon et al., 1993). Endoglin ist ein Glykoprotein mit vier potentiellen Glykosylierungsstellen (Paquet et al., 2001). Aus diesem Grund kann das Migrationsverhalten des Proteins bzw. der Untereinheiten im Rahmen einer Elektrophorese je nach Glykosylierungsstatus leicht variieren.

Während die parentalen Zellen unter den gewählten Experimentierbedingungen im Western-Blot keine sichtbare Endoglin-Expression zeigen, weisen die mit den Endoglin-Expressionsvektoren stabil transfizierten Zelllinien L-End-3 und S-End-8 hohe Konzentrationen an Endoglin der jeweiligen Isoform auf. Die vom Anti-Endoglin-Antikörper detektierten Proteine besitzen, in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Angaben für S- und L-Endoglin (s.o.), eine Molekularmasse von 95 bis 100kDa. Der Unterschied in den Molekularmassen beider Isoformen von etwa 5kDa ist nicht deutlich erkennbar. Die akkumulierte Endoglin-Menge ist besonders in den L-End-3-Zellen sehr hoch (Abb. 3.12). Da für Membranproteine keine geeignete Ladekontrolle existiert, wurde das Auftragen gleicher Gesamtproteinmengen durch sorgfältiges Pipettieren, sowie Anfärben eines parallel angefertigten, zweiten Gels mit Coomassie-Brillantblau und Abschätzen der Bandenintensitäten sichergestellt.

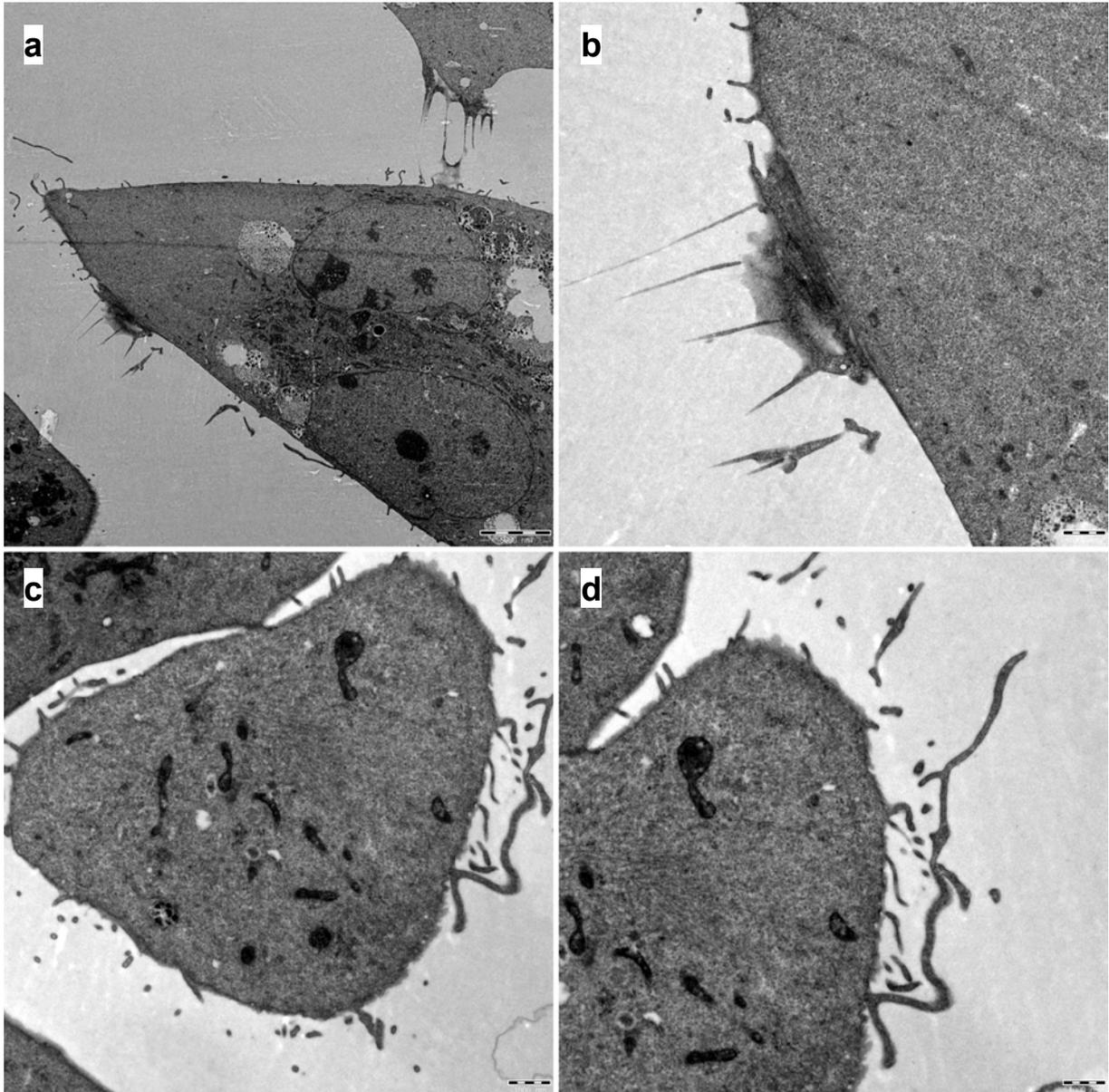


**Abb. 3.12** Endoglin-Expression auf Proteinebene in parentalen MDA-MB-231-Zellen und den abgeleiteten Klonen L-End-3 und S-End-8 (SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen in Anwesenheit von 10% FKS. Von den Zellen isolierte man Membranfraktionen, welche dann in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt wurden (5µg Gesamtprotein pro Spur, Anfangsbedingungen: 400V, 340mA). Die Gesamtkonzentration des Trenngels an Acrylamid/Bis lag bei 10% (w/v). Als Standard diente der Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, #SM0671), mit den Fragmentgrößen 110, 90, 70, 55, 45, 35, 25 und 15 kDa. Die Detektion von Endoglin erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Systems. In den stabil transfizierten Klonen ist eine starke L- und S-Endoglin-Expression zu erkennen. Leichte Nebenbanden können durch Unterschiede im Grad der Endoglin-Glykosylierung entstehen.

### 3.4 Elektronenmikroskopische Darstellung subzellulärer Details

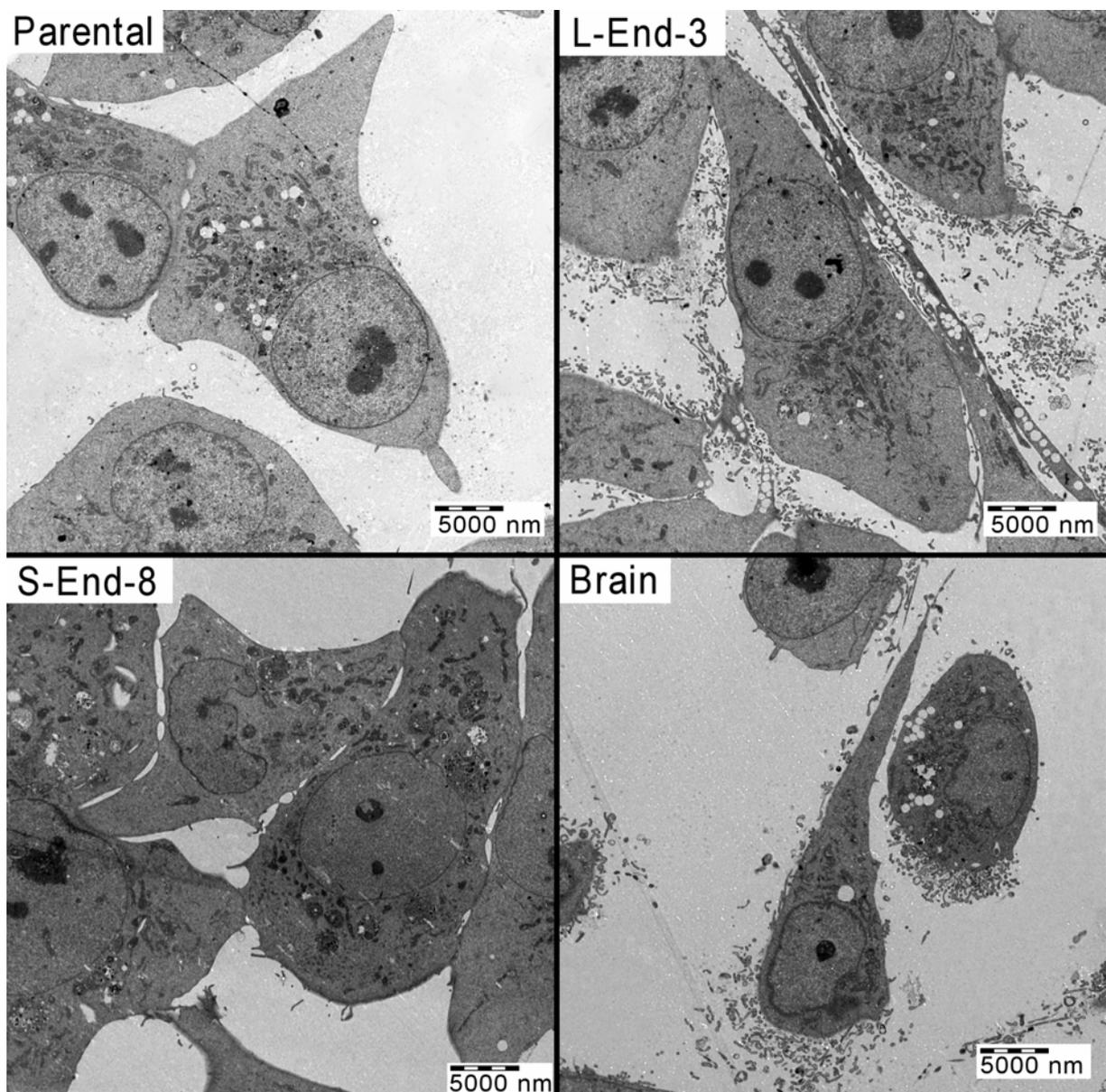
#### 3.4.1 Metastasierungs-relevante Strukturen: Invadopodien und Membranvesikel

MDA-MB-231-Brusttumorzellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) in Anwesenheit von 10% FKS bis zu einem



**Abb. 3.13** Elektronenmikroskopische Darstellung (TEM) von Invadopodien und seitlichen Zellausläufern. Durch tangentielle Schnittführung werden die ventral gelegenen Invadopodien sichtbar (a+b). Sie besitzen eine deutlich andere Struktur als die geschlängelten lateralen Fortsätze (c+d). Von letzteren werden vermutlich die in Abb. 3.14 gezeigten Membranvesikel abgeschnürt. Beide Zellausläuftertypen lassen sich nur in den L-Endoglin-exprimierenden Zelllinien in relevanter Anzahl nachweisen. a+b: MDA-MB-231-L-End3; c+d: MDA-MB-231-Brain. Balken = 1000 nm.

subkonfluenten Stadium auf Matrigel kultiviert. Die Zellen wurden fixiert, mittels aufsteigender Ethanolreihe entwässert, in LR-White-Harz eingebettet und mit einem Ultramikrotom (Leica EM UC6, Leica Microsystems, Wien) geschnitten. Nachdem die Schnitte auf einem Nickelgitter aufgebracht worden waren, erfolgte eine Kontrastierung mittels Osmiumtetroxid und Bleiacetat. Die Proben konnten nun mit Hilfe eines Elektronenmikroskops (Zeiss 902 Elektronenmikroskop, Zeiss, Oberkochen) betrachtet und dokumentiert werden. Die ventrale, der ECM-Beschichtung zugewandten Zellseite, wies im Fall der L-Endoglin-exprimierenden Zelllinien MDA-MB-231-L-End-3 und -Brain geradlinige, stabförmige Fortsätze auf (Invadopodien). Zusätzlich zeigten sich bei diesen Zellen auch laterale Zellausläufer, in deren Umgebung meist zahlreiche Membranvesikel anzutreffen waren (Abb. 3.13). Bei parentalen und S-Endoglin-exprimierenden MDA-MB-231-Zellen ließen sich



**Abb. 3.14** Elektronenmikroskopische Darstellung der Freisetzung von Membranvesikeln bei verschiedenen MDA-MB-231-Brusttumorzelllinien. Ein Zusammenhang zwischen L-Endoglin-Expression und der Abschnürung von Partikeln ist nicht zu übersehen.

diese Strukturen, trotz längerer Suche, nicht (Invadopodien), oder nur in geringem Umfang (laterale Zellausläufer), auffinden.

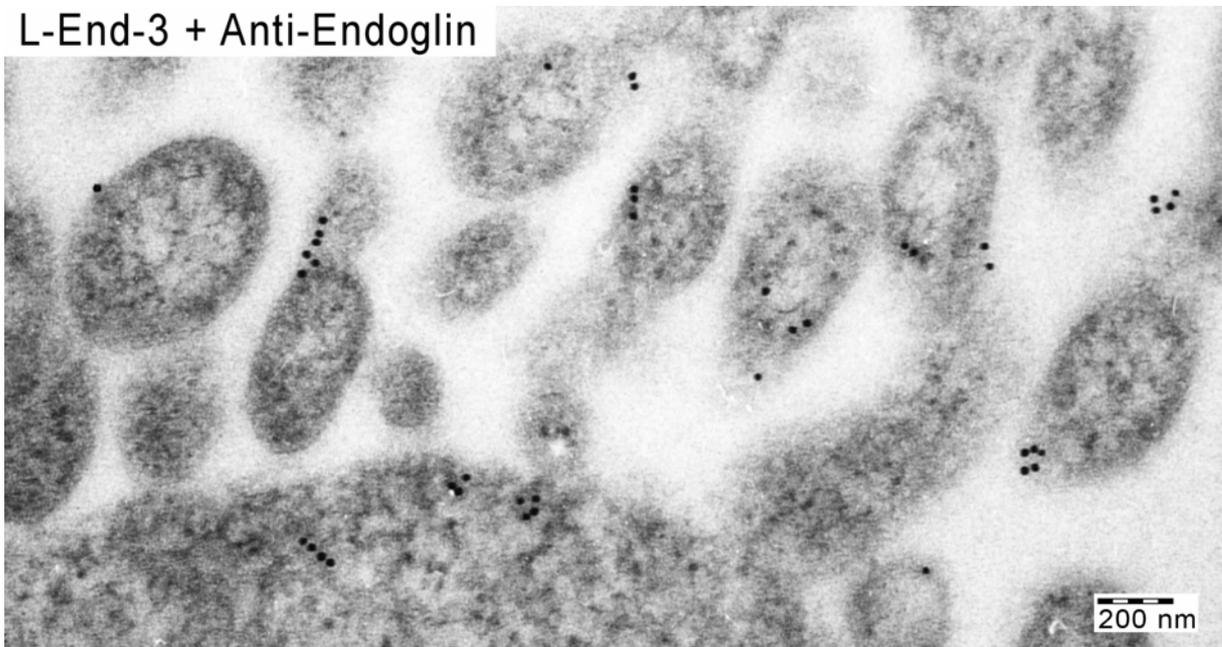
Entsprechend beschränkte sich auch das Vorkommen abgeschnürter Membranvesikel fast ausschließlich auf Zellen mit hoher Endoglin-Synthese (Abb 3.14). Hier zeigte sich aber in der Regel ein massenhaftes Auftreten der Partikel (Größe: etwa 250 bis 500nm). Membranvesikel üben einen Einfluss auf verschiedene Aspekte der Tumorentwicklung und –Metastasierung aus und werden im Kapitel 4.3.5 beschrieben.

### 3.4.2 Subzelluläre Lokalisation Endoglin im Klon L-End-3

Für die Immuno-Elektronenmikroskopie wurde das so genannte „post-embedding“-Verfahren angewandt. Zunächst erfolgte wiederum die Fixierung, Entwässerung und Einbettung der Zellen. Nun wurden Ultradünnschnitte angefertigt und auf Nickelnetze aufgebracht. Um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, wurden die Proben mit Normalserum aus der Ziege inkubiert und anschließend in Anwesenheit eines Anti-Endoglin-Antikörper (IgG, 1:100, Santa-Cruz Biotechnology, Ca, USA, sc-20632) bei 4°C über Nacht vorinkubiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Anti-Kaninchen-Antikörpers, welcher mit Gold-Kolloiden (durchschnittliche Größe: 10nm) konjugiert, vorlag (Ziege, IgG, 1:30, British BioCell International, Cardiff, UK).

Mit Hilfe des Elektronenmikroskops zeigte sich, dass der TGF- $\beta$ -TypIII-Rezeptor hauptsächlich an Zellfortsätzen der lateralen Zellmembran vorkommt. Das Endoglin-Protein befindet sich allerdings auch an der Zelloberfläche und innerhalb von Endosomen (Abb 3.15).

#### L-End-3 + Anti-Endoglin



**Abb. 3.15** Subzelluläre Lokalisation von Endoglin in Zellen des L-Endoglin-Klones L-End-3 (TEM). Zur Visualisierung des Proteins wurde ein polyklonaler Kaninchenantikörper (IgG, 1:100, Santa-Cruz Biotechnology, Ca, USA, sc-20632), sowie ein, mit Goldpartikeln konjugierter, Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen IgG, 1:30, British BioCell International, Cardiff, UK) eingesetzt. Das Endoglin-Protein befindet sich hauptsächlich an Fortsätzen der Zelle.

## 3.5 Die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion in MDA-MB-231-Zellen

### 3.5.1 Einfluss des Endoglin-Proteins auf die Expression von Zielgenen des ALK-1-Signaltransduktionswegs

Endoglin ist ebenso wie das Betaglycan ein TGF- $\beta$ -Rezeptor vom Typ III. Um den Einfluss von Endoglin auf die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion zu ermitteln, wurde die Induktion des Id1 (Inhibitor of DNA-binding 1 bzw. Inhibitor of differentiation 1) -Gens durch TGF- $\beta$ 1 in den verschiedenen MDA-MB-231-Zelllinien und -Klonen untersucht. Id-Proteine gehören zur Familie der helix-loop-helix (HLH)-Transkriptionsfaktoren (Benezra et al., 1990) und können mit gewebsspezifischen bHLH (basic HLH)-Proteinen Heterodimere bilden.

Da den Id-Proteinen, im Gegensatz zu den ebenfalls mit gewebsspezifischen bHLH interagierenden E-Proteinen, eine zur DNA-Bindung notwendige basische Region fehlt, können die Id-bHLH-Heterodimere nicht als Transkriptionsaktivatoren wirken. Deshalb fungieren Id-Proteine als negativ dominante Regulatoren der bHLH-Proteine. Sie wirken als Inhibitoren der Zelldifferenzierung, steigern die Zellproliferation und besitzen eine wichtige Bedeutung für Tumorzellen. Die exogene Überexpression von Id1 in einer nicht aggressiven Mammakarzinomzelllinie führte zur Ausbildung eines aggressiveren Phänotyps (Desprez et al., 1998; Lin et al., 2000). Die Id1-Expression wird über den TGF- $\beta$ / ALK-1-Signaltransduktionsweg durch TGF- $\beta$  reguliert.

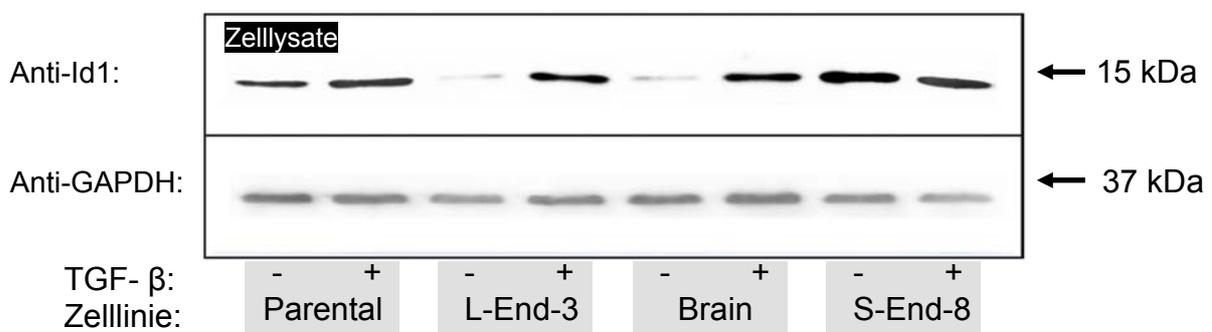
#### 3.5.1.1 Einfluss des Endoglin-Proteins auf die Id1-Expression

Die Brusttumorzellen wurden zunächst 72 Stunden unter serumfreien Bedingungen kultiviert, um eine durch Serum bedingte Stimulation der TGF- $\beta$ -Rezeptoren auszuschließen. Die höchsten TGF- $\beta$ -Konzentrationen des Körpers findet man nämlich in Thrombozyten. Es wurde gezeigt, dass bei der Gewinnung von Serum viele Inhaltsstoffe der Thrombozyten, so auch TGF- $\beta$  freigesetzt werden und in die Präparation gelangen. TGF- $\beta$ 1 wird als 390 AS langes Glykoprotein synthetisiert. Bei der Prozessierung des Preproproteins werden ein Signalpeptid (29 As) und eine Sequenz, welche man als so genanntes Latenz-assoziiertes Propeptid (249 As) bezeichnet, abgespalten. Aus diesem Grund weist das reife, aktive TGF- $\beta$ 1 eine Kettenlänge von nur 112 Aminosäuren auf. Diese 112 Aminosäuren stimmen beim humanen (Zugangs-Nr. AAP35909.1) und bovinen (Zugangs-Nr. AAA30778.1) TGF- $\beta$ 1 zu 100% überein, so dass von einer Kreuzreaktivität auszugehen ist.

Die Zellen wurden wahlweise für 6 Stunden mit TGF- $\beta$ 1 (5ng/ml) stimuliert und dann lysiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der Bestandteile des Zelllysates in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Gelkonzentration: 12,5% (w/v) Acrylamid/Bis, Anfangsbedingungen: 400V, 340mA). Die Proteine wurden durch Elektroblothing im semi-dry-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von Id1 erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers (Anti-Id1, sc-488, Santa Cruz Biotechnology), in einer Verdünnung von 1:250.

Der mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:20000 eingesetzt (Anti-Kaninchen-HRP, P0260, Dako). Gebundener Sekundärantikörper wurde mittels ECL-Chemilumineszenz-Systems sichtbar gemacht. Nachdem der Chemilumineszenz-Film belichtet war, wurde die

Membran von gebundenem Antikörper befreit („stripping“ der Membran). Als Ladekontrolle wurde nun die jeweils aufgetragene Menge an GAPDH-Protein bestimmt (Anti-GAPDH-Antikörper, sc-25778, Santa Cruz Biotechnology, Verdünnung 1:250). Das *gapdh*-Gen gilt als sog. „housekeeping“-Gen, welches in seiner Expression nicht durch das Einbringen der Konstrukte beeinflusst werden sollte. Wie aus dem Western-Blot deutlich wird, lässt sich die Id1-Synthese nur in den MDA-MB-231-Zelllinien mit hoher L-Endoglin-Expression durch TGF- $\beta$ 1 effektiv regulieren (siehe Abb. 3.16). Parentale Zellen mit geringer Endoglin-Konzentration weisen schon im unstimulierten Zustand eine recht hohe Id1-Expression auf. Eine Induktion des Gens durch TGF- $\beta$ 1 fällt hier nur gering aus. Beim MDA-MB-231-Klon S-End-8 ist das Id1-Syntheseniveau bereits in den unstimulierten Zellen so hoch, dass eine Zugabe von TGF- $\beta$ 1 keine erkennbare Id1-Induktion hervorruft (siehe Abb. 3.16).

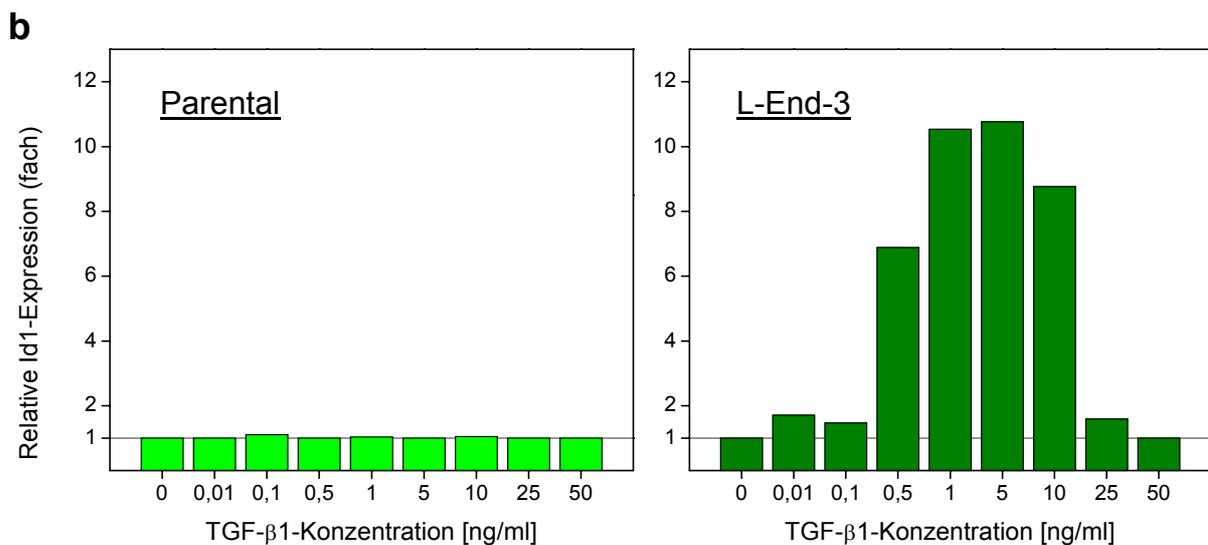
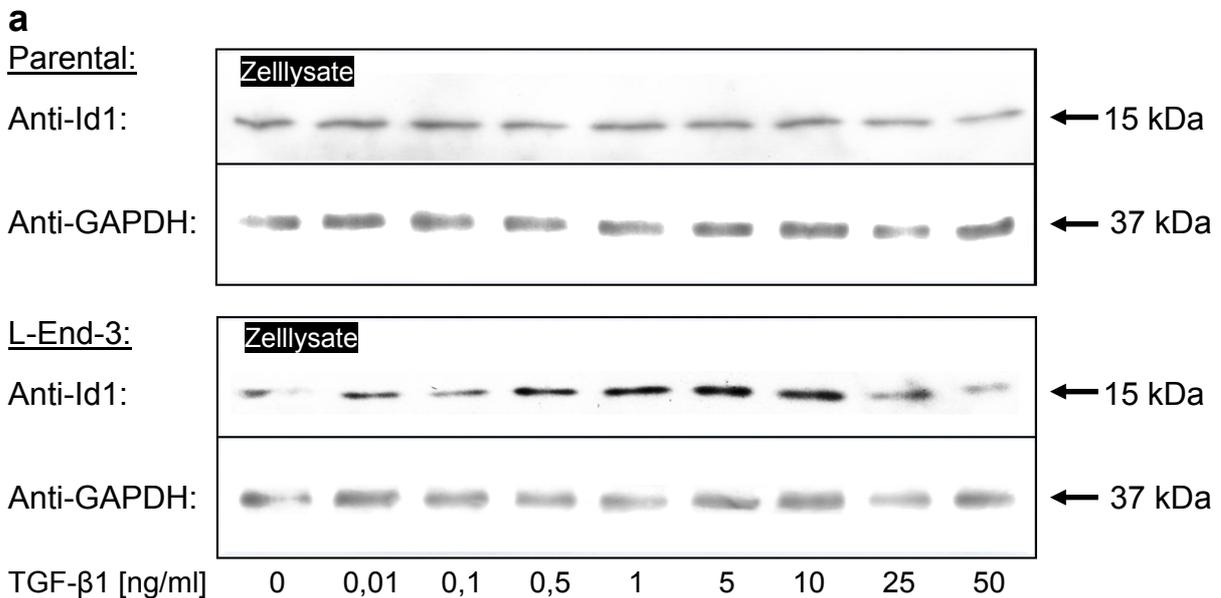


**Abb. 3.16** Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Expression von Id1 in Zellen mit unterschiedlicher Endoglin-Expression (Western-Blot). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen, jedoch in Abwesenheit von FKS. Die Zellen wurden entweder mit TGF- $\beta$ 1 (5ng/ml) für 6 Stunden stimuliert (+) oder blieben unstimuliert (-). Die anschließend hergestellten Zellysate wurden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt (5 $\mu$ g Gesamtprotein pro Spur, 400V, 340mA). Das verwendete Trenngel wies eine Gesamtkonzentration an Acrylamid/Bis von 12,5% (w/v) auf. Die Detektion von Id1 und GAPDH erfolgte mit Hilfe polyklonaler Kaninchen-Antikörper (0,8  $\mu$ g/ml, Verdünnung in beiden Fällen: 1:250) und des ECL-Chemilumineszenz-Systems. Die L-Endoglin-exprimierenden Zelllinien MDA-MB-231 - L-End-3 und -Brain zeigen eine starke Induktion des Id1-Gens infolge der Stimulation durch TGF- $\beta$ 1. In Zellen mit geringer Endoglin-Expression (Parental) oder starker Expression der kürzeren Spleiß-Variante des Proteins (S-Endoglin) wird die Id1-Synthese nicht durch TGF- $\beta$ 1 reguliert.

### 3.5.1.2 Dosisabhängigkeit der TGF- $\beta$ 1-bedingten Id1-Induktion

Um den Einfluss von Endoglin auf die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Id1-Induktion zu untersuchen, wurden in einem weiteren Experiment Zellen der MDA-MB-231-Zelllinien Parental und L-End-3 mit unterschiedlichen TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen stimuliert. Der L-End-3-Klon unterscheidet sich von der parentalen Zelllinie lediglich in einer höheren Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors Endoglin. Die Zellen wurden wiederum unter serumfreien Bedingungen (siehe weiter oben) kultiviert und dann lysiert. Nun folgte eine größenabhängige Auftrennung der zellulären Proteine (Gesamtlysat) durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Gelkonzentration

12,5%), sowie Proteintransfer auf eine PVDF-Membran. Zum Nachweis von Id1 und GAPDH wurde die Protein-beladene Membran mit entsprechenden polyklonalen Kaninchen Antikörpern inkubiert. Die verwendeten Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper wiesen als Reportergruppe eine konjugierte Meerrettich-Peroxidase auf.



**Abb. 3.17** Dosisabhängigkeit der Id1-Induktion in MDA-MB-231-Brusttumorzellen bei TGF- $\beta$ 1-Stimulation. Die Zellen wurden serumfrei kultiviert, jeweils 6 Stunden mit TGF- $\beta$ 1 der angegebenen Konzentration stimuliert und dann lysiert. Anschließend erfolgte eine größenabhängige Auftrennung der Zelllysate-Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (5  $\mu$ g pro Spur, 400V, 340mA). Das verwendete Trenngel wies eine Gesamtkonzentration an Acrylamid/Bis von 12,5% (w/v) auf. Die Proteindetektion erfolgte mit Hilfe polyklonaler Antikörper (jeweils 0,8 $\mu$ g Antikörper/ml) und des ECL-Chemilumineszenz-Systems. Immunoblots gegen Id1 und GAPDH (a) wurden mit Hilfe der Software PCBAS densitometrisch ausgewertet (b). Die Intensitäten der Id1-Banden wurden zunächst auf die jeweilige GAPDH-Auftragskontrolle, dann auf die unstimulierte Kontrolle normalisiert. Das Id1-Protein lässt sich nur in den stark Endoglin-exprimierenden MDA-MB-231-Zellen durch TGF- $\beta$ 1 induzieren. In den parentalen Brusttumorzellen mit geringem Endoglin-Gehalt bleibt die Id1-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen unverändert.

Eine Peroxidase-Aktivität wurde mittels ECL-Chemilumineszenz-Systems in Lichtsignale umgewandelt, welche dann der Belichtung eines Lumineszenzfilms dienen (Hyperfilm ECL, High Performance Chemiluminescence Film, GE Healthcare). Die von den Antikörpern detektierten Proteine wiesen Molekülmassen auf, die dem humanen Id1-Protein (15kDa) und der humanen GAPDH (37 kDa) entsprachen. Zur quantitativen Beurteilung der Ergebnisse wurden die Proteinbanden mit einem Scanner eingelesen und mit Hilfe der Software PCBAS (Version 2.09g, Raytest, Straubenhardt) densitometrisch ausgewertet. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Schwärzung des Films beim Belichtungsvorgang nur innerhalb gewisser Genauigkeitsgrenzen linear mit der Menge des vorhandenen Zielproteins zunimmt.

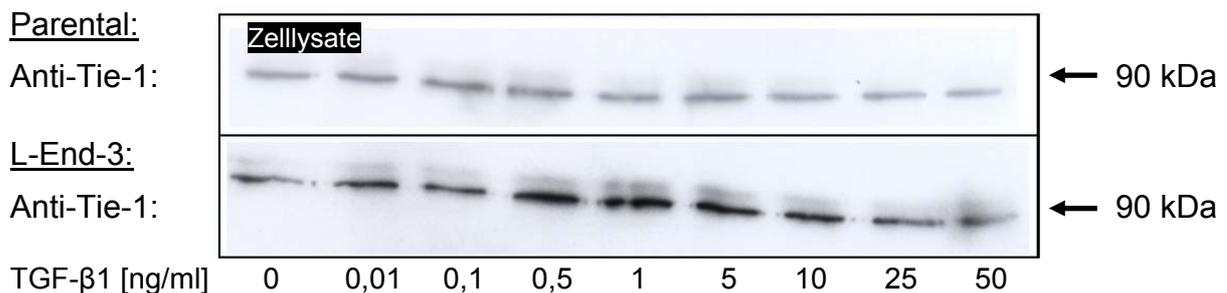
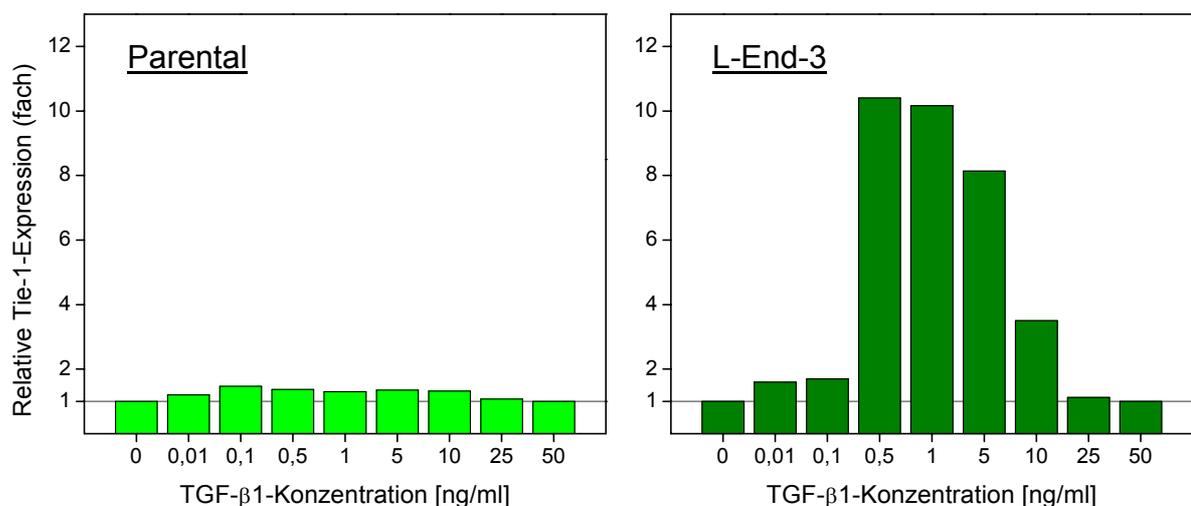
Ebenso wie beim vorangegangenen Experiment, zeigt auch dieser Western-Blot, dass sich das Id1-Gen in parentalen MDA-MB-231-Brusttumorzellen nicht durch TGF- $\beta$ 1 induzieren lässt. Im Gegensatz hierzu wird die Id1-Synthese in Zellen des MDA-MB-231-Klons L-End-3 bei Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 deutlich hochreguliert, wobei die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Id1-Expression eine, für dieses Zytokin typische, glockenförmige Dosisabhängigkeit aufweist (siehe Abb. 3.17). Die höchsten Induktionsraten erhält man in Anwesenheit von 1 bis 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1. Beim *Id1*-Gen handelt es sich um ein Zielgen des TGF- $\beta$ /ALK-1 (Activin-Like Kinase-1) –Wegs. Bei der Stimulation von L-End-3-Zellen mit TGF- $\beta$ 1 wird also dieser und nicht der TGF- $\beta$ /ALK-5 Signaltransduktionsweg aktiviert, bzw. allgemeiner: Endoglin fördert die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Induktion von Zielgenen des TGF- $\beta$ /ALK-1-Wegs.

### 3.5.1.3 Dosisabhängigkeit der TGF- $\beta$ 1-bedingten Tie-1-Induktion

Da MDA-MB-231-Brain-Zellen im Vergleich zu parentalen Zellen eine signifikant erhöhte Tie-1-Expression aufwiesen (siehe Abschnitt 1.6), sollte im Folgenden geklärt werden, ob das höhere Endoglin-Expressionsniveau der Brain-Zelllinie hierfür ursächlich ist. Aus diesem Grund wurden die bereits zur Verfügung stehenden Zelllysate TGF- $\beta$ 1-stimulierter MDA-MB-231 Parental- und –L-End-3-Zellen in einem weiteren Western-Blot, diesmal jedoch gegen Tie-1 gerichtet, eingesetzt. Das Vorgehen entsprach demjenigen beim Id-1-Immunoblot, jedoch wurde der Primärantikörper hier lediglich 1:100 verdünnt.

Tie-1 ist eine Endothelzell-assoziierte Rezeptor-Tyrosin-Kinase (Tie-1= Tyrosine kinase with Immunoglobulin und Epidermal growth factor homology domains\_1), welche einen hohen Grad an Homologie mit Tie-2, dem Angiopoietinrezeptor teilt. Es wurde gezeigt, dass die Angiopoietine Ang1 und Ang4 auch den Tie-1-Rezeptor aktivieren können (Saharinen et al., 2005). Der aktivierte Rezeptor assoziiert mit der Phosphatidylinositol-3-Kinase, was eine Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt zur Folge hat (Kontos et al., 2002). Tie-Proteine repräsentieren die frühesten Marker der Endothel-Linie und regulieren die Endothelzellproliferation, -differenzierung und korrekte Gefäßbildung während der Vaskulogenese. Das Protein wird allerdings auch in sehr invasiven Melanomzellen auf hohem Niveau exprimiert (Maniotis et al., 1999; Bittner et al., 2000; Seftor et al., 2002). Diese Zellen zeigen in-vitro das Phänomen der vaskulären Mimikry und exprimieren in einigen Fällen Endothelzell-Marker, wie VE-Cadherin. Tie-1-Knockout-Mäuse sterben zwischen dem Embryonaltag 13,5 und 14,5 infolge schwerwiegender Ödeme, Blutungen und gestörter Integrität der Mikrogefäße (Puri et al., 1995; Sato et al., 1995).

Vergleicht man Id1- und Tie-1-Immunoblot (Abb. 3.17 und 3.18), so ist eine auffällige Korrelation zwischen der Expression beider Gene festzustellen. Das Tie-1-Gen lässt sich, ebenso wie das Id1-Gen, in den parental Brusttumorzellen nicht durch TGF- $\beta$ 1 induzieren. Zu einer deutlichen, TGF- $\beta$ 1-vermittelten Aktivierung des Tie-1-Promotors kommt es nur dann, wenn die Brusttumorzellen ein hohes L-Endoglin-Expressionsniveau aufweisen. Bei Stimulation des L-End-3-Klons mit unterschiedlichen TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen zeigt auch die Tie-1-Expression ein glockenförmiges Ansprechverhalten. Aufgrund der übereinstimmenden Aktivierung

**a****b**

**Abb. 3.18** Dosisabhängigkeit der Tie-1-Induktion in parental MDA-MB-231-Brusttumorzellen, sowie dem Klon L-End-3 (6-stündige Stimulation mit unterschiedlichen TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen; Western-Blot). Bei den L-End-3 Zellen handelt es sich um stabil mit dem Vektor pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoL transfizierte Parental-Zellen. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden dieselben Zelllysate eingesetzt, die schon im Western-Blot auf Id1 Verwendung fanden. Das verwendete Trenngel wies eine Gesamtkonzentration an Acrylamid/Bis von 10% (w/v) auf. Zum Nachweis der Proteine dienten polyklonale Kaninchen-Antikörper, welche in einer Konzentration von 2 $\mu$ g/ml (Anti-Tie-1, Verdünnung 1:100) bzw. 0,8 $\mu$ g/ml (Anti-GAPDH, Verdünnung 1:250) eingesetzt wurden. Die Immunoblots gegen Tie-1 (a) und GAPDH (hier aus Platzgründen nicht dargestellt) wurden mit einem Scanner eingelese und mit Hilfe der Software PCBAS densitometrisch ausgewertet (b). Die Intensitäten der Tie-1-Banden wurden zunächst auf die jeweilige GAPDH-Auftragskontrolle, dann auf die unstimulierte Kontrolle normalisiert (Werte für die unstimulierten Zellen wurden gleich eins gesetzt).

beider Gene im Rahmen der durchgeführten TGF- $\beta$ 1-Stimulationsexperimente, ist davon auszugehen, dass es sich bei Tie-1 ebenfalls um ein TGF- $\beta$ /ALK-1-reguliertes Gen handelt.

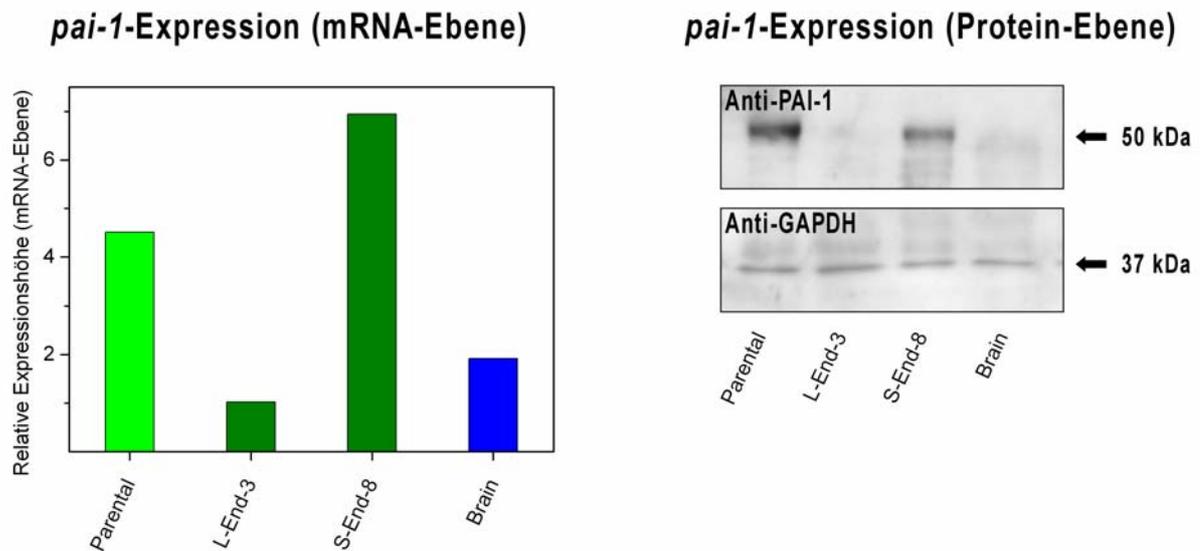
### 3.5.2 Einfluss des Endoglin-Proteins auf die Expression von Zielgenen des TGF- $\beta$ /ALK-5-Signaltransduktionswegs

Da der Rezeptor Endoglin die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Induktion von Zielgenen des TGF- $\beta$ /ALK-1 in MDA-MB-231-Brusttumorzellen förderte, sollte im Folgenden geklärt werden, welchen Einfluss das Protein auf den TGF- $\beta$ /ALK-5-Signaltransduktionsweg ausübt. Als Beispiel für ein ALK-5-reguliertes Gen wurde *pai-1* (*plasminogen-aktivator-inhibitor-1*) gewählt. Beim Genprodukt handelt es sich um ein Plasma- und Extrazellulär-Matrix (ECM)-Protein, das zur Familie der Serinprotease-Inhibitoren gehört.

Die physiologische Funktion des Proteins besteht hauptsächlich in der Inhibition der Plasminogen Aktivatoren (t-PA, Tissue-type Plasminogen Activator und u-PA, Urokinase-type Plasminogen Activator). Es hemmt die Fibrinolyse und nimmt eine zentrale, regulatorische Funktion in der Ausbildung stabiler Blutgerinnsel ein. Im Blutplasma wird es durch Bindung an Vitronectin in seiner aktiven Form gehalten (Declerck et al., 1988). Die PAI-1-Expression spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellmigration (PAI-1 hemmt die Integrin und Vitronectin-vermittelte Zellmigration; Kohler und Grant, 2000), Tumormetastasierung (Kortlever und Bernards, 2006) und Angiogenese.

Die Kultivierung der Brusttumorzellen erfolgte, wie bereits beschrieben, für 48 Stunden unter serumfreien Bedingungen. Nach einer Stimulation für 6 Stunden in Anwesenheit von 5ng/ml TGF- $\beta$ 1 wurde aus den entsprechenden Zellen mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in einer real-time-RT-PCR eingesetzt. Parallel erfolgte eine Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließendem Immunoblot. Hierfür wurden Zellüberstände entnommen und 10-fach aufkonzentriert, wobei eine Membran aus regenerierter Zellulose (Nominal Molecular Weight Limit, NMWL:10000, Amicon® Millipore Corporation, Bedford, USA) zum Einsatz kam. Das Konzentrat wurde in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (10%iges Gel) aufgetrennt. Beim PAI-1-Nachweis kam ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper zum Einsatz (Konzentration: 1 $\mu$ g/ml; Verdünnung: 1:200). Gebundener Sekundärantikörper wurde über dessen Peroxidase-Aktivität mittels ECL-Chemilumineszenz-Systems detektiert.

Wie aus Abb. 3.19 hervorgeht, besitzen parentale MDA-MB-231-Brusttumorzellen in Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 (5ng/ml) die höchste *pai-1*-Expression. Kultiviert man MDA-MB-231-Zellen mit hoher L-Endoglin-Expression (L-End-3 und Brain) unter gleichen Versuchsbedingungen lässt sich *pai-1* nur auf mRNA-Ebene mit Hilfe quantitativer PCR nachweisen. Eine Überexpression von S-Endoglin in dieser Brusttumorzelllinie verbessert hingegen die Induzierbarkeit des *pai-1*-Gens durch TGF- $\beta$ 1. Zusammenfassend formuliert, hemmt L-Endoglin demnach die TGF- $\beta$ 1-bedingte Expression des TGF- $\beta$ /ALK-5-Zielgens *pai-1*, S-Endoglin übt einen gegensätzlichen Effekt aus.



**Abb. 3.19** Einfluss von Endoglin auf die Expression von *pai-1* (*plasminogen-aktivator-inhibitor-1*) in verschiedenen MDA-MB-231 Brusttumorzelllinien. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert (5ng/ml). Anschließend wurde aus den Zellen mRNA isoliert, mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und für real-time-RT-PCRs verwendet. Für den Western-Blot-basierten Nachweis des PAI-1-Proteins mussten die Zellüberstände etwa 10-fach, mittels Ultrafiltration (Filtermaterial: Regenerierte Zellulose, Molecular weight cutoff 10000, Amicon® Millipore), aufkonzentriert werden. Die im Überstand befindlichen Proteine wurden, entsprechend ihrer Größe, in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (400V, 340mA) aufgetrennt, wobei das verwendete Trenngel eine Gesamtkonzentration an Acrylamid/Bis von 10% (w/v) aufwies. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion von PAI-1 mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers (1  $\mu$ g/ml, Verdünnung 1:200) und des ECL-Chemilumineszenz-Systems. Aus beiden Experimenten ist ersichtlich, dass die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Induktion des *pai-1*-Gens in MDA-MB-231-Zellen mit hoher L-Endoglin-Expression deutlich reduziert ist.

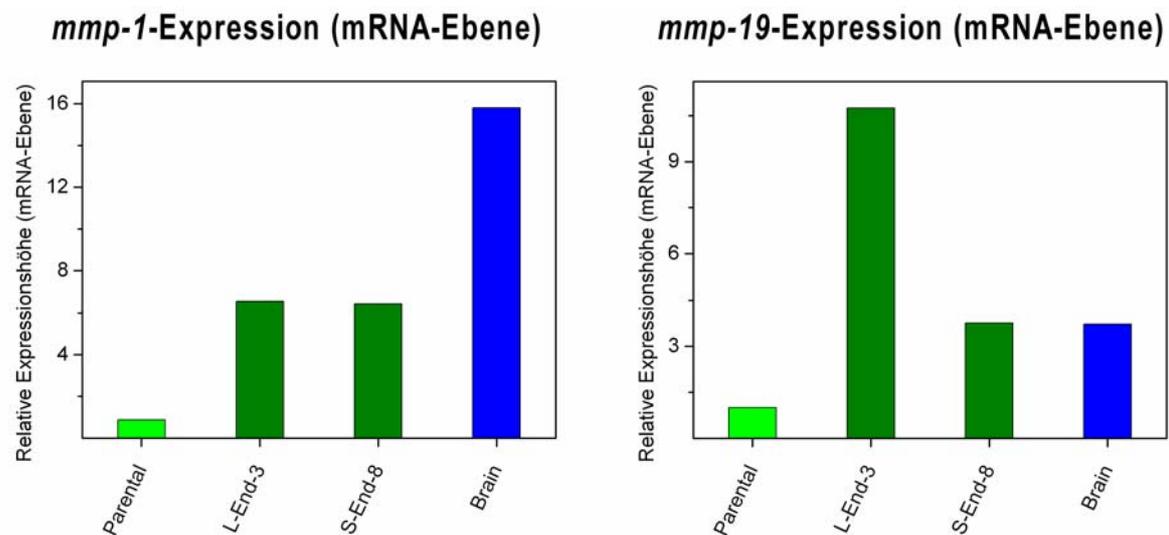
### 3.5.3 Endoglin-modulierte Expression von Matrix-Metalloproteinasen

Die Zelllinien MDA-MB-231-Parental, -L-End-3, -S-End-8 und -Brain wurden unter Standardbedingungen (s.o.) kultiviert und mittels 5ng/ml TGF- $\beta$ 1 stimuliert (6h). Die mRNA wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben und in quantitativen Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzt. Hierbei wurde das Expressionsniveau der Matrix-Metalloproteinasen MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-14 und MMP-19 bestimmt. Beim Vergleich der vier Zelllinien zeigten sich nur im Fall von MMP-1 und MMP-19 signifikante Unterschiede.

Die Expression der Matrix-Metalloproteinase MMP-1 stieg infolge der Endoglin-Überexpression etwa um den Faktor 7. Da das MMP-1-Expressionsniveau in MDA-MB-231-Brain-Zellen 16-fach höher ist, als in Zellen der Ursprungszelllinie MDA-MB-231-Parental, lässt sich die hohe MMP-1-Expression des hirnmastasierenden Subklons nur zum Teil auf einen Endoglin-abhängigen Mechanismus zurückführen.

Die Matrix-Metalloproteinase 19 wurde erst kürzlich identifiziert (Pendas et al., 1997), wobei die Charakterisierung der Promotorregion des entsprechenden *mmp19*-Gens weiterhin aussteht. Aus diesem Grund bleibt die auffällige, L-Endoglin-assoziierte Steigerung der MMP19-mRNA-Konzentration (Faktor 10,5) vorerst unklar. Die Expressionshöhe der Metalloproteinase 19 unterscheidet sich in hirnmastasierenden und parental MDA-MB-231-Zellen weitaus weniger (Abb. 3.20), was

darauf hindeutet, dass MDA-MB-231-Brain-Zellen weitere, Endoglin-unabhängige genetische Veränderungen aufweisen.



**Abb. 3.20** Expression der Matrix-Metalloproteinasen MMP-1 und MMP-19. Zellen der MDA-MB-231-Linien Parental, L-End-3, S-End-8 und Brain wurden für 6 Stunden mittels TGF- $\beta$ 1 (5ng/ml) stimuliert. Bei der Analyse des Expressionsniveaus einiger Matrix-Metalloproteinasen (siehe Text) mit Hilfe der Real-time-RT-PCR zeigten sich nur im Fall der Matrix-Metalloproteinasen MMP-1 und MMP-19 signifikante Unterschiede.

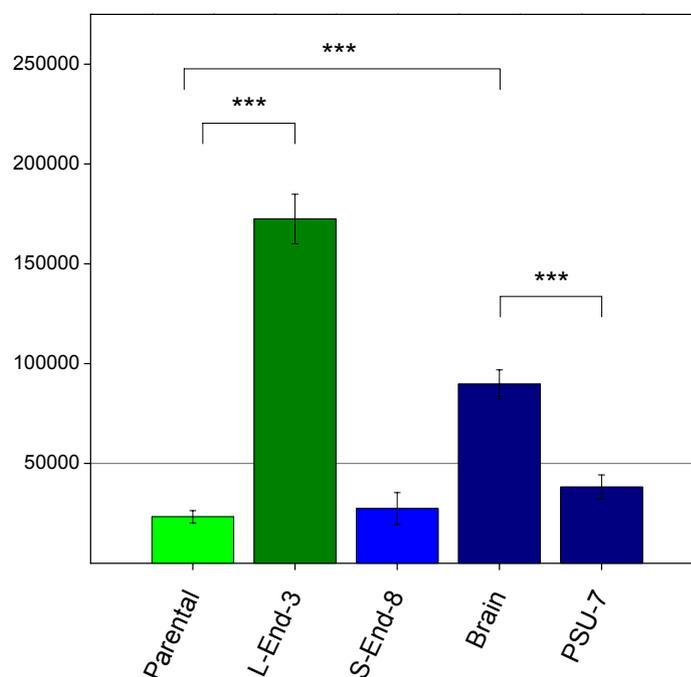
### 3.6 Proliferationsverhalten der verschiedenen MDA-MB-231-Zelllinien unter serumfreien Bedingungen

Ebenso wie die Invasivität ist auch die deregulierte Proliferation ein wichtiges Merkmal von Tumorzellen. Besonders diese beiden Eigenschaften führen letztlich zu infiltrativem Wachstum in gesundes Gewebe und Metastasierung der Tumorzellen. Da in Abschnitt 3.5.1.1 und 3.5.1.2 ein Einfluss von Endoglin auf die Expression des *Id1*-Gens gezeigt werden konnte, und Id-Proteine als positive Regulatoren der Zellproliferation agieren (Id1 inhibiert beispielsweise die DNA-Bindung von Ets1 und Ets2, was zu einer verminderten Expression des CDK-Inhibitors p16<sup>INK4a</sup> führt; Ohtani et al., 2001), sollte im folgenden ein potentieller Einfluss von Endoglin auf das Proliferationsverhalten der MDA-MB-231-Brusttumorzellen untersucht werden.

Hierzu wurden 50000 Zellen der jeweiligen MDA-MB-231-Zelllinie in 35mm Zellkulturschalen (TPP) ausgesät und für 8 Stunden bei 37°C (5% CO<sub>2</sub>) in FKS-haltigem (10%) DMEM-Medium inkubiert. Nach dieser Etablierungsphase folgte eine Überprüfung der Anzahl ausgesäter Zellen mit Hilfe des CyQuant Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, USA). Hierbei stellte sich heraus, dass jeweils gleiche Zellzahlen ausgesät wurden und die Zellen bis zu diesem Zeitpunkt –wie zu erwarten war– noch nicht erkennbar proliferierten. Die eigentlichen Versuchsansätze wurden nun für drei Tage in serumfreiem Medium kultiviert. Kulturüberstände wurden täglich durch frisches, serumfreies Medium ersetzt. Anschließend wurde das Nährmedium abgesaugt und die Kulturschalen samt Zellrasen bei -70°C eingefroren.

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte über den DNA-Gehalt mittels CyQuant Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes).

Wie aus der Abb. 3.21 hervorgeht, starb während der dreitägigen serumfreien Kultivierung ein großer Teil der parentalen Zellpopulation ab, die Zellzahlen sanken auf etwa 50% des Anfangswertes (durchschnittlich von 50000 auf 23000). Die L-End-3-Zellen, in denen L-Endoglin künstlich überexprimiert wird, proliferierten hingegen selbst in Abwesenheit von Serum deutlich. Nach drei Tagen befanden sich in den 35mm Kulturschalen im Mittel 172000 L-End-3-Zellen, diese Zellpopulationen haben sich also mehr als verdreifacht (Faktor 3,44). Der Unterschied zwischen der parentalen Zelllinie und dem Klon L-End-3 war statistisch hoch signifikant  $p < 0,001$ .



**Abb. 3.21 Proliferationsverhalten der verschiedenen MDA-MB-231-Zelllinien unter serumfreien Bedingungen.** Nach vorheriger Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer, wurden jeweils 50000 Zellen in 35mm Kulturschalen ausgesät. Damit die Zellen an die Plastikböden der Kulturschalen adhären konnten, wurden sie für 8 Stunden in FKS-haltigem Nährmedium kultiviert. Die Anzahl ausgesäter Zellen wurde in parallel pipettierten Ansätzen mit Hilfe des CyQuant Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, USA) kontrolliert. Hierbei zeigte sich, dass jede Kulturschale in der Tat 50000 Zellen aufwies. Anschließend erfolgte eine dreitägige Inkubation der Zellen unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigte Atmosphäre, täglicher Mediumwechsel), allerdings in Abwesenheit von FKS. Die Zellzahlen wurden nun wiederum mittels CyQuant-Test ermittelt. Unter serumfreien Bedingungen proliferierten lediglich MDA-MB-231-Zelllinien mit hoher L-Endoglin-Expression (MDA-MB-231-Brain und L-End-3). Der Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen den Klonen und den jeweiligen Ausgangszellen war statistisch hoch signifikant  $***p < 0,001$ . Zelllinien mit geringer Endoglin-Synthese oder hoher S-Endoglin-Expression nehmen hingegen in ihrer Zellzahl ab. Endoglin ermöglicht demnach das Überleben der MDA-MB-231-Zellen unter serumfreien Bedingungen. Anzahl unabhängiger Einzelerperimente  $n =$  jeweils 15.

Wird andererseits in den MDA-MB-231-Brusttumorzellen die kurze Isoform des Endoglin-Proteins überexprimiert, so wirkt sich dies nicht positiv auf das Überleben der Zellen aus. Man erhält hier Ergebnisse, die mit denen der parentalen Zelllinie vergleichbar sind (27000 Zellen nach drei Tagen). Das S-Endoglin unterscheidet sich vom L-Endoglin lediglich in der kurzen cytosolischen Domäne, Extrazellulär- und Transmembrandomäne sind bei beiden Proteinen identisch. Bei Stimulation mit TGF- $\beta$  wird die 47 As lange cytosolische Domäne (CD) des L-Endoglins an drei Threonin-Resten phosphoryliert (Threonin<sup>640</sup>, Threonin<sup>647</sup>, Threonin<sup>654</sup>; Koleva et al., 2006). Der cytosolischen Domäne des S-Endoglins fehlt dieser Sequenzbereich (Länge der CD: 14 As).

Demnach wird das Überleben der Brusttumorzellen durch einen TGF- $\beta$ -vermittelten Signaltransduktionsweg ermöglicht, die cytosolische Domäne des L-Endoglins ist hierbei unentbehrlich. Die Vektoren, welche zur Endoglin-Überexpression verwendet wurden (pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoL und pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoS) unterscheiden sich nur im klonierten Endoglin-cDNA-Fragment. Daher dient diese Zelllinie gleichzeitig als Kontrolle: Das Überleben bzw. die gesteigerte Proliferation des L-Endoglin-Klons L-End-3 lässt sich demnach nicht auf den integrierten Vektor selbst zurückführen.

Ebenso wie der L-End-3-Klon, zeichnet sich auch die MDA-MB-231-Zelllinie Brain durch eine erhöhte Überlebensrate aus (90000 Zellen nach 3 Tagen). Das hohe Endoglin-Expressionsniveau der hirnmetastasierenden MDA-MB-231 Zellen ist allerdings nicht die Folge eines definierten Transfektionsversuchs, sondern entstand im Laufe wiederholter (6mal) sequentieller Passage der Zellen in einer Nacktmaus (Balb/c nu/nu –Stamm, vier Wochen alt) und in-vitro (Yoneda et al., 2001). Die MDA-MB-231-Parental-Zellen wurden der Maus hierbei in den linken Herzventrikel injiziert, 3 bis 4 Wochen später erfolgte die Entnahme abgesiedelter Brusttumorzellen aus dem Hirn der Mäuse. Bei Balb/c nu/nu –Mäusen handelt es sich um eine Thymus-depletierte Mangelmutante des Balb/c-Stammes, sie werden daher niemals vollständig immunkompetent. Bei dieser Vorgehensweise wurden Zellen einer parentalen Subpopulation angereichert, welche L-Endoglin überexprimieren, offensichtlich aber auch andere Veränderungen erfahren haben.

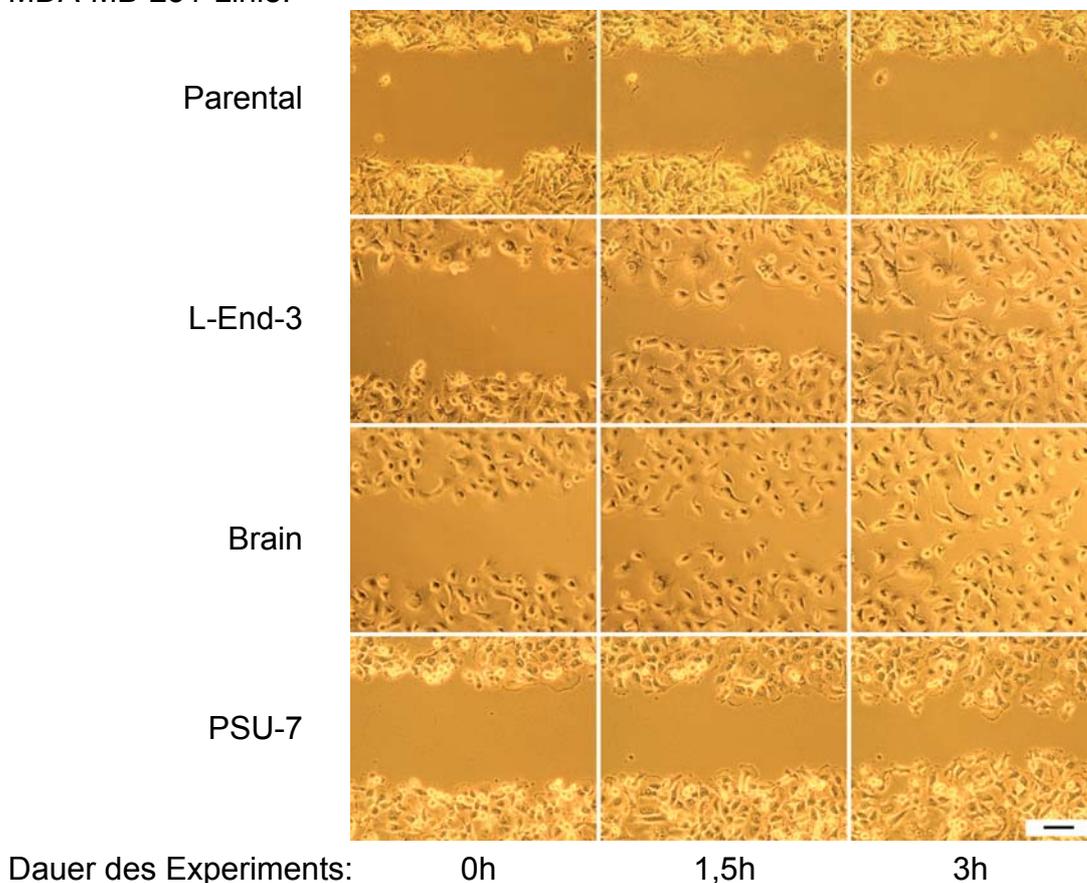
Zur weiteren Absicherung der Ergebnisse wurde in einem gegensätzlichen experimentellen Ansatz die Endoglin-Expression der Zelllinie MDA-MB-231-Brain abgesenkt. Dies erfolgte durch dauerhafte Integration des Endoglin-shRNA (small hairpin RNA) –Vektors in das Genom der Zellen. Die derart veränderte Brain-Zelllinie zeigte unter den gewählten Versuchsbedingungen keine effektive Zellvermehrung, die Zellzahl sank innerhalb der dreitägigen Versuchsdauer auf 38000 Zellen pro 35mm-Kulturschale ab. Zusammenfassend kann formuliert werden, dass eine gesteigerte Endoglin-Expression in MDA-MB-231-Brusttumorzellen das Überleben der Zellen unter serumfreien Bedingungen ermöglicht und mit höheren Proliferationsraten assoziiert ist. In einem parallelen Versuchsansatz wurden die Zelllinien durchgehend in Anwesenheit von Serum (10% FKS) kultiviert. Hierbei konnten keine Unterschiede im Proliferationsverhalten festgestellt werden.

In einem zweiten Versuch wurden anstelle von 50000 Zellen 100000 Zellen ausgesät, bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen. Die verschiedenen MDA-MB-231-Brusttumorzellen zeigten hierbei ein tendenziell identisches Proliferationsverhalten, nur waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien etwas geringer.

### 3.7 Untersuchung der Läsions-induzierten Zellmigration

Neben dem Verlust von Zelladhäsion von Tumorzellen, welcher es ihnen ermöglicht, den Zellverband zu verlassen, ist die Stimulation der Zellmotilität ein weiterer notwendiger Schritt in der Metastasierungskaskade. Um das Migrationsverhalten der Brusttumorzellen auf einer zweidimensionalen Oberfläche zu untersuchen, wurde ein so genannter Scratch-Test durchgeführt. Hierfür kultivierte man die Zellen unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) in 6-Well-Platten, bis sich ein lückenloser Zellrasen gebildet hatte. In die konfluente Schicht aus Brusttumorzellen wurde nun unter sterilen Bedingungen

MDA-MB-231-Linie:



**Abb. 3.22 Migratorisches Verhalten der Brusttumorzellen in einem zweidimensionalen System („Scratch-Test“).** In einen konfluenten Zellrasen wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze ein etwa 400µm breiter Spalt gekratzt. Anschließend wurde das Einwandern der Zellen in den zellfreien Bereich verfolgt. MDA-MB-231-Zellen mit hoher Endoglin-Expression weisen, verglichen mit parentalen Ausgangszellen, eine hohe Motilität auf. Die Besiedlung der zellfreien Fläche erfolgt hier deutlich schneller. Senkt man die Endoglin-Konzentration in der hirnmastasierenden Zelllinie MDA-MB-231-Brain, durch stabile Integration eines Endoglin-shRNA (small hairpin RNA) –Vektors in das Zellgenom (Klon: PSU-7), so wird die Migration gehemmt. Der Balken entspricht einer Länge von 100µm. Versuchsbedingungen: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>; 10% FKS; TGF-β1-Konzentration 5ng/ml; Anzahl unabhängiger Einzelexperimente: n = 2.

**Tabelle 3.4** Relative Migrationsgeschwindigkeit der MDA-MB-231-Zelllinien im Scratch-Test. Es wurde die Geschwindigkeit bestimmt, mit der die Zellen auf eine unbesiedelte (mechanisch von Zellen befreite) Fläche einwanderten.

MDA-MB-231-Zelllinie	Relative Migrationsgeschwindigkeit
Parental	1,0
L-End-3	7,2
Brain	4,2
PSU-7	3,2

mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze eine Läsion definierter Größe gesetzt (Spaltbreite etwa 400µm). Die Kulturplatten wurden jetzt unter ein Axiovert 35M-Mikroskop mit Zellkulturkammer und heizbarem Objektisch (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, Luftbefeuchtung) gelegt, so dass das Auswandern von Zellen aus dem intakten Zellverband in den zellfreien Spalt verfolgt werden konnte. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer digitalen Spiegelreflexkamera (Canon EOS 350D, Software: Canon ZoomBrowser Ex, Aufnahmezeit: alle 90 Sekunden). Das zellfreie Areal wurde unter Verwendung der Software Corel Paint Shop Pro X (Version 10.01) markiert, der jeweilige Flächeninhalt wurde dann mit der Software analySIS Pro 3.1 (Soft Imaging System GmbH, Berlin) bestimmt (siehe Tabelle 3.4).

Die parentalen MDA-MB-231-Zellen wiesen im durchgeführten Test die geringste Motilität auf, die zellfreie Fläche wurde innerhalb der dreistündigen Versuchsdauer nur geringfügig besiedelt (siehe Abb. 3.22). In Gegensatz hierzu zeigten beide MDA-MB-231-Zelllinien mit hoher Endoglin-Expression einen Phänotyp mit deutlich gesteigerter Migration (siehe Tabelle 3.4). Die Migrationsgeschwindigkeit dieser Zellen scheint besonders in der Anfangsphase sehr hoch zu sein. Senkt man die Endoglin-Expression der hirnmastasierenden MDA-MB-231-Zellen, wie im Beispiel der Zelllinie PSU-7 geschehen, ist dies mit einer Abnahme der Motilität verbunden.

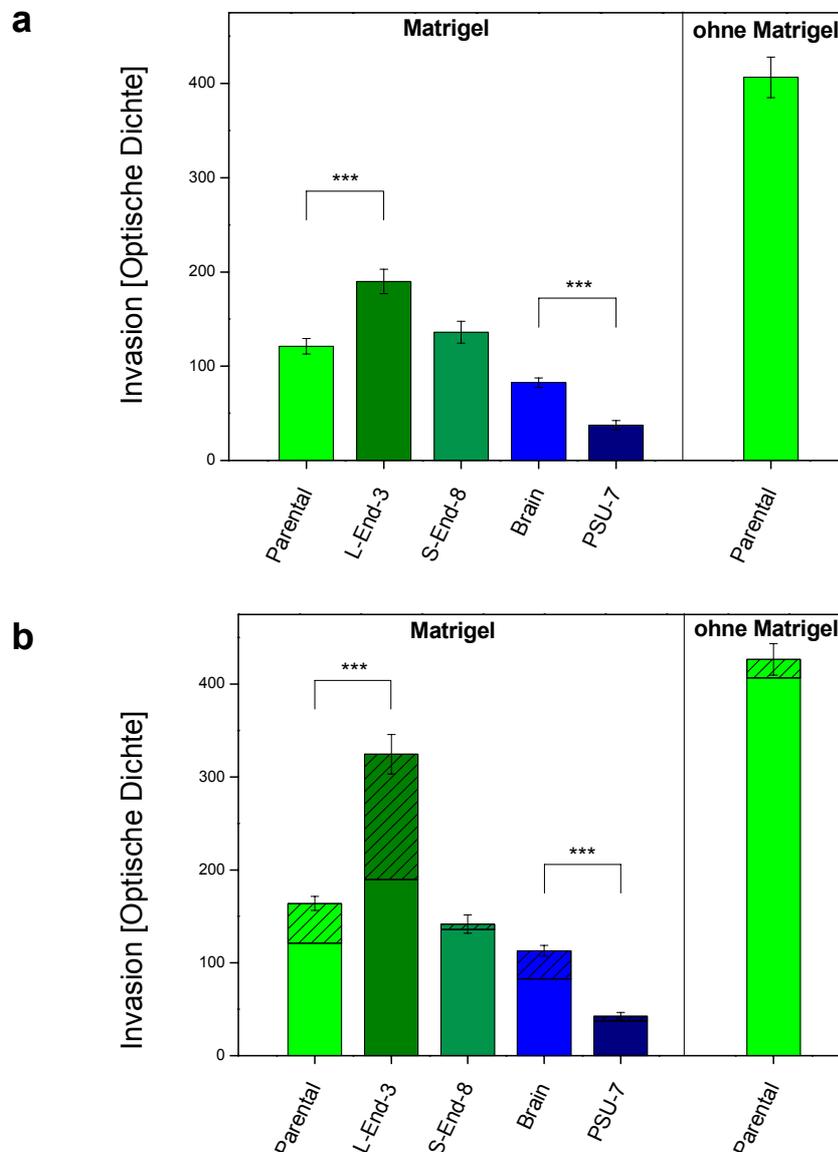
Da der Scratch-Test nicht zwischen reiner Migration und solcher mit zusätzlicher Zellproliferation differenzieren kann, wird der Test oft in Gegenwart von Inhibitoren des Zellwachstums durchgeführt. Im vorliegenden Experiment wurde hierauf allerdings aufgrund der hohen Motilität der Zellen und der damit verbundenen kurzen Versuchsdauer verzichtet. Bei Durchsicht der aufgenommenen Bildsequenzen wurde dementsprechend –wie zu erwarten war– auch keine Zellteilung beobachtet.

## 3.8 Invasivität der verschiedenen MDA-MB-231-Zelllinien

### 3.8.1 Bestimmung der in-vitro Invasivität mittels Mikrochemotaxis-Kammer

Da sich im „Scratch“-Test kein Konzentrationsgradient des Stimulans erhalten lässt, kann mit Hilfe dieses Tests auch keine echte Chemotaxis, sondern lediglich eine Chemokinese, nachgewiesen werden. Um die gezielte Migration von Zellen in Richtung eines chemotaktischen Reizes nachzuweisen, setzt man häufig die Mikrochemotaxis-Kammer („Boyden-Kammer“) ein. Diese besteht aus zwei Kompartimenten, welche durch eine Membran getrennt werden. Im vorliegenden Fall wurde

eine, in der Regel Matrigel-beschichtete (etwa  $100\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , auf Oberseite von Membran aufgetragen), Polycarbonat-Membran mit einem Porendurchmesser von  $5\mu\text{m}$  verwendet (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA). In das obere Kompartiment wurden die



**Abb. 3.23** Invasives Verhalten unstimulierter und TGF- $\beta$ 1-stimulierter MDA-MB-231-Zelllinien und -Klone in der Mikrochemotaxis-Kammer. Die Brusttumorzellen (jeweils 100000 Zellen /50 $\mu$ l Medium) wurden in die Vertiefungen des oberen Kompartiments pipettiert. Die unteren Vertiefungen wurden mit TGF- $\beta$ 1-freiem oder -haltigem Medium befüllt. Schraffierte Bereiche in geben die Verhältnisse bei Stimulation mit 5ng/ml TGF- $\beta$ 1 wieder. Die verwendete Polycarbonat-Membranen (Porendurchmesser:  $5\mu\text{m}$ ) wurde in der Regel mit einer Beschichtung aus Matrigel ( $100\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) versehen. Durch die Membran gewanderte Zellen wurden auf der Unterseite mittels Hämalanlösung angefärbt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software PCBAS (Raytest GmbH, Straubenhardt). a: basale Zellinvasion, b: basale und TGF- $\beta$ 1-vermittelte Zellinvasion. Endoglin fördert sowohl die basale, als auch die TGF- $\beta$ -induzierte Invasivität der MDA-MB-231-Brusttumorzellen. Letztere ist von der cytosolischen Domäne des L-Endoglins abhängig. Signifikanz: \*\*\* $p < 0,001$ . Dauer des Experiments: 3 Stunden, Anzahl der unabhängigen Versuche:  $n =$  jeweils 15 bis 20.

zu untersuchenden Brusttumorzellen (jeweils 100000 Zellen) pipettiert, in das untere, als chemotaktisches Agens, TGF- $\beta$ 1 (5ng/ml). Im Laufe des Experiments wird ein definierter Konzentrationsgradient geschaffen, wobei die Zellen in Gebiete höherer Lockstoffkonzentration wandern. Um in das untere Kompartiment zu gelangen, müssen sie die eventuell vorhandene Matrigelbeschichtung, sowie die Poren der Membran passieren und verbleiben dann auf der Membranunterseite. Man untersucht beim Boyden-Kammer-Versuch daher keine reine Zellmigration, sondern vielmehr das invasive Verhalten der Zellen.

Nach Ablauf der dreistündigen Versuchsdauer wurde die Membran entnommen und auf der Oberseite vorsichtig von Zellen befreit. Die Zellbeladene Unterseite der Membran wurde nun mit Hilfe von Hämalaulösung (nach Mayer) angefärbt und mittels Scanner eingelesen. Die densitometrische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software PCBAS (Raytest GmbH, Straubenhardt).

Wie aus der Abbildung 3.23 hervorgeht, erhöht L-Endoglin bereits in Abwesenheit von TGF- $\beta$ 1 in signifikanter Weise ( $p < 0,001$ ) die Invasion kultivierter MDA-MB-231-Zellen durch eine Beschichtung aus Extrazellulär-Matrix-Proteinen (Matrigel) und die Poren einer Polycarbonat-Membran. Bei Brusttumorzellen mit künstlicher Überexpression der kurzen Isoform des Endoglin-Proteins (S-End-8-Zelllinie) ist das infiltrative Potential, verglichen mit dem der parentalen Zelllinie, nur geringfügig erhöht (Abb. 3.23). Überraschenderweise durchwandern von der Zelllinie MDA-MB-231-Brain etwa 60% weniger Zellen die beschichtete Membran. Reduziert man in diesen Zellen die Endoglin-Expression mit Hilfe von Endoglin-spezifischer siRNA, so verringert sich die Invasivität auf etwa die Hälfte (Klon PSU-7).

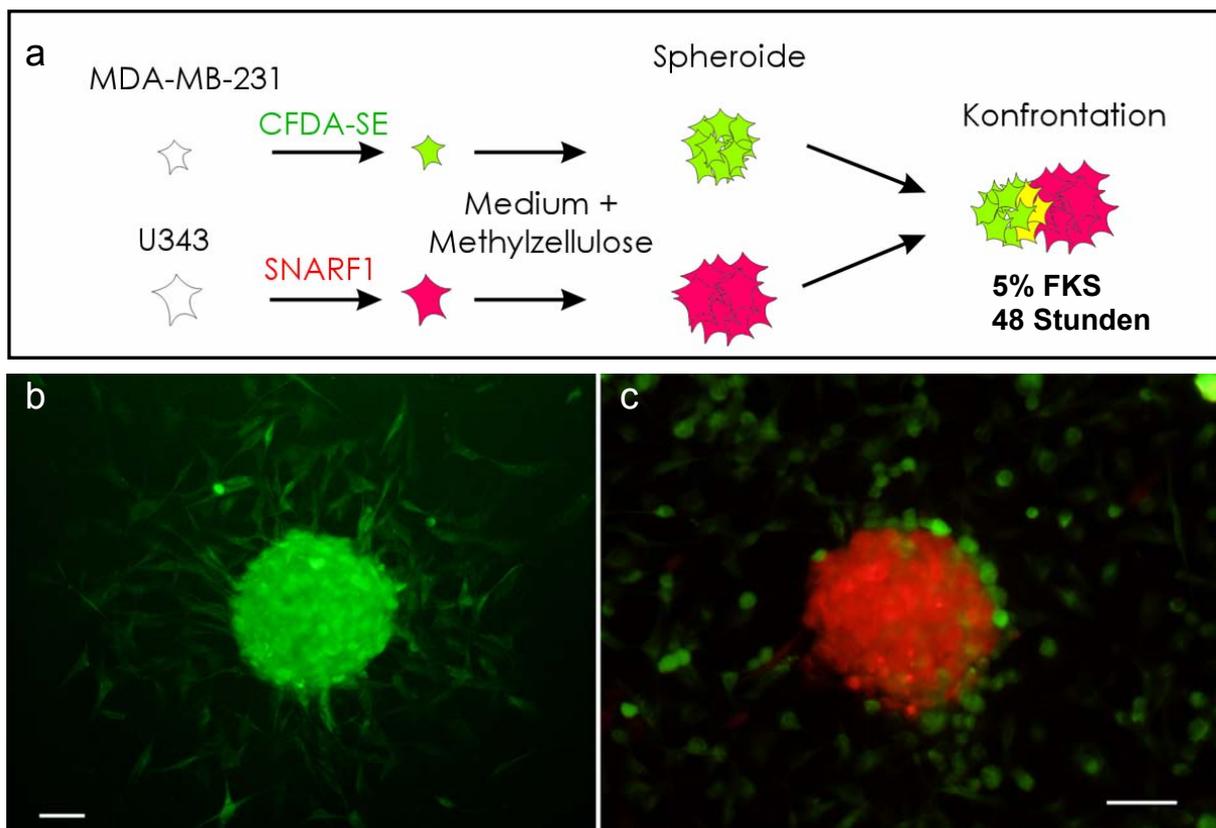
Verwendet man eine unbeschichtete Membran, so vervierfacht sich die Zahl parentaler Zellen, die auf der Unterseite angefärbt werden können. Demnach stellt die Beschichtung aus ECM-Proteinen für die Zellwanderung ein größeres Hindernis dar, als die Polycarbonat-Membran. Die Transmigration der parentalen Zellen durch die Membran lässt sich durch TGF- $\beta$ 1-Stimulation (5ng/ml) nicht signifikant erhöhen (siehe Abb. 3.23).

Bei einer Stimulierung der Brusttumorzellen mit TGF- $\beta$ 1 (5ng/ml) erhöht sich die in-vitro Invasivität der parentalen und der hirnmetastasierenden MDA-MB-231-Zellen (Parental: +35%, Brain: +37%), besonders aber die des L-Endoglin-Klons L-End-3 (+71%). Wird in den parentalen MDA-MB-231-Zellen nicht L-Endoglin, sondern S-Endoglin überexprimiert, so lässt sich die Invasivität durch Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 (5ng/ml) nicht über das basale Niveau hinaus steigern (S-End-8: +4%). Da sich der S-Endoglin-Expressionsvektor lediglich in der Endoglin-cDNA vom L-Endoglin-Expressionsvektor unterscheidet, ist hiermit zugleich der Beweis erbracht, dass nicht der integrierte Vektor per se für die erhöhte Invasivität des Klons L-End-3 verantwortlich ist, sondern ausschließlich die größere Menge an Endoglin-Protein. Eine Induktion invasiver Eigenschaften ist auch bei dem MDA-MB-231-Brain-Klon PSU-7 nur in sehr geringem Umfang möglich (PSU-7: +13%).

Vergleicht man die generierten MDA-MB-231-Klone mit ihren jeweiligen Ausgangszelllinien, so ist eine deutliche Korrelation zwischen Endoglin-Expression und Invasivität in-vitro festzustellen. Im Rahmen der TGF- $\beta$ 1-induzierten Invasion spielt die cytosolische Domäne (CD) des Endoglin-Proteins eine entscheidende Rolle. Das S-Endoglin ist mit seiner kürzeren CD (14 As anstelle von 47 As) nicht in der Lage, dass TGF- $\beta$ -Signal in eine gesteigerte Infiltration der Matrigelbeschichtung umzusetzen (siehe 3.23 b).

### 3.8.2 In-vitro Invasivität der MDA-MB-231-Zellen in einem dreidimensionalen System: Sphäroid-Aggregat-Konfrontationstest

Die MDA-MB-231-Brusttumorzelllinie Brain metastasiert im Mausmodell mit hoher Präferenz ins Hirn der Tiere (Yoneda et al., 2001) und weist im Vergleich zur parentalen Zelllinie eine signifikant erhöhte Endoglin-Konzentration auf (Abschnitt 3.3.1, Abb. 3.9). Um den potentiellen Einfluss von Endoglin auf das Metastasierungsverhalten zu untersuchen, wurde ein so genannter Sphäroid-Aggregat-Konfrontationstest durchgeführt. Dieser Test weist, im Vergleich zum Scratch-Test und Boyden-Kammer-Versuch, einen stärkeren Bezug zur in-vivo Situation der Metastasenbildung auf. Während man mittels Scratch-Test und Boyden-Kammer-Versuch nur die ungerichtete Migration, bzw. die Durchwanderung einer Membran oder extrazellulären Matrix untersucht, kann der Sphäroid-Konfrontationstest die gezielte Invasion von Zellaggregaten verschiedener Zellen aufzeigen. Da zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung keine geeignete, humane Astrozyten-Zelllinie zur Verfügung stand, diente die Glioblastomalinie U343 als in-vitro Modell zur Simulation von Hirngewebe.



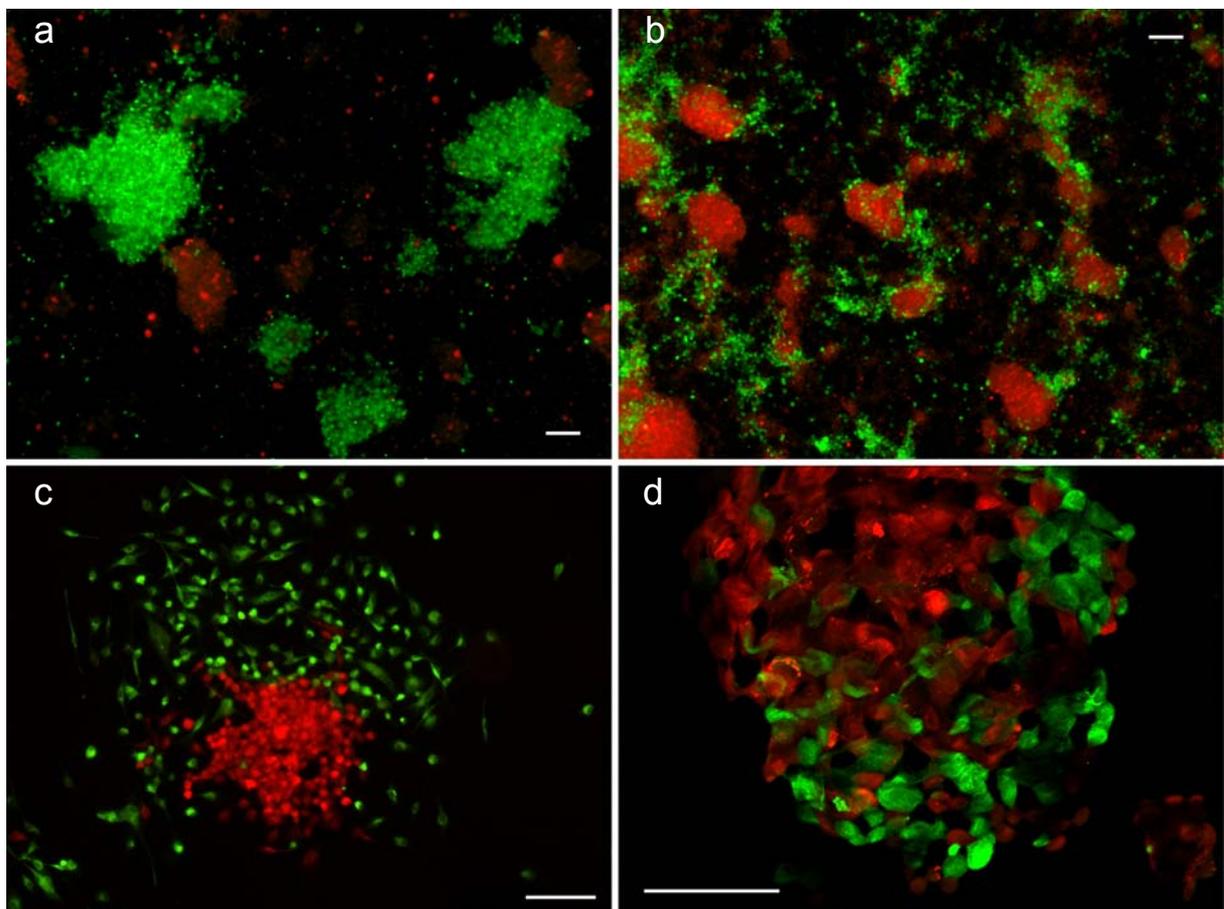
**Abb. 3.24** Herstellung von Sphäroiden aus MDA-MB-231-Zelllinien und -Klonen, sowie U343-Gliomazellen. Die Zelllinien wurden mit den Fluoreszenz-Vitalfarbstoffen CFDA-SE (Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und SNARF-1 (Seminapthorhodafluor, ebenfalls Molecular Probes) angefärbt. MDA-MB-231-Zellen wurden ausnahmslos mit Hilfe von CFDA-SE grün markiert, U343 Gliomazellen mittels SNARF-1 rot. Die Sphäroidbildung wurde durch Anwesenheit von 0,24% Methylzellulose induziert. a: Schematische Darstellung; b: MDA-MB-231 L-End-3-Sphäroid; c: U343-Sphäroid, an welches grün angefärbte MDA-MB-231-Brain-Zellen adhärirt haben. Die Konfrontation erfolgte für 48 Stunden in serumhaltigen Medium (5% FKS). Jeder Balken entspricht einer Distanz von 100µm.

### Herstellung der fluoreszenzmarkierten Sphäroide

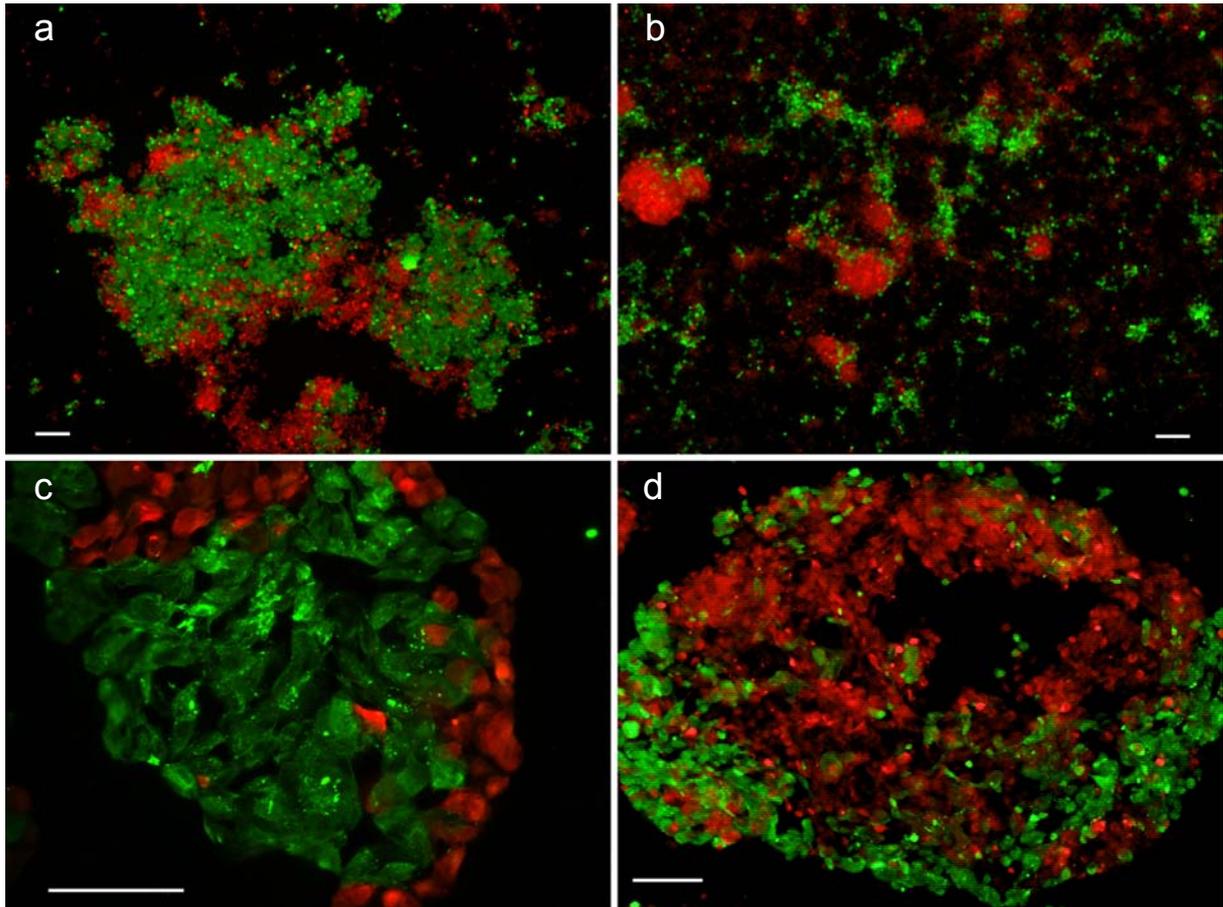
Für den Test wurden MDA-MB-231- und U343-Zellen kultiviert und separat mit Vitalfarbstoffen beladen. Die Markierung der Brusttumorzellen erfolgte mit Hilfe eines grünen Fluoreszenzfarbstoffs (CFDA-SE), die Gliomazellen wurden mittels roten Fluoreszenzfarbstoffs (SNARF-1) gekennzeichnet. In Anwesenheit von Methylzellulose lagerten sich die Zellen zu kugelförmigen Aggregaten, den Sphäroiden, zusammen. In allen durchgeführten Experimenten zeigten die MDA-MB-231-Zellen, im Vergleich zu den Gliomazellen, eine größere Tendenz, sich aus dem Zellverband zu lösen (siehe Abb. 3.24 b und c).

### Durchführung des Konfrontationstests und Ergebnisse

Die Sphäroide wurden für 48 Stunden in einer dreidimensionalen Kokultur gehalten („konfrontiert“), anschließend fixiert (Aceton-Methanol-Gemisch, 1:1) und mittels Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Carpinteria, USA) eingebettet. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Axiovert 200M



**Abb. 3.25** Invasivität der MDA-MB-231-Zelllinien Parental und Brain beim Sphäroid-Konfrontationstest. Bei den unteren Bildern handelt es sich um repräsentative Detailvergrößerungen. Die Brusttumorzellen wurden mit CFDA-SE grün angefärbt, U343 Gliomazellen mit SNARF-1 rot. Das Experiment erfolgte in Anwesenheit von 5% Serum (Dauer des Experiments: 48h). a+c: MDA-MB-231 Parental, b+d: MDA-MB-231 Brain. Parentale MDA-MB-231-Zellen weisen keine sichtbare Affinität gegenüber U343-Gliomazellen auf (a und c). Die Zellen der hirnmastasierenden MDA-MB-231-Linie Brain hingegen, kommen nach 48h nur mit U343-Zellen assoziiert vor (b) und infiltrierten viele der U343-Sphäroide in erheblichem Ausmaß (d). Jeder Balken entspricht einer Distanz von 100µm.



**Abb. 3.26** Invasivität der MDA-MB-231-Klone S-End-8 und L-End-3 beim Sphäroid-Konfrontationstest. Bei den unteren Bildern handelt es sich um repräsentative Detailvergrößerungen. Die Brusttumorzellen wurden mit CFDA-SE grün angefärbt, U343 Gliomazellen mit SNARF-1 rot. Jedes Sphäroid setzte sich aus annähernd 50000 Zellen zusammen. Die Kokultur beider Zelllinien erfolgte in Anwesenheit von 5% Serum für 48 Stunden. a+c: MDA-MB-231 S-End-8, b+d: MDA-MB-231 L-End-3. Jeder Balken entspricht einer Distanz von 100µm.

Mikroskops (Carl Zeiss AG, Oberkochen). Bilder wurden mit der monochromen Kamera AxioCam MRm aufgenommen und mittels AxioVision-Software verarbeitet (AxioVision Rel. 4.5, Zeiss AG, Oberkochen).

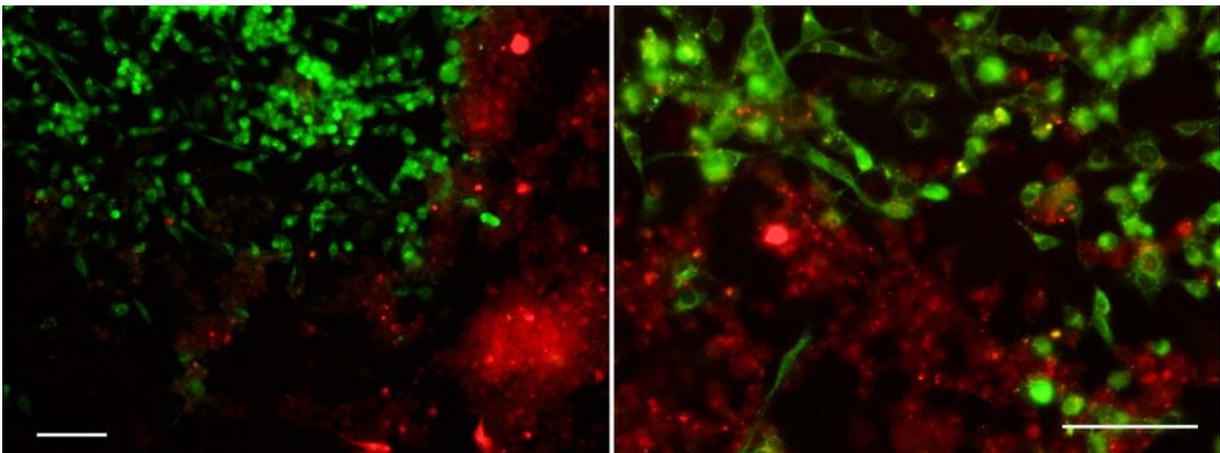
Zunächst wurden in verschiedenen Versuchsansätzen Sphäroide der MDA-MB-231-Zelllinien Parental, Brain, S-End-8 und L-End-3 mit U343-Sphäroiden kokultiviert. Die parentalen MDA-MB-231-Zellen verlassen hierbei ihren Zellverband nur in geringem Ausmaß, selbst nach 48 Stunden sind die meisten dieser Zellen noch in Sphäroid-artigen Ansammlungen organisiert (Abb. 3.25 a). Die U343-Zellen scheinen auf die MDA-MB-231-Parental-Zellen keinen erkennbaren chemotaktischen Reiz auszuüben, sowohl Zellverbände aus parentalen Zellen, als auch diese selbst, werden nicht von U343-Zellen angezogen (Abb. 3.25 a und c). Werden hingegen Sphäroide aus hirnmastasierenden MDA-MB-231-Brain- sowie U343-Zellen kokultiviert, zeigt sich ein gänzlich anderes Bild. Zweifelsohne üben die U343-Zellen eine große Anziehungskraft auf diese Brusttumorzellen aus. Nach Ablauf des Experiments kommen die MDA-MB-231-Brain-Zellen nur noch mit U343-Zellen

vergesellschaftet vor (Abb. 3.25 b). In vielen Fällen erfolgte eine starke Infiltration der U343-Sphäroide durch MDA-MB-231-Brain-Zellen (Abb. 3.25 d und 3.29).

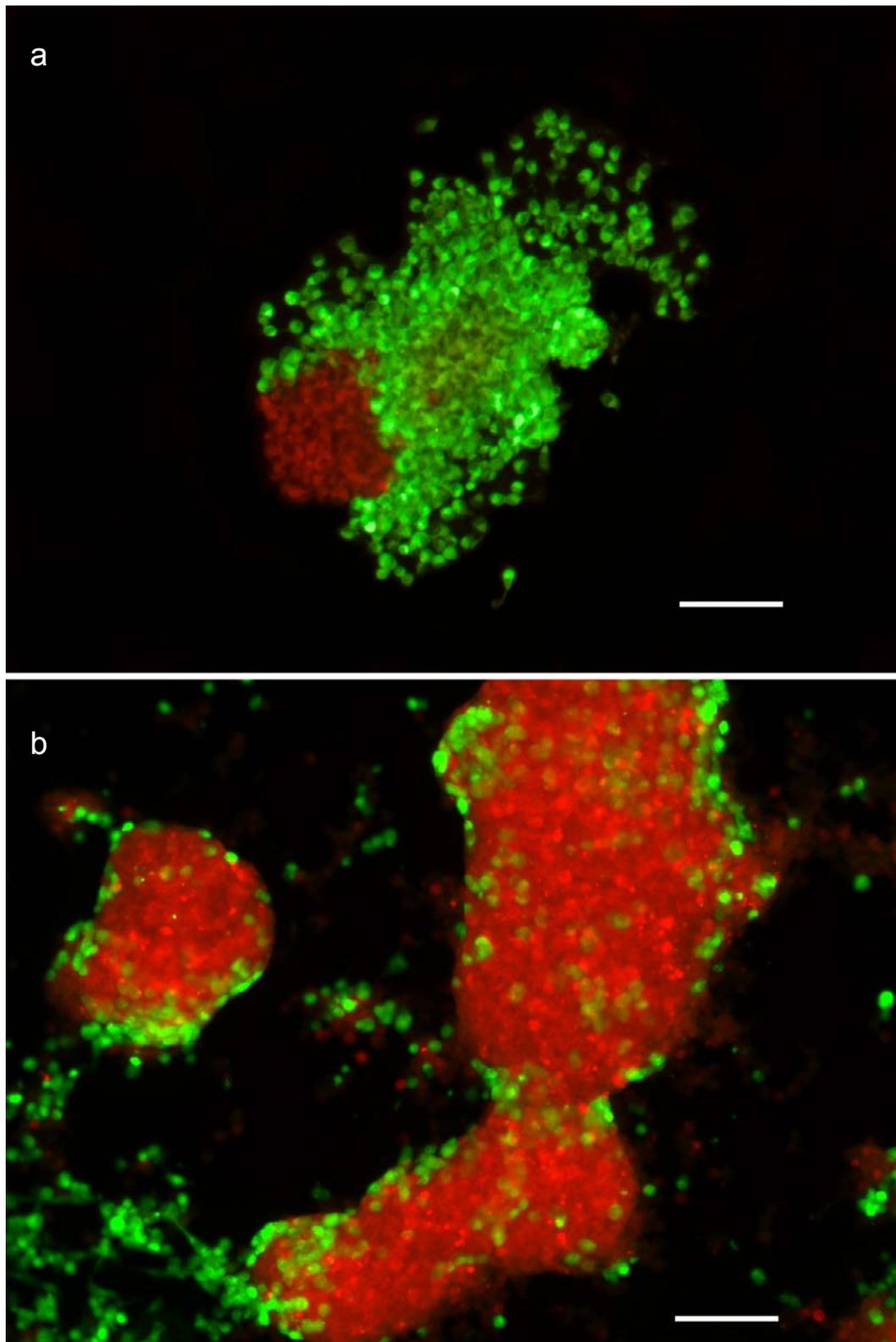
Das Verhalten von Zellen des L-Endoglin überexprimierenden Klons L-End-3 ist mit dem der MDA-MB-231-Brain-Zellen vergleichbar. Auch Aggregate der L-End-3-Zellen divergieren schnell auseinander, wobei die Brusttumorzellen wiederum sehr stark von den U343-Sphäroiden angezogen werden. Oft stellten sich die MDA-MB-231-Zellen als Saum dar, welcher die U343-Sphäroide einfasste (Abb. 3.28 b und 3.29 b).

Im Laufe des Experiments adhären die L-End-3-Zellen zunächst an die U343-Aggregate und wandern dann in den Zellverband aus Hirntumorzellen ein (Abb. 3.26 d und 3.28 b). Der invasive Charakter ist hier ebenso ausgeprägt, wie bei den hirnmetastasierenden MDA-MB-231-Brain Zellen. Führt man die Konfrontation der Sphäroide in Anwesenheit höherer Konzentrationen an Methylzellulose (etwa 0,24%) durch, so wandern die Brusttumorzellen als Zellverband auf die Gliomazell-Aggregate zu (Abb. 3.28 a). Dieses Phänomen konnte auch bei der MDA-MB-231-Brain-Zelllinie festgestellt werden, die Linien MDA-MB-231-Parental und S-End-8 zeigten es hingegen nicht.

Zellen des S-Endoglin-überexprimierenden Klons S-End-8 zeigten im Rahmen des Sphäroid-Konfrontationstests ein Verhalten, dass von dem der anderen MDA-MB-231-Zelllinien abwich. Ebenso wie die parentalen Zellen, tendierten sie zwar dazu, ihren Zellverband aufrecht zu erhalten (Abb. 3.26 a), sie waren aber zugleich imstande, sich effektiv an die Gliomazell-Aggregate anzulagern. Diese Anlagerung blieb aber nur oberflächlich und führte zu keiner Einwanderung von MDA-MB-231-Zellen in das Innere des U343-Sphäroids (etwa 10 entsprechende U343-Sphäroide untersucht, repräsentatives Beispiel: Abb. 3.26 c).



**Abb. 3.27** Der etablierte Sphäroid-Konfrontationstest: Verhalten der MDA-MB-231-L-End-3-Zellen in Anwesenheit eines neutralisierenden Anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörpers (Konzentration: 5 $\mu$ g/ml). L-End-3-Zellen wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff grün angefärbt, U343-Glioma-Zellen rot. Das Experiment erfolgte in einem Zeitraum von 48 Stunden, wobei die Zellen nach 24h frisches, ebenfalls antikörperhaltiges Kulturmedium (5% FKS) erhielten. In Anwesenheit des Anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörpers kam es weder zu einer Anlagerung von MDA-MB-231-Zellen an U343-Aggregate, noch zu einem Invasionsereignis. Jeder Balken entspricht einer Distanz von 100 $\mu$ m.



**Abb. 3.28** Invasivität des MDA-MB-231-Klons L-End-3 beim Sphäroid-Konfrontations-test (Detail). Die Brusttumorzellen wurden mit CFDA-SE grün angefärbt, U343 Gliomazellen mit SNARF-1 rot. Die verwendeten Sphäroide enthielten jeweils etwa 40000 Zellen. In Anwesenheit höherer Methylzellulose-Konzentrationen (etwa 0,24%, w/v) migrieren die Brusttumorzellen als Zellverband auf das U343-Sphäroid zu (a), weist das Kulturmedium (5% FKS) niedrigere Konzentrationen an Methylzellulose auf, so lösen sich die MDA-MB-231-Zellen schnell aus ihrem Verband und wandern dann als Einzelzellen in Richtung U343-Sphäroid (b). Dauer des Experiments: 48h. Jeder Balken entspricht einer Distanz von 100 $\mu$ m.

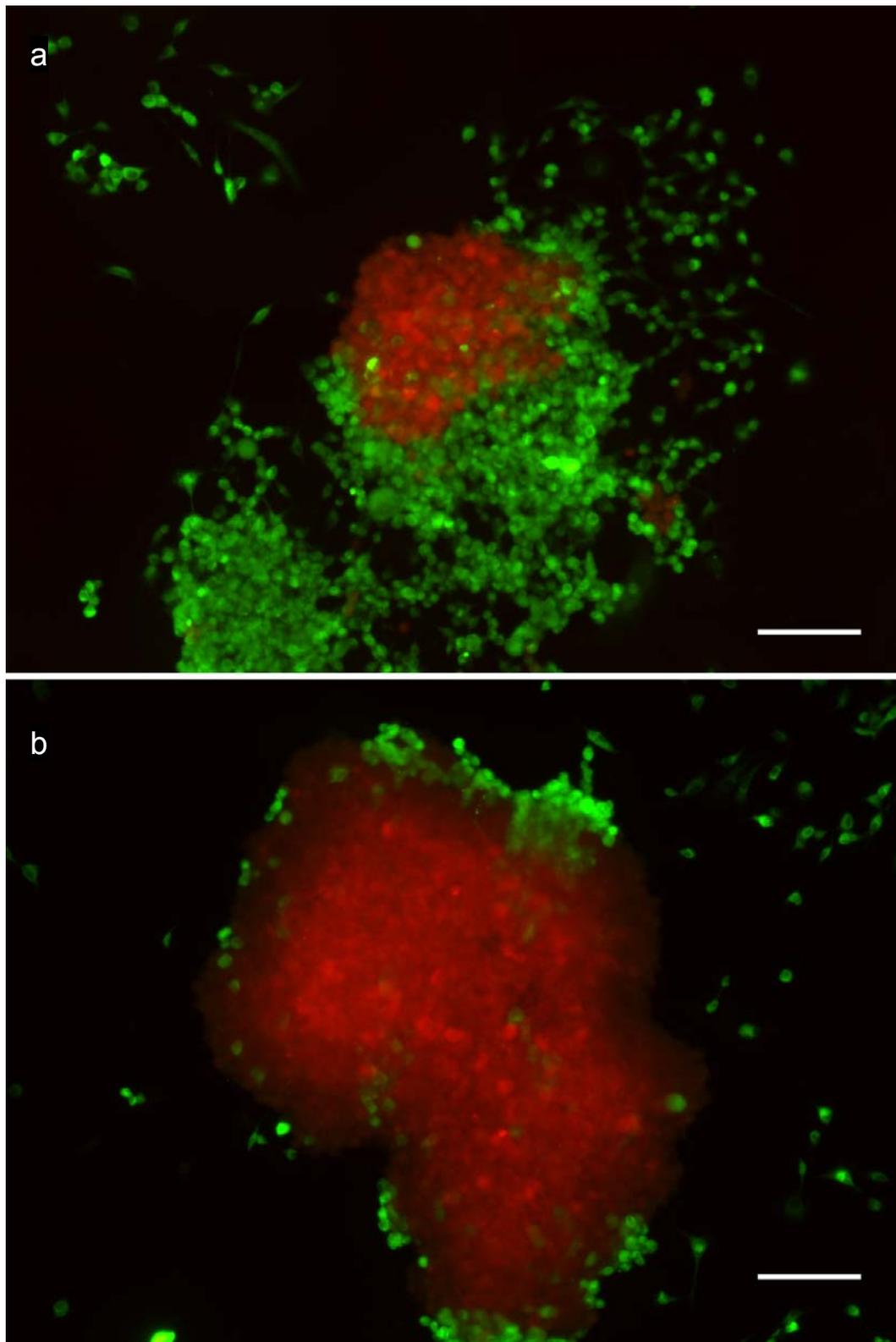


Abb. 3.29 Invasivität der MDA-MB-231-Zelllinie Brain beim Sphäroid-Konfrontationstest (Detail). Die Brusttumorzellen wurden mit CFDA-SE grün angefärbt, U433 Gliomazellen mit SNARF-1 rot. Die eingesetzten Sphäroide bestanden aus etwa 40000 Zellen. Bei höheren Konzentrationen an Methylzellulose (etwa 0,24%, w/v) migrieren die Brusttumorzellen als Zellverband auf das U433-Sphäroid zu (a). Weist das Kulturmedium wenig Methylzellulose auf, lösen sich die MDA-MB-231-Zellen schnell aus ihrem Verband und wandern dann als Einzelzellen in Richtung U433-Sphäroid (b). Das Experiment wurde in Anwesenheit von 5% Serum durchgeführt. Dauer des Experiments: 48h. Jeder Balken repräsentiert eine Distanz von 100µm.

Da die L-Endoglin-überexprimierenden Brusttumorzelllinien Brain und L-End-3 im durchgeführten Sphäroid-Konfrontationstest einen deutlich invasiveren Phänotyp zeigten, sollte im folgenden der Einfluss des Endoglin-Liganden TGF- $\beta$ 1 auf den invasiven Charakter der L-End-3-Zellen untersucht werden. Hierbei kam ein neutralisierender Anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörper (5 $\mu$ g/ml, Verdünnung 1:200) zum Einsatz (Anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörper in 0,01M PBS, pH7, frei von Konservierungsstoffen; abcam, Artikel-Nr. ab647). Wie aus der Abb. 3.27 hervorgeht, verlieren die U343-Zellen in Anwesenheit des Antikörpers ihren chemotaktischen Reiz, sowohl Anlagerung als auch Einwanderung von Brusttumorzellen bleibt aus.

Endoglin spielt demnach eine entscheidende Rolle bei invasiven Prozessen der Brusttumorzelllinie MDA-MB-231. Offensichtlich ist ein TGF- $\beta$ -vermittelter Signaltransduktionsweg an diesen Prozessen beteiligt, da es in Anwesenheit des neutralisierenden Antikörpers zu keiner Infiltration von U343-Sphäroide kommt.

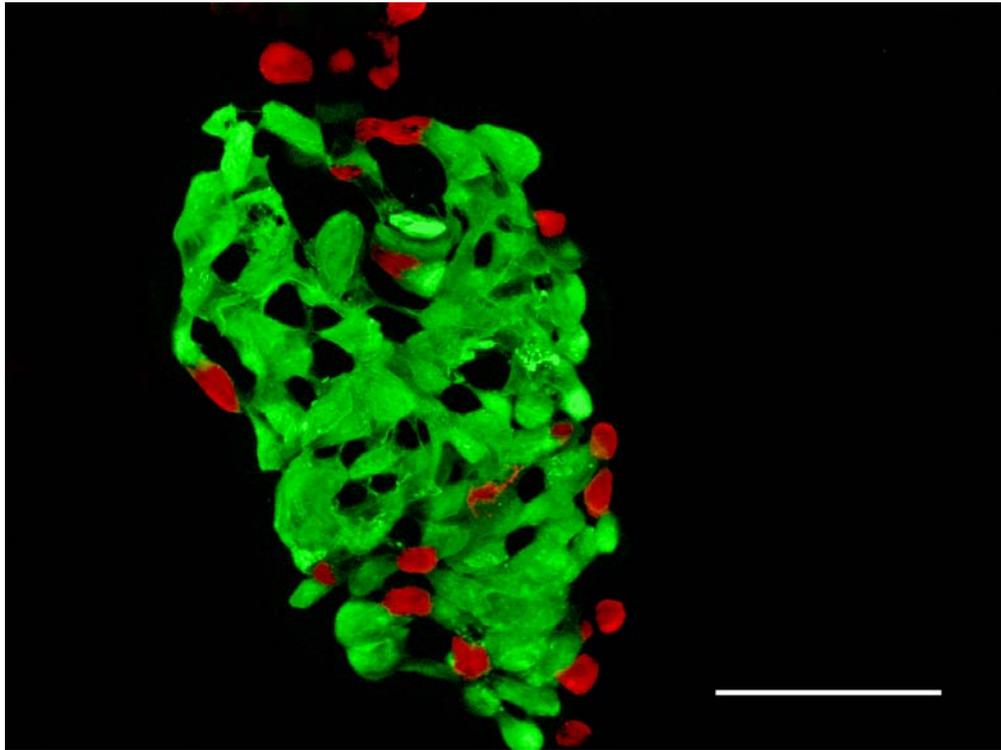
## 3.9 Einfluss von Endoglin auf vaskulogene Mimikry (VM) und die Ausbildung tubulärer Strukturen

### 3.9.1 Matrigel-induzierte Bildung von VM-Strukturen

Zellen der MDA-MB-231-Linien Brain und L-End-3 zeigten im Rahmen des Sphäroid-Konfrontationstests häufig einen auffälligen Phänotyp, sofern sie sich in unmittelbarer Nähe eines U343-Aggregates befanden (Abb. 3.30). Die netzwerkartige Organisation der Zellen erinnert an den Phänotyp der vaskulogene Mimikry (VM), der sich in einem dreidimensionalen Wachstum nicht-endothelialer Zellen (häufig Tumorzellen) auf extrazellulären Matrices äußert. Um festzustellen, in wie weit die verschiedenen MDA-MB-231-Zelllinien und -Klone zur Ausbildung von VM-Strukturen befähigt sind, wurden die Brusttumorzellen im vorliegenden Experiment auf Extrazellulär-Matrix-Proteinen (Matrigel) kultiviert.

Die verwendete Proteinfraction stammt aus einem murinen Sarkom (Engelbreth Holm-Swarm Maus Sarkom) und wird standardmäßig in Versuchen zur vaskulären Mimikry eingesetzt. Sie besteht hauptsächlich aus Laminin, Kollagen Typ IV, Heparansulfat-Proteoglykan und Entactin (Nidogen) und ist im gekühlten Zustand (4°C) flüssig. Bei Raumtemperatur polymerisiert die Proteinmischung zu einer biologisch aktiven Matrix, welche einer Basalmembran von Säugetierzellen entspricht.

Die Brusttumorzellen wurden zur besseren Visualisierung zunächst mit Hilfe des bereits weiter oben beschriebenen Vitalfarbstoffs CFDA-SE grün markiert. Die Kultur der Zellen erfolgte dann auf Matrigel-beschichteten Objektträgern. Hierzu wurden etwa 50-100  $\mu$ l kaltes Matrigel gleichmäßig auf der PDL-beschichteten Seite des Objektträgers verteilt. Die Objektträger wurden mit den entsprechenden Sphäroiden (jeweils etwa 40000 Zellen) versehen, in sterile große Petrischalen gegeben und für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte, wie im Fall des Sphäroid-Aggregat-Konfrontationstests, mittels Aceton-Methanol-Gemisch (1:1), fixierte Zellen und Zellaggregate wurden mit Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Carpinteria, USA) eingebettet. Um den bestmöglichen Kontrast zu gewährleisten, wurden die monochrom aufgenommenen Originalbilder dargestellt.



**Abb. 3.30** Erste Hinweise auf vaskulogene Mimikry. Zellen des MDA-MB-231-Klons MDA-MB-231-Klons L-End-3 (grün) zeigten während des Sphäroid-Konfrontationstests häufig einen auffälligen Phänotyp mit netzwerkartiger Zellanordnung, wenn sie sich in unmittelbarer Nähe von U343-Gliomazell-Aggregaten (rot) aufhielten. Die Zellen wurden für 48h auf Matrigel kultiviert (5% FKS, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Der Balken entspricht einer Distanz von 100µm.

Die parentalen MDA-MB-231-Zellen zeigen auf Matrigel ein Wachstum, welches dem üblichen Wachstumsverhalten in-vitro (bei Kultivierung auf Plastikböden von Zellkulturgefäßen) gleicht. Die Zellen migrieren zwar auf dem, mit Extrazellulärmatrix-Substanzen versetztem Gel, richten sich aber nicht zu geordneten Strukturen aus (Abb.3.31 a und c). Kultiviert man hingegen den L-Endoglin-überexprimierenden Klon L-End-3 unter gleichen Bedingungen, so bildet sich innerhalb von 48 Stunden im Matrigel ein Zellverband mit dreidimensionaler Organisation der Zellen (Abb. 3.31 d und 3.33). Obwohl es sich nicht um eine Gefäßbildung handelt, werden auch bei vaskulogener Mimikry Hohlräume mit einem Lumen geschaffen (Abb 3.33), die prinzipiell einem Stoffaustausch dienen können. Viele Zellen der netzwerkartigen Gebilde besitzen einen sehr langgestreckten Zelleib (Abb. 3.33 b, siehe Pfeil).

Wie aus der Abb. 3.32 deutlich wird, weist die hirnmetastasierende MDA-MB-231-Brain-Zelllinie ebenfalls das Phänomen der vaskulogenen Mimikry auf. Auch Zellen dieser Linie organisieren sich zu ringförmigen, geschlossenen Strukturen (Bildmitte) und dreidimensionalen Netzwerken (Abb. 3.32 c, rechter Rand). Zwischen dem „Gerüst aus Tumorzellen“ entsteht auf diese Weise ein System aus Hohlräumen. Charakteristisch ist die Bildung von interzellulären Verbindungen (Abb.3.33).

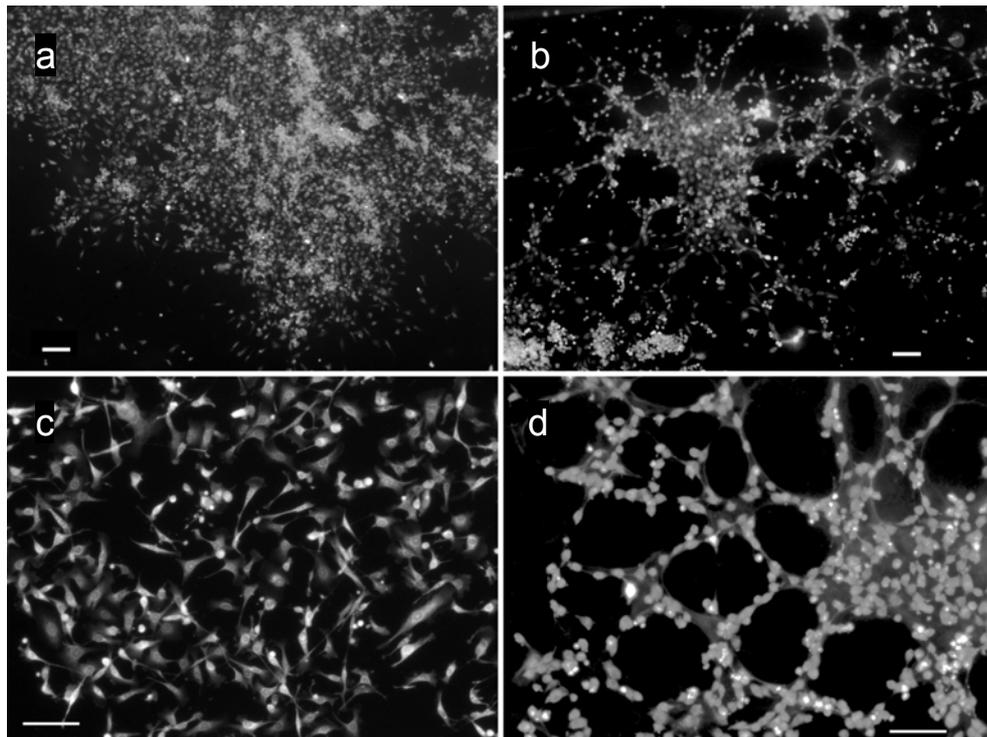


Abb. 3.31 Wachstum von MDA-MB-231-Parental und -L-End-3-Zellen auf Matrigel (5% FKS, v/v). Die parentalen Zellen (a+c) bilden bei Kultivierung für 48h auf Matrigel keine geordneten Strukturen (a+c), während der L-Endoglin-überexprimierende Klon netzwerkähnliche, schleifenförmige Strukturen ausbildet (b+d). Balken = 100 $\mu$ m.

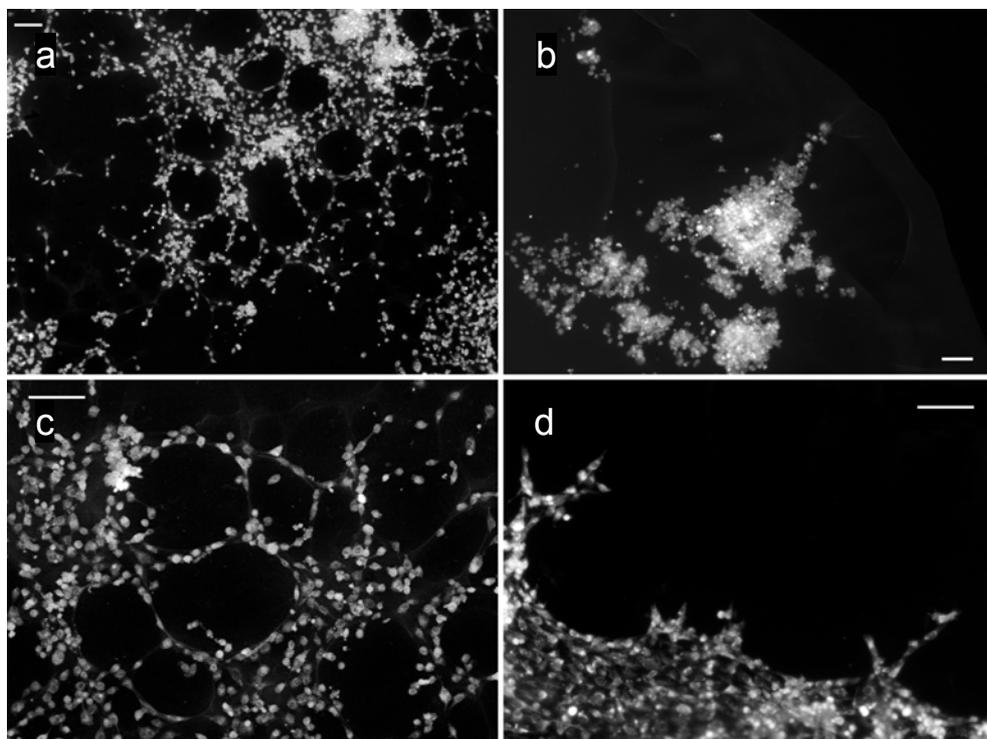
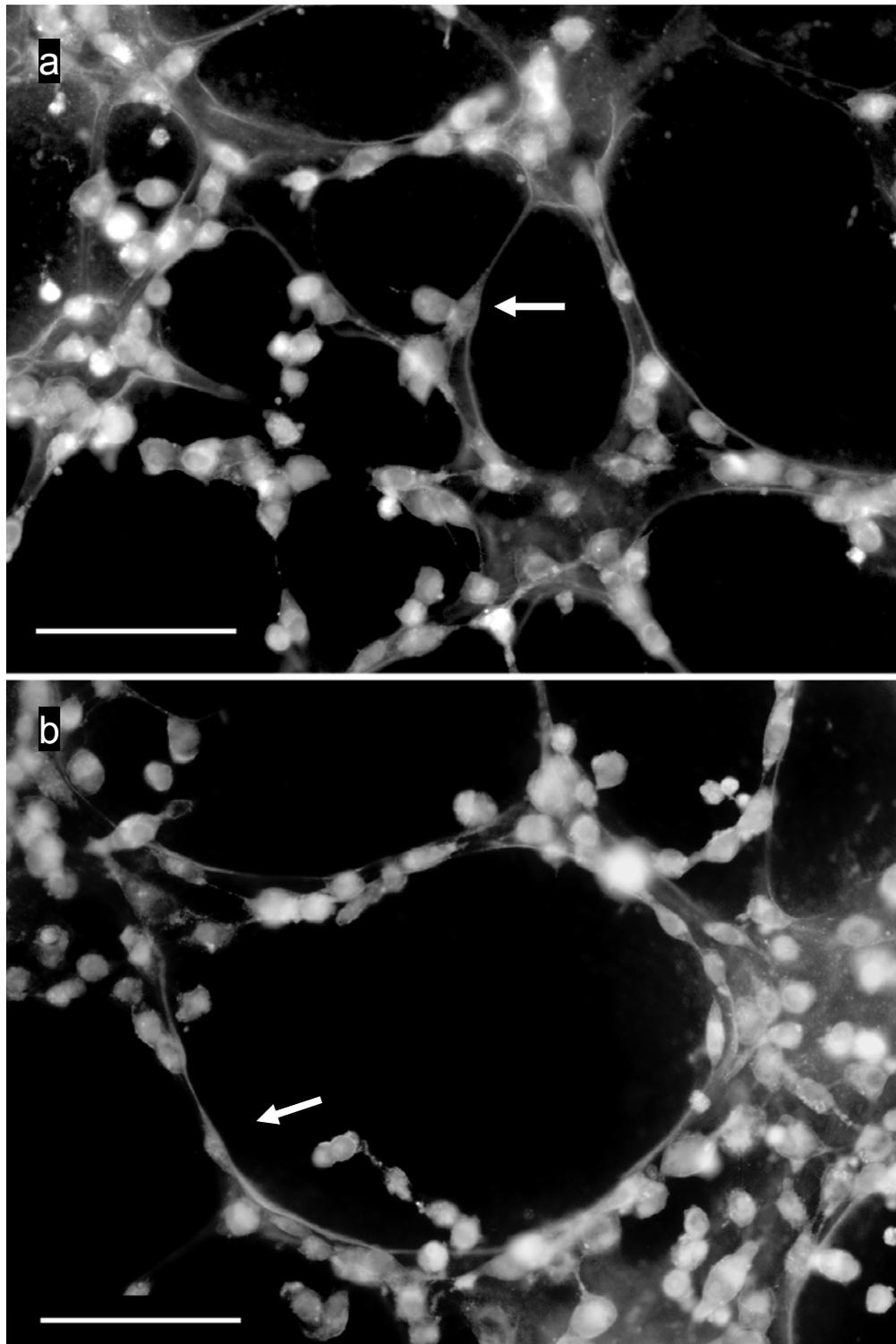
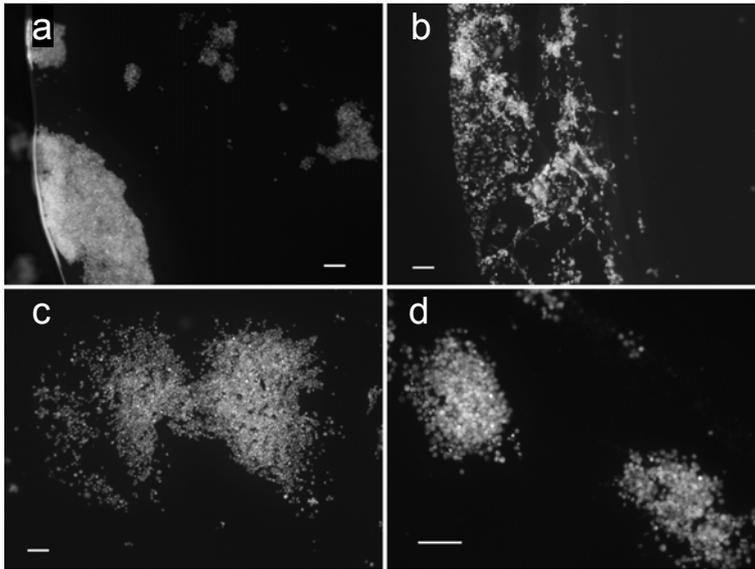


Abb. 3.32 Wachstum von MDA-MB-231-Brain-Zellen und dem Klon PSU-7 auf Matrigel (5% FKS, v/v). Die Ausgangszelllinie Brain (a+c) bildet bei Kultivierung auf Matrigel innerhalb von 48h netzwerkähnliche und schleifenförmige Strukturen aus, während der Klon (b+d) mit reduzierter Endoglin-Expression dieses Phänomen nur andeutungsweise zeigt (d). Jeder Balken repräsentiert eine Distanz von 100 $\mu$ m.



**Abb. 3.33** Wachstumsverhalten des MDA-MB-231-Klons L-End-3 bei 48h Kultivierung auf Matrigel in Anwesenheit von 5% (v/v) FKS (Detailaufnahmen). Die Zellen bilden interzelluläre Kontakte und organisieren sich zu netzwerkartigen (a) oder schleifenförmigen (b) dreidimensionalen Strukturen, wobei Hohlräume geschaffen werden. Oft sind sehr langgestreckte Zellen (Pfeile) sichtbar. Jeder Balken entspricht einer Distanz von 100 $\mu$ m.



**Abb. 3.34** Kultivierung des Klons MDA-MB-231–L-End-3 unter serumfreien Bedingungen (a+c) und in Anwesenheit des RGD-Peptids (b+d; RGD-Peptid: 100 $\mu$ M, hier 5%FKS) auf einem Matrigel-beschichteten Objektträger. In beiden Fällen bleibt die Bildung von geordneten Strukturen (vaskulogene Mimikry) aus. Jeder Balken entspricht einer Distanz von 100 $\mu$ m.

Reduziert man die Endoglin-Expression der MDA-MB-231-Brain-Zellen (Klon PSU-7) und kultiviert die Zellen dann unter den beschriebenen Bedingungen, so weisen die Zellen, im Vergleich zu denen der Ausgangszelllinie, eine deutlich verringerte Tendenz zur Bildung der VM-Strukturen auf. Schleifenförmige Strukturen sind hier nur im Ansatz zu erkennen (Abb. 3.32 d). Das Auftreten der genannten Strukturen korreliert demnach stark mit der Endoglin-Expression der Zellen. Endoglin spielt also zweifelsohne eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von vaskulogene Mimikry.

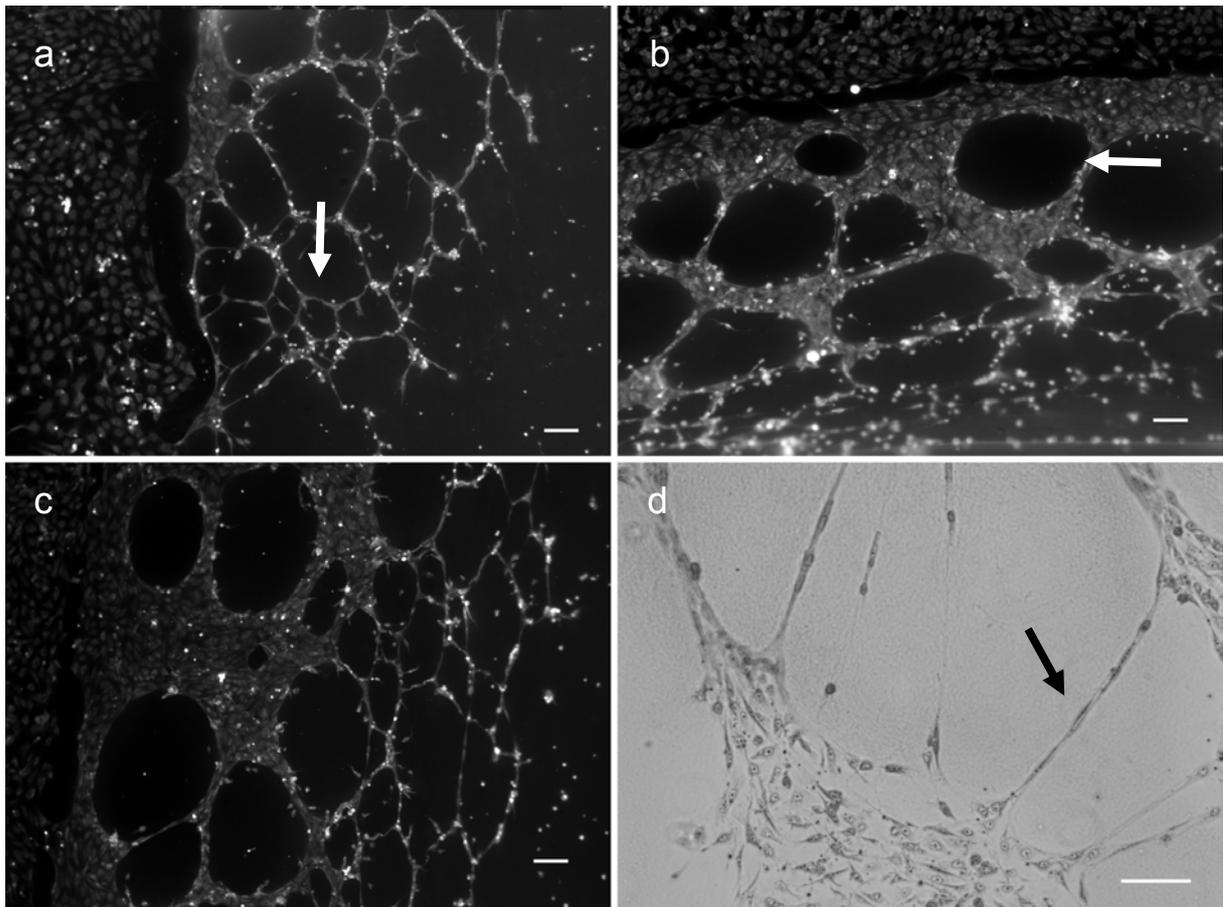
Eine vollständige Hemmung der Bildung von dreidimensionalen Strukturen und interzellulären Verbindungen erreicht man unter serumfreien Bedingungen (Abb. 3.34 a und c) oder durch Zugabe eines zyklischen RGD-Peptids (Abb. 3.34 b und d). Endoglin weist ein Integrin-bindendes Motif (RGD-Motif) auf und spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Bindung von Endothelzellen an Integrine.

Das verwendete Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) (Molekulargewicht: 574,6 g/mol, Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg) wurde in einer Konzentration von 100 $\mu$ M eingesetzt und ist ein wirksamer Inhibitor der Zelladhäsion. Es unterbindet die Adhäsion von Tumorzellen an Laminin und Vitronectin und kann zudem die Neovaskularisierung der Retina reduzieren (Hammes et al., 1996).

### 3.9.2 Wachstum von Endothelzellen (HUVEC) auf Extrazellulär-Matrix-Protein-beschichteten Oberflächen

Um die Bildung der ringförmigen und netzartigen Strukturen bei der Mammakarzinomzelllinie besser bewerten zu können, wurde der Matrigeltest zum Vergleich mit humanen Endothelzellen (HUVEC) wiederholt. Auch HUVE-Zellen formierten sich bei Kultur auf Matrigel zu ringförmigen, geschlossenen Zellverbänden (Abb. 3.35 b) und netzwerkartigen Strukturen (Abb. 3.35 a). Diese unterschieden sich in keinster Weise von den VM-Strukturen der MDA-MB-231-Zellen.

Man geht davon aus, dass die Zusammenlagerung von Endothelzellen zu schleifenförmigen (VM-entsprechenden) und tubulären Strukturen den ersten Schritt zur Bildung eines Kapillarnetzes in-vivo darstellt. Ist diese Annahme zutreffend, so sollte angesichts der vorliegenden Ergebnisse ein potentieller Beitrag von Brusttumorzellen zur Gefäßbildung bei Mammakarzinomen untersucht werden.



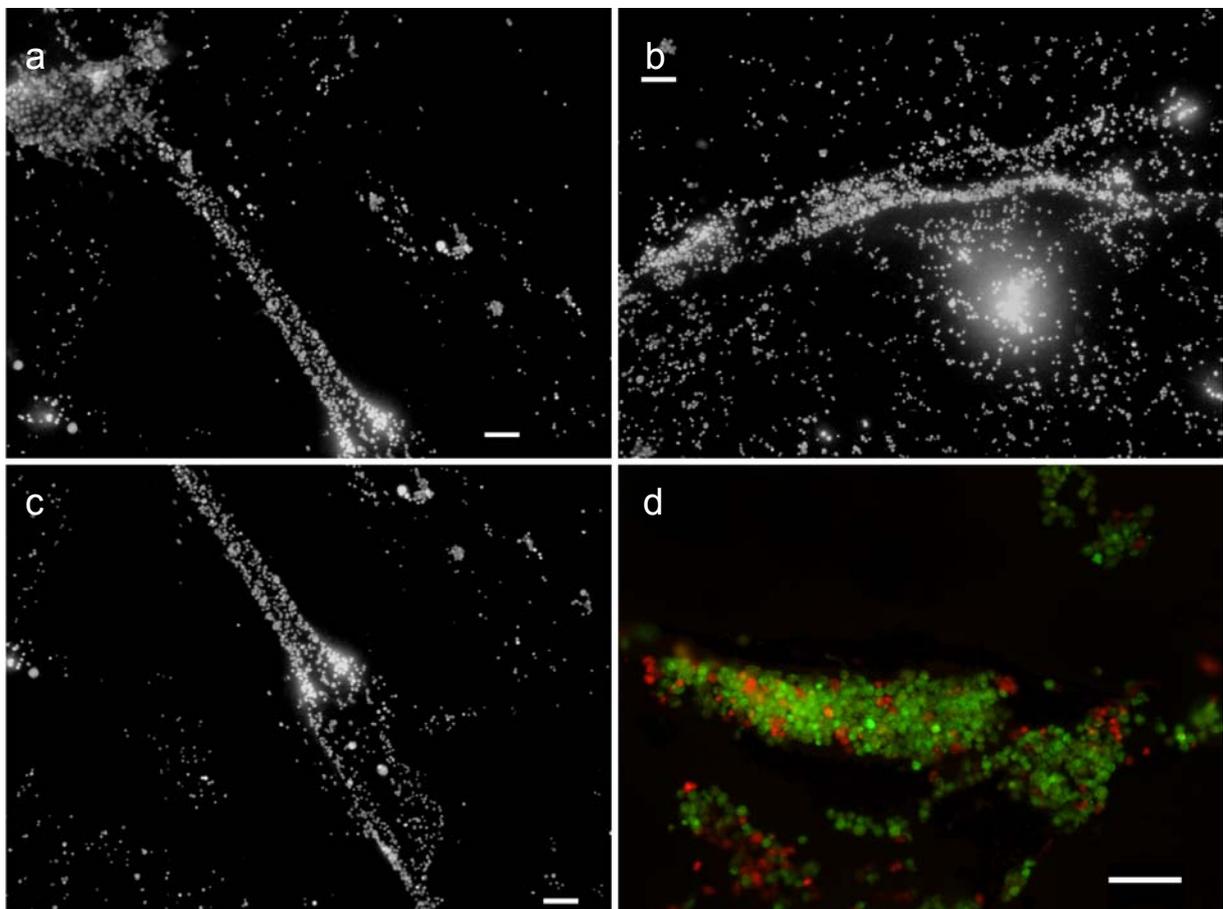
**Abb. 3.35 Zellorganisation von Endothelzellen bei Kultivierung auf Extrazellulär-Matrix-Proteinen (Matrigel). Ebenso wie die Endoglin-exprimierenden MDA-MB-231 Brusttumorzellen bilden auch die HUVEC-Zellen (Human Vein Endothelial Cells) netzwerkähnliche (a, siehe Pfeil) und schleifenförmige (b, siehe Pfeil) Strukturen. Auch hier sind oft sehr langgestreckte Zellen sichtbar (d, siehe Pfeil). Jeder Balken repräsentiert eine Distanz von 100µm.**

### 3.9.3 Ausbildung tubulärer Strukturen bei MDA-MB-231-Zellen

Erfolgt die Kultivierung der L-End-3-Zelllinie auf einem Gemisch von Matrigel und Kollagen Typ-I (1:1), so zeigen sich, anstelle der VM-Strukturen, röhrenförmige Gebilde mit einem sichtbaren Lumen (Abb. 3.36 a-c). Diese entsprechen den Strukturen, die man im Rahmen des „Tube-formation-Assays“ bei Verwendung von Endothelzellen erhält. Hierbei werden Endothelzellen meist in einer Lösung aus Kollagen TypI suspendiert und in Anwesenheit von VEGF kultiviert (Ota et al., 2002).

MDA-MB-231-L-End-3-Zellen sind demzufolge in der Lage, über die VM-Bildung hinaus, auch tubuläre Strukturen zu formen. In-vitro ließ sich dieses extrazellulär-Matrix-abhängige Phänomen bisher nur bei Endothelzellen nachweisen. Im Gegensatz zu den L-Endoglin-exprimierenden MDA-MB-231-Zellen, zeigen die untransfizierten, parentalen MDA-MB-231-Zellen dieses Phänomen nicht.

Nachdem die Befähigung der L-End-3-Zelllinie zur Bildung einer endothelähnlichen Zellorganisation demonstriert werden konnte, sollte in einem abschließenden Experiment eine potentielle Kooperation von L-End-3- und Endothelzellen überprüft werden. Kultiviert man die Zellen des L-End-3-Klons zusammen mit HUVEC, so nehmen letztere tatsächlich an der Brusttumorzell-Röhrenbildung teil (rot-fluoreszierende Zellen in Abb. 3.36 d).



**Abb. 3.36** Kultivierung von MDA-MB-231 Brusttumor- und HUVEC-Zellen auf einem Matrigel-Kollagen-Typl-Gemisch (FKS: 5% v/v). a-c: MDA-MB-231 L-End-3, d: Kokultivierung von MDA-MB-231 L-End-3-Zellen mit HUVEC. Der L-End-3-Klon wurde zuvor mit CFDA-SE grün gefärbt, die HUVEC-Zellen mit SNARF-1 rot markiert. Jeder Balken entspricht einer Distanz von 100µm. Die Endoglin-überexprimierenden L-End-3-Zellen bilden bei Kultur auf einem Matrigel-Kollagen-Typl-Gemisch (1:1) röhrenförmige Strukturen, HUVEC-Zellen können hierbei kooperieren (d).

## 4. Diskussion

### 4.1 Die „seed and soil“ –Theorie der metastatischen Tumorzell-Disseminierung

Tumorzellen werden klassischerweise über ihr unkontrolliertes und invasives Wachstum definiert, jedoch setzt sich zunehmend die Überzeugung durch, dass auch Zellen maligner Tumore in komplexer Weise reguliert werden. Hierbei spielen Interaktionen der entarteten Zellen mit umliegendem Gewebe, beispielsweise Fibroblasten, Immun- und Endothelzellen, sowie Komponenten der extrazellulären Matrix, eine wesentliche Rolle (Radisky und Bissell, 2004). Die Wechselwirkungen werden oft über sekretierte Cytokine und Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ), HGF (Hepatocyte growth factor), EGF (Epidermal growth factor) oder TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) vermittelt. Von Stromazellen synthetisierte Wachstumsfaktoren können beispielsweise das Zytokin-Expressionsmuster von Nachbarzellen beeinflussen. So exprimieren MDA-MB-231-Brusttumorzellen als Antwort auf eine TNF- $\alpha$ -Stimulation bFGF, VEGF und besonders IL-1 $\alpha$  (Hirtenlehner et al., 2002).

In einem Brustkrebsmodell konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von TGF- $\beta$  und HGF durch gentechnisch veränderte Fibroblasten ein hyperplastisches oder karzinogenes Wachstum von normalem Brustepithelium fördert, während unveränderte Stromazellen ein solches Wachstum hemmen (Kuperwasser et al., 2004). Viele Gewebe, wie beispielsweise die Knochenmatrix, dienen als Speicher für latentes TGF- $\beta$ . Dieses kann während des Matrix-Umbaus mobilisiert und durch die Proteasen MMP-2, MMP-9 und Plasmin aktiviert werden. Da diese Proteasen von oft von Tumorzellen überexprimiert werden, findet man aktives TGF- $\beta$  oft an der führenden Front einwandernder Tumorzellen (Reiss und Barcellos-Hoff, 1997).

Das von den Stromazellen erzeugte „Mikroenvironment“ kann jedoch nicht nur die Entstehung eines Primärtumors begünstigen oder unterdrücken, sondern auch die Einnistung und Vermehrung von metastasierenden Tumorzellen in einem Sekundärorgan beeinflussen.

Bereits 1889 formulierte der englische Chirurg Stephen Paget seine bis zum heutigen Tag gültige „seed and soil“ Theorie (Paget, 1889), nach welcher der Prozess der Metastasenbildung nicht auf Zufall beruht, sondern gerichtet erfolgt:

*„When a plant goes to seed, its seeds are carried in all directions; but they can only live and grow if they fall on congenial soil.*

*...The best work in the pathology of cancer is now done by those who, like Mr. Ballance and Mr. Shattock, are studying the nature of the seed. They are like scientific botanists; and he who turn over the record of cases of cancer is only a ploughman, but his observation of the properties of the soil may also be useful.”*

Eine metastatisch aktive Subpopulation des heterogenen Tumors hat demnach eine besondere Affinität für das Mikromilieu bestimmter Organ. Metastasen



**Abb. 4.1.** Die „seed and soil“-Analogie der Tumormetastasierung. Sowohl Tumorzellen, als auch Pflanzensamen, werden in der Regel ungerichtet verbreitet. Zu einer Absiedlung kommt es jedoch nur dann, wenn das entsprechende Mikromilieu am Sekundärort ein Tumorwachstum fördert.

**Bild:** Inokulierte Mykorrhiza-Pilze stimulieren deutlich das vegetative Wachstum von Tagetes-Pflanzen (rechte Bildhälfte), wodurch diese langanhaltende Wachstumsvorteile gewannen; links: Kontrollpflanzen. (Jahn, 1998; Dissertation).

entstehen nur dann, wenn das lokale Wirtsgewebe in passender Weise mit den Tumorzellen reagiert und diesen ein wachstumsförderndes Umfeld bietet. Wegbereitend für Pagets Theorie war die von Ernst Fuchs („Sarkom des Uvealtractus“, 1882) getroffene Feststellung, dass bestimmte Organe eine Prädisposition für die Entstehung von Sekundärtumoren aufweisen.

Kolon-Karzinome metastasieren gewöhnlich in Leber und Lunge, aber nur selten in Knochen, Haut- und Hirngewebe und nahezu nie in Nieren, Muskel oder andere Darmabschnitte. Im Gegensatz hierzu siedeln sich Brustkarzinomzellen zunächst oft in Knochengewebe ab. Ist die Brustkrebserkrankung fortgeschritten, lassen sich bei 80% aller Patienten Knochenmetastasen nachweisen (Coleman und Rubens, 1987). Betroffen sind meist Wirbelsäule, Rippen, Becken, Schädel, sowie die langen Knochen der Extremitäten, wobei sowohl osteolytische als auch osteoblastische Tochtertumore auftreten. Desweiteren sind auch Lymphknoten, Lunge, Leber und Hirn (Inzidenz: 20 bis 30%) häufig von Brusttumor-Metastasierung betroffen.

## 4.2 Organspezifische Metastasierung

Prometastatische Faktoren, die bei der Untersuchung von Primärtumoren identifiziert werden, sind meist genereller Natur und fördern die Metastasierung durch Steigerung der Zellmotilität und allgemeinen Invasivität. Von einem Einfluss auf die organspezifische Metastasierung ist bei bestimmten Chemokinen auszugehen. Chemokine sind chemotaktisch wirkende Moleküle, die von zirkulierenden Leukozyten und Stammzellen genutzt werden, um in bestimmte Organe zu gelangen, einem Vorgang der auch als „homing“ bezeichnet wird (Moser und Loetscher, 2001). Wahrscheinlich erfolgt auch die Zielfindung metastasierender Tumorzellen über eine Interaktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren, wobei der Ort der Metastasierung zusätzlich wachstumsstimulierende Bedingungen bieten muss.

CXCR4 (CXC Chemokin-Rezeptor 4) und CCR7 (CC Chemokin-Rezeptor 7) sind vermutlich die bedeutendsten Chemokinrezeptoren mit Metastasierungs-Relevanz.

Ein in der Fachliteratur gut belegtes Beispiel für organspezifische Metastasierung ist das Ligand-Rezeptor-Paar CXCL12 (CXC Chemokin-Ligand 12) und CXCR4. Eine signifikante Expression von CXCR4 konnte bei vielen Tumorzellen nachgewiesen werden (Cabioglu et al., 2005; Li et al., 2004). Brusttumorzellen exprimieren sowohl CXCR4 als auch CCR7 (Muller et al., 2001). Interessanterweise werden die entsprechenden Liganden der Rezeptoren in Geweben exprimiert, die oft von Metastasenbildung durch Brusttumorzellen betroffen sind. So wird der CXCR4-Ligand CXCL12 (auch SDF1- $\alpha$  bzw. Stromal-cell-derived factor 1- $\alpha$  genannt) in Lunge, Leber und auch Hirn exprimiert (Zlotnik, 2004). Bei In-vivo-Versuchen mit immundefizienten Nacktmäusen konnte die Absiedlung von Brusttumorzellen in die Lunge durch einen neutralisierenden Antikörper inhibiert werden (Muller et al., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MDA-MB-231-Brusttumorzellen mit Endoglin-Expressionsvektoren transfiziert. Hierbei zeigte sich, dass lediglich die L-Endoglin-exprimierenden Zellen weniger CXCR4 synthetisieren (Real-time-RT-PCR-Ergebnisse: MDA-MB-231-Parental:  $\Delta$ CT 10,0; MDA-MB-231-L-End-3:  $\Delta$ CT 12,0; MDA-MB-231-Brain:  $\Delta$ CT 13,3). Eine gesteigerte Endoglin-Expression könnte demnach über Senkung der CXCR4-Synthese die Oberflächenkonzentration dieses Chemokins herabsetzen und auf diesem Weg die Metastasierung in Lunge und Leber hemmen. Im Zuge dieses Effekts werden möglicherweise Mechanismen begünstigt, die eine präferentielle Metastasierung in das Hirn bewirken.

Der Chemokin-Rezeptor CCR7 vermittelt das „homing“ von Gedächtnis-T-Zellen und reifen dendritischen Zellen in die Lymphknoten. Einige Studien schreiben CCR7 eine entscheidende Rolle beim Eintritt von dendritischen Zellen in Lymphgefäße zu (Moser und Loetscher, 2001; Takanami, 2003). Dementsprechend scheint CCR7 auch Tumorzellen in Lymphknoten zu navigieren. So ist eine hohe CCR7 Expression von T1 Brusttumoren mit einer Metastasierung in Lymphknoten verbunden (Cabioglu et al., 2005). Zudem wurde eine gesteigerte Chemotaxis und Chemoinvasion von Brusttumorzellen in Richtung höherer CCL21-Konzentrationen, also des CCR7-Liganden demonstriert (Muller et al., 2001).

## 4.3 Prometastatische Faktoren

### 4.3.1 Der Epithelial-Mesenchymal-Übergang (EMT, Epithelial-mesenchymal-transition)

Im Laufe der Tumorentwicklung verlieren Karzinomazellen oft für Epithelzellen charakteristische Eigenschaften und erwerben im Gegenzug bestimmte Fähigkeiten migrierender Zellen, die in ihrer Gesamtheit zu einem aggressiveren Phänotyp beitragen. Eine metastatisch aktive Subpopulation des heterogenen Primärtumors muss beispielsweise in der Lage sein, die Basalmembran abzubauen, bestehende Anhaftungen zu unterbrechen und im interstitiellen Bindegewebe zu migrieren. Um diese Funktionen erfüllen zu können, sind Anpassungen, sowohl in der Zellmorphologie als auch in der enzymatischen Ausstattung, notwendig.

Dieser Vorgang, der als Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT) bezeichnet wird, ist oft mit genetischen Veränderungen von Komponenten Wachstumsfaktor-induzierter Signalkaskaden, wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder Phosphatasen, assoziiert. Für EMT-Prozesse ist der Verlust von E-Cadherin (ein epitheliales Zell-Zell-Adhäsionsmolekül),  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin, sowie die Expression mesenchymaler Marker, wie Vimentin, Fibronectin, N-Cadherin (ein mesenchymales Zell-Zell-Adhäsionsmolekül) und „mesenchymalen“ Integrinen (z.B.  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 6$ ) charakteristisch. Dies ist in der Regel mit einer schwachen Zell-Zell-Adhäsion und einem Umbau des Aktinzytoskeletts assoziiert, wodurch die epitheliale Polarität verloren geht.

Die EMT-Hypothese wurde unter Berücksichtigung einer relativ großen Anzahl von Brusttumorzelllinien aufgestellt. Die Zellen wiesen ein breites Differenzierungsspektrum auf, welches sich von einem epithelialen bis zu einem rein mesenchymalen Erscheinungsbild erstreckte (Thompson et al., 1992; Sommers et al., 1994). Aufgrund ihres Phänotyps und ihres invasiven Potentials (Durchquerung einer Matrigel-beschichteten Membran in der Mikrochemotaxis-Kammer) lassen sich die Brusttumorzelllinien grundsätzlich in drei Gruppen einteilen:

Die Zellen der ersten Gruppe zeichnen sich durch eine hohe Expression von Markerproteinen aus, die für einen epithelialen Phänotyp lumenbildender Brustzellen typisch sind: Östrogen-Rezeptor, E-Cadherin (Gen: *cdh1*), Zonula occludens-1 (Gen: *tjp1*) und Desmoplakin I/II (Gen: *dsp*), wobei die letzten drei Proteine an der Ausbildung von Adhäsions-Verbindungen, geschlossenen Zellkontakten (Tight Junctions) und Desmosomen beteiligt sind. Zellen dieser Gruppe, beispielsweise MCF-7-Zellen, sind nur sehr schwach invasiv. Die zweite Gruppe beinhaltet Brusttumorzellen, bei denen der epitheliale Phänotyp sehr gering ausgeprägt ist. Es werden nur noch einige der Epithelmarker exprimiert und dies auf niedrigem Niveau. Zu dieser Kategorie gehören, unter anderen, MDA-MB-453 und MDA-MB-468 Zellen. Sie sind durch eine relativ schwache in-vitro-Invasivität charakterisiert.

Die dritte Gruppe, zu der zweifelsohne die MDA-MB-231-Zellen zählen, unterscheidet sich deutlich von den zuvor beschriebenen. Man findet hier Zellen mit mesenchymalem, oft Fibroblasten-artigem Charakter. Anstelle der weiter oben genannten epithelialen Marker, werden hier mesenchymale Proteine, wie Vimentin, exprimiert. Der Phänotyp-Wechsel ist mit Veränderungen in der Zellmorphologie und sehr hoher in-vitro-Invasivität verbunden.

Man geht davon aus, dass der EMT-Prozess durch ein Zusammenspiel von TGF- $\beta$  und onkogenem Ras verursacht wird (Oft et al., 1998). Zellen, die einen EM-Übergang vollzogen haben, produzieren neben mesenchymalen Markerproteinen auch hohe Mengen an TGF- $\beta$ , so dass der mesenchymale Phänotyp auf autokrinem Weg stabilisiert wird (Oft et al., 1996). MDA-MB-231-Zellen haben vermutlich einen EMT-Prozess durchlaufen, sie besitzen eine aktivierende Mutation des K-Ras-Gens (Kozma et al., 1987) und synthetisieren Vimentin (ein Intermediärfilamentprotein mesenchymaler Zellen), jedoch nicht E-Cadherin oder  $\beta$ -Catenin (Gilles et al., 1997). Ihr epithelialer Ursprung ist aber durch eine signifikante Expression der Intermediärfilamentproteine Zytokeratin-8, -18 und -19 deutlich zu erkennen (Trask et al., 1990).

### 4.3.2 Einfluss von Proteinasen auf die Metastasierung

#### 4.3.2.1 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind an dem Ab- und Umbau extrazellulärer Matrix beteiligt und spielen deshalb bei Entwicklungsvorgängen und Morphogenese eine wichtige Rolle. Bislang konnten in Wirbeltieren 24 verschiedene MMPs identifiziert werden, von denen 23 im Menschen vorkommen. Darüber hinaus wurden Mitglieder dieser Proteinasefamilie auch in *Hydra* (Leontovich et al., 2000) und *Arabidopsis* (Maidment et al., 1999) nachgewiesen. Die Expression von Matrix-Metalloproteinasen begleitet streng regulierte zelluläre Vorgänge, wie beispielsweise Wundheilung und Involution der Brustdrüse (Singh und Foster, 1989; Lund et al., 1996).

Bei der malignen Entartung von Zellen fördert eine unkontrollierte oder unangemessene Expression einer oder mehrerer MMPs vermutlich den pathologischen Prozess (MacDonald und Steeg, 1993). Ebenso wie bei vielen anderen Krebserkrankungen, korreliert eine erhöhte MMP-Expression oder -Aktivierung auch bei Tumoren der Brust mit einem gesteigerten invasiven Potential und schlechterer Prognose des Krankheitsverlaufs (Ishigaki et al., 1999; Jones et al., 1999; Duffy et al., 2000). Die Invasion von Tumorzellen in das umliegende Gewebe, die Intravasation und die Extravasation in distalen Organen kann nur durch ein Zusammenspiel von Integrinen und MMPs erfolgen (McCawley und Matrisian, 2000).

Bei Matrix-Metalloproteinasen handelt sich um Mitglieder einer separaten Familie proteolytisch aktiver Enzyme, die in ihrem aktiven Zentrum ein Zink-Ion aufweisen, und Kollagene und andere Bestandteile der extrazellulären Matrix degradieren. In Fall von Brustkrebs konnte eine Überexpression bestimmter Matrix-Metalloproteinasen, nämlich MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-11, MMP-13 und MT1-MMP (Membran-Typ I-MMP) gezeigt werden. Die gesteigerte Expression der Enzyme ist hierbei generell mit einem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert.

#### **MMP-1 und andere Kollagenasen**

Zu den interstitiellen Kollagenasen gehören die Matrix-Metalloproteinasen MMP-1, MMP-8 und MMP-13. Es sind die einzigen Vertreter der MMP-Familie, die fibrilläres Kollagen abbauen können. MMP-1 wird als Prepro-Enzym mit einer Kettenlänge von 469 Aminosäuren synthetisiert, welches aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, einer katalytischen Domäne und einer C-terminalen Domäne besteht. Das Enzym wird von einer Vielzahl von Zellen, wie Fibroblasten, Chondrozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Keratinozyten produziert (Goldring, 1993). Normale Epithelzellen der Brust hingegen exprimieren MMP-1 nicht in signifikanter Menge (Kousidou et al., 2005). MMP-1 ist für die Brustkrebsforschung von Interesse, da lediglich Brusttumorzellen mit sehr invasivem Phänotyp MMP-1 exprimieren. Die Expression ist in der Tumorperipherie höher als im Zentrum (Bachmeier et al., 2005).

Entsprechend weisen auch MDA-MB-231-Zellen diese Proteinase in hoher Konzentration auf (Stark et al., 2007; Giambenardi et al., 1998). Die hohe mRNA Expression spiegelt sich besonders bei dem hirnmetastasierenden Subklon MDA-MB-231-Brain auch in einer hohen Menge an sekretiertem MMP-1-Protein wieder. Ein signifikanter Anteil des MMP-1 wird im Kulturüberstand von MDA-MB-231-Brain-Zellen aktiviert (Stark et al., 2007).

Neben den hirnmetastasierenden MDA-MB-231-Brain-Zellen, wiesen auch Zellen, die mit den Endoglin-Expressionsvektoren transfiziert wurden, höhere Konzentrationen an MMP-1-mRNA auf. Im Vergleich zu den parentalen MDA-MB-231-Zellen steigerte sich die Kopienzahl um den Faktor 7 (MDA-MB-231-L-End-3) bzw. 28 (MDA-MB-231-Brain). Die Ursache hierfür lässt sich jedoch nicht ohne weiteres aus Literaturangaben ableiten.

An einem potentiellen Mechanismus könnte das ZRP-1-Protein beteiligt sein. Durch Endoglin-Überexpression wird die Lokalisation des Endoglin-Interaktionsproteins ZRP-1 in eindeutiger Weise beeinflusst, es ist eine auffällige Akkumulation im Bereich des Zellkerns festzustellen (siehe Abb. 3.11). Es wird angenommen, dass ein kontrollierter Transport von ZRP-1 zwischen Zytosol und Kern stattfindet. In den Zellkern verlagertes ZRP-1 fungiert hierbei als Koaktivator für AP-1 (Aktivator Protein-1) und NF $\kappa$ B (Nuclear factor- $\kappa$ B) regulierte Sequenzen in Promotoren (Kassel et al., 2004). Da der MMP-1-Promotor sowohl durch AP-1 als auch durch NF- $\kappa$ B transaktiviert wird, könnte Endoglin die MMP-1-Expression zumindest teilweise über das ZRP-1-Protein modulieren.

Der AP1-enthaltende Komplex von Transkriptionsfaktoren kann in MDA-MB-231-Zellen auch durch Stimulierung des EGF-Rezeptors, beispielsweise mit Hilfe von EGF (Nutt und Lunec, 1996) oder TGF- $\alpha$ , induziert werden. Entsprechend kann das MMP-1-Gen ebenso durch den Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoyl Phorbol-13-Acetat (TPA) aktiviert werden (Angel et al., 1987; Nutt und Lunec, 1996). Hierbei verzehnfacht sich sowohl die Menge an Gesamt-MMP-1 als auch an aktiviertem MMP-1-Protein (Stark et al., 2007).

Weiterhin könnte ein TGF- $\beta$  / ALK-1-induzierter Signaltransduktionsweg zu einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung führen, wie in Neuronen demonstriert (König et al., 2005), und auf diesem Weg die MMP-1-Expression erhöhen.

Während sich MMP-8, die „neutrophile Kollagenase“, in MDA-MB-231-Zellen mittels real-time RT PCR nicht nachweisen lässt (Stark et al., 2007), synthetisieren die Zellen relativ große Mengen an MMP-13 (Kollagenase 3). Humane MMP-13 wurde zunächst in Karzinomen der Mamma identifiziert (Freije et al., 1994). Aktuelle Studien belegen, dass diese MMP in einer Reihe von malignen Tumoren exprimiert wird. Aufgrund der geringen Substratspezifität scheint die physiologische MMP-13-Expression mit Situationen assoziiert zu sein, in denen ein schneller und effektiver Umbau extrazellulärer Matrix (ECM) erforderlich ist.

Diese Metalloproteinase wird vermutlich anders reguliert als die übrigen MMPs, da im Rahmen einer Studie (Stark et al., 2007) Kollagenase 3 als einzige Matrix-Metalloproteinase in MDA-MB-231-Brain Zellen eine geringere Expression zeigt als in parentalen MDA-MB-231-Zellen. Der MMP-13-Promotor ist in MDA-MB-231-Zellen durch TGF- $\beta$  aktivierbar, wobei die Expression durch einen Komplex aus Smad3, JunB und Runx2 induziert wird (Selvamurugan et al., 2002; 2004).

### **Fokale Proteolyse: MT1-MMP und Gelatinasen**

Die Migration von Tumorzellen in dreidimensionalen Matrices erfordert den Abbau extrazellulärer Matrix durch Membran-assoziierte Proteasen (Friedl und Wolf, 2003). Hierzu zählen die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, sowie die Membran-Typ I Metalloproteinase (MMP14). Diese sind an fokalen Zell-Matrix-Kontakten von

Invadopodien und Podosomen lokalisiert, also den Zellinvasions-vermittelnden Strukturen (Linder und Aepfelbacher, 2003; Seals et al., 2005).

Gelatinasen spalten die Kollagen-Typen I bis IV, sowie Laminin, Elastin und Fibronectin, wobei die Kollagentypen I-III nur von MMP-2 (Gelatinase A, 72kDa) und nicht von MMP-9 (Gelatinase B, 92kDa) degradiert werden. Darüberhinaus agieren sie synergistisch, zusammen mit interstitiellen Kollagenasen, beim Abbau von fibrillärem Kollagen (Lobmann et al., 2005). MMP-2 kann von unterschiedlichsten Zelltypen, beispielsweise Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen, synthetisiert werden. Dem Enzym kommt eine tragende Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie Wundheilung, Arteriosklerose und Tumormetastasierung zu.

Auch MMP-9 weist ein ausgedehntes Expressionsmuster auf, es wird von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen (Nielsen et al., 1996), vaskulären Perizyten (Nielsen et al., 1997) und auch Krebszellen (Rha et al., 1997) produziert. Im Gegensatz zu anderen Metalloproteinasen besitzen Gelatinasen in ihrer katalytischen Domäne drei Kopien einer Fibronectin-TypII-Domäne auf, mit denen sie Substrate, wie Gelatin, Kollagene und Laminin binden (Allan et al., 1995).

Die Aktivierung von MMP-2 erfolgt nicht wie bei anderen MMPs im Extrazellulärraum (Großteil der MMPs) oder intrazellulär (MMP-11 und Membran-Typ-MMPs), sondern mittels Membran-Typ-MMPs (MT-MMPs) an der Zelloberfläche (Visse und Nagase, 2003).

Das initiale Ereignis der Tumordinvasion besteht aus einem Durchbruch von Tumorzellen durch die Basalmembran. Dieser Vorgang ist von Kollagen-TypIV-abbauenden Enzymen, hauptsächlich MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, sowie dem Inhibitor TIMP-2 abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die TypIV Gelatinase-Aktivität in direkter Weise mit Tumormetastasierung korreliert (Liotta et al., 1980). Die Basalmembran der Gefäße ist ein supramolekularer Komplex aus Proteinen, Glykoproteinen und Proteoglykanen, welcher durch eigenständige Zusammenlagerung („self-assembly“) der Einzelbestandteile entsteht und sowohl Endothelzellen, als auch Perizyten umhüllt.

Eine stark erhöhte Expression von MMP-2 und MMP-9 wurde in Krebserkrankungen von Lunge, Kolon, Brust (Nielsen et al., 1997; Heppner et al., 1996; Behrens et al., 2001; Pellikainen et al., 2004; Baker et al., 2002), Haut und Prostata gefunden und korrelierte mit einem gesteigerten invasiven Potential, sowie Metastasenbildung (Egeblad und Werb, 2002). In vielen Fällen steht das Stadium der Tumorentwicklung in linearem Zusammenhang mit der Expressionshöhe von Gelatinasen, da vor allem hoch-aggressive Tumorzellen MMP-2 und MMP-9 exprimieren. Eine veränderte Expression von Matrix-Metalloproteinasen infolge von Krebserkrankungen ist nicht erstaunlich, da viele Promotoren von MMP-Genen Bindestellen für Proto-Onkogene aufweisen. Der MMP-9-Promotor besitzt beispielsweise AP-1- und PEA-3-Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren *jun*, *fos* und *ets*, eine GT-Box für das Retinoblastoma-Protein (RB), sowie SP-1- und NF- $\kappa$ B-Sequenzen (Giambernardi et al., 1998).

Auch die membranständige Proteinase MT1-MMP (MMP-14, 57kDa) ist eng mit invasiven Prozessen assoziiert. So ist MMP-14 bei der Regulation des invasiven Potentials aggressiver Brusttumorzellen von entscheidender Bedeutung. Eine hohe Expression der Proteinase konnte in Brusttumoren nachgewiesen werden und

korreliert mit einer schlechten Prognose für den Krebspatienten (Jiang et al., 2006). In migrierenden Zellen wird MT1-MMP vermutlich mit Hilfe von CD44 an den führenden Leitsaum (Lamellipodium) befördert (Mori et al., 2002) und rekrutiert weitere Moleküle, wie MMP-2 hinzu (Jiang et al., 2006).

Ein interessanter Aspekt ist hierbei, dass Gelatinasen und MT-MMPs das Genprodukt des Metastasen-Suppressor-Gens KiSS-1 und auch dessen prozessierte Form, das Metastin-Decapeptid spalten. Metastin bindet an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, hOT7T175, und unterdrückt die Metastasenbildung von Tumoren, die den Rezeptor exprimieren. Die aktiven Formen der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, MT3-MMP und MT5-MMP sind in der Lage die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Gly<sup>118</sup> und Leu<sup>119</sup> des KiSS-1-Proteins und Metastin-Decapeptids zu spalten, wodurch der Ligand seine biologische Aktivität verliert und nicht mehr an den Rezeptor binden kann (Takino et al., 2003).

MDA-MB-231-Zellen, besonders der hirnmetastasierende Subklon, exprimieren MMP-9-mRNA relativ stark. Im Überstand der Zellen wurden allerdings nur im Fall der MDA-MB-231-Brain-Zellen signifikante Menge der Proteinase nachgewiesen (Stark et al., 2007). In parentalen MDA-MB-231-Zellen erfolgt eine Induktion des MMP-9-Gens, wenn die Zellen auf Matrigel (Balduyck et al., 2000) oder in Anwesenheit von Phorbolestern (Stark et al., 2007) kultiviert werden. Die MMP-9-Expression wird zudem durch Hypoxie aktiviert. Kultiviert man MDA-MB-231-Zellen unter Hypoxie-Bedingungen (1% O<sub>2</sub> / 94% N<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>), so wird MMP-9, als auch eine 103kDa große Gelatinase synthetisiert. Der MMP-9-Promotor weist kein HRE auf, die Hypoxie-bedingte Induktion wird möglicherweise über AP-1 oder NFκB – aktivierbare Sequenzen des Promotors vermittelt (Ridgeway et al., 2005). In MDA-MB-231-Zellen kann die MMP-9-Expression zudem durch TGF-β aktiviert werden (Safina et al., 2006).

In vielen Studien konnte in MDA-MB-231-Zellen keine MMP-2-Expression oder Aktivität nachgewiesen werden (Farina et al., 2002; Ridgeway et al., 2005; Stark et al., 2007). Andere Studien hingegen zeigten eine MMP-2-Expression von MDA-MB-231-Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene (Kousidou et al., 2005; Paquette et al., 2005). Dies mag daran liegen, dass MMP-2 nur in dünn ausgesäten Zellen exprimiert wird, bei Erreichen konfluenten Wachstums geht die Expression verloren (Menashi et al., 1998).

Grundsätzlich erhöht die Aktivität dieser Gelatinase das invasive Potential von MDA-MB-231-Zellen jedoch entscheidend. Bei DNA-Mikroarray-Analysen von knochenmetastasierenden MDA-MB-231-Zellen konnte MMP-2, neben anderen Genen, wie MMP-1, CXCR4, IL11 und CTGF, für das gesteigerte metastatische Potential der Zellen verantwortlich gemacht werden (Kang et al., 2003; Minn et al., 2005). Eine künstliche Überexpression von MMP-2 in MDA-MB-231-Zellen führte so zu einer gesteigerten in-vitro Invasivität und der Ausbildung von Fernmetastasen in Nacktmäusen (Tester et al., 2004). Desweiteren wurde beim Menschen eine Korrelation zwischen hohen MMP-2 Serum-Konzentrationen und metastasierenden Brusttumoren festgestellt (Leppa et al., 2004; Sheen-Chen et al., 2001; Hao et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich ein Einfluss von Endoglin auf die Expression von MT1-MMP oder Gelatinasen nicht nachweisen. Hohe Endoglin-Konzentrationen

scheinen allerdings die Lokalisation dieser Proteinase zu verändern, indem sie die Bildung von Invadopodien und Membranvesikeln stimulieren. Es wurde gezeigt, dass Membran-assoziierte Matrix-Metalloproteinasen besonders an diesen Zellausläufern und –abschnürungen zu finden sind (siehe Kapitel 4.3.4). Die Lokalisierung dieser Proteinase war hierbei für das invasive Potential von größerer Bedeutung, als deren absolutes Expressionsniveau.

### **Andere MMPs**

Zurzeit werden fünf Vertreter der Matrix-Metalloproteinasen des Menschen als „andere MMPs“ klassifiziert. Hierzu gehören MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-23 und MMP-28. MMP-19 wurde durch Klonierung aus einer cDNA-Bibliothek von humanen Lebergewebe identifiziert (Pendas et al., 1997) und bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen, wo es durch T-Zellen synthetisiert wird und als Autoantigen wirkt (Kolb et al., 1997). Die Hauptsubstrate von MMP-19 sind Gelatin, Kollagen IV und Laminin (Stracke et al., 2000), wobei die Prozessierung der  $\gamma 2$ -Kette von Laminin 5 in die Fragmente  $\gamma 2'$  und  $\gamma 2x$  durch MMP-19 die Migration von Epithelzellen fördert (Sadowski et al., 2005). MMP-19 steigert dementsprechend die Migration von Keratinozyten durch Matrices aus Kollagen Typ IV und Fibrin und nimmt an der Tumordinvasion von Epithelzellen teil (Sadowski et al., 2005). Im Gegensatz zu den meisten anderen Matrix-Metalloproteinasen wird MMP-19 auch unter normalen physiologischen Bedingungen von humanen Epithelzellen der Brust und Haut exprimiert (Beck et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit zeigte der L-Endoglin überexprimierende Klon L-End-3 eine prominente MMP-19-Expression, die vermutlich den invasiven Charakter dieser Zellen fördert.

### **Aktivierung und Beseitigung biologisch-aktiver Komponenten der EC-Matrix durch MMPs**

Die Hauptfunktion von MMPs besteht aus einer Beseitigung von ECM, vor allem während Umbauprozessen von Geweben. ECM besteht allerdings nicht nur aus einem Gerüst extrazellulärer Matrix, sondern dient auch als Speicher für biologisch aktive Moleküle, wie Chemokine (Sternlicht und Werb, 2001). Beim Abbau extrazellulärer Matrix durch MMPs können diese Faktoren freigesetzt werden und dann das Verhalten von Zellen beeinflussen. Moleküle können durch MMPs jedoch nicht nur mobilisiert, sondern auch aktiviert werden. Als Beispiele hierfür seien der Fas-Ligand (Powell et al., 1999), TNF- $\alpha$  (Gearing et al., 1994) oder IL-8 (Van den Steen et al., 2000) genannt. Umgekehrt können in den Extrazellulärraum sekretierte Faktoren auch degradiert und inaktiviert werden, wie im Fall von IL-1 $\beta$  (Ito et al., 1996) und den Chemokinen MCP-3 (McQuibban et al., 2000) und SDF-1 (Stromal derived factor-1; McQuibban et al., 2002) gezeigt wurde.

Auch ECM-Komponenten, die man nicht als klassische Liganden definieren würde, weisen gelegentlich verborgene funktionelle Strukturen auf. Diese können infolge einer Proteolyse freigelegt werden und entfalten dann ihre biologische Aktivität. Der Abbau von Basalmembran-Bestandteilen durch MMP-3 kann beispielsweise die Apoptose (Boudreau et al., 1995) oder Alveolarbildung (Sympson et al., 1994; Witty et al., 1995) bei Epithelzellen der Brustdrüse hervorrufen. Eine Proteolyse von E-Cadherin durch die gleiche Metalloproteinasen fördert die Epithel-

Mesenchym-Konversion (EMT) von Epithelzellen der Mamma (Lochter et al., 1997; Thomasset et al., 1998) und steigert zudem die Zellinvasion (Noe et al., 2001). Ein interessanter Aspekt ist auch die gesteigerte Zellmigration von Brustepithelzellen bei Spaltung der  $\gamma$ 2-Kette von Laminin 5 durch MMP-2 und MT1-MMP (Giannelli et al., 1997; Koshikawa et al., 2000). Dieser Vorgang hat direkte Auswirkungen auf die Matrigel-induzierte Bildung von Netzwerken (siehe 4.3.6).

#### 4.3.2.2 Plasmin-assoziierte Proteinase: PAI-1 und uPA

Die proteolytische Aktivität muss selbst bei unkontrolliert scheinenden Vorgängen, wie der Invasion von Tumorzellen, räumlich und zeitlich reguliert werden. Ein zu exzessiver Abbau von extrazellulärer Matrix kann den Untergrund zerstören, den die migrierenden Zellen zur Verankerung benötigen. Dies erklärt den paradoxen Effekt, dass nicht nur eine Überexpression des Plasminogen-Aktivators uPA mit erhöhter Aggressivität von Tumoren und schlechter Prognose assoziiert sein kann, sondern auch die seines Gegenspielers PAI-1 (Schmitt et al., 1991; Harbeck et al., 2004). Die essentielle Bedeutung von PAI-1 konnte in einem Tiermodell mit PAI-1-defizienten Mäusen belegt werden. Die transplantierten Tumorzellen konnten hierbei erst nach wiederhergestellter PAI-1-Expression mit Hilfe eines adenoviralen Vektors in das Gewebe eindringen (Bajou et al., 1998). Invasionsprozesse hängen folglich von einem genau abgestimmten Zusammenspiel beider Proteinase ab.

Plasmin kann die inaktiven Vorstufen der Matrix-Metalloproteinase MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10 und MMP-13 (Lijnen, 2001) aktivieren, ein Vorgang, dem in-vivo eine relevante Bedeutung zukommt (Visse und Nagase, 2003). Plasmin wiederum entsteht bei der Aktivierung von Plasminogen durch den Fibrin-gebundenen Gewebs-Typ-Plasminogen-Aktivator (t-PA, Tissue-type Plasminogen Activator) oder rezeptorgebundenem uPA (urokinase-type PA). Der Prozess kann durch Serin-Protease-Inhibitoren, wie PAI-1 und PAI-2 gehemmt werden. Sowohl Plasminogen als auch uPA liegen Membran-assoziiert vor, wodurch eine lokal begrenzte Aktivierung von Pro-MMPs an der Zelloberfläche erfolgt.

Die Expression von uPA und PAI-1 lässt sich in MDA-MB-231-Brusttumorzellen durch Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 (5ng/ml) induzieren (Lindemann et al., 2003). Dementsprechend steigert TGF- $\beta$  über Induktion der Urokinaseaktivität die Invasivität dieser Brusttumorzelllinie (Farina et al., 1998). MDA-MB-231-Zellen synthetisieren sowohl uPA als auch dessen Rezeptor, uPAR (Gilles et al., 1997). Die hohe Expression von uPA-Expression in diesen Brusttumorzellen konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Mittels Realtime-RT-PCR wurden  $\Delta$ CT-Werte von 3,7 bis 4,8 bestimmt. Die Induktion des uPA-Gens fiel aufgrund des hohen Basalniveaus, wie zu erwarten war, nur gering aus.

Bei der Quantifizierung von PAI-1-mRNA in MDA-MB-231-Zellen ergaben sich im Rahmen dieser Arbeit  $\Delta$ CT-Werte von 3,7 bis 4,8. Bei Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 wiesen parentale und vor allem S-Endoglin-überexprimierende MDA-MB-231-Zellen deutlich höhere PAI-1-mRNA-Konzentrationen auf, als L-Endoglin enthaltende Zellen der Linien MDA-MB-231-L-End-3 und MDA-MB-231-Brain. Möglicherweise trägt das niedrigere Expressionsniveau des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors in den L-Endoglin exprimierenden Brusttumorzellen zur hohen Invasivität dieser Zelllinien bei.

### 4.3.3 Potentielle Molekulare Grundlagen der Migrations- und Invasionssteigerung

#### 4.3.3.1 Beeinflussung der Zellmigration durch das Zytoskelettprotein ZRP-1

ZRP-1 (Zyxin-related protein-1), auch TRIP6 (Thyroid receptor-interacting protein 6) genannt, ist ein cytoplasmatisches Protein aus 476 Aminosäureresten (Lee et al., 1995). Es gehört zur Zyxin-Familie, welche auch die Proteine Zyxin und LPP (Lipoma preferred partner) umfasst. Die Vertreter dieser Familie sind an der Regulation des dynamischen Auf- und Abbaus von Actin-Filamenten beteiligt und modulieren Zelladhäsions- und Migrations-assoziierte Signaltransduktionswege (Murthy et al., 1999, Xu et al., 2004, Yi et al., 2002).

ZRP-1 wurde zunächst als Protein identifiziert, das mit dem nukleären Thyroxin (thyroid) Hormon-Rezeptor und dem Retinoid X Rezeptor interagiert (Lee et al., 1995), obwohl es, ebenso, wie Zyxin und LPP am N-terminalen Proteinende ein Kern-Export-Signal besitzt. Am C-Terminus befinden sich bei ZRP-1 drei LIM (nach den Homöodomänen-Proteinen Lin-11, Isl-1 und Mec-3 benannt) Domänen. Sowohl Zyxin als auch ZRP-1 treten zudem mit Signaltransduktions-Molekülen, wie CasL/HEF1 (Human Enhancer of Filamentation 1) und p130<sup>Cas</sup> in Kontakt (Yi et al., 2002). Diese Wechselwirkungen beeinflussen maßgeblich den Actin-Umbau, die Zelladhäsion und die Zellmigration.

In ruhenden Zellen sind LIM-Domänen-Proteine überwiegend an fokalen Adhäsionen lokalisiert, also Bereichen, in denen die Zelle engen Kontakt mit der extrazellulären Matrix aufweist. Die LIM-Domänen-Proteine interagieren hier entweder direkt oder über Adaptor-Moleküle mit dem Actin-Zytoskelett (Drees et al., 1999; Li et al., 2003; Schaller 2001; Xu et al., 2004). Unter bestimmten Bedingungen lassen sich mehrere Vertreter dieser Proteinfamilie allerdings auch im Zellkern nachgewiesen (Petit et al., 2000; Wang et al., 1999).

Interessanterweise können ZRP-1, Zyxin und LPP trotz ihres Kern-Export-Signals in den Zellkern translozieren. Neben diesen Export-Signalen wurden in den Proteinen zusätzlich Sequenzen identifiziert, die einen Transport in den Kern vermitteln (Wang und Gilmore, 2001). Sowohl die zelluläre Lokalisation als auch die identifizierten nukleären (Thyroid Hormon Rezeptor und v-Rel) und cytoplasmatischen (Protein Tyrosine Phosphatasen PTP1E und PTPBL) Interaktionsproteine legen nahe, dass ein Transport von ZRP-1 zwischen diesen Kompartimenten stattfindet.

Im Zellkern befindliches ZRP-1 dient als Koaktivator für AP-1 und NF- $\kappa$ B (Kassel et al., 2004). Eine Überexpression von ZRP-1 in Fibroblasten der Maus (10T1/2-Zellen) führte zu einer deutlichen Reduktion der Durchwanderung einer Fibronectin-beschichteten Membran (Boyden-Kammer; Yi et al., 2002). Andererseits führt eine Blockierung der ZRP-1-Expression zu einer gesteigerten Zellmotilität (Yi et al., 2002; Worley et al., 2006). Eine Reduktion der ZRP-1 Expression mit Hilfe von siRNA führte zu einer erhöhten Anzahl und erweiterten Länge von Actin-Stress-Fasern (Gur'ianova et al., 2005). Dies war mit einem verminderten Auftreten von fokalen Adhäsionen und Zell-Zell-Kontakten verbunden. Im einem Wundheilungs-Test (Scratch-Test) zeigten diese Zellen einen deutlich motileren Phänotyp (Gur'ianova et al., 2005).

Ein besonders interessanter Aspekt der ZRP-1-Funktion steht im Zusammenhang mit *Salmonella typhimurium*-Infektionen. Diese fakultativ intrazellulären Pathogene können sich in ihrem Wirt verbreiten, indem sie Phagozyten des Gastrointestinaltrakts befallen und deren Motilität erhöhen. Es konnte gezeigt werden, dass ein von *Salmonella* sekretiertes Protein, SrfH (SsrB regulated factor H), an ZRP-1 bindet und auf diese Weise die Zellmotilität erheblich erhöht (Worley et al., 2006). Durch Wirkung von SrfH ändert sich die subzelluläre Verteilung des ZRP-1 Proteins, so dass es nun mit dem Zytoskelett assoziiert, vorkommt (Worley et al., 2006). Worley et al. deuteten deshalb ZRP-1 als „Bremse“, welche die Ausbreitung infizierter Zellen verhindert.

#### Interaktion von Endoglin mit dem Zytoskelettprotein ZRP-1

Es wurde gezeigt, dass Endoglin sowohl mit Zyxin (Conley et al., 2004), als auch mit ZRP-1 (Sanz-Rodriguez, 2004) interagiert. Die Wechselwirkung erfolgt zwischen den LIM-Domänen von ZRP-1 bzw. Zyxin und dem Klasse I PDZ-Motif von Endoglin. Dem S-Endoglin fehlt dieses Motif (Sequenz: SSMA), weshalb eine Interaktion mit ZRP-1 unwahrscheinlich ist. Endoglin ist ebenso wie ZRP-1 hauptsächlich an Stellen fokaler Adhäsion lokalisiert, es akkumuliert aber auch teilweise in kernnahen Bereichen (Guo et al., 2004).

Bezeichnenderweise führt eine Überexpression von Endoglin ebenfalls zu einer veränderten ZRP-1 Lokalisation. In Abwesenheit von Endoglin lässt sich ZRP-1 hauptsächlich an fokalen Adhäsionen nachweisen (Sanz-Rodriguez et al., 2004). Bei künstlicher Überexpression von Endoglin wird ZRP-1 aus diesen peripheren Zonen in zentralere Bereiche der Zelle transportiert. Die Überexpression von Endoglin in den MDA-MB-231-Brusttumorzellen führte zu einer prominenten Lokalisierung von ZRP-1 in nukleären oder perinukleären Bereichen. Diese Translokation des Zytoskelettproteins ZRP-1 könnte das motilere Verhalten der Endoglin-überexprimierenden MDA-MB-231 verursachen. Durch gestiegene Konzentrationen an nukleärem ZRP-1 würden zudem AP-1 regulierte Promotoren stärker induziert werden. Interessanterweise lässt sich gerade in den Endoglin-haltigen Zelllinien MDA-MB-231-Brain und -L-End-3 eine höhere MMP-1-mRNA-Expression nachweisen.

#### **4.3.3.2 Der Transkriptionsfaktor Id1 als Zielgen des TGF- $\beta$ /ALK1-Wegs**

Die Metastasierung maligner Tumore wird durch den Vorgang der Neo-Angiogenese in erheblichem Maße beeinflusst. Hierbei spielen proangiogene Transkriptionsfaktoren, wie HIF-1 $\alpha$ , Egr-1, c-Jun und die Id-Proteine eine bedeutende Rolle. Id-Proteine gehören zur großen Familie der helix-loop-helix (HLH)-Transkriptionsfaktoren, welche mehr als 200 verschiedene Vertreter umfasst. Der Name Id steht für „inhibitor of DNA binding“, oder auch „inhibitor of differentiation“, da Id-Proteine die Bindung von bHLH (basischen HLH)-Proteinen an bestimmte DNA-Sequenzen, so genannte E-Boxen (Basensequenz: CANNTG), verhindern.

In Abwesenheit von Id-Proteinen können die gewebsspezifischen bHLH-Transkriptionsfaktoren mit ubiquitär exprimierten E-Proteinen, wie E12, E47 und E2-2 Heterodimere bilden und an E-Box-haltige Promotoren von Genen der Zelldifferenzierung binden und diese aktivieren. Die DNA-Bindung erfolgt über basische Regionen, die sowohl für bHLH- als auch E-Proteine charakteristisch sind.

Den Id-Proteinen hingegen fehlt das basische, DNA-bindende Motiv, so dass Heterodimere aus bHLH und Id-Proteinen nicht in der Lage sind als Transkriptionsaktivatoren zu wirken. Die Id-Proteine fungieren deshalb als dominant-negative Regulatoren von bHLH-Proteinen.

Eine Inhibierung der Zelldifferenzierung ist zumeist mit einer Förderung der Zellproliferation assoziiert. Erwartungsgemäß agieren Id-Proteine deshalb auch proliferationsfördernd. Id1 steigert die Proliferation indirekt, indem es als Antagonist von E-Proteinen die E2A-abhängige Expression des negativen Zellzyklus-Regulators (CDKI; cyclin-dependent kinase inhibitors) p21<sup>Cip1/Waf1</sup> supprimiert (Prabhu et al., 1997). Desweiteren reduziert Id1 auch die Synthese des CDK-Inhibitors p16<sup>INK4a</sup> (Ohtani et al., 2001).

Die exogene Überexpression von Id1 in Brustkarzinomzellen bewirkt, dass diese einen aggressiveren Phänotyp annehmen und in Abwesenheit von Serum proliferieren (Lin et al., 2000). Ein gleiches Vorgehen veranlasst auch nicht-entartete Brustdrüsenepithelzellen dazu, die Basallamina zu durchbrechen und in die extrazelluläre Matrix von Geweben einzuwandern (Desprez et al., 1998; Fong et al., 2003). Id1 wird von aggressiven und metastatisch aktiven Brustkarzinomzellen in hohem Maße überexprimiert. Das Protein lässt sich zudem in humanen Biopsien von infiltrierenden Brustkarzinomen nachweisen. Während diese Karzinome hohe Mengen an Id1 synthetisieren, sind nicht invasive Brustkarzinome (DCIS, Ductal carcinoma in-situ) bei immunhistochemischen Färbungen fast ausnahmslos Id1-negativ (Lin et al., 2000). Die Id1-Konzentration kann demnach als zuverlässiger Marker für das invasive und metastatische Potential von Brusttumoren dienen (Fong et al., 2003).

Beim *Id1*-Gen handelt es sich um ein Zielgen des TGF- $\beta$ -ALK-1-Smad1/5-Weges (Lebrin et al., 2004; Ota et al., 2002; Goumans et al., 2002). Der Alk-1-Rezeptor galt zunächst als Endothel-spezifisch, wurde dann aber auch in Epidermiszellen und Neuronen (König et al., 2005) nachgewiesen. In Endothelzellen wird dieser Signaltransduktionsweg durch Endoglin gefördert (Lebrin et al., 2004). Id1 ist ein positiver Regulator proangiogener Moleküle, wie dem Integrin  $\alpha6\beta4$ , dem FGF-Rezeptor-1 und der Gelatinase MMP-2 (Ruzinova et al., 2003). Wie gezeigt werden konnte, korrelieren zudem die Expressionshöhen von Id1 und MT1-MMP (Fong et al., 2003). Interessanterweise spielen gerade MMP-2 und MT1-MMP bei dem Phänomen ‚vaskulogene Mimikry‘ (VM) eine entscheidende Rolle. Dementsprechend wurde in einer Studie dargestellt, dass der Id1-Promotor in Endothelzellen über einen Smad1/5-Signalweg induziert wird, wobei die Id1-Expression zu einer Stimulierung der Endothelzellmigration, sowie der Ausbildung von VM-homologen Strukturen auf einer Matrigelbeschichtung führte (Valdimarsdottir et al., 2002). Gleiche Ergebnisse ließen sich auch durch ektopische Überexpression von Id1 erzielen (Valdimarsdottir et al., 2002).

Ebenso, wie bei Endothelzellen (Lebrin et al., 2004), lässt sich das *Id1*-Gen -wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt- auch bei MDA-MB-231-Brusttumorzellen nur in Gegenwart hoher Endoglin-Konzentrationen durch TGF- $\beta$  induzieren. Vermutlich wird in MDA-MB-231-Zellen also neben dem weit verbreiteten Smad2/3- auch der für Endothelien charakteristische Smad1/5-Signaltransduktionsweg durch TGF- $\beta$  aktiviert. Es ist davon auszugehen, dass beide Typ1-Rezeptoren (ALK5 und ALK1) in dieser Zelllinie TGF- $\beta$ -Signale weiterleiten können (Dumont und Arteaga, 2003).

Da im Rahmen dieser Arbeit nur MDA-MB-231-Zelllinien mit hoher Endoglin-Expression vaskulogene Aktivität demonstrierten, könnte ein Zusammenhang zwischen dem Id1-Gehalt von Zellen und der Fähigkeit zur Ausbildung VM-artiger Strukturen bestehen.

Interessanterweise korrelierte die Expression des Endothelmarkers Tie-1 (Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-1) eindeutig mit der Id1-Protein-Konzentration. Tie1 ist mit dem Angiopoietinrezeptor Tie-2 verwandt, es konnte jedoch bislang kein Tie-1-Ligand identifiziert werden. Dem Protein kommt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Gefäßen im Rahmen der Neovaskularisierung zu. Eine Überexpression von Tie-1 ließ sich bei Karzinomen der Brust (Yang et al., 2003) und des Magens nachweisen. Möglicherweise handelt es sich beim *tie-1*-Gen ebenfalls um ein direktes Zielgen des TGF- $\beta$ -ALK1-Weges, andernfalls könnte es aber auch durch den Transkriptionsfaktor Id1 reguliert werden.

Der Transkriptionsfaktor Id-1 kontrolliert demnach verschiedene Aspekte der Brustkrebs-Biologie, indem es die Expressionshöhe von Kontrollproteinen des Zellzyklus, invasionsbestimmender Proteinase und Proteinen der Zell-Zell-Interaktion reguliert.

#### 4.3.4 Einfluss von Invadopodien auf die Tumorzellinvasion

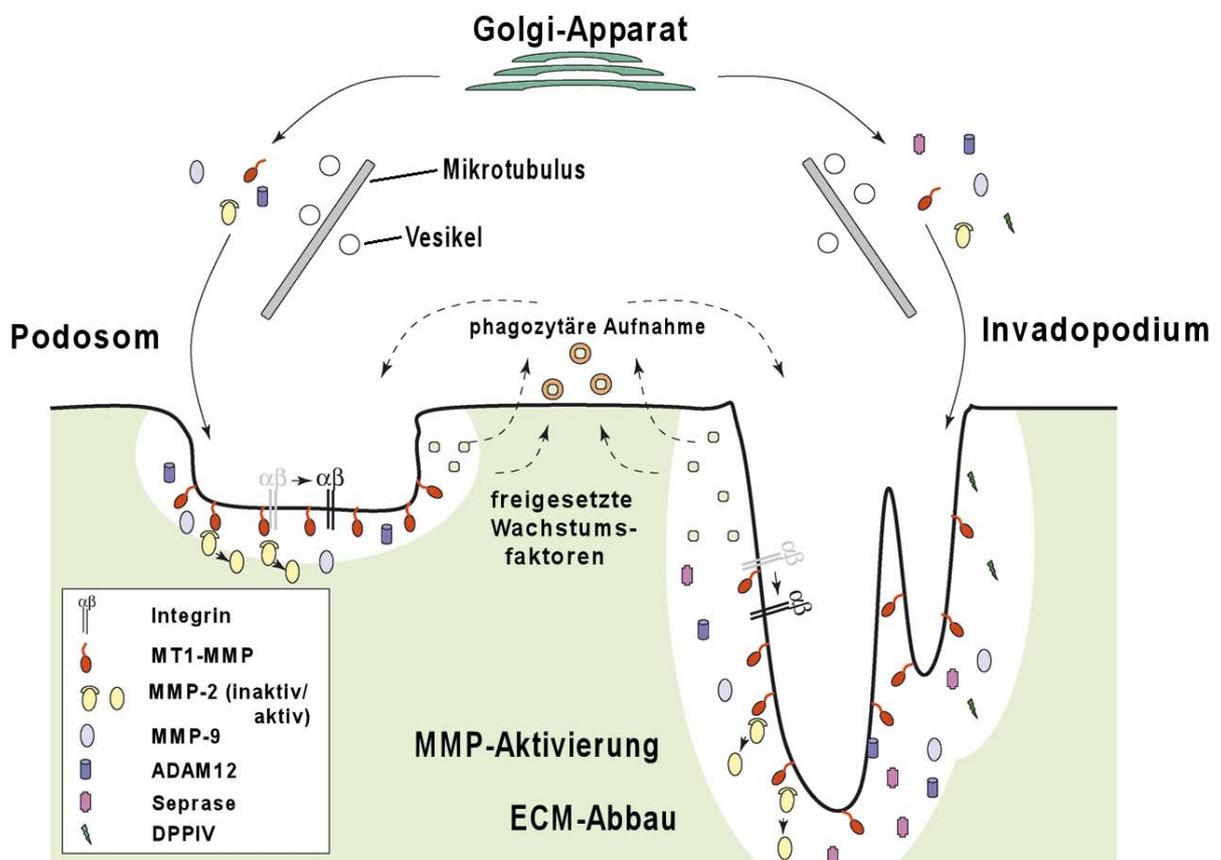
Die Bewegung von Zellen durch eine dreidimensionale ECM-Matrix erfordert im Gegensatz zur reinen Zellmigration eine Anpassung der Zellform, sowie eine angemessene proteolytische Aktivität (Murphy und Gavrilovic, 1999; Friedl und Brocker, 2000). Podosomen und Invadopodien werden zurzeit intensiv erforscht, da diese Zelleinrichtungen sowohl an physiologischen Ereignissen, wie der Extravasation und Gewebstransmigration von Monozyten (Buccione et al., 2004), als auch bei pathologischen Bedingungen, wie Arteriosklerose (Moreau et al., 2003) und Krebserkrankungen (Buccione et al., 2004; Weaver, 2006; Yamaguchi und Condeelis, 2006) beteiligt sind.

Invadopodien sind fingerförmige Ausläufer der ventralen Zelloberfläche, die sich bis in die extrazelluläre Matrix hervorstrecken. Es handelt sich um Bereiche aktiven ECM Abbaus (Baldassarre et al., 2003). Man findet Invadopodien ausschließlich an Tumorzellen, wobei ihr Auftreten mit gesteigerter Invasivität und Metastasierung assoziiert ist (Weaver, 2006). Zellausläufer dieses Typs vermitteln metastasierungsrelevante Funktionen, wie den Abbau extrazellulärer Matrix und die Verankerung migrierender Zellen im Untergrund. Invadopodien bestehen aus einem verzweigten Netzwerk aus F-actin, das neben weiteren Elementen des Zytoskeletts auch Proteine enthält, die der Signaltransduktion, Zelladhäsion oder Matrix-Degradation dienen (siehe Tabelle 4.1).

Strukturen mit ähnlicher Funktion und Molekülausstattung, so genannte Podosomen, findet man bei Zellen, die Gewebe durchqueren oder diese umformen, wie Makrophagen und Osteoklasten (Linder und Aepfelbacher, 2003). Beide Zellausläuferarten unterscheiden sich vermutlich nur in ihrem strukturellen Aufbau. Während bei Invadopodien F-Actin und Komponenten der Zelladhäsion kolokalisiert vorkommen, besteht der Querschnitt eines Podosoms aus einem charakteristischen

Ring Adhäsions-assoziiierter Moleküle, welcher einen Kern aus Aktin umgibt (Weaver et al., 2006). Laut einer Theorie könnte es sich bei Podosomen um Vorläufer von Invadopodien handeln (Linder und Aepfelbacher, 2003; Buccione et al., 2004). Im Hinblick auf den Abbau extrazellulärer Matrix bestehen jedoch Unterschiede zwischen Podosomen und Invadopodien.

Während Podosomen nur rekonstituierte Basalmembran oder nicht-quervernetztes Fibronectin degradieren können (Burgstaller und Gimona, 2005), sind Invadopodien zudem in der Lage auch quervernetztes Fibronectin, sowie Gelatin Abzubauen (Baldassarre et al., 2003). Hierfür ist vermutlich die unterschiedliche Ausstattung mit Proteasen verantwortlich, so findet man beispielsweise Seprase und DPPIV lediglich an Invadopodien (siehe weiter unten).



**Abb. 4.2** Der Matrix-Abbau an Podosomen und Invadopodien. Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP und ADAM12) und Serinproteasen (Seprase und DPPIV) gelangen mit Hilfe von Membranvesikeln entlang von Mikrotubuli vom Golgi-Apparat zu den Orten der Membraninsertion (im Fall von MT1-MMP) oder der Sekretion. Hier beginnen sie unmittelbar mit der Degradation extrazellulärer Matrix. Sowohl degradierte und anschließend phagozytierte Matrix, als auch freigesetzte Wachstumsfaktoren könnten die Bildung der Zellausläufer zusätzlich stimulieren (nach Linder, 2007). Die Serin-Proteasen wurden bislang nur an Invadopodien identifiziert.

Invadopodien enthalten vor allem Komponenten, die der Strukturgebung, dem Aktin-Umbau und der Zelladhäsion dienen. Die zelluläre Adhäsion wird hauptsächlich durch Integrine vermittelt. Integrine fungieren generell als Transmembranrezeptoren, wobei sie das Zytoskelett der Zelle mit der extrazellulären Matrix verbinden und auf diese Weise Signale in das Zellinnere übertragen können. Invadopodien epithelialer Zellen weisen die Integrine  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha V\beta 3$  auf (Mueller et al., 1999; Deryugina et al., 2001). Diese steigern vermutlich das invasive Potential von Zellen, indem sie Proteasen und mit Zelladhäsion assoziierte Aktivatoren in direkte Nachbarschaft zueinander bringen.

Zusätzlich findet man an Invadopodien auch Proteine, die an signalgebenden Prozessen beteiligt sind (siehe Tabelle 4.1). EGF ist der wichtigste chemotaktische Lockstoff für Karzinomzellen der Brust (Wang et al., 2004) und spielt eine entscheidende Rolle bei Vorgängen, wie der Tumorzellinvasion, -intravasation und Metastasierung. Da sich die Invadopodienbildung durch Stimulation mittels EGF (oder Phorbolestern, wie TPA) induzieren lässt, liegt der Schluss nahe, dass eine EGF-vermittelte Invadopodienbildung an diesen Prozessen beteiligt ist (Condeelis et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die EGF-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion essentielle Voraussetzung für eine Invadopodienbildung bei Adenokarzinomzellen der Brust ist (Yamaguchi et al., 2005). In-vivo kann EGF beispielsweise von Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) produziert werden (Yamaguchi et al., 2006). Ein weiteres Protein, das an Signaltransduktionswegen beteiligt ist, ist Cdc42. Die Aktivierung des GTP bindenden Proteins Cdc42 löst beispielsweise eine Aktinpolymerisation und -bündelung aus, was zu einer Invadopodienbildung führt (Yamaguchi et al., 2005).

Zur Ausstattung an Proteinasen gehören neben MMP-2, MMP-9, MT1-MMP und ADAM12 („A Disintegrin And Metalloproteinase“ 12) auch Seprase und ein ähnliches Enzym, die Dipeptidylpeptidase IV (DPP4). Beide letztgenannten Proteinase findet man bei Endothelzellen an Invadopodia-artigen Strukturen kolokalisiert. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen den Seprase-DPP4-Komplex konnte die Migration der Endothelzellen signifikant blockiert werden (Gherzi et al., 2006). Da die Tumor-assoziierte Neoangiogenese von der Migration endothelialer Zellen abhängt, stellt der Proteinase-Komplex möglicherweise ein potentielles Ziel für Tumor-bekämpfende Strategien dar.

Sowohl MT1-MMP als auch Seprase spielen eine entscheidende Rolle bei dem Abbau von Makromolekülen der extrazellulären Matrix, wie Kollagen, Fibronectin und Laminin (Nakahara et al., 1997; Monsky et al., 1994). Ein wichtiger Faktor ist nicht nur die Aktivität, sondern auch die subzelluläre Lokalisation der Proteinase. MT1-MMP war die erste membranständige Metalloproteinase, die identifiziert werden konnte, sie wird konstitutiv durch einen Furin-abhängigen Weg aktiviert (Nakahara et al., 1997). MT1-MMP besitzt eine kleine cytoplasmatische Domäne und eine singuläre membrandurchspannende Aminosäurekette, welche das Protein in der Membran verankert, und seinen Wirkungsbereich auf die Zellmembran begrenzt. Einen ECM-degradierenden und invasionssteigernden Effekt üben MT1-MMP und Seprase erst dann aus, wenn sich die Enzyme an Invadopodien konzentrieren und somit direkten Kontakt zu ihren Substraten erlangen (Nakahara et al., 1997; Mueller et al., 1999). MT1-MMP aktiviert an der Zelloberfläche zusätzlich sehr effektive Proteinase, wie MMP-2.

Tabelle 4.1 Molekulare Zusammensetzung von Invadopodien

Funktions-klasse	Proteinname	Referenzen
Signal-transduktion	• EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)	(1)
	• Src	(1), (2)
	• PKC (Protein Kinase C)	(1)
	• FAK (Focal Adhesion Kinase)	(1)
	• Tks5/FISH (Tyrosine kinase substrate 5 / Five SH3 domains)	
	• Cdc42	(2), (6)
	• Dynamin	(1), (6)
	• ASAP1 / AMAP1	(1)
	• Paxilin	(1), (2), (5)
• p130Cas	(1)	
Zytoskelett-aufbau	• F-Actin (Filamentöses Actin)	(2)
	• Arp2/3 (Actin-related Protein2/3)	(2), (6)
	• N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein)	(2), (6)
	• Cortactin	(2), (6)
	• Gelsolin / CapZ	
	• Cofilin	(2), (6)
	• VASP (vasodilator-activated phosphoprotein)	(1)
	• Vinculin	(1)
	• Talin	(1), (2)
• Zyxin	(1)	
Zell-adhäsion	• Integrine ( $\alpha3\beta1$ , $\alpha5\beta1$ , $\alphaV\beta3$ )	(1)
	• CD44	
	• Vinculin	(1), (2)
Matrix-Degradation	• MT1-MMP (Membran-Typ 1 MMP, MMP14)	(2), (6), (7)
	• MMP2, MMP9	(1), (2)
	• Seprase,	(2), (8), (9)
	• DPPIV (Dipeptidyl Peptidase IV)	(2), (9)

• = Vorkommen auch in fokalen Adhäsionskontakten; Literatur : (1) = Weaver, 2006; (2) = Linder, 2007; (3) = Conley et al., 2004; (4) = Sanz-Rodriguez et al., 2004; (5) = Brown und Turner, 2004; (6) = Artym et al., 2006; 7 = van Hinsbergh et al., 2006; 8 = Monsky et al., 1994; 9 = Chen und Kelly, 2003

Eine Überexpression von MT1-MMP, bei der die Konzentration dieser Proteinase an Invadopodien nicht erhöht wird, führt zwar zur Aktivierung von MMP-2, fördert jedoch weder den ECM-Abbau, noch das invasive Potential der Zelle (Nakahara et al., 1997). Die räumliche Konzentrierung von MT1-MMP an Invadopodien wird durch die cytoplasmatische Domäne des Proteins (Nakahara et al., 1997) vermittelt. Im Fall der MT1-MMP konnte ein direkter Einfluss auf die Tumorzell-Invasion durch mehrere Studien belegt werden (Nakahara et al., 1997; Sabeh et al., 2004).

Mit Hilfe eines Multiphotonen-Mikroskops und GFP-markierten Brusttumorzellen, konnte gezeigt werden, dass Karzinomzellen beim Vorgang der Intravasation Invadopodien-förmige Fortsätze ausbilden und mit diesen die Wände der Blutgefäße durchbrechen (Condeelis und Segall, 2003; Yamaguchi et al., 2005). Invadopodien invasiver Tumorzellen dienen demzufolge nicht nur dem Abbau extrazellulärer Matrix des Stromas, sondern auch dem Durchbrechen der Basalmembran von Blutgefäßen. Sie üben also einen entscheidenden Einfluss auf zwei wichtige Prozesse der Metastasierung aus, nämlich der Invasion in Gewebe und der Intravasation in Gefäße.

Eine künstlich gesteigerte Endoglin-Synthese führte bei MDA-MB-231-Zellen zu einer vermehrten Entstehung von Invadopodien. Hierbei war es von Bedeutung, welche Isoform des Endoglins überexprimiert wurde (Kapitel 3.4.1). Anscheinend ist nur die L-Endoglin-Isoform in der Lage, die Ausbildung dieser Zellausläufer zu stimulieren und auf diesem Weg das invasive Potential der Zellen zu fördern. Die Verbindung zwischen Endoglin und Invadopodien ist interessant, da im Rahmen einer Studie gezeigt wurde, dass die Invadopodienbildung bei MDA-MB-231-Brusttumorzellen durch Hypoxiebedingungen (1,5% O<sub>2</sub>) induziert wird (Munoz-Najar et al., 2006). Da Endoglin ebenfalls die Ausformung von Invadopodien stimuliert und zudem selbst durch Hypoxie induziert wird (Sanchez-Elsner et al., 2002), könnte Endoglin ein entscheidender Regulator dieses Prozesses sein.

#### 4.3.5 Freisetzung von Membranvesikeln durch MDA-MB-231-Tumorzellen

Bereits in den Achtziger Jahren deuteten mehrere Studien darauf hin, dass aus Tumorzellen stammende Vesikel, Schritte der metastatischen Kaskade beeinflussen könnten (Poste und Nicolson, 1980; Barz et al., 1985). Bei der Freisetzung der Partikel, dem so genannten „Vesikel-Shedding“, handelt es sich um einen Vorgang, bei dem bestimmte Areale der Plasmamembran in Form von Ektozomen an die Umgebung abgegeben werden. Diese Areale sind durch eine Anhäufung von Molekülen charakterisiert, die an Zell-Matrix-Wechselwirkungen und dem ECM-Abbau beteiligt sind (beispielsweise MMP-9 und  $\beta$ 1-Integrin) oder der Antigen-Präsentation dienen (HLA bzw. MHC-Klasse-I-Molekül). Einige Bestandteile der Membran-Partikel sind in der Tabelle 4.2 gelistet.

Das Vesikel-Shedding stattet Zellen mit, zum Teil bemerkenswerten Fähigkeiten aus. So wurde kürzlich demonstriert, dass der Chemokin-Rezeptor CCR5 mit Hilfe von Membranvesikeln von einer Zelle zur anderen gelangen kann (Mack et al., 2000).

Die Abschnürung von Membranvesikeln an der Zelloberfläche lässt sich in-vitro und in-vivo bei einer Reihe von normalen Zellen, als auch Tumorzellen beobachten (Taylor und Black, 1986). Im Fall von normalen (nicht-entarteten) Zellen scheint das Phänomen des „Vesikel Shedding“ streng reguliert zu sein. Als Antwort auf einen spezifischen Stimulus wird, beispielsweise von einer HUVE-Zelle, nur eine begrenzte Anzahl von Membranvesikeln freigesetzt und dies nur an definierten Bereichen der Plasmamembran (Taraboletti et al., 2002).

Im Gegensatz hierzu entlässt eine Tumorzelle, über den gesamten Zellkörper verteilt, Vesikel in den Extrazellulärraum (Dolo et al., 1995). Im Fall von Melanomzellen war zu beobachten, dass metastatische Varianten der entsprechenden Zelllinie mehr Vesikel abgeben, als die Ursprungszellen (Taylor et al., 1988). Interessanterweise erhöht sich das metastatische Potential in Zellen mit schwacher metastatischer Aktivität, wenn diese Membran-Vesikel der stark disseminierenden Variante aufnehmen, wobei dann auch anscheinend gleiche Organe besiedelt werden (Poste und Nicolson, 1980).

Da die Vesikel über den Prozess der Ektozytose freigesetzt werden, bezeichnet man sie dementsprechend auch als Ektosomen oder verwendet bei Vesikeln aus Tumorzellen die Abkürzung EMVTC (extracellular membrane vesicles from tumor cell). Ihre Größe liegt in der Regel bei einem Durchmesser von 300 bis 1200 nm (Taraboletti et al., 2006).

**Tabelle 4.2 Biologisch aktive Bestandteile von Membran-Vesikeln**

Funktionsklasse	Proteinname	Referenzen
Matrix-Degradation	• MMP-2	(1), (3)
	• MMP-9	(1), (2), (3)
	• MMP-14 (MT1-MMP)	(3)
	• TIMP-1, TIMP-2	(3)
	• uPA	(1), (4), (5)
Rezeptoren	• $\beta$ 1-Integrin	(2), (6)
	• neu : Endoglin	(diese Studie)
	• $\alpha$ -Folate-Rezeptor	(10)
Immunantwort	• HLA ("Human lymphocyte Antigen") class I	(2), (6)
	• Fas-Antigen und Fas-Ligand (FasL)	(7), (8), (9)
Wachstumsfaktoren und Zytokine	• VEGF	(11)
	• FGF-2	(12)
	• Interleukin-1 $\beta$	(13)
	• TGF- $\beta$	(14)
weitere	• Sphingomyelin	(15)

(1) = Dolo et al., 1994; (2) = Dolo et al., 1998; (3) = Taraboletti et al., 2002; (4) = Angelucci et al., 2000; (5) = Taylor und Black, 1986; (6) = Dolo et al., 1995; (7) = Albanese et al., 1998; (8) = Abrahams et al., 2003 ; (9) = Martinez-Lorenzo et al., 2004 ; (10) = Dolo et al., 1999; (11) = Taraboletti et al., 2006 ; (12) = Taverna et al., 2003; (13) = MacKenzie et al., 2001; (14) = Dolo et al., 1995b; (15) = Kim et al., 2002

Von der Zelle abgelöste Membranvesikel weisen viele bioaktive Moleküle auf, welche zelluläre Funktion in autokriner und parakriner Weise modulieren und infolge dessen mehrere Aspekte der Tumorprogression und –metastasierung beeinflussen können. Hierzu gehören:

1. Beeinflussung der Immunantwort des Wirts
2. Förderung des invasiven Potentials und der Metastasierung von Tumoren
3. Vermittlung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika
4. Förderung von Angiogenese

#### 1. Beeinflussung der Immunantwort des Wirts

Das Vesikel-Shedding ist vermutlich ein Mechanismus, mit dem sich eine Krebszelle ihrer Tumor-spezifischen Antigene (TSA) entledigt, um eine Immunantwort gegen den Tumor abzuwenden. Tatsächlich können an den Vesikeln Tumor-assoziierte Oberflächen-Antigene nachgewiesen werden (Alexander, 1974; Dolo et al., 1995). Die Partikel sind zudem in höchstem Maße immunogen (Wolfers et al., 2001; Andre et al., 2002). Bei den meisten TSAs handelt es sich jedoch um cytoplasmatische oder nukleäre Proteine, die nur über MHC-Klasse I-Präsentation, durch cytotoxische T-Zellen erkannt werden (Boon et al., 1997). Auffälligerweise werden auch MHC-Klasse I-Moleküle mit Hilfe der Membranvesikel von der Tumorzelloberfläche entfernt (Dolo et al., 1998).

Zudem wurde demonstriert, dass Membranvesikel von Brust-Tumorzellen TGF- $\beta$  enthalten und zudem die Lymphozytenproliferation inhibieren (Dolo et al., 1995). Die Inhibierung kann durch Zugabe eines neutralisierenden Anti-TGF- $\beta$ -Antikörpers blockiert werden. In-vivo lagern sich vermutlich Subpopulationen von Lymphozyten an TSA-beladene Membranvesikel an. Infolge dieser Interaktion könnten Anti-TSA-spezifische Lymphozyten an ihrer Proliferation gehindert werden.

Die aufgeführten Studien legen nahe, dass zumindest ein Teil der Tumormarker, die sich im Blut von Krebspatienten nachweisen lassen, in Form von Vesikeln vorliegen. Ein Beispiel hierfür ist sEndoglin („lösliches Endoglin“), welches in den Seren von Krebspatienten in deutlich höherer Konzentration vorliegt (Li et al., 2000; Fonsatti et al., 2001). Erhöhte Endoglin-Spiegel sind bei Brustkarzinomen oder kolorektalen Krebserkrankungen festzustellen und korrelieren mit einer geringen Lebenserwartung des Patienten (Li et al., 2000; Duff et al., 2003). Die Quantifizierung von Serum-Endoglin kann demnach dazu dienen, das Risiko der Metastasenbildung abzuschätzen.

Desweiteren können sich Tumorzellen vor einer Lyse durch das Komplementsystem schützen, indem sie den membranangreifenden Komplex (MAC, Membrane attack complex) mit Hilfe abgeschnürter Membranvesikel entsorgen und somit unschädlich machen (Pilzer et al., 2005). Der membranangreifende Komplex besteht aus den Komplementproteinen C5b, C6, C7, C8 und C9. Zu Beginn eines Komplement-Angriffs befinden sich auf der Zelloberfläche MAC-Konzentrationen, die noch keine Zellyse hervorrufen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt ein schneller Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welcher über Aktivierung der Proteinkinasen PKC und ERK zu einer Stimulation der Vesikelabschnürung führt. Die Mechanismen flussabwärts von PKC und ERK sind noch unklar, es wird jedoch eine Beteiligung des Proteins Mortalin (bzw. mitochondriales hsp70) angenommen (Pilzer et al., 2005).

## 2. Förderung des invasiven Potentials und der Metastasierung von Tumoren

In Membranvesikeln von Endothel- und auch Tumorzellen wurden bislang die Proteinasen MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP, sowie deren biologische Inhibitoren, TIMP-1 und TIMP-2, nachgewiesen (Taraboletti et al., 2002). Das Vorkommen der Metalloproteinasen wurde bei Vesikeln von Brusttumorzellen (Dolo et al., 1994), Fibrosarkomzellen (Ginestra et al., 1997) und ovariellen Karzinomzellen (Dolo et al., 1999) dokumentiert.

Die Vesikel enthalten zudem Rezeptor-gebundenes uPA (Ginestra et al., 1997; Angelucci et al., 2000) und sind, im Vergleich zur Plasmamembran der Zelle, mit der  $\beta$ 1-Integrin-Untereinheit angereichert (Dolo et al., 1998). Integrine stellen die wichtigste Klasse von Rezeptoren für ECM-Makromoleküle dar. Das Auftreten von Integrinen an Membran-Vesikeln deutet darauf hin, dass die abgeschnürten Ektosomen leicht an ECM-Komponenten binden und auf diese Weise die Proteinase-Aktivität dicht an den Substraten konzentrieren können.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten eine deutliche Zunahme der Vesikelabschnürung infolge der Endoglin-Überexpression in MDA-MB-231-L-End-3- und MDA-MB-231-Brain-Zellen. Bei humanen 8701-BC und MCF-7 Brustkarzinomzellen enthielten freigesetzte Membranvesikel die MT1-MMP und die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9. Sollte die auch für Ektosomen von MDA-MB-231-Brustkarzinomzellen zutreffen, könnte dies die beobachtete Endoglin-abhängige Steigerung des invasiven Potentials im Rahmen der Mikrochemotaxis-Versuche (Boyden-Kammer) erklären. Die ECM-abbauenden Enzyme gelangen infolge einer Lokalisation an Membranpartikeln vermutlich leichter an ihre jeweiligen Substrate.

## 3. Vermittlung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika

Während der Chemotherapie wird auf Tumorzellen ein selektiver Druck ausgeübt, welcher das Auftreten von Mutationen und Veränderungen in der Genexpression begünstigt. Dieser Prozess kann in einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber Anti-Krebs-Medikamenten resultieren. Es konnte gezeigt werden, dass das Vesikel-Shedding bei Tumorzellen mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika korreliert (Shedden et al., 2003). Experimente belegten eine Akkumulation von Doxorubicin und anderen kleinen Moleküle an der Zelloberfläche, sowie deren Entfernung in Form von Membranvesikeln. Dieser Resistenz-vermittelnde Mechanismus ist vermutlich im Fall lipophiler Wirkstoffe von großer Bedeutung. Hydrophile Wirkstoffe werden dagegen eher über ‚Multidrug resistance‘-Transporter, wie das P-Glykoprotein entfernt.

## 4. Förderung vaskulogener Mimikry und anderer Angiogenese-Prozesse

Von Endothelzellen lösen sich Proteasen-enthaltende Vesikel, deren proteolytische Aktivität möglicherweise angiogenetische Vorgänge unterstützt. Die Vesikelabgabe wird bei Endothelzellen durch Angiogenese-fördernde Faktoren, wie VEGF und FGF-2, sowie Anwesenheit von Serum stimuliert (Taraboletti et al., 2002), der genaue Mechanismus der Freisetzung ist allerdings noch weitgehend ungeklärt (Kim et al., 2002).

An der Regulation von angiogenetischen Prozessen sind nachweislich die Metalloproteinasen MMP-1, MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP beteiligt (Mignatti et al., 1989;

Cornelius et al., 1995; Hanemaaijer et al., 1993). Die Bedeutung dieser Enzyme im Rahmen der Angiogenese wurde durch Experimente nachgewiesen, bei denen sowohl endogene als auch synthetische Inhibitoren von MMPs die Angiogenese-prozesse verhinderten (Hidalgo und Eckhardt, 2001). Der molekulare Hintergrund der Angiogeneseförderung durch MMPs ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Mittels ECM-Abbau ermöglichen sie es Zellen, durch die Basalmembran zu gelangen oder im interstitiellen Stroma zu wandern. Diese Beweglichkeit befähigt Endothelzellen erst dazu, sich in tubulären Strukturen zu organisieren. MMPs beeinflussen ferner die Zelladhäsion, Proliferation und Zugänglichkeit anderer pro-angiogener Faktoren. Letztere können beispielsweise in der extrazellulären Matrix immobilisiert vorliegen oder selbst Bestandteil dieser sein. So besitzen manche ECM-Komponenten kryptische Domänen, deren biologische Aktivitäten erst durch Proteolyse freigelegt werden.

Die Expression der membran-assoziierten Metalloproteinasen MMP-2 und MT1-MMP stattet Zellen unmittelbar mit dem Potential zur Invasion extrazellulärer Matrix und Bildung netzwerkartiger Strukturen (vaskulogener Mimikry) aus (Hotary et al., 2000). Es lag nahe, dass Vesikel, die diese Proteinasen aufweisen, ebenfalls vaskulogene Mimikry (VM) ermöglichen können. In der Tat zeigten Versuche einen Einfluss der Vesikel auf das Phänomen ‚vaskulogene Mimikry‘. Stimuliert man HUVE-Zellen unter VM-hemmenden Bedingungen (5% Serum) mit isolierten Membran-vesikeln aus dem konditionierten Überstand von HUVE-Zellen, so bilden sich bei Kultivierung auf Matrigel die typischen, netzwerkartigen VM-Strukturen (Taraboletti et al., 2002).

Membran-Vesikel aus Tumorzellen stimulieren nicht nur die vaskulogene Mimikry in-vitro, sondern fördern auch die Neovaskularisierung in-vivo (Kim et al., 2002). Dementsprechend findet man in den Vesikeln auch VEGF (Taraboletti et al., 2006) und FGF (Fibroblast growth Factor) -2 (Taverna et al., 2003). Auch  $\beta$ 1-Integrin ist durch Interaktion mit Fibronectin und weiteren ECM-Bestandteilen in Angiogenesevorgänge involviert.

Die Freisetzung von Membranvesikeln fördert also unter anderem die Invasivität und Bildung von Strukturen vaskulogener Mimikry. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig ein Zusammenhang zwischen der Endoglinexpression und dem ‚Vesikel-Shedding‘-Phänomen demonstriert werden. Die gesteigerte Freisetzung von Membranvesikeln korrelierte mit einer Förderung des invasiven Potentials und dem Auftreten von vaskulogener Mimikry. Vermutlich sind die beiden letztgenannten Effekte von der Aktivität zweier Metalloproteinasen, nämlich MMP-2 und MT1-MMP, abhängig. Während der Migration auf PDL-beschichteten Objektträgern hinterließen die L-Endoglin-überexprimierenden MDA-MB-231-Zellen auf ihrem Weg eine Spur abgeschnürter Vesikel (siehe Abb. 3.14). In dreidimensionalen Systemen hätte dies vermutlich einen massiven Abbau extrazellulärer Matrix zur Folge, was nachfolgenden Zellen den Weg bahnen würde.

Zusätzlich könnten Tumorzellen über das Phänomen ‚vaskulogene Mimikry‘ direkten Kontakt zum Blutstrom erlangen und mittels Vesikel-abhängiger Mechanismen einer Immunantwort auszuweichen. Sämtliche hier aufgeführten Prozesse werden von der Endoglin-Expression beeinflusst und bestimmen maßgeblich die Metastasierung von Tumorzellen.

### 4.3.6 Metastasierungsförderung durch Angiogenese-ähnliche Prozesse

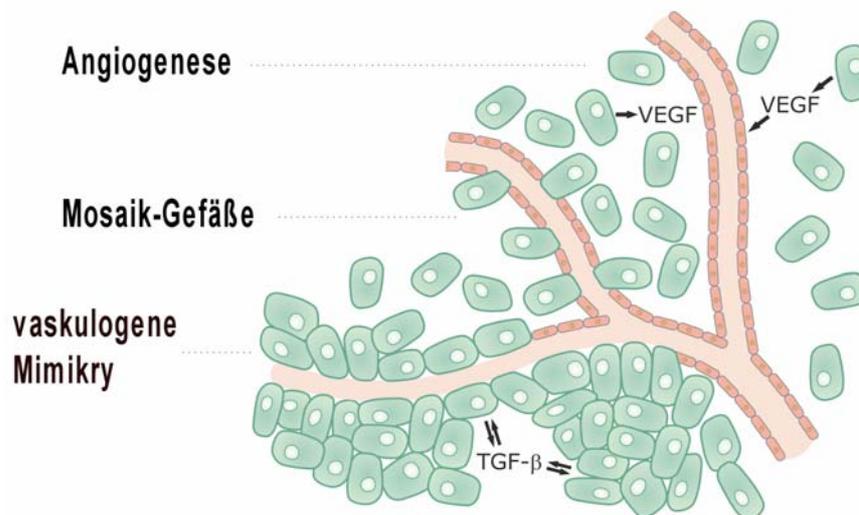
Es wird angenommen, dass Neoangiogenese sowohl für Tumorwachstum, als auch für Metastasierungsprozesse essentiell notwendig ist. Unter bestimmten Umständen können Tumore ihre Nährstoff und Gas-Versorgung allerdings auch mittels alternativer Methoden sicherstellen. Hierzu gehören beispielsweise die Gefäß-Kooption, also die Inbesitznahme bestehender Gefäße durch Tumorzellen, die Bildung von Mosaikgefäßen (siehe Abb 4.3) oder das Phänomen der vaskulogenen Mimikry. Kooption findet man gewöhnlich bei Metastasenbildungen in stark vaskularisierten Geweben, wie dem zentralen Nervensystem (Holash et al., 1999). Es kommt hierbei zu einem sehr invasiven Wachstum, wobei sich die Tumorzellen entlang bestehender Kapillare ausbreiten (Döme et al., 2007).

#### 4.3.6.1 Vaskulogene Mimikry (VM)

Unter vaskulogener Mimikry versteht man das ECM-abhängige Wachstum bestimmter Zellen in Form dreidimensionaler, lamininreicher Netzwerke. Dieser Prozess ähnelt der Entwicklung primitiver Netzwerke im Rahmen der embryonalen Vaskulogenese (Hendrix et al., 2003). Vaskulogene Mimikry tritt nur bei aggressiven Tumoren auf, der Nachweis erfolgt mittels PAS (Periodic Acid Schiff)-Färbung, wobei sich im Fall von VM netzwerkartige Muster zeigen. Das Phänomen wurde bei einer Reihe von Karzinomen (von Brust, Haut, Prostata, Ovar, Chorion und Lunge) und Sarkomen (z.B. Synovialsarkom) identifiziert (Döme et al., 2007). In Fall von Melanomen erhöhten VM-Strukturen das Metastasen- und Sterberisiko um 50% (Folberg et al., 1993). Die in-vivo erzeugten Strukturen ermöglichen vermutlich eine Form von Mikrozirkulation, bei der das Blut in direkten Kontakt mit den Tumorzellen tritt. Daher ist VM mit einer hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen assoziiert und korreliert mit schlechter Prognose des Krankheitsverlaufs (Warso et al., 2001; Maniotis et al., 1999).

Die flüssigkeitsführenden, ECM-reichen Netzwerke bieten den aggressiv wachsenden Tumoren eine Möglichkeit zum Nährstoffaustausch und verhindern hierdurch vermutlich das Auftreten von Nekrose (Hendrix et al., 2003; Maniotis et al., 1999). Funktionelle Studien mit transplantierten humanen Melanomzellen belegten einen Anschluss der geflechtartigen Strukturen aus Tumorzellen an das Gefäßsystem der Wirtsmäuse, wobei ein Stoffaustausch zwischen beiden Systemen erfolgte (Ruf et al., 2003). Die Melanomzellen wiesen, Endothelzellen entsprechend, gerinnungshemmende Eigenschaften (Ruf et al., 2003).

Bislang sind Faktoren, die den VM-Phänotyp induzieren, noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint die Ausprägung eines Endothelzell-ähnlichen Charakters entscheidend zu sein, wie im Fall von Melanomzellen gezeigt wurde (Seftor et al., 2002). Melanomzellen, die zur VM befähigt sind, weisen auf molekularer Ebene meist Marker unterschiedlicher Zelltypen auf, was auf eine Dedifferenzierung in Richtung eines pluripotenten, unreifen Phänotyps deutet (Hendrix et al., 2000). Sie exprimieren verschiedene Marker des Endotheliums, wie Tie-1 (Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains -1; Hendrix et al., 2000; Maniotis et al., 1999), den Epithel-Marker Keratin-8, sowie Marker mesenchymaler Zellen, wie das Intermediärfilamentprotein Vimentin. Ebenso wie



**Abb. 4.3 Die Tumorangio- und Angiogenese-ähnliche Prozesse. Solide Tumore sichern ihre Nährstoff- und Gasversorgung oft über den Vorgang der Neoangiogenese. Neue Gefäße entstehen hierbei durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem. Die zur Bildung der Gefäßwände notwendigen Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen werden durch den Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) aktiviert. Die Angiogenese ist von der Vaskulogenese abzugrenzen, bei der Blutgefäße aus endothelialen Vorläuferzellen neugebildet werden. Bei Mosaikgefäßen besteht die Auskleidung der Kapillaren hauptsächlich aus Endothelzellen, zu einem kleinen Teil aber auch aus Tumorzellen. Bei Kolonkarzinomen sind beispielsweise 15% der Gefäße Mosaikgefäße, bei denen bis zu 4% der Gefäßoberfläche aus Tumorzellen gebildet wird. Bei vaskulogener Mimikry handelt es sich um ein blutführendes dreidimensionales System, das nur aus Tumorzellen aufgebaut ist. Da sich die Hohlräume nicht aus bereits bestehenden Gefäßen entwickeln, benutzt man den Ausdruck „vaskulogen“. Vaskulogene Mimikry lässt sich nur bei hochaggressiven Tumorzellen nachweisen, schwach invasive Tumorzellen zeigen das Phänomen auch in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren nicht.**

Melanomzellen, synthetisieren auch MDA-MB-231-Zellen große Mengen der Endothelmarker VEGF (Vascular endothelial growth factor) und Thrombin-Rezeptor, in niedrigerer Expressionshöhe aber auch Tie-2 und CD31 (Hendrix et al., 2000).

Vaskulogene Mimikry wird nachweislich durch die Proteine VE-Cadherin und EphA2 (Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma -A2) beeinflusst, die kolokalisiert an Zell-Zell-Verbindungen vorliegen. Ein wichtiger Regulator des Phänomens ist vermutlich das Enzym Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), welches die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen MT1-MMP (Membran-typ I MMP) und MMP-2 kontrolliert. Beide Proteinase sind eng mit Invasion, Metastasierung und Tumor-Angiogenese assoziiert, zudem aber auch für die Ausbildung von VM-Strukturen unerlässlich (Seftor et al., 2001). Nach dem aktuellen Modell zur VM, aktiviert die Metalloproteinase MT1-MMP zunächst Pro-MMP-2. Bezeichnenderweise vermittelt gerade der natürliche Inhibitor einiger Metalloproteinasen TIMP-2 die

Aktivierung von Pro-MMP-2, indem es diese Proteinase in unmittelbare Nähe der aktiven MT1-MMP leitet (Hess et al., 2003). MMP-2 und MT1-MMP spalten daraufhin, vermutlich in Kooperation, Laminin-5- $\gamma$ 2-Moleküle in die promigratorisch wirkenden Fragmente  $\gamma$ 2' und  $\gamma$ 2x (Walker-Daniels et al., 2003; Hess et al., 2003; Hess et al., 2005). Die Laminin-5-Spaltprodukte fördern unter anderem die Migration von Epithelzellen der Brust und verschiedener Tumorzelltypen (Seftor et al., 2001; Giannelli et al., 1997; Koshikawa et al., 2000).

In Experimenten konnte demonstriert werden, dass die  $\gamma$ 2' und  $\gamma$ 2x -Fragmente als Signal dienen können, welches selbst wenig-aggressive Tumorzellen dazu anregt, sich in Netzwerk-Strukturen zu organisieren (Seftor et al., 2001). Während die VM-stimulierende Wirkung der promigratorischen Fragmente sehr gut belegt ist, bleibt der detaillierte Mechanismus weitgehend unklar.

Interessanterweise inhibiert TGF- $\beta$ 1 die Netzwerk-Bildung bei HUVE-Zellen, in denen die Endoglin-Expression mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden reduziert wurde. Während sich die unstimulierten Zellen beim Wachstum auf einer Kollagen-Matrix (natives Kollagen Typ1) noch in röhrenförmigen Strukturen organisierten, führte die Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 (0,1 ng/ml) zu einem Zusammenbruch der Netzwerke (Li et al., 2000). In Endothelzellen werden TGF- $\beta$ -Signale über zwei verschiedene Smad-Wege weitergeleitet. Da Endoglin den Smad1/5-Weg fördert, scheint das VM-Phänomen in den Endoglin-defizienten Endothelzellen durch den ALK-5-Weg blockiert zu werden. In einem Experiment mit konstitutiv aktiven Formen der ALK-1 und ALK-5-Rezeptoren konnte dies bestätigt werden. Während ein aktiver ALK-1-Weg keine offensichtlichen Effekte ausübte, wurde über den ALK-5/Smad-3-Weg sowohl die Proliferation, als auch die Netzbildung von HUVE-Zellen blockiert (Ota et al., 2002).

Entsprechend könnte die Überexpression von Endoglin in MDA-MB-231-Brusttumorzellen einen inhibitorischen ALK-5/Smad-3-Weg unterdrücken. In parentalen MDA-MB-231-Zellen wird der ALK-5-Weg vermutlich auch ohne exogene Zugabe von TGF- $\beta$  stimuliert, da MDA-MB-231-Zellen eine autokrine Aktivität dieses Zytokins aufweisen (Dumont et al., 2003; Lei et al., 2002). Zudem stimuliert Laminin, die Hauptkomponente der Basalmembran und des Matrigels, die Sekretion von TGF- $\beta$ 1 in MDA-MB-231-Zellen (Hirtenlehner et al., 2002). Endoglin könnte demnach die Fähigkeit zur vaskulogenen Mimikry fördern, indem es einen inhibitorisch-wirkenden Signaltransduktionsweg blockiert. Durch die Ausbildung der VM-Strukturen kommen Tumorzellen in direkten Kontakt zum Blutstrom, wodurch die hämatogene Disseminierung der Zellen in-vivo gefördert wird und das metastatische Potential der Zelllinie ansteigt.

#### **4.3.6.2 In-vitro-Röhrenbildung bei MDA-MB-231-Brustkarzinomzellen**

Neben der Ausbildung von Strukturen vaskulogener Mimikry, zeigten sich bei Kultivierung von MDA-MB-231-Zellen auf Matrigel/Kollagen-Typ-I-haltigen Matrices auch röhrenförmige Gebilde (siehe Abb. 3.36). Mit Hilfe Kollagen-Typ-I-haltiger Gele wird üblicherweise die Befähigung von Endothelzellen zur Gefäßformung untersucht (Ota et al., 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ließ sich erstmals eine Kollagen-Typ-I-abhängige Röhrenbildung auch bei Karzinomzellen demonstrieren. Dies gelang allerdings nur bei L-Endoglin-exprimierenden MDA-MB-231-Zellen (Zelllinie L-End-3), parentale MDA-MB-231-Zellen waren hierzu nicht in der Lage.

Hierbei konnte auch eine Kooperation von L-Endo-3- und Endothelzellen festgestellt werden. Voraussetzung für einen solchen Prozess ist möglicherweise eine Endoglin-abhängige Expression des endothelialen Zell-Zell-Adhäsionsproteins VE-Cadherin. Ob das Zusammenwirken beider Zelltypen zu einer Entstehung von Mosaik-Gefäßen (Abb. 4.3) führen kann, müssen zukünftige in-vivo Experimente zeigen. Ein Nachweis von Mosaikgefäßen würde das hohe metastatische Potential von MDA-MB-231-Zellen in-vivo zusätzlich begründen.

#### 4.3.6.3 Das Phänomen der Pseudo-Vaskulogenese

Während der normalen Schwangerschaft tritt im Rahmen der Einnistung des Embryos ein Phänomen auf, das als Pseudo-Vaskulogenese bezeichnet wird. Hierbei wechseln die Zytotrophoblasten von einem epithelialen zu einem endothelialen Phänotyp. Die spezialisierten Epithelzellen der Plazenta nehmen vorübergehend einen Tumorzell-ähnlichen Charakter an und dringen in die extrazelluläre Matrix des Uterus ein (Hoang et al., 2001) um eine Anbindung der Plazenta an Spiralarterien des maternalen Gefäßsystems zu gewährleisten. Haben die Zytotrophoblasten die Spiralarterien erreicht, wachsen sie in die Wände der mütterlichen Gefäße ein und übernehmen hier die Funktion von Endothelzellen (endovaskuläre Zytotrophoblasten). Dieser Prozess ist für die Versorgung und Entwicklung des Embryos von entscheidender Bedeutung. Ein Ausbleiben der Pseudo-Vaskulogenese führt zur Präeklampsie, einer hypertensiven Erkrankung in der Schwangerschaft. Antiangiogenes sEndoglin (soluble Endoglin) gilt als akkurater Risikomarker für das Auftreten von Präeklampsie (Luft, 2006; Levine et al., 2006).

Interessanterweise können Zytotrophoblasten nicht nur als Endothelzellen fungieren, sondern zeigen bei Kultivierung auf Matrigel das Phänomen der vaskulogenen Mimikry (Fukushima et al., 2005) und exprimieren zudem Endoglin. Im Gegensatz zum zellulären L-Endoglin, gilt sEndoglin als antiangiogen, es beeinträchtigt die Bindung von TGF- $\beta$  an seinen Rezeptor und somit dessen Signaltransduktion. sEndoglin inhibiert nicht nur die Röhrenbildung in-vitro, sondern auch die Zytotrophoblasten-Funktion in-vivo (Venkatesha et al., 2006). Auch diese Befunde legen nahe, dass L-Endoglin sowohl für die VM-Bildung auf Matrigel als auch für die Vermittlung eines endothelialen Phänotyps eine entscheidende Rolle spielt.

Zwischen dem invasiven Verhalten von Zytotrophoblasten und Krebszellen existieren auffällige Ähnlichkeiten (Kliman und Feinberg, 1990; Murray und Lessey, 1999; Bischof und Campana, 2000). Im Gegensatz zur Tumorzellinvasion, ist das Einwandern der Zytotrophoblasten jedoch zeitlich und räumlich reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass ein Spaltprodukt des KiSS-1-Proteins (das Kp-10 Dekapeptid) diese invasiven Vorgänge reguliert, indem es sowohl die Migration der Zellen inhibiert, als auch deren Gelatinasen-Aktivität supprimiert (Bilban et al., 2004).

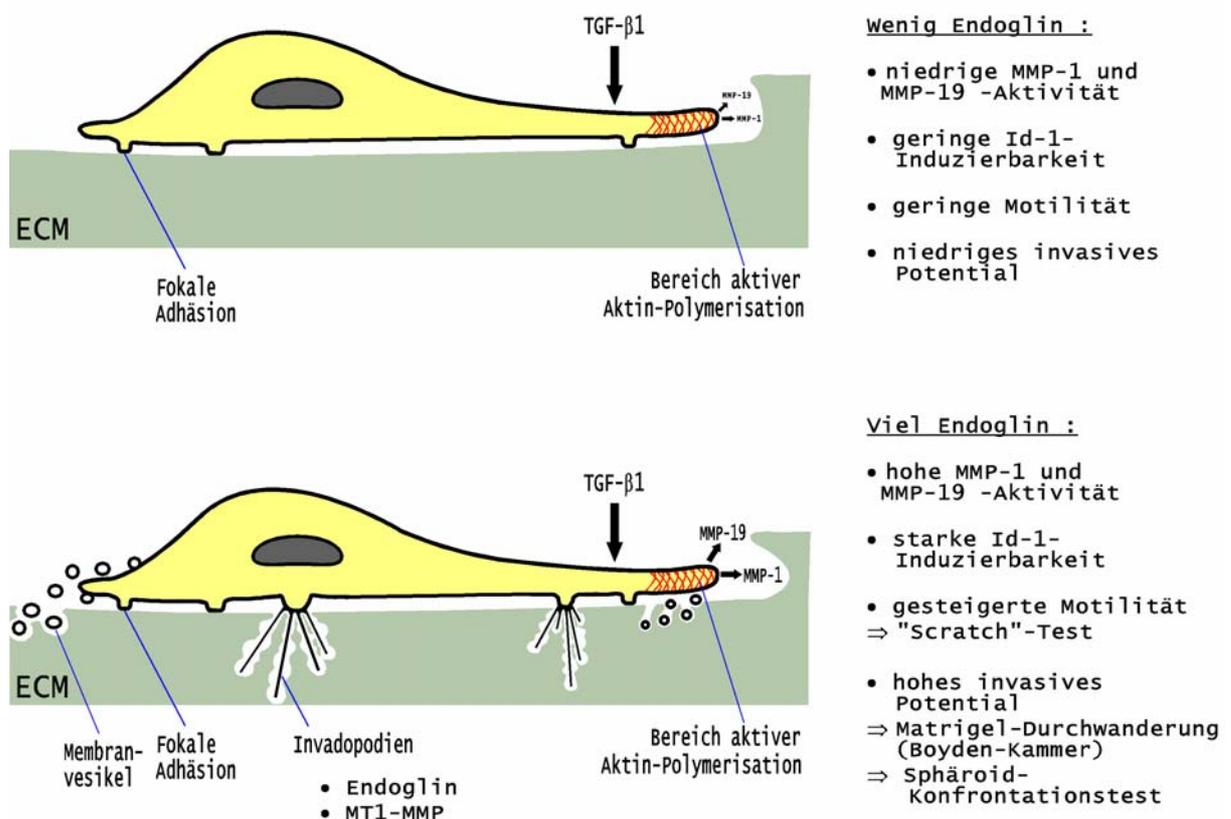
Die spezialisierten Epithelzellen der Plazenta sind also in der Lage, invasiv in fremde Gewebe einzuwandern und an dem Aufbau einer Gefäßwand teilzunehmen, wobei sie Endoglin auf hohem Niveau exprimieren.

## 4.4 Zusammenfassende Betrachtung der Invasivitätssteigerung durch das Endoglin-Protein

Durch künstliche Überexpression von Endoglin in MDA-MB-231-Zellen, konnte deren invasives Potential in-vitro deutlich gesteigert werden.

Es zeigte sich, dass Endoglin-überexprimierende Klone der Zelllinie Fähigkeiten erworben haben, die eine Zell-Vermehrung in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren ermöglichen. Solche Zellen können vermutlich auch Gewebe besiedeln, in denen ausschließlich Wachstumsfaktoren synthetisiert werden, die die Proliferation von MDA-MB-231-Zellen nicht stimulieren. Möglicherweise lässt sich die gesteigerte Metastasierung der Endoglin-exprimierenden MDA-MB-231-Brain-Zellen in das Hirngewebe von Versuchstieren auf diese Weise erklären.

Desweiteren führt die Endoglin-Überexpression zu einem signifikant motileren Phänotyp, so dass Zell-freie Areale im Rahmen des „Scratch-Tests“ schneller besiedelt wurden. Das hohe Migrationsvermögen ist Grundvoraussetzung eines jeden Invasionsvorgangs. Neben dieser reinen Migration wurde anschließend das invasive Potential der Zellen bestimmt. Dies erfolgte zunächst in der Mikrochemotaxis-Kammer, dann in einem dreidimensionalen Sphäroid-Konfrontations-Test. Im erstgenannten Experiment konnte eine deutlich schnellere Durchquerung der, mit



**Abb. 4.4** Strukturelle und molekulare Korrelate des invasiven Potentials der MDA-MB-231-Brusttumorzellen. Im Gegensatz zu parentalen MDA-MB-231-Zellen (wenig Endoglin, obere Bildhälfte), weisen Zellen der MDA-MB-231-Zelllinie L-End-3 metastasierungsfördernde Invadopodien und Membranvesikel auf. Darüber hinaus synthetisieren sie in größerem Ausmaß Invasivitäts-relevante Enzyme, wie MMP1 und MMP19.

Extrazellulär-Matrix-Proteinen beschichteten, Membran durch L-Endoglin-exprimierende MDA-MB-231-Zellen festgestellt werden. Am hierfür erforderlichen Abbau von ECM-Proteinen sind in der Regel Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Endoglin-exprimierende Zellen eine deutlich höhere Expression der Proteinasen MMP-1 und MMP-19 aufweisen. Eine gesteigerte Invasivität von L-Endoglin-produzierenden Zellen ließ sich auch im Rahmen des Sphäroid-Konfrontations-Tests nachweisen. Von chemotaktischen Reizen angezogen, adhärirten MDA-MB-231-L-End-3- und MDA-MB-231-Brain-Zellen zunächst an Sphäroid-Aggregate aus U343-Gliomazellen und wanderten dann in den gegenüberliegenden Zellverband ein. Gliomazell-Sphäroide, beispielsweise solche aus U118-MG-Zellen, enthalten Extrazellulär-Matrix-Proteine, wie Fibronectin, Laminin und Kollagen (Nederman et al., 1984). Es ist daher naheliegend, dass MMPs auch während der Sphäroid-Infiltration eine wichtige Rolle spielen.

Die Zellen produzieren jedoch nicht nur Invasionsfördernde Enzyme, sondern bilden auch Strukturen aus, die Membranständige oder -assoziierte Proteinasen zu den jeweiligen Substraten befördern. Derartige Zellfortsätze (Invadopodien) und -abschnürungen (Membranvesikel) steigern nicht nur die Invasivität, sondern unterstützen auch Angiogenese-ähnliche Prozesse, wie das Phänomen der vaskulogenen Mimikry (siehe weiter oben).

Das Endoglin-Protein wirkt also Metastasierungs-steigernd, indem es die Zellinvasion (siehe Abb. 4.4) oder Angiogenese-ähnliche Vorgänge, wie vaskulogene Mimikry fördert.

- Abrahams VM, Straszewski SL, Kamsteeg M, Hanczaruk B, Schwartz PE, Rutherford TJ *et al.*: **Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand.** *Cancer Res* 2003, **63**: 5573-5581.
- Albanese J, Meterissian S, Kontogianna M, Dubreuil C, Hand A, Sorba S *et al.*: **Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles.** *Blood* 1998, **91**: 3862-3874.
- Alexander P: **Proceedings: Escape from immune destruction by the host through shedding of surface antigens: is this a characteristic shared by malignant and embryonic cells?** *Cancer Res* 1974, **34**: 2077-2082.
- Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G: **Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components.** *Biochem J* 1995, **309 ( Pt 1)**: 299-306.
- Andre F, Andersen M, Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Serra V *et al.*: **Exosomes in cancer immunotherapy: preclinical data.** *Adv Exp Med Biol* 2001, **495**: 349-354.
- Andre F, Scharz NE, Chaput N, Flament C, Raposo G, Amigorena S *et al.*: **Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens.** *Vaccine* 2002, **20 Suppl 4**: A28-A31.
- Andre F, Scharz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P *et al.*: **Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes.** *Lancet* 2002, **360**: 295-305.
- Andre F, Escudier B, Angevin E, Tursz T, Zitvogel L: **Exosomes for cancer immunotherapy.** *Ann Oncol* 2004, **15 Suppl 4**: iv141-iv144.
- Andre F, Cabioglu N, Assi H, Sabourin JC, Delaloge S, Sahin A *et al.*: **Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer.** *Ann Oncol* 2006, **17**: 945-951.
- Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P: **12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region.** *Mol Cell Biol* 1987, **7**: 2256-2266.
- Angelucci A, D'Ascenzo S, Festuccia C, Gravina GL, Bologna M, Dolo V *et al.*: **Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines.** *Clin Exp Metastasis* 2000, **18**: 163-170.
- Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E *et al.*: **Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development.** *Dev Biol* 2000, **217**: 42-53.
- Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moisewitsch F, Yamada KM, Mueller SC: **Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function.** *Cancer Res* 2006, **66**: 3034-3043.
- Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A: **Molecular mechanisms of tumor vascularization.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2005, **54**: 53-61.
- Aulmann S, Adler N, Rom J, Helmchen B, Schirmacher P, Sinn HP: **c-myc amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences.** *J Clin Pathol* 2006, **59**: 424-428.
- Bachmeier BE, Rohrbach H, De Waal J, Jochum M, Nerlich AG: **Enhanced expression and activation of major matrix metalloproteinases in distinct topographic areas of invasive breast carcinomas.** *Int J Oncol* 2005, **26**: 1203-1207.

- Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C *et al.*: **Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization.** *Nat Med* 1998, **4**: 923-928.
- Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ: **Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival.** *Mol Pathol* 2002, **55**: 300-304.
- Baldassarre M, Pompeo A, Beznoussenko G, Castaldi C, Cortellino S, McNiven MA *et al.*: **Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells.** *Mol Biol Cell* 2003, **14**: 1074-1084.
- Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V, Lemaire R, Hemon B, Grard G *et al.*: **Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro.** *Clin Exp Metastasis* 2000, **18**: 171-178.
- Bamberger AM, Thuneke I, Schulte HM: **Differential regulation of the human 'leukemia inhibitory factor' (LIF) promoter in T47D and MDA-MB 231 breast cancer cells.** *Breast Cancer Res Treat* 1998, **47**: 153-161.
- Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP: **Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines.** *Oncogene* 1990, **5**: 893-899.
- Barz D, Goppelt M, Szamel M, Schirmmacher V, Resch K: **Characterization of cellular and extracellular plasma membrane vesicles from a non-metastasizing lymphoma (Eb) and its metastasizing variant (ESb).** *Biochim Biophys Acta* 1985, **814**: 77-84.
- Beck IM, Muller M, Mentlein R, Sadowski T, Mueller MS, Paus R *et al.*: **Matrix Metalloproteinase-19 Expression in Keratinocytes Is Repressed by Transcription Factors Tst-1 and Skn-1a: Implications for Keratinocyte Differentiation.** *J Invest Dermatol* 2006.
- Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG: **Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity.** *J Mol Med* 1997, **75**: 429-439.
- Beger B, Robertson K, Evans A, Grant A, Berg J: **Expression of endoglin and the activin receptor-like kinase 1 in skin suggests a role for these receptors in normal skin function and skin tumorigenesis.** *Br J Dermatol* 2006, **154**: 379-382.
- Behrens P, Rothe M, Wellmann A, Krischler J, Wernert N: **The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer.** *J Pathol* 2001, **194**: 43-50.
- Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S *et al.*: **Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions.** *Eur J Immunol* 1993, **23**: 2340-2345.
- Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H: **The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins.** *Cell* 1990, **61**: 49-59.
- Berx G, van Roy F: **The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression.** *Breast Cancer Res* 2001, **3**: 289-293.
- Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C *et al.*: **Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts.** *J Cell Sci* 2004, **117**: 1319-1328.

- Birnboim HC, Doly J: **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Res* 1979, **7**: 1513-1523.
- Bischof P, Campana A: **A putative role for oncogenes in trophoblast invasion?** *Hum Reprod* 2000, **15 Suppl 6**: 51-58.
- Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M *et al.*: **Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling.** *Nature* 2000, **406**: 536-540.
- Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteso M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C: **Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex.** *J Cell Physiol* 2005, **204**: 574-584.
- Blobe GC, Liu X, Fang SJ, How T, Lodish HF: **A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC.** *J Biol Chem* 2001, **276**: 39608-39617.
- Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE, Kaiser HE: **Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization.** *Anticancer Res* 1998, **18**: 3621-3628.
- Boon T, Coulie PG, Van den EB: **Tumor antigens recognized by T cells.** *Immunol Today* 1997, **18**: 267-268.
- Botella LM, Sanchez-Elsner T, Rius C, Corbi A, Bernabeu C: **Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation.** *J Biol Chem* 2001, **276**: 34486-34494.
- Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ: **Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix.** *Science* 1995, **267**: 891-893.
- Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M: **A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia.** *J Clin Invest* 1999, **104**: 1343-1351.
- Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**: 248-254.
- Brown MC, Turner CE: **Paxillin: adapting to change.** *Physiol Rev* 2004, **84**: 1315-1339.
- Buccione R, Orth JD, McNiven MA: **Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**: 647-657.
- Buhring HJ, Muller CA, Letarte M, Gougos A, Saalmuller A, van Agthoven AJ *et al.*: **Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow.** *Leukemia* 1991, **5**: 841-847.
- Burgstaller G, Gimona M: **Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, **288**: H3001-H3005.
- Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW *et al.*: **Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy.** *Clin Cancer Res* 1995, **1**: 1623-1634.
- Byfield SD, Roberts AB: **Lateral signaling enhances TGF-beta response complexity.** *Trends Cell Biol* 2004, **14**: 107-111.

- Cabioglu N, Sahin A, Doucet M, Yavuz E, Igci A, Yildirim O *et al.*: **Chemokine receptor CXCR4 expression in breast cancer as a potential predictive marker of isolated tumor cells in bone marrow.** *Clin Exp Metastasis* 2005, **22**: 39-46.
- Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, Broglio KR, Hortobagyi GN, Price JE *et al.*: **CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**: 5686-5693.
- Cabioglu N, Summy J, Miller C, Parikh NU, Sahin AA, Tuzlali S *et al.*: **CXCL-12/stromal cell-derived factor-1alpha transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation.** *Cancer Res* 2005, **65**: 6493-6497.
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr.: **Breast tumor cell lines from pleural effusions.** *J Natl Cancer Inst* 1974, **53**: 661-674.
- Cailleau R, Olive M, Cruciger QV: **Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization.** *In Vitro* 1978, **14**: 911-915.
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J *et al.*: **Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells.** *J Biol Chem* 1992, **267**: 19027-19030.
- Chen WT, Kelly T: **Seprase complexes in cellular invasiveness.** *Cancer Metastasis Rev* 2003, **22**: 259-269.
- Cicek M, Fukuyama R, Welch DR, Sizemore N, Casey G: **Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits gene expression by targeting nuclear factor-kappaB activity.** *Cancer Res* 2005, **65**: 3586-3595.
- Clarke R: **Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines.** *Breast Cancer Res Treat* 1996, **39**: 69-86.
- Clegg RM: **Fluorescence resonance energy transfer.** *Curr Opin Biotechnol* 1995, **6**: 103-110.
- Coleman RE, Rubens RD: **3(Amino-1,1-hydroxypropylidene) bisphosphonate (APD) for hypercalcaemia of breast cancer.** *Br J Cancer* 1987, **56**: 465-469.
- Coleman RE, Rubens RD: **The clinical course of bone metastases from breast cancer.** *Br J Cancer* 1987, **55**: 61-66.
- Condeelis J, Segall JE: **Intravital imaging of cell movement in tumours.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**: 921-930.
- Condeelis J, Singer RH, Segall JE: **The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, **21**: 695-718.
- Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabeu C *et al.*: **Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain.** *J Biol Chem* 2004, **279**: 27440-27449.
- Cornelius LA, Nehring LC, Roby JD, Parks WC, Welgus HG: **Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration.** *J Invest Dermatol* 1995, **105**: 170-176.
- Cuppen E, van Ham M, Wansink DG, de Leeuw A, Wieringa B, Hendriks W: **The zyxin-related protein TRIP6 interacts with PDZ motifs in the adaptor protein RIL and the protein tyrosine phosphatase PTP-BL.** *Eur J Cell Biol* 2000, **79**: 283-293.

- Dales JP, Garcia S, Bonnier P, Duffaud F, Andrac-Meyer L, Ramuz O *et al.*: **CD105 expression is a marker of high metastatic risk and poor outcome in breast carcinomas. Correlations between immunohistochemical analysis and long-term follow-up in a series of 929 patients.** *Am J Clin Pathol* 2003, **119**: 374-380.
- Dales JP, Garcia S, Andrac L, Carpentier S, Ramuz O, Lavaut MN *et al.*: **Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome.** *Int J Oncol* 2004, **24**: 1197-1204.
- Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Andrac L, Ramuz O, Lavaut MN *et al.*: **Prediction of metastasis risk (11 year follow-up) using VEGF-R1, VEGF-R2, Tie-2/Tek and CD105 expression in breast cancer (n=905).** *Br J Cancer* 2004, **90**: 1216-1221.
- Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Andrac L, Ramuz O, Lavaut MN *et al.*: **Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2/Tek, CD105, and CD31 immunocytochemical expression.** *Hum Pathol* 2004, **35**: 176-183.
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F: **The c-Myc target gene network.** *Semin Cancer Biol* 2006, **16**: 253-264.
- Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF: **Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**: 5545-5549.
- Declerck PJ, De Mol M, Alessi MC, Baudner S, Paques EP, Preissner KT *et al.*: **Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin).** *J Biol Chem* 1988, **263**: 15454-15461.
- Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ: **Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device.** *J Cell Sci* 2000, **113 Pt 19**: 3365-3374.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A: **TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression.** *Nat Genet* 2001, **29**: 117-129.
- Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW *et al.*: **MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells.** *Exp Cell Res* 2001, **263**: 209-223.
- Desprez PY, Lin CQ, Thomasset N, Sympton CJ, Bissell MJ, Campisi J: **A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the helix-loop-helix protein Id-1.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**: 4577-4588.
- Dolo V, Ginestra A, Gherzi G, Nagase H, Vittorelli ML: **Human breast carcinoma cells cultured in the presence of serum shed membrane vesicles rich in gelatinolytic activities.** *J Submicrosc Cytol Pathol* 1994, **26**: 173-180.
- Dolo V, Pizzurro P, Ginestra A, Vittorelli ML: **Inhibitory effects of vesicles shed by human breast carcinoma cells on lymphocyte 3H-thymidine incorporation, are neutralised by anti TGF-beta antibodies.** *J Submicrosc Cytol Pathol* 1995, **27**: 535-541.
- Dolo V, Adobati E, Canevari S, Picone MA, Vittorelli ML: **Membrane vesicles shed into the extracellular medium by human breast carcinoma cells carry tumor-associated surface antigens.** *Clin Exp Metastasis* 1995, **13**: 277-286.

- Dolo V, Ginestra A, Cassara D, Violini S, Lucania G, Torrisi MR *et al.*: **Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells.** *Cancer Res* 1998, **58**: 4468-4474.
- Dolo V, Ginestra A, Cassara D, Gherzi G, Nagase H, Vittorelli ML: **Shed membrane vesicles and selective localization of gelatinases and MMP-9/TIMP-1 complexes.** *Ann N Y Acad Sci* 1999, **878**: 497-499.
- Dolo V, D'Ascenzo S, Violini S, Pompucci L, Festuccia C, Ginestra A *et al.*: **Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro.** *Clin Exp Metastasis* 1999, **17**: 131-140.
- Dolo V, D'Ascenzo S, Giusti I, Millimaggi D, Taraboletti G, Pavan A: **Shedding of membrane vesicles by tumor and endothelial cells.** *Ital J Anat Embryol* 2005, **110**: 127-133.
- Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tovari J, Timar J: **Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications.** *Am J Pathol* 2007, **170**: 1-15.
- Drees BE, Andrews KM, Beckerle MC: **Molecular dissection of zyxin function reveals its involvement in cell motility.** *J Cell Biol* 1999, **147**: 1549-1560.
- Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S: **CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications.** *FASEB J* 2003, **17**: 984-992.
- Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N: **Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis.** *Breast Cancer Res* 2000, **2**: 252-257.
- Dumont N, Arteaga CL: **A kinase-inactive type II TGFbeta receptor impairs BMP signaling in human breast cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **301**: 108-112.
- Dumont N, Bakin AV, Arteaga CL: **Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells.** *J Biol Chem* 2003, **278**: 3275-3285.
- Egeblad M, Werb Z: **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**: 161-174.
- El Ashry D, Lippman ME: **Molecular biology of breast carcinoma.** *World J Surg* 1994, **18**: 12-20.
- Elliott RL, Blobe GC: **Role of transforming growth factor Beta in human cancer.** *J Clin Oncol* 2005, **23**: 2078-2093.
- Evans AJ, James JJ, Cornford EJ, Chan SY, Burrell HC, Pinder SE *et al.*: **Brain metastases from breast cancer: identification of a high-risk group.** *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2004, **16**: 345-349.
- Fabbro D, Kung W, Roos W, Regazzi R, Eppenberger U: **Epidermal growth factor binding and protein kinase C activities in human breast cancer cell lines: possible quantitative relationship.** *Cancer Res* 1986, **46**: 2720-2725.
- Falk W, Goodwin RH, Jr., Leonard EJ: **A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration.** *J Immunol Methods* 1980, **33**: 239-247.
- Farina AR, Coppa A, Tiberio A, Tacconelli A, Turco A *et al.*: **Transforming growth factor-beta1 enhances the invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells by up-regulating urokinase activity.** *Int J Cancer* 1998, **75**: 721-730.

- Farina AR, Tacconelli A, Cappabianca L, Gulino A, Mackay AR: **Inhibition of human MDA-MB-231 breast cancer cell invasion by matrix metalloproteinase 3 involves degradation of plasminogen.** *Eur J Biochem* 2002, **269**: 4476-4483.
- Ference BA, Shannon TM, White RI, Jr., Zawin M, Burdge CM: **Life-threatening pulmonary hemorrhage with pulmonary arteriovenous malformations and hereditary hemorrhagic telangiectasia.** *Chest* 1994, **106**: 1387-1390.
- Fidler IJ: **Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis.** *Surg Oncol Clin N Am* 2001, **10**: 257-viii.
- Fidler IJ: **The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**: 453-458.
- Folberg R, Rummelt V, Parys-Van Ginderdeuren R, Hwang T, Woolson RF, Pe'er J *et al.*: **The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma.** *Ophthalmology* 1993, **100**: 1389-1398.
- Fong S, Itahana Y, Sumida T, Singh J, Coppe JP, Liu Y *et al.*: **Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**: 13543-13548.
- Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S *et al.*: **Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies.** *J Cell Physiol* 2001, **188**: 1-7.
- Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P, Altomonte M, Maio M: **Emerging role of endoglin (CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human malignancies.** *Curr Cancer Drug Targets* 2003, **3**: 427-432.
- Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M: **Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels.** *Oncogene* 2003, **22**: 6557-6563.
- Förster T: **Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.** *Ann Phys* 1948, **2**: 55-75.
- Frazier MW, He X, Wang J, Gu Z, Cleveland JL, Zambetti GP: **Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**: 3735-3743.
- Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J *et al.*: **Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas.** *J Biol Chem* 1994, **269**: 16766-16773.
- Friedl P, Brocker EB: **The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix.** *Cell Mol Life Sci* 2000, **57**: 41-64.
- Friedl P, Wolf K: **Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes.** *Biochem Soc Symp* 2003, 277-285.
- Friend DS, Papahadjopoulos D, Debs RJ: **Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes.** *Biochim Biophys Acta* 1996, **1278**: 41-50.
- Fuchs E: **Das Sarkom des Uvealtractus.** *Graefe's Archiv für Ophthalmologie* 1882, 233.
- Fukushima K, Miyamoto S, Tsukimori K, Kobayashi H, Seki H, Takeda S *et al.*: **Tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor induce endothelial integrin repertoires, regulating endovascular differentiation and apoptosis in a human extravillous trophoblast cell line.** *Biol Reprod* 2005, **73**: 172-179.

- Gallione CJ, Klaus DJ, Yeh EY, Stenzel TT, Xue Y, Anthony KB *et al.*: **Mutation and expression analysis of the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia reveals null alleles.** *Hum Mutat* 1998, **11**: 286-294.
- Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH *et al.*: **Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases.** *Nature* 1994, **370**: 555-557.
- Gherzi G, Zhao Q, Salamone M, Yeh Y, Zucker S, Chen WT: **The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices.** *Cancer Res* 2006, **66**: 4652-4661.
- Giambernardi TA, Grant GM, Taylor GP, Hay RJ, Maher VM, McCormick JJ *et al.*: **Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells.** *Matrix Biol* 1998, **16**: 483-496.
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V: **Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5.** *Science* 1997, **277**: 225-228.
- Gilles C, Polette M, Birembaut P, Brunner N, Thompson EW: **Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines.** *Clin Exp Metastasis* 1997, **15**: 519-526.
- Ginestra A, Monea S, Seghezzi G, Dolo V, Nagase H, Mignatti P *et al.*: **Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells.** *J Biol Chem* 1997, **272**: 17216-17222.
- Goldring MB: **Degradation of articular cartilage in culture: regulatory factors.** In *Joint cartilage degradation*. Edited by Woessner JF, Howell DS. New York: Dekker; 1993:281-346.
- Gougos A, Letarte M: **Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line.** *J Immunol* 1988, **141**: 1934-1940.
- Gougos A, Letarte M: **Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line.** *J Immunol* 1988, **141**: 1925-1933.
- Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Buhring HJ *et al.*: **Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts.** *Int Immunol* 1992, **4**: 83-92.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P: **Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors.** *EMBO J* 2002, **21**: 1743-1753.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C *et al.*: **Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling.** *Mol Cell* 2003, **12**: 817-828.
- Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G: **Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-beta receptor signaling pathways.** *Trends Cardiovasc Med* 2003, **13**: 301-307.
- Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A, Perez-Alvarez MJ, Langa C, Lopez LA *et al.*: **Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts.** *Eur J Cell Biol* 1999, **78**: 614-623.
- Guo B, Rooney P, Slevin M, Li C, Parameshwar S, Liu D *et al.*: **Overexpression of CD105 in rat myoblasts: role of CD105 in cell attachment, spreading and survival.** *Int J Oncol* 2004, **25**: 285-291.

- Gur'ianova OA, Sablina AA, Chumakov PM, Frolova EI: **[Down-regulation of TRIP6 expression induces actin cytoskeleton rearrangements in human carcinoma cell lines]**. *Mol Biol (Mosk)* 2005, **39**: 905-909.
- Hainaut P, Hollstein M: **p53 and human cancer: the first ten thousand mutations**. *Adv Cancer Res* 2000, **77**: 81-137.
- Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner KT: **Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization**. *Nat Med* 1996, **2**: 529-533.
- Hanahan D: **Escherichia coli and Salmonella typhimurium**. In *Cellular and Molecular Biology*. Edited by Ingraham JL, Brooks Low K, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1987:1177.
- Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer**. *Cell* 2000, **100**: 57-70.
- Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW: **Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester**. *Biochem J* 1993, **296 ( Pt 3)**: 803-809.
- Hannon GJ, Beach D: **p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest**. *Nature* 1994, **371**: 257-261.
- Hao X, Sun B, Hu L, Lahdesmaki H, Dunmire V, Feng Y *et al.*: **Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis**. *Cancer* 2004, **100**: 1110-1122.
- Harbeck N, Kates RE, Schmitt M, Gauger K, Kiechle M *et al.*: **Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer**. *Clin Breast Cancer* 2004, **5**: 348-352.
- Harvath L, Falk W, Leonard EJ: **Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly**. *J Immunol Methods* 1980, **37**: 39-45.
- Hatori K, Nagai A, Heisel R, Ryu JK, Kim SU: **Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells**. *J Neurosci Res* 2002, **69**: 418-426.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Kirschmann DA, Seftor RE: **Molecular biology of breast cancer metastasis. Molecular expression of vascular markers by aggressive breast cancer cells**. *Breast Cancer Res* 2000, **2**: 417-422.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE: **Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma**. *Nat Rev Cancer* 2003, **3**: 411-421.
- Henson DE, Tarone RE: **Involution and the etiology of breast cancer**. *Cancer* 1994, **74**: 424-429.
- Hepner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH: **Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response**. *Am J Pathol* 1996, **149**: 273-282.
- Hess AR, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ: **Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry**. *Cancer Res* 2003, **63**: 4757-4762.

- Hess AR, Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Schneider GB, Seftor RE *et al.*: **Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype.** *Cancer Res* 2005, **65**: 9851-9860.
- Hidalgo M, Eckhardt SG: **Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy.** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**: 178-193.
- Hirtenlehner K, Pec M, Kubista E, Singer CF: **Influences of stroma-derived growth factors on the cytokine expression pattern of human breast cancer cell lines.** *Arch Gynecol Obstet* 2002, **266**: 108-113.
- Hirtenlehner K, Pec M, Kubista E, Singer CF: **Extracellular matrix proteins influence phenotype and cytokine expression in human breast cancer cell lines.** *Eur Cytokine Netw* 2002, **13**: 234-240.
- Hoang VM, Foulk R, Clauser K, Burlingame A, Gibson BW, Fisher SJ: **Functional proteomics: examining the effects of hypoxia on the cytotrophoblast protein repertoire.** *Biochemistry* 2001, **40**: 4077-4086.
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D *et al.*: **Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF.** *Science* 1999, **284**: 1994-1998.
- Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ: **Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3.** *J Cell Biol* 2000, **149**: 1309-1323.
- Hui L, Zheng Y, Yan Y, Bargonetti J, Foster DA: **Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D.** *Oncogene* 2006, **25**: 7305-7310.
- Hynes RO: **Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.** *Cell* 1992, **69**: 11-25.
- Ilunga K, Nishiura R, Inada H, El Keref A, Imanaka-Yoshida K, Sakakura T *et al.*: **Co-stimulation of human breast cancer cells with transforming growth factor-beta and tenascin-C enhances matrix metalloproteinase-9 expression and cancer cell invasion.** *Int J Exp Pathol* 2004, **85**: 373-379.
- Ishigaki S, Toi M, Ueno T, Matsumoto H, Muta M, Koike M *et al.*: **Significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in breast cancer.** *Jpn J Cancer Res* 1999, **90**: 516-522.
- Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ *et al.*: **Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases.** *J Biol Chem* 1996, **271**: 14657-14660.
- Jahn M: **Untersuchungen zum Einfluß selektierter arbuskulärer Mykorrhizapilze (AMP) und assoziativer Rhizoshärebakterien einzeln und kombiniert auf das Wachstum und den Zierwert von Zierpflanzen für den urbanen Bereich.** *Dissertation* 1998, 1-114.
- Jiang WG, Davies G, Martin TA, Parr C, Watkins G, Mason MD *et al.*: **Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells.** *Int J Mol Med* 2006, **17**: 583-590.
- Jones JL, Glynn P, Walker RA: **Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas.** *J Pathol* 1999, **189**: 161-168.
- Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM: **The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**: 457-461.

- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C *et al.*: **A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone.** *Cancer Cell* 2003, **3**: 537-549.
- Kang Y: **Pro-metastasis function of TGFbeta mediated by the Smad pathway.** *J Cell Biochem* 2006, **98**: 1380-1390.
- Kassel O, Schneider S, Heilbock C, Litfin M, Gottlicher M, Herrlich P: **A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF-kappaB-regulated promoters.** *Genes Dev* 2004, **18**: 2518-2528.
- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H *et al.*: **Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase.** *Science* 1995, **270**: 1491-1494.
- Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS: **Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin.** *Cancer Res* 2002, **62**: 6312-6317.
- Kinsella AR, Lepts GC, Hill CL, Jones M: **Reduced E-cadherin expression correlates with increased invasiveness in colorectal carcinoma cell lines.** *Clin Exp Metastasis* 1994, **12**: 335-342.
- Kinzler KW, Vogelstein B: **Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers.** *Nature* 1997, **386**: 761, 763.
- Kleinman HK, Kibbey MC, Schaper W, Hadley MA, Dym M, Grant DS: **Role of basement membrane in differentiation.** In *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes*. Edited by Rohrbach DH, Timpl R. New York: Academic Press; 1993:309-323.
- Kliman HJ, Feinberg RF: **Human trophoblast-extracellular matrix (ECM) interactions in vitro: ECM thickness modulates morphology and proteolytic activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**: 3057-3061.
- Kohler HP, Grant PJ: **Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease.** *N Engl J Med* 2000, **342**: 1792-1801.
- Kolb C, Mauch S, Peter HH, Krawinkel U, Sedlacek R: **The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient.** *Immunol Lett* 1997, **57**: 83-88.
- Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A *et al.*: **Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors.** *J Biol Chem* 2006, **281**: 25110-25123.
- Kontos CD, Cha EH, York JD, Peters KG: **The endothelial receptor tyrosine kinase Tie1 activates phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to inhibit apoptosis.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**: 1704-1713.
- Kortlever RM, Bernards R: **Senescence, wound healing and cancer: the PAI-1 connection.** *Cell Cycle* 2006, **5**: 2697-2703.
- Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V: **Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5.** *J Cell Biol* 2000, **148**: 615-624.
- Kousidou OC, Roussidis AE, Theocharis AD, Karamanos NK: **Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential.** *Anticancer Res* 2004, **24**: 4025-4030.
- Kousidou OC, Mitropoulou TN, Roussidis AE, Kletsas D, Theocharis AD, Karamanos NK: **Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors.** *Int J Oncol* 2005, **26**: 1101-1109.

- Kozma SC, Bogaard ME, Buser K, Saurer SM, Bos JL, Groner B *et al.*: **The human c-Kirsten ras gene is activated by a novel mutation in codon 13 in the breast carcinoma cell line MDA-MB231.** *Nucleic Acids Res* 1987, **15**: 5963-5971.
- König HG, Kogel D, Rami A, Prehn JH: **TGF- $\beta$ 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- $\kappa$ B signaling.** *J Cell Biol* 2005, **168**: 1077-1086.
- Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L *et al.*: **Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**: 4966-4971.
- Lacroix M, Haibe-Kains B, Hennuy B, Laes JF, Lallemand F, Gonze I *et al.*: **Gene regulation by phorbol 12-myristate 13-acetate in MCF-7 and MDA-MB-231, two breast cancer cell lines exhibiting highly different phenotypes.** *Oncol Rep* 2004, **12**: 701-707.
- Lacroix M, Leclercq G: **Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.** *Breast Cancer Res Treat* 2004, **83**: 249-289.
- Lai YJ, Chen CS, Lin WC, Lin FT: **c-Src-mediated phosphorylation of TRIP6 regulates its function in lysophosphatidic acid-induced cell migration.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**: 5859-5868.
- Lamouille S, Mallet C, Feige JJ, Bailly S: **Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis.** *Blood* 2002, **100**: 4495-4501.
- Lastres P, Martin-Perez J, Langa C, Bernabeu C: **Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin.** *Biochem J* 1994, **301 ( Pt 3)**: 765-768.
- Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U *et al.*: **Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1.** *J Cell Biol* 1996, **133**: 1109-1121.
- Lauria R, Perrone F, Carlomagno C, De Laurentiis M, Morabito A, Gallo C *et al.*: **The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer.** *Cancer* 1995, **76**: 1772-1778.
- Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M *et al.*: **Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction.** *EMBO J* 2004, **23**: 4018-4028.
- Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, ten Dijke P: **TGF-beta receptor function in the endothelium.** *Cardiovasc Res* 2005, **65**: 599-608.
- Lee JH, Welch DR: **Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1.** *Cancer Res* 1997, **57**: 2384-2387.
- Lee JW, Choi HS, Gyuris J, Brent R, Moore DD: **Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor.** *Mol Endocrinol* 1995, **9**: 243-254.
- Lei X, Bandyopadhyay A, Le T, Sun L: **Autocrine TGFbeta supports growth and survival of human breast cancer MDA-MB-231 cells.** *Oncogene* 2002, **21**: 7514-7523.
- Leontovich AA, Zhang J, Shimokawa K, Nagase H, Sarras MP, Jr.: **A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process.** *Development* 2000, **127**: 907-920.

- Leppa S, Saarto T, Vehmanen L, Blomqvist C, Elomaa I: **A high serum matrix metalloproteinase-2 level is associated with an adverse prognosis in node-positive breast carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**: 1057-1063.
- Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B *et al.*: **Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 33011-33019.
- Levi F, La Vecchia C, Schüler G, Bopp M, Tschopp A: **Vorkommen von Brustkrebs: Fakten und Trends.** In *Brustkrebs, Fakten und Handlungsbedarf, Nationales Krebs-Bekämpfungsprogramm.* Schweizerische Krebsliga; 1996.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP *et al.*: **Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia.** *N Engl J Med* 2006, **355**: 992-1005.
- Levy L, Hill CS: **Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2006, **17**: 41-58.
- Li B, Zhuang L, Reinhard M, Trueb B: **The lipoma preferred partner LPP interacts with alpha-actinin.** *J Cell Sci* 2003, **116**: 1359-1366.
- Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S: **CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells.** *FASEB J* 2000, **14**: 55-64.
- Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N *et al.*: **Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer.** *Int J Cancer* 2000, **89**: 122-126.
- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG *et al.*: **Defective angiogenesis in mice lacking endoglin.** *Science* 1999, **284**: 1534-1537.
- Li YM, Pan Y, Wei Y, Cheng X, Zhou BP, Tan M *et al.*: **Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis.** *Cancer Cell* 2004, **6**: 459-469.
- Lijnen HR: **Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling.** *Thromb Haemost* 2001, **86**: 324-333.
- Lin CQ, Singh J, Murata K, Itahana Y, Parrinello S *et al.*: **A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells.** *Cancer Res* 2000, **60**: 1332-1340.
- Lindemann RK, Ballschmieter P, Nordheim A, Dittmer J: **Transforming growth factor beta regulates parathyroid hormone-related protein expression in MDA-MB-231 breast cancer cells through a novel Smad/Ets synergism.** *J Biol Chem* 2001, **276**: 46661-46670.
- Lindemann RK, Nordheim A, Dittmer J: **Interfering with TGFbeta-induced Smad3 nuclear accumulation differentially affects TGFbeta-dependent gene expression.** *Mol Cancer* 2003, **2**: 20.
- Linder S, Aepfelbacher M: **Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells.** *Trends Cell Biol* 2003, **13**: 376-385.
- Linder S: **The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation.** *Trends Cell Biol* 2007, **17**: 107-117.
- Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S: **Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen.** *Nature* 1980, **284**: 67-68.
- Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**: 402-408.

- Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C: **Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia.** *J Mol Biol* 2007, **365**: 694-705.
- Lobmann R, Schultz G, Lehnert H: **Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications.** *Diabetes Care* 2005, **28**: 461-471.
- Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ: **Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells.** *J Cell Biol* 1997, **139**: 1861-1872.
- Luft FC: **Soluble endoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt) receptor as a pre-eclampsia molecule.** *Nephrol Dial Transplant* 2006, **21**: 3052-3054.
- Lund LR, Romer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ *et al.*: **Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways.** *Development* 1996, **122**: 181-193.
- Lupulescu A: **Estrogen use and cancer risk: a review.** *Exp Clin Endocrinol* 1993, **101**: 204-214.
- MacDonald NJ, Steeg PS: **Molecular basis of tumour metastasis.** *Cancer Surv* 1993, **16**: 175-199.
- Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J *et al.*: **Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection.** *Nat Med* 2000, **6**: 769-775.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A: **Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding.** *Immunity* 2001, **15**: 825-835.
- Maidment JM, Moore D, Murphy GP, Murphy G, Clark IM: **Matrix metalloproteinase homologues from Arabidopsis thaliana. Expression and activity.** *J Biol Chem* 1999, **274**: 34706-34710.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Sefter EA, Gardner LM, Pe'er J *et al.*: **Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry.** *Am J Pathol* 1999, **155**: 739-752.
- Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L: **Prognostic factors in early breast carcinoma.** *Cancer* 1994, **74**: 381-400.
- Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA, Pineiro A, Naval J, Lasiera P *et al.*: **The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack.** *Exp Cell Res* 2004, **295**: 315-329.
- Matrisian LM: **The matrix-degrading metalloproteinases.** *Bioessays* 1992, **14**: 455-463.
- McAllister KA, Baldwin MA, Thukkani AK, Gallione CJ, Berg JN, Porteous ME *et al.*: **Six novel mutations in the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 suggest a dominant-negative effect of receptor function.** *Hum Mol Genet* 1995, **4**: 1983-1985.
- McCawley LJ, Matrisian LM: **Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression.** *Mol Med Today* 2000, **6**: 149-156.
- McGuire WL, Clark GM: **Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer.** *N Engl J Med* 1992, **326**: 1756-1761.

- McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM: **Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3.** *Science* 2000, **289**: 1202-1206.
- McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C *et al.*: **Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1.** *J Biol Chem* 2001, **276**: 43503-43508.
- Menashi S, Dehem M, Souliac I, Legrand Y, Fridman R: **Density-dependent regulation of cell-surface association of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in breast-carcinoma cells.** *Int J Cancer* 1998, **75**: 259-265.
- Mentlein R, Buchholz C, Krisch B: **Somatostatin-binding sites on rat telencephalic astrocytes. Light- and electron-microscopic studies in vitro and in vivo.** *Cell Tissue Res* 1990, **262**: 431-443.
- Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB: **In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteases.** *J Cell Biol* 1989, **108**: 671-682.
- Millimaggi D, Festuccia C, Angelucci A, D'Ascenzo S, Rucci N *et al.*: **Osteoblast-conditioned media stimulate membrane vesicle shedding in prostate cancer cells.** *Int J Oncol* 2006, **28**: 909-914.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD *et al.*: **Genes that mediate breast cancer metastasis to lung.** *Nature* 2005, **436**: 518-524.
- Monsky WL, Lin CY, Aoyama A, Kelly T, Akiyama SK, Mueller SC *et al.*: **A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells.** *Cancer Res* 1994, **54**: 5702-5710.
- Moreau V, Tatin F, Varon C, Genot E: **Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**: 6809-6822.
- Mori H, Tomari T, Koshikawa N, Kajita M, Itoh Y, Sato H *et al.*: **CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain.** *EMBO J* 2002, **21**: 3949-3959.
- Moser B, Loetscher P: **Lymphocyte traffic control by chemokines.** *Nat Immunol* 2001, **2**: 123-128.
- Mueller SC, Ghersi G, Akiyama SK, Sang QX, Howard L, Pineiro-Sanchez M *et al.*: **A novel protease-docking function of integrin at invadopodia.** *J Biol Chem* 1999, **274**: 24947-24952.
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME *et al.*: **Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.** *Nature* 2001, **410**: 50-56.
- Mundy GR: **Mechanisms of bone metastasis.** *Cancer* 1997, **80**: 1546-1556.
- Munoz-Najar UM, Neurath KM, Vumbaca F, Claffey KP: **Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation.** *Oncogene* 2006, **25**: 2379-2392.
- Murphy G, Gavrilovic J: **Proteolysis and cell migration: creating a path?** *Curr Opin Cell Biol* 1999, **11**: 614-621.
- Murray MJ, Lessey BA: **Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis.** *Semin Reprod Endocrinol* 1999, **17**: 275-290.
- Murthy KK, Clark K, Fortin Y, Shen SH, Banville D: **ZRP-1, a zyxin-related protein, interacts with the second PDZ domain of the cytosolic protein tyrosine phosphatase hPTP1E.** *J Biol Chem* 1999, **274**: 20679-20687.

- Nakahara H, Howard L, Thompson EW, Sato H, Seiki M, Yeh Y *et al.*: **Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**: 7959-7964.
- Nanki T, Imai T, Nagasaka K, Urasaki Y, Nonomura Y, Taniguchi K *et al.*: **Migration of CX3CR1-positive T cells producing type 1 cytokines and cytotoxic molecules into the synovium of patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**: 2878-2883.
- Nederman T, Norling B, Glimelius B, Carlsson J, Brunk U: **Demonstration of an Extracellular Matrix in Multicellular Tumor Spheroids.** *Cancer Res* 1984, **44**: 3090-3097.
- Nielsen BS, Timshel S, Kjeldsen L, Sehested M, Pyke C *et al.*: **92 kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer.** *Int J Cancer* 1996, **65**: 57-62.
- Nielsen BS, Sehested M, Kjeldsen L, Borregaard N, Rygaard J, Dano K: **Expression of matrix metalloprotease-9 in vascular pericytes in human breast cancer.** *Lab Invest* 1997, **77**: 345-355.
- Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W *et al.*: **Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1.** *J Cell Sci* 2001, **114**: 111-118.
- Nutt JE, Lunec J: **Induction of metalloproteinase (MMP1) expression by epidermal growth factor (EGF) receptor stimulation and serum deprivation in human breast tumour cells.** *Eur J Cancer* 1996, **32A**: 2127-2135.
- Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E: **TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells.** *Genes Dev* 1996, **10**: 2462-2477.
- Oft M, Heider KH, Beug H: **TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis.** *Curr Biol* 1998, **8**: 1243-1252.
- Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y *et al.*: **Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence.** *Nature* 2001, **409**: 1067-1070.
- Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H *et al.*: **Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells.** *J Cell Physiol* 2002, **193**: 299-318.
- Paget S. **The distribution of secondary growths in cancer of the breast.** *Lancet* 1889, **1**: 571-573.
- Paquet ME, Pece-Barbara N, Vera S, Cymerman U, Karabegovic A, Shovlin C *et al.*: **Analysis of several endoglin mutants reveals no endogenous mature or secreted protein capable of interfering with normal endoglin function.** *Hum Mol Genet* 2001, **10**: 1347-1357.
- Paquette B, Bisson M, Baptiste C, Therriault H, Lemay R, Cantin AM: **Invasiveness of breast cancer cells MDA-MB-231 through extracellular matrix is increased by the estradiol metabolite 4-hydroxyestradiol.** *Int J Cancer* 2005, **113**: 706-711.
- Parker WL, Goldring MB, Philip A: **Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGFbeta receptor independent manner.** *J Bone Miner Res* 2003, **18**: 289-302.
- Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J: **Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data.** *IARC Sci Publ* 1992, 45-173.

- Pece-Barbara N, Vera S, Kathirkamathamby K, Liebner S, Di Guglielmo GM, Dejana E *et al.*: **Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway.** *J Biol Chem* 2005, **280**: 27800-27808.
- Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM: **Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**: 7621-7628.
- Pendas AM, Knauper V, Puente XS, Llano E, Mattei MG, Apte S *et al.*: **Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution.** *J Biol Chem* 1997, **272**: 4281-4286.
- Pepper MS: **Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity.** *Cytokine Growth Factor Rev* 1997, **8**: 21-43.
- Perez-Gomez E, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M *et al.*: **Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development.** *Oncogene* 2005, **24**: 4450-4461.
- Petit MM, Fradelizi J, Golsteyn RM, Ayoubi TA, Menichi B, Louvard D *et al.*: **LPP, an actin cytoskeleton protein related to zyxin, harbors a nuclear export signal and transcriptional activation capacity.** *Mol Biol Cell* 2000, **11**: 117-129.
- Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z: **Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer.** *Springer Semin Immunopathol* 2005, **27**: 375-387.
- Poste G, Nicolson GL: **Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, **77**: 399-403.
- Pouliot F, Labrie C: **Expression profile of agonistic Smads in human breast cancer cells: absence of regulation by estrogens.** *Int J Cancer* 1999, **81**: 98-103.
- Pouliot F, Labrie C: **Role of Smad1 and Smad4 proteins in the induction of p21WAF1,Cip1 during bone morphogenetic protein-induced growth arrest in human breast cancer cells.** *J Endocrinol* 2002, **172**: 187-198.
- Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM: **The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis.** *Curr Biol* 1999, **9**: 1441-1447.
- Prabhu S, Ignatova A, Park ST, Sun XH: **Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**: 5888-5896.
- Preuss U, Kreutzfeld R, Scheidtmann KH: **Tumor-derived p53 mutant C174Y is a gain-of-function mutant which activates the fos promoter and enhances colony formation.** *Int J Cancer* 2000, **88**: 162-171.
- Price JE: **Metastasis from human breast cancer cell lines.** *Breast Cancer Res Treat* 1996, **39**: 93-102.
- Price JT, Bonovich MT, Kohn EC: **The biochemistry of cancer dissemination.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997, **32**: 175-253.
- Pufe T, Bartscher M, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R: **Expression of pleiotrophin, an embryonic growth and differentiation factor, in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**: 660-667.

- Pufe T, Groth G, Goldring MB, Tillmann B, Mentlein R: **Effects of pleiotrophin, a heparin-binding growth factor, on human primary and immortalized chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**: 155-162.
- Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J: **The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells.** *EMBO J* 1995, **14**: 5884-5891.
- Qu R, Silver MM, Letarte M: **Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation.** *Cell Tissue Res* 1998, **292**: 333-343.
- Quintanilla M, Ramirez JR, Perez-Gomez E, Romero D, Velasco B, Letarte M *et al.*: **Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis.** *Oncogene* 2003, **22**: 5976-5985.
- Radisky DC, Bissell MJ: **Cancer. Respect thy neighbor!** *Science* 2004, **303**: 775-777.
- Reiss M, Barcellos-Hoff MH: **Transforming growth factor-beta in breast cancer: a working hypothesis.** *Breast Cancer Res Treat* 1997, **45**: 81-95.
- Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J: **Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta.** *Genes Dev* 1995, **9**: 1831-1845.
- Rha SY, Kim JH, Roh JK, Lee KS, Min JS, Kim BS *et al.*: **Sequential production and activation of matrix-metalloproteinase-9 (MMP-9) with breast cancer progression.** *Breast Cancer Res Treat* 1997, **43**: 175-181.
- Ridgway PF, Ziprin P, Alkhamisi N, Paraskeva PA, Peck DH, Darzi AW: **Hypoxia augments gelatinase activity in a variety of adenocarcinomas in vitro.** *J Surg Res* 2005, **124**: 180-186.
- Rodriguez-Barbero A, Obreo J, Alvarez-Munoz P, Pandiella A, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM: **Endoglin modulation of TGF-beta1-induced collagen synthesis is dependent on ERK1/2 MAPK activation.** *Cell Physiol Biochem* 2006, **18**: 135-142.
- Rosen EM, Fan S, Isaacs C: **BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research.** *Endocr Relat Cancer* 2005, **12**: 533-548.
- Rosen PP: **Invasive mammary carcinoma.** In *Diseases of the breast*. Edited by Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.
- Ruf W, Seftor EA, Petrovan RJ, Weiss RM, Gruman LM *et al.*: **Differential role of tissue factor pathway inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry.** *Cancer Res* 2003, **63**: 5381-5389.
- Ruzinova MB, Schoer RA, Gerald W, Egan JE, Pandolfi PP, Rafii S *et al.*: **Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors.** *Cancer Cell* 2003, **4**: 277-289.
- Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M *et al.*: **Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP.** *J Cell Biol* 2004, **167**: 769-781.
- Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Ludwig A, Proksch E, Titz B *et al.*: **Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces epithelial cell migration.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**: 870-880.
- Safina A, Vandette E, Bakin AV: **ALK5 promotes tumor angiogenesis by upregulating matrix metalloproteinase-9 in tumor cells.** *Oncogene* 2006.

- Saharinen P, Kerkela K, Ekman N, Marron M, Brindle N, Lee GM *et al.*: **Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2.** *J Cell Biol* 2005, **169**: 239-243.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
- Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C: **Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 43799-43808.
- Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabeu C: **Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins.** *J Biol Chem* 2004, **279**: 32858-32868.
- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M *et al.*: **Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation.** *Nature* 1995, **376**: 70-74.
- Schaller MD: **Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein.** *Oncogene* 2001, **20**: 6459-6472.
- Schmitt M, Goretzki L, Janicke F, Calvete J, Eulitz M, *et al.*: **Biological and clinical relevance of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) in breast cancer.** *Biomed Biochim Acta* 1991, **50**: 731-741.
- Seals DF, Azucena EF, Jr., Pass I, Tesfay L, Gordon R, Woodrow M *et al.*: **The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells.** *Cancer Cell* 2005, **7**: 155-165.
- Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, Pe'er J, Maniotis AJ, Trent JM *et al.*: **Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis.** *Clin Exp Metastasis* 2002, **19**: 233-246.
- Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M *et al.*: **Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix /metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma.** *Cancer Res* 2001, **61**: 6322-6327.
- Selvamurugan N, Fung Z, Partridge NC: **Transcriptional activation of collagenase-3 by transforming growth factor-beta1 is via MAPK and Smad pathways in human breast cancer cells.** *FEBS Lett* 2002, **532**: 31-35.
- Selvamurugan N, Kwok S, Partridge NC: **Smad3 interacts with JunB and Cbfa1/Runx2 for transforming growth factor-beta1-stimulated collagenase-3 expression in human breast cancer cells.** *J Biol Chem* 2004, **279**: 27764-27773.
- Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR: **Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles.** *Cancer Res* 2003, **63**: 4331-4337.
- Sheen-Chen SM, Chen HS, Eng HL, Sheen CC, Chen WJ: **Serum levels of matrix metalloproteinase 2 in patients with breast cancer.** *Cancer Lett* 2001, **173**: 79-82.
- Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman CE, Seidman JG: **Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia.** *Am J Hum Genet* 1997, **61**: 68-79.
- Siegel PM, Massague J: **Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**: 807-821.

- Singh G, Foster CS: **Gross factors in treatment of nonhealing corneal ulcers and recurrent erosions.** *Cornea* 1989, **8**: 45-53.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** *Science* 1987, **235**: 177-182.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A *et al.*: **Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.** *N Engl J Med* 2001, **344**: 783-792.
- Sliva D, English D, Lyons D, Lloyd FP, Jr.: **Protein kinase C induces motility of breast cancers by upregulating secretion of urokinase-type plasminogen activator through activation of AP-1 and NF-kappaB.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **290**: 552-557.
- Sloan EK, Anderson RL: **Genes involved in breast cancer metastasis to bone.** *Cell Mol Life Sci* 2002, **59**: 1491-1502.
- Smorenburg SM, Van Noorden CJ: **The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies.** *Pharmacol Rev* 2001, **53**: 93-105.
- Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemler R, Gelmann EP, Byers SW: **Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities.** *Cell Growth Differ* 1991, **2**: 365-372.
- Sommers CL, Byers SW, Thompson EW, Torri JA, Gelmann EP: **Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines.** *Breast Cancer Res Treat* 1994, **31**: 325-335.
- Spano JP, Andre F, Morat L, Sabatier L, Besse B, Combadiere C *et al.*: **Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome.** *Ann Oncol* 2004, **15**: 613-617.
- Stark AM, Anuszkiewicz B, Mentlein R, Yoneda T, Mehdorn HM, Held-Feindt J: **Differential expression of matrix metalloproteinases in brain- and bone-seeking clones of metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells.** *J Neurooncol* 2007, **81**: 39-48.
- Stawowy P, Margeta C, Kallisch H, Seidah NG, Chretien M, Fleck E *et al.*: **Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-beta1 involves furin-convertase.** *Cardiovasc Res* 2004, **63**: 87-97.
- Sternlicht MD, Werb Z: **How matrix metalloproteinases regulate cell behavior** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001, **17**: 463-516.
- Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendas AM, Smith B, Lopez-Otin C *et al.*: **Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme.** *J Biol Chem* 2000, **275**: 14809-14816.
- Strozyk E, Kulms D: **NFkB: cell survival or cell death?** *Signal Transduction* 2005, **5**: 334-349.
- Sun B, Zhang S, Zhang D, Du J, Guo H, Zhao X *et al.*: **Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma.** *Oncol Rep* 2006, **16**: 693-698.

- Sympson CJ, Talhouk RS, Alexander CM, Chin JR, Clift SM, Bissell MJ *et al.*: **Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression.** *J Cell Biol* 1994, **125**: 681-693.
- Szekanecz Z, Haines GK, Harlow LA, Shah MR, Fong TW, Fu R *et al.*: **Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)-beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease.** *Clin Immunol Immunopathol* 1995, **76**: 187-194.
- Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y *et al.*: **Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**: 524-32.
- Takanami I: **Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis.** *Int J Cancer* 2003, **105**: 186-189.
- Takino T, Koshikawa N, Miyamori H, Tanaka M, Sasaki T, Okada Y *et al.*: **Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastin by matrix metalloproteinases.** *Oncogene* 2003, **22**: 4617-4626.
- Tang H, Low B, Rutherford SA, Hao Q: **Thrombin induces endocytosis of endoglin and type-II TGF-beta receptor and down-regulation of TGF-beta signaling in endothelial cells.** *Blood* 2005, **105**: 1977-1985.
- Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V: **Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells.** *Am J Pathol* 2002, **160**: 673-680.
- Taraboletti G, D'Ascenzo S, Giusti I, Marchetti D, Borsotti P, Millimaggi D *et al.*: **Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH.** *Neoplasia* 2006, **8**: 96-103.
- Taverna S, Gherzi G, Ginestra A, Rigogliuso S, Pecorella S, Alaimo G *et al.*: **Shedding of membrane vesicles mediates fibroblast growth factor-2 release from cells.** *J Biol Chem* 2003, **278**: 51911-51919.
- Taylor DD, Black PH: **Shedding of plasma membrane fragments. Neoplastic and developmental importance.** *Dev Biol (N Y 1985)* 1986, **3**: 33-57.
- Taylor DD, Taylor CG, Jiang CG, Black PH: **Characterization of plasma membrane shedding from murine melanoma cells.** *Int J Cancer* 1988, **41**: 629-635.
- Tester AM, Waltham M, Oh SJ, Bae SN, Bills MM, Walker EC *et al.*: **Pro-matrix metalloproteinase-2 transfection increases orthotopic primary growth and experimental metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells in nude mice.** *Cancer Res* 2004, **64**: 652-658.
- Thomasset N, Lochter A, Sympson CJ, Lund LR, Williams DR, Behrendtsen O *et al.*: **Expression of autoactivated stromelysin-1 in mammary glands of transgenic mice leads to a reactive stroma during early development.** *Am J Pathol* 1998, **153**: 457-467.
- Thompson EW, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R *et al.*: **Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines.** *J Cell Physiol* 1992, **150**: 534-544.

- Thompson WD: **Genetic epidemiology of breast cancer.** *Cancer* 1994, **74**: 279-287.
- Torsney E, Charlton R, Parums D, Collis M, Arthur HM: **Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo.** *Inflamm Res* 2002, **51**: 464-470.
- Trask DK, Band V, Zajchowski DA, Yaswen P, Suh T, Sager R: **Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**: 2319-2323.
- Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T *et al.*: **Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester.** *Cancer Res* 1982, **42**: 1530-1536.
- Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, Brugman M, Itoh S, Lebrin F *et al.*: **Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells.** *Circulation* 2002, **106**: 2263-2270.
- Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G: **Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact.** *Blood* 2000, **96**: 2673-2681.
- van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH: **Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, **26**: 716-728.
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T *et al.*: **Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia.** *Nat Med* 2006, **12**: 642-649.
- Vilar JM, Jansen R, Sander C: **Signal processing in the TGF-beta superfamily ligand-receptor network.** *PLoS Comput Biol* 2006, **2**: e3.
- Visse R, Nagase H: **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.** *Circ Res* 2003, **92**: 827-839.
- von Lintig FC, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR: **Ras activation in human breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2000, **62**: 51-62.
- Walker-Daniels J, Hess AR, Hendrix MJ, Kinch MS: **Differential regulation of EphA2 in normal and malignant cells.** *Am J Pathol* 2003, **162**: 1037-1042.
- Wang JM, Kumar S, Pye D, van Agthoven AJ, Krupinski J, Hunter RD: **A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues.** *Int J Cancer* 1993, **54**: 363-370.
- Wang SJ, Saadi W, Lin F, Minh-Canh NC, Li JN: **Differential effects of EGF gradient profiles on MDA-MB-231 breast cancer cell chemotaxis.** *Exp Cell Res* 2004, **300**: 180-189.
- Wang Y, Doohar JE, Koedood ZM, Gilmore TD: **Characterization of mouse Trip6: a putative intracellular signaling protein.** *Gene* 1999, **234**: 403-409.
- Wang Y, Gilmore TD: **LIM domain protein Trip6 has a conserved nuclear export signal, nuclear targeting sequences, and multiple transactivation domains.** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1538**: 260-272.
- Warso MA, Maniotis AJ, Chen X, Majumdar D, Patel MK, Shilkaitis A *et al.*: **Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary cutaneous melanoma.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**: 473-477.
- Weaver AM: **Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion.** *Clin Exp Metastasis* 2006, **23**: 97-105.

- Weil RJ, Palmieri DC, Bronder JL, Stark AM, Steeg PS: **Breast cancer metastasis to the central nervous system.** *Am J Pathol* 2005, **167**: 913-920.
- Weinberg RA: *The Biology of Cancer*. New York: Garland Science; 2007.
- Welch DR, Steeg PS, Rinker-Schaeffer CW: **Molecular biology of breast cancer metastasis. Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis.** *Breast Cancer Res* 2000, **2**: 408-416.
- Wilson CA, Cajulis EE, Green JL, Olsen TM, Chung YA *et al.*: **HER-2 overexpression differentially alters transforming growth factor-beta responses in luminal versus mesenchymal human breast cancer cells.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**: R1058-R1079.
- Witty JP, Wright JH, Matrisian LM: **Matrix metalloproteinases are expressed during ductal and alveolar mammary morphogenesis, and misregulation of stromelysin-1 in transgenic mice induces unscheduled alveolar development.** *Mol Biol Cell* 1995, **6**: 1287-1303.
- Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C *et al.*: **Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming.** *Nat Med* 2001, **7**: 297-303.
- Worley MJ, Nieman GS, Geddes K, Heffron F: **Salmonella typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**: 17915-17920.
- Xu J, Lai YJ, Lin WC, Lin FT: **TRIP6 enhances lysophosphatidic acid-induced cell migration by interacting with the lysophosphatidic acid 2 receptor.** *J Biol Chem* 2004, **279**: 10459-10468.
- Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M *et al.*: **Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin.** *J Cell Biol* 2005, **168**: 441-452.
- Yamaguchi H, Pixley F, Condeelis J: **Invadopodia and podosomes in tumor invasion.** *Eur J Cell Biol* 2006, **85**: 213-218.
- Yamaguchi H, Condeelis J: **Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion.** *Biochim Biophys Acta* 2006.
- Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME: **Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**: 5284-5288.
- Yang XH, Hand RA, Livasy CA, Cance WG, Craven RJ: **Overexpression of the receptor tyrosine kinase Tie-1 intracellular domain in breast cancer.** *Tumour Biol* 2003, **24**: 61-69.
- Yi J, Kloeker S, Jensen CC, Bockholt S, Honda H, Hirai H *et al.*: **Members of the Zyxin family of LIM proteins interact with members of the p130Cas family of signal transducers.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 9580-9589.
- Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R *et al.*: **TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development.** *J Clin Invest* 1999, **103**: 197-206.
- Yokota J: **Tumor progression and metastasis.** *Carcinogenesis* 2000, **21**: 497-503.
- Yoneda T, Sasaki A, Dunstan C, Williams PJ, Bauss F, De Clerck YA *et al.*: **Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2.** *J Clin Invest* 1997, **99**: 2509-2517.

Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, Niewolna M, Nishimura R: **A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro.** *J Bone Miner Res* 2001, **16**: 1486-1495.

Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ: **Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid.** *J Biol Chem* 1995, **270**: 18997-19007.

Zhu Y, Sun Y, Xie L, Jin K, Sheibani N, Greenberg DA: **Hypoxic induction of endoglin via mitogen-activated protein kinases in mouse brain microvascular endothelial cells.** *Stroke* 2003, **34**: 2483-2488.

Zlotnik A: **Chemokines in neoplastic progression.** *Semin Cancer Biol* 2004, **14**: 181-185.

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Karzinogenese	3
1.2	Die metastatische Kaskade	6
1.3	Brusttumorzell-Thrombus in einem lymphatischen Gefäß	8
1.4	Der TGF- $\beta$ /ALK-5-Signaltransduktionsweg	14
1.5	Der TGF- $\beta$ /ALK-1-Signaltransduktionsweg	15
1.6	Die Struktur der extrazellulären Domäne von Endoglin (CD105)	17
1.7	Molekulares Profil der selektiv metastasierenden MDA-MB-231-Brusttumorzellen	21
2.1	Der Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(-) der Fa. Invitrogen	36
2.2	Das Zeocin-Selektionsreagenz	44
2.3	Das Prinzip der Real-time-RT-PCR mittels 5'-Nuklease-Methode	47
2.4	Das Biotin-Streptavidin-System für den Nachweis von Antigenen in der Immuncyto- und Immunhistochemie	55
2.5	Die Mikrochemotaxis-Kammer AP48 von Neuro Probe Inc.	57
2.6	Mittels Cyquant-Test ermittelte DNA-Standard-Kurve	60
2.7	Zellzahl-Standard-Kurve	61
3.1	Relative Promotor-Aktivität des Hypoxia-Response-Elements (HRE) in parentalen MDA-MB-231 Zellen und der hirnmetastasierenden Linie MDA-MB-231- Brain	66
3.2	Die Expressionsvektoren pcEXV-3-EndoL und pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoL	68
3.3	Überprüfung des pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoL-Klons	69
3.4	Der Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoS	70
3.5	Überprüfung des pcDNA3.1/Zeo(-)-EndoS-Klons	71
3.6	Der shRNA (small-hairpin RNA) –Vektor pSUPER-Zeo-EndoEx4 zur Reduktion der Endoglin-Expression der MDA-MB-231-Brain-Zelllinie	72

3.7	Überprüfung des pSUPER-Zeo-EndoEx4 –Klons	73
3.8	MDA-MB-231-Brain-Zellen nach Transfektion mit dem shRNA-Vektor pSUPER-Zeo-EndoEx4 und 10-tägiger Selektion mit Hilfe des Reagenzes Zeocin	76
3.9	Bestimmung der relativen Endoglin-Expression in verschiedenen MDA-MB-231 Zelllinien und Vergleichszellen mittels quantitativer RT PCR	77
3.10	Immunocytochemische Darstellung des TyplII-TGF $\beta$ -Rezeptors Endoglin in verschiedenen MDA-MB-231 Brusttumorzelllinien	79
3.11	Immunfluoreszenz-Darstellung von Endoglin (grün) und dem Endoglin-Interaktionsprotein ZRP-1 (Zyxin-related protein-1, rot)	80
3.12	Endoglin-Expression auf Proteinebene in parentalen MDA-MB-231-Zellen und den abgeleiteten Klonen L-End-3 und S-End-8	82
3.13	Elektronenmikroskopische Darstellung (TEM) von Invadopodien und seitlichen Zellausläufern	83
3.14	Elektronenmikroskopische Darstellung der Freisetzung von Membranvesikeln bei verschiedenen MDA-MB-231-Brusttumorzelllinien	84
3.15	Subzelluläre Lokalisation von Endoglin in Zellen des L-Endoglin-Klons L-End-3 (TEM)	85
3.16	Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Expression von Id1 in Zellen mit unterschiedlicher Endoglin-Expression (Western-Blot)	87
3.17	Dosisabhängigkeit der Id1-Induktion in MDA-MB-231-Brusttumorzellen bei TGF- $\beta$ 1-Stimulation	88
3.18	Dosisabhängigkeit der Tie-1-Induktion in parentalen MDA-MB-231-Brusttumorzellen, sowie dem Klon L-End-3	90
3.19	Einfluss von Endoglin auf die Expression von <i>pai-1</i> ( <i>plasminogen-aktivator-inhibitor-1</i> ) in verschiedenen MDA-MB-231 Brusttumorzelllinien	92
3.20	Expression der Matrix-Metalloproteinasen MMP-1 und MMP-19	93
3.21	Proliferationsverhalten der verschiedenen MDA-MB-231-Zelllinien unter serumfreien Bedingungen	94
3.22	Migratorisches Verhalten der Brusttumorzellen in einem zweidimensionalen System („Scratch-Test“)	96
3.23	Invasives Verhalten unstimulierter und TGF- $\beta$ 1-stimulierter MDA-MB-231-Zelllinien und –Klone in der Mikrochemotaxis-Kammer	98
3.24	Herstellung von Sphäroiden aus MDA-MB-231-Zelllinien und –Klonen, sowie U343-Gliomazellen	100
3.25	Invasivität der MDA-MB-231-Zelllinien Parental und Brain beim Sphäroid-Konfrontationstest	101

---

3.26	Invasivität der MDA-MB-231-Klone S-End-8 und L-End-3 beim Sphäroid-Konfrontationstest	102
3.27	Der etablierte Sphäroid-Konfrontationstest: Verhalten der MDA-MB-231-L-End-3-Zellen in Anwesenheit eines neutralisierenden Anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörpers	103
3.28	Invasivität des MDA-MB-231-Klons L-End-3 beim Sphäroid-Konfrontationstest (Detail)	104
3.29	Invasivität der MDA-MB-231-Zelllinie Brain beim Sphäroid-Konfrontationstest (Detail)	105
3.30	Erste Hinweise auf vaskulogene Mimikry	107
3.31	Wachstum von MDA-MB-231-Parental und -L-End-3-Zellen auf Matrigel	108
3.32	Wachstum von MDA-MB-231-Brain Zellen und dem Klon PSU-7 auf Matrigel	108
3.33	Wachstumsverhalten des MDA-MB-231 Klons L-End-3 bei 48h Kultivierung auf Matrigel in Anwesenheit von 5% (v/v) FKS (Detailaufnahmen)	109
3.34	Kultivierung des Klons MDA-MB-231–L-End-3 unter serumfreien Bedingungen und in Anwesenheit des RGD-Peptids	110
3.35	Zellorganisation von Endothelzellen bei Kultivierung auf Extrazellulär-Matrix-Proteinen (Matrigel)	111
3.36	Kultivierung von MDA-MB-231 Brusttumor- und HUVEC-Zellen auf einem Matrigel-Kollagen-Typl-Gemisch	112
4.1	Die „seed and soil“-Analogie der Tumormetastasierung	114
4.2	Der Matrix-Abbau an Podosomen und Invadopodien	127
4.3	Die Tumorangio-genese und Angiogenese-ähnliche Prozesse	136
4.4	Strukturelle und molekulare Korrelate des invasiven Potentials der MDA-MB-231-Brusttumorzellen	139

## Tabellenverzeichnis

### Tabelle

1.1	Metastasierungs-Suppressoren von Brusttumorzellen	8
1.2	Abhängigkeit des Metastasierungsverhaltens vom Ort der Brusttumorzell-Injektion bei in-vivo-Maus-Experimenten	10
1.3	Die Vertreter der TGF- $\beta$ Superfamilie	11
2.1	Für Klonierungs- und Transfektionsexperimente verwendete Vektoren	24
2.2	Für die Vektoramplifikation und Klonselktion in Prokaryoten ( <i>E. coli</i> ) verwendete Antibiotika-Konzentrationen	28
2.3	Das, in Rahmen der Real-Time-RT-PCR verwendete, Thermocycler-Programm	48
2.4	TaqMan-Gen-Expressionssysteme für die quantitative RT-PCR	48
2.5	Gel-Zusammensetzung bei Verwendung von Acrylamid-Bis-Lösung (29:1) von Serva	51
2.6	Empfohlene Porengrößen für SDS-Polyacrylamid-Gele	53
2.7	Primär- und Sekundärantikörper für Immunoblots	54
2.8	Methoden zur Bestimmung der Zellzahlen	59
3.1	Überprüfung des putativen pcDNA3.1-Zeo(-)-EndoL-Klons mittels Restriktionsanalyse	69
3.2	Überprüfung des putativen pcDNA3.1-Zeo(-)-EndoS-Klons mittels Restriktionsanalyse	71
3.3	Überprüfung des putativen pSUPER-Zeo-EndoEx4-Klons mittels Restriktionsanalyse	73
3.4	Relative Migrationsgeschwindigkeit der MDA-MB-231-Zelllinien im Scratch-Test	97
4.1	Molekulare Zusammensetzung von Invadopodien	129
4.2	Biologisch aktive Bestandteile von Membran-Vesikeln	131

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig von mir verfasst wurde und keine weiteren, als die darin angegebenen, Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Diese Arbeit hat weder in gleicher, noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, 18. April 2007

(Daniel Oxmann)

## Lebenslauf

Name		Daniel Oxmann
Anschrift		Olshausenstr. 81 24106 Kiel
Geboren		19. Januar 1973 in Schleswig
Familienstand		ledig
Staatsangehörigkeit		deutsch
Hochschulausbildung	seit 09/2004	Promotion am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Arbeitsgruppe Mentlein
	10/1997 – 10/2003	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abschluss Diplom, Note: sehr gut Diplomarbeit bei Prof. Dr. Knut Heller, Institut für Mikrobiologie, Bundesanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Kiel Thema: „Charakterisierung phagen-resistenter ISS1-Insertionsmutanten von <i>Lactococcus lactis</i> “
	04/1994 – 09/1997	Studium der Chemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
	04/1983 – 05/1992	Lornsenschule (Gymnasium) in Schleswig Abschluss: Abitur
Schulausbildung	08/1981 – 04/1983	Grundschule Nübel
	08/1979 – 07/1981	Grundschule Neuberend
Ersatzdienst	12/1992 – 02/1994	Tierschutzverein Schleswig