

Technische Universität München  
Frauenklinik der Technischen Universität München  
Klinische Forschergruppe

**Die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Migration humaner  
Ovarialkarzinomzellen als Funktion des  
Metastasierungssuppressors KAI1 (CD82) und seiner  
Splice-Variante sowie deren Interaktion  
mit dem Zell/Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin**

**Sina Upheber**

Vollständiger Abdruck der von der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt
2. Univ.-Prof. Dr. B. Schmalfeldt

Die Dissertation wurde am 10.04.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät der Medizin am 21.01.2015 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Ovarialkarzinom	1
1.2 Zellbiologische Aspekte der Metastasierung des Ovarialkarzinoms	2
1.3 Der Metastasierungssuppressor KAI1-Wildtyp	5
1.3.1 KAI1-Wildtyp, ein Mitglied der Tetraspanin-Superfamilie	5
1.3.2 Die Funktion des KAI1-Wildtyp als Metastasierungssuppressor	8
1.4 Die Splice-Variante des KAI1 (KAI1-Splice)	10
1.5 Integrine: Wichtige Interaktionspartner der KAI1-Proteine bei (tumor)-zellbiologischen Prozessen	12
1.5.1 Die Superfamilie der Integrine	12
1.5.2 Die Rolle des Integrins $\alpha_v\beta_3$ in der Tumorpathologie des Ovarialkarzinoms	15
1.6 Die zelluläre Migration	16
1.6.1 Die Rolle der Integrine bei der zellulären Migration	16
1.6.2 Das Zusammenspiel von KAI1-Proteinen und Integrinen bei der zellulären Migration	19
1.7 Die Wechselwirkung der KAI1-Proteine mit dem Zell/Zell-Adhäsionsrezeptor E-Cadherin	20
1.8 Zielsetzung	24
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1 Zelllinie	25
2.2 Materialien und Reagenzien	25
2.2.1 Materialien und Reagenzien für die Zellkultur und zellbiologische Versuchsansätze	25
2.2.2 Geräte	29
2.2.3 Software	29
2.3 Zellbiologische Methoden	30
2.3.1 Zellkultur	30
2.3.1.1 Herstellung der Zellkulturmedien	30
2.3.1.2 Kultivierung und Passagieren der Zellen	30

2.3.1.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen	31
2.3.1.4	Bestimmung der Zellzahl	31
2.3.1.5	Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit extrazellulären Matrixproteinen	31
2.3.1.6	Herstellung von Zellysaten	32
2.3.2	Etablierung von stabil mit KAI1-Wildtyp- bzw. KAI1-Splice-cDNA-transfizierten OV-MZ-6-Zellen	33
2.3.3	Durchflusszytofluorometrie	34
2.3.4	Immunzytochemische Analyse	34
2.3.5	Zellmotilitätsstudien mittels <i>time-lapse</i> -Videomikroskopie	35
2.4	Proteinbiochemische Methoden	38
2.4.1	Quantifizierung des Proteingehalts der Zellysate	38
2.4.2	Auftrennung der zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese	39
2.4.3	Westernblot-Analyse	40
2.4.4	Koimmunpräzipitationsanalyse	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1	Etablierung eines KAI1-Wildtyp- bzw. KAI1-Splice-exprimierenden Ovarialkarzinomzellmodells	43
3.1.1	Charakterisierung der KAI1-Wildtyp- bzw. KAI1-Splice-Expression in stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen mittels immunzytochemischer Analyse	44
3.1.2	Charakterisierung der Expression von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice in stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen mittels Westernblot-Analyse	46
3.1.3	Charakterisierung der Expression von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice in stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen mittels Durchflusszytofluorometrie	47
3.2	Untersuchungen zur migratorischen Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen als Funktion der KAI1-Wildtyp- bzw. KAI1-Splice-Expression	48
3.2.1	Optimierung der Versuchsbedingungen für Zellmotilitätsstudien mittels <i>time-lapse</i> -Videomikroskopie	49
3.2.2	Auswirkung der Expression von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die Integrin-vermittelte Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen	51
3.2.2.1	Einfluss von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die Integrin $\alpha_v\beta_3$ /Vitronektin-vermittelte Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen	51
3.2.2.2	Einfluss von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen auf dem Adhäsionssubstrat Kollagen Typ I	54
3.2.2.3	Einfluss von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen nach Adhäsion an Poly-L-Lysin	56

3.2.2.4	Einfluss von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit des Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Expressions- spiegels	58
3.3	Untersuchungen zur zellulären Kolokalisierung von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice mit dem interzellulären Adhäsionsrezeptor E-Cadherin in humanen Ovarialkarzinomzellen	63
3.3.1	Immunzytochemische Analyse der zellulären Kolokalisierung von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice mit E-Cadherin in humanen Ovarialkarzinomzellen	63
3.3.2	Analyse der zellulären Kolokalisierung von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice mit E-Cadherin in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels Koimmunpräzipitationsanalyse	65
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	66
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1	Die Rolle von KAI1-Wildtyp bzw. dessen Splice-Variante bei der Metastasierung des Ovarialkarzinom	68
4.1.1	Der Einfluss von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die migratorische Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen	68
4.1.2	Die Bedeutung der Wechselwirkung von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ für die Migration humaner Ovarialkarzinomzellen	70
4.1.3	Die Wechselwirkung von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice mit E-Cadherin in humanen Ovarialkarzinomzellen	75
4.2	Potentieller Nutzen der gewonnenen Erkenntnisse für die Therapieüberlegungen beim Ovarialkarzinom	77
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
6.1	Zeitschriftenartikel	82
6.2	Buchbeiträge	99
6.3	Internetquellen	100
	<b>Danksagung</b>	<b>101</b>

# Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchinonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre ( <i>complementary</i> ) Desoxyribonukleinsäure
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy/Microscope</i>
dest.	Destilliert
DMEM	<i>Dulbecco´s modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dubbecco´s phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(R)	Epidermaler Wachstumsfaktor(rezeptor) <i>[epidermal growth factor (receptor)]</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FN	Fibronectin
FIGO	<i>Fédération de Gynécologie et d´Obstétrique</i>
g	Erdbeschleunigung/Fallbeschleunigung/Ortsfaktor $\sim 9,81 \text{ m/s}^2$
GAM	Wachstum arretierendes Medium ( <i>growth arrest medium</i> )
h	Stunde
HGF(R)	Hepatozyten Wachstumsfaktor(rezeptor) <i>[hepatocyte growth factor (receptor)]</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-Ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
KAI1	Kangai 1, CD82, C33, SAR2, ST6, IA4, 4F9, GR15, TSPAN27
kDa	Kilodalton
KITENIN	KAI1 COOH-terminal interacting Tetraspanin
Kol I	Kollagen Typ I

M	Molare Masse
mA	Milliampere
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Boten ( <i>messenger</i> )-Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
OV-MZ-6	Humane Ovarialkarzinomzelllinie
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PDGF(R)	Wachstumsfaktor(rezeptor) sezerniert von Thrombozyten [ <i>platelet-derived growth factor (receptor)</i> ]
PLL	Poly-L-Lysin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	Sekunde
SP	Splice
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM4SF	<i>Transmembrane 4 superfamily</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
V	Volt
VEK	Vektor
VN	Vitronektin
$v/v$	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
$w/v$	Gewicht/Volumen
$\mu\text{m}$	Mikrometer

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist nach dem Endometriumskarzinom der zweithäufigste maligne Genitaltumor der Frau. Es steht an fünfter Stelle in der Rangfolge der Inzidenzen aller Tumoren (Engel et al., 2010). Jährlich erkranken circa 239.000 Frauen weltweit an einem Ovarialkarzinom. Für Deutschland liegt diese Zahl bei 6.700 (Ferley et al., 2013). Die Häufigkeit nimmt dabei mit dem Alter zu, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei etwa 60 Jahren liegt. Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist bisher weitgehend unklar. Abgrenzbare Risikofaktoren sind neben dem Alter auch Ernährungs- und Umweltfaktoren. Zudem ist die Ovulation im Rahmen der Tumorentstehung von Bedeutung. Infertilität, Nulliparität sowie die medikamentöse Ovulationsinduktion und das polyzystische Ovarsyndrom gehen mit einem erhöhten Risiko einher. Schwangerschaften und die Einnahme von Kontrazeptiva stellen dagegen protektive Faktoren dar (Engel et al., 2010).

Über 90% der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf. Etwa 10% sind durch genetische Veränderungen bedingt (Engel et al., 2010). Hier spielen unter anderem Mutationen in den Brustkrebsgenen BRCA 1 und BRCA 2 eine Rolle (Schwarz-Böger et al., 2010).

Die Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms erfolgt nach der TNM- und der *Fédération de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO)-Klassifikation. Stadium I/T1 beschreibt dabei ein auf die Ovarien begrenztes Karzinom, während im Stadium II/T2 bereits eine Ausbreitung im kleinen Becken vorliegt. Im Stadium III/T3 befällt der Tumor das Peritoneum außerhalb des Beckens und das Stadium IV/T4 ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Fernmetastasen (Mayr et al., 2010).

Die Standardtherapie des Ovarialkarzinoms setzt sich aus einer radikalen Operation und einer adjuvanten Kombinationschemotherapie mit Platin und Taxan zusammen. Durch dieses therapeutische Konzept konnte die Gesamtlebenszeit sowie das progressionsfreie Überleben der Frauen mit fortgeschrittenem Karzinom deutlich verbessert werden (Schmalfeldt et al., 2010). Dennoch geht das Ovarialkarzinom mit einer sehr hohen Mortalität einher. Weltweit ist eine Mortalitätsrate von etwa 152.000 und für Deutschland von circa 5.400 beschrieben (Ferley et al., 2013). Das Ovarialkarzinom steht somit auch bezüglich der Mortalität an der fünften Stelle aller maligner Tumoren und stellt die führende Todesursache durch Malignome des weiblichen Genitals dar (Engel et al., 2010). Dies ist unter anderem dadurch bedingt, dass die

Tumorerkrankung in der Mehrzahl erst spät erkannt wird. Die Problematik einer frühen Diagnosestellung ist zum einen auf einen Mangel an effektiven Screeningmethoden zurückzuführen und zum anderen auf das Fehlen charakteristischer Frühsymptome. Daraus resultierend weisen etwa zwei Drittel der Patientinnen bei der Erstdiagnose ein fortgeschrittenes Tumorstadium auf, bei dem sich bereits Metastasen gebildet haben. Hier liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate unter 40% (Burges et al., 2010). Die Tumorausbreitung stellt somit, neben anderen Faktoren, wie der Größe des postoperativ verbliebenen Tumorrestes, der Histologie, dem Alter und dem Allgemeinzustand der Patientinnen, einen entscheidenden prognostischen Parameter dar (Mayr et al., 2010). Im Folgenden sollen daher wichtige Aspekte der Metastasierung des Ovarialkarzinoms erläutert werden.

## **1.2 Zellbiologische Aspekte der Metastasierung des Ovarialkarzinoms**

Die Entstehung von Metastasen weist beim Ovarialkarzinom einige Besonderheiten auf (Abbildung 1). Im Gegensatz zu einer Vielzahl anderer solider Tumoren spielt hier die hämatogene Metastasierung eine untergeordnete Rolle. Typisch für das Ovarialkarzinom sind hingegen die direkte und die lymphogene Ausbreitung der malignen Zellen. Die Metastasierung über das Lymphsystem erfolgt dabei vorwiegend in pelvine und paraaortale Lymphknoten, während Ovarialkarzinomzellen *per continuitatem* benachbarte Organe, wie den Uterus, die Vagina, die Blase und das Rektum infiltrieren. Zudem breiten sich die Zellen diffus innerhalb der Peritonealhöhle aus. In dieser werden sie über die Peritonealflüssigkeit transportiert. Ein Befall weiterer Strukturen und Organe des Bauchraums, wie der Leber, dem Diaphragma oder dem großen Bauchnetz wird ermöglicht. Durch Adhärenz der malignen Zellen an dem Peritoneum, das die Bauchhöhle auskleidet, kommt es zur Ausbildung der charakteristischen Peritonealkarzinose. Diese ist Ausdruck eines fortgeschrittenen Tumorstadiums und geht mit einer deutlich reduzierten Lebenserwartung einher (Naora und Montell, 2005).

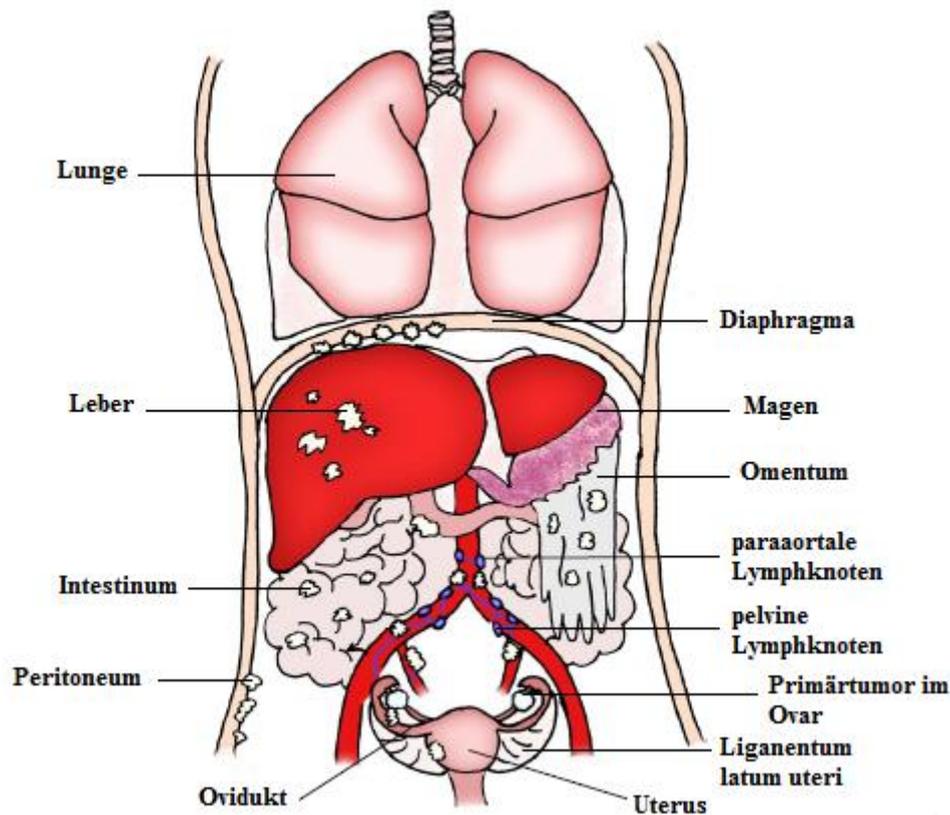
Die Progression vom lokal begrenzten Primärtumor zur Bildung von Metastasen umfasst aus zellbiologischer Sicht eine Reihe von komplexen Schritten. Zu diesen zählt das Lösen der Tumorzellen von dem Primärtumor, die Angiogenese, der Eintritt der Zellen in das Gefäßsystem, die Invasion in umgebende Strukturen, die zelluläre Migration sowie die weitere Proliferation in sekundären Regionen. Diesen Prozessen liegen Veränderungen zahlreicher

physiologisch wichtiger zellulärer Funktionen zugrunde (Woodhouse et al., 1997; Berger et al., 2005). Die Zelladhäsion spielt unter diesen eine besonders wichtige Rolle. Sie beinhaltet sowohl den Kontakt zwischen einzelnen Zellen untereinander als auch zwischen einer Zelle und der extrazellulären Matrix (EZM). Die EZM stellt dabei ein komplexes, die Zellen umgebendes Gerüst dar. Sie besteht hauptsächlich aus sezernierten Makromolekülen, zu denen Polysaccharide und hochmolekulare Proteine, wie Kollagen (Kol), Vitronektin (VN), Fibronektin (FN) und Laminin gehören. Verschiedene Zelladhäsionsrezeptoren sind an der Ausbildung von Zellkontakten beteiligt. Bei diesen handelt es sich um transmembrane Proteine, zu denen unter anderem die Integrine und die Cadherine zählen (Okegawa et al., 2004). Zelladhäsive Phänomene sind an nahezu allen Schritten der Metastasenbildung beteiligt. So ermöglicht beispielsweise ein Verlust der interzellulären Adhäsion das Lösen maligner Zellen aus dem Gewebeverband und eine unkontrollierte Proliferation. Die Zellmotilität und das invasive Potential steigen an (Hirohashi, 1998; Wijnhoven et al., 2000). Diese Eigenschaften wiederum sind stark abhängig von der Ausbildung zellulärer Kontakte mit der Umgebung. Interaktionen mit der EZM werden von malignen Zellen genutzt, um sich fortzubewegen, sich invasiv in umgebende Strukturen auszubreiten und sich folglich in entfernte Körperregionen abzusiedeln (Felding-Habermann, 2003).

Auch für die Progression des Ovarialkarzinoms ist die Zelladhäsion von entscheidender Bedeutung. Dies zeigt sich unter anderem in dem charakteristischen Bild des fortgeschrittenen Tumorstadiums, das durch das Vorhandensein von einerseits adhären Zellen im Bereich des Primärtumors sowie der Absiedlungsorte und andererseits gelösten, frei in der Peritonealflüssigkeit befindlichen Zellen gekennzeichnet ist (Naora und Montell, 2005).

Die Beteiligung der Zelladhäsion an der Metastasenbildung macht deutlich, wie wichtig eine koordinierte, ausgewogene Regulierung von Adhäsionsmolekülen ist. Diese stellt einen komplexen Prozess dar. Adhäsionsrezeptoren sind auf der Zellmembran in multimolekularen Netzwerken organisiert, wodurch die Ausbildung von Zellkontakten ermöglicht und moduliert wird.

Die molekularen Mechanismen, die den veränderten zellulären Eigenschaften im Rahmen der Tumorprogression zugrunde liegen und malignen Zellen die Fähigkeit zur Metastasierung verleihen, sind bisher noch nicht genau bekannt. Analog zu Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen, die positiv oder negativ auf die Entstehung von Primärtumoren einwirken, existieren auch für den komplexen Vorgang der Metastasierung sowohl stimulierende als auch supprimierende Faktoren.



**Abbildung 1. Schematische Darstellung der Metastasierung des Ovarialkarzinoms**

Durch die Modulierung der Zelladhäsion können sich maligne Zellen vom Primärtumor im Bereich des Ovars lösen. Folgend erlaubt die Ausbildung von Zell/EZM-Kontakten die Migration der Zellen sowie eine Infiltration umliegender Organe. Die malignen Zellen können sich innerhalb der Bauchhöhle über die Peritonealflüssigkeit diffus ausbreiten. Hier werden die Zellen an der Oberfläche der Organe und des Peritoneums wieder adhären und es kommt zur Ausbildung solider Sekundärtumoren und der prognostisch ungünstigen Peritonealkarzinose. Neben der direkten Ausbreitung können Ovarialkarzinomzellen auch lymphogen in pelvine und paraaortale Lymphknoten metastasieren. Der hämatogene Ausbreitungsweg, z. B. in die Lunge, ist beim Ovarialkarzinom von geringer Bedeutung (modifiziert nach Naora und Montell, 2005).

Metastasierungssuppressoren stellen Proteine dar, welche die Bildung von Metastasen kontrollieren und reduzieren. Diese protektive Funktion üben sie aus, indem sie für die Metastasierung relevante zellbiologische Verhaltensmuster, wie die Adhäsion sowie auch die Migration und die Invasion, beeinflussen. Eine Vielzahl verschiedener Metastasierungssuppressoren ist bereits bekannt (Berger et al., 2005, Smith und Theodorescu, 2009). Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht das Tetraspanin KAI1-Wildtyp (WT), dessen Funktion als Metastasierungssuppressor 1995 bei einem genetischen Screening einer metastasierten Prostatakarzinom-Zellreihe *rat* AT6.1 entdeckt wurde (Dong et al., 1995). Inzwischen ist eine Beteiligung dieses Proteins an der Tumorprogression vieler verschiedener maligner Tumoren, zu denen auch das Ovarialkarzinom zählt, beschrieben (Liu et al., 2000; Houle et al., 2002).

## 1.3 Der Metastasierungssuppressor KAI1-Wildtyp

### 1.3.1 KAI1-Wildtyp, ein Mitglied der Tetraspanin-Superfamilie

KAI1-WT ist identisch mit dem Leukozytenoberflächenprotein CD (*Cluster of differentiation*) 82 und dem C33 (Bienstock und Barrett, 2001). Das Gen, welches das aus 267 Aminosäuren bestehende Protein kodiert, befindet sich auf dem Chromosom 11p11.2 (Dong et al., 1995).

KAI1-WT gehört zu den Tetraspaninen (auch *transmembrane 4 superfamily* = TM4SF genannt), einer Gruppe transmembraner Proteine mit circa 32 Mitgliedern, die in variabler Expression auf nahezu allen humanen Zellen vorkommen (Hemler, 2001; 2003). Tetraspanine besitzen eine charakteristische Struktur (Abbildung 2). Sie bestehen aus vier Transmembrandomänen sowie einer kleinen und einer großen extrazellulären Schleife. Intrazellulär befindet sich eine weitere Schleife sowie der N- und C-terminale Bereich des Proteins (Stipp et al., 2003; Maecker et al., 1997; Levy und Shoham, 2005b).

Die Transmembrandomänen sind unter den Tetraspaninen hochkonserviert. In den Transmembrandomänen 1, 3 und 4 befinden sich charakteristische polare Aminosäuren (Asparagin, Glutamin und Glutamat). Diese tragen zur Selbstassoziation der Proteine bei und sind wichtig für die Interaktion von verschiedenen Tetraspaninen untereinander sowie mit anderen Oberflächenmolekülen (Stipp et al., 2003; Bari et al., 2009).

Die große extrazelluläre Schleife weist unter den Tetraspaninen in Hinblick auf die Struktur die geringste Ähnlichkeit auf (Levy und Shoham, 2005a). Sie ist in eine konstante Region, bestehend aus drei  $\alpha$ -Helices, und eine variable Region mit zwei  $\alpha$ -Helices gegliedert (Kitadokoro et al., 2001). In der variablen Domäne befinden sich vier konservierte Cysteine. Von diesen sind zwei in das charakteristische Cystein-Cystein-Glycin (CCG)-Motiv integriert. Je nach Tetraspanin existieren noch weitere Cysteine, was die Abgrenzung einzelner Tetraspanine voneinander erlaubt (Levy und Shoham, 2005b). KAI1-WT besitzt sechs dieser Aminosäuren (C149, C150, C174, C176, C193, C216), die in drei typischen Motiven (CCG, CSC, EGC) auftreten. Die Cysteine bilden untereinander Disulfidbrücken aus, was für die Proteinstabilität und die korrekte Faltung entscheidend ist (Bienstock und Barrett, 2001). Die variable Region der großen extrazellulären Schleife der Tetraspanine ist für die Vermittlung spezifischer, heterogener Interaktionen verantwortlich, während der konstante Bereich an Tetraspanin/Tetraspanin-Wechselwirkungen beteiligt ist (Kitadokoro et al., 2001; Seigneuret et al., 2001).

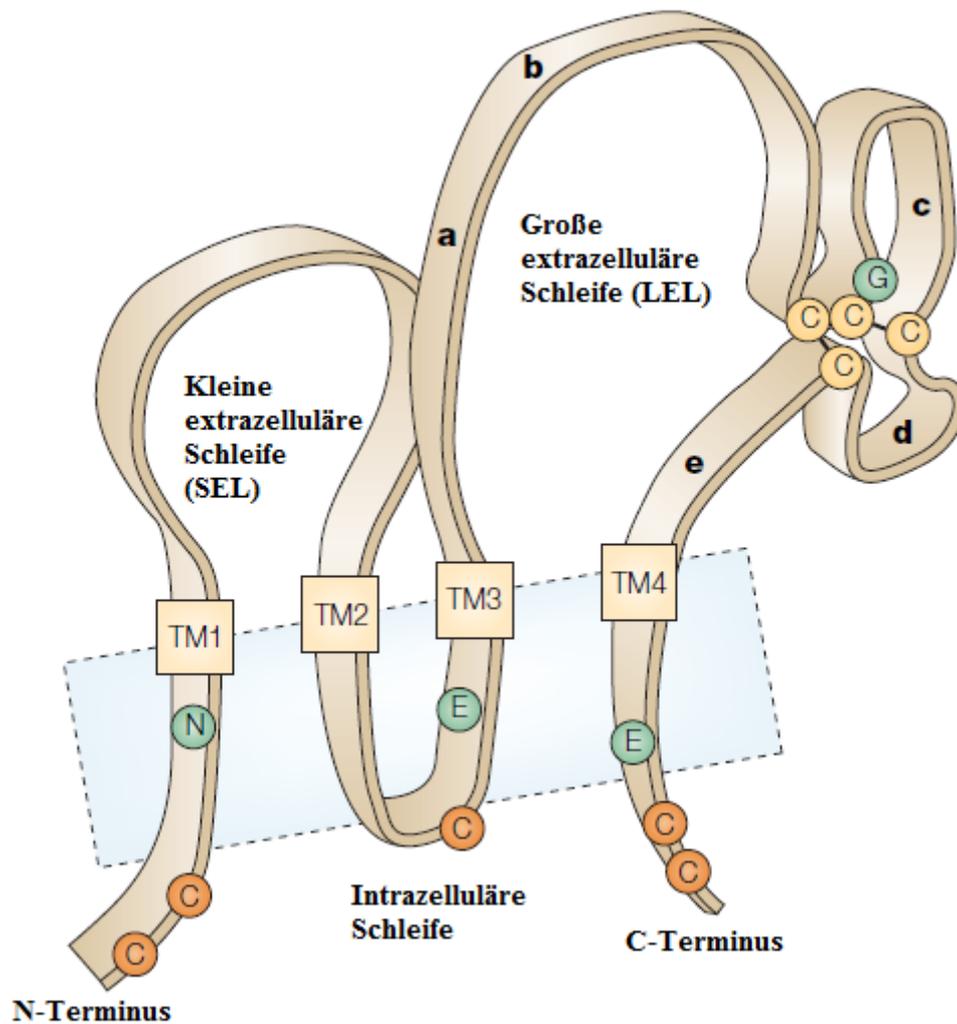
KAI1-WT besitzt in der großen extrazellulären Schleife zudem drei Bereiche für eine N-Glykosylierung (Asn129, Asn157, Asn198) (Bienstock und Barrett, 2001). Das Maß der N-Glykosylierung variiert in verschiedenen Geweben. Sie ist unter anderem für die Assoziation mit Integrinen wichtig (Ono et al., 2000).

Über die aus 17 Aminosäuren bestehende kleine extrazelluläre Schleife des Tetraspanins KAI1-WT (Bienstock und Barrett, 2001) ist noch wenig bekannt. Studien über andere Tetraspanine, wie das CD81, lassen eine Beteiligung bei der Faltung der großen Schleife vermuten (Masciopinto et al., 2001).

Die intrazelluläre Schleife von KAI1-WT enthält vier Aminosäuren, wobei die Cysteine nahe der Zellmembran (C74, C83) palmitoyliert sind (Zhou et al., 2004).

In den zytoplasmatischen Termini weist KAI1-WT zehn Aminosäuren im N-terminalen Bereich und 14 Aminosäuren in der C-terminalen Region auf (Bienstock und Barrett, 2001). Diese enthalten Erkennungssequenzen für den Einbau des Proteins in das richtige Kompartiment und fungieren als Verbindung zum Zytoskelett sowie zu intrazellulären Signalmolekülen (Stipp et al., 2003; Charrin et al., 2009). Angrenzend an die Transmembrandomänen befinden sich in diesen Bereichen drei weitere Cysteine (Cys 5, Cys 251, Cys 253). Diese sind, wie die Cysteine der intrazellulären Schleife, palmitoyliert (Zhou et al., 2004). Die Palmitoylierung spielt eine wesentliche Rolle bei der Interaktion von Tetraspaninen untereinander und mit anderen Transmembranproteinen (Berditchevski et al., 2002; Charrin et al., 2002; Yang et al., 2002).

Die Fähigkeit, Verbindungen sowohl untereinander als auch mit einer Vielzahl an weiteren Proteinen einzugehen, zählt zu den bedeutendsten Eigenschaften der Tetraspanine. Diese stellt die Grundlage für die Ausbildung eines transmembranen, multimolekularen Netzwerks, dem *tetraspanin web*, dar. Da Tetraspanine keine intrinsische katalytische Aktivität besitzen, üben sie ihre Funktionen im Rahmen der Vermittlung von Protein/Protein-Interaktionen in diesen Komplexen aus (Charrin et al., 2009). Dabei ist über das *tetraspanin web* zum einen eine laterale Amplifikation von Signalen über die Zellmembran möglich. Zum anderen können die Tetraspanine durch ihre Fähigkeit, sowohl mit extrazellulären Proteinen als auch mit intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen zu interagieren, als "Transmembran-Linker" fungieren (Stipp et al., 2003). Je nach Zelltyp und Zustand der Zelle setzt sich das *tetraspanin web* aus unterschiedlichen Tetraspaninen sowie verschiedenen assoziierten Proteinen zusammen und trägt so zu den zelltypspezifischen Funktionen und deren Regulierung bei (Levy und Shoham, 2005b).



**Abbildung 2. Schematische Darstellung eines Tetraspanins**

Tetraspanine bestehen strukturell aus vier Transmembrandomänen (TM 1-4), einer kleinen (SEL) und einer großen (LEL) extrazellulär gelegenen Schleife. Intrazellulär befindet sich eine weitere Schleife sowie das N- und C-terminale Ende. Die große extrazelluläre Schleife besteht aus einem konstanten (a, b, e) und einem variablen Bereich (c, d). Hier befindet sich das hochkonservierte Cyctein-Cystein-Glycin (CCG)-Motiv, das mit zwei weiteren charakteristischen Cysteinen (C) Disulfidbrücken ausbildet. Je nach Tetraspanin treten in diesem Bereich noch weitere Cysteine auf, die ebenfalls Disulfidbrücken bilden. Im zytoplasmatischen Bereich der Tetraspanine befinden sich nahe der Zellmembran Palmitoylierungsstellen an Cysteinen. Die Transmembrandomänen enthalten die hochkonservierten polaren Aminosäuren Asparagin, Glutamin und Glutamat (N, E) (modifiziert nach Levy und Shoham, 2005b).

Die Wechselwirkungen der Tetraspanine finden dabei auf unterschiedlichen Ebenen statt. Prinzipiell werden direkte und indirekte Interaktionen unterschieden. Die erste Ebene beschreibt direkte oder primäre Verbindungen von Tetraspaninen zu anderen Proteinen. Ein bedeutender Aspekt dieser ist die Zelltypspezifität. Interaktionen der ersten Ebene sind gegen-

über starken Detergenzien stabil. Die zweite Ebene stellt die Assoziation von Tetraspaninen mit weiteren Tetraspaninen dar. Diese Wechselwirkungen ermöglichen das Zusammenführen von primären Komplexen und somit die Ausbildung eines multimolekularen Netzwerks. Sie sind indirekt und nur gegenüber milden Detergenzien stabil. Die dritte Ebene beschreibt die indirekten Interaktionen der Tetraspanine mit anderen Proteinen. Diese Verbindungen werden selbst in milden Detergenzien zerstört, während sie in weniger hydrophoben Detergenzien erhalten bleiben (Hemler, 2001; Levy und Shoham, 2005a).

Die Interaktion mit diversen Molekülen ermöglicht es Tetraspaninen, auf eine Vielzahl zellbiologischer Prozesse Einfluss zu nehmen. Tetraspanine regulieren zelluläre Funktionen, wie die Adhäsion, die Migration, die Differentiation und die Proliferation (Ruseva et al., 2009; Abe et al., 2009; Lagaudrière-Gesbert et al., 1997; Malik et al., 2009; Yáñez-Mo et al., 1998; Mela und Goldman, 2009; Takahashi et al., 2007; Deissler et al., 2007). Im Rahmen der Modulierung dieser Zellaktivitäten beeinflussen sie unter anderem die Immunantwort (Levy und Shoham, 2005b), das Nervenwachstum (Mela und Goldman, 2009; Schmidt et al., 1996; Stipp und Hemler, 2000) und vaskuläre Vorgänge (Zhang et al., 2009). Zudem sind die Tetraspanine in pathophysiologische Prozesse involviert. Von großer Bedeutung ist dabei ihre Rolle bei der Tumorentstehung und der Tumorprogression. Die verschiedenen Tetraspanine sind hieran auf unterschiedliche Art und Weise beteiligt (Boucheix et al., 2001). Die Funktion von KAI1-WT als Metastasierungssuppressor wird im folgenden Abschnitt genauer erläutert.

### **1.3.2 Die Funktion des KAI1-Wildtyp als Metastasierungssuppressor**

Die prominenteste bislang beschriebene Rolle spielt das Tetraspanin KAI1-WT bei der Reduzierung der Metastasenbildung. Es besteht eine inverse Korrelation zwischen der Expression von KAI1-WT und dem invasiven sowie dem metastatischen Potential von soliden Tumorzellen (Jackson et al., 2000a; Miyazaki et al., 2000; Ow et al., 2000; Uzawa et al., 2002; Liu et al., 2003).

Ein Zusammenhang zwischen einer verminderten KAI1-WT-Expression und der Tumorprogression ist für eine Vielzahl von verschiedenen malignen Tumoren bereits beschrieben. Zu diesen gehören das Ovarial- (Liu et al., 2000; Houle et al., 2002), das Mamma- (Yang et al., 1997; 2000), das Hepatozelluläre- (Guo et al.; 1998, Sun et al., 1998), das Pankreas- (Guo et al., 1996) und das Lungenkarzinom (Adachi et al., 1996) sowie auch das Cervix- (Liu et al., 2001; Schindl et al., 2002), Ösophagus- (Miyazaki et al., 2000), Kolon- (Lombardi et al.,

1999; Maurer et al., 1999), Schilddrüsen- (Chen et al., 2004b), Blasen- (Yu et al., 1997; Ow et al., 2000; Jackson et al., 2000a) und Magenkarzinom (Hinoda et al., 1998). Der Expressionsverlust von KAI1-WT ist dabei mit einer schlechten Prognose verbunden (Schindl et al., 2001; Adachi et al., 1996; Sho et al., 1998; Higashiyama et al., 1998).

Anhand verschiedener *in vivo*-Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine experimentelle Reetablierung der im Laufe der Tumorprogression supprimierten endogenen KAI1-WT-Expression die Bildung von Metastasen deutlich vermindert (Shinohara et al., 2001b; Yang et al., 2001; Xu et al., 2008).

Das Tetraspanin KAI1-WT limitiert die Metastasierung, indem es innerhalb des *tetraspanin webs* die Signale der assoziierten Proteine reguliert und moduliert und auf diese Weise Einfluss auf wichtige tumorzellbiologische Prozesse nimmt (Boucheix et al., 2001). Zu den Molekülen, mit denen KAI1-WT interagiert, gehören neben anderen Tetraspaninen, wie dem CD9, dem CD81 (Imai und Yoshie, 1993) und KITENIN (KAI1 COOH-terminal interacting Tetraspanin) (Lee et al., 2004; Rowe und Jackson, 2006), Adhäsionsrezeptoren, wie die Integrine (Mannion et al., 1996; Berditchevski und Odintsova, 1999; Ono et al., 2000; Ruseva et al., 2009) und Cadherine (Abe et al., 2008) sowie verschiedene weitere Oberflächenmoleküle, wie Wachstumsfaktorrezeptoren (Odintsova et al., 2000; 2003), CD4 und CD8 (Imai et al., 1995; Imai und Yoshie, 1993), CD19 und CD46 (Horváth et al., 1998; Lozahic et al., 2000), *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse I und II Moleküle (Szöllósi et al., 1996; Lagaudrière-Gesbert et al., 1997; Hammond et al., 1998; Angelisová et al., 1994) und EWI2/PGRL (Zhang et al., 2003b). Zudem steht KAI1-WT in Wechselwirkung mit verschiedenen intrazellulären Signalmolekülen, wie der Proteinkinase C (PKC) (Zhang et al., 2001) und der *focal adhesion kinase* (FAK) (Zhang et al., 2003a).

Im Rahmen der zahlreichen Interaktionen innerhalb des *tetraspanin webs* moduliert KAI1-WT die zelluläre Adhäsion, limitiert die migratorische Aktivität sowie die Invasion maligner Zellen (Ruseva et al., 2009; Ono et al., 1999; Takaoka et al., 1998; Jackson et al., 2000a; Yang et al., 2001; Zhang et al., 2003a; Sridhar und Miranti, 2006; Jee et al., 2007; Xu et al., 2008) und hemmt die zelluläre Proliferation (Ruseva et al., 2009; Guo et al., 2005; Lu et al., 2007; Bandyopadhyay et al., 2006).

Die beschriebene protektive Funktion von KAI1-WT bei der Metastasenbildung unterstreicht die Wichtigkeit der Frage nach möglichen Ursachen für den Funktionsverlust von KAI1-WT. Bisher sind die Mechanismen, die für den Expressionsverlust von KAI1-WT verantwortlich sind, noch nicht hinreichend geklärt. Es gibt Hinweise, dass Veränderungen in der Regulierung der Transkription durch Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen (Kim et al., 2005;

Shinohara et al., 2001a; Telese et al., 2005), während Mutationen, eine verstärkte Methylierung der Promotorregion sowie ein Heterozygotieverlust am Genlokus nicht beteiligt zu sein scheinen (Jackson et al., 2000b; Miyazaki et al., 2000; Uzawa et al., 2002; Tagawa et al., 1999). Neben der verminderten Expression von KAI1-WT sind zudem Veränderungen der posttranskriptionellen Modifikation beschrieben, die zu einem Verlust der Eigenschaft des KAI1-WT-Proteins als Metastasierungssuppressor führen können (Zhou et al., 2004; Ono et al., 1999; 2000).

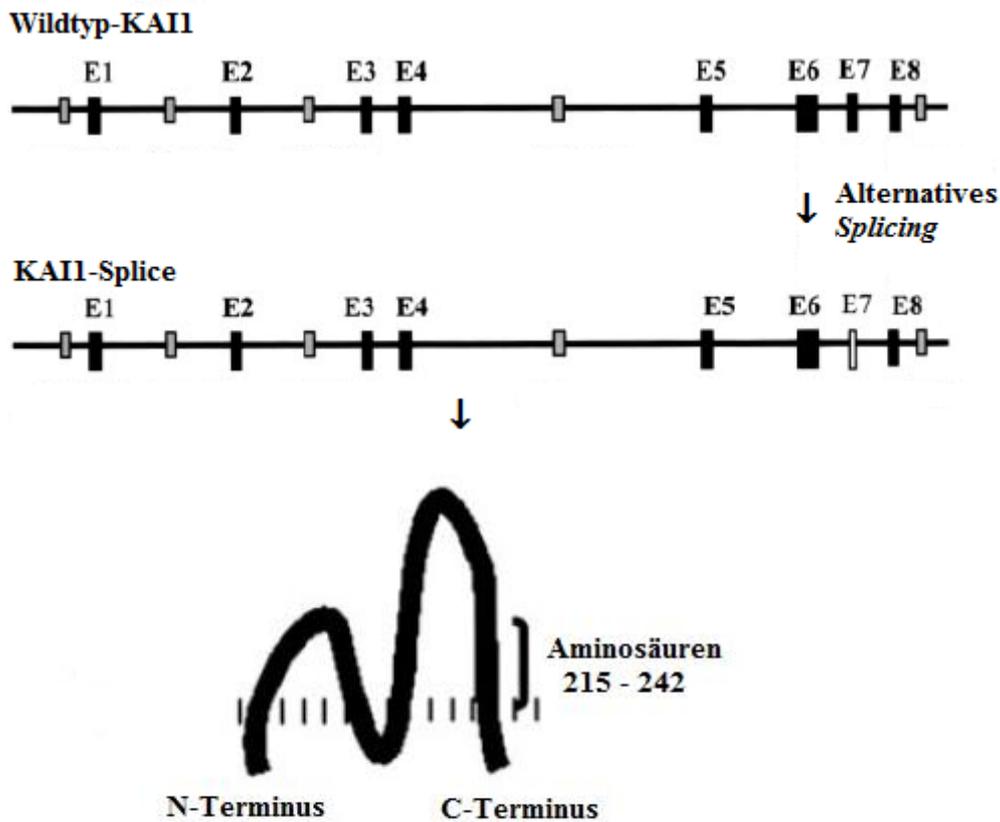
Ein weiterer potentieller Mechanismus, der die Funktion von KAI1-WT bei der Tumorentstehung beeinflusst, stellt die Produktion von Splice (SP)-Varianten dar. Durch Lee et al. (2003) ließ sich im Rahmen einer Studie über die Expression von verschiedenen Genen, die für die Metastasenbildung beim Magenkarzinom relevant sind, eine SP-Variante von KAI1 identifizieren. Das folgende Kapitel soll einen Überblick über strukturelle und funktionelle Besonderheiten dieses Proteins geben.

## **1.4 Die Splice-Variante des KAI1 (KAI1-Splice)**

Die SP-Variante des KAI1 ist ein Resultat des alternativen *Splicings*, welches einen besonderen Vorgang im Rahmen der Genexpression bei Eukaryonten darstellt. Bei dem Prozess der Transkription wird zunächst anhand einer DNA-Matrize eine entsprechende RNA gebildet. Das primäre Transkript enthält anschließend sowohl kodierende Basensequenzen (Exons) als auch nicht-kodierende Bereiche (Introns). Bei der Modifizierung dieses primären Transkripts, der sogenannten Prozessierung, werden bei dem Vorgang des *Splicings* die Introns herausgeschnitten, während die Exons zur reifen mRNA, die als Vorlage zur Synthese der Proteine dient, verknüpft werden. Das alternative *Splicing* beschreibt einen Prozess, bei dem es während des Zusammenfügens der Exons zu Umorientierungen, Umlagerungen oder auch zum Auslassen dieser kommen kann. Auf diese Weise können aus einem Gen mehrere verschiedene mRNA-Moleküle und durch deren Translation auch variable Proteine entstehen. Diese können sich sowohl strukturell als auch funktionell voneinander unterscheiden (Netzker, 2006).

Die von Lee et al. (2003) identifizierte SP-Variante von KAI1 entsteht durch einem Verlust des Exons 7, einer Sequenz aus 84 Basenpaaren, im Rahmen des Prozesses des alternativen *Splicings*. Das Exon 7 kodiert für einen Bereich aus 28 Aminosäuren (215-242), der in der C-terminalen Region des Proteins lokalisiert ist. Das Fehlen dieses Exons bedingt somit eine

veränderte Proteinstruktur. Der distale Teil der großen extrazellulären Schleife und ein Bereich der vierten Transmembranregion des KAI1-WT-Proteins gehen verloren (Lee et al., 2003) (Abbildung 3).



**Abbildung 3. Schematische Darstellung der Entstehung der Splice-Variante von KAI1**

Das Gen, welches das aus 267 Aminosäuren bestehende KAI1-WT-Protein kodiert, ist auf Chromosom 11p11.2 lokalisiert. Es besteht aus Introns (mit ■ gekennzeichnet), die bei dem Vorgang des *Splicings* herausgeschnitten werden sowie aus acht Exons (E1-E8, mit ■ gekennzeichnet), die bei diesem Prozess miteinander verknüpft werden. Im Rahmen des alternativen *Splicings* kommt es zu einem Verlust des Exons 7 (E7). Daraus resultiert eine veränderte Proteinstruktur. Der SP-Variante von KAI1 fehlt ein aus 28 Aminosäuren (215-242) bestehender Teil im Bereich des C-Terminus (modifiziert nach Lee et al., 2003).

Es existieren Hinweise darauf, dass sich diese strukturellen Abweichungen in einem Verlust der Funktion des Proteins als Metastasierungssuppressor widerspiegeln und somit ein Zusammenhang zwischen der Expression von KAI1-SP und der Bildung von Metastasen besteht. Lee et al. (2003) zeigten in Gewebeproben von Magenkarzinompatienten mit vergleichsweise schlechter Prognose sowohl im Bereich des Primärtumors als auch in Lymphknoten- und

Peritonealmetastasen eine hohe Expression von KAI1-SP. Ebenso konnte die SP-Variante von KAI1 auch in Zellen unterschiedlicher anderer maligner Tumoren nachgewiesen werden. Der Vergleich verschiedener Kolonkarzinomzelllinien zeigte dabei eine stärkere Expression in Zelllinien mit großem Metastasierungspotential. Zudem ergaben Untersuchungen zum Einfluss von KAI1-SP auf tumorbiologisch wichtige zelluläre Funktionen eine gesteigerte Motilität und Invasivität nach Expression von KAI1-SP.

An dem Verlust der protektiven Funktion des Proteins bei der Metastasenbildung scheint, basierend auf dem Fehlen des durch das Exon 7 kodierten Bereichs, eine veränderte Assoziation mit verschiedenen Interaktionspartnern von KAI1-SP beteiligt zu sein. Dabei spielen Abweichungen in der Wechselwirkung mit Adhäsionsmolekülen, wie den Integrinen und dem E-Cadherin, eine wesentliche Rolle (Lee et al., 2003). Diese Adhäsionsrezeptoren und die Bedeutung ihrer Interaktion mit KAI1-Proteinen sollen daher im Weiteren genauer beschrieben werden.

## **1.5 Integrine: Wichtige Interaktionspartner der KAI1-Proteine bei (tumor)zellbiologischen Prozessen**

### **1.5.1 Die Superfamilie der Integrine**

Integrine stellen eine Gruppe heterodimerer, transmembraner Glykoproteine dar, die sowohl die Adhäsion zwischen einzelnen Zellen als auch zwischen der Zelle und der EZM vermitteln (van der Flier und Sonnenberg, 2001; Hynes, 2002). Die Adhäsionsrezeptoren bestehen jeweils aus einer von 18  $\alpha$ - und einer von 8  $\beta$ -Untereinheiten. Diese sind nicht-kovalent miteinander verknüpft. Variable Kombinationen der einzelnen Untereinheiten ergeben eine Vielzahl unterschiedlicher Integrine. Beim Menschen sind insgesamt über 24 verschiedene dieser Zelloberflächenrezeptoren bekannt, die in variabler Expression nahezu ubiquitär vorhanden sind (Hynes, 1992; 2002; Humphries, 2000).

Beide Integrin-Untereinheiten stellen Typ I Transmembranproteine dar, die jeweils aus einer großen extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer hydrophoben transmembranen Region sowie einer kleinen zytoplasmatischen Domäne bestehen (Hynes, 1992).

Die bislang einzige veröffentlichte Kristallstruktur der extrazellulären Region der Zelladhäsionsmoleküle ist die des Integrins  $\alpha_v\beta_3$ . Diese zeigt eine Zusammensetzung aus zwölf einzel-

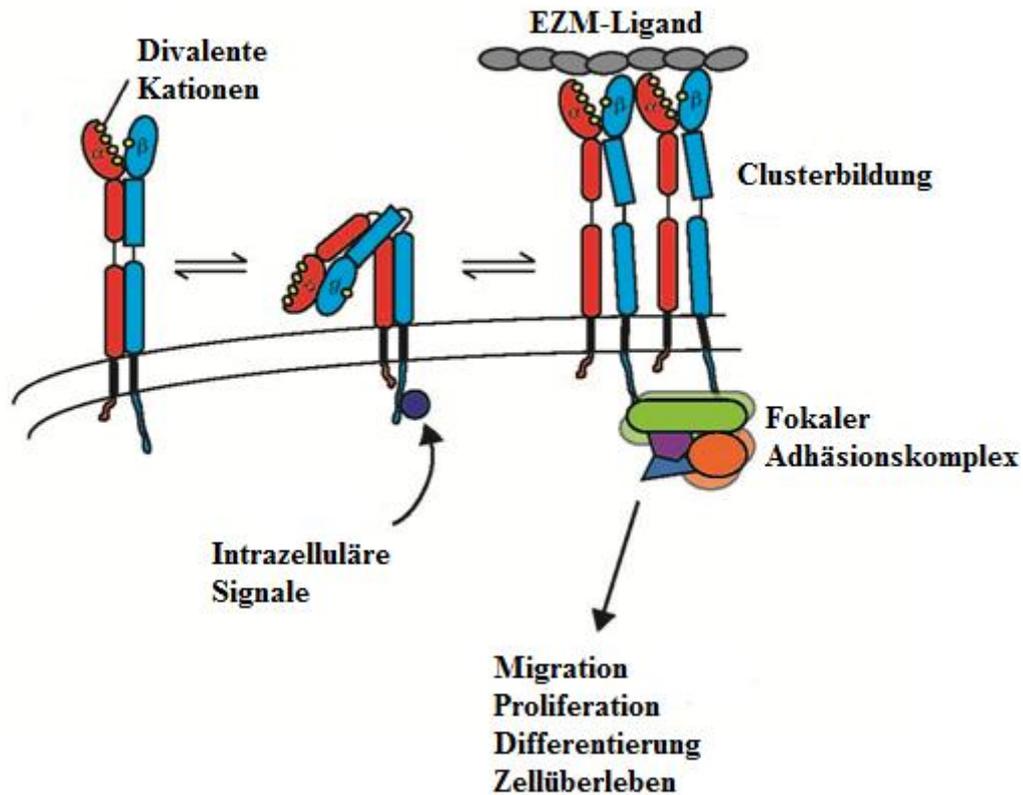
nen Domänen, die in eine Kopf- und zwei parallele Schwanzregionen eingeteilt werden können. Über die Kopfreion erfolgt die Bindung von Komponenten der EZM (Xiong et al., 2001). Diese Liganden-Bindungsdomäne wird von beiden Untereinheiten der Integrine gebildet, sodass nur die Heterodimerisierung einen Kontakt zur EZM ermöglicht. Hierbei determiniert die Kombination der verschiedenen Untereinheiten die Spezifität für den Liganden. Für die meisten Integrine sind jedoch mehrere Bindungspartner beschrieben und auch EZM-Proteine binden nicht spezifisch an nur ein Integrin. Verschiedene Peptidsequenzen ermöglichen es den Zelladhäsionsrezeptoren, ihre Liganden zu erkennen. Ein Großteil der Integrine, unter anderem das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , bindet das Arg-Gly-Asp (RGD)-Motiv. EZM-Proteine, die dieses Motiv besitzen, sind VN, FN, Kol, Fibrinogen und Laminin (van der Flier und Sonnenberg, 2001; Hynes, 1992).

Die Interaktion der Adhäsionsrezeptoren mit EZM-Proteinen hängt zudem von der Bindung divalenter Kationen in der extrazellulären Region ab (Zhang und Chen, 2012). Diese sind essentiell für die Assoziation der beiden Untereinheiten und beeinflussen sowohl die Affinität als auch die Spezifität der Ligandenbindung (Gailit und Ruoslahti, 1988; Kirchhofer et al., 1990; 1991; Zhang und Chen, 2012).

Neben der Funktion als Adhäsionsmolekül stellen Integrine eine Verbindung zum Zytoskelett her und übernehmen wichtige Aufgaben bei der Übermittlung von Signalen über die Zellmembran hinweg. Dabei können Integrine Signale sowohl aus dem Zellinneren nach außen vermitteln („*inside-out signaling*“) als auch umgekehrt („*outside-in signaling*“). Diese bidirektionale Signaltransduktion stellt einen komplexen Prozess dar und beinhaltet eine Konformationsänderung der Adhäsionsrezeptoren mit Änderung des Aktivierungszustands, eine Clusterbildung der Integrine sowie die Formation eines großen intrazellulären Adhäsionskomplexes (Anthis und Campbell, 2011; Legate et al., 2009).

Im Rahmen des „*inside-out signalings*“ beeinflussen Signale aus dem Zellinneren den Aktivierungszustand der Integrine, wodurch die Rezeptoraffinität und die Bindung des entsprechenden Liganden reguliert werden. Durch Clusterbildung der Integrine kann dabei die Stärke der Zell/EZM-Bindung gesteigert werden. Beim „*outside-in signaling*“ dagegen führt die Bindung eines extrazellulären Liganden zu einer Integrinaktivierung, einer Clusterbildung und Akkumulierung intrazellulärer Signal- und Strukturmoleküle. Durch die Aktivierung verschiedener zytoplasmatischer Signalkaskaden werden folgend multiple wichtige zelluläre Funktionen beeinflusst. Durch Änderung der Genexpression werden unter anderem das Zellüberleben, die Differenzierung und die Proliferation gesteuert. Zudem spielen Integrine durch ihren Kontakt sowohl zur EZM als auch zum Zytoskelett eine entscheidende Rolle bei der

Modulierung der Zellmigration (Anthis und Campbell, 2011; Legate et al., 2009). Diese Eigenschaft wird in Abschnitt 1.6 im Detail erläutert.



**Abbildung 4. Schematische Darstellung der Integrinstruktur und ihrer bidirektionalen Signaltransduktion**

Integrine bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die nicht-kovalent miteinander verknüpft sind. Beide Untereinheiten stellen Typ I Transmembranproteine dar. Sie enthalten jeweils eine kurze membranständige und eine zytoplasmatische Domäne sowie eine große, komplexe extrazelluläre Region, über die nach Bindung von divalenten Kationen der Kontakt zu EZM-Proteinen erfolgt. Durch Konformationsänderungen können Integrine ihren Aktivierungszustand und ihre Bindungsaffinität ändern. Die Abbildung zeigt mittig ein Integrin mit geringer und rechts mit hoher Bindungsaffinität nach Rezeptoraktivierung. An dieser sind im Sinne einer bidirektionalen Signaltransduktion sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Signale beteiligt. Die Rezeptoraktivierung geht mit einer Clusterbildung der Integreine und der Formation eines großen zytoplasmatischen Adhäsionskomplexes einher. Folgend können multiple zelluläre Funktionen beeinflusst werden (modifiziert nach Young et al., 2013).

Neben ihren regulatorischen Funktionen bei physiologischen Vorgängen sind Integrine in pathophysiologische zelluläre Prozesse involviert. Ihnen kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Tumorentstehung und -progression zu (Felding-Habermann, 2003, Desgrosellier und Cheresch, 2010). Das zelluläre Integrin-Expressionsmuster ist äußerst vielfältig. So experi-

mieren auch Ovarialkarzinomzellen eine Vielzahl unterschiedlicher Integrine, die hier als Adhäsionsrezeptoren wesentlich in die Tumorphathologie involviert sind (Gardner et al., 1995; Bartolazzi et al., 1993; Bottini et al., 1993; Cannistra et al., 1995; Carreiras et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit steht die Funktion des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  beim Ovarialkarzinom im Vordergrund.

### **1.5.2 Die Rolle des Integrins $\alpha_v\beta_3$ in der Tumorphathologie des Ovarialkarzinoms**

Dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  kommt unter den zahlreichen verschiedenen Integrinen eine besondere Bedeutung zu. Es ist in die Tumorphathologie multipler maligner Tumoren involviert (Hapke et al., 2003; Dang et al., 2006; Hosotani et al., 2002; Ria et al., 2002; Wechsel et al., 1999; Cooper et al., 2002; Felding-Habermann et al., 2001; 2002; Vellon et al., 2006; Gladson et al., 1991).

In den Ovarien wird das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  sowohl von normalen ovariellen Oberflächenepithelzellen als auch von Ovarialkarzinomzellen synthetisiert (Cruet et al., 1999). Die Tatsache, dass die Expression beim Ovarialkarzinom im Vergleich zu epithelialen Ovarialtumoren mit geringerem malignem Potential, sogenannten *Borderline*-Tumoren, erhöht ist (Liapis et al., 1997), unterstreicht die Bedeutung des Integrin  $\alpha_v\beta_3$  für die Tumorprogression.

Im Rahmen dieser spielt die Interaktion des Adhäsionsrezeptors mit dem charakteristischen umgebenden Milieu des Tumors eine zentrale Rolle. Das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  tritt über verschiedene EZM-Proteine mit der zellulären Umgebung in Kontakt (Wildner, 2002; Hynes, 1992). VN stellt unter diesen den Hauptliganden dar (Horton, 1997). Diese spezifische Interaktion ermöglicht es dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , entscheidende zelluläre Funktionen, die Bestandteil des komplexen Prozesses der Metastasierung sind, zu beeinflussen. So moduliert das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  die Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen und erhöht ihre migratorische Aktivität sowie auch ihre Proliferation (Carreiras et al., 1995; 1999; Hapke et al., 2003).

Der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Kontakt zwischen disseminierten malignen Zellen und Mesothelzellen des Peritoneums ermöglicht deren Implantation und somit die Entstehung der für das Ovarialkarzinom charakteristischen Peritonealkarzinose (Heyman et al., 2008).

Zudem spielt das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  eine wichtige Rolle bei der Angiogenese (Eliceiri und Cheresh, 1999; 2000; Brooks et al., 1994a). Eine ausgeprägte Vaskularisierung stellt beim Ovarialkarzinom einen prognostisch ungünstigen Faktor dar (Elie et al., 2003). Die Bildung neuer

Gefäße fördert zum einen das Tumorwachstum, zum anderen stellt diese einen weiteren Metastasierungsweg dar. Durch die Interaktion des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  mit dessen Ligand VN können maligne Zellen an Endothelzellen haften. Folgend erlaubt die Assoziation des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  mit der Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 das Eintreten der Zellen in das Gefäßsystem und die weitere Ausbreitung (Leroy-Dudal et al., 2005a; 2005b).

Es wird deutlich, dass das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  in eine Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse bei der Progression des Ovarialkarzinoms involviert ist. Hierbei spielt die Vermittlung von Kontakten zur umgebenden EZM eine entscheidende Rolle. Mit dieser Zell/EZM-Adhäsion sehr eng verknüpft ist die zelluläre Migration, einer sehr wichtigen Eigenschaft maligner Zellen bei der Metastasierung. Im Folgenden sollen daher die Grundzüge der Zellmigration dargestellt werden, wobei der Fokus auf der Funktion der Integrine liegt.

## **1.6 Die zelluläre Migration**

Die zelluläre Migration ist essentiell für eine Vielzahl biologischer Prozesse. Sie spielt unter anderem eine Rolle bei der Wundheilung, der Embryogenese, bei Entzündungsreaktionen und der Angiogenese. Daneben stellt sie eine wichtige zelluläre Eigenschaft im Rahmen der Tumorprogression dar. Sie trägt entscheidend dazu bei, dass sich maligne Zellen invasiv in umgebende Strukturen ausbreiten und in entfernte Regionen absiedeln können (Lauffenburger und Horwitz, 1996).

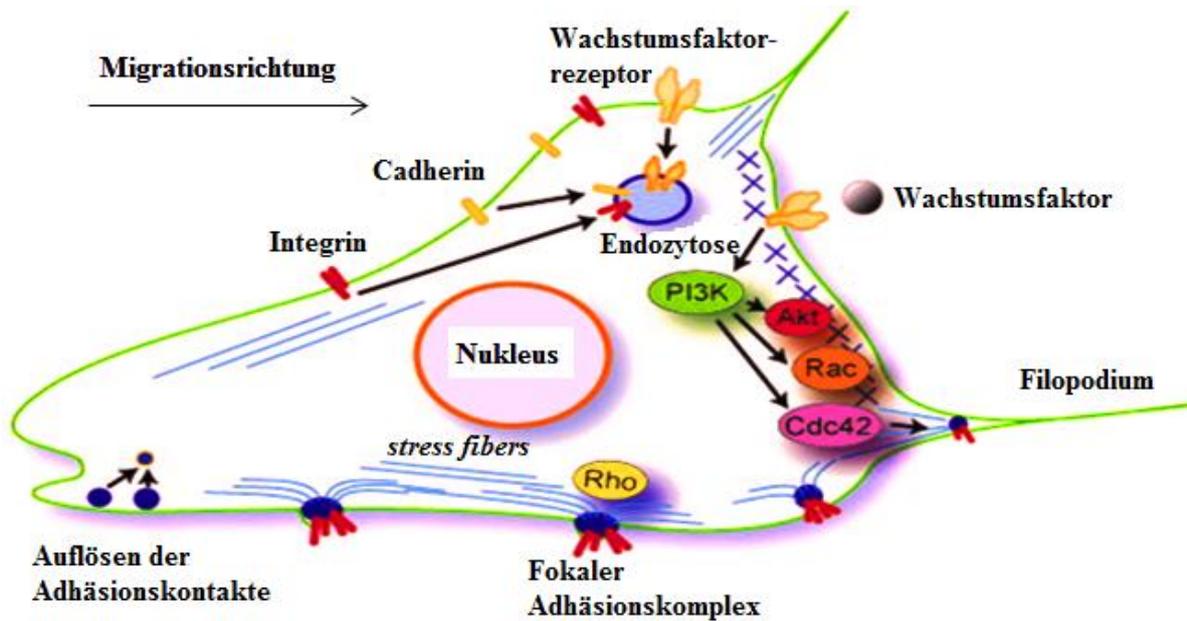
Die Zellmigration stellt einen komplexen Prozess dar, an dem eine Vielzahl von verschiedenen Molekülen beteiligt ist. Unter diesen kommt den Integrinen eine besondere Bedeutung zu (Vicente-Manzanares et al., 2009).

### **1.6.1 Die Rolle der Integrine bei der zellulären Migration**

Die Migration beruht auf einem Wechselspiel zwischen Adhärenz und Lösung der Zellen von der sie umgebenden EZM. Integrine stellen als EZM-Protein-Rezeptoren diese Verbindung her und vermitteln gleichzeitig über die Zellmembran hinweg einen Kontakt zum Zytoskelett, welches vor allem mit den Aktin- und Myosinfilamenten wesentlich an der migratorischen Aktivität beteiligt ist. Erst diese koordinierte Verbindung zwischen EZM-Proteinen,

Integrinen und Zytoskelettelementen erlaubt es Zellen, sich fortzubewegen (Ridley et al., 2003; Vicente-Manzanares et al., 2009; Hood und Cheresch, 2002).

Sowohl das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  als auch dessen Hauptligand VN sind in migrierenden Ovarialkarzinomzellen vorwiegend im Bereich der Zellfront lokalisiert (Carreiras et al., 1999). Hier kommt es ausgelöst durch verschiedene extrazelluläre Signale, wie zum Beispiel durch chemo- oder haptotaktische Reize, zur Ansammlung zahlreicher Integrine mit hoher Affinität für das entsprechende EZM-Protein. Nachdem ein Integrin-vermittelter Kontakt der Zelle zur EZM hergestellt ist, entstehen die charakteristischen fokalen Adhäsionsstellen mit Akkumulation intrazellulärer Signal- und Adaptermoleküle. Wichtige Bestandteile dieser Kontaktregionen sind unter anderem verschiedene Proteinkinasen, wie die FAK, Phosphatasen sowie Vinculin, Talin und  $\alpha$ -Aktinin, die die Einzelkomponenten verbinden. Im Rahmen dieser Komplexe wird die Anbindung der Integrine an das Zytoskelett vermittelt und diverse Signalkaskaden aktiviert (Giancotti und Ruoslahti, 1999; van der Flier und Sonnenberg, 2001; Anthis und Campbell, 2011; Legate et al., 2009). Über die Integrin-abhängige Aktivierung kleiner GTP-bindender Proteine aus der Familie der Rho-GTPasen (Rac, Rho, Cdc42) können Signalwege, die die Zelladhäsion sowie das Aktinnetzwerk der Zelle beeinflussen, initiiert und moduliert werden (Clark et al., 1998; Hall, 2005; Nobes und Hall, 1995; Legate et al., 2009). Durch Reorganisation des Zytoskeletts kommt es zur Polarisierung der Zelle. Das bedeutet, es bilden sich ein Aktin-reicher vorderer Zellpol und ein Aktin-armer hinterer Pol. Durch die Polymerisierung der Aktinfilamente an der Zellfront entstehen Filo- und Lamellipodien, welche Membranausstülpungen darstellen, die von der Zelle für die Protrusion genutzt werden. Während der Migration bewegen sich diese Membranstrukturen von der Vorderseite zur Rückseite der Zelle, indem sie durch die Aktinpolymerisierung nach hinten geschoben werden. Integrin-vermittelt werden an der Zellfront stetig neue Kontakte zur EZM geknüpft und parallel dazu bestehende Verbindungen zur EZM im hinteren Pol der Zellen aufgelöst. Die beteiligten Integrine werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und anschließend abgebaut oder erneut verwendet, indem sie zum vorderen Zellpol transportiert werden. Die Aktivierung von zytoplasmatischen Aktin-Myosin-Einheiten (*stress fibers*), die eine Kontraktion des Zytoskeletts bedingen, erlaubt schließlich die Migration der Zelle, wobei der Zellkörper passiv nachgezogen wird (Vicente-Manzanares et al., 2009; Hood und Cheresch, 2002; Lauffenburger und Horwitz, 1996; Ridley et al., 2003).



**Abbildung 5. Schematische Darstellung des zellulären Migrationsprozesses**

Die zelluläre Migration untergliedert sich in verschiedene Phasen. Die Reorganisation des Zytoskeletts führt zu einer Polarisierung der Zelle. Das bedeutet, es bilden sich ein Aktin-reicher vorderer Zellpol und ein Aktin-arter hinterer Pol. Durch die Polymerisierung der Aktinfilamente im Bereich der Zellfront entstehen Membranausstülpungen in Migrationsrichtung, sogenannte Filo- und Lamellipodien. In diesen Bereichen werden Integrin-vermittelt neue Kontakte zur EZM ausgebildet, während bestehende Verbindungen zur EZM im, zur Migrationsrichtung betrachteten, hinteren Zellbereich gelöst werden und die beteiligten Integrine durch Endozytose internalisiert werden. In den Kontaktregionen der Zelle auf dem entsprechenden EZM-Substrat entstehen die charakteristischen fokalen Adhäsionsstellen, die aus Integrienen sowie intrazellulären Signal- und Adaptermolekülen bestehen. Im Rahmen dieser Komplexe wird die Anbindung der Integrine an das Zytoskelett ermöglicht und diverse für die Migration essentielle Signalkaskaden aktiviert. Dabei nehmen auch externe Signale, wie Wachstumsfaktoren, Einfluss. Es kommt unter anderem nach Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) zu einer Stimulierung kleiner GTP-bindender Proteine aus der Familie der Rho-GTPasen (Rac, Cdc42) und der Proteinkinase Akt. Die Fortbewegung der Zelle wird schließlich durch die Aktivierung von zytoplasmatischen Aktin-Myosin-Einheiten (*stress fibers*), die eine Kontraktion des Zytoskeletts bedingen, ermöglicht (modifiziert nach Jiang et al., 2009).

Die Darstellung des Prozesses der zellulären Migration macht deutlich, dass dieser eine feinabgestimmte Integration extra- und intrazellulärer Signale fordert, an welcher die transmembranen Integrine mit ihrer Eigenschaft der bidirektionalen Signaltransduktion wesentlich beteiligt sind. Es liegt demnach nahe, dass Abweichungen in der Funktion der Integrine, wie sie im Rahmen der Tumorprogression beobachtet werden, zu einem veränderten motilen Zellverhalten führen. Zum einen spielen hier Änderungen des Integrin-Expressionsmusters eine wichtige Rolle (Mizejewski, 1999). Zum anderen kann die Aktivität der Integrine durch die Interaktion mit anderen Zelloberflächenmolekülen innerhalb multimolekularer Netzwerke auf der Zellmembran beeinflusst werden. Zu diesen gehören beispielsweise Wachstumsfaktor-

rezeptoren und auch verschiedene Tetraspanine. Im Rahmen dieser Wechselwirkungen beeinflussen die verschiedenen Transmembranproteine jeweils die Signalgebung ihrer Interaktionspartner. Einzelne Signalwege werden moduliert oder zum Teil erst ermöglicht. Auf diese Weise werden multiple zelluläre Funktionen, wie auch die Migration, reguliert (van der Flier und Sonnenberg, 2001; Porter und Hogg, 1998; Legate et al., 2009).

Die Bedeutung der Wechselwirkung der Integrine, speziell des Integrins  $\alpha_v\beta_3$ , mit dem Tetraspanin KAI1-WT und KAI1-SP für die Motilität von Ovarialkarzinomzellen stellt einen zentralen Punkt der vorliegenden Arbeit dar.

### **1.6.2 Das Zusammenspiel von KAI1-Proteinen und Integrinen bei der zellulären Migration**

Die Komplexbildung von Integrinen und Tetraspaninen spielt eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression (Hemler et al., 1996). An der Zellmigration, als tumorbiologisch wichtige zelluläre Eigenschaft, sind, wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, zum einen Integrine wesentlich beteiligt. Zum anderen ist bekannt, dass das Tetraspanin KAI1-WT im Rahmen seiner Funktion als Metastasierungssuppressor die Motilität maligner Zellen limitiert (Zhang et al., 2003a, Sridhar und Miranti, 2006, Jee et al., 2007; Takaoka et al., 1998). Ein Zusammenspiel von Integrinen und KAI1-Proteinen bei der Regulierung der zellulären Migration ist demnach naheliegend.

Das Tetraspanin KAI1-WT steht mit verschiedenen Integrinen, wie beispielsweise den Integrinen  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$  und  $\alpha_5\beta_1$ , in Verbindung (Mannion et al., 1996; Berditchevski und Odintsova, 1999; Ono et al., 2000). Ruseva et al. (2009) zeigten erstmalig auch eine Kollokalisierung des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  mit KAI1-WT sowie funktionelle Wechselwirkungen dieser Proteine in humanen Ovarialkarzinomzellen. Sie gaben Hinweise darauf, dass KAI1-WT durch die Regulierung der Funktion des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  die zelluläre Motilität reduziert. Eine wichtige Rolle scheint hierbei die Modulierung bzw. die Stabilisierung der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Adhäsion an VN durch KAI1-WT zu spielen. Bisher sind die genauen Mechanismen, über die KAI1-WT die Zellmigration hemmt, sowie die Rolle der Wechselwirkung mit Integrinen jedoch noch unzureichend geklärt.

Einige Moleküle und Signalwege, die in die Modulierung der zellulären Motilität durch KAI1-WT involviert sind, sind dennoch bereits beschrieben. Ein wichtiger Mechanismus in diesem Zusammenhang ist die Regulierung von Tyrosinkinasen. Verschiedene Rezeptor-

Tyrosinkinasen, wie der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), c-Met und der *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) sind an dem Prozess der Migration beteiligt (Sridhar und Miranti 2006; Odintsova et al., 2000). Sie sind zum einen Bestandteil der Signalwege der Integrine (Sundberg und Rubin, 1996; Mitra et al., 2011; Moro et al., 2002) und interagieren zum anderen mit KAI1-WT (Sridhar und Miranti 2006; Takahashi et al., 2007; Odintsova et al., 2000; 2003). Sridhar und Miranti (2006) zeigten, dass KAI1-WT die Integrin-vermittelte Aktivierung von c-Met hemmt und auf diese Weise das invasive Potential maligner Zellen reduziert. Zudem ist bekannt, dass KAI1-WT im Rahmen einer Wechselwirkung mit dem EGFR EGF-induzierte Signalwege desensibilisiert und auch durch Endozytose des EGFR/EGF-Komplexes die zelluläre Motilität beeinflusst (Odintsova et al., 2000).

Ein weiterer Signalweg, über den KAI1-WT die Integrin-vermittelte Migration moduliert, beinhaltet intrazelluläre Src-Kinasen, die FAK, p130cas und CrkII (Sridhar und Miranti 2006; Zhang et al., 2003a). Ebenso wird auch die Funktion der PKC, die als intrazelluläres Signalmolekül mit  $\beta_1$ -Integrinen assoziiert ist und an der Zytoskelettorganisation sowie der Zellmotilität beteiligt ist, durch KAI1-WT durch Phosphorylierung der Integrine beeinflusst (Zhang et al., 2001). Zudem gibt es Hinweise, dass KAI1-WT in die Endozytose von Integrinen involviert ist sowie die Reifung von  $\beta_1$ -Integrinvorstufen verzögert und somit durch Änderung des Integrin-Expressionsmusters Einfluss auf die migratorische Aktivität von Zellen nimmt (He et al., 2005; Jee et al., 2007).

Die beschriebenen komplexen Interaktionswege zeigen, wie eng KAI1-Proteine und Integrine zusammenarbeiten und wie bedeutend diese Wechselwirkung für die Regulierung der zellulären Migration ist.

## **1.7 Die Wechselwirkung der KAI1-Proteine mit dem Zell/Zell-Adhäsionsrezeptor E-Cadherin**

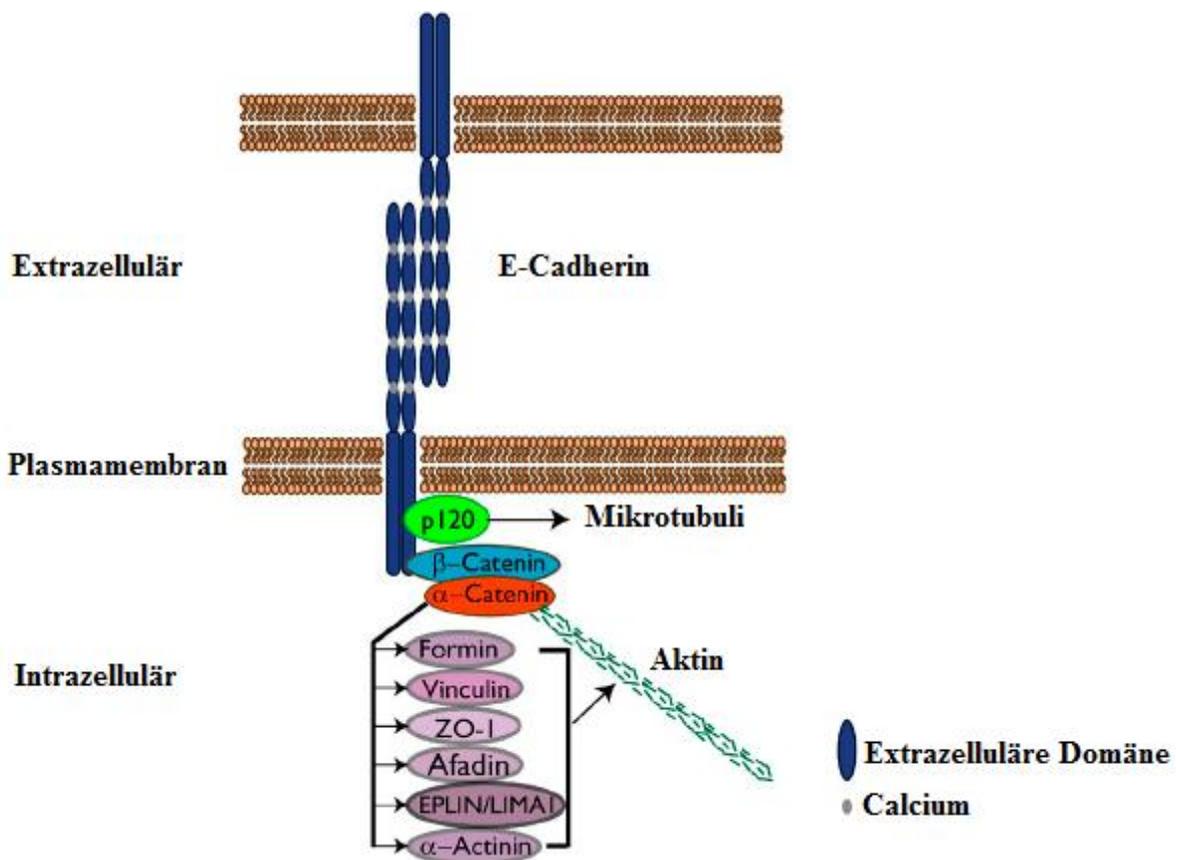
Das E-Cadherin ist neben den Integrinen ein weiteres wichtiges Adhäsionsmolekül, das mit KAI1-Proteinen interagiert (Abe et al., 2008). Es gehört zu der Gruppe der klassischen Cadherine und bildet in epithelialen Geweben homophile Zell/Zell-Kontakte in Form von *Adherens Junctions* aus. E-Cadherin stellt ein transmembranes Glykoprotein dar, das in Form eines Dimers in die Zellmembran integriert ist (Gumbiner et al., 1988; Gumbiner, 1996; 2005; Baum und Georgiou, 2011).

Cadherine weisen in ihrem extrazellulären Teil eine variable Anzahl an charakteristischen, sich wiederholenden Cadherin-Domänen auf. E-Cadherin besitzt fünf dieser Domänen (Takeichi, 1995; Parisini et al., 2007; Ivanov et al., 2001). Durch die Bindung von Calciumionen in diesem Bereich wird die Ausbildung einer stabilen Proteinkonformation ermöglicht, welche eine Voraussetzung für die Zelladhäsion darstellt (Overduin et al., 1995; Ozawa et al., 1990a; Nagar et al., 1996; Shapiro et al., 1995; Pokutta et al., 1994; Baum und Georgiou, 2011). Die E-Cadherin-vermittelte interzelluläre Adhäsion resultiert schließlich aus der Interaktion der extrazellulären Domänen zweier Cadherine benachbarter Zellen (Ivanov et al., 2001).

Über die zytoplasmatische Domäne steht E-Cadherin mit verschiedenen Proteinen der Catenin-Familie in Kontakt, die eine Anbindung an das Zytoskelett ermöglichen (Ozawa et al., 1998; Shibamoto et al., 1995; Baum und Georgiou, 2011). Es existiert eine Bindungsstelle für p120-Catenin (Shibamoto et al., 1995; Reynolds et al., 1994; Staddon et al., 1995; Hu, 2012) sowie für  $\beta$ -Catenin und für Plakoglobin. Über  $\beta$ -Catenin wird der Kontakt zu  $\alpha$ -Catenin hergestellt (Hülsken et al., 1994; Oyama et al., 1994; Aberle et al., 1994; Baum und Georgiou, 2011), das entweder direkt mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert (Rimm et al., 1995) oder über Aktin-bindende Proteine mit diesem assoziiert ist (Knudsen et al., 1995; Weiss et al., 1998; Nieset et al., 1997; Watabe-Uchida et al., 1998; Baum und Georgiou, 2011). Die Formation dieses Cadherin/Catenin-Komplexes ist essentiell für die Ausbildung stabiler interzellulärer Kontakte (Ozawa et al., 1990b; Shimoyama et al., 1992; Kawanishi et al., 1995; Oyama et al., 1994; Davis et al., 2003; Niessen et al., 2011; Baum und Georgiou, 2011).

Ein Verlust der E-Cadherin-vermittelten Zell/Zell-Adhäsion spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und der Progression maligner Tumoren (Hedrick et al., 1993; Wijnhoven et al., 2000; Birchmeier und Behrens, 1994; Semb und Christofori, 1998; Rodriguez et al., 2012; Hirohashi, 1998). Für verschiedene maligne Tumorentitäten, so auch für das Ovarialkarzinom, ist eine verminderte Expression des E-Cadherins beschrieben (Fujioka et al., 2001; Imai et al., 2004; Voutilainen et al., 2006; Kokenyesi et al., 2003; Wang et al., 2013). Dieser Expressionsverlust ist ein wesentlicher Bestandteil der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Diese beschreibt eine zellphänotypische Umwandlung im Rahmen der Tumorprogression, bei der epitheliale Zellen ihre zelltypspezifischen Eigenschaften verlieren und gleichzeitig mesenchymale Merkmale annehmen (Wheelock et al., 2008; Rodriguez et al., 2012; Le Bras et al., 2012).

Die verminderte E-Cadherin-vermittelte interzelluläre Adhäsion ermöglicht zudem, dass sich maligne Zellen vom Primärtumor lösen. Folglich nimmt ihre Motilität zu und die Kontakthemmung entfällt. Es entsteht ein unkontrolliertes Zellwachstum und das invasive sowie das metastatische Potential der Zellen steigt (Frixen et al., 1991; Handschuh et al., 1999; Kokenyesi et al., 2003; Takeichi, 1993; Vleminckx et al., 1991; Rodriguez et al., 2012). Somit weisen Patientinnen mit Ovarialkarzinom, bei denen das E-Cadherin vermindert exprimiert wird, häufig ein fortgeschrittenes Tumorstadium und eine verstärkte Metastasenbildung auf (Yuecheng et al., 2006). Die Überlebensrate ist hier deutlich reduziert (Faleiro-Rodrigues et al., 2004).



**Abbildung 6. Schematische Darstellung des E-Cadherin/Catenin-Komplexes**

E-Cadherin stellt ein transmembranes Glykoprotein dar. Es liegt in Form eines Dimers vor und bildet in epithelialen Geweben homophile Zell/Zell-Kontakte aus. Die extrazelluläre Domäne enthält fünf charakteristische Cadherin-Domänen. Die Bindung von Calciumionen in diesem Bereich ermöglicht die Ausbildung einer stabilen Konformation, die essentiell für die Adhäsion ist. Die zytosplasmatische Domäne des E-Cadherins steht über den Cateninkomplex, der aus p120, β-Catenin, α-Catenin und Aktin-bindenden Proteinen (Formin, Vinculin, ZO-I, Afadin, EPLIN/LIMAI, α-Actinin) besteht, mit dem Zytoskelett in Verbindung (modifiziert nach Baum und Georgiou, 2011).

Die genauen Mechanismen, die dem Expressionsverlust des E-Cadherins zugrunde liegen, sind noch nicht genau bekannt. Unter anderem scheinen eine Hypermethylierung der Promotorregion und eine supprimierte Transkription dabei eine Rolle zu spielen (Yoshiura et al., 1995; Battle et al., 2000; Cano et al., 2000; Caldeira et al., 2006). Neben der reduzierten Expression sind jedoch auch weitere Ursachen für einen Funktionsverlust des E-Cadherins beschrieben, die zu einer Destabilisierung der Zell/Zell-Adhäsion führen. Zu diesen zählen verschiedene Mutationen des E-Cadherins und auch der assoziierten Catenine sowie ein Expressionsverlust der Catenine (Handschuh et al., 1999; 2001; Shimoyama et al., 1992; Morton et al., 1993; Kawanishi et al., 1995; Oyama et al., 1994).

Für das Ovarialkarzinom gibt es zudem Hinweise, dass auch ein Expressionsanstieg des E-Cadherins in die Tumorprogression involviert ist und E-Cadherin in diesem Zusammenhang Einfluss auf tumorbiologisch relevante Zellfunktionen, wie die Motilität oder das Zellwachstum nimmt (Rodriguez et al., 2012). Somit scheint E-Cadherin hier eine besondere Rolle zu spielen, die bislang jedoch noch nicht hinreichend geklärt ist.

Dennoch wird deutlich, dass einer ausgewogenen Regulierung des E-Cadherin eine entscheidende Bedeutung für die Tumorprogression zukommt. An dieser sind multiple verschiedene Moleküle beteiligt. Es besteht sowohl ein Einfluss durch externe Signale, wie zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren (Moon et al., 2001; Shiozaki et al., 1995; Shibamoto et al., 1994; Hoschuetzky et al., 1994), als auch durch weitere Transmembranproteine, wie unter anderem durch Integrine (Canel et al., 2013) und auch das Tetraspanin KAI1-WT (Abe et al., 2008). Die Regulationsmechanismen sind sehr komplex. Unter diesen spielt die Modulierung der Adhäsionsstärke des E-Cadherin/Catenin-Komplexes durch Tyrosinphosphorylierung der Einzelkomponenten eine große Rolle (Daniel und Reynolds, 1997; Nelson, 2008). Wichtig für die Tumorprogression ist dabei unter anderem die verstärkte Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, die zu einer Dissoziation des E-Cadherin/Catenin-Komplexes und folglich zu einer verminderten interzellulären Adhäsion führt (Roura et al., 1999; Piedra et al., 2001).

Für die vorliegende Arbeit ist vor allem die Funktion der KAI1-Proteine bei der Regulierung der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion bedeutend. Über diese ist bislang noch wenig bekannt. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass KAI1-WT den Komplex aus E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin stabilisiert, indem es die Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenins vermindert. Die daraus resultierende verstärkte interzelluläre Adhäsion scheint maligne Zellen vor einer Dissemination zu schützen und eine Barriere für invasive Zellen zu bilden (Abe et al., 2008). Dies weist darauf hin, dass die Regulierung der interzellulären Adhäsion im Rahmen der Interaktion von

KAI1-WT und E-Cadherin einen weiteren wichtigen Mechanismus darstellt, über den KAI1-WT die Fähigkeit maligner Zellen zur Metastasierung limitiert.

## 1.8 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Funktion des Tetraspanins KAI1-WT im Vergleich zu KAI1-SP in humanen Ovarialkarzinomzellen. Hierzu wurde die Rolle der beiden strukturell unterschiedlichen KAI1-Proteine bei der Regulierung tumorbiologisch wichtiger zellulärer Eigenschaften - der Adhäsion und der Migration - untersucht.

- **Analyse der zellulären Motilität:**

Im Fokus der Arbeit stand die Analyse des Einflusses von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die zelluläre Migration im Kontext einer Interaktion mit Integrinen, speziell dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$ . Dazu wurde die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte migratorische Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen auf VN nach Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP untersucht. Zudem wurde die Auswirkung einer Überexpression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  auf die Funktion der beiden strukturell unterschiedlichen KAI1-Proteine bei der Zellmigration überprüft.

- **Analyse der Wechselwirkung mit E-Cadherin:**

Neben der Analyse der zellulären Motilität im Rahmen der Wechselwirkung mit Integrinen wurde die physikalische Interaktion von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit dem Zell/Zell-Adhäsionsrezeptor E-Cadherin im Hinblick auf potentielle Unterschiede in der Wechselwirkung der Proteine untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zelllinie

Für die vorliegende Arbeit wurden humane Ovarialkarzinomzellen der Zelllinie **OV-MZ-6** verwendet. Diese wurden ursprünglich aus dem malignen Aszites einer Patientin mit fortgeschrittenem serösen Adenokarzinom des Ovars entnommen. Die Charakterisierung und Etablierung dieser Zelllinie im Hinblick auf biochemische, immunhistochemische und morphologische Eigenschaften erfolgte durch Möbus et al. (1992).

Neben Wildtyp (WT)-OV-MZ-6-Zellen wurden auch Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen verwendet, die bereits im Rahmen früherer Studien generiert worden waren (Hapke et al., 2001; 2003) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Die Zellen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Reuning, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, mit KAI1-Splice (SP)- oder mit KAI1-WT-cDNA aus humanem Ovarialkarzinomgewebe mittels geeigneter Expressionsvektoren stabil transfiziert, um die entsprechenden Proteine verstärkt zu exprimieren.

### 2.2 Materialien und Reagenzien

#### 2.2.1 Materialien und Reagenzien für die Zellkultur und zellbiologische Versuchsansätze

##### Zellkultur

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>Dubbecco's phosphate buffered saline</i> (DPBS)	Invitrogen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Geneticin G418	Invitrogen

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Invitrogen
Hygromycin B	Invitrogen
L-Arginin und L-Asparagin	Sigma-Aldrich
Trypanblau-Lösung 0,4% (w/v)	Sigma-Aldrich
Trypsin	Biochrom AG
Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

### Stabile Zelltransfektion

KAI1-WT-cDNA	Der KAI1-WT-cDNA-enthaltende Expressionsvektor wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Reuning, Klinische Forschung der Frauenklinik der TUM, zur Verfügung gestellt.
KAI1-SP-cDNA	Der KAI1-SP-cDNA-enthaltende Expressionsvektor wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Eva Gross, Tumorgenetische Arbeitsgruppe der Frauenklinik TUM, zur Verfügung gestellt.
Lipofektin Reagenz	Invitrogen
Plasmid pcDNA3.1/Hygro	Invitrogen
Plasmid pcDNA3.1/myc-His	Invitrogen

### Extrazelluläre Matrixproteine

Fibronektin (FN)	Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Kollagen Typ I (Kol I)	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma-Aldrich
Vitronektin (VN)	Becton-Dickinson Biosciences

### Durchflusszytometrie und Immunozytochemie

FACS <i>Flow Sheath Fluid</i>	Becton-Dickinson Biosciences
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur-Objektträger mit 8 Kammern ( <i>micro chamber cell culture slides</i> )	Nunc Lab-Tek, Naperville, IL, USA

### Migrationsstudien am CLSM

Unbeschichtete Zellkulturplatten mit Glasboden ( <i>Glass bottom culture dishes</i> ) (P35G-0-14-C)	MatTek Cooperation, Ashland, USA
Deckel für <i>Glass bottom culture dishes</i> mit gasdurchlässiger Folie [ <i>CultFoil</i> (25µm)]	PeCon GmbH, Erlbach, Deutschland

### Proteinbestimmung, SDS-Gelelektrophorese, Westernblot-Analyse

Acrylamid (Rotiphorese Gel 40)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
BCA Protein <i>Assay Kit</i>	Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products, Rockford, USA
Essigsäure	Roth
Ethanol (99,8%)	Apotheke (Klinikum Rechts der Isar, München)
Glycin	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Sigma-Aldrich
Pierce ECL Westernblot Substrat	Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products
Proteinmarker ( <i>Prestained Protein Ladder</i> #SM0671)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PVDF Gel-Blotting-Membran	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

### **Antikörper**

Isotypkontrolle Maus-IgG (Klon Mg2b00)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Monoklonales Kaninchen-IgG gegen E-Cadherin (Klon 24E10)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Monoklonales Maus-IgG gegen E-Cadherin (Klon MB2)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Monoklonales Maus-IgG gerichtet gegen KAI1 (Klon TS82b)	Diaclone, Tepnel Research Products & Services, Besançon, Frankreich
Polyklonales Kaninchen-IgG gerichtet gegen die Aminosäuren 95-267 am Carboxy-Terminus von KAI1 (Klon H-173)	Santa Cruz Biotechnology
Polyklonales Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa-488-konjugiert	Invitrogen
Polyklonales Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Alexa-568-konjugiert	Invitrogen
Ziege-anti Kaninchen IgG, HRP ( <i>horseradish peroxidase</i> )-konjugiert	Dianova
Ziege-anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	Dianova

Alle übrigen, hier nicht separat aufgeführten, Verbrauchsmaterialien wurden von Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA und der Firma Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, bezogen.

### 2.2.2 Geräte

Durchflusszytofluorometer FACS Calibur	Becton-Dickinson Biosciences
Elektrophoresekammer, Kämme, Gießstation	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Gel Lufttrockner	Bio-Rad Laboratories
Konfokales <i>Laser Scanning</i> -Mikroskop (CLSM) Axiovert 35 mit <i>Laserscan</i> -Detektionseinheit	Zeiss, Jena, Deutschland Leica, Wetzlar, Deutschland
LSM 510 Meta mit inversem Mikroskop Axiovert 100M und angeschlossenem Inkubationssystem mit Temperaturregulator ( <i>Tempcontrol 37-2 digital</i> ) und CO <sub>2</sub> -Regulation ( <i>CTI-Controller 3700 digital</i> )	Zeiss PeCon GmbH, Erlbach, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Röntgenfilmentwickler Cawomat 2000IR	Cawo, Schrobenhausen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Hera <i>Safe</i>	Heraeus, Hanau, Deutschland
SLT <i>Spectra Elisa Reader</i>	SLT, Crailsheim, Deutschland
pH-Meter	Schott, Mainz, Deutschland
Protein Elektrophorese <i>Power-supply Power Pac 300V</i>	Bio-Rad Laboratories
<i>Wet-Blotting</i> -Kammer	Bio-Rad Laboratories
Zellinkubator Hera <i>Cell</i>	Heraeus
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 2.2.3 Software

<i>CellQuest</i>	Becton-Dickinson Bioscience
<i>Image J 1.40g</i>	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
LSM <i>Image Browser</i> Version 3.2.0.70	Zeiss

## **2.3 Zellbiologische Methoden**

### **2.3.1 Zellkultur**

#### **2.3.1.1 Herstellung der Zellkulturmedien**

Das Kulturnährmedium für die Ovarialkarzinomzellen setzte sich wie folgt zusammen:

- DMEM mit Glutamax
- 10 mM HEPES
- 10% (v/v) FCS
- 550 mM L-Arginin
- 272 mM L-Asparagin

Zur selektiven Kultivierung der mit KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-cDNA transfizierten Zellen mittels Expressionsvektoren, welche ein Hygromycinresistenzgen trugen (Plasmid pcDNA3.1/Hygro), wurde dem Nährmedium Hygromycin B in einer Konzentration von 200 µg/ml zugeführt. Die Kultivierung der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -transfizierten OV-MZ-6-Zellen erfolgte zusätzlich mit Geneticin (G418) in einer Konzentration von 1 µg/ml Medium, da der hier verwendete Expressionsvektor auch ein Resistenzgen für dieses Antibiotikum enthielt (Plasmid pcDNA3.1/myc-His).

Das Einfriermedium setzte sich aus 90% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO zusammen.

#### **2.3.1.2 Kultivierung und Passagieren der Zellen**

Die Ovarialkarzinomzellen wurden bei 37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in Kulturflaschen im Zellinkubator kultiviert. Bei einer Zellkonfluenz von etwa 80% wurden sie alle 3-4 Tage passagiert. Dazu wurde das Medium mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen von der Oberfläche wurde PBS, 0,05% (w/v) EDTA für 5-10 min bei 37 °C hinzugegeben. Nachdem sich die Zellen sichtbar gelöst hatten, folgte ein Waschschrift mit PBS. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 20 °C 3 min bei 246 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturfläche verteilt.

### 2.3.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um ein Depot an Zellen zu schaffen, wurden Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen, wie beschrieben, abgelöst, gewaschen und zentrifugiert. Nachfolgend wurden circa  $5 \times 10^6$  Zellen in 0,5-1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryogefäß überführt. Dieses wurde sofort auf Eis gestellt und anschließend für 3-4 Tage bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte schockartig, damit ihre Kontaktzeit zu dem DMSO, das toxisch wirkt, möglichst gering gehalten wurde. Die kryokonservierten Proben wurden zunächst auf Eis gelagert und anschließend in 10 ml Medium aufgenommen, zentrifugiert, in  $37\text{ }^\circ\text{C}$  warmen Medium resuspendiert und erneut in einer Zellkulturflasche unter den oben genannten Bedingungen kultiviert.

### 2.3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese enthält 6 Großquadrate mit je 1 mm Seitenlänge und einer Kammerhöhe von 0,2 mm. Die Zellsuspension wurde zur Anfärbung toter Zellen 1:10 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und mittels Kapillarkräfte in die Kammer gezogen. Unter dem Mikroskop wurden 4 diagonal liegende Kleinquadrate ausgezählt. Danach konnte die Zellzahl wie folgt errechnet werden:

Gezählte Zellen :  $4 \times 10$  (Verdünnungsfaktor)  $\times 10000$  (Kammervolumen) = Zellzahl/ml

### 2.3.1.5 Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit extrazellulären Matrixproteinen

Zum Beschichten von Zellkulturgefäßen wurden verschiedene EZM-Proteinen in PBS resuspendiert. Die Beschichtung erfolgte für 30-60 min bei Raumtemperatur (RT) (Kol I, PLL) oder  $4\text{ }^\circ\text{C}$  (FN, VN). Anschließend wurden die Zellkulturgefäße 2 Mal in PBS gewaschen und vor der Zellaussaat freie Bindungsstellen mit PBS, 2% ( $^w/v$ ) BSA für 1 h bei RT blockiert. Folgende EZM-Proteine und Konzentrationen wurden verwendet:

**FN:** 10  $\mu\text{g/ml}$

**VN:** 5  $\mu\text{g/ml}$

**Kol I:** 5  $\mu\text{g/ml}$

**PLL** 0,01 % ( $^w/v$ )

### 2.3.1.6 Herstellung von Zelllysaten

Um Proteine nachweisen zu können, wurden die Zellen zunächst durch einen speziellen Lysepuffer in wässrige Lösung gebracht. Um die zelleigenen Proteasen zu hemmen enthielt der verwendete Puffer einen *Protease Inhibitor Cocktail* (EDTA-frei) und sowohl die verwendeten Lösungen als auch die Materialien wurden stetig in einem Eisbad gekühlt.

#### **Zelllysate für die Westernblot-Analyse:**

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen in eiskaltem PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit 400 µl des Lysepuffers inkubiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 246 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden danach in neuen Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert oder direkt für die Proteinbestimmung verwendet.

<b>Lysepuffer:</b>	50 mM	HEPES (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	10 % (v/v)	Glycerin
	1 % (v/v)	Triton X-100
	0,1 % (v/v)	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i> (EDTA-frei)

#### **Zelllysate für die Immunpräzipitation:**

Die Zellen wurden in PBS, 0,05% (w/v) EDTA abgelöst, in PBS gewaschen, in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und anschließend 3 min bei 246 x g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte die Inkubation des Zellpellets mit dem Lysepuffer. Bei diesem wurde mit Brij V98 ein milderer Detergenz, als im Lysepuffer für die anschließende Westernblot-Analyse, verwendet, um potentielle schwache Protein/Protein-Wechselwirkungen nicht aufzuheben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurden die Lysate zentrifugiert und die Überstände bei -20 °C gelagert oder direkt für die Proteinbestimmung verwendet.

<b>Lysepuffer:</b>	25 mM	HEPES (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
	1 mM	NaF
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 % (v/v)	Brij V98-Detergenz
	0,1 % (v/v)	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i> (EDTA-frei)

### 2.3.2 Etablierung von stabil mit KAI1-Wildtyp- bzw. KAI1-Splice-cDNA-transfizierten OV-MZ-6-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden WT-OV-MZ-6-Zellen sowie Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -überexprimierende OV-MZ-6-Zellen verwendet, die im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof Dr. Ute Reuning generiert worden waren. Diese wurden stabil mit KAI1-WT-, KAI1-SP-cDNA oder dem entsprechenden Expressionsvektor ohne cDNA-Insert (VEK) transfiziert und für die vorliegenden Studien freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Vorgang der Transfektion soll im Folgenden daher nur kurz erläutert werden.

Für die stabile Transfektion wurden die Zellen für 2-3 Tage kultiviert. Bei einer Konfluenz des Zellrasens von etwa 60% wurden die Zellen mit KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-cDNA-enthaltenden Expressionsplasmiden transfiziert oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Expressionsvektor ohne cDNA-Insert. Hierzu wurden die Zellen nach einem Waschschrift in PBS mit jeweils 5  $\mu$ g DNA und 15  $\mu$ l des Transfektionsreagenz Lipofectin in 400  $\mu$ l Medium ohne Zusatz von FCS (= GAM, *growth arrest medium*) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 6 h bei 37 °C wurde das Transfektionsmedium entfernt und Kompletmedium hinzugegeben. Die transfizierten Zellen wurden weiter kultiviert und bei einer Konfluenz des Zellrasens von etwa 80% mit dem entsprechenden Selektionsmedium unter Antibiotikazugabe versetzt. Dieses enthielt, wie unter 2.3.1.1 ausführlich beschrieben, Hygromycin in einer Konzentration von 200  $\mu$ g/ml und für Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -transfizierte OV-MZ-6-Zellen zusätzlich Genitacin (G418) in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml. Zellen, die den Expressionsvektor nicht aufgenommen hatten, starben unter diesen Bedingungen. Auf diese Weise wurden erfolgreich transfizierte Zellklone selektiert. Die im Einzelnen erzeugten Zellklone werden in Abschnitt 3.1 aufgelistet. Wie nachfolgend beschrieben, wurden diese anschließend immunzytochemisch, durchflusszytofluorometrisch sowie mittels Westernblot-Analyse hinsichtlich ihrer KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expressionshöhe charakterisiert.

### 2.3.3 Durchflusszytometrie

Um die Ovarialkarzinomzellen hinsichtlich der Expressionsstärke von KAI1-WT bzw. KAI1-SP nach stabiler Transfektion mit der entsprechenden cDNA zu untersuchen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse (FACS = *fluorescence activated cell sorting*) durchgeführt. Dazu wurden jeweils circa  $10^5$  der KAI1-WT-, KAI1-SP- und der VEK-transfizierten Zellen als Kontrolle in Polystyrol-Röhrchen überführt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei  $246 \times g$  wurde der Überstand mittels einer Pasteurpipette abgesaugt. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit PBS, 2% ( $w/v$ ) BSA für 30 min bei RT blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper (monoklonales Maus-IgG gegen KAI1, Klon TS82b) in einer Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  PBS, 1% ( $w/v$ ) BSA für 2 h bei RT. Im Anschluss an 3 Waschvorgänge in PBS wurde der entsprechende Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sekundärantikörper (Alexa-488-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG) in einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  PBS, 1% ( $w/v$ ) BSA für 45 min in Dunkelheit hinzugegeben. Nach 2 weiteren Waschvorgängen in PBS wurden die Zellen in PBS, 1% ( $w/v$ ) BSA aufgenommen und die KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expressionslevel durchflusszytometrisch am FACS Calibur detektiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der *CellQuest* Software.

### 2.3.4 Immunzytochemische Analyse

Die Expressionsstärke der stabil transfizierten Zellklone wurde zusätzlich zu der oben beschriebenen durchflusszytometrischen Analyse auch immunzytochemisch untersucht. Dazu wurden Glasobjektträger mit mehreren kleinen Zellkammern, sogenannte *micro chamber cell culture slides*, mit dem EZM-Protein VN ( $5 \mu\text{g/ml}$  PBS) oder FN ( $10 \mu\text{g/ml}$  PBS) beschichtet. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei  $4^\circ\text{C}$ . Der Beschichtung folgten 3 Waschschrte in PBS. Anschließend wurden jeweils etwa  $5 \times 10^4$  Zellen der verschiedenen Zellklone ausgesät und über Nacht kultiviert. Für die immunzytochemische Färbung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in PBS gewaschen. Nachfolgend fand die Fixierung der Zellen in PBS, 4% ( $w/v$ ) PFA für 15-20 min bei  $4^\circ\text{C}$  statt. Nach 3 Waschschrten in PBS wurden unspezifische Bindungsstellen in PBS, 2% ( $w/v$ ) BSA für 30 min bei RT blockiert. Die Zellen wurden erneut 3 Mal in PBS gewaschen und mit dem Primärantikörper (monoklonales Maus-IgG gegen KAI1, Klon TS82b) in einer Konzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$  PBS, 1% ( $w/v$ ) BSA für 1-2 h bei RT inkubiert. Im Anschluss an 3 weitere Waschvorgänge in PBS folgte die Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper (Alexa-488-konju-

giertes Ziege-anti-Maus-IgG) in einer Konzentration von 1 µg/ml PBS, 1% (<sup>w/v</sup>) BSA für 45 min in Dunkelheit. Nach erneutem Waschen in PBS wurde die Immunfluoreszenz an einem CLSM ausgewertet.

Die Kolokalisierung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit E-Cadherin wurde im Rahmen einer immunzytochemischen Doppelfärbung untersucht. Hierzu wurden die Zellen simultan mit 2 Primärantikörpern, dem monoklonalen Maus-IgG gegen KAI1 (Klon TS82b) und einem monoklonalen Kaninchen-IgG gegen E-Cadherin (Klon 24E10) inkubiert. Die Signaldetektion am CLSM erfolgte entsprechend unter Verwendung von 2 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern (Alexa-488-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa-568-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG).

### **2.3.5 Zellmotilitätsstudien mittels *time-lapse*-Videomikroskopie**

Die Auswirkung der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Motilität von Ovarialkarzinomzellen wurde mittels Zeitraffer (*time-lapse*)-Aufnahmen an einem CLSM untersucht. Die für die *time-lapse*-Videomikroskopie benötigten Geräte (Abbildung 7) und die dazugehörige Software wurden freundlicherweise vom Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München am Helmholtz Zentrum München zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen der Motilitätsstudien wurde das Bewegungsmuster von KAI1-WT-, KAI1-SP- sowie VEK-transfizierten OV-MZ-6-Zellen als Kontrolle analysiert. Pro Zellklon wurden circa  $2,5 \times 10^5$  Zellen in etwa 3 ml Medium auf speziellen Kulturschalen mit einem zentral gelegenen Glasboden ausgesät. Diese wurden zuvor auf dem runden Mittelstück aus Glas, welches der Strahlengang des Mikroskops passiert, mit den EZM-Proteinen VN oder Kol I oder mit PLL als Kontrolle beschichtet. Dabei wurden die EZM-Substrate in einer Konzentration von 5 µg/ml PBS für 1 h auf die Petrischalen aufgetragen (VN bei 4 °C und Kol I bei RT). Die Beschichtung mit PLL erfolgte in einer Konzentration von 0,01% (<sup>w/v</sup>) für ebenfalls 1 h bei RT. Im Anschluss wurden die Petrischalen mit PBS gespült und nach Aussaat der Zellen in die Inkubationskammer des Mikroskops eingesetzt. Durch das integrierte Inkubationssystem mit Temperatur- und CO<sub>2</sub>-Regler war es möglich, optimale Kultivierungsbedingungen für die Zellen zu schaffen (37 °C und 5% (<sup>v/v</sup>) CO<sub>2</sub>) und somit die Beobachtung der Zellen über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten. Innerhalb der Inkubationskammer wurde die Petrischale zusätzlich von einem Ring, in den eine gasdurchlässige Folie gespannt

war, bedeckt, um ein Verdunsten des Mediums während des Beobachtungszeitraums zu verhindern. Je nach verwendetem Substrat und Zellklon zeigte sich nach circa 30-70 min eine vollständige Adhäsion der Zellen, sodass ein geeigneter Bildausschnitt optisch fokussiert werden konnte. Von diesem wurde anschließend über einen Zeitraum von 12 h alle 3 min bei 543 nm ein Phasenkontrastbild (PlanNeofluar Linse 20x/0,5 Ph2 Objektiv; Helium Neon Laser im Transmissionsmodus) aufgenommen. Auf diese Weise entstand im Zeitraffer ein Film mit 240 Einzelbildern.



**Abbildung 7. Aufbau des Messsystems für die Zellmotilitätsstudien mittels *time-lapse*-Videomikroskopie**

- 1 Zeiss LSM 510 Meta
- 2 Inverses Mikroskop (Axiovert 100M)
- 3 Inkubationskammer mit Heizeinsatz
- 4 pH-Wert-Regler (Regulierung der CO<sub>2</sub>-Zufuhr, CTI-Controller 3700 digital)
- 5 Temperaturregler (*Tempcontrol* 37-2 digital)

Die zelluläre Motilität wurde anhand von *time-lapse*-Aufnahmen an einem CLSM untersucht. Dieses setzt sich aus einer *Laser scanning*-Einheit (1) und einem inversen Mikroskop (2) zusammen. Die zu untersuchenden Zellen befanden sich, auf beschichteten Petrischalen ausgesät, in der angeschlossenen Inkubationskammer (3). Über einen pH-Wert- und einen Temperaturregler (4 und 5) wurden in dieser Zellkultivierungsbedingungen (37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub>) geschaffen.

Für KAI1-SP-, KAI1-WT- und VEK-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden jeweils in Abhängigkeit der verschiedenen Adhäsionsproteine 2-3 *time-lapse*-Bildserien erstellt und mit Hilfe der Software *LSM Image Browser* (Zeiss) ausgewertet (Abbildung 8).



**Abbildung 8. Ermittlung der zellmigratorischen Aktivität mittels *LSM Image Browser***

Die zelluläre Motilität wurde mittels *time-lapse*-Videomikroskopie aufgezeichnet mit Hilfe der Software *LSM Image Browser* ausgewertet. Dabei wurde die Bewegung der Nuklei über einen Zeitraum von 10 h manuell nachgezeichnet. Die Länge der auf diese Weise entstandenen Linie wurde durch das Programm berechnet und nebenstehend in  $\mu\text{m}$  angegeben.

Hier gezeigt ist eine repräsentative Auswertung von KAI1-SP-transfizierten OV-MZ-6-Zellen in Adhäsion an Kol I mit den jeweiligen Wegstreckenangaben in  $\mu\text{m}/10\text{ h}$ .

Hierbei blieben die ersten 40 Bilder (= 2 h) jeder Serie unberücksichtigt, um die Motilität der Zellen nur in der Phase der vollständigen Adhäsion zu erfassen. Somit wurde das zelluläre Bewegungsmuster über einen Zeitraum von 10 h analysiert. Aus den 2-3 erstellten Bilderreihen der verschiedenen Transfektanten wurden zwischen 50 und 110 Zellen anhand von defi-

nierten Ein- und Ausschlusskriterien (Abschnitt 3.2.1) ausgewählt und mittels des LSM *Image Browsers* untersucht. Hiermit war es möglich, die Motilität der einzelnen Zellen genau zu erfassen. Dazu wurde der zelluläre Nukleus zu Auswertungsbeginn markiert und anschließend manuell über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg verfolgt, was durch ein langsames Abspielen des auszuwertenden Films (2 Bilder pro sec) erleichtert werden konnte. Das zelluläre Bewegungsausmaß wurde als Linie abgebildet, deren Länge durch das Programm berechnet wurde. Diese Länge, angegeben in  $\mu\text{m}$ , wurde als Maß für die zurückgelegte Wegstrecke der migrierenden Zellen innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 10 h gewertet.

Aus den ermittelten Wegstreckenlängen der ausgewählten KAI1-SP-, KAI1-WT- und VEK-transfizierten OV-MZ-6-Zellen wurden mit Hilfe der Statistik-Software SPSS 19.0 jeweils die Medianwerte berechnet. Als solche sind die Daten im Ergebnisteil aufgeführt. Die migratorische Aktivität der verschiedenen Zellklone wurde miteinander verglichen. Die Berechnung der Signifikanz der Motilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Zelltransfektanten erfolgte dabei mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5% gewählt, sodass ein p-Wert  $<0,05$  einen statistisch signifikanten Unterschied definierte.

## **2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.4.1 Quantifizierung des Proteingehalts der Zellysate**

Die Proteinquantifizierung erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode mittels des BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce nach Angaben des Herstellers. Die Grundlage dieses Testverfahrens ist die Biuret-Reaktion, bei der zweiwertige Kupferionen durch Komplexbildung mit Proteinen im alkalischen Milieu zu einwertigen Kupferionen reduziert werden. Diese reagieren mit dem in der Lösung befindlichen BCA zu einem spezifischen violetten Farbkomplex, dessen Absorption spektrophotometrisch gemessen werden kann.

Zunächst wurde eine *Tris buffered saline* (TBS)-Stammlösung (pH 8,5) angesetzt. Diese wurde als Gebrauchslösung 1:10 mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. verdünnt. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde mit Hilfe eines Proteinstandards (BSA) eine Verdünnungsreihe pipettiert. Zur Kontrolle der Messergebnisse diente zudem ein Fibrinogenstandard. Je 50  $\mu\text{l}$  des Proteinstandards, der Kontrolllösung oder der Proteinproben wurden auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen aufgetragen und mit 200  $\mu\text{l}$  des BCA-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubation über Nacht bei

RT wurde die Absorption im ELISA *Reader* bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der BSA-Standardkurve errechnet.

**TBS Stammlösung:**            0,2 M            Tris-HCl (pH 8,5)  
   7,3 % (w/v)    NaCl

## 2.4.2 Auftrennung der zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dazu wurden zunächst die Proteinproben in einem nicht-reduzierenden SDS-Probenpuffer gelöst und 10 min bei 95 °C erhitzt, was zur Denaturierung der Proteine führte. SDS, ein stark anionisches Detergenz, formt negativ geladene Komplexe mit den denaturierten Proteinen. Es wurde verwendet, um die Eigenladungen der Proteine zu überdecken, sodass diese eine konstante Ladungsverteilung aufwiesen. So wurde verhindert, dass die unterschiedliche negative Ladung der Proteine die Laufeigenschaften veränderte.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 12%iges Trenngel verwendet, das zwischen zwei abgedichtete Glasplatten mit einem Abstand von 1,5 mm gegossen wurde. Dieses wurde mit Ethanol überschichtet, um eine Glättung der Gelgrenze zu erreichen und den Kontakt mit Sauerstoff zu verhindern, da dieser die zur Polymerisierung notwendigen Radikale abfangen und somit eine korrekte Polymerisierung des Gels stören würde. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Gels wurde der Alkohol abgegossen und über das Trenngel eine Schicht eines 4%igen Sammelgels aufgetragen. Um Taschen zum Einfüllen der Proben zu erhalten, wurde zusätzlich ein spezieller Kamm in dieses eingesetzt. Anschließend wurde das fertige Polyacrylamid-Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Nach Entfernen des Kamms wurden die Proben in die Taschen des Sammelgels überführt. Neben den Proben wurde ein Proteinmarker (*Prestained Protein Ladder* #SM0671) zur späteren Abschätzung der Molekulargewichte aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von etwa 90 V bis die sichtbare Lauf-front das 12%ige Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung auf 120-150 V erhöht bis das untere Ende des Trenngels erreicht war und die entsprechenden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt waren.

**Nicht reduzierender  
Ladepuffer:**

150 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
15 % (w/v)	SDS
45 % (v/v)	Glycerin
0,01 % (w/v)	Bromphenolblau

**Trenngel (12%):**

1,5 M	Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
40 % (w/v)	Acrylamid	3 ml
10 % (w/v)	SDS	100 µl
10 % (w/v)	APS	50 µl
	TEMED	5 µl
	H <sub>2</sub> O dest.	4,3 ml

**Sammelgel 4 %:**

0,5 M	Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 ml
40 % (w/v)	Acrylamid	1 ml
10 % (w/v)	SDS	100 µl
10 % (w/v)	APS	50 µl
	TEMED	10 µl
	H <sub>2</sub> O dest.	6,3 ml

**Elektrophoresepuffer  
(10x):**

250 mM	Tris
1 % (w/v)	SDS
1,6 M	Glycin

### 2.4.3 Westernblot-Analyse

Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgte nach Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in der Westernblot-Analyse.

**Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran**

Die mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten zellulären Proteine wurden in einem elektrischen Feld von dem SDS-Elektrophoresegel auf eine polymere Nitrozellulose-

Membran übertragen. Der Proteintransfer wurde im “*Wet-Verfahren*“ durchgeführt. Dazu wurden eine Membran und 6 *Whatman*-Filterpapiere auf die Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wurde anschließend in Methanol und die *Whatman*-Papiere in *Blotting*-Puffer getränkt. Dann wurden 3 der Filterpapiere auf den als Anode dienenden Boden der *Blotting*-Kammer gelegt, gefolgt von der Membran, dem Gel und 3 weiteren Filterpapieren kathodenseitig. Durch Ausstreichen mit Hilfe einer Glaspipette wurde sichergestellt, dass keine Luftblasen den Kontakt zwischen dem Gel und der Nitrozellulose-Membran behinderten. Der Transfer erfolgte auf Eis bei einem konstanten Strom von 350 mA über 90 min. Die Proteinbanden konnten anschließend auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden.

***Blotting*-Puffer:**

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
20 % (v/v)	Methanol

#### **Detektion der Proteine auf der Blot-Membran durch spezifische Antikörper**

Zum Absättigen unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran wurde diese zunächst mit *Blocking*-Puffer über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Vor der Antikörperinkubation wurde die Membran 3 Mal für jeweils 10 min in TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (monoklonales Maus-IgG gegen KAI1, Klon TS82b) in einer Konzentration von 1 µg/ml erfolgte anschließend erneut über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurde die Membran wieder 3 Mal für jeweils 10 min in TBST gewaschen und mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper in einer Konzentration von 0,2 µg/ml für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten in TBST wurde die ECL-Lösung nach Angaben des Herstellers vorbereitet und die Membran 1 min in dieser geschwenkt. Danach wurde sie in eine Klarsichtfolie eingeschlagen. Die Exposition der Antikörper/Proteine-Komplexe auf einem Röntgenfilm erfolgte in der Dunkelkammer.

**TBST-Puffer:**

50 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
150 mM	NaCl
0,1 % (v/v)	Tween-20

<b>Blocking-Puffer:</b>	2,5 % (w/v)	Magermilchpulver
	0,5 % (w/v)	BSA
		TBST-Puffer

#### 2.4.4 Koimmunpräzitationsanalyse

Die Koimmunpräzitationsanalyse stellt eine Methode zum Nachweis von Protein/Protein-Interaktionen dar. In der vorliegenden Arbeit wurde sie verwendet, um die Interaktion von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit E-Cadherin zu untersuchen.

Die Koimmunpräzitation wurde mit jeweils 1 mg Gesamtprotein durchgeführt. Zelllysate wurden, wie unter 2.3.1.6 beschrieben, hergestellt und zunächst für 2 h bei 4 °C mit Protein A-Sepharose-Beads inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Vor der Verwendung wurden diese 2 Mal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Lysate für 3 min bei 246 x g zentrifugiert und der Überstand zur Weiterverwendung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um aus den Zelllysaten die zu untersuchenden Proteinkomplexe selektiv zu adsorbieren, wurde der Überstand mit dem spezifischen Antikörper, einem monoklonalen Maus-IgG gegen E-Cadherin (Klon MB2), in einer Konzentration von 5 µg/ml PBS inkubiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Als Isotypkontrolle wurde ein unspezifisches Maus-IgG (Klon Mg2b00) in einer Konzentration von 5 µg/ml PBS verwendet. Am folgenden Tag wurden die Lysate erneut mit Protein A-Sepharose über Nacht bei 4 °C inkubiert. Da die Protein A-Sepharose den F<sub>c</sub>-Teil des Antikörpers bindet, war es somit möglich, den Antikörper/Protein-Komplex aus den Lysaten zu entfernen. Danach wurde kurz zentrifugiert (30 sec bei 246 x g), der Überstand verworfen und 5 Mal in eiskaltem PBS gewaschen. Nach jedem dieser Waschvorgänge wurden die Proteingemische für 5-10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden das Protein und seine Interaktionspartner direkt im Westernblot unter Verwendung eines gegen KAI1-gerichteten polyklonalen Kaninchen-IgG (Klon H-173) als Primäranantikörper analysiert oder die Proben bei -20 °C gelagert.

## 3 Ergebnisse

Die Progression einer Vielzahl maligner Tumoren, so auch des Ovarialkarzinoms, ist mit einer verminderten Expression des Tetraspanins KAI1-Wildtyp (WT) assoziiert (Liu et al., 2000; Houle et al., 2002). Daneben scheint die Expression einer Splice-Variante von KAI1 (KAI1-SP) eine Rolle bei der Tumorprogression zu spielen (Lee et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von KAI1-WT im Vergleich zu KAI1-SP an einem Ovarialkarzinomzellmodell *in vitro* genauer untersucht. Hierzu wurde die Beteiligung der beiden strukturell unterschiedlichen KAI1-Proteine an der Zelladhäsion und der Zellmigration, als tumorbiologisch wichtige zelluläre Eigenschaften, analysiert.

### 3.1 Etablierung eines KAI1-Wildtyp- bzw. KAI1-Splice-exprimierenden Ovarialkarzinomzellmodells

Für die Studien der vorliegenden Dissertation wurden Zellen der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 verwendet, die einen niedrigen endogenen KAI1-Gehalt aufweisen. Diese wurden mit KAI1-WT- oder KAI1-SP-cDNA-enthaltenden Expressionsvektoren transfiziert, um einen Vergleich biologischer Effekte beider Proteine im zellulären Kontext zu ermöglichen. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit einem entsprechenden Expressionsvektor ohne cDNA-Insert transfiziert wurden. Aufgrund der tumorbiologischen Bedeutung des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  wurden neben WT-OV-MZ-6-Zellen auch OV-MZ-6-Zellen verwendet, die zuvor stabil mit dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  transfiziert worden waren (Hapke et al., 2001; 2003).

Die Generierung der KAI1-WT- und KAI1-SP-Expressionsplasmide sowie die stabile Transfektion der Zellen erfolgten in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Reuning. Die verschiedenen OV-MZ-6-Zellklone, die für die vorliegende Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, sind hier mit der entsprechenden Nomenklatur, die bei der folgenden Darstellung der Ergebnisse verwendet wurde, aufgeführt:

### **WT-OV-MZ-6-Zellen = OV-MZ-6-Zellen:**

- WT-OV-MZ-6 + Vektor = OV-MZ-6-VEK
- WT-OV-MZ-6 + KAI1-Wildtyp = OV-MZ-6-KAI1-WT
- WT-OV-MZ-6 + KAI1-Splice = OV-MZ-6-KAI1-SP

### **Integrin $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen = $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen:**

- Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6 + Vektor =  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK
- Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6 + KAI1-Wildtyp =  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT
- Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6 + KAI1-Splice =  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-SP

Nach stabiler Transfektion wurden Zellklone mit vergleichbarer Expressionshöhe von KAI1-WT und KAI1-SP isoliert, um die Auswirkung der Expression der beiden Proteine auf das zelluläre Verhalten genau vergleichen zu können. Dazu wurde der zelluläre Gehalt der beiden KAI1-Proteine, wie nachfolgend beschrieben, ermittelt.

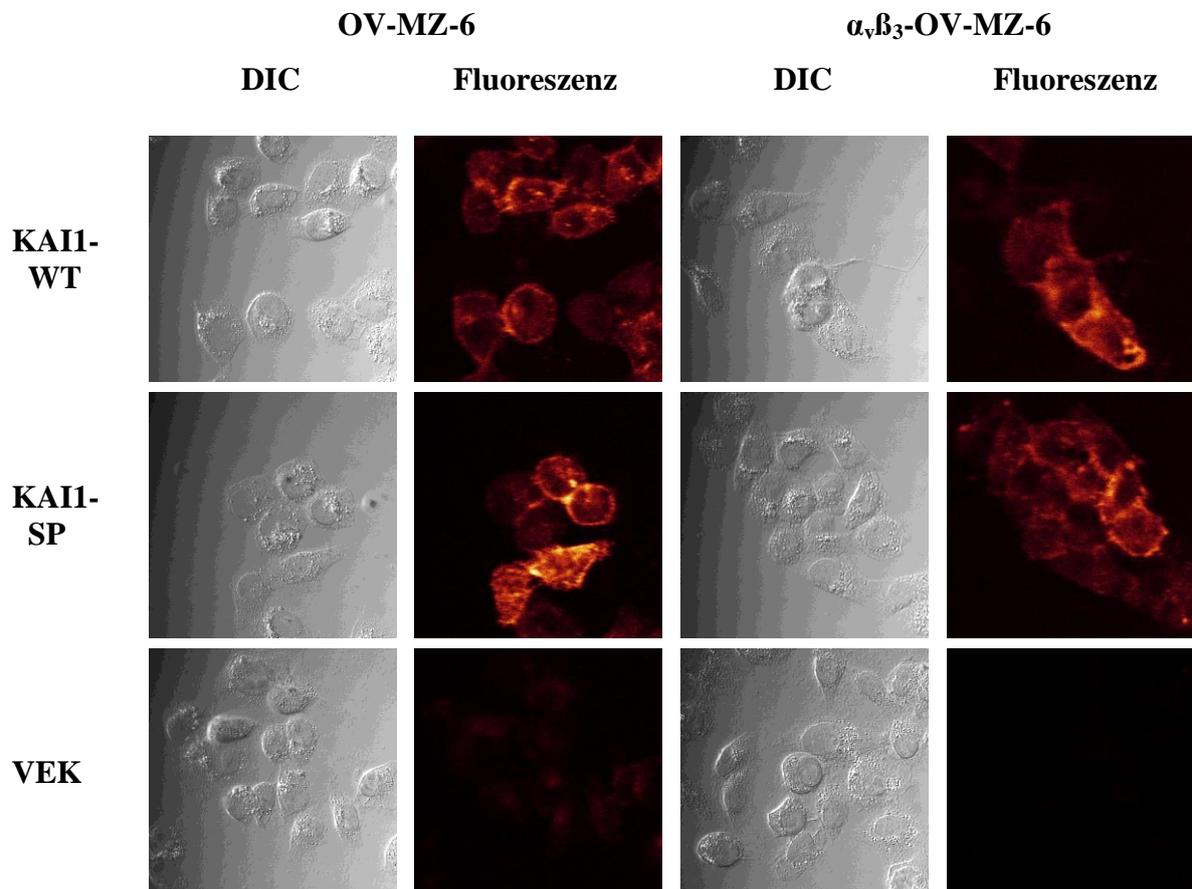
### **3.1.1 Charakterisierung der KAI1-Wildtyp- bzw. KAI1-Splice-Expression in stabil transfizierten Ovarialkarzinomzellen mittels immunzytochemischer Analyse**

Die Effizienz der stabilen Transfektion der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 mit KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-cDNA wurde zunächst mittels immunzytochemischer Färbung analysiert. Zellen, die mit einem Expressionsvektor ohne cDNA-Insert transfiziert worden waren, korrespondierten mit dem niedrigen endogenen KAI1-Proteingehalt und dienten als Kontrolle.

Die immunzytochemische Färbung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP in den transfizierten OV-MZ-6-Zellen erfolgte mittels des monoklonalen Maus-IgG Klon TS82b, welches gegen KAI1 gerichtet ist, als Primärantikörper. Dieser Antikörper erkennt sowohl KAI1-WT als auch dessen SP-Variante. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte für die nachfolgende Analyse am CLSM mit Hilfe eines Alexa-488-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG.

In der immunzytochemischen Anfärbung der KAI1-Proteine ließen sich KAI1-WT bzw. KAI1-SP an der Zelloberfläche lokalisieren. Sowohl OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen als auch OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen wiesen einen deutlichen Intensitätsanstieg der Immunfluoreszenz im Vergleich zu OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-

VEK-Zellen auf. Die Expression von KAI1-WT und KAI1-SP war dabei nahezu vergleichbar stark ausgeprägt.



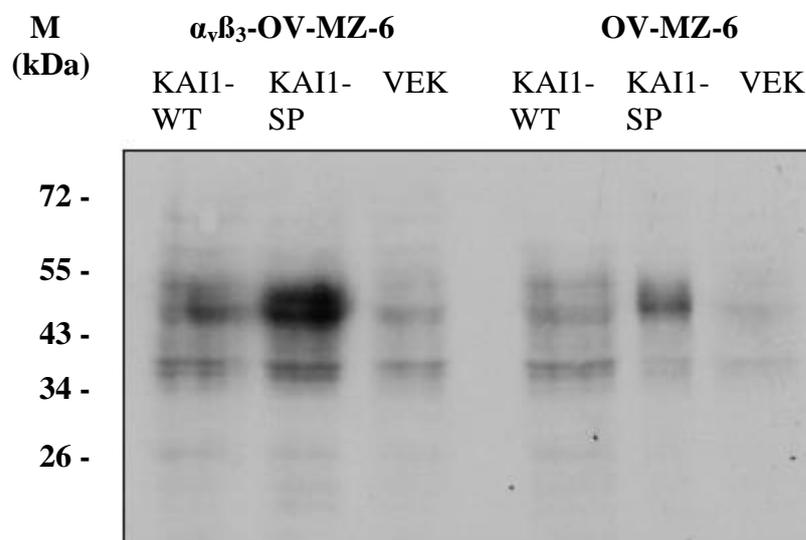
**Abbildung 9. Immunzytochemischer Nachweis der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP in stabil transfizierten OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen**

Die zelluläre Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP wurde nach stabiler Transfektion humaner Ovarialkarzinomzellen jeweils in OV-MZ-6-KAI1-WT, -KAI1-SP und -VEK-Zellen sowie in  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT, -KAI1-SP und -VEK-Zellen mittels immunzytochemischer Färbung untersucht. Die Intensität des Fluoreszenzsignals als Maß für die KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expression wurde am CLSM beurteilt. Das Fluoreszenzbild ist zusammen mit dem dazugehörigen differentiellen Interferenzkontrast (DIC)-Bild dargestellt.

OV-MZ-6-KAI1-WT und -KAI1-SP-Zellen zeigten ebenso, wie  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT und -KAI1-SP-Zellen, gegenüber den entsprechenden VEK-transfizierten Zellen eine deutlich höhere Expression der KAI1-Proteine. Die Expressionshöhe von KAI1-WT und KAI1-SP war dabei nahezu vergleichbar.

### 3.1.2 Charakterisierung der Expression von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice in stabil transfizierten Ovarialkarzinomzellen mittels Westernblot-Analyse

Die Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP in stabil transfizierten OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen wurde zusätzlich mittels Westernblot-Analyse untersucht. Als Kontrolle dienten entsprechende Zellen, die mit dem Expressionsvektor ohne cDNA-Insert transfiziert worden waren. Nachdem von den einzelnen Zellklonen Zelllysate in RIPA-Puffer hergestellt worden waren, wurden jeweils 100  $\mu\text{g}$  Protein unter Verwendung des monoklonalen Maus-IgG Klon TS82b mittels Westernblot-Analyse auf den Gehalt der beiden KAI1-Proteine hin untersucht. Hier zeigte sich bei den OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen sowie auch bei den OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen eine Bande im Bereich von etwa 50 kDa. Diese war dem KAI1-WT-Protein bzw. dessen SP-Variante zuzuordnen. Aufgrund der starken Glykosylierung der KAI1-Proteine wurden breite Banden sichtbar. Für die OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen ließ sich eine deutlich schwächere Signalintensität und somit Expression der KAI1-Proteine nachweisen.

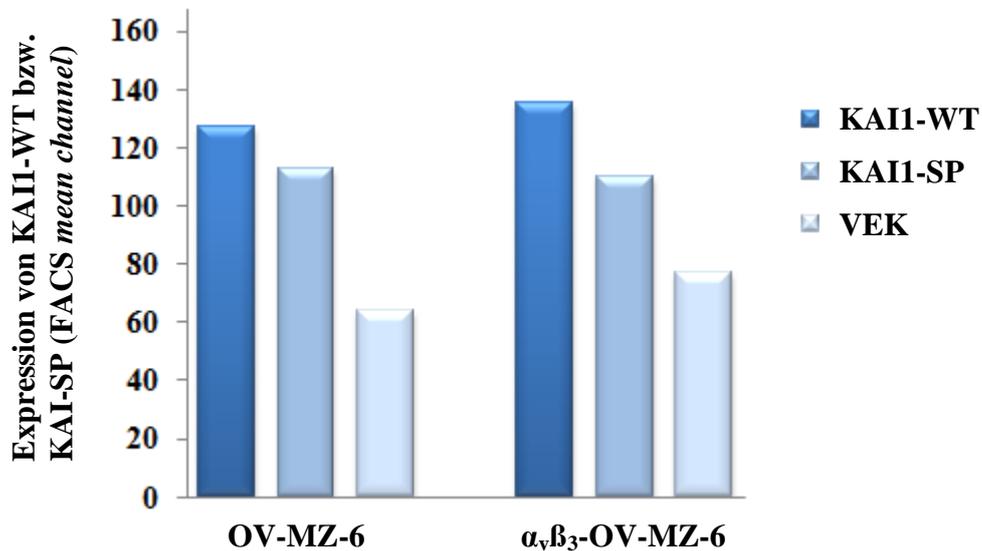


**Abbildung 10. Expressionsnachweis von KAI1-WT bzw. KAI1-SP in stabil transfizierten OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen mittels Westernblot-Analyse**

Die zelluläre KAI1-Expression wurde nach stabiler Transfektion jeweils in OV-MZ-6-KAI1-WT, -KAI1-SP und -VEK-Zellen sowie in  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT, -KAI1-SP und -VEK-Zellen mittels Westernblot-Analyse untersucht. Unter Verwendung des monoklonalen Maus-IgG Klon TS82b ließen sich für OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen sowie für OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen breite Banden im Molekulargewichtsbereich (M) von etwa 50 kDa darstellen, welche den KAI1-Proteinen zuzuordnen waren. In OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen war ein niedriger Expressionspegel nachweisbar.

### 3.1.3 Charakterisierung der KAI1-Wildtyp- bzw. KAI1-Splice-Expression in stabil transfizierten Ovarialkarzinomzellen mittels Durchflusszytometrie

Parallel zur immunzytochemischen und Westernblot-Analyse wurden die OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen nach Transfektion hinsichtlich ihrer KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expression durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen. Die Expressionsanalyse erfolgte mittels des monoklonalen Maus-IgG Klon TS82b.



**Abbildung 11. FACS-Analyse der zellulären Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP in stabil transfizierten OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen**

Die zelluläre Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP wurde nach stabiler Transfektion in OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6- Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die verschiedenen Expressionsspiegel der OV-MZ-6-KAI1-WT, -KAI1-SP und -VEK-Zellen sowie der  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT, -KAI1-SP und -VEK-Zellen wurden einander gegenübergestellt. OV-MZ-6-KAI1-WT und -KAI1-SP-Zellen sowie  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT und -KAI1-SP-Zellen zeigten im Vergleich zu den entsprechenden OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK Zellen einen höheren KAI1-Gehalt. Die Expression von KAI1-WT und KAI1-SP war dabei vergleichbar stark ausgeprägt.

In der FACS-Analyse konnte unter den OV-MZ-6-Zellklonen die stärkste Expression in OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen nachgewiesen werden. Diese zeigten im Vergleich zu OV-MZ-6-VEK-Zellen einen 2-fach erhöhten Expressionsspiegel. OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen wiesen einen 1,8-fach erhöhten KAI1-Proteingehalt auf.

Für die OV-MZ-6-Zellen, die zusätzlich das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  überexprimierten, ließen sich ähnliche Ergebnisse zeigen. In  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen war auch hier das höchste Expressionslevel nachweisbar. Verglichen mit  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen exprimierten sie die 1,8-fache Menge an KAI1-Protein. In  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen lag der Expressionsspiegel ebenfalls unter dem der  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen. Im Vergleich zu  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen zeigte sich jedoch eine 1,4-fach höhere Expression.

Zusammenfassend zeigte sich in der Expressionsanalyse mittels Durchflusszytofluorometrie, immunzytochemischer Färbung und Westernblot-Analyse ein erhöhtes KAI1-Expressionsniveau sowohl für OV-MZ-6-KAI1-WT und -KAI1-SP-Zellen als auch für  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT und -KAI1-SP-Zellen im Vergleich zu OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen. Die Zellklone der OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen wiesen dabei eine vergleichbare Expressionshöhe der untersuchten KAI1-Proteine auf. Desweiteren zeigte sich, dass die Expressionsspiegel von KAI1-WT und KAI1-SP jeweils ähnlich stark ausgeprägt waren, was für den nachfolgenden funktionellen Vergleich der beiden KAI1-Proteine im zellulären Kontext essentiell war.

### **3.2 Untersuchungen zur migratorischen Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen als Funktion der KAI1-Wildtyp- bzw. KAI1-Splice-Expression**

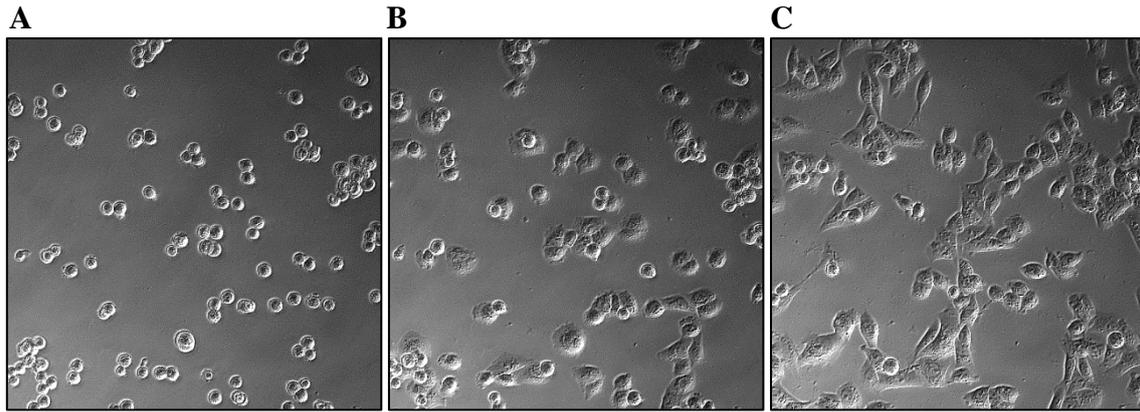
Im Rahmen der Tumorprogression des Ovarialkarzinoms kommt es zu einem Expressionsverlust des Tetraspanins KAI1-WT, das als putativer Metastasierungssuppressor bekannt ist (Liu et al., 2000; Houle et al., 2002). Funktionell ist KAI1-WT in die Regulierung wichtiger zellbiologischer Prozesse, wie der Adhäsion und der damit eng verknüpften zellulären Migration, involviert. Hierbei scheint die funktionelle Wechselwirkung mit Integrinen eine wesentliche Rolle zu spielen. In früheren Motilitätsstudien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Reuning zeigte sich nach einer Reetablierung der zellulären KAI1-WT-Expression eine deutliche Reduzierung der Integrin-vermittelten Migration humaner Ovarialkarzinomzellen (Ruseva et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich die Expression von KAI1-WT im Vergleich zu dessen SP-Variante auf die Integrin-vermittelte Migration humaner Ovarialkarzinomzellen auswirkt. Dazu wurde die Motilität KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-transfizierter

Ovarialkarzinomzellen mittels *time-lapse*-Videomikroskopie an einem CLSM, wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben, aufgezeichnet. Zellen, die mit einem Expressionsvektor ohne entsprechendes cDNA-Insert transfiziert worden waren und den niedrigen endogenen KAI1-Proteingehalt widerspiegelten, dienten als Kontrolle. Anhand der *time-lapse*-Videomikroskopie-Bilder wurde die migratorische Aktivität der verschiedenen Zellklone mit Hilfe der Software *LSM Image Browser* als Wegstrecke pro Zeit bestimmt.

Um die Rolle der Integrine bei der Regulierung der Migration durch KAI1-WT bzw. KAI1-SP mitzuerfassen, wurden Motilitätsstudien in Abhängigkeit verschiedener Adhäsionssubstrate durchgeführt. Im Fokus der Arbeit stand der Einfluss von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -abhängige migratorische Aktivität von Ovarialkarzinomzellen auf VN, welches in OV-MZ-6-Zellen den Hauptliganden des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  darstellt. Zudem wurde die Zellmotilität auf Kol I, einem EZM-Protein, an welches hauptsächlich  $\beta_1$ -Integrine binden, untersucht und zur Kontrolle auf PLL, das eine Integrin-unabhängige Zelladhäsion vermittelt.

### **3.2.1 Optimierung der Versuchsbedingungen für Zellmotilitätsstudien mittels *time-lapse*-Videomikroskopie**

Für die Zellmigration ist die Interaktion und Adhäsion an das sie umgebende Substrat essentiell. Die Beurteilung der zellulären Motilität am CLSM mittels Zeitrafferaufnahmen erfolgte somit erst, nachdem die Zellen eine vollständige Adhärenz an verschiedene EZM-Proteine bzw. als Kontrolle an PLL erreicht hatten und ein *spreading*, d. h. eine Ausbreitung der Zellen durch Vergrößerung ihrer Kontaktfläche, sichtbar war. Je nach Zellklon und Adhäsionssubstrat war dazu ein unterschiedlich langer Zeitraum nötig. Auf den EZM-Proteinen VN und Kol I wurde bei VEK- und KAI1-SP-transfizierten Zellen nach etwa 30 min eine Adhärenz beobachtet, während sich KAI1-WT-Zellklone erst nach 40-45 min adhären zeigten. Bei Verwendung von PLL betrug diese Zeitspanne für alle Zellklone 60-70 min. Das Bewegungsmuster der Zellen wurde insgesamt über einen Zeitraum von 12 h anhand von Phasenkontrastbildern, die im Abstand von 3 min gespeichert wurden, festgehalten. Um weiterhin eine ausreichende Adhärenz der Zellen für die Beurteilung der Migration sicherzustellen, gingen die ersten 2 h dieser Zeitrafferaufnahmen nicht in die Auswertung ein, sodass sich ein Auswertungszeitraum von 10 h ergab.



**Abbildung 12. Repräsentative Phasenkontrast-Bilder von OV-MZ-6-Zellen aus einer *time-lapse*-Serie am CLSM**

Hier dargestellt sind zu verschiedenen Zeitpunkten am CLSM aufgenommene Bilder einer *time-lapse*-Serie von OV-MZ-6-KAI-SP-Zellen in Adhäsion an VN.

**A:** Bild zu Beginn der *time-lapse*-Serie: Nach Aussaat der Zellen auf EZM-Protein beschichteten Petrischalen wurde am CLSM ein geeigneter Bildausschnitt mit mindestens 20 Zellen fokussiert. Die Zellen zeigten nach etwa 30 min eine beginnende Adhärenz, sodass zu diesem Zeitpunkt die Aufnahme gestartet wurde.

**B:** Bild 2 h nach Aufnahmestart: Die Zellen zeigten jetzt eine vollständige und stabile Adhärenz sowie ein *spreading*. Ab diesem Zeitpunkt wurden die einzelnen Bilder für die Auswertung verwendet.

**C:** Bild am Ende der *time-lapse*-Serie.

Im Rahmen der Migrationsstudien wurden jeweils 2-3 *time-lapse*-Serien für KAI1-WT-, KAI1-SP- und VEK-transfizierte Zellklone in Adhäsion an verschiedene Substrate aufgezeichnet. Um eine gute Vergleichbarkeit der zellulären Motilität der verschiedenen Zellklone zu gewährleisten, wurden Bedingungen für die Auswertung definiert. Aus den Bilderserien wurden pro Zellklon die Wegstrecken von jeweils 50-110 Zellen nach folgenden Ein- und Ausschlusskriterien analysiert:

**Einschlusskriterien:**

- Der Nukleus einer Zelle musste sich während des Beobachtungszeitraumes kontinuierlich innerhalb des Bildausschnitts befinden.
- Die Zelle musste über die gesamte Zeit eine ausreichende Adhärenz zeigen.
- Die Zelle musste einzeln oder in geringem Kontakt zu benachbarten Zellen liegen, um eine gegenseitige Beeinflussung oder Behinderung ihrer Motilität zu minimieren.

### **Ausschlusskriterien:**

- Die Zelle verließ den Bildausschnitt während des Beobachtungszeitraumes.
- Die Zelle trat erst im Verlauf der 10-stündigen Analyse in den Bildausschnitt ein.
- Die Zelle war nicht über die gesamte Zeit hinweg adhärent.
- Die Zelle lag in sehr dichten Zellclustern und war somit in ihrer Motilität eingeschränkt.
- Die Zelle wurde zeitweise von anderen Zellen überdeckt, sodass eine Beurteilung der Bewegung des Nukleus nicht möglich war.
- Die Zelle teilte sich innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 10 h.

Die Motilität der ausgewählten Zellen wurde mittels der Software *LSM Image Browser* als Wegstrecke in  $\mu\text{m}/10\text{ h}$  manuell ausgemessen. Die zelluläre Migration ist ein dynamischer Prozess, bei dem sich die Morphologie der Zelle, vor allem im Bereich der Peripherie, unter anderem durch die Ausbildung von Filo- und Lamellipodien, stetig ändert. Um das Bewegungsmuster der Zellen trotzdem durch manuelles Nachzeichnen genau darstellen und miteinander vergleichen zu können, wurde jeweils der Nukleus einer Zelle markiert und dessen Bewegungsausmaß als Wegstrecke bestimmt.

## **3.2.2 Auswirkung der Expression von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die Integrin-vermittelte Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen**

### **3.2.2.1 Einfluss von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die Integrin $\alpha_v\beta_3$ /Vitronektin-vermittelte Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen**

Ruseva et al. (2009) gaben bereits Hinweise darauf, dass die Wechselwirkung von KAI1-WT und dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  eine wesentliche Rolle bei der Migration von Ovarialkarzinomzellen auf VN spielt. Sie zeigten nach Reexpression von KAI1-WT in OV-MZ-6-Zellen eine signifikant verminderte Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelte zelluläre Motilität. Darüber hinaus wurde eine Kollokalisierung der beiden Proteine auf der Zellmembran von OV-MZ-6-Zellen beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der Expression von KAI1-WT auf die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Motilität von OV-MZ-6-Zellen in Adhäsion an VN im Vergleich zu seiner SP-Variante mittels *time-lapse*-Videomikroskopie analysiert. Die Wegstreckenlängen

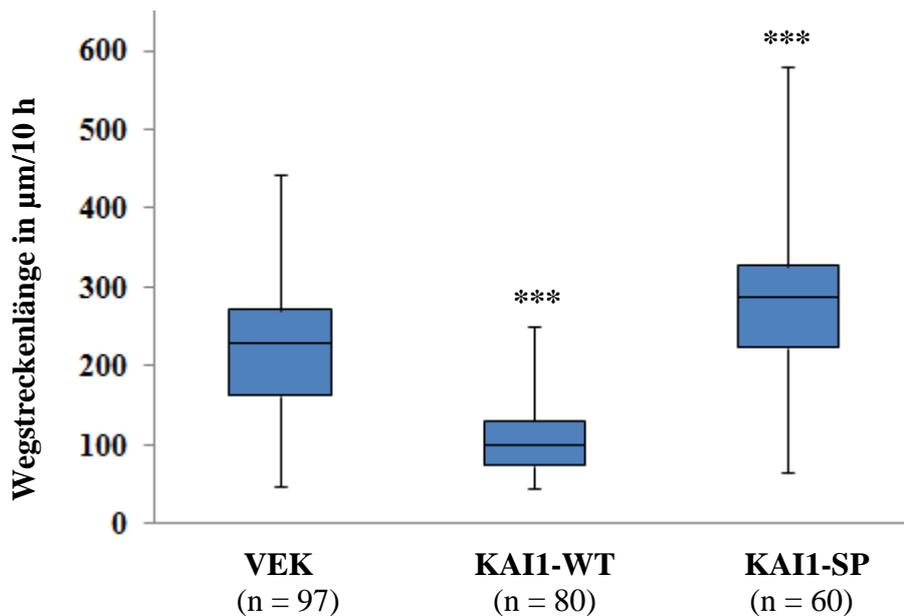
von OV-MZ-6-KAI1-WT (n=80), -KAI1-SP (n=60) und -VEK-Zellen (n=97), die die erarbeiteten und unter 3.2.1 aufgeführten Kriterien erfüllten, wurden bestimmt und die Medianwerte miteinander verglichen.

In der Motilitätsanalyse zeigte sich, dass KAI1-WT die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Motilität von OV-MZ-6-Zellen auf VN signifikant vermindert. Es ließ sich für OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen innerhalb von 10 h eine Wegstreckelänge von 100  $\mu\text{m}$  ermitteln, was eine Reduzierung der Zellmigration um 56% im Vergleich zu OV-MZ-6-VEK-Zellen mit einer Wegstreckenlänge von 228  $\mu\text{m}$  ausmachte. Im Gegensatz dazu konnte für KAI1-SP kein hemmender Effekt auf die motilen Eigenschaften der OV-MZ-6-Zellen nachgewiesen werden. Vielmehr führte die Expression von KAI1-SP zu einer gesteigerten Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -abhängigen migratorischen Aktivität auf dem Adhäsionssubstrat VN. Mit einer Wegstreckenlänge von 287  $\mu\text{m}$  ließ sich für OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen gegenüber OV-MZ-6-VEK-Zellen eine Wegstreckenverlängerung von 26% und verglichen mit OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen von 187% beobachten.

OV-MZ-6	Wegstreckenlänge in $\mu\text{m}/10\text{ h}$		Motilität in Prozent im Vergleich zu VEK-transfizierten Zellen
	Median	Mittelwert $\pm$ SD	
VEK	228 $\mu\text{m}$	218 $\pm$ 81 $\mu\text{m}$	100%
KAI1-WT	100 $\mu\text{m}$	108 $\pm$ 44 $\mu\text{m}$	44%
KAI1-SP	287 $\mu\text{m}$	284 $\pm$ 90 $\mu\text{m}$	126%

**Tabelle 1. Auswirkung der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelte Motilität von OV-MZ-6-Zellen**

Die Motilität von OV-MZ-6-KAI1-WT, -KAI1-SP und -VEK-Zellen in Adhäsion an VN wurde über einen Zeitraum von 10 h anhand von *time-lapse*-Videomikroskopieaufnahmen ermittelt. Die Median- und die Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung (SD) der Wegstreckenlängen der verschiedenen Zellklone wurden berechnet. Die Medianwerte wurden miteinander verglichen. Hier aufgeführt ist die migratorische Aktivität der OV-MZ-6-KAI1-WT bzw. -KAI1-SP-Zellen im Vergleich zu OV-MZ-6-VEK-Zellen, wobei die Motilität der OV-MZ-6-VEK-Zellen mit 100% gleichgesetzt wurde.



**Abbildung 13. Migratorische Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen auf dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Liganden VN als Funktion der KAI1-WT- bzw. der KAI1-SP-Expression**

Die Motilität von OV-MZ-6-KAI1-WT (n=80), -KAI1-SP (n=60) und -VEK-Zellen (n=97) in Adhäsion an VN wurde über 10 h mittels *time-lapse*-Videomikroskopie aufgezeichnet. Aufgeführt sind die Wegstreckenlängen der verschiedenen OV-MZ-6-Zellklone im Vergleich. Die Daten sind als Boxplot dargestellt (Signifikanzen im Vergleich zu VEK-transfizierten Zellen mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet: \*\*\* = p < 0,001).

Die Expression von KAI1-WT führte zu einer Reduzierung der Migration von OV-MZ-6-Zellen auf VN. Hingegen war für OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen eine gesteigerte Motilität im Vergleich zu OV-MZ-6-KAI1-WT und OV-MZ-6-VEK-Zellen nachweisbar.

Die Untersuchungen zur Auswirkung der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelte Motilität von OV-MZ-6-Zellen ergaben somit deutliche funktionelle Unterschiede zwischen den beiden strukturell verschiedenen KAI1-Proteinen. Für KAI1-WT ließ sich, wie bereits von Ruseva et al. (2009) beschrieben, ein hemmender Einfluss auf die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Migration von OV-MZ-6-Zellen auf VN nachweisen. In Gegenwart von KAI1-SP war die Motilität hingegen sowohl im Vergleich zu OV-MZ-6-KAI1-WT als auch zu -VEK-Zellen, die einen niedrigem endogenen KAI1-Proteingehalt aufwiesen, erhöht. Die Expression von KAI1-SP war somit mit einem größeren zellulären Migrationspotential verbunden, als der Expressionsverlust von KAI1-WT allein.

### 3.2.2.2 Einfluss von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen auf dem Adhäsionssubstrat Kollagen Typ I

Neben der Auswirkung der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelte zelluläre Motilität wurden zum Vergleich die jeweiligen Effekte von KAI1-WT und KAI1-SP auf das migratorische Verhalten der Zellen in Adhärenz an Kol I, als wichtiges Adhäsionsprotein für  $\beta_1$ -Integrine, untersucht. Integrine der  $\beta_1$ -Subfamilie wurden als erste wichtige Interaktionspartner des KAI1-WT auf der Zelloberfläche beschrieben (Mannion et al., 1996; Berditchevski und Odintsova, 1999; Ono et al., 2000).

In die Motilitätsanalyse gingen die Wegstreckenlängen ausgewählter OV-MZ-6-KAI1-WT (n=72), -KAI1-SP (n=71) und -VEK-Zellen (n=106) ein. Die Medianwerte wurden berechnet und miteinander verglichen.

**A**

OV-MZ-6	Wegstreckenlänge in $\mu\text{m}$		Motilität in Prozent im Vergleich zu VEK-transfizierten Zellen
	Median	Mittelwert $\pm$ SD	
VEK	104 $\mu\text{m}$	108 $\pm$ 38 $\mu\text{m}$	100%
KAI1-WT	49 $\mu\text{m}$	52 $\pm$ 17 $\mu\text{m}$	47%
KAI1-SP	163 $\mu\text{m}$	165 $\pm$ 49 $\mu\text{m}$	157%

**B**

OV-MZ-6	VEK	KAI1-WT	KAI1-SP
Motilität in Prozent im Vergleich zu VN	46%	49%	57%

**Tabelle 2. Auswirkung der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Motilität von OV-MZ-6-Zellen nach Adhäsion an Kol I**

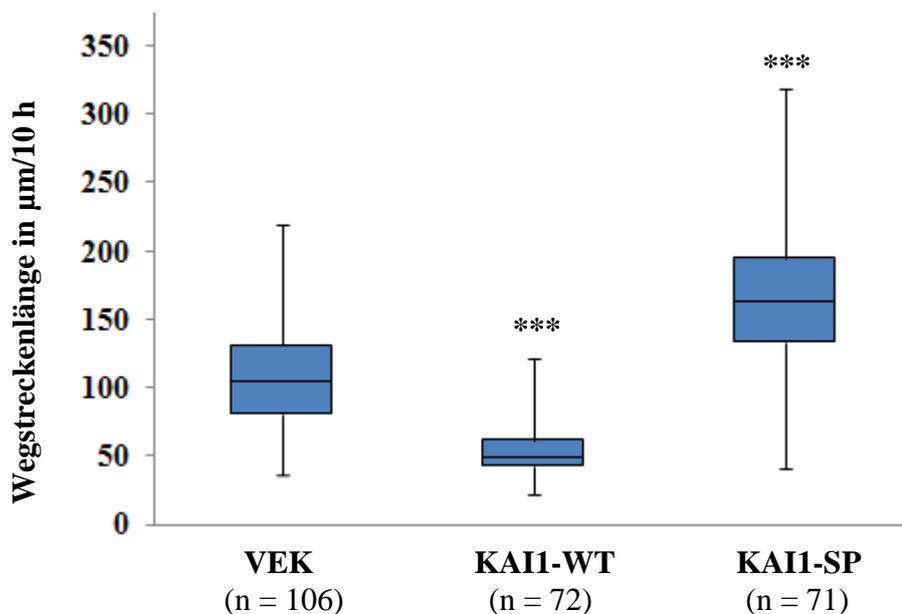
**A.** Die Motilität OV-MZ-6-KAI1-WT, -KAI1-SP und -VEK-Zellen in Adhäsion an Kol I wurde über einen Zeitraum von 10 h anhand von *time-lapse*-Videomikroskopieaufnahmen ermittelt. Die Median- und die Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung (SD) der Wegstreckenlängen der verschiedenen Zellklone wurden berechnet. Die Medianwerte wurden miteinander verglichen. Hier dargestellt ist die migratorische Aktivität von OV-MZ-6-KAI1-WT bzw. -KAI1-SP-Zellen im Vergleich zu OV-MZ-6-VEK-Zellen, wobei die Motilität der OV-MZ-6-VEK-Zellen mit 100% gleichgesetzt wurde.

**B.** Hier aufgeführt ist die Motilität der einzelnen Zellklone auf Kol I im Vergleich zu VN.

Nach Adhäsion an Kol I zeigten alle OV-MZ-6-Zellklone eine wesentlich geringere zelluläre migratorische Aktivität, als auf VN als Substrat. Verglichen mit den einzelnen Zellklonen auf VN war die Motilität von OV-MZ-6-VEK-Zellen um 54% reduziert, die der OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen um 51% und der OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen um 43%.

Ebenso, wie in Anwesenheit von VN beobachtet, zeigte sich in Gegenwart von Kol I ein hemmender Effekt auf die zelluläre Motilität als Funktion der KAI1-WT-Expression.

OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen wiesen eine Wegstreckenlänge von 49  $\mu\text{m}$ , OV-MZ-6-VEK-Zellen von 104  $\mu\text{m}$  auf. Die KAI1-WT-Expression resultierte somit in einer Reduzierung der Migration um 53%. Dagegen ging auch hier die Expression von KAI1-SP mit einem Anstieg der zellulären Motilität einher. Die Wegstrecke der OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen war mit 163  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen um 233% länger und verglichen mit OV-MZ-6-VEK-Zellen um 57%.



**Abbildung 14. Migratorische Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen auf Kol I als Funktion der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP**

Die Motilität von OV-MZ-6-KAI1-WT (n=72), -KAI1-SP (n=71) und -VEK-Zellen (n=106) in Adhäsion an Kol I wurde über 10 h mittels *time-lapse*-Videomikroskopie aufgezeichnet. Aufgeführt sind die Wegstreckenlängen der verschiedenen OV-MZ-6-Zellklone im Vergleich. Die Daten sind als Boxplot dargestellt (Signifikanzen im Vergleich zu VEK-transfizierten Zellen mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet: \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Durch Expression von KAI1-WT wurde die zelluläre Motilität signifikant reduziert. Die Expression von KAI1-SP führte dagegen zu einem Anstieg der Motilität im Vergleich zu OV-MZ-6-KAI1-WT und OV-MZ-6-VEK-Zellen. Insgesamt war die Zellmigration in Adhäsion an Kol I wesentlich geringer, als auf VN.

### 3.2.2.3 Einfluss von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen nach Adhäsion an Poly-L-Lysin

Zur Kontrolle wurde die Migration von OV-MZ-6-Zellen, neben den EZM-Proteinen VN und Kol I, in Gegenwart von PLL, als Integrin-unabhängiges Adhäsionssubstrat, untersucht. Zur Auswertung kamen hier die Wegstreckenlängen ausgewählter OV-MZ-6-KAI1-WT (n=90), -KAI1-SP (n=86) und -VEK-Zellen (n=102), aus denen die Medianwerte bestimmt und miteinander verglichen wurden.

**A**

OV-MZ-6	Wegstreckenlänge in $\mu\text{m}$		Motilität in Prozent im Vergleich zu VEK-transfizierten Zellen
	Median	Mittelwert $\pm$ SD	
VEK	27 $\mu\text{m}$	28 $\pm$ 10 $\mu\text{m}$	100%
KAI1-WT	27 $\mu\text{m}$	29 $\pm$ 10 $\mu\text{m}$	104%
KAI1-SP	33 $\mu\text{m}$	35 $\pm$ 13 $\mu\text{m}$	122%

**B**

OV-MZ-6	VEK	KAI1-WT	KAI1-SP
Motilität in Prozent im Vergleich zu VN	12%	27%	12%
Motilität in Prozent im Vergleich zu Kol I	26%	55%	20%

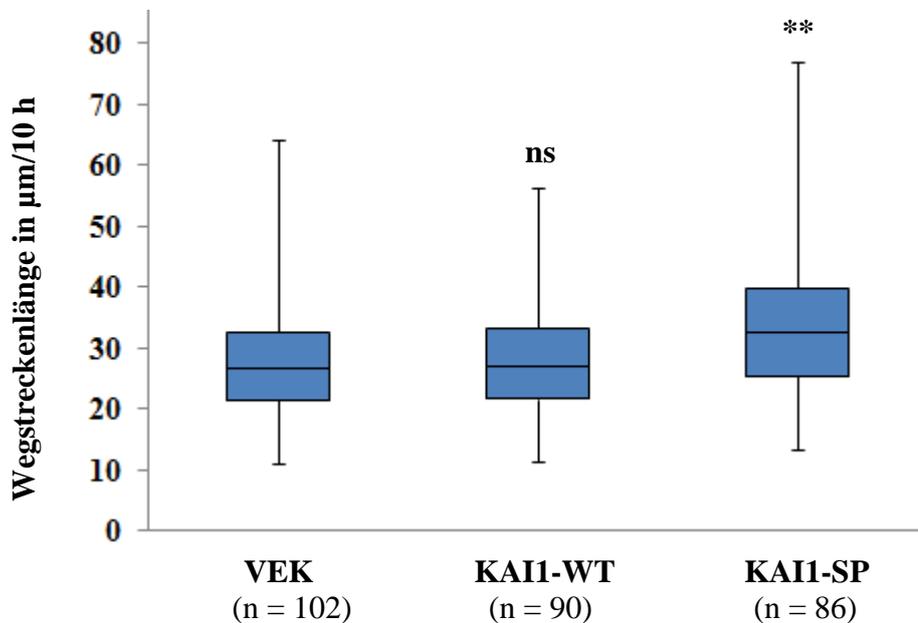
**Tabelle 3. Auswirkung der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Motilität von OV-MZ-6-Zellen nach Adhäsion an PLL**

**A.** Die Motilität von OV-MZ-6-KAI1-WT, -KAI1-SP und -VEK-Zellen nach Adhäsion an PLL wurde über einen Zeitraum von 10 h anhand von *time-lapse*-Videomikroskopieaufnahmen ermittelt. Die Median- und Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung (SD) der Wegstreckenlängen der verschiedenen Zellklone wurden berechnet. Die Medianwerte wurden miteinander verglichen. Hier aufgeführt ist die migratorische Aktivität von OV-MZ-6-KAI1-WT bzw. -KAI1-SP-Zellen im Vergleich zu OV-MZ-6-VEK-Zellen, wobei die Motilität der OV-MZ-6-VEK-Zellen mit 100% gleichgesetzt wurde.

**B.** Hier dargestellt ist die Motilität der verschiedenen Zellklone auf PLL im Vergleich zu Kol I und VN.

Auf PLL zeigten die Zellen eine deutlich geringere migratorische Aktivität, als in Adhäsion an die beiden EZM-Proteine VN und Kol I. Für OV-MZ-6-KAI1-WT und OV-MZ-6-VEK-Zellen ließ sich nur eine Wegstreckenlänge von 27  $\mu\text{m}$  und für OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen von 33  $\mu\text{m}$  ermitteln. Im Vergleich zu VN war die Motilität von OV-MZ-6-VEK und OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen somit um 88%, die der OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen um 73% vermindert. Verglichen mit der migratorischen Aktivität auf Kol I ergab sich eine Reduzierung von 74%, 80% und 45%.

Durch die Expression von KAI1-WT war auf PLL keine signifikante Änderung der zellulären Motilität zu verzeichnen. KAI1-SP dagegen führte auch hier zu einer gesteigerten Migration der OV-MZ-6-Zellen. Die Wegstrecke der OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen war verglichen mit OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen und OV-MZ-6-VEK-Zellen um 22% länger.



**Abbildung 15. Migratorische Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen auf PLL als Funktion der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP**

Die Motilität von OV-MZ-6-KAI1-WT (n=90), -KAI1-SP (n=86) und -VEK-Zellen (n=102) auf PLL wurde über 10 h mittels *time-lapse*-Videomikroskopie aufgezeichnet. Aufgeführt sind die Wegstreckenlängen der verschiedenen OV-MZ-6-Zellklone im Vergleich. Die Daten sind als Boxplot dargestellt (Signifikanzen im Vergleich zu VEK-transfizierten Zellen mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet: \*\* =  $p < 0,01$ ; ns = nicht signifikant).

Alle OV-MZ-6-Zellklone zeigten auf PLL eine deutlich geringere migratorische Aktivität, als in Adhäsion an VN und Kol I. Für KAI1-WT ließ sich kein signifikanter Einfluss auf die zelluläre Migration nachweisen. Die Expression von KAI1-SP ging dagegen mit einem Anstieg der Motilität einher.

### **3.2.2.4 Einfluss von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit des Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Expressionspiegels**

Invasive Ovarialkarzinomzellen weisen eine verstärkte Expression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  auf (Liapis et al., 1997), was darauf hinweist, dass die Expression dieses Adhäsionsrezeptors mit der Progression des Ovarialkarzinoms korreliert. In *in vitro*-Studien von Hapke et al. (2003) ließ sich bereits in Abhängigkeit eines Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Expressionsanstieges in OV-MZ-6-Zellen eine verstärkte Zelladhäsion an VN nachweisen, was mit einer gesteigerten Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelten Migration einherging. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich der Einfluss von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Expression untersucht. Hierzu wurde die migratorische Aktivität ausgewählter  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT (n=59 auf VN, n=48 auf Kol I, n=65 auf PLL), -KAI1-SP (n=57 auf VN, n=60 auf Kol I, n=78 auf PLL) und -VEK-Zellen (n=65 auf VN, n=66 auf Kol I, n=64 auf PLL) auf den unterschiedlichen Adhäsionssubstraten mittels *time-lapse*-Videomikroskopie analysiert. Die Medianwerte der Wegstreckenlängen der verschiedenen Zelltransfektanten wurden miteinander verglichen.

Ebenso, wie für die OV-MZ-6-Zellen mit niedrigem endogenen Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Gehalt, ergab sich für  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen mit signifikant erhöhter zellulärer Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Expression ein differentieller Einfluss von KAI1-WT und KAI1-SP auf die Integrin-vermittelte zelluläre Motilität. Auch hier führte die Expression von KAI1-WT zu einer Reduzierung der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -abhängigen Migration auf VN. In Gegenwart von KAI1-SP ließ sich dagegen wieder ein Anstieg der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelten Motilität zeigen. Diese Funktion von KAI1-WT bzw. KAI1-SP war auch in Adhäsion an Kol I nachweisbar.

Auf VN als Adhäsionssubstrat zeigten die Zellen wieder die größte Motilität. Hier wiesen  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI-WT-Zellen innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 10 h eine Wegstreckenlänge von 80  $\mu\text{m}$  auf, was im Vergleich zu  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen mit einer Wegstreckenlänge von 132  $\mu\text{m}$  eine Verminderung der Motilität um 39% ausmachte. Für  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen ließ sich mit 187  $\mu\text{m}$  eine um 134% längere Wegstrecke beobachten, als für  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen. Im Vergleich zu  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen war diese um 42% verlängert.

**A Vitronektin**

OV-MZ-6	Wegstreckenlänge in $\mu\text{m}$		Motilität in Prozent im Vergleich zu VEK-transfizierten Zellen
	Median	Mittelwert $\pm$ SD	
VEK	132 $\mu\text{m}$	126 $\pm$ 47 $\mu\text{m}$	100%
KAI1-WT	80 $\mu\text{m}$	90 $\pm$ 42 $\mu\text{m}$	61%
KAI1-SP	187 $\mu\text{m}$	184 $\pm$ 47 $\mu\text{m}$	142%

**B Kollagen Typ I**

OV-MZ-6	Wegstreckenlänge in $\mu\text{m}$		Motilität in Prozent im Vergleich zu VEK-transfizierten Zellen
	Median	Mittelwert $\pm$ SD	
VEK	87 $\mu\text{m}$	101 $\pm$ 38 $\mu\text{m}$	100%
KAI1-WT	58 $\mu\text{m}$	74 $\pm$ 55 $\mu\text{m}$	67%
KAI1-SP	140 $\mu\text{m}$	140 $\pm$ 52 $\mu\text{m}$	161%

**C Poly-L-Lysin**

OV-MZ-6	Wegstreckenlänge in $\mu\text{m}$		Motilität in Prozent im Vergleich zu VEK-transfizierten Zellen
	Median	Mittelwert $\pm$ SD	
VEK	29 $\mu\text{m}$	31 $\pm$ 10 $\mu\text{m}$	100%
KAI1-WT	27 $\mu\text{m}$	28 $\pm$ 10 $\mu\text{m}$	93%
KAI1-SP	37 $\mu\text{m}$	38 $\pm$ 11 $\mu\text{m}$	128%

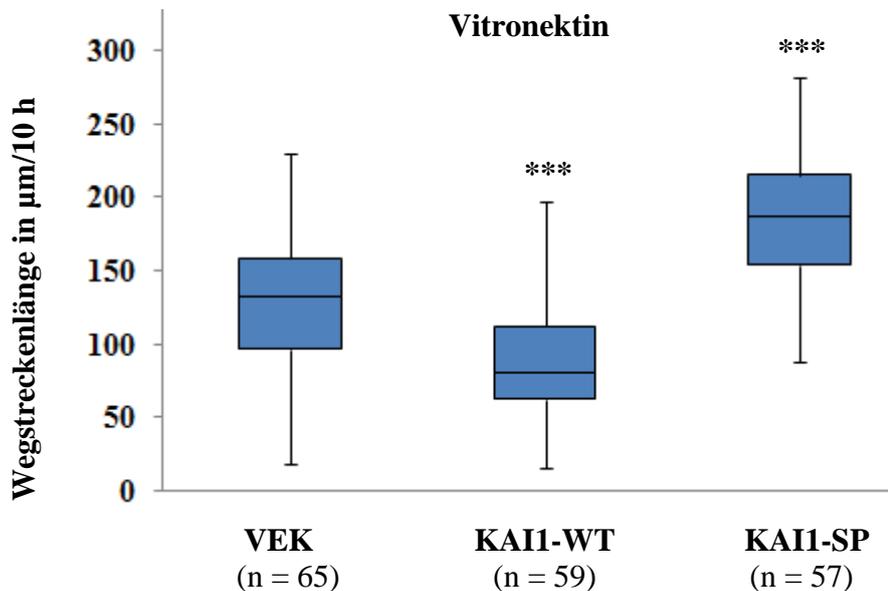
**Tabelle 4. Auswirkung der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Motilität von OV-MZ-6-Zellen in Abhängigkeit einer Überexpression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$**

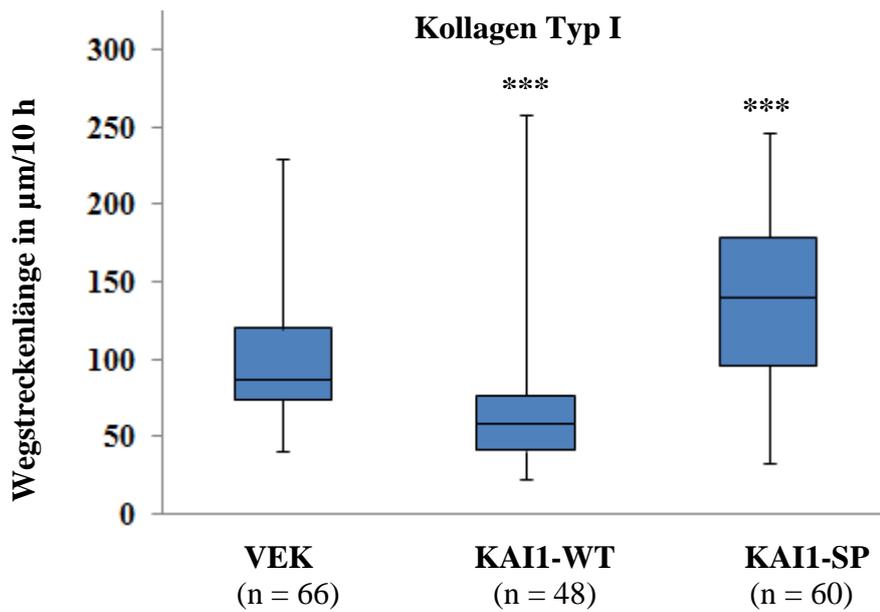
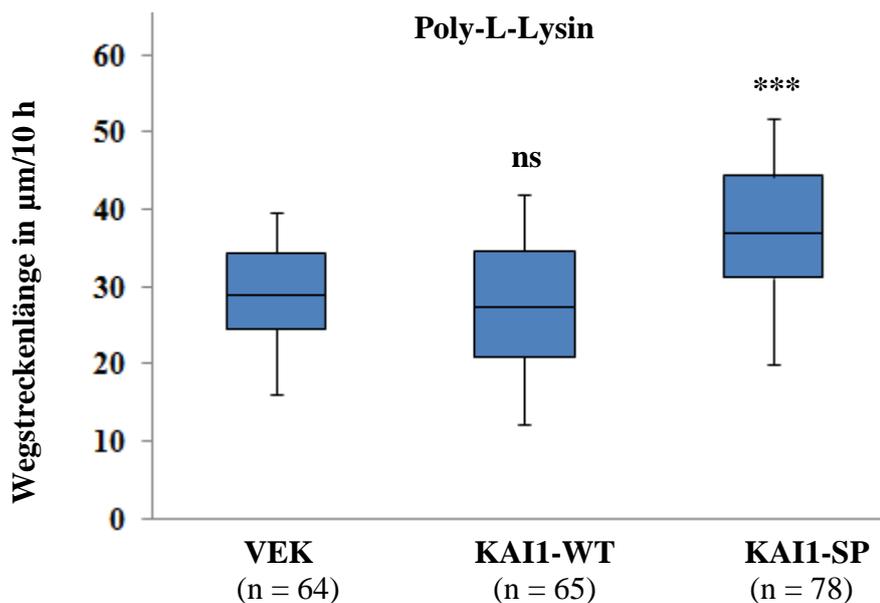
Die Motilität von  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT, -KAI1-SP und -VEK-Zellen wurde in Adhäsion an VN (A), Kol I (B) und PLL (C) über einen Zeitraum von 10 h anhand von *time-lapse*-Videomikroskopieaufnahmen bestimmt. Die Median- und Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung (SD) der Wegstreckenlängen der verschiedenen Zellklone wurden berechnet. Hier aufgeführt ist die migratorische Aktivität von  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT und -KAI1-SP-Zellen im Vergleich zu  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen. Die Motilität der  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen wurde dabei mit 100% gleichgesetzt.

In Adhäsion an Kol I legten  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen eine Wegstrecke von 58  $\mu\text{m}$  zurück, was im Vergleich zu  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen mit einer Wegstreckenlänge von 87  $\mu\text{m}$  einer Reduzierung der migratorischen Aktivität um 33% entspricht. Die Motilität von  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen war dagegen in Gegenwart von Kol I mit einer Wegstreckenlänge von 140  $\mu\text{m}$  um 141% größer, als die der  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen und um 61%, als die der  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen.

In Gegenwart von PLL war die zelluläre Motilität gegenüber den EZM-Protein-Adhäsionssubstraten wieder deutlich reduziert.  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen wiesen eine Wegstreckenlänge von 27  $\mu\text{m}$ ,  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen von 29  $\mu\text{m}$  und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen von 37  $\mu\text{m}$  auf. Es konnte somit auch für  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen nach Adhäsion an PLL kein signifikanter Einfluss von KAI1-WT auf die Zellmigration gezeigt werden. Für die  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen ergab sich dagegen eine Wegstreckenverlängerung um 37% im Vergleich zu  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT und um 28% gegenüber  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen.

A



**B****C**

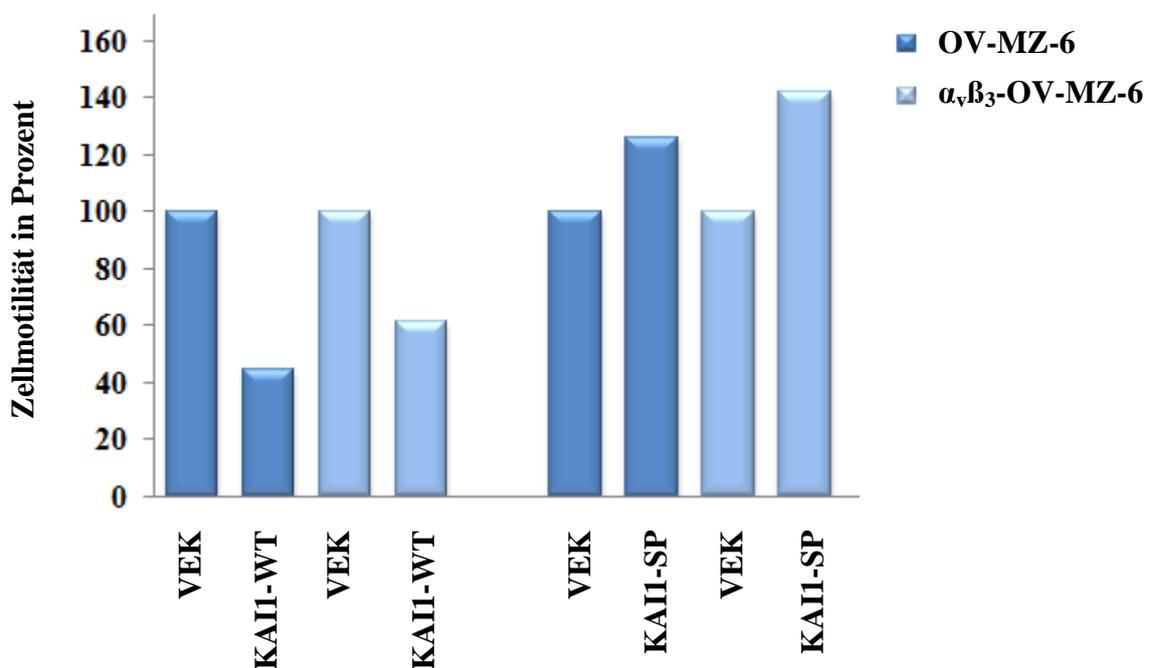
**Abbildung 16. Migratorische Aktivität Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -transfizierter OV-MZ-6-Zellen als Funktion der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP**

Die migratorische Aktivität von  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT, -KAI1-SP und -VEK-Zellen wurde in Adhäsion an VN (A), Kol I (B) und PLL (C) über 10 h mittels *time-lapse*-Videomikroskopie aufgezeichnet. Aufgeführt sind die Wegstreckenlängen der verschiedenen Zellklone im Vergleich. Die Daten sind als Boxplot dargestellt (Signifikanzen im Vergleich zu VEK-transfizierten Zellen mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; ns = nicht signifikant).

Nach Expression von KAI1-WT zeigte sich eine Verminderung der zellulären Migration auf VN und auf Kol I, nicht jedoch auf PLL. Die Expression von KAI1-SP führte hingegen zu einem Anstieg der Motilität im Vergleich zu  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT und -VEK-Zellen auf allen Adhäsionssubstraten.

Um den Einfluss einer Überexpression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  auf die Funktion von KAI1-WT bzw. KAI1-SP bei der Motilität von Ovarialkarzinomzellen genauer zu untersuchen, wurden die jeweiligen Effekte der beiden KAI1-Proteine in den Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6- und den OV-MZ-6-Zellklonen mit niedrigem endogenen Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Gehalt verglichen.

Auf dem EZM-Protein VN wurde die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Motilität von  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen durch KAI1-WT weniger stark reduziert, als in OV-MZ-6-Zellen. Dagegen zeigte sich der fördernde Effekt von KAI1-SP auf die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelte Migration nach Überexpression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  verstärkt.



**Abbildung 17. Vergleich der Funktion von KAI1-WT bzw. KAI1-SP bei der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelten Motilität in Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -transfizierten OV-MZ-6-Zellen und OV-MZ-6-Zellen mit niedrigem endogenen Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Gehalt**

Die Auswirkung der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Integrin  $\alpha_v\beta_3$  /VN-vermittelte Motilität in OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen wurde miteinander verglichen. Die migratorische Aktivität von OV-MZ-6- und  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-VEK-Zellen wurde dabei mit 100% gleichgesetzt.

Nach Überexpression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  zeigte sich der motilitätshemmende Effekt von KAI1-WT weniger stark und der motilitätssteigernde Einfluss von KAI1-SP verstärkt.

### **3.3 Untersuchungen zur zellulären Kolokalisierung von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice mit dem interzellulären Adhäsionsrezeptor E-Cadherin in humanen Ovarialkarzinomzellen**

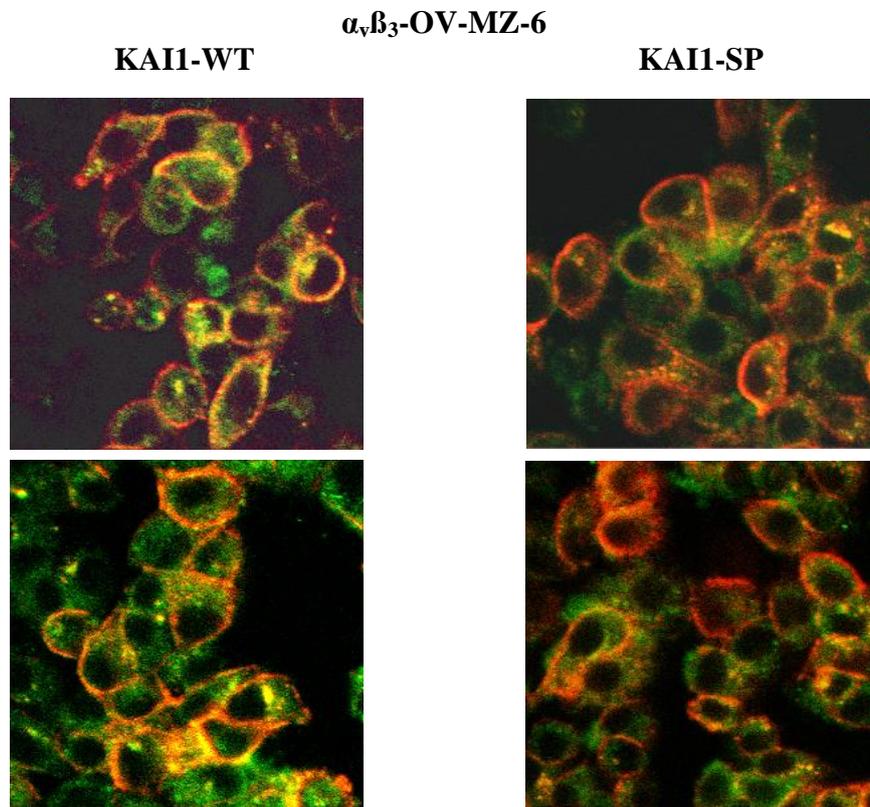
Neben der Integrin-vermittelten zellulären Adhäsion an die umgebende EZM, als wesentlicher Bestandteil der migratorischen Aktivität, scheint auch die Regulierung der interzellulären Adhäsion durch KAI1-Proteine von großer tumorbiologischer Bedeutung zu sein. In epithelialen Zellen werden Zell/Zell-Kontakte unter anderem durch das Adhäsionsmolekül E-Cadherin vermittelt. Es existieren bereits Hinweise, dass KAI1-WT die Adhäsion maligner Zellen im Rahmen einer Interaktion mit E-Cadherin beeinflusst (Abe et al., 2008). Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die Kolokalisierung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit E-Cadherin in Ovarialkarzinomzellen mittels immunzytochemischer Färbung und Koimmunpräzipitationsanalyse im Vergleich untersucht. Zur Verwendung kamen  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT und -KAI1-SP-Zellen.

#### **3.3.1 Immunzytochemische Analyse der zellulären Kolokalisierung von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice mit E-Cadherin in humanen Ovarialkarzinomzellen**

Zunächst wurde die Kolokalisierung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit E-Cadherin mittels immunzytochemischer Doppelfärbung analysiert. Als Primärantikörper zur Bindung der zu untersuchenden Proteine wurde das monoklonale Maus-IgG Klon TS82b gegen KAI1 sowie ein monoklonales Kaninchen-IgG, welches gegen E-Cadherin gerichtet ist (Klon 24E10), verwendet. Die Signaldetektion des KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Proteins am CLSM erfolgte durch ein Alexa-488-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG (grünes Signal) und die des E-Cadherins mittels eines Alexa-568-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG (rotes Signal).

Die immunzytochemische Anfärbung von KAI1-WT, KAI1-SP und E-Cadherin zeigte bei separater Betrachtung eine Expression aller Proteine an der Zelloberfläche. Um eine mögliche Kolokalisierung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit E-Cadherin in diesem Bereich zu ermitteln, wurden die einzelnen Fluoreszenzbilder überlagert. Hierbei konnte eine deutliche Kolokalisierung von KAI1-WT und E-Cadherin nachgewiesen werden, welche sich als gelbes Sig-

nal zeigte. Für KAI1-SP war die Kolokalisierung mit E-Cadherin wesentlich geringer ausgeprägt.



**Abbildung 18. Immunzytochemische Doppelfärbung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit E-Cadherin in OV-MZ-6-Zellen**

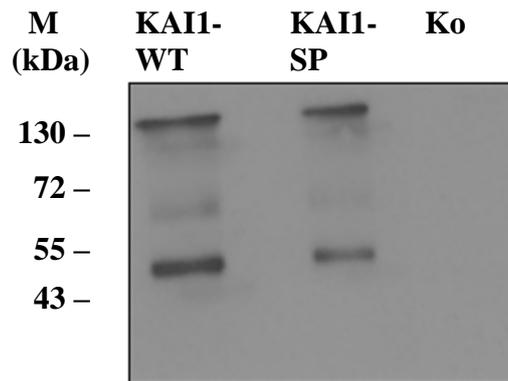
Die Kolokalisierung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit E-Cadherin in  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-Zellen wurde mittels einer immunzytochemischen Doppelfärbung untersucht. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde am CLSM beurteilt. Die Detektion der KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Expression erfolgte mittels eines entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpers bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (grünes Signal), die des E-Cadherins bei 568 nm (rotes Signal). Um eine potentielle Kolokalisierung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit E-Cadherin zu ermitteln, wurden die einzelnen Fluoreszenzbilder überlagert. Eine räumliche Nähe von KAI1-WT bzw. KAI1-SP und E-Cadherin zeigte sich dabei als gelbes Signal. Repräsentative Bilder sind in der Abbildung dargestellt.

Für KAI1-WT und E-Cadherin ließ sich eine deutliche Kolokalisierung nachweisen. Für KAI1-SP und E-Cadherin war diese sichtbar geringer ausgeprägt.

### **3.3.2 Analyse der zellulären Kolokalisierung von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice mit E-Cadherin in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels Koimmunpräzipitationsanalyse**

Zusätzlich zur immunzytochemischen Kolokalisierungsanalyse mittels E-Cadherin/KAI1-Doppelfärbungen wurden Koimmunpräzipitationsversuche durchgeführt. Hierzu wurden jeweils Zellysate aus  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT und -KAI1-SP-Zellen hergestellt. Die Lyse erfolgte dabei in Gegenwart des milden Detergenz Brij96, um die potentiell vorhandenen, aber eventuell schwachen Tetraspanin/E-Cadherin-Wechselwirkungen in der Membran nicht während der Komplexextraktion zu dissoziieren (Hemler, 2001; Levy und Shoham, 2005a). Als "Fänger"-Antikörper wurde das gegen E-Cadherin gerichtete monoklonale Maus-IgG Klon MB2 verwendet. Die Antigen/Antikörper-Komplexe wurden mittels Antikörperbindender Protein A-Sepharose-Beads aus der Lösung isoliert. Als Isotypkontrolle diente das unspezifische Maus-IgG Klon Mg2b00. Die Detektion der KAI1-Proteine, als potentielle Bestandteile des Immunpräzipitationskomplexes, erfolgte anschließend in der Westernblot-Analyse durch das polyklonale Kaninchen-IgG Klon H-173. Durch die Verwendung dieses im Kaninchen generierten Antikörpers, im Gegensatz zu dem für die Immunpräzipitation eingesetzten Maus-IgG gegen E-Cadherin, wurden Kreuzreaktionen des sekundären Detektions-Antikörpers in der Westernblot-Analyse reduziert.

In der Westernblot-Analyse ließ sich bei  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT und -KAI1-SP-Zellen eine breite Bande nachweisen, während diese in der Kontrolle nicht sichtbar war. Die Bande lag im Molekulargewichtsbereich von etwa 50 kDa und war dem KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-Protein zuzuordnen. Es konnte somit sowohl für KAI1-WT als auch für KAI1-SP eine Kolokalisierung mit E-Cadherin detektiert werden. Hinsichtlich der Signalstärke und demnach auch im Ausmaß der physikalischen Wechselwirkung waren jedoch Unterschiede zwischen den KAI1-Proteinen erkennbar. Bei  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-WT-Zellen zeigte sich eine sichtbar stärker ausgeprägte Bande und somit Kolokalisierung mit E-Cadherin, als bei  $\alpha_v\beta_3$ -OV-MZ-6-KAI1-SP-Zellen.



**Abbildung 19. Koimmunpräzitationsanalyse von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit E-Cadherin in OV-MZ-6-Zellen**

Die zelluläre Kolokalisierung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit E-Cadherin wurde mittels Koimmunpräzitation untersucht. Für die Immunpräzitation von KAI1-WT- bzw. KAI1-SP-transfizierten Zelllysaten wurde das gegen E-Cadherin-gerichtete Maus-IgG Klon MB2 und zur Kontrolle (Ko) das unspezifische Maus-IgG Klon Mg2b00 verwendet. Die nachfolgende Westernblot-Analyse erfolgte mittels des gegen KAI1-gerichteten Kaninchen-IgG Klon H-173. Die breiten Banden mit einem Molekulargewicht (M) von etwa 50 kDa zeigen, dass sowohl für KAI1-WT als auch für KAI1-SP eine Kolokalisierung mit E-Cadherin existierte, wobei diese für KAI1-SP geringer ausgeprägt war, als für KAI1-WT. Bei der Kontrolle hingegen war keine Bande zu beobachten.

### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Metastasierungssuppressors KAI1-WT im Vergleich zu dessen SP-Variante an einem humanen Ovarialkarzinomzellmodell näher untersucht. Dazu wurde die Auswirkung der Expression der beiden strukturell verschiedenen KAI1-Proteine auf die Integrin-vermittelte zellmigratorische Aktivität, als wichtige tumorzellbiologische Eigenschaft, analysiert. Im Fokus stand dabei der Einfluss auf die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -abhängige Migration von OV-MZ-6-Zellen in Adhäsion an VN. Hier ließen sich differenzielle funktionelle Eigenschaften von KAI1-WT und KAI1-SP charakterisieren. Durch Expression von KAI1-WT wurde die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelte Migration signifikant vermindert. Diese Funktion von KAI1-WT ließ sich auch in Gegenwart von Kol I, einem Adhäsionssubstrat von Integrinen der  $\beta_1$ -Subfamilie, zeigen. Die Expression von KAI1-SP führte dagegen zu einem Anstieg der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelten Motilität und auch der zellmigratorische Aktivität auf Kol I. Dieser Effekt war ausgeprägter, als der durch den Verlust des KAI1-WT-Proteins allein, was der Vergleich mit VEK-transfizierten Zellen, die einen niedrigen endogenen KAI1-Proteingehalt aufwiesen, zeigte.

Zudem wurde die Funktion von KAI1-WT bzw. KAI1-SP bei der Zellmigration in Abhängigkeit des Expressionsspiegels des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  untersucht, indem die Motilität von Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen analysiert wurde. Nach Überexpression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  ließ sich ebenso die oben beschriebene differentielle Funktion der beiden KAI1-Proteine bei der Zellmigration beobachten. KAI1-WT reduzierte die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelte Zellmotilität, KAI1-SP verstärkte diese. Im Vergleich zu OV-MZ-6-Zellen mit niedrigem endogenen Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Gehalt war nach Überexpression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  allerdings der motilitätshemmende Einfluss von KAI1-WT weniger stark ausgeprägt, während der migrationsfördernde Effekt von KAI1-SP verstärkt auftrat.

Neben der Integrin/EZM-vermittelten Migration, spielt auch die Zell/Zell-Adhäsion und deren Regulierung eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression. In der vorliegenden Arbeit wurde, zusätzlich zur Funktion von KAI1-WT bzw. KAI1-SP bei der Zellmotilität, die Interaktion der KAI1-Proteine mit dem interzellulären Adhäsionsrezeptor E-Cadherin in humanen Ovarialkarzinomzellen untersucht. Auch hier ergaben sich Unterschiede zwischen KAI1-WT und KAI1-SP. Für KAI1-SP zeigte sich verglichen mit KAI1-WT eine deutlich schwächere physikalische Wechselwirkung mit E-Cadherin.

Insgesamt ergaben sich somit im Rahmen der Studien deutliche Hinweise für eine unterschiedliche Funktion von KAI1-WT und KAI1-SP bei der Migration und der Adhäsion humaner Ovarialkarzinomzellen.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die Rolle von KAI1-Wildtyp bzw. dessen Splice-Variante bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms**

#### **4.1.1 Der Einfluss von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice auf die migratorische Aktivität humaner Ovarialkarzinomzellen**

Das Ovarialkarzinom stellt, trotz zahlreicher Fortschritte bezüglich der Therapie, die führende Todesursache durch Malignome des weiblichen Genitals dar. In diesem Zusammenhang kommt der Bildung von Metastasen eine große Bedeutung zu, da ein Großteil der Patientinnen bei der Erstdiagnose bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium aufweist, bei dem sich Sekundärtumoren gebildet haben (Borges et al., 2010). Das charakteristische diffuse intraabdominale Wachstumsverhalten des Ovarialkarzinoms begrenzt die therapeutischen Optionen. Dies zeigt die Notwendigkeit auf, Moleküle zu identifizieren, die an dem Prozess der Metastasenbildung beteiligt sind und ihre funktionellen Eigenschaften zu untersuchen.

Metastasierungssuppressoren stellen Moleküle dar, die die Absiedlung von Tumorzellen limitieren. Sie sind in die Regulierung wichtiger zellulärer Funktionen, wie der Adhäsion, der Migration und der Invasion, involviert und nehmen auf diese Weise Einfluss auf multiple Schritte des komplexen Prozesses der Metastasierung (Smith und Theodorescu, 2009; Becker et al., 2005). Ein Verlust ihrer protektiven Funktion spielt eine wesentliche Rolle bei der Tumorprogression (Ichikawa et al., 1991; Smith und Theodorescu, 2009).

Unter den bereits identifizierten Metastasierungssuppressoren nimmt das Tetraspanin KAI1-Wildtyp (WT) eine besondere Stellung ein. Für eine Reihe von soliden Tumoren, so auch für das Ovarialkarzinom, existieren Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer verminderten Expression des KAI1-WT und dem Auftreten von Metastasen (Houle et al., 2002; Yang et al., 1997; Yu et al., 1997; Guo et al., 1996 und 1998; Liu et al., 2001; Miyazaki et al., 2000; Lombardi et al., 1999; Chen et al., 2004a; Hinoda et al., 1998). Anhand von *in vivo*-Studien wurde bereits für verschiedene Tumorzelllinien eine deutliche Reduzierung der Metastasierung als Folge einer Reexpression von KAI1-WT gezeigt (Shinohara et al., 2001b; Yang et al., 2001; 2008; Takeda et al., 2007; Xu et al., 2008).

Die Ursachen für einen Expressions- oder Funktionsverlust von KAI1-WT in malignen Tumoren sind bisher noch nicht hinreichend geklärt. Lee et al. (2003) beschrieben durch die

Entdeckung einer Splice-Variante von KAI1 (KAI1-SP) einen potentiellen Mechanismus, der die Funktion des Proteins als Metastasierungssuppressor beeinflusst. KAI1-SP entsteht durch einen Verlust des Exons 7 und unterscheidet sich strukturell durch ein Fehlen eines Teils der großen extrazellulären Schleife sowie der vierten Transmembranregion von KAI1-WT. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in wieweit sich dieser strukturelle Unterschied von KAI1-SP auf die funktionellen zellbiologischen Eigenschaften des Proteins auswirkt.

KAI1-WT übt seine Funktion als Metastasierungssuppressor aus, indem es wesentliche zellbiologische Prozesse beeinflusst. Die Adhäsion sowie die damit eng verknüpfte Migration stellen wichtige zelluläre Funktionen bei der Metastasenbildung dar. Folglich wurde die Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit der Expression von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mittels *time-lapse*-Videomikroskopie vergleichend analysiert. Als Folge der KAI1-WT-Expression wurde eine signifikant verminderte Motilität der Ovarialkarzinomzellen beobachtet. Dieser Zusammenhang zeigte sich bereits in früheren Migrationstudien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Reuning, in denen der Einfluss von KAI1-WT auf die migratorische Aktivität kultivierter humaner Ovarialkarzinomzellen untersucht wurde (Ruseva et al., 2009). Ebenso konnte in anderen Tumorzelllinien ein KAI1-WT-vermittelter supprimierender Effekt auf die Zellmotilität nachgewiesen werden (Zhang et al., 2003a; Jee et al., 2007; Takaoka et al., 1998).

Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Migrationsanalyse von Ovarialkarzinomzellen, die KAI1-SP exprimierten, eine gesteigerte Motilitätskapazität im Vergleich zu KAI1-WT- und auch zu VEK-transfizierten Zellen mit sehr geringem KAI1-Proteingehalt. Somit scheint die Expression von KAI1-SP mit einem größeren Migrationspotential der Ovarialkarzinomzellen assoziiert zu sein, als der Expressionsverlust des KAI1-WT-Proteins allein. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit Studien von Lee et al. (2003). Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Rolle von KAI1-SP bei der Metastasierung einer Kolonkarzinomzelllinie und konnte auch hier eine gesteigerte zelluläre Motilität als Funktion von KAI1-SP nachweisen. Zudem war die Expression von KAI1-SP mit einer erhöhten Invasivität, das heißt einer gerichteten Migration durch Gewebe, als weitere für die Metastasierung wichtige zelluläre Eigenschaft, assoziiert.

Die konkreten Mechanismen, welche der differentiellen Auswirkung der Expression von KAI1-WT und KAI1-SP auf die migratorische Aktivität von Ovarialkarzinomzellen zugrunde liegen, sind bisher noch weitgehend unklar. Ein Ansatzpunkt zur Klärung dieser Frage, stellt die Wechselwirkung der beiden KAI1-Proteine mit Integrinen dar.

#### **4.1.2 Die Bedeutung der Wechselwirkung von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-Splice mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ für die Migration humaner Ovarialkarzinomzellen**

Die zelluläre Migration ist wesentlich vom Ausmaß der Zell/EZM-Adhäsion abhängig. Integrine haben als Vermittler dieser Kontakte und als Bindeglied zum Zytoskelett einen entscheidenden Einfluss auf die Zellmotilität. Ihre Fähigkeit zur bidirektionalen Signalgebung, die im Rahmen der Interaktion mit anderen Membranproteinen beeinflusst wird, erlaubt eine fein abgestimmte Regulierung der migratorische Aktivität von Zellen (Vicente-Manzanares et al., 2009; Hood und Cheresch, 2002).

Ovarialkarzinomzellen exprimieren eine Reihe unterschiedlicher Integrine (Gardner et al., 1995; Bottini et al., 1993; Cannistra et al., 1995; Carreiras et al., 1995). Unter diesen kommt dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  eine besondere Bedeutung für die Tumorprogression zu. Dieses ist in Abhängigkeit seines Hauptliganden VN vornehmlich an der Regulierung adhäsiver und motiler Eigenschaften von Ovarialkarzinomzellen beteiligt (Carreiras et al., 1995; 1999; Hapke et al., 2001; 2003; Cruet et al., 1999).

Die Rolle der Integrine, speziell des Integrins  $\alpha_v\beta_3$ , bei dem Prozess der zellulären Migration und die Bedeutung der Wechselwirkung mit KAI1-WT bzw. KAI1-SP wurde in der vorliegenden Arbeit genauer betrachtet, indem die Motilität der Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit verschiedener Adhäsionssubstrate untersucht wurde. Dabei zeigte sich in Gegenwart von VN, das in OV-MZ-6-Zellen fast ausschließlich vom Integrin  $\alpha_v\beta_3$  gebunden wird, die größte migratorische Aktivität der Ovarialkarzinomzellen. Dagegen war auf PLL, das eine Integrin-unabhängige Adhäsion vermittelt, die geringste Motilität nachweisbar. Demnach wurde die Wichtigkeit der Integrine und vor allem die bedeutende Rolle der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Adhäsion auf VN bei der zellulären Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen bestätigt.

Die Tatsache, dass sich der motilitätshemmende Einfluss von KAI1-WT nur nach Adhäsion an die EZM-Proteine VN und Kol I zeigen ließ, nicht jedoch auf PLL, weist zudem darauf hin, dass eine Regulierung der Integrine durch KAI1-WT wesentlich an dem supprimierenden Effekt auf die Migration von OV-MZ-6-Zellen beteiligt ist. Für KAI1-WT ist bekannt, dass es als Tetraspanin seine Funktionen im Rahmen der Vermittlung von multiplen Protein/Protein-Interaktionen ausübt. Innerhalb des *tetraspanin webs* reguliert KAI1-WT die Funktion und die

Signalgebung der assoziierten Proteine, unter denen Integrine eine wichtige Gruppe darstellen (Berditchevski, 2001).

Studien von Ruseva et al. (2009) gaben erstmalig Hinweise auf ein Zusammenspiel zwischen KAI1-WT und dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  bei dem Prozess der Ovarialkarzinomzellmigration. In diesen war zum einen nach Adhäsion von OV-MZ-6-Zellen an VN eine Kolokalisierung von KAI1-WT und dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  auf der Zelloberfläche nachweisbar, was auf eine funktionelle Wechselwirkung der beiden Proteine hindeuten könnte. Zum anderen zeigten sie einen Zusammenhang zwischen der Expression von KAI1-WT und einer verstärkten Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Adhäsion auf VN.

Die zelluläre Migration beruht, wie bereits in Kapitel 1.7 ausführlich beschrieben, auf einem Wechselspiel zwischen Adhärenz und Lösen der Zellen von der sie umgebenden EZM. Eine Änderung dieser Balance nimmt einen entscheidenden Einfluss auf die Zellmotilität. Demnach ist es möglich, dass KAI1-WT die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Zellmigration auf VN reduziert, indem es das Gleichgewicht auf die Seite der Adhäsion verschiebt und die Zellen als Folge einer zu starken Substratanheftung in ihrer Motilität einschränkt. Auf gleiche Weise wäre der hemmende Effekt von KAI1-WT auf die zelluläre Motilität auf Kol I erklärbar, der vermutlich auf der Interaktion von KAI1-WT mit  $\beta_1$ -Integrinen, die dieses EZM-Substrat binden, beruht.

Aufgrund der großen Bedeutung der Zell/EZM-Adhäsion für den Prozess der zellulären Migration, wurden auch die Motilitäsanalysen der vorliegenden Arbeit in Zusammenhang mit dem Adhäsionsverhalten der Ovarialkarzinomzellen, welches parallel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Reuning untersucht wurde (Karle et al., unveröffentlichte Daten), betrachtet. Wie bereits von Ruseva et al. (2009) gezeigt, führte die Expression von KAI1-WT hier zu einer verstärkten Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Adhäsion auf VN und auch zu einem Adhäsionsanstieg auf Kol I. Im Gegensatz dazu war für KAI1-SP-transfizierte Zellen eine verminderte Adhärenz an die EZM-Substrate nachweisbar. Dieser abweichende Einfluss von KAI1-WT und KAI1-SP auf die Integrin-vermittelte Zell/EZM-Adhäsion weist darauf hin, dass eine unterschiedliche Regulierung der Integrinfunktion durch KAI1-WT und KAI1-SP wesentlich an ihrem differentiellen Einfluss auf die Ovarialkarzinomzellmigration beteiligt ist. Während die Zellmotilität nach Expression von KAI1-WT vermutlich durch verstärkte Adhärenz an die EZM limitiert wird, scheint eine nicht ausreichende Substratanheftung nach Expression von KAI1-SP zu dem migrationsfördernden Effekt beizutragen.

In Studien von Lee et al. (2003) führte die Expression von KAI1-SP in einer Kolonkarzinomzelllinie nicht zu einer verminderten Zell/EZM-Adhäsion, wie für OV-MZ-6-Zellen beschrie-

ben. Hier zeigte sich hingegen eine verstärkte Integrin  $\alpha_3\beta_1$ -vermittelte Adhäsion auf FN. Ebenso sind auch für KAI1-WT Unterschiede in der Modulierung der Zell/EZM-Adhäsion in verschiedenen Tumorzelllinien bekannt. So ließ sich, im Gegensatz zu der verstärkten Adhäsion von OV-MZ-6-Zellen auf VN und Kol I, in Kolon- und Leberkarzinomzelllinien eine Reduzierung der Adhäsion auf FN in Abhängigkeit der KAI1-WT-Expression darstellen (Lee et al., 2003; Liu et al., 2003; Yang et al., 2008) und in einer Prostatakarzinomzelllinie führte die Reetablierung von KAI1-WT zu einer verminderten Adhärenz an Laminin (He et al., 2005). Diese nicht einheitlichen Ergebnisse bezüglich des Einflusses von KAI1-WT bzw. KAI1-SP auf die Zell/EZM-Adhäsion sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass je nach Tumorentität eine andere Balance zwischen Adhärenz und Lösen der Zellen von der sie umgebenden EZM für die Migration nötig ist.

Die zelluläre Motilität wird weiterhin durch verschiedene andere Faktoren, wie beispielsweise die Adhäsionsrezeptordichte, bestimmt. In Studien von Hapke et al. (2003) wurde bereits ein Einfluss der Expressionshöhe des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  auf die Migration von OV-MZ-6-Zellen nachgewiesen. Hier führte die Überexpression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  zu einer gesteigerten Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelten Migration bei verstärkter Zelladhäsion auf VN.

Um die Bedeutung der Wechselwirkung von KAI1-WT bzw. KAI1-SP mit dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  für die Motilität humaner Ovarialkarzinomzellen näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit zudem die Funktion von KAI1-WT bzw. KAI1-SP bei der zellulären Migration in Abhängigkeit einer Überexpression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  betrachtet. Auch hier ließ sich der differentielle Einfluss von KAI1-WT und KAI1-SP auf die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Motilität in Adhäsion an VN darstellen. Als Folge des Expressionsanstiegs des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  zeigte sich der migrationshemmende Effekt von KAI1-WT jedoch weniger stark ausgeprägt und der motilitätssteigernde Einfluss von KAI1-SP im Vergleich zu OV-MZ-6-Zellen mit niedrigem endogenen Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Gehalt verstärkt. Demnach scheint die Höhe des Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Expressionsspiegels eine wichtige Rolle sowohl bei der Regulierung der zellulären Migration durch KAI1-WT als auch durch KAI1-SP zu spielen, wobei der genaue Zusammenhang weiterhin unklar bleibt. Es ergeben sich dennoch deutliche Hinweise, dass eine unterschiedliche Wechselwirkung von KAI1-WT und KAI1-SP mit dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  zu dem differentiellen Einfluss auf die Ovarialkarzinomzellmigration beiträgt.

KAI1-SP unterscheidet sich strukturell durch ein Fehlen des distalen Teils der großen extrazellulären Schleife sowie eines Bereichs der vierten Transmembranregion von KAI1-WT. Diese Region scheint zum einen für den hemmenden Effekt von KAI1-WT auf die zelluläre Motilität wichtig zu sein (Lee et al., 2004). Zum anderen zeigten Studien über das Tetraspanin

CD151 eine Beteiligung der großen extrazellulären Schleife an der Wechselwirkung von Tetraspaninen mit Integrinen (Yauch et al., 2000; Berditchevski et al., 2001). Es ist demnach vorstellbar, dass strukturelle Abweichungen innerhalb dieser Region, wie sie für KAI1-SP beschrieben sind, eine veränderte physikalische Interaktion mit Integrinen bedingen und folglich zu dem differentiellen Einfluss von KAI1-SP auf die zelluläre Migration beitragen könnten. Hinweise auf diesen Zusammenhang geben auch Studien von Lee et al. (2003). Diese zeigten in einer Kolonkarzinomzelllinie eine verminderte Kolo-kalisierung von KAI1-SP und dem Integrin  $\alpha_3\beta_1$  im Vergleich zu KAI-WT und führten die reduzierte zelluläre Motilität nach Expression von KAI1-SP auf diese veränderte Interaktion zurück. In Ovarialkarzinomzellen wurde bereits eine Kolo-kalisierung von KAI1-WT und dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  mittels Koimmunpräzipitationsstudien beschrieben (Ruseva et al., 2009). Die physikalische Wechselwirkung von KAI1-SP mit Integrinen, speziell mit dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , im Vergleich zu KAI1-WT ist bislang jedoch noch nicht untersucht.

Weitere Einblicke in das komplexe Zusammenspiel zwischen den beiden KAI1-Proteinen und Integrinen bei der Ovarialkarzinomzellmigration ergeben sich aus Untersuchungen zur Klärung potentieller Mechanismen, die der Reduzierung der Integrin-vermittelten zellulären Migration durch KAI1-WT zugrunde liegen. Die Modulierung intrazellulärer Signaltransduktionswege der Integrine stellt dabei einen Ansatzpunkt dar. Sridhar und Miranti (2006) zeigten, dass die Expression von KAI1-WT in einer Prostatakarzinomzelllinie zu einer verminderten Aktivierung und Phosphorylierung der Scr-Kinase sowie ihrer nachgeschalteten Substrate FAK Y861 und p130cas führt. Zudem scheint die p130cas/crkII-Komplexbildung durch KAI1-WT reduziert zu werden (Zhang et al., 2003a). In Untersuchungen von Zhang et al. (2001) war zu beobachten, dass Tetraspanine, wie KAI1-WT, die PKC in fokale Adhäsionsstellen rekrutieren können. Durch die Vermittlung der Phosphorylierung von  $\beta_1$ -Integrinen in den entstehenden Komplexen, bestehend aus PKC,  $\beta_1$ -Integrinen und Tetraspaninen, können möglicherweise zelluläre Prozesse, wie die Migration, beeinflusst werden. Daneben ist auch die Interaktion mit anderen Rezeptoren, wie Wachstumsfaktorrezeptoren, in die Regulierung der Integrin-vermittelten Motilität durch KAI1-WT involviert. Odintsova et al. (2000) zeigten eine Abschwächung EGF-induzierter Signale durch die Wechselwirkung von KAI1-WT mit dem EGFR. Die EGF-induzierte Ausbildung von Lamellipodien wurde reduziert. Ein anderer potentieller Mechanismus, über den KAI1-WT die Zellmotilität limitiert, stellt die Beschleunigung der Internalisierung seiner Bindungspartner dar. In einer Prostatakarzinomzelllinie führte die Expression von KAI1-WT zu einer verstärkten Endozytose und somit zu einer verminderten Expression des Integrins  $\alpha_6\beta_1$  auf der

Zelloberfläche (He et al., 2005). Ebenso scheint KAI1-WT durch die verzögerte Reifung von  $\beta_1$ -Integrinvorstufen die Integrinexpression zu beeinträchtigen (Jee et al., 2007). Für das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  konnte jedoch keine Änderung des Expressionsspiegels nach Reexpression von KAI1-WT in humanen Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden (Ruseva et al., 2009). Somit scheint diese Funktion von KAI1-WT Integrin-spezifisch zu sein.

Die aufgeführten Mechanismen, die bislang für den hemmenden Einfluss von KAI1-WT auf die Integrin-vermittelte Zellmotilität beschrieben sind, könnten ebenso eine Rolle bei der Funktion von KAI1-SP spielen. Es besteht die Möglichkeit, dass die abweichende Struktur von KAI1-SP dazu führt, dass die Modulierung dieser in die Migration involvierten Moleküle und Signalwege aufgehoben oder verändert und folglich die Motilität der Zellen beeinflusst wird.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen die große Bedeutung der Regulierung der Funktion der Integrine, speziell des Integrins  $\alpha_v\beta_3$ , durch KAI1-WT und KAI1-SP für die Adhäsion und Migration von Ovarialkarzinomzellen. Trotz einiger Hinweise auf potentielle zugrunde liegende Mechanismen, bedarf es weiterer Forschung, um die genauen Hintergründe der differentiellen Interaktion von KAI1-WT und KAI1-SP mit dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  sowie die dadurch bedingten Auswirkung auf das Verhalten maligner Ovarialkarzinomzellen zu verstehen.

Um die Funktion von KAI1-WT und KAI1-SP bei der Progression des Ovarialkarzinoms genauer zu klären, muss zudem auch die Wechselwirkung der beiden unterschiedlichen KAI1-Proteine mit anderen Molekülen innerhalb des *tetraspanin webs* berücksichtigt werden. Zum einen scheinen in die Regulierung der Motilität durch KAI1-SP auch Integrin-unabhängige Mechanismen involviert zu sein. Anhaltspunkte dafür ergeben sich aus der Tatsache, dass KAI1-SP, anders als KAI1-WT, die zellmigratorische Aktivität auch auf PLL beeinflusste. Zum anderen existieren auch Hinweise auf einen unterschiedlichen Einfluss von KAI1-WT und KAI1-SP auf andere tumorbiologisch relevante zelluläre Funktionen. Ein Beispiel ist hier die Proliferation. Lee et al. (2003) zeigten in einer Kolonkarzinomzelllinie eine Verminderung der Proliferationsrate als Funktion von KAI1-WT, während KAI1-SP keinen Einfluss auf diese hatte. Es liegt demnach nahe, dass neben Unterschieden zwischen KAI1-WT und KAI1-SP bei dem Zusammenspiel mit Integrienen auch Abweichungen in der Interaktion mit weiteren Proteinen, welche sowohl wichtig für die Motilität als auch für andere zelluläre Funktionen sind, bestehen.

### **4.1.3 Die Wechselwirkung von KAI1-WT bzw. KAI1-Splice mit E-Cadherin in humanen Ovarialkarzinomzellen**

Der interzelluläre Adhäsionsrezeptor E-Cadherin stellt ein weiteres Molekül dar, das in die Progression des Ovarialkarzinoms involviert ist. Yuecheng et al. (2006) zeigten bereits in einer Studie einen Zusammenhang zwischen einer verminderten Expression des E-Cadherins und einem fortgeschrittenen Tumorstadium sowie der Bildung von Lymphknotenmetastasen bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Ebenso, wie KAI1-WT, ist E-Cadherin funktionell als Metastasierungssuppressor zu betrachten (Hedrick et al., 1993; Semb und Christofori, 1998). Ein Verlust der Funktion des E-Cadherins bei der Vermittlung stabiler interzellulärer Kontakte trägt dazu bei, dass sich maligne Zellen infolge einer gesteigerten Motilität und Invasivität weiter in umgebende Gewebsstrukturen ausbreiten können (Kokenyesi et al., 2003; Handschuh et al., 1999; 2001; Takeichi, 1993). Eine ausgewogene Regulierung der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion spielt demnach eine wichtige Rolle bei der Tumorigression.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Koimmunpräzipitationsanalyse und immunzytochemischer Doppelfärbung eine Kolokalisierung von KAI1-WT mit E-Cadherin in humanen Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen. Dies weist darauf hin, dass KAI1-WT in die Regulierung der Funktion von E-Cadherin beim Ovarialkarzinom involviert ist. Für KAI1-SP ließ sich eine deutlich schwächere Kolokalisierung mit E-Cadherin zeigen, als für KAI1-WT. Da der Verlust des Exons 7 im Rahmen der Entstehung von KAI1-SP Bereiche der großen extrazellulären Schleife und der vierten Transmembranregion betrifft, kann spekuliert werden, dass Anteile dieser Regionen, wie auch bei Integrinen, an der Wechselwirkung der KAI1-Proteine mit E-Cadherin beteiligt sind. Folglich wäre die abweichende Interaktion von KAI1-SP und E-Cadherin auf den strukturellen Unterschied von KAI1-SP in diesem Bereich zurückzuführen. Eine differentielle Kolokalisierung von KAI1-WT und KAI1-SP mit E-Cadherin wurde auch bereits von Lee et al. (2003) in einer Kolonkarzinomzelllinie nachgewiesen. Während sich hier ebenso eine eindeutige Assoziation von KAI1-WT mit E-Cadherin im Bereich der interzellulären Kontaktregionen zeigen ließ, war diese für KAI1-SP nicht detektierbar.

Es stellt sich die Frage, wie sich die unterschiedliche physikalische Wechselwirkung der beiden strukturell verschiedenen KAI1-Proteine mit E-Cadherin auf die Funktion dieses Zell/Zell-Adhäsionsrezeptors auswirkt und welche Bedeutung sie für die Progression des Ovarialkarzinoms hat. Dabei ist neben der direkten physikalischen Interaktion der KAI1-

Proteine mit E-Cadherin auch die Möglichkeit einer indirekten Wechselwirkung über andere Moleküle zu berücksichtigen.

Abe et al. (2008) untersuchten die Interaktion von KAI1-WT mit E-Cadherin sowie die Auswirkung dieser auf das Verhalten maligner Zellen bereits näher. Sie zeigten, dass KAI1-WT die E-Cadherin-vermittelte Adhäsion verstärkt und maligne Zellen folglich vor der Disseminierung schützt, indem es den Komplex aus E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin stabilisiert. Dieser ist essentiell für die Ausbildung stabiler interzellulärer Kontakte. Durch Tyrosinphosphorylierung einzelner Komponenten des E-Cadherin/Catenin-Komplexes kann die Komplexbildung bzw. die Stabilität und folglich auch die Zell/Zell-Adhäsion moduliert werden. Dabei geht die Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenins mit einer Schwächung des Adhäsionskomplexes und auch der interzellulären Adhäsion einher (Roura et al., 1999; Piedra et al., 2001). Verschiedene Wachstumsfaktoren, wie der *hepatocyte growth factor* (HGF) und der EGF sind hieran beteiligt (Shibamoto et al., 1994). Abe et al. (2008) zeigten, dass KAI1-WT sowohl durch Modulierung der Signalwege der Wachstumsfaktoren als auch unabhängig von diesen die Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenins reduziert und auf diese Weise den Adhäsionskomplex, bestehend aus E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin, stabilisiert. Es ist denkbar, dass dieser Mechanismus, über den KAI1-WT die Ausbreitung maligner Zellen schützt, für KAI1-SP infolge der abweichenden Wechselwirkung mit E-Cadherin nicht existiert bzw. verändert wird.

Zudem ist bekannt, dass die Expressionshöhe des E-Cadherins eine wesentliche Rolle bei der Progression des Ovarialkarzinoms spielt, wobei bislang unklar ist, auf welche Weise. Neben diversen Studien, in denen Ovarialkarzinomzellen eine verminderte E-Cadherin-Expression aufwiesen (Fujioka et al., 2001; Imai et al., 2004; Faleiro-Rodrigues et al., 2004, Voutilainen et al., 2006) und ein Zusammenhang dieser mit der Bildung von Metastasen beschrieben wurde (Yuecheng et al., 2006), gibt es auch Hinweise, dass ein E-Cadherin-Expressionsanstieg in die maligne Progression involviert ist (Rodriguez et al., 2012). Vor diesem Hintergrund erscheint es somit möglich, dass die beiden unterschiedlichen KAI1-Proteine im Rahmen der Interaktion mit E-Cadherin auch durch Änderung des Expressionsmusters Einfluss auf die Tumorprogression des Ovarialkarzinoms nehmen. In der vorliegenden Arbeit ließ sich immunzytochemisch kein Unterschied in der Expression des E-Cadherins zwischen KAI1-WT- und KAI1-SP-transfizierten OV-MZ-6-Zellen nachweisen. Ebenso zeigte sich in Studien von Abe et al. (2008) keine Änderung des E-Cadherin-Expressionsspiegels durch KAI1-WT. Der genaue Zusammenhang zwischen der Expression der beiden KAI1-Proteine und der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion bleibt demnach weiterhin unklar. Dennoch weisen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kollaborationsstudien darauf hin,

dass neben der Regulierung der Integrine durch KAI1-WT und KAI1-SP auch die des E-Cadherins eine wichtige Rolle bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms spielt. Zudem ergeben sich weitere Anhaltspunkte für einen differentiellen Einfluss von KAI1-WT und KAI1-SP auf das zelluläre Verhalten im Rahmen der Tumorprogression.

## **4.2 Potentieller Nutzen der gewonnenen Erkenntnisse für die Therapieüberlegungen beim Ovarialkarzinom**

Durch die Analyse der Beteiligung des Metastasierungssuppressors KAI1-WT und dessen SP-Variante an der Adhäsion und Migration humaner Ovarialkarzinomzellen im Rahmen der vorliegenden Dissertation ergeben sich neue Einblicke in die Mechanismen, die den veränderten zellulären Eigenschaften bei dem komplexen Prozess der Metastasierung des Ovarialkarzinoms zugrunde liegen. Diese Kenntnisse könnten zum einen bedeutsam für eine prognostische Aussage und zum anderen von potentiellem Nutzen in Hinblick auf therapeutische Optionen für Patientinnen mit Ovarialkarzinom sein.

Das Tetraspanin KAI1-WT ist bereits seit langem als Metastasierungssuppressor bekannt und seine protektive Funktion in diversen Tumorentitäten genauer untersucht. Es stellt jedoch eine große Herausforderung dar, das bisherige Wissen in effektive therapeutische Konzepte umzuwandeln. Es existieren bereits einige *in vitro*- und *in vivo*-Studien mit verschiedenen Ansatzpunkten. Dabei basiert ein gentherapeutischer Ansatz auf der Reexpression von KAI1-WT in malignen Zellen. Takeda et al. (2007) etablierten ein orthotopes Bronchialkarzinommodell durch Implantation von Zellen einer nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie in Nacktmäuse. Um die Expression von KAI1-WT wiederherzustellen und die Auswirkung auf die Metastasierung *in vivo* zu untersuchen, wurden den malignen Zellen sowohl vor als auch nach ihrer Implantation für KAI1-WT-kodierende Adenoviren als Vektoren injiziert. In beiden Studienzweigen zeigte sich nach Reexpression von KAI1-WT eine deutlich verminderte Metastasierung in mediastinale Lymphknoten. Xu et al. (2008) zeigten auch für das Pankreaskarzinom nach Etablierung eines Primärtumors in Nacktmäusen und anschließender Injektion von KAI1-WT-cDNA-enthaltenden Expressionsvektoren eine verminderte pulmonale Metastasierung.

Eine weitere Möglichkeit, die Expression von KAI1-WT in therapeutische Überlegungen einzubeziehen, stellt die Regulierung seiner Transkription dar. El Touny und Banerjee (2007)

gaben Hinweise darauf, dass die Transkription von KAI1-WT durch das Phytoöstrogen Genistein induziert wird. Anhand eines Prostatakarzinom-Mausmodells ließ sich als Folge der Gabe von Genistein ein Expressionsanstieg von KAI1-WT zeigen, welcher sich mit einem verminderten zellulären Invasionspotential in Zusammenhang bringen ließ. Der genaue Mechanismus, über den das Phytoöstrogen diesen Effekt bedingt, ist jedoch unklar. Zudem scheint das Protein p53 über ein p53-Response-Element die Transkription von KAI1-WT zu induzieren (Mashimo et al., 1998). Mashimo et al. (2000) zeigten, dass das Zytostatikum Etoposid durch eine Aktivierung von p53 zu einem Expressionsanstieg von KAI1-WT führt. Passend hierzu ergaben *in vivo*-Studien von Wu et al. (2003), in denen Mäuse nach Implantation von Magenkarzinomzellen mit Etoposid behandelt wurden, eine verstärkte KAI1-WT-Expression und eine reduzierte Metastasierung in die Leber. Für Etoposid existieren auch bereits klinische Phase II-Studien, in denen die Wirkung bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom mit Erfolg getestet wurde (Correale et al., 2006; 2011). Der Zusammenhang zwischen der Gabe des Zytostatikums und der Expression von KAI1-WT blieb in bisherigen Studien allerdings unberücksichtigt. Da für Etoposid ein sehr breites Wirkungsspektrum bekannt ist, bleibt die Frage offen, inwieweit KAI1-WT wirklich in den therapeutischen Effekt von Etoposid involviert ist. Hieraus wird ersichtlich, dass die Suche nach Methoden, mittels derer die Expression von KAI1-WT gesteigert werden kann, noch am Anfang steht und weiterer Forschung bedarf.

Die bisherigen Kenntnisse über die differentielle Funktion von KAI1-WT und KAI1-SP beim Ovarialkarzinom geben Anhaltspunkte dafür, dass, neben den beschriebenen Methoden zur Stärkung der Funktion des KAI1-WT, die Hemmung von KAI1-SP einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt darstellen könnte. Im Gegensatz zu KAI1-WT, dessen Funktion als Metastasierungssuppressor bereits in verschiedenen malignen Tumoren gezeigt und genauer untersucht wurde, existieren für KAI1-SP bisher lediglich Hinweise darauf, dass es die Metastasierung beeinflussen kann. Um die genaue Rolle der SP-Variante von KAI1 bei der Tumorprogression zu klären, sind weitere Untersuchungen nötig, in denen der Einfluss von KAI1-SP auf das zelluläre Verhalten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert wird. Erst dann ist es möglich, auch eine Aussage über die Bedeutung von KAI1-SP für alternative Therapieoptionen von Ovarialkarzinompatientinnen zu machen.

Bei der Suche nach neuen therapeutischen Optionen, die sich auf das KAI1-WT-Protein und dessen SP-Variante beziehen, muss zudem die Wechselwirkung dieser Proteine mit anderen Molekülen bedacht werden. So könnte auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, die Funktion von KAI1-WT und KAI1-SP indirekt zu beeinflussen, indem ihre Interaktionspart-

ner als therapeutische Zielstruktur genutzt werden. Für das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , als wichtiger Interaktionspartner des KAI1-WT und KAI1-SP beim Ovarialkarzinom, existieren zahlreiche Studien, in denen die Entwicklung von selektiv wirkenden Antagonisten, wie zyklischen RGD-Peptiden oder monoklonalen Antikörpern, die gegen das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  gerichtet sind, im Vordergrund steht (Danhier et al., 2012; Auzzas et al., 2010; Cai und Chen, 2006; Belvisi et al., 2005; Gutheil et al., 2006). Dadurch konnten bereits Erfolge in Bezug auf die Tumorprogression erzielt werden. Diese waren in erster Linie auf die Hemmung der Angiogenese zurückzuführen (Brooks et al., 1994b; Allman et al., 2000; Taga et al., 2002; Mousa et al., 2005). Auch für das Ovarialkarzinom wurde eine derartige Therapie bereits untersucht. *In vitro* konnte nach Hemmung des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  eine verminderte Proliferation und Invasion maligner Zellen gezeigt werden (Landen et al., 2008). Zudem ließ sich auch in *in vivo*-Studien durch Blockierung der Integrinfunktion eine verminderte peritoneale Ausbreitung maligner Zellen sowie eine Reduzierung des Tumorwachstums in Mäusen nachweisen (Yamamoto et al., 1991; Landen et al., 2008; Kim et al., 2009).

Die dargestellten Möglichkeiten, das bisherige Wissen über KAI1-WT und dessen SP-Variante therapeutisch zu nutzen, zeigen, trotz erster potentieller Ansätze, die Notwendigkeit weiterer intensiver Forschung. Es bedarf der Klärung der genauen Hintergründe des zellulären Verhaltens bei der Progression des Ovarialkarzinoms, um ein geeignetes therapeutisches Konzept, das in die Humanmedizin integriert werden kann, zu entwickeln.

## 5 Zusammenfassung

Für das Ovarialkarzinom ist bekannt, dass die Mehrzahl der Patientinnen bei Diagnosestellung bereits eine Metastasenbildung aufweisen, welche die therapeutischen Optionen begrenzt und zur hohen Mortalität des Ovarialkarzinoms beiträgt (Borges et al., 2010). Charakteristisch ist dabei eine diffuse intraabdominale Ausbreitung der Zellen, welche unter anderem auf adhäsiven, migratorischen und invasiven Fähigkeiten der malignen Zellen beruht. KAI1-Wildtyp (WT) stellt ein Protein dar, welches als Metastasierungssuppressor in diversen malignen Tumoren bereits bekannt ist. Als Tetraspanin beeinflusst es für die Tumorumprogression wichtige zelluläre Prozesse, indem es im Rahmen von transmembranen, multimolekularen Netzwerken mit anderen Molekülen interagiert. Unter diesen spielen Adhäsionsrezeptoren, wie Cadherine und Integrine, eine große Rolle. Ein Expressionsverlust von KAI1-WT, welcher bei vielen fortgeschrittenen Karzinomen zu finden ist, ist mit der Progression von Tumoren und einer schlechten Prognose verbunden (Boucheix et al., 2001). Anders, als für KAI1-WT, wurde für eine Splice (SP)-Variante von KAI1 ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression und der Metastasierung maligner Zellen beschrieben. KAI1-SP unterscheidet sich strukturell durch ein Fehlen eines Bereichs in der großen extrazellulären Schleife sowie der vierten Transmembranregion von KAI1-WT (Lee et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der beiden unterschiedlichen KAI1-Proteine beim Ovarialkarzinom vergleichend näher untersucht. Dazu wurden OVMZ-6-Zellen stabil mit KAI1-WT- oder KAI1-SP-cDNA transfiziert und die Beteiligung der beiden Proteine an der Zelladhäsion und der Migration, als tumorbiologisch wichtige Zelleigenschaften, analysiert. Der Einfluss der KAI1-Proteine auf die zelluläre Motilität wurde im Kontext einer Interaktion mit Integrinen mittels *time-lapse*-Videomikroskopie beurteilt. Das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  gilt als tumorbiologisch wichtiges EZM-Adhäsionsmolekül, das in Tumoren oftmals verstärkt exprimiert wird und in Abhängigkeit seines Hauptliganden Vitronektin (VN) an der Zellmotilität wesentlich beteiligt ist (Hapke et al., 2003). In Ovarialkarzinomzellen wurde bereits eine funktionelle Wechselwirkung mit KAI1-WT gezeigt. Im Rahmen dieser Interaktion war ein hemmender Einfluss von KAI1-WT auf die Motilität nachweisbar (Ruseva et al., 2009). Dieser Effekt konnte in der Arbeit erneut gezeigt werden. Durch KAI1-WT wurde die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelte Migration signifikant vermindert. Hingegen war nach Expression von KAI1-SP ein Anstieg der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /VN-vermittelten Motilität zu beobachten. Ähnliche differentielle Effekte der KAI1-Proteine zeigten sich nach Überexpression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$ . Neben der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Migration auf VN wurde auch die Motilität auf Kollagen Typ I, vermutlich im

Rahmen einer Wechselwirkung mit  $\beta_1$ -Integrinen, durch KAI1-WT limitiert und durch KAI1-SP verstärkt. Die genauen Hintergründe dieser differentiellen Funktion der beiden KAI1-Proteine bei der Integrin-vermittelten Migration von Ovarialkarzinomzellen sind noch unklar. Ein unterschiedlicher Einfluss auf die Zell-EZM-Adhäsion scheint hier eine Rolle zu spielen. Parallel in der Arbeitsgruppe angefertigte Adhäsionsstudien zeigten eine verstärkte Zell-EZM-Adhäsion durch Expression von KAI1-WT, während KAI1-SP diese reduzierte (Karle et al., unveröffentlichte Daten). Weitere mögliche Ursachen bzw. Mechanismen könnten eine, durch den strukturellen Unterschied bedingte, abweichende physikalische Wechselwirkung der KAI1-Proteine mit Integrinen sein sowie ein veränderter Einfluss auf die Expression der Adhäsionsrezeptoren. Zudem besteht auch die Möglichkeit, dass KAI1-WT und KAI1-SP durch unterschiedliche Regulierung anderer an der Migration beteiligten Moleküle, wie zum Beispiel intrazelluläre Signalmoleküle, die Motilität beeinflussen. Neben der Analyse der zellulären Motilität im Rahmen einer Interaktion mit Integrinen, speziell dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , wurde in der Arbeit die physikalische Wechselwirkung von KAI1-WT und KAI1-SP mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül E-Cadherin im Hinblick auf potentielle Unterschiede in OV-MZ-6-Zellen untersucht. Auch für E-Cadherin wurde bereits im Vorfeld eine Interaktion mit KAI1-WT beschrieben, die mit einer Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten in malignen Zellen einherging und die Disseminierung reduzierte (Abe et al., 2008). Im Rahmen von Koimmunpräzipitationsstudien und immunzytochemischer Doppelfärbung konnte ebenso in OV-MZ-6-Zellen eine Wechselwirkung von KAI1-WT und E-Cadherin nachgewiesen werden. Diese war für KAI1-SP wesentlich geringer ausgeprägt, was vermuten lässt, dass die beiden KAI1-Proteine auch einen abweichenden Einfluss auf die interzelluläre Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen haben. Insgesamt ließen sich somit im Rahmen der vorliegenden Studien differentielle funktionelle Eigenschaften von KAI1-WT und KAI1-SP bei der Tumorbologie des Ovarialkarzinoms charakterisieren. Während für KAI1-WT erneut eine Rolle als Metastasierungssuppressor gezeigt werden konnte, ergaben sich für KAI1-SP Hinweise auf eine metastasierungsfördernde Funktion. Diese Einblicke in die Mechanismen, die den veränderten zellulären Eigenschaften im Rahmen der Metastasierung zugrunde liegen, könnten eine Bedeutung für die prognostische Aussage beim Ovarialkarzinom haben und in Hinblick auf zukünftige therapeutische Optionen von Nutzen sein. Es existieren bereits Studien mit dem Ziel die Standardtherapie des Ovarialkarzinoms auf molekularbiologischer Ebene zu erweitern. Sowohl die Reexpression als auch die Hemmung von Molekülen stellen hierbei Ansätze dar. Für die Entwicklung eines geeigneten therapeutischen Konzepts bedarf es jedoch noch weiterer Forschung.

## 6 Literaturverzeichnis

### 6.1 Zeitschriftenartikel

Abe M, Sugiura T, Takahashi M, Ishii K, Shimoda M, Shirasuna K (2008). A novel function of CD82/KAI-1 on E-cadherin-mediated homophilic cellular adhesion of cancer cells. *Cancer Lett* 266:163-170.

Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 107:3655-3663.

Adachi M, Taki T, Ieki Y, Huang CL, Higashiyama M, Miyake M (1996). Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 56:1751-1755.

Allman R, Cowburn P, Mason M (2000). In vitro and in vivo effects of a cyclic peptide with affinity for the alpha(nu)beta3 integrin in human melanoma cells. *Eur J Cancer* 36:410-422.

Angelisová P, Hilgert I, Horejsí V (1994). Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics* 39:249-256.

Anthis NJ und Campbell ID (2011). The tail of integrin activation. *Trends Biochem Sci* 36:191-198.

Auzzas L, Zanardi F, Battistini L, Burreddu P, Carta P, Rassu G, Curti C, Casiraghi G (2010). Targeting alphavbeta3 integrin: design and applications of mono- and multifunctional RGD-based peptides and semipeptides. *Curr Med Chem* 17:1255-1299.

Bandyopadhyay S, Zhan R, Chaudhuri A, Watabe M, Pai SK, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Takano Y, Saito K, Pauza ME, Hayashi S, Wang Y, Mohinta S, Mashimo T, Iizumi M, Furuta E, Watabe K (2006). Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat Med* 12:933-938.

Bari R, Zhang YH, Zhang F, Wang NX, Stipp CS, Zheng JJ, Zhang XA (2009). Transmembrane interactions are needed for KAI1/CD82-mediated suppression of cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol* 174:647-660.

Bartolazzi A, Kaczmarek J, Nicolo G, Risso AM, Tarone G, Rossino P, Defilippi P, Castellani P (1993). Localization of the alpha 3 beta 1 integrin in some common epithelial tumors of the ovary and in normal equivalents. *Anticancer Res* 13:1-11.

Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2:84-89.

Baum B und Georgiou M (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol* 192:907-917.

Belvisi L, Riccioni T, Marcellini M, Vesce L, Chiarucci I, Efrati D, Potenza D, Scolastico C, Manzoni L, Lombardo K, Stasi MA, Orlandi A, Ciucci A, Nico B, Ribatti D, Giannini G, Presta M, Carminati P, Pisano C (2005). Biological and molecular properties of a new  $\alpha(v)\beta3/\alpha(v)\beta5$  integrin antagonist. *Mol Cancer Ther* 4:1670-1680.

Berditchevski F und Odintsova E (1999). Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol* 146:477-492.

Berditchevski F (2001). Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 114:4143-4151.

Berditchevski F, Gilbert E, Griffiths MR, Fitter S, Ashman L, Jenner SJ (2001). Analysis of the CD151- $\alpha3\beta1$  integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis. *J Biol Chem* 276:41165-41174.

Berditchevski F, Odintsova E, Sawada S, Gilbert E (2002). Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of  $\alpha3\beta1$  integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem* 277:36991-37000.

Berger JC, Vander Griend DJ, Robinson VL, Hickson JA, Rinker-Schaeffer CW (2005). Metastasis suppressor genes: from gene identification to protein function and regulation. *Cancer Biol Ther* 4:805-812.

Bienstock RJ und Barrett JC (2001). KAI1, a prostate metastasis suppressor: prediction of solvated structure and interactions with binding partners: integrins, cadherins, and cell-surface receptor proteins. *Mol Carcinog* 32:139-153.

Birchmeier W und Behrens J (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198:11-26.

Bottini C, Miotti S, Fiorucci S, Facheris P, Menare S, Colnaghi MI (1993). Polarization of the  $\alpha6\beta4$  integrin in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 54:261-267.

Boucheix C, Duc GH, Jasmin C, Rubinstein E (2001). Tetraspanins and malignancy. *Expert Rev Mol Med* 2001:1-17.

Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA (1994a). Requirement of vascular integrin  $\alpha v \beta 3$  for angiogenesis. *Science* 264:569-571.

Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA (1994b). Integrin  $\alpha v \beta 3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79:1157-1164.

Cai W und Chen X (2006). Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin  $\alpha v \beta 3$  antagonism. *Anticancer Agents Med Chem* 6:407-428.

Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA, Rogatto SR (2006). CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC Cancer* 6:48.

Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG (2013). E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci* 126:393-401.

Cannistra SA, Ottensmeier C, Niloff J, Orta B, Dicarolo J (1995). Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecol Oncology* 58:261-225.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2:76-83.

Carreiras F, Lehmann M, Sichel F, Marvaldi J, Gauduchon P, LeTalaër JY (1995). Implication of the alpha v beta 3 integrin in the adhesion of the ovarian-adenocarcinoma cell line IGROV1. *Int J Cancer* 63:530-536.

Carreiras F, Rigot V, Cruet S, André F, Gauduchon P, Marvaldi J (1999). Migration properties of the human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1: importance of alpha(v)beta3 integrins and vitronectin. *Int J Cancer* 80:285-294.

Charrin S, Manié S, Oualid M, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E (2002). Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett* 516:139-144.

Charrin S, le Naour F, Silvie O, Milhiet PE, Boucheix C, Rubinstein E (2009). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* 420:133-154.

Chen QY, Lin XM, Zhou JY, An Z, Yang L, Jiang ZY (2004a). Relationship between the levels of KAI1/CD82 and CD44 and the clinicopathological features of non-small cell lung cancer. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 27:101-104.

Chen Z, Mustafa T, Trojanowicz B, Brauckhoff M, Gimm O, Schmutzler C, Köhrle J, Holzhausen HJ, Kehlen A, Klonisch T, Finke R, Dralle H, Hoang-Vu C (2004b). CD82, and CD63 in thyroid cancer. *Int J Mol Med* 14:517-527.

Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes RO (1998). Integrin-mediated Signals Regulated by Members of the Rho Family of GTPases. *J Cell Biol* 142:573-586.

Cooper CR, Chay CH, Pienta KJ (2002). The role of alpha(v)beta(3) in prostate cancer progression. *Neoplasia* 4:191-194.

Correale P, Cerretani D, Remondo C, Martellucci I, Marsili S, La Placa M, Sciandivasci A, Paolelli L, Pascucci A, Rossi M, Di Bisceglie M, Giorgi G, Gotti G, Francini G (2006). A novel metronomic chemotherapy regimen of weekly platinum and daily oral etoposide in high-risk non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep* 16:133-140.

Correale P, Botta C, Basile A, Pagliuchi M, Licchetta A, Martellucci I, Bestoso E, Apollinari S, Addeo R, Misso G, Romano O, Abbruzzese A, Lamberti M, Luzzi L, Gotti G, Rotundo

- MS, Caraglia M, Tagliaferri P (2011). Phase II trial of bevacizumab and dose/dense chemotherapy with cisplatin and metronomic daily oral etoposide in advanced non-small-cell-lung cancer patients. *Cancer Biol Ther* 12:112-118.
- Cruet S, Salsmanca C, Mitchell GWE, Aersperg N (1999).  $\alpha\beta 3$  and vitronectin expression by normal ovarian surface epithelial cells: role in cell adhesion and cell proliferation. *Gynecol Oncol* 75: 254-260.
- Dang D, Bamburg JR, Ramos DM (2006).  $\alpha v \beta 3$  integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion. *Exp Cell Res* 312:468-477.
- Danhier F, Le Breton A, Pr at V (2012). RGD-based strategies to target  $\alpha(v) \beta(3)$  integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol Pharm* 9:2961-2973.
- Daniel JM und Reynolds AB (1997). Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays* 19:883-891.
- Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* 163:525-534.
- Deissler H, Kuhn EM, Lang GE, Deissler H (2007). Tetraspanin CD9 is involved in the migration of retinal microvascular endothelial cells. *Int J Mol Med* 20:643-652.
- Desgrosellier JS und Cheresh DA (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10:9-22.
- Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ischikawa T, Isaacs JT, Barrett JC (1995). KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 268:884-886.
- Eliceiri BP und Cheresh DA (1999). The role of  $\alpha v$  integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *L Clin Invest* 103:1227-1230.
- Eliceiri BP und Cheresh DA (2000). Role of  $\alpha v$  integrins during angiogenesis. *Cancer J* 6:245-249.
- Elie N, Tran KT, Herlin P, Joly F, Denoux J, Crout H, et al. (2003). Prognostic significance of tumor vascularization on survival of patients with ovarian carcinoma, *Proc. Am. Soc. Clin. Onc.*, 22:462.
- El Touny LH und Banerjee PP (2007). Genistein induces the metastasis suppressor kangai-1 which mediates its anti-invasive effects in TRAMP cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361:169-175.
- Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, Ferreira VM, Lopes CS (2004). Association of E-cadherin and beta-catenin immunoexpression with clinicopathologic features in primary ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 35:663-639.

Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, Hughes PE, Pampori N, Shattil SJ, Saven A, Mueller BM (2001). Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U SA* 98:1853-8.

Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, Hensler M (2002). Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 19:427-436.

Felding-Habermann B (2003). Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 20:203-213.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*, 113:173-185.

Fujioka T, Takebayashi Y, Kihana T, Kusanagi Y, Hamada K, Ochi H, Uchida T, Fukumoto M, Ito M (2001). Expression of E-cadherin and beta-catenin in primary and peritoneal metastatic ovarian carcinoma. *Oncol Rep.* 8:249-255.

Gailit J und Ruoslahti E (1988). Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *J Biol Chem* 263:12927-12933.

Gardner MJ, Jones LM, Catterall JB, Turner GA (1995). Expression of cell adhesion molecules on ovarian tumour cell lines and mesothelial cells, in relation to ovarian cancer metastasis. *Cancer Lett* 91:229-234.

Giancotti FG und Ruoslahti E (1999). Integrin signalling. *Science* 285:1028-1032.

Gladson CL, Cheresch DA (1991). Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest* 88:1924-32.

Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A (1988). The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol* 107:1575-1587.

Gumbiner BM (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357.

Gumbiner BM (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:622-634.

Guo X, Friess H, Graber HU, Kashiwagi M, Zimmermann A, Korc M, Büchler MW (1996). KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases. *Cancer Res* 56:4876-4880.

Guo XZ, Friess H, Di Mola FF, Heinicke JM, Abou-Shady M, Graber HU, Baer HU, Zimmermann A, Korc M, Büchler MW (1998). KAI1, a new metastasis suppressor gene, is reduced in metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 28:1481-1488.

Guo XZ, Xu JH, Liu MP, Kleeff J, Ho CK, Ren LN, Li HY, Königer J, Cui ZM, Wang D, Wu CY, Zhao JJ, Friess H (2005). KAI1 inhibits anchorage-dependent and -independent pancreatic cancer cell growth. *Oncol Rep* 14:59-63.

Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, Watkins JD, Huse WD, Bodkin DJ, Cheresch DA (2006). Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *Clin Cancer Res* 6:3056-3061.

Hall A (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33:891-895.

Handschuh G, Candidus S, Lubert B, Reich U, Schott C, Oswald S, Becke H, Hutzler P, Birchmeier W, Höfler H, Becker KF (1999). Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 18:4301-4312.

Handschuh G, Lubert B, Hutzler P, Höfler H, Becker KF (2001). Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences. *J Mol Biol* 314:445-454.

Hapke S, Kessler H, Arroyo de Prada N, Bengel A, Schmitt M, Lengyel E, Reuning U (2001). Integrin  $\alpha$ (v) $\beta$ (3)/vitronectin interaction affects expression of the urokinase system in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 276:26340-26348.

Hapke S, Kessler H, Lubert B, Bengel A, Hutzler P, Höfler H, Schmitt M, Reuning U (2003). Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin  $\alpha$ (v) $\beta$ (3)/Vitronectin interaction. *Biol Chem* 384:1073-1083.

He B, Liu L, Cook GA, Grgurevich S, Jennings LK, Zhang XA (2005). Tetraspanin CD82 attenuates cellular morphogenesis through down-regulating integrin  $\alpha$ 6-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* 280:3346-3354.

Hedrick L, Cho KR, Vogelstein B (1993). Cell adhesion molecules as tumour suppressors. *Trends Cell Biol* 3:36-39.

Hemler ME, Mannion BA, Berditchevsky F (1996). Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1287:67-71.

Hemler ME (2001) Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* 155:1103-1107.

Hemler ME (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:397-422.

Heyman L, Kellouche S, Fernandes J, Dutoid S, Poulain L, Carreiras F (2008). Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Tumour Biol* 29:231-244.

Higashiyama M, Kodama K, Yokouchi H, Takami K, Adachi M, Taki T, Ishiguro S, Nakamori S, Yoshie O, Miyake M (1998). KAI1/CD82 expression in nonsmall cell lung

carcinoma is a novel, favorable prognostic factor: an immunohistochemical analysis. *Cancer* 83:466-474.

Hinoda Y, Adachi Y, Takaoka A, Mitsuuchi H, Satoh Y, Itoh F, Kondoh Y, Imai K (1998). Decreased expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in gastric cancer. *Cancer Lett* 129:229-234.

Hirohashi S (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 15:333-339.

Hood JD und Cheresch DA (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2:91-100.

Horton MA (1997). The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *Int J Biochem Cell Biol* 29:721-725.

Horváth G, Serru V, Clay D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E (1998). CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem* 273:30537-30543.

Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R (1994). Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 127:1375-1380.

Hosotani R, Kawaguchi M, Masui T, Koshiba T, Ida J, Fujimoto K, Wada M, Doi R, Imamura M (2002). Expression of integrin alphaVbeta3 in pancreatic carcinoma: relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis. *Pancreas* 25:30-35.

Houle CD, Ding XY, Foley JF, Afshari CA, Barrett JC, Davis BJ (2002). Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol* 86:69-78.

Hu G (2012). p120- Catenin: a novel regulator of innate immunity and inflammation. *Crit Rev Immunol* 32:127-138.

Hülsken J, Birchmeier W, Behrens J (1994). E-Cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 127:2061-2069.

Humphries MJ (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28:311-339.

Hynes RO (1992). Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.

Hynes RO (2002). Integrins: bidirectional allosteric signalling machines. *Cell* 110:673-687.

Ichikawa T, Ichikawa Y, Isaacs JT (1991). Genetic factors and suppression of metastatic ability of prostatic cancer. *Cancer Res* 51:3788-3792.

Imai T und Yoshie O (1993). C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibody inhibitory to syncytium formation by human T cell leucemiavirus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 and CD8 in T cells. *J Immunol* 151:6470-6481.

- Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Yoshie O (1995). Molecular analysis of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J Immunol* 155:1229-1239.
- Imai T, Horiuchi A, Shiozawa T, Osada R, Kikuchi N, Ohira S, Oka K, Konishi I (2004). Elevated expression of E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenins in metastatic lesions compared with primary epithelial ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 35:1469-1476.
- Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA (2001). Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry* 66:1174-1186.
- Jackson P, Kingsley EA, Russell PJ (2000a). Inverse correlation between KAI1 mRNA levels and invasive behaviour in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett* 156:9-17.
- Jackson P, Millar D, Kingsley E, Yardley G, Ow K, Clark S, Russell PJ (2000b). Methylation of a CpG island within the promoter region of the KAI1 metastasis suppressor gene is not responsible for down-regulation of KAI1 expression in invasive cancers or cancer cell lines. *Cancer Lett* 157:169-176.
- Jee BK, Lee LY, Lim Y, Lee KH, Jo YH (2007). Effects of KAI1/CD82 on the beta1 integrin maturation in highly migratory carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 359:703-708.
- Jiang P, Enomoto A, Takahashi M (2009). Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton. *Cancer Lett* 284:122-130.
- Kawanishi J, Kato J, Sasaki K, Fujii S, Watanabe N, Niitsu Y (1995). Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion due to mutation of the beta-catenin gene in a human cancer cell line, HSC-39. *Mol Cell Biol* 15:1175-1181.
- Kim JH, Kim B, Cai L, Choi HJ, Ohgi KA, Tran C, Chen C, Chung CH, Huber O, Rose DW, Sawyers CL, Rosenfeld MG, Baek SH (2005). Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature* 434:921-926.
- Kim TJ, Landen CN, Lin YG, Mangala LS, Lu C, Nick AM, Stone RL, Merritt WM, Armaiz-Pena G, Jennings NB, Coleman RL, Tice DA, Sood AK (2009). Combined anti-angiogenic therapy against VEGF and integrin alphaVbeta3 in an orthotopic model of ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 8:2263-2272.
- Kirchhofer D, Galli J, Ruoslahti E, Grzesiak J, Pierschbacher MD (1990). Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa. *J Biol Chem* 265:18525-18530.
- Kirchhofer D, Grzesiak J, Pierschbacher MD (1991). Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* 266:4471-4477.
- Kitadokoro K, Bordo D, Galli G, Petracca R, Falugi F, Abrignani S, Grandi G, Bolognesi M (2001). CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J* 20:12-18.

Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol* 130:67-77.

Kokenyesi R, Murray KP, Benshushan A, Huntley ED, Kao MS (2003). Invasion of interstitial matrix by a novel cell line from primary peritoneal carcinosarcoma, and by established ovarian carcinoma cell lines: role of cell-matrix adhesion molecules, proteinases, and E-cadherin expression. *Gynecol Oncol* 89:60-72.

Lagaudrière-Gesbert C, Le Naour F, Lebel-Binay S, Billard M, Lemichez E, Boquet P, Boucheix C, Conjeaud H, Rubinstein E (1997). Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cell Immunol* 182:105-112.

Landen CN, Kim TJ, Lin YG, Merritt WM, Kamat AA, Han LY, Spannuth WA, Nick AM, Jennings NB, Kinch MS, Tice D, Sood AK (2008). Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of alphavbeta3 integrin in ovarian cancer. *Neoplasia* 10:1259-1267.

Lauffenburger DA und Horwitz AF (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.

Le Bras GF, Taubenslag KJ, Andl CD (2012). The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adh Migr* 6:365-373.

Lee JH, Seo YW, Park SR, Kim YJ, Kim KK (2003). Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res* 63:7247-7255.

Lee JH, Park SR, Chay KO, Seo YW, Kook H, Ahn KY, Kim YJ, Kim KK (2004). KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin (KITENIN), a member of the tetraspanin family, interacts with KAI1, a tumor metastasis suppressor, and enhances metastasis of cancer. *Cancer Res* 64:4235-4243.

Legate KR, Wickström SA, Fässler R (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev* 23:397-418.

Leroy-Dudal J, Demeilliers C, Gallet O, Pauthe E, Dutoid S, Agniel R, Gauduchon P, Carreiras F (2005a). Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves alphav integrins and the participation of MMP2. *Int J Cancer* 114:531-543.

Leroy-Dudal J, Heyman L, Gauduchon P, Carreiras F (2005b). Adhesion of human ovarian adenocarcinoma IGROV1 cells to endothelial cells is partly mediated by the alphav integrins-vitronectin adhesive system and induces an alteration of endothelial integrity. *Cell Biol Int* 29:482-488.

Levy S und Shoham T (2005a). Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology* 20:218-224.

Levy S und Shoham T (2005b). The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 5:136-148.

Liapis H, Adler LM, Wick MR, Rader JS (1997). Expression of  $\alpha v\beta 3$  integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 28:443-449.

Liu FS, Dong JT, Chen JT, Hsieh YT, Ho ES, Hung MJ (2000). Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 78:10-15.

Liu FS, Chen JT, Dong JT, Hsieh YT, Lin AJ, Ho ES, Hung MJ, Lu CH (2001). KAI1 metastasis suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma. *Am J Pathol* 159:1629-1634.

Liu L, Wu DH, Li ZG, Yang GZ, Ding YQ (2003). Effects of KAI1/CD82 on biological behavior of human colorectal carcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 9:1231-1236.

Lombardi DP, Geradts J, Foley JF, Chiao C, Lamb PW, Barrett JC (1999). Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer. *Cancer Res* 59:5724-5731.

Lozahic S, Christiansen D, Manié S, Gerlier D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E (2000). CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol* 30:900-907.

Lu D, Wang WX, Xu YQ, Jiang QY, Yang Y (2007). Inhibitory effect of KAI1 gene on breast cancer cell growth in vitro. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 29:580-583.

Maecker HT, Todd SC, Levy S (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 11:428-442.

Malik FA, Sanders AJ, Kayani MA, Jiang WG (2009). Effect of expressional alteration of KAI1 on breast cancer cell growth, adhesion, migration and invasion. *Cancer Genomics Proteomics* 6:205-213.

Mannion BA, Berditchevski F, Kraeft SK, Chen LB, Hemler ME (1996). Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associated with integrin alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29). *J Immunol* 157:2039-2047.

Masciopinto F, Campagnoli S, Abrignani S, Uematsu Y, Pileri P (2001). The small extracellular loop of CD81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative HCV receptor. *Virus Res* 80:1-10.

Mashimo T, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, Miura K, Tegtmeyer PJ, Rinker-Shaeffer CW, Watabe K (1998). The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11307-11311.

Mashimo T, Bandyopadhyay S, Goodarzi G, Watabe M, Pai SK, Gross SC, Watabe K (2000). Activation of the tumor metastasis suppressor gene, KAI1, by etoposide is mediated by p53 and c-Jun genes. *Biochem Biophys Res Commun* 274:370-376.

Maurer CA, Graber HU, Friess H, Beyermann B, Willi D, Netzer P, Zimmermann A, Büchler MW (1999). Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases. *Surgery* 126:869-880.

Mela A und Goldman JE (2009). The tetraspanin KAI1/CD82 is expressed by late-lineage oligodendrocyte precursors and may function to restrict precursor migration and promote oligodendrocyte differentiation and myelination. *J Neurosci* 29:11172-11181.

Mitra AK, Sawada K, Tiwari P, Mui K, Gwin K, Lengyel E (2011). Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and  $\alpha(5)\beta(1)$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene* 30:1566-1576.

Miyazaki T, Kato H, Shitara Y, Yoshikawa M, Tajima K, Masuda N, Shouji H, Tsukada K, Nakajima T, Kuwano H (2000). Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 89:955-962.

Mizejewski GJ (1999). Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:124-38.

Möbus V, Gerharz CD, Press U, Moll R, Beck T, Mellin W, Pollow K, Knapstein PG, Kreienberg R (1992). Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 52:76-84.

Moon HS, Choi EA, Park HY, Choi JY, Chung HW, Kim JI, Park WI (2001). Expression and tyrosine phosphorylation of E-cadherin, beta- and gamma-catenin, and epidermal growth factor receptor in cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 81:355-359.

Moro L, Dolce L, Cabodi S, Bergatto E, Boeri Erba E, Smeriglio M, Turco E, Retta SF, Giuffrida MG, Venturino M, Godovac-Zimmermann J, Conti A, Schaefer E, Beguinot L, Tacchetti C, Gaggini P, Silengo L, Tarone G, Defilippi P (2002). Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem* 277:9405-9414.

Morton RA, Ewing CM, Nagafuchi A, Tsukita S, Isaacs WB (1993). Reduction of E-cadherin levels and deletion of the alpha-catenin gene in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 53:3585-3590.

Mousa SA, Mohamed S, Wexler EJ, Kerr JS (2005). Antiangiogenesis and anticancer efficacy of TA138, a novel alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub> antagonist. *Anticancer Res* 25:197-206.

Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380:360-364.

Naora H und Montell DJ (2005). Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer* 5:355-356.

Nelson WJ (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans* 36:149-155.

- Nieset JE, Redfield AR, Jin F, Knudsen KA, Johnson KR, Wheelock MJ (1997). Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *J Cell Sci* 110:1013-1022.
- Nobes CD und Hall A (1995). Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* 23:456-459.
- Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F (2000). Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol* 10:1009-1012.
- Odintsova E, Voortman J, Gilbert E, Berditchevski F (2003). Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *J Cell Sci* 116:4557-4566.
- Okegawa T, Pong RC, Li Y, Hsieh JT (2004). The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol* 51:445-457.
- Ono M, Handa K, Withers DA, Hakomori S (1999). Motility inhibition and apoptosis are induced by metastasis-suppressing gene product CD82 and its analogue CD9, with concurrent glycosylation. *Cancer Res* 59:2335-2339.
- Ono M, Handa K, Withers DA, Hakomori S (2000). Glycosylation effect on membrane domain (GEM) involved in cell adhesion and motility: a preliminary note on functional alpha3, alpha5-CD82 glycosylation complex in Id1D 14 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 279:744-750.
- Overduin M, Harvey TS, Bagby S, Tong KI, Yau P, Takeichi M, Ikura M (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 267:386-389.
- Ow K, Delprado W, Fisher R, Barrett J, Yu Y, Jackson P, Russell PJ (2000). Relationship between expression of the KAI1 metastasis suppressor and other markers of advanced bladder cancer. *J Pathol* 191:39-47.
- Oyama T, Kanai Y, Ochiai A, Akimoto S, Oda T, Yanagihara K, Nagafuchi A, Tsukita S, Shibamoto S, Ito F, et al. (1994). A truncated beta-catenin disrupts the interaction between E-cadherin and alpha-catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. *Cancer Res* 54:6282-6287.
- Ozawa M, Baribault H, Kemler R (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 8:1711-1717.
- Ozawa M, Engel J, Kemler R (1990a). Single amino acid substitutions in one Ca<sup>2+</sup> binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell* 63:1033-1038.
- Ozawa M, Ringwald M, Kemler R (1990b). Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4246-4250.

- Parisini E, Higgins JM, Liu JH, Brenner MB, Wang JH (2007). The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *J Mol Biol* 373:401-411.
- Piedra J, Martinez D, Castano J, Miravet S, Dunach M, de Herreros AG (2001). Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 276:20436-20443.
- Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* 223:1019-1026.
- Porter JC und Hogg N (1998). Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends Cell Biol* 8:390-396.
- Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 14:8333-8342.
- Ria R, Vacca A, Ribatti D, Di Raimondo F, Merchionne F, Dammacco F (2002). Alpha(v)beta(3) integrin engagement enhances cell invasiveness in human multiple myeloma. *Haematologica* 87:836-845.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704-1709.
- Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS (1995). Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8813-8817.
- Rodriguez FJ, Lewis-Tuffin LJ, Anastasiadis PZ (2012). E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1826:23-31.
- Roura S, Miravet S, Piedra J, García de Herreros A, Duñach M (1999). Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 274:36734-36740.
- Rowe A und Jackson P (2006). Expression of KATENIN, a KAI1/CD82 binding protein and metastasis enhancer, in bladder cancer cell lines: relationship to KAI1/CD82 levels and invasive behaviour. *Oncol Rep* 16:1267-1272.
- Ruseva Z, Geiger PX, Hutzler P, Kotzsch M, Lubber B, Schmitt M, Gross E, Reuning U (2009). Tumor suppressor KAI1 affects integrin alphavbeta3-mediated ovarian cancer cell adhesion, motility, and proliferation. *Exp Cell Res* 315:1759-1771.
- Schindl M, Birner P, Breitenecker G, Oberhuber G (2001). Downregulation of KAI1 metastasis suppressor protein is associated with a dismal prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 83:244-248.

Schindl M, Birner P, Bachtary B, Breitenacker G, Selzer E, Oberhuber G (2002). KAI1 metastasis suppressor protein in cervical cancer. *Am J Pathol* 160:1542-1543.

Schmidt C, Künemund V, Wintergerst ES, Schmitz B, Schachner M (1996). CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J Neurosci Res* 43:12-31.

Seigneuret M, Delaguillaumie A, Lagaudrière-Gesbert C, Conjeaud H (2001). Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem* 276:40055-40064.

Semb H und Christofori G (1998). The tumor-suppressor function of E-cadherin. *Am J Hum Genet* 63:1588-1593.

Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Oku N, Miyazawa K, Kitamura N, Takeichi M, Ito F (1994). Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes Commun* 1:295-305.

Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, et al. (1995). Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol* 128:949-957.

Shimoyama Y, Nagafuchi A, Fujita S, Gotoh M, Takeichi M, Tsukita S, Hirohashi S (1992). Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of alpha-catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Res* 52:5770-5774.

Shinohara T, Miki T, Nishimura N, Nokihara H, Hamada H, Mukaida N, Sone S (2001a). Nuclear factor-kappaB-dependent expression of metastasis suppressor KAI1/CD82 gene in lung cancer cell lines expressing mutant p53. *Cancer Res* 61:673-678.

Shinohara T, Nishimura N, Hanibuchi M, Nokihara H, Miki T, Hamada H, Sone S (2001b). Transduction of KAI1/CD82 cDNA promotes hematogenous spread of human lung-cancer cells in natural killer cell-depleted SCID mice. *Int J Cancer* 94:16-23.

Shiozaki H, Kadowaki T, Doki Y, Inoue M, Tamura S, Oka H, Iwazawa T, Matsui S, Shimaya K, Takeichi M, et al. (1995). Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human oesophageal cancer cell line. *Br J Cancer* 71:250-258.

Sho M, Adachi M, Taki T, Hashida H, Konishi T, Huang CL, Ikeda N, Nakajima Y, Kanehiro H, Hisanaga M, Nakano H, Miyake M (1998). Transmembrane 4 superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 79:509-516.

Smith SC und Theodorescu D (2009). Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins. *Nat Rev Cancer* 9:253-264.

Sridhar SC und Miranti CK (2006). Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. *Oncogene* 25:2367-2378.

Staddon JM, Smales C, Schulze C, Esch FS, Rubin LL (1995). p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *J Cell Biol* 130:369-381.

Stipp CS und Hemler ME (2000). Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with alpha 3 beta 1 integrin, and selectively contribute to alpha 3 beta 1-dependent neurite outgrowth. *Cell Sci* 113:1871-1882.

Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci* 28:106-112.

Sundberg C und Rubin K (1996). Stimulation of beta1 integrins on fibroblasts induces PDGF independent tyrosine phosphorylation of PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* 132:741-752.

Sun HC, Tang ZY, Zhou G, Li XM (1998). KAI1 gene expression in hepatocellular carcinoma and its relationship with intrahepatic metastases. *J Exp Clin Cancer Res* 17:307-311.

Szöllösi J, Horejsí V, Bene L, Angelisová P, Damjanovich S (1996). Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J Immunol* 157:2939-2946.

Taga T, Suzuki A, Gonzalez-Gomez I, Gilles FH, Stins M, Shimada H, Barsky L, Weinberg KI, Laug WE (2002). Alpha v-Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int J Cancer* 98:690-697.

Tagawa K, Arihiro K, Takeshima Y, Hiyama E, Yamasaki M, Inai K (1999). Down-regulation of KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 90:970-976.

Takahashi M, Sugiura T, Abe M, Ishii K, Shirasuna K (2007). Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD82 affects cancer cell migration. *Int J Cancer* 121:1919-1929.

Takaoka A, Hinoda Y, Satoh S, Adachi Y, Itoh F, Adachi M, Imai K (1998). Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene* 16:1443-1453.

Takeda T, Hattori N, Tokuhara T, Nishimura Y, Yokoyama M, Miyake M (2007). Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model. *Cancer Res* 67:1744-1749.

Takeichi M (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 5:806-811.

Takeichi M (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7:619-627.

Telese F, Bruni P, Donizetti A, Gianni D, D'Ambrosio C, Scaloni A, Zambrano N, Rosenfeld MG, Russo T (2005). Transcription regulation by the adaptor protein Fe65 and the nucleosome assembly factor SET. *EMBO Rep* 6:77-82.

- Uzawa K, Ono K, Suzuki H, Tanaka C, Yakushiji T, Yamamoto N, Yokoe H, Tanzawa H (2002). High prevalence of decreased expression of KAI1 metastasis suppressor in human oral carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 8:828-835.
- Van der Flier A und Sonnenberg A (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305:285-298.
- Vellon L, Menendez JA, Lupu R (2006). A bidirectional "alpha(v)beta(3) integrin-ERK1/ERK2 MAPK" connection regulates the proliferation of breast cancer cells. *Mol Carcinog* 45:795-804.
- Vicente-Manzanares M, Choi CK, Horwitz AR (2009). Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci* 122:199-206.
- Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66:107-119.
- Voutilainen KA, Anttila MA, Sillanpää SM, Ropponen KM, Saarikoski SV, Juhola MT, Kosma VM (2006). Prognostic significance of E-cadherin-catenin complex in epithelial ovarian cancer. *J Clin Pathol* 59:460-467.
- Wang WS, Yu SL, Yang XS, Chang SD, Hou JQ (2013). Expression and Significance of Twist and E-cadherin in Ovarian Cancer Tissues. *Asian Pac J Cancer Prev* 14:669-672.
- Watabe-Uchida M, Uchida N, Imamura Y, Nagafuchi A, Fujimoto K, Uemura T, Vermeulen S, van Roy F, Adamson ED, Takeichi M (1998). alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol* 142:847-857.
- Wechsel HW, Petri E, Feil G, Nelde HJ, Bichler KH, Loesr W (1999). Renal cell carcinoma: immunohistological investigation of expression of the integrin alpha v beta 3. *Anticancer Res* 19:1529-1532.
- Weiss EE, Kroemker M, Rüdiger AH, Jockusch BM, Rüdiger M (1998). Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol* 141:755-764.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR (2008). Cadherin switching. *J Cell Sci* 121:727-735.
- Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M (2000). E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 87:992-1005.
- Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80:1529-1537.
- Wu Q, Ji Y, Zhang MQ, Chen YQ, Chen F, Shi DL, Zheng ZH, Huang YJ, Su WJ (2003). Role of tumor metastasis suppressor gene KAI1 in digestive tract carcinomas and cancer cells. *Cell Tissue Res* 314:237-249.

- Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Yhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha v \beta 3$ . *Science* 294:339-345.
- Xu JH, Guo XZ, Ren LN, Shao LC, Liu MP (2008). KAI1 is a potential target for anti-metastasis in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 14:1126-1132.
- Yamamoto K, Murae M, Yasuda M (1991). RGD-containing peptides inhibit experimental peritoneal seeding of human ovarian cancer cells. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 43:1687-1692.
- Yang JM, Peng ZH, Si SH, Liu WW, Luo YH, Ye ZY (2008). KAI1 gene suppresses invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells in vitro and in animal models. *Liver Int* 28:132-139.
- Yang X, Welch DR, Phillips KK, Weissman BE, Wei LL (1997). KAI1, a putative marker for metastatic potential in human breast cancer. *Cancer Lett* 119:149-155.
- Yang X, Wei L, Tang C, Slack R, Montgomery E, Lippman M (2000). KAI1 protein is down-regulated during the progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res* 6:3424-3429.
- Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME (2001). Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res* 61:5284-5288.
- Yang X, Claas C, Kraeft SK, Chen LB, Wang Z, Kreidberg JA, Hemler ME (2002). Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell* 13:767-781.
- Yauch RL, Kazarov AR, Desai B, Lee RT, Hemler ME (2000). Direct extracellular contact between integrin  $\alpha(3)\beta(1)$  and TM4SF protein CD151. *J Biol Chem* 275:9230-9238.
- Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S (1995). Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7416-7419.
- Yuecheng Y, Hongmei L, Xiaoyan X (2006). Clinical evaluation of E-cadherin expression and its regulation mechanism in epithelial ovarian cancer. *Clin Exp Metastasis* 23:65-74.
- Yu Y, Yang JL, Markovic B, Jackson P, Yardley G, Barrett J, Russell PJ (1997). Loss of KAI1 messenger RNA expression in both high-grade and invasive human bladder cancers. *Clin Cancer Res* 3:1045-1049.
- Zhang F, Kotha J, Jennings LK, Zhang XA (2009). Tetraspanins and vascular functions. *Cardiovasc Res* 83:7-15.
- Zhang K und Chen J (2012). The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr* 6:20-29.

Zhang XA, Bontrager AL, Hemler ME (2001). Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem* 276:25005-25013.

Zhang XA, He B, Zhou B, Liu L (2003a). Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration. *J Biol Chem* 278:27319-27328.

Zhang XA, Lane WS, Charrin S, Rubinstein E, Liu L (2003b). EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res* 63:2665-2674.

Zhou B, Liu L, Reddivari M, Zhang XA (2004). The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity. *Cancer Res* 64:7455-7463.

## 6.2 Buchbeiträge

Burges A, Anthuber C, Schelling M, Stieber P (2010). Früherkennung und Diagnostik. In: *Manual Maligne Ovarialtumoren - Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, Schmalfeldt B (Hrsg), W. Zuckerschwerdt Verlag, München, 9.Auflage, 11.

Engel J, Schlesinger-Raab A, Schubert-Fritschle G, Schmalfeldt B (2010). Epidemiologie. In: *Manual Maligne Ovarialtumoren - Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, Schmalfeldt B (Hrsg), W. Zuckerschwerdt Verlag, München, 9.Auflage, 1.

Mayr D, Dettmar P, Schmalfeldt B, Schwarz-Böger U (2010). Histologische Klassifikation maligner und potentiell maligner Ovarialtumoren, Stadieneinteilung und Prognosefaktoren. In: *Manual Maligne Ovarialtumoren - Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, Schmalfeldt B (Hrsg), W. Zuckerschwerdt Verlag, München, 9.Auflage, 21-24.

Netzker R (2006). Genexpression. In: *Duale Reihe Biochemie*, Bob A und Bob K (Hrsg), Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, 444 und 460-463.

Schmalfeldt B, Anthuber C, Ataseven B, Bauernfeind I, Burges A, Höß C, Kaiser C, Kolben M, Oberlechner E, Rehbock J, Schwörer M (2010). Operative Primärtherapie. In: *Manual Maligne Ovarialtumoren - Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, Schmalfeldt B (Hrsg), W. Zuckerschwerdt Verlag, München, 9.Auflage, 35.

Schwarz-Böger U, Meidl A, Kiechle M, Anthuber C (2010). Hereditäres Ovarialkarzinom. In: *Manual Maligne Ovarialtumoren - Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, Schmalfeldt B (Hrsg), W. Zuckerschwerdt Verlag, München, 9.Auflage, 27.

### **6.3 Internetquellen**

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 ([http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)). Stand: 31.03.2014.

Young SA, Graf R, Stupack DG (2013). Neuroblastoma integrins (<http://www.intechopen.com/books/neuroblastoma/neuroblastoma-integrins>). Stand: 31.03.2014.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ute Reuning, die mich über den gesamten Zeitraum meiner Arbeit betreut und begleitet hat. Ihre fachlich kompetente Beratung und auch die menschlich angenehme Zusammenarbeit waren für mich eine große Unterstützung und trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität München anfertigen zu können.

Für die fachkundige Einführung in die praktische Laborarbeit und die beständige hilfreiche und aufmunternde Unterstützung danke ich Frau Anke Bengel.

Bei all meinen Kolleginnen und Kollegen in der Klinischen Forschergruppe möchte ich mich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre stetige Hilfsbereitschaft bedanken. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an Alexandra Karle für die moralische Unterstützung und die aufbauenden Gespräche.

Große Teile der experimentellen Arbeit wurden am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München am Helmholtz Zentrum München angefertigt. Hier möchte ich mich für die Bereitstellung des CLSM sowie die freundliche und hilfreiche Betreuung bedanken.

Für die Einarbeitung in die Arbeit mit dem CLSM und in die Auswertung der gewonnenen Daten danke ich zudem Pamina Geiger.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für die Ermöglichung meiner Ausbildung und die stetige Unterstützung.