

Die Rolle des Fibronektins bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Norman J. Hackl

geboren am 09.12.1978 in Mainz

Mainz, 2010

Dekan: *

1. Berichterstatterin: *

2. Berichterstatter: *

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2010

*personenbezogene Angaben sind aus Datenschutzgründen aus dieser elektronischen Version entfernt worden

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikationen:

Hackl N., Bersch C., Feick P., Antoni C., Franke A., Singer M. V., Nakchbandi I. A.
„Circulating Fibronectin Isoforms Predict the Degree of Fibrosis in Chronic Hepatitis C“
Scand J Gastroenterol. 2010, *in press.*

Kawelke N., Bentmann A., **Hackl N.**, Hager H. D., Feick P., Geursen A., Singer M. V.,
Nakchbandi I. A. „An Isoform of Fibronectin Mediates Bone Loss in Patients with Primary Biliary
Cirrhosis by Suppressing Bone Formation“ *J Bone Miner Res* 2008, 23(8):1278-1286.

Tagungsbeiträge:

10/2009 **Hackl N.**, von Au A., Vasel M., Tiwari S., Cecchini M. G., Nakchbandi I. A.
Vortrag „The Role of Fibronectin in the Bone Marrow Metastatic Niches“
CABS, Arlington *The IX International Meeting on Cancer Induced Bone Disease*
Virginia, USA

09/2009 **Hackl N.**, von Au A., Bentmann A., Cecchini M. G., Nakchbandi I. A.
Plenary Poster „Fibronectin Modulates Breast Cancer Metastasis“
ASBMR, Denver *The American Society for Bone and Mineral Research 31st Annual Meeting*
Colorado, USA

03/2009 **Hackl N.**, von Au A., Bentmann A., Cecchini M. G., Tiwari S., Glüer S.,
Poster Nakchbandi I. A.
Osteologie, „Fibronectin beeinträchtigt die Knochenmetastasenbildung durch seinen
Frankfurt am Main Einfluss auf die Gefäßbildung und SDF-1“

Auszeichnung: **Posterpreis für das beste Poster aus dem Gebiet der
Grundlagenforschung (Deutsche Gesellschaft für Osteologie e.V.)**

05/2008 Kawelke N., Bentmann A., **Hackl N.**, Nakchbandi I. A.
Poster „Bone Loss in Patients with Primary Biliary Cirrhosis is Caused by a Fibro-
ECTS, Barcelona nectin Isoform“
Spanien *35th European Symposium on Calcified Tissues*

09/2007

Vortrag

ASBMR, Honolulu
Hawaii, USA

Kawelke N., Bentmann A., **Hackl N.**, Feick P., Singer M. V.,
Nakchbandi I. A.

„An Isoform of Fibronectin is Responsible for Decreased Bone Formation
Patients with Primary Biliary Cirrhosis and this Effect is not Exclusively
Mediated by beta1 Integrins“

The American Society for Bone and Mineral Research 30st Annual Meeting

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	VIII-X
I. Einleitung.....	1
I.1. Das Fibronectin	1
I.1.1. Struktur des Fibronectins	1
I.1.2. Die Isoformen des Fibronectins.....	2
I.1.2.1. Alternatives Spleißen der Fibronectin prä-mRNA	3
I.1.2.2. Posttranslationale Modifikationen	3
I.1.2.3. Bedeutung der Fibronectin-Isoformen für den Organismus	4
I.1.2.3.1. Die EDA-Domäne	4
I.1.2.3.2. Die EDB-Domäne	5
I.1.2.3.3. Die variable Region.....	6
I.1.3. Aufgaben und Funktion des Fibronectins	6
I.1.3.1. Fibronectin-Zell Interaktionen.....	6
I.1.3.2. Antiapoptotische Wirkungsweise von Fibronectin	7
I.1.3.3. Matrixbildung.....	8
I.1.3.3.1. Aufbau eines funktionalen Fibronectin-Netzwerkes	8
I.1.3.3.2. Einfluss von Fibronectin auf die Wundheilung und Hämostase	8
I.2. Krebserkrankungen.....	9
I.2.1. Einführung und Begriffsbestimmung	9
I.2.2. Krebs – eine genetische Erkrankung auf zellulärer Ebene.....	9
I.2.3. Schlüsselmerkmale von Krebserkrankungen	10
I.3. Die Rolle von Fibronectin bei Krebserkrankungen	11
I.3.1. Die metastatische Kaskade.....	12
I.3.1.1. Abtrennung vom Zellkollektiv	13
I.3.1.2. Invasion.....	14
I.3.1.3. Migration	14
I.3.1.4. Intravasation	15
I.3.1.5. Zirkulation und Extravasation der Tumorzellen	15
I.3.1.5.1. Tumorzell-Zell Interaktionen.....	16
I.3.1.5.2. Mechanismus der Endothel-Adhäsion	16

I.3.1.6.	Die metastatische Kolonisierung.....	17
I.3.1.7.	Die Mikrometastase	17
I.3.1.8.	Die Makrometastase	18
I.3.1.8.1.	Die Angiogenese.....	18
I.3.2.	Mechanismen der organspezifischen Metastasierung	22
I.3.2.1.	Metastasierung anatomisch benachbarter Organe	22
I.3.2.2.	Strukturelle Eigenschaften der Kapillarwände.....	22
I.3.2.3.	Rolle des Lymphgefäßsystems bei der Metastasierung.....	23
I.3.2.4.	Adhäsion an Endothel	24
I.3.2.5.	Genexpressionsprofile korrelieren mit der Organspezifität.....	24
I.3.2.6.	Chemokinrezeptor vermittelte Chemotaxis	25
I.3.2.7.	Interaktionen mit der Mikroumgebung.....	25
I.3.2.7.1.	Modellierung der Mikroumgebung.....	26
I.3.3.	Das metastatische Nischen-Modell	29
I.3.3.1.	Die Stammzellnische im Knochenmark.....	29
I.3.3.2.	Die metastatische Nische.....	30
I.3.3.2.1.	Initiierung der prämetastatischen Nische	30
I.3.3.2.2.	Etablierung der Nische für das Tumorwachstum	31
I.3.3.2.3.	Die Rolle der extrazellulären Matrix	32
I.3.3.3.	Besondere Stellung des Knochenmarks	34
I.4.	Spontane Tumorregression.....	34
I.5.	Konditionelle Fibronektin-Knockoutmäuse	36
I.6.	Zielsetzung der Arbeit.....	38
II.	Material und Methoden	39
II.1.	Materialien.....	39
II.1.1.	Herstellerverzeichnis	39
II.1.2.	Laboraausstattung	41
II.1.3.	Verbrauchsmaterial	42
II.1.4.	Chemikalien	43
II.1.5.	Puffer, Medien und Reagenzien.....	44
II.1.6.	Antikörper.....	47
II.1.6.1.	Primärantikörper	47
II.1.6.2.	Sekundärantikörper.....	47
II.1.7.	Enzyme	47
II.1.8.	Synthetische Oligonukleotide	48

II.2. Methoden	48
II.2.1. Tierexperimentelle Methoden.....	48
II.2.1.1. Verwendete Mausstämme	48
II.2.1.1.1. Immundefiziente, athymische Nacktmäuse	49
II.2.1.2. Konditionelle Knockout-Mäuse.....	49
II.2.1.2.1. MxCre-Linie	49
II.2.1.2.2. ColCre-Linie.....	49
II.2.1.3. Intraperitoneal verabreichte Injektionen	50
II.2.1.3.1. Induktion des Mx-Promotors.....	50
II.2.1.3.2. Anästhesie von Versuchstieren	50
II.2.1.3.3. Luciferin Applikation.....	50
II.2.1.4. <i>Xenotransplantat</i> -Metastasierungsmodell	51
II.2.1.4.1. Intrakardiale Applikation humaner Tumorzellen.....	51
II.2.1.4.2. Biolumineszenz-Bildgebung	51
II.2.1.4.3. Detektion von Knochen-Läsionen mittels Radiographie	52
II.2.1.4.4. Tötung von Mäusen und Probenentnahme.....	53
II.2.1.5. Versuchstierhaltung	54
II.2.2. Zellexperimentelle Methoden	54
II.2.2.1. Verwendete Zelllinien.....	54
II.2.2.1.1. MDA-MB-231B/luc ⁺	54
II.2.2.1.2. PC-3M-Pro4/luc ⁺	55
II.2.2.2. Kultivierung der Zellen	55
II.2.2.3. Bestimmung der Zellzahl.....	56
II.2.2.4. Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen.....	56
II.2.2.5. Lentivirale Transduktion humaner Tumorzellen	57
II.2.2.5.1. Puromycin-Titration.....	59
II.2.2.5.2. Selektion stabiler Klone	59
II.2.2.5.3. Isolierung von Einzelkolonien	59
II.2.2.5.4. Analyse der Fibronectin spezifischen Knockdown-Effizienz	60
II.2.2.6. Vorbereitung von Tumorzellen für die intrakardiale Applikation	60
II.2.2.7. Isolation von Leukozyten aus der Milz	61
II.2.2.8. Durchflusszytometrie	61
II.2.2.9. Chromfreisetzungstest	62
II.2.2.9.1. Vorbereitung der Zielzellen.....	62
II.2.2.9.2. Zellvermittelte Lyse.....	62
II.2.3. Molekularbiologische Methoden.....	63
II.2.3.1. Isolierung und Aufreinigung von genomischer DNA.....	63
II.2.3.2. PCR-Analyse zur Genotypisierung der isolierten DNA	63
II.2.3.3. DNA-Analyse mittels Gelelektrophorese	64

II.2.3.4.	Restriktionsverdau von DNA zur Bestimmung des <i>nude</i> Genotyps	65
II.2.3.5.	Nachweis von Mycoplasmen mittels PCR.....	65
II.2.4.	Biochemische Methoden	66
II.2.4.1.	Detektion und Analyse von Proteinen	66
II.2.4.1.1.	Herstellung von Proteinextrakten.....	66
II.2.4.1.2.	Herstellung von Knochen- und Knochenmarkslysaten	66
II.2.4.1.3.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	67
II.2.4.1.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	67
II.2.4.1.5.	Protein-Blotting	68
II.2.4.1.6.	Immundetektion von Proteinen nach dem Western-Blotting.....	68
II.2.4.2.	Isolation von Fibronectin über eine Gelatine-Sepharose-Säule	69
II.2.4.3.	Fibronectin-Depletion des fetalen Kälberserums	69
II.2.4.4.	Proteinkonzentrierung und Dialyse	70
II.2.4.5.	Immunoassays.....	70
II.2.4.5.1.	Gesamtfibronectin-ELISA	70
II.2.4.5.2.	Zellproliferations-ELISA.....	71
II.2.4.5.3.	Zell-Adhäsions-Array	71
II.2.4.6.	Histologische Untersuchungen an Tumorgeweben.....	72
II.2.4.6.1.	Entkalkifizierung der Knochentumore	72
II.2.4.6.2.	Immunhistochemie.....	72
II.2.5.	Statistische Auswertung	73
III.	Ergebnisse.....	74
III.1.	Induktion von Knochenmetastasen	74
III.1.1.	Verifizierung einer erfolgreichen intrakardialen Injektion.....	74
III.1.2.	Quantifizierung osteolytischer Läsionen.....	75
III.2.	Einfluss von Fibronectin der Mikroumgebung auf die Etablierung und das Wachstum von Knochenmetastasen	76
III.2.1.	Die Rolle des Fibronectins der Blutzirkulation und des Knochenmarks bei der Metastasierung.....	77
III.2.1.1.	Ausschaltung des Plasmafibronectins in konditionellen Knockoutmäusen	77
III.2.1.2.	Beweis der Ausschaltung des Fibronectins im Knochenmark.....	78
III.2.1.3.	Überlebensraten	78
III.2.1.4.	Anzahl gebildeter Metastasen.....	80
III.2.1.5.	Gesamtumorbelastung.....	81
III.2.1.6.	Tumorstadium	82

III.2.1.7.	Radiographische Analyse osteolytischer Läsionen	83
III.2.1.8.	Untersuchung der mikrovaskulären Gefäßdichte	83
III.2.1.9.	Verifizierung der Ergebnisse unter Verwendung eines Prostatakarzinoms.....	85
III.2.2.	Die Rolle des Fibronektins der osteoblastischen Nische bei der Metastasierung	86
III.2.2.1.	Überlebensraten	87
III.2.2.2.	Anzahl gebildeter Metastasen	88
III.2.2.3.	Gesamttumorbelastung.....	89
III.2.2.4.	Tumorwachstum	90
III.2.2.5.	Radiographische Analyse osteolytischer Läsionen	92
III.2.2.6.	Untersuchungen der mikrovaskulären Gefäßdichte	92
III.3.	Einfluss von tumorzellspezifischem Fibronektin auf die Etablierung und das Wachstum von Knochenmetastasen	93
III.3.1.	Ausschaltung der endogenen Fibronektinexpression.....	93
III.3.1.1.	Morphologische Untersuchungen transduzierter Zellen	96
III.3.1.2.	<i>In vitro</i> Bestimmung der Zellproliferation und Zellviabilität	97
III.3.1.3.	Analyse der Luciferase-Expression.....	99
III.3.1.4.	Charakterisierung der Adhäsionseigenschaften der Tumorzellen.....	100
III.3.2.	Die Rolle des Tumorzell-Fibronektins bei der Metastasierung	102
III.3.2.1.	Überlebensraten	102
III.3.2.2.	Anzahl gebildeter Metastasen.....	103
III.3.2.3.	Gesamttumorbelastung.....	105
III.3.2.4.	Tumorwachstum	105
III.3.2.5.	Radiographische Analyse osteolytischer Läsionen	106
III.3.2.6.	Untersuchung der mikrovaskulären Gefäßdichte	107
III.3.2.7.	Verifizierung der Ergebnisse unter Verwendung eines Prostatakarzinoms....	107
III.4.	Auswirkungen der kombinierten Ausschaltung von zirkulierendem Fibronektin, Knochenmarks- und Tumorzell-Fibronektin auf die Etablierung und das Wachstum von Knochenmetastasen	109
III.4.1.1.	Überlebensraten	110
III.4.1.2.	Anzahl gebildeter Metastasen	111
III.4.1.3.	Gesamttumorbelastung.....	111
III.4.1.4.	Tumorwachstum	112
III.5.	Spontane Tumorregression.....	113
III.5.1.	Komplette- und partielle Regression der Tumore.....	113
III.5.2.	Zeitliche Eingrenzung der spontanen Tumorregression.....	114

III.5.3.	Evaluierung der spontanen Tumorregression	115
III.5.3.1.	Nachweis der vollständigen Regression mittels Biolumineszenz-Bildgebung	115
III.5.3.2.	Radiologische Untersuchung der Tumorregression	117
III.5.3.3.	Leukozytenvermittelte Zytotoxizität	117
III.5.3.4.	Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen	119
IV.	Diskussion	123
IV.1.	Die Rolle des Fibronektins bei der Metastasierung	124
IV.1.1.	Metastasierungsmodelle	124
IV.1.2.	Induktion von Knochenmetastasen	125
IV.1.2.1.	Biolumineszenz-Bildgebung	125
IV.1.2.2.	Radiographische Analyse	126
IV.1.3.	Die Rolle des Fibronektins der Mikroumgebung bei der Metastasierung	127
IV.1.3.1.	Bedeutung des Fibronektins der Blutzirkulation und des Knochenmarks für die Metastasierung	128
IV.1.3.1.1.	Einfluss des zirkulierenden und des Knochenmark-Fibronektins auf das <i>Homing</i> der Tumorzellen	129
IV.1.3.1.2.	Einfluss des Knochenmark-Fibronektins auf das Wachstum von Tumoren.....	130
IV.1.3.1.3.	Einfluss des Knochenmark-Fibronektins auf die Angiogenese.....	131
IV.1.3.2.	Einfluss von Fibronektin der osteoblastischen Nische auf die frühe Entwicklung von Knochenmetastasen.....	133
IV.1.4.	Die Rolle des Tumorzell-Fibronektins bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren.....	137
IV.1.4.1.	Ausschaltung des Tumorzell-Fibronektins	137
IV.1.4.2.	Die Bedeutung des Tumorzell-Fibronektins bei der Metastasierung.....	137
IV.1.4.2.1.	Einfluss von Tumorzell-Fibronektin auf das <i>Homing</i> der Tumorzellen.....	137
IV.1.4.2.2.	Einfluss von Tumorzell-Fibronektin auf das Wachstum der Tumore	140
IV.2.	Spontane Tumorregression.....	141
V.	Zusammenfassung	145
VI.	Summery.....	146
VII.	Literaturverzeichnis	147
VIII.	Anhang.....	163

VIII.1. Vektorkarte	163
Lebenslauf.....	164
Danksagung.....	165
Versicherung.....	166

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Alb	Albumin
α MEM	„advanced minimum essential medium“
AS	Aminosäuren
ASBMR	„american society of bone and mineral research“
ATG	Startkodon (Nukleotide mit der Basenfolge Adenin-Thymin-Guanin)
ATP	Adenosintrisphosphat
β -ME	beta-Mercaptoethanol
BMU	„bone/basic multicellular unit“
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	„bovine serum albumin“
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	„Cluster of Differentiation“
CD1	„Caesarean Derived 1“
cKO	konditioneller Knockout
CMV	Cytomegalievirus
Col	2,3 Kb α_1 Typ I Kollagen
Cre	„causes recombination“
CSF	„colony stimulating factor“
CT	Kontrolle
CXCL12	Chemokin CXC-Motiv-Ligand 12
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	„deoxyribonucleic acid“
dNTP	„deoxyribonucleotide triphosphate“
DPBS	Dulbecco's PBS
EDA	„extra domain A“
EDB	„extra domain B“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
engl.	englisch
F1	Filial 1

F2	Filial 2
FCS	„fetal calf serum“
fl	floxed (von „flanked by loxP“)
FN	Fibronectin
<i>foxn1</i>	„forkhead box N1“
G418	Geneticin
H ₂ O _d	destilliertes Wasser
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HRP	„horseradish peroxidase“
I. E.	internationale Einheiten
i. p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Kb	Kilobasen
Kd	Knockdown
kDa	Kilo Dalton
kv	kilovolt
lat.	lateinisch
LoxP	„locus of crossing-over“
Lsg.	Lösung
MEZ	Mitteuropäische Zeit
Min.	Minute
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloprotease
MMRRC	„Mutant Mouse Regional Resource Centers“
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MOI	„multiplicity of infection“
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	„messenger RNA“
MSC	Mesenchymale Stammzellen
Mx	„myxovirus resistance 1“
NBF	„neutral buffered formalin“
NS	nicht signifikant
OB	Osteoblasten
OPG	Osteoprotegerin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PBS-T	„phosphate buffered saline“-Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion

PDGF	„platelet derived growth factor“
PE	Polyethylen
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pFN	Plasmafibronectin
pl-pC	Polyinosinic-Polycytidylic Säure
prä-mRNA	Präkursor-mRNA
RANK	„receptor activator of nuclear factor κ -B“
RANKL	„receptor activator of nuclear factor κ -B ligand“
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RNA	„ribonucleic acid“
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	„revolutions per minute“
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDF-1 α	„stromal cell-derived factor-1 alpha“
SDS	„sodium dodecylsulfate“
shRNA	„short hairpin RNA“
siRNA	„small interfering RNA“
SPF	spezifiziert pathogen frei
Sr	Steradian
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	„tris buffered saline“
TBS-T	„tris buffered saline“-Tween
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TU	„transducing units“
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
VEGFR	„vascular endothelial growth factor receptor“
VLA	„very late antigen“
VR	variable Region
vs.	versus
WB	Western Blotting
z. B.	zum Beispiel

I. Einleitung

I.1. Das Fibronektin

Fibronektin (FN) ist ein großes Glykoprotein (ca. 500 kDa) mit einer vielfachdomänen Struktur, welches ubiquitär in Geweben, auf Zelloberflächen, im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten vorkommt. Der Name Fibronektin wurde von den lateinischen Begriffen *fibra* (Faser) und *nectere* (verknüpfen) abgeleitet und deutet auf die Funktionalität des Proteins hin [1, 2]. Fibronektin kann in zwei Varianten vorliegen, als lösliche Form im Plasma (Konzentration: 300 µg/ml) und als unlösliche Variante in der extrazellulären Matrix [3]. Plasmafibronektin (pFN) wird von den Hepatozyten der Leber gebildet, wohingegen das zelluläre Fibronektin (cFN) vor allem von Fibroblasten exprimiert wird. Aber auch andere Zelltypen wie Endothelzellen, Epithelzellen, Myoblasten, Chondrozyten, Granulozyten, Makrophagen und Osteoblasten sezernieren zelluläres Fibronektin, das als fibrilläres Netzwerk zur Strukturbildung der extrazellulären Matrix beiträgt [1, 4]. Fibronektin interagiert mit einer großen Anzahl an Makromolekülen, einschließlich den Komponenten des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix (EZM), zirkulierender Bestandteile der Blutgerinnung, Akutphasen-Proteine, Teile des Komplementsystems und mit Zelloberflächen-Rezeptoren diverser Zellen. Es konnten Bindedomänen für Kollagen, Fibrin, Fibrinogen, Heparin, DNA, Aktin und zahlreiche weitere Proteine identifiziert werden [5]. Fibronektin ist an einer Vielzahl wichtiger Funktionen involviert, wie der Wundheilung, der Zelladhäsion, der Blutgerinnung, der Zelldifferenzierung, der Apoptose, der onkogenen Transformation sowie der Metastasierung und Migration von Zellen [1, 6, 7]. Eine essentielle Rolle von Fibronektin während der Embryogenese wurde durch die Tatsache bekräftigt, dass Mäuseembryonen, deren Fibronektin-Gen inaktiviert wurde, etwa 8,5 Tage nach Gestation *in utero* versterben. Die embryonalen Schädigungen sind assoziiert mit schwerwiegenden Defekten mesodermaler Strukturen, wie Abwesenheit der Somiten und des Notochord, als auch Entwicklungsdefekte des Herzens und des Vaskularsystems [8].

I.1.1. Struktur des Fibronektins

Fibronektin ist ein extrazelluläres Glykoproteindimer, bestehend aus zwei nahezu identischen Untereinheiten (ca. 250 kDa), die über zwei Disulfidbrücken an ihrem C-Terminus kovalent verbunden sind [5]. Jedes Monomer setzt sich aus 3 unterschiedlichen Homologie-Regionen oder Modulen zusammen, die über kurze Aminosäuresequenzen perlschnurartig verknüpft sind. Die

einzelnen Module bilden voneinander unabhängig gefaltete Einheiten oder strukturelle Domänen, die ca. 90% der Aminosäuresequenz des Fibronektins ausmachen. Die funktionellen Domänen werden meist durch ihre Bindungseigenschaften definiert und entstehen aus der Kombination unterschiedlicher Module [5, 9]. Die aminoterminalen und carboxyterminalen Regionen werden von 12 Typ I-Modulen, bestehend aus ca. 40 Aminosäureresten, gebildet und sind vorwiegend an der Bindung von Fibrin und Kollagen beteiligt. Die Typ II-Module umfassen jeweils 60 Aminosäuren und sind ebenfalls an der Bindung von Kollagen beteiligt. Das am häufigsten auftretende Typ III-Modul beinhaltet die RGD-Sequenz (steht für die Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure), die die Bindung an Zelloberflächen-Rezeptoren ermöglicht, sowie weitere Bindungsstellen für Integrine und Heparin. Abhängig von Gewebetyp und zellulären Gegebenheiten setzt sich Fibronektin aus 15-17 Typ III-Modulen (ca. 90 Aminosäuren) zusammen [5, 9]. Fibronektin ist ein Glykoprotein, welches je nach Zell-Ursprung einen Kohlenhydrate-Anteil von 4-10% aufweisen kann. Glykosylierungen sind in erster Linie bei Typ III-Modulen und der Kollagen Bindedomäne zu finden (Abb. I.1). Die physiologischen Funktionen der Glykosylierungen sind noch nicht vollständig geklärt, zumindest stabilisieren sie Fibronektin gegen Hydrolyse und modulieren die Affinität gegenüber bestimmten Substraten [5, 10].

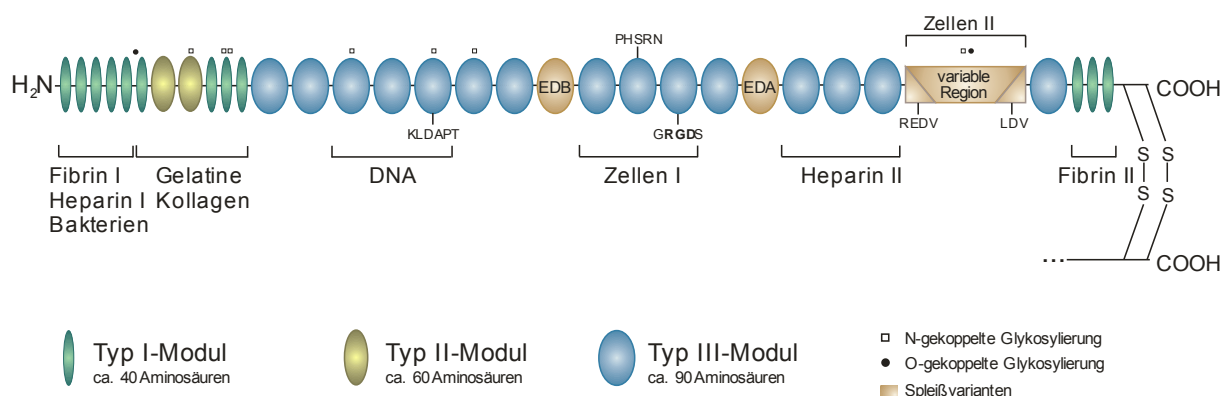


Abbildung I.1: Struktur und Bindungsdomänen eines Fibronektin-Monomers

Schematische Darstellung der Domänenstruktur eines Fibronektin-Monomers (ca. 250 kDa). Das Molekül setzt sich aus wiederholenden Einheiten dreier unterschiedlicher Module zusammen (Typ I, Typ II und Typ III). Die Untereinheiten sind an ihrem carboxyterminalen Ende über 2 Disulfidbrücken miteinander verbunden. Das Vorhandensein der variablen Region und der Typ III-Module EDA (Extra-Domäne-A) und EDB (Extra-Domäne-B) wird durch alternatives Spleißen der pre-mRNA reguliert. Die funktionalen Domänen sind durch die entsprechenden Bindungspartner gekennzeichnet. Des Weiteren sind die Aminosäuresequenzen, die Interaktionen mit Zelloberflächen-Rezeptoren ermöglichen, und mögliche Glykosylierungsstellen abgebildet (schematische Darstellung in Anlehnung an [1, 5, 11]).

I.1.2. Die Isoformen des Fibronektins

Obwohl Fibronektin das Produkt eines einzelnen Gens darstellt, kann das Protein in verschiedenen Isoformen vorliegen, die durch alternatives Spleißen der Präkursor-mRNA (prä-mRNA) er-

zeugt werden [12, 13]. Neben den verschiedenen Isoformen sind auch posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen, bekannt. Durch die vielfältigen Modifikationen ist es möglich, dass Fibronectin die unterschiedlichsten Funktionen im Organismus erfüllt.

I.1.2.1. Alternatives Spleißen der Fibronectin prä-mRNA

Auf Proteinebene unterscheiden sich die einzelnen Isoformen hauptsächlich in 3 Bereichen voneinander. Die Exon-Regionen der Typ III-Module der Extra-Domäne-A (EDA; alternative Termini EIIIA oder EDI) und der Extra-Domäne-B (EDB; alternative Termini EIIB oder EDII) werden entweder aus dem primären RNA-Transkript entfernt oder verbleiben in der RNA und folglich im Protein [14, 15]. Die dritte Region, die durch alternatives Spleißen modifiziert wird, befindet sich in einem nicht homologen Abschnitt und wird als variable Region oder IIICS (engl. type-III connecting segment) bezeichnet. Die strukturellen Variationen dieses Bereichs sind bei Weitem komplexer, da diese Region zusätzlich abschnittsweise an- bzw. abwesend sein kann. Die variable Region setzt sich aus 3 unterschiedlich langen Aminosäure-Abschnitten zusammen. Durch deren Entfernen oder Verbleiben können beim Menschen alleine durch alternatives Spleißen der variablen Region 5 unterschiedliche Isoformen erzeugt werden [16]. Unter Berücksichtigung der Varianten, die durch posttranskriptionale Modifikationen der EDA und EDB Module entstehen, können beim Menschen 20 verschiedenen Fibronectin-Monomere generiert werden [5].

I.1.2.2. Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen, stabilisieren Fibronectin vermutlich gegen Hydrolyse und modulieren die Affinität gegenüber bestimmter Substrate [10]. Des Weiteren sind Interaktionen der Kohlenhydratstrukturen mit spezifischen Zelloberflächenrezeptoren denkbar, indem neue Bindungsstellen bereitgestellt werden. Der Kohlenhydrat-Anteil variiert je nach Zellursprung und Zusammensetzung der Fibronectin-Isoformen zwischen 4 und 10% [5]. Plasmafibronectin weist einen Glykosylierungsgrad von 4-5% auf [17], wohingegen Fibronectin, welches aus amniotischer Flüssigkeit isoliert wurde, über einen Kohlenhydrat-Anteil von 9-10% verfügt [18]. Bisweilen konnten 7 unterschiedliche Glykosylierungsstellen identifiziert werden, die über Stickstoffatome verknüpft werden (Abb. I.1). Zumindest zwei weitere Kohlenhydratstrukturen werden hingegen über ein Sauerstoffatom gebildet [19].

Die Charakterisierung einer weiteren Fibronectin-Isoform erfolgte mit Hilfe des Antikörpers FDC-6, der eine spezielle Glykosylierung innerhalb des Fibronectins erkennt [20]. Das FDC-6⁺ Fibronectin wird vorwiegend von Tumoren und fötalen Zellen synthetisiert und wird aus diesem Grund als onkofötales Fibronectin (oFN) bezeichnet [21].

I.1.2.3. Bedeutung der Fibronectin-Isoformen für den Organismus

Die Isoformen können spezielle Unterschiede, bezogen auf Löslichkeit, Zelladhäsion und Liganden-Bindungseigenschaften, aufweisen. Auf diese Weise kann die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix gewebespezifisch, auf zellulärer Ebene, reguliert werden. Die verschiedenen Isoformen des Fibronectins werden zum Einen abhängig vom zugrunde liegenden Zelltyp und zum Anderen abhängig vom Entwicklungsstadium gebildet.

Außerdem spielen die unterschiedlichen Fibronectin-Isoformen bei transformierten Zellen und malignen Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. Veränderte Spleiß-Muster der Fibronectin prä-mRNA führen zu einer übermäßigen Expression der Isoformen, die die Bereiche IIICS, EDA und EDB beinhalten [22-26].

I.1.2.3.1. Die EDA-Domäne

Fibronectin, welches die EDA-Domäne enthält, wird vorwiegend in stark proliferierenden Geweben gebildet, beispielsweise während der Embryonalentwicklung [27]. In adultem Gewebe wird EDA⁺ Fibronectin vor allem bei der Wundheilung exprimiert [28]. Darüber hinaus konnte es ebenfalls mit malignen Krebserkrankungen, z.B. der Leber, assoziiert werden [25]. EDA⁺ Fibronectin kann die Zelladhäsion [29] sowie die Motilität von Zellen erhöhen [30]. Möglicherweise wirkt EDA-haltiges Fibronectin fördernd auf die Metastasierung von Tumorzellen, da es *in vitro* die Migrationsfähigkeiten bestimmter Tumorzelllinien erhöhte. Dabei stimulierten die Wachstumsfaktoren TGF- β (engl. „transforming growth factor- β “) und HGF (engl. „hepatocyte growth factor“) durch eine Synergiewirkung die tumorzellspezifische EDA-Synthese und in der Folge die Motilität [30]. Demgemäß wurden durch die Überexpression von EDA⁺ Fibronectin die Zellausbreitung, die Zellmigration und die Zelladhäsion intensiviert. Die verstärkte Motilität und Zelladhäsion von EDA⁺ Fibronectin wird durch eine erhöhte Bindungsaffinität zu dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ hervorgerufen und nicht wie zuvor vermutet durch eine EDA spezifische Zell-Bindungsdomäne [31]. Die erhöhte Bindungsaffinität der EDA-Domäne zu dem Fibronectin-Rezeptor $\alpha_5\beta_1$ stimuliert außerdem das Fortschreiten des Zellzyklus, indem intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert werden. Dies erklärt ebenfalls die erhöhte Produktion an EDA⁺ Fibronectin in embryonalem Gewebe und Tumorgewebe. Das alternative Spleißen der EDA-Region kann somit das hoch proliferative Potential von Zellen in solchen Geweben unterstützen [32]. Außerdem konnte mittels diverser Verfahren ein Einfluss der EDA-Domäne bei Gewebeverletzung und Entzündungsvorgängen [33, 34], Zelldifferenzierung [35, 36], zytokinabhängige Expression von Matrixmetalloproteasen [37], Proteinsekretion [38], Matrixaufbau [39] und Dimerisierung [40] gezeigt werden.

EDA⁺ Fibronectin konnte auch bei verschiedenen menschlichen Krankheiten nachgewiesen werden. Chronische Hepatitis C, eine durch das Hepatitis-C-Virus verursachte Infektionskrankheit, kann zur Leberschädigung (Leberfibrose) führen. In diesem Krankheitszustand produzieren aktivierte hepatische Sternzellen EDA⁺ Fibronectin-Isoformen. Dabei korrelieren die Menge der löslichen Fibronectin-Isoformen mit dem Grad der Leberfibrose [41]. Ferner konnten erhöhte Mengen an EDA⁺ Fibronectin im Plasma und/oder betroffenen Geweben von Patienten, die an Schuppenflechte [42], rheumatoider Arthritis [43], Diabetes mellitus [44], Sepsis (Blutvergiftung durch Infektionserreger) [33] und Krebserkrankungen [25] litten, festgestellt werden.

I.1.2.3.2. Die EDB-Domäne

Detaillierte Strukturvergleiche der EDB-Domäne mit anderen Typ III-Modulen ergaben, dass EDB⁺ Fibronectin deutliche Unterschiede entsprechender Schleifen-Strukturen aufweist. Diese haben erhebliche Veränderungen der relativen Orientierung von benachbarten Domänen zur Folge [45]. Die Konformationsänderungen, die mit der Anwesenheit der EDB-Domäne einhergehen, exponieren Aminosäuresequenzen, die normalerweise verborgen sind. Dies wird durch die spezifische Bindung eines monoklonalen Antikörpers bestätigt, der die native Form des EDB-beinhaltenden Fibronectins erkennt [46].

EDB⁺ Fibronectin wird, wie zuvor für EDA beschrieben, ebenfalls vermehrt in stark proliferierenden Geweben gebildet. So wird EDB⁺ Fibronectin in großer Menge während der Embryonalentwicklung [47], der Wundheilung [48] und der tumorspezifischen Angiogenese (Blutgefäßbildung) [49] synthetisiert. EDB⁺ Fibronectin ist in adulten Geweben und vollentwickelten Blutgefäßen weitestgehend abwesend, wohingegen es in regenerierenden Geweben und im Umfeld entstehender Blutgefäße häufig auftritt [50, 51]. EDB⁺ Fibronectin wird bei der durch Tumore induzierten Gefäßneubildung exprimiert und kann in der Nähe dieser neovaskulären Strukturen vermehrt auftreten. Aus diesem Grund wird EDB⁺ Fibronectin auch als Marker für die Angiogenese betrachtet [52]. Dieses selektive Expressionsmuster wurde mehrfach für unterschiedliche Tumortypen gezeigt, wie für invasive duktales Karzinome [53] oder Gehirntumore [52]. Die induktive Formation neuer Blutgefäße (Angiogenese; Abschnitt I.2.3.5.) ist der wichtigste Schritt, um die essentielle Versorgung solider Tumore mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten. Ein möglicher Therapieansatz, der noch weiter entwickelt werden sollte, wäre, dass Antikörper, die spezifisch die EDB-Domäne erkennen, toxische Moleküle in Bereichen neovaskulärer Strukturen freisetzen und somit das Tumorwachstum blockieren [54].

Obwohl das EDB-Exon bereits vor mehr als 20 Jahren entdeckt wurde, bleiben die genauen biologischen Funktionen von Fibronectin-Isoformen, die diese Domäne beinhalten, unklar. Knockoutmäuse, die nicht dazu in der Lage waren, die EDB-Domäne zu bilden, zeigten *in vivo* keine offen-

sichtlichen Änderungen bezüglich des Phänotyps [55]. Zumindest konnte *in vitro* ein geringer Effekt auf die Proliferation und den Matrixaufbau von embryonalen Fibroblasten, die aus den EDB-Knockoutmäusen isoliert wurden, nachgewiesen werden. Die Zellen wuchsen verlangsamt und produzierten Fibronektinfibrillen, die im Vergleich zu normalen embryonalen Fibroblasten kürzer und dünner waren [55].

Interessanterweise führte die kombinierte Ausschaltung der Domänen EDA und EDB aufgrund deutlicher Defekte bei der Gefäßbildung zum Absterben der Mäuseembryonen [56]. Diese Studien zeigten, dass die EDA- und EDB-Domänen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Herzkreislaufsystems einnehmen, jedoch die Anwesenheit einer der beiden für einen normalen Entwicklungsverlauf ausreichend ist [57].

I.1.2.3.3. Die variable Region

Das lösliche Plasmafibronectin wird als Heterodimer sezerniert und zumindest eine Untereinheit muss die variable Region beinhalten. Homodimere, bei denen die variable Region vollständig fehlt, werden zwar synthetisiert, vermutlich aber zu einem frühen Zeitpunkt wieder degradiert (Knorpelgewebe ausgenommen) [58]. Demgegenüber enthält das zelluläre Fibronectin der Fibroblasten üblicherweise in beiden Monomeren die variable Region. Vermutlich liefert diese strukturelle Abweichung die Begründung für die Unterschiede bezüglich der Vernetzung von Plasmafibronectin, bzw. zellulärem Fibronectin mit Fibrin während der Blutgerinnung. Hierbei ist sowohl die Verknüpfungsart, als auch die Effizienz der Vernetzung betroffen [59].

I.1.3. Aufgaben und Funktion des Fibronektins

I.1.3.1. Fibronectin-Zell Interaktionen

Die Wechselwirkungen zwischen dem Fibronectin und verschiedenen Zelltypen sind für unterschiedliche Prozesse von großer Bedeutung. So haben diese Interaktionen Auswirkungen auf die Adhäsion, die Proliferation, die Differenzierung und die Migration von Zellen [1]. Hierbei spielen Integrine eine wichtige Rolle. Integrine sind heterodimere Zelloberflächenproteine, die eine zentrale Rolle bei den Zell-Zell und Zell-Matrix-Wechselwirkungen einnehmen. Bislang konnten 11 unterschiedliche Integrine identifiziert werden, die die Fähigkeit besitzen, an Fibronectin zu binden [60].

Die zentrale Zellbindungsdomäne des Fibronektins beinhaltet die RGD-Sequenz und ist im zehnten Typ III-Module lokalisiert (Abb. I.1). Die RGD-Sequenz ist ein weit verbreitetes Bindungsmotiv und kommt u. a. in den Proteinen Osteopontin, Kollagen, Fibrillin und Vitronektin vor [61-63]. Das RGD-Motiv des Fibronektins wird von den Integrinen $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, dem thrombozyten-spezifischen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und allen Mitgliedern der α_v Unterfamilie erkannt [64, 65]. Eine Besonderheit des Integrins $\alpha_5\beta_1$ ist, dass es eine weitere Bindungsstelle, die PHSRN-Sequenz (Prolin-Histidin-Serin-Arginin-Asparagin), in dem benachbarten III-9 Modul des Fibronektins erkennt und durch diese Synergiewirkung eine erhöhte Bindungsaffinität erlangt [66, 67].

Des Weiteren konnten Integrin Bindungsstellen in der variablen Region und der EDA-Domäne identifiziert werden. Aus diesem Grund können bestimmte Zellinteraktionen mittels alternativem Spleißen reguliert werden. Die EDA-Domäne ermöglicht die Bindung der Integrine $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_9\beta_1$ [64, 68]. Die variable Region kann über die Aminosäuresequenzen LDV (Leucin-Asparaginsäure-Valin) und REDV beim Menschen (Arginin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Valin) [69, 70], bzw. der homologen Sequenz RGDV (Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Valin) bei der Ratte [71], mit den Integrinen $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$ interagieren. Neben den Integrinen sind weitere Zelloberflächenrezeptoren bekannt, die mit Fibronektin in Wechselwirkung treten. Hier lassen sich beispielsweise der Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 [72] oder das Syndecan-4 nennen [73].

I.1.3.2. Antiapoptotische Wirkungsweise von Fibronektin

Zellen sind über diverse molekulare Mechanismen untereinander und mit der umgebenden extrazellulären Matrix verbunden. Diese Interaktionen sichern die Proliferation und das Überleben der Zellen. Ein Unterbinden dieser notwendigen Wechselwirkungen kann zum Erliegen des Zellzyklus führen und/oder den kontrollierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Fibronektin ist dazu in der Lage, über zahlreiche Bindungsstellen mit Integrinrezeptoren unterschiedlicher Zellen zu interagieren. Dabei können Signaltransduktionswege initiiert werden, die in der Folge antiapoptotisch wirken. So konnte die Bindung des Integrins $\alpha_5\beta_1$ an die RGD-Sequenz von Fibronektin die Apoptose von CHO-Zellen (engl. „chinese hamster ovary“) *in vitro* verhindern. In diesem Zusammenhang wurde eine erhöhte Expression des antiapoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 beobachtet [74].

Des Weiteren konnte eine antiapoptotische Funktionsweise von Plasmafibronektin nachgewiesen werden. Mäusen, denen experimentell eine Ischämie (Minderdurchblutung eines Gewebes) im Gehirn erzeugt wurde, wiesen in Abwesenheit von Plasmafibronektin größere nekrotische Bereiche auf, als die entsprechenden Kontrollen. Die Autoren folgerten ebenfalls, dass Plasmafibronektin über Interaktionen mit Integrinen und der daraus resultierenden Aktivierung interner Signaltransduktionswege die Zellen vor der Apoptose bewahrt [3, 75].

I.1.3.3. Matrixbildung

I.1.3.3.1. Aufbau eines funktionalen Fibronektin-Netzwerkes

Fibronektin ist dazu in der Lage, mit sich selbst zu interagieren und auf diese Weise ein fibrilläres Netzwerk auszubilden. Zusätzlich diffundiert das aus der Blutzirkulation stammende lösliche Plasmafibronektin in das Gewebe und wird dort in das fibrilläre Netzwerk eingebaut [76, 77]. Dieser Prozess wird maßgeblich durch Zellinteraktionen vorangetrieben, wobei Integrine eine zentrale Rolle einnehmen [4]. Fibronektin-Fibrillen besitzen Bindungsstellen für zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix. Diese beeinflussen wiederum die Anordnung diverser Matrix-Proteine, wie Kollagen I und III, Fibulin-1, Fibrinogen, Thrombospondin-1, LTBP-1 (engl. „latent transforming growth factor- β binding protein-1“), Decorin und Biglycan. Auf diese Weise trägt Fibronektin maßgeblich zur strukturgebenden Wirkung der extrazellulären Matrix bei [60, 78]. Fibronektin-Fibrillen vermitteln auch die Zelladhäsion, z.B. über Integrine und die damit verbundene Signaltransduktion, die wiederum die Zellmigration, die Zellproliferation und/oder die Apoptose begünstigt [79, 80]. Darüber hinaus steuert Fibronektin die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren. Beispielsweise reguliert Fibronektin die Aktivierung gebundener Komplexe, wie es bereits für TGF- β gezeigt werden konnte [81].

Integrine können in einer niedrig affinen (inaktiven) oder in einer hoch affinen (aktiven) Konformation vorliegen [82]. In Geweben exprimieren Zellen aktivierte Integrinrezeptoren, die Fibronektin hoch affin binden. Dabei werden über Wechselwirkungen mit dem Aktinzytoskelett mechanische Zugspannungen aufgebaut, die zur Streckung des gebundenen Fibronektinmoleküls führen. Die Dehnung des Fibronektins hat zur Folge, dass verborgene Bindungsstellen, die der Selbstassoziation dienen, verfügbar werden. Auf diese Weise werden weitere Fibronektinmoleküle gebunden und eine Art Kettenreaktion ausgelöst, die sich letztendlich in der Formation der Fibrillen äußert [83, 84]. Außerdem könnten durch diese mechanische Streckung der Fibronektin-Fibrillen weiter verborgene Motive exponiert werden, die spezifische Interaktionen und Funktionen vermitteln [85].

I.1.3.3.2. Einfluss von Fibronektin auf die Wundheilung und Hämostase

Hämatopoetische Zellen, die sich in der Blutzirkulation befinden, exprimieren Integrine in einer inaktiven Konformation. Dies verhindert die Bindung an Plasmafibronektin und somit die Formation der Fibronektin-Fibrillen. Sobald die Integrine jedoch in der hoch affinen Konformation vorliegen, z.B. wenn Thrombozyten aufgrund einer Gefäßverletzung aktiviert werden, wird Plasmafibronektin gebunden und es kommt zum Aufbau der Fibronektin-Fibrillen. Diese Fibrillen werden

beispielweise für die Stabilität und die Entstehung eines Thrombus (Blutpfropf) während der Hämostase (Blutstillung) benötigt [86, 87]. Der Thrombus, der im Zuge der Blutgerinnung entsteht, setzt sich vorwiegend aus Thrombozyten, Leukozyten sowie einem Netzwerk aus Fibronektin und Fibrin zusammen [87, 88]. Die kovalente Bindung zwischen Fibronektin und Fibrin wird durch den Blutgerinnungsfaktor XIIIa vermittelt [89]. Die auf diese Weise entstandene Matrix kann der Adhäsion von Zellen dienen [90, 91]. Außerdem wird Fibronektin während der Wundheilung vermehrt synthetisiert und kann z.B. die Migration von Keratinozyten (hornbildende Zelle) bei der Wundschließung unterstützen, indem es als provisorische Matrix fungiert [92, 93].

I.2. Krebserkrankungen

I.2.1. Einführung und Begriffsbestimmung

Maligne Tumorerkrankungen sind in Deutschland nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit ca. 25% aller Todesfälle die zweithäufigste Todesursache [94]. Unter Tumoren versteht man eine örtlich umschriebene Zunahme des Gewebevolumens, hervorgerufen durch abnormes Zellwachstum [95]. Im Gegensatz zu benignen (gutartigen) Tumoren unterscheiden sich maligne (bösartige) Tumore durch ihr invasives Wachstum und die Fähigkeit, fernab des Primärtumors einen Streuherd zu bilden und andere Organe zu befallen. Der Prozess, bei dem sich Zellen vom Primärtumor absiedeln und zu anderen Körperabschnitten migrieren, wird als Metastasierung bezeichnet [96]. Maligne Tumorerkrankungen, die auch als Krebs bezeichnet werden, werden als eine Gruppierung von Erkrankungen erachtet. Bisweilen wurden 100 verschiedene Krebstypen klassifiziert, wobei die charakteristischen Merkmale der Tumore durch deren Ursprungsgewebe definiert werden. 85% aller Krebsarten gehen aus epithelialen Zellen hervor und werden als Karzinome bezeichnet. Des Weiteren wird zwischen malignen Zellen mesodermalen Ursprungs (Sarkom) und entarteten Zellen, die aus Drüsengeweben hervorgegangen sind (Adenokarzinom), differenziert [97].

I.2.2. Krebs – eine genetische Erkrankung auf zellulärer Ebene

Interessanterweise sind die meisten Krebs verursachenden Faktoren (Karzinogene) Agenzien oder physikalische Einflüsse (z.B. Strahlung). Diese sind auf Umstände zurückzuführen, die Veränderungen der DNA-Sequenz bzw. Mutationen hervorrufen (Mutagene). Demzufolge beruht

Krebs, wie alle genetischen Erkrankungen, auf DNA-Aberrationen. Es gibt zahlreiche Anzeichen dafür, dass die DNA von Tumorzellen umfassende Modifikationen beinhaltet, beginnend bei Punktmutationen bis zur Veränderung von Chromosomen, wie Deletionen, Duplikationen oder chromosomale Translokationen.

Die zeitliche Akkumulation zellulärer Mutationen ist ein mehrstufiger Prozess, der der Krebsentstehung zugrunde liegt. Dies erklärt ebenfalls das gesteigerte Krebsrisiko im Alter und begründet die Zunahme an Krebserkrankungen in den letzten Jahrhunderten, in denen sich die durchschnittliche Lebenserwartung stark erhöht hat. Die meisten Mutationen, die bei Tumorzellen identifiziert wurden, beruhen auf somatischen Mutationen, wobei die DNA einer somatischen Zelle geschädigt wurde [98]. Diese genetischen Aberrationen werden während der Zellteilung auf die Tochterzellen übertragen, als somatische Ereignisse aber nicht auf die Nachkommen vererbt. Demzufolge kann Krebs als eine genetische Erkrankung auf zellulärer Ebene betrachtet werden. Einzig DNA-Aberrationen der Gameten, sogenannte Keimbahnmutationen, werden auf die Nachkommen übertragen. Manche Keimbahnmutationen haben ein erhöhtes Krebsrisiko zur Folge, sind aber an der direkten Entstehung von Krebserkrankungen eher selten beteiligt. Die genetische Disposition (genetisch bedingte Anfälligkeit für die Ausbildung von Krankheiten) ist nur in 5% aller Fälle die Ursache für die Krebserkrankung [97, 99].

I.2.3. Schlüsselmerkmale von Krebserkrankungen

Tumorzellen unterscheiden sich auf zellulärer Ebene von normalen Körperzellen durch charakteristische Merkmale, die das Tumorwachstum, das Überleben der Krebszellen und die Bildung von Metastasen fördern. Diese essentiellen Veränderungen zellphysiologischer Prozesse bestimmen die maligne Transformation von Zellen und sind bei den meisten, wenn nicht bei allen humanen Tumortypen zu finden. Typische erworbene Merkmale, die dem Tumor erlauben, unkontrolliert zu proliferieren, sind: Autonomie bezüglich externen Wachstumssignalen, Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose), Gewebeinvasion und Metastasenbildung, Angiogenese (das Wachstum neuer Blutgefäße), Umgehung der Überwachung durch das Immunsystem und ein uneingeschränktes Replikationspotential (Abb. I.2). Aber auch eine generelle genetische Instabilität, abnorme Gen-Expression und eine anormale Zell-Zell-Kommunikation begünstigen die maligne Transformation von Zellen [98, 100].

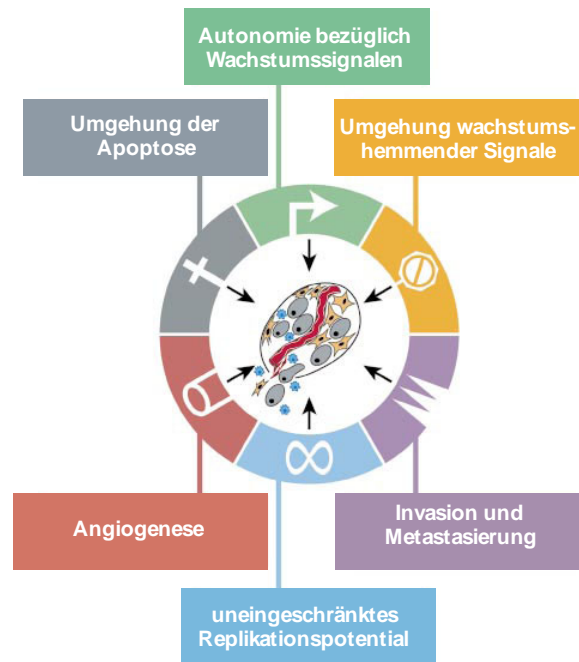


Abbildung I.2: Erworbenes funktionelle Merkmale maligner Tumorzellen

Die maligne Transformation von Zellen beruht auf essentiellen Veränderungen zellphysiologischer Prozesse. Diese charakteristischen funktionellen Merkmale kennzeichnen die meisten, wenn nicht alle Krebsarten und werden durch verschiedene mechanistische Strategien erworben (schematische Darstellung in Anlehnung an [98]).

I.3. Die Rolle von Fibronektin bei Krebserkrankungen

Aufgrund der verschiedenartigen Beschaffenheit und Zusammensetzung hat die extrazelluläre Matrix diverse Funktionen im Organismus wie die Formgebung von Geweben und Organen, die Verankerung von Zellen und die Regulierung der interzellulären Kommunikation. Des Weiteren dient die extrazelluläre Matrix als Reservoir für eine Vielzahl von zellulären Wachstumsfaktoren. Veränderte physiologische Bedingungen können zur Aktivierung von Proteasen führen und in der Folge die lokale Freisetzung dieser Wachstumsfaktoren einleiten. Dies ermöglicht die schnelle und lokale wachstumsfaktorvermittelte Aktivierung zellulärer Funktionen, ohne De-novo-Synthese.

Das Verständnis der Struktur und der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ist für die komplexen Vorgänge der Tumorerkrankung und der Metastasierung von großer Bedeutung. Aufgrund dessen gewinnt die extrazelluläre Matrix zunehmend an Bedeutung für die Erforschung von Krebserkrankungen. So konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Tumorzellen, sondern auch die Mikroumgebung das Verhalten von Tumorzellen beeinflusst. Beispielsweise führte die Inokulation von Mammazellen mit malignem Potenzial (Comma-D) in eine zuvor bestrahlte Um-

gebung zur vermehrten Tumorbildung. Im Gegensatz dazu konnte bei der Übertragung der Tumorzellen in ein unbestrahltes Umfeld nur selten eine Tumormorphose festgestellt werden [101].

Fibronectin ist in zahlreiche für die Tumor-Progression wichtige Funktionen involviert, wie die Blutgefäßneubildung [102] und die Metastasierung von Tumoren [103]. Bereits zu einem frühen Zeitpunkt konnte nachgewiesen werden, dass Fragmente, die aus der Degradation von Fibronectin entstehen, die maligne Transformation von Zellen stimulieren [104]. Ferner trägt Fibronectin zur Invasion von Tumorzellen bei, indem es die Expression und Sekretion bestimmter Matrixmetalloproteasen erhöht und somit die Degradation der Matrix unterstützt [105]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Fibronectin die Migration von Tumorzellen stark stimuliert und somit ebenfalls die Tumordinvasion unterstützt [7]. Andererseits wurde aber auch gezeigt, dass Fibronectin von den Tumorzellen abgebaut wird, und dass bestimmte Fragmente dieses Moleküls Wachstum und Metastasierung inhibieren [106].

Während des Fortschreitens der Krebserkrankung wird die extrazelluläre Matrix, die das Tumorgewebe umgibt, erheblich umgestaltet. Dies erfolgt durch die Degradation der bestehenden Matrix und durch die Neusynthese von Matrixbestandteilen, die oftmals in normalen Geweben nicht vorkommen. Fibronectin nimmt eine zentrale Rolle bei der Vermittlung dieser Matrixfunktionsweisen ein. Die entstehende extrazelluläre Matrix hat eine für das Tumorstadium geeignete permissive und/oder instruktive Mikroumgebung zur Folge [107].

I.3.1. Die metastatische Kaskade

In der Metastasierung liegt das eigentliche klinische Problem von Krebserkrankungen begründet. Ein Primärtumor kann aus chirurgischer Sicht relativ einfach entfernt werden, wohingegen es nahezu unmöglich ist, zahlreiche zum Teil sehr kleine über den gesamten Körper verteilte Metastasen zu beseitigen. Dabei bleibt hervorzuheben, dass über 50% aller soliden Tumore zum Zeitpunkt der Diagnose bereits begonnen haben zu metastasieren. Des Weiteren können über 90% aller krebsbezogenen Todesfälle auf einen metastasenbildenden Krankheitsverlauf zurückgeführt werden [97, 108].

Die Fähigkeit von malignen Tumorzellen, fernab des Primärtumors Metastasen zu bilden, ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der in folgende Schritte unterteilt werden kann: Zunächst kommt es durch Veränderungen auf zellphysiologischer Ebene zu der Ablösung von Zellen aus dem Primärtumorverband. Während der Invasion wird die Basalmembran degradiert und die Tumorzellen migrieren in die umgebende extrazelluläre Matrix. Anschließend erfolgt die

Intravasation in Blut- oder Lymphgefäße, die den Transport der Tumorzellen zu ihrem Zielorgan vermitteln (Abb. I.3.).

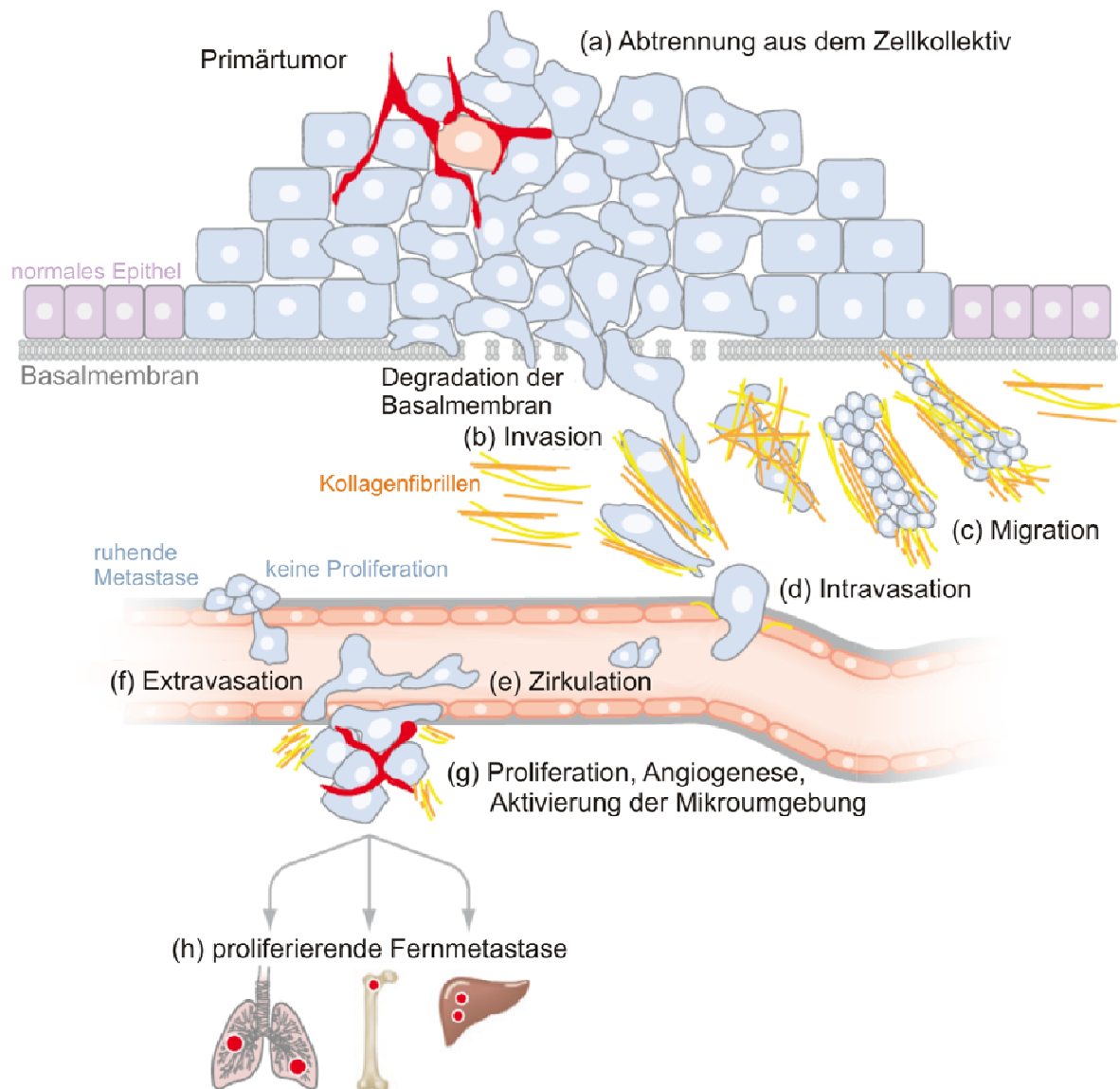


Abbildung I.3: Schematische Darstellung der metastatischen Kaskade

Eine Tumorzelle, die eine metastatische Kolonie initiiert, muss Veränderungen auf zellphysiologischer Ebene durchlaufen, um sich aus dem Zellverband abzulösen (a), die Basalmembran zu durchdringen (b), das Gewebestroma bzw. die extrazelluläre Matrix zu durchwandern (c), die lokalen Lymph- bzw. Blutgefäße zu penetrieren (d), im Blutkreislauf zu überleben (e), an Kapillaren oder Venolen zu adhären, das entsprechende Parenchym zu erschließen (f) und sich an das neue Milieu anzupassen bzw. die lokale Mikroumgebung entsprechend den Bedürfnissen der Tumorzellen zu modifizieren (g), so dass die Fernmetastasen proliferieren können (h) (schematische Darstellung in Anlehnung an [109, 110]).

I.3.1.1. Abtrennung vom Zellkollektiv

In einem ersten Schritt lösen sich die Tumorzellen vom Primärtumorverband (Epithel-Mesenchym-Transition). Dazu müssen zunächst die molekularen Mechanismen überwunden

werden, die normalerweise Zellen miteinander verbinden. Maligne Zellen, die sich vom Primärtumor absiedeln, zeichnen sich durch den Verlust bestimmter Zelladhäsionsmoleküle (z.B. Cadherine) aus [111, 112]. Des Weiteren müssen disseminierte Tumorzellen zahlreiche apoptotische Signale umgehen, die durch den Kontaktverlust zu benachbarten Zellen (Anoikis) und der extrazellulären Matrix (Amorphosis) induziert werden [113, 114]. Fibronectin kann über diverse Bindungsstellen mit Integrinrezeptoren unterschiedlicher Zellen interagieren. Dabei können Signal-transduktionswege initiiert werden, die in der Folge antiapoptotisch wirken [74].

I.3.1.2. Invasion

Ein wichtiges Kennzeichen der Invasion ist die Penetration der Basalmembran und die nachfolgende Erschließung des Bindegewebes und der extrazellulären Matrix. Zunächst binden die Tumorzellen über Oberflächenrezeptoren an die Basalmembran und durchdringen diese. Die Basallamina stellt eine spezialisierte extrazelluläre Matrix dar, welche als stabilisierende Schicht unter der Epithel-Zellschicht lokalisiert ist. Für die Degradation der Bestandteile der Basalmembran, vorwiegend Typ IV Kollagen, Fibronectin, Laminin und Proteoglykane, sind Proteasen notwendig [115]. Hier kommen vor allem Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Serinproteasen zum Einsatz. Obwohl diverse Tumorzellen dazu in der Lage sind, Matrix-Metalloproteasen zu synthetisieren, stimulieren sie in den meisten Fällen umgebende Stromazellen zur Sezernierung der Proteasen [97, 110]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung des Integrins $\alpha_5\beta_1$ an Fibronectin bestimmte Signaltransduktionswege initiiert, die in der Folge zu einer erhöhten Expression und Sekretion der für die Tumorinvasion notwendigen Matrixmetalloproteasen MMP-1, MMP-3 und MMP-9 führen [105].

I.3.1.3. Migration

Tumorzellen interagieren auf vielseitige Weise mit der extrazellulären Matrix. Das Durchdringen der Matrix setzt die Anlagerung der Zellen an diese voraus [110]. Durch die Degradation der extrazellulären Matrix wird außerdem Raum für die Migration der Zellen geschaffen. Integrine sind bei allen soeben genannten Prozessen beteiligt und interagieren unter anderem über die RGD-Sequenz mit Fibronectin. Es konnte gezeigt werden, dass das von Brustkrebszellen exprimierte Integrin $\alpha_v\beta_3$ die Adhäsion an die Matrix erleichtert, da es die Bindung an diverse Matrixproteine, wie Fibronectin, ermöglicht [116]. Integrine können als membranständige Rezeptoren mechanische und chemische Signale auslösen. Dadurch kann z.B. sowohl das Zytoskelett der Zellen neu organisiert bzw. umgebaut, als auch die Proliferation und das Überleben von Zellen beeinflusst werden [109, 117]. Ferner regulieren Integrine adhäsive versus migratorische Interaktionen mit der extrazellulären Matrix und sind mit Modifikationen der Zusammensetzung der extrazellulären

Matrix assoziiert. So konnte für maligne Melanomzellen (schwarzer Hautkrebs) gezeigt werden, dass sie eine fibronektinreiche promigratorische Matrix produzieren und dass Interaktionen der Tumorzellen mit Fibronektin zu den Invasions- und Metastasierungsfähigkeiten beitragen [7].

I.3.1.4. Intravasation

Die Intravasation ist das Eindringen einer Tumorzelle in das Gefäß- oder Lymphsystem. Dabei kommt es zur Anhaftung der Tumorzelle an die Stromazellen des Blutgefäßes, gefolgt von der Degradation der Basalmembran (fehlt bei lymphatischen Gefäßen), dem Durchdringen der endothelialen Zellen (transendotheliale Migration) und dem Eintritt in den Blutkreislauf. Dabei spielen ähnliche Faktoren und rezeptorvermittelte Interaktionen eine Rolle, wie zuvor für die Invasion beschrieben [109]. Einige Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass die Intravasation auf der Expression von MMP-9 beruht und einen limitierenden Schritt bei der Metastasierung darstellt [118]. Wie zuvor beschrieben erhöht die Bindung des Integrins $\alpha_5\beta_1$ an Fibronektin die Expression der Matrixmetalloproteasen MMP-1, MMP-3 und MMP-9 und könnte somit die Intravasation erleichtern [105].

I.3.1.5. Zirkulation und Extravasation der Tumorzellen

Die im Blutkreislauf zirkulierenden Tumorzellen sind Blutstrom verursachenden Scherkräften sowie mechanischen Belastungen durch die Kollision mit anderen zirkulierenden Zellen oder Blutgefäßwänden ausgesetzt. Ferner können die Tumorzellen beim Durchqueren enger Kompartimente der Zirkulation oder durch Abwehrmechanismen des Immunsystems geschädigt werden, so dass weniger als 1% der Tumorzellen, die in den Blutkreislauf eintreten, letztendlich Metastasen bilden [119-123]. Wie es scheint sind zirkulierende Tumorzellen dazu in der Lage, heterotypische Aggregate (Emboli) mit Thrombozyten und/oder Leukozyten zu bilden [124, 125], aber auch homotypische einzig aus Tumorzellen bestehende Aggregate sind möglich [126, 127]. Einerseits dient die Aggregation dazu, den negativen Faktoren der Blutzirkulation zu entgehen, andererseits können sich diese Mikroemboli in Kapillaren diverser Organe festsetzen und somit die Extravasation (Wiederaustritt von Tumorzellen aus dem Blut in das Gewebe) erleichtern. In diesem Zusammenhang beginnen die Tumorzellen bereits in den Kapillaren lokal zu proliferieren, zerstören die Kapillarwand und erschließen anschließend das lokale Parenchym [128, 129]. Außerdem erleichtern diese Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten die Adhäsion am mikrovaskulären Endothel der Zielorgane und somit die Metastasierung [130].

I.3.1.5.1. Tumorzell-Zell Interaktionen

Tumorzellen interagieren mit Thrombozyten und Leukozyten über integrinvermittelte (z.B. $\alpha_v\beta_3$) Adhäsion. Thrombozyten exprimieren den Integrin Rezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$, der die RGD-Sequenz von Fibronectin erkennt und so maßgeblich an der Bindung von Tumorzellen beteiligt ist [125, 131]. Experimentelle Modelle haben gezeigt, dass Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten und/oder Leukozyten die Metastasierung begünstigen [132-135]. Darüber hinaus wurde vorgeschlagen, dass Integrine und Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) an der Anhaftung der Tumorzellen an das Endothel beteiligt sind. Das fibronectinbindende Integrin $\alpha_4\beta_1$, welches primär von Lymphozyten exprimiert wird, konnte bei einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen werden. Für seinen Hauptliganden VCAM-1 (engl. „vascular cell adhesion molecule-1“) wurde bereits gezeigt, dass es die Anhaftung von Melanom-Zellen am Oberflächenendothel unterstützt [136].

I.3.1.5.2. Mechanismus der Endothel-Adhäsion

Vermutlich nutzen Tumorzellen Mechanismen, die auch Leukozyten verwenden, um an Endothelien zu adhären. Transformierte Zellen exprimieren häufig ein abgeändertes Glycosyltransferasen-Repertoire. Beispielsweise bedecken Glykosyl- und Sialyltransferase, die von vielen Tumorzellen exprimiert werden, Zelloberflächenrezeptoren mit Oligosaccharidstrukturen, die Selektin-Liganden entsprechen und die Adhäsion am Oberflächenendothel ermöglichen [129, 137].

Die Adhäsion von Leukozyten an ein aktiviertes Endothel verläuft typischerweise in 3 Schritten. Zunächst kommt es aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den auf den Endothelzellen induzierten Selektinen und den entsprechenden Kohlenhydratliganden auf den Leukozyten zu einer schwachen Bindung an das Gefäßendothel. Diese Bindung ist nicht stark genug, um den Scherkräften des Blutstroms zu widerstehen, so dass die Zellen am Endothel entlangrollen, indem sie ständig neue Verbindungen ausbilden und alte wieder lösen. Diese niedrig affine Bindung ermöglicht jedoch stärkere Wechselwirkungen, die das Resultat der Induktion von ICAM-1 (engl. „intercellular adhesion molecule 1“) auf dem Endothel und der Aktivierung seiner Rezeptoren (Integrin β_2) auf den Leukozyten sind. Die stabile Bindung zwischen diesen Molekülen beendet die Rollbewegung und die Leukozyten können sich zwischen Endothelzellen, welche die Wand der Blutgefäße bilden, hindurchzwängen (Extravasation). Die Leukozyten müssen außerdem die Basalmembran durchqueren. Dies geschieht, wie zuvor für die Invasion der Tumorzellen beschrieben, mit Matrix-Metalloproteasen, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden [138]. Tumorzellen sind im Vergleich zu zirkulierenden Leukozyten größer und besitzen andere morphologische Eigen-

schaften. Dessen ungeachtet nutzen Tumorzellen zumindest einige dieser Adhäsionsmechanismen, um mit dem vaskulären Endothel zu interagieren [109].

I.3.1.6. Die metastatische Kolonisierung

Die Tumorzellen können im Anschluss an die Extravasation und Einwanderung in das spezifische Organparenchym Fernmetastasen bilden. Die metastatische Kolonisierung ist der letzte und entscheidende Schritt der Etablierung einer kontinuierlich wachsenden Fernmetastase. Dabei kann die Zusammensetzung des Stromas stark von der des Primärtumors abweichen. Aus diesem Grund wird dieser Prozess maßgeblich von den Fähigkeiten der Tumorzellen beeinflusst, die lokale Mikroumgebung seinen Bedürfnissen anzupassen [139].

I.3.1.7. Die Mikrometastase

Mikrometastasen wurden ursprünglich definiert als kleine verborgene Metastasen mit einem Durchmesser von weniger als 0,2 cm. Gegenwärtig umfasst der Begriff ebenfalls disseminierte Tumorzellen, die im peripheren Blut, dem Knochenmark oder den Lymphknoten vorliegen [140]. Es wird vermutet, dass einzelne isolierte Tumorzellen primär noch nicht autonom proliferieren, sondern dass sich diese Mikrometastasen in einer Art Ruhezustand (engl. dormancy) befinden. In diesem Latenzzustand können die Tumorzellen über viele Jahre verharren, bis sich die lokalen Gegebenheiten ändern und die Tumorzellen zu proliferieren beginnen.

Verschiedene Hypothesen wurden aufgestellt, um den Ruhezustand der Mikrometastasen zu erklären. Es wurde vorgeschlagen, dass Tumorzellen in ein ausgeweitetes Stadium der G_0 -Phase eintreten, die Proliferation einstellen und somit in einem Latenzzustand verbleiben [141]. Jedoch konnte auch nachgewiesen werden, dass ruhende Mikrometastasen unter bestimmten Umständen ihre metabolische Aktivität beibehalten, obwohl sie eine Größe von 200 μm nicht überschritten. Die Größenlimitierung wurde durch eine Art Gleichgewichtszustand zwischen Proliferation und dem Absterben der Zellen erreicht, ohne Nettozuwachs der Tumormasse [142, 143]. Vermutlich entstehen die meisten humanen Tumorzellen zunächst ohne angiogenes Potenzial und verharren über mehrere Monate oder Jahre in einem mikroskopischen Ruhezustand ohne Neovaskularisation. Möglicherweise wird dieser Zustand durch Faktoren der Mikroumgebung ausgelöst, die die Mikrometastasen daran hindern, auf den angiogenen Phänotyp umzuschalten [144]. Auch gibt es Hinweise, dass das Wachstum bzw. die Größe von Mikrometastasen durch das Immunsystem kontrolliert wird [145-147]. Ruhende Mammakarzinomzellen, die aus Geweben abseits des Primärtumors isoliert wurden und über einen langen Zeitraum teilungsunfähig waren, zeigten interessanterweise die Fähigkeit zu proliferieren und Tumore zu bilden, nachdem sie immundefizienten Mäusen innokuliert wurden. Obwohl diese Zellen scheinbar ihre Proliferation eingestellt

hatten und in den Latenzzustand eingetreten waren, hatten sie ihr tumorigenes Potenzial nicht verloren [128]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das Wirtsgewebe permissive oder restriktive Signale aussenden kann und diese somit bestimmen, ob die Tumorzellen proliferieren und sekundäre Tumore bilden. Neuen Erkenntnissen zur Folge können Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zu einem Wechsel des Gleichgewichtszustandes zwischen natürlichen Stimulatoren und Inhibitoren der Tumorzellproliferation führen. So veranlassen manche Produkte, die bei der Degeneration der Matrix entstehen, die latenten Tumorzellen dazu, auf den angiogenen Phänotyp umzuschalten und die Entwicklung zur Makrometastase fortzusetzen [148].

I.3.1.8. Die Makrometastase

Das Einleiten der Angiogenese (engl. „the angiogenic switch“), bzw. das durch angiogene Wachstumsfaktoren ausgelöste Fortschreiten zur Makrometastase ist unerlässlich für die Etablierung eines wachsenden Sekundärtumors [149]. Hierbei ist die induktive Formation neuer Blutgefäße der wichtigste Schritt, um die essentielle Versorgung des wachsenden Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten und somit das makrometastatische Wachstum zu ermöglichen [139, 150]. Die maximale Größe, die ein Tumor erreichen kann, ohne die Angiogenese zu induzieren, beträgt ca. 1 mm^3 . Die Tumorzellen müssen einen Maximalabstand von 100-200 μm (Diffusionsgrenze von Sauerstoff) zu einem Blutgefäß einhalten, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten [97, 151, 152].

I.3.1.8.1. Die Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man das Wachstum kleiner Blutgefäße (Kapillare), die überwiegend durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem entstehen [102]. Die Angiogenese findet unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich während der Embryogenese und der fötalen Entwicklung statt. Zudem kann die Blutgefäßbildung unter pathologischen Bedingungen, wie der Wundheilung, der Thrombose und dem Tumorwachstum, beobachtet werden [153, 154]. Während der Wundheilung oder der Thrombose wachsen neu gebildete Blutgefäße in kontrollierter Weise und stellen das Wachstum ein, sobald der ursprüngliche Zustand wiederhergestellt ist. Dies trifft jedoch nicht auf die tumorinduzierte Angiogenese zu. Dieser Prozess kann über Jahre hinweg andauern und hat eine desorganisierte, ineffiziente und undichte Blutgefäßstruktur zur Folge [155].

Wächst ein Tumor über die Größe von 1 mm^3 hinaus, können Zellen im Inneren des Tumors aufgrund der unzureichenden Sauerstoffversorgung nicht überleben. Der Sauerstoffmangel (Hypo-

nie) kann zur Ausbildung nekrotischer Regionen innerhalb des Tumors führen und dieser hypoxische Zustand kann über einen langen Zeitraum andauern [151]. Durch den Sauerstoff- und Glukosemangel beginnen die Tumorzellen angiogene Wachstumsfaktoren zu sezernieren, die für die Initiierung der Blutgefäßbildung verantwortlich sind [156].

Verschiedene Wachstumsfaktoren sind an dem Prozess der Angiogenese beteiligt. Einer der Hauptfaktoren für die Initiierung und die Regulation der Gefäßneubildung ist VEGF (engl. „vascular endothelial growth factor“), der zunächst eine Erweiterung der Blutgefäße (Vasodilatation) bewirkt. Diese erhöht die Permeabilität der Kapillaren und in der Folge kommt es zur Extravasation von Plasmaproteinen sowie zur Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen, die an der Initiierung der Angiogenese beteiligt sind [142, 150, 157, 158]. VEGF wird von hypoxischen Tumorzellen sezerniert und diffundiert durch die extrazelluläre Matrix. Hypoxische Bedingungen führen ebenfalls zu einer Verminderung des extrazellulären pH-Wertes und es konnte gezeigt werden, dass die Interaktionen zwischen VEGF und Fibronectin bei saurem pH zunehmen [159, 160]. Vermutlich führen hypoxische Bedingungen und die damit verbundene saure extrazelluläre Mikroumgebung zur Einlagerung und Speicherung von VEGF in die extrazelluläre Matrix. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass VEGF in Bereichen mit großem Sauerstoffmangel und dem damit verbundenen niedrigeren pH-Wert aufgrund der erhöhten Bindung an Fibronectin und der vermehrten Expression von VEGF in ausreichenden Mengen zur Verfügung steht [159]. Infolgedessen entsteht ein VEGF-Gradient zwischen dem hypoxischen Tumorarealen und den umliegenden Gefäßen. Erschließen neue Blutgefäße Areale mit niedrigem pH-Wert und hohem gebundenen VEGF-Gehalt, steigt der pH-Wert in diesen Bereichen und gebundenes VEGF wird freigesetzt. Dieses stimuliert das zielgerichtete Wachstum und die Migration neuer Blutgefäße [159].

Erreicht VEGF ein Blutgefäß so bindet es an spezielle Oberflächenrezeptoren (VEGFR, engl. „vascular endothelial growth factor receptor) von Endothelzellen, welche die Blutgefäßwand auskleiden [161, 162]. Die auf diese Weise stimulierten Endothelzellen sezernieren Matrixmetalloproteasen, die die Basalmembran degradieren. In der Folge verlassen die Endothelzellen die Gefäßwand und dringen in die extrazelluläre Matrix ein [153, 163]. Durch VEGF werden nun intrazelluläre und interzelluläre Signalwege initiiert, die die Proliferation und die Selektion von migrierenden Endothelzellen an der Spitze des wachsenden Sprosses steigern [153]. Die migrierende Spitzenzelle des Sprosses sondiert ihre Umgebung mittels beweglicher Pseudopodien (Scheinfüßchen) und migriert chemotaktisch entlang des VEGF-Gradienten zu Regionen höherer Konzentration [164]. Endothelzellen, die hinter der migrierenden Spitzenzelle lokalisiert sind, proliferieren in hohem Maße und vermitteln somit die Ausdehnung des neugebildeten Blutgefäßes [153, 164]. Die migrierende Spitzenzelle sezerniert Fibronectin, welches zusammen mit dem Fibronectin der extrazellulären Matrix als eine Art adhäsiver Gradienten für nachfolgende Endothelzellen dient [163, 165, 166]. Fibronectin, welches von den Endothelzellen freigesetzt wird, bindet an

Matrix-Komponenten wie Kollagen, die ca. 30% der extrazellulären Matrix ausmachen [167, 168]. Im Gegenzug kann matrixgebundenes Fibronectin an Transmembranrezeptoren (z.B. Integrine) auf der Oberfläche von Endothelzellen binden und somit deren Migration vermitteln [169]. Dieser autokrine Signalweg, der auf Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsion beruht, wird als Haptotaxis bezeichnet [153]. Darüber hinaus ermöglicht die integrinvermittelte Adhäsion der Endothelzellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix (z.B. Fibronectin) die Aufrechterhaltung von notwendigen Überlebenssignalen. Endothelzellen sind sehr empfänglich für apoptotische Signale, wenn sie den Kontakt zu benachbarten Zellen oder der extrazellulären Matrix verlieren. Die Migration der Endothelzellen während der Angiogenese ist verbunden mit dem wiederholten Lösen und dem erneuten Aufbau dieser Zellkontakte. Die durch diverse pro-angiogene Proteine ausgelöste verstärkte Expression von Integrinen und die intensiven Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix liefern vermutlich die notwendigen Überlebenssignale und ermöglichen somit die Migration [154]. Nachdem die Endothelzellstrukturen eine geringe Distanz zurückgelegt haben, kommt es zur mehrfachen Verzweigung an der Spitze des Gefäßsprosses. Durch einen Prozess, der als Anastomose bezeichnet wird, können in räumlicher Nähe gelegene Gefäßsprosse fusionieren und Kreisstrukturen ausbilden. Zudem adhären die proliferierenden Endothelzellen miteinander und bilden eine Lumenstruktur, welche die Blutzirkulation ermöglicht [153] (Abb.I.4).

Anschließend wird die Basalmembran wieder aufgebaut und Perizyten und glatte Muskelzellen werden rekrutiert, um die neu entstandenen Gefäßwände zu stabilisieren [170]. Wie schon erwähnt, sind diese neu formierten Gefäßstrukturen oft desorganisierter und durchlässiger, was zu einem erhöhten interstitiellen Druck und zu einer ineffizienten Blutversorgung führt [155]. Der wachsende Tumor übt mechanischen Druck auf die anfälligen Blutgefäße aus. Dies kann eine temporale Störung der lokalen Blutversorgung bewirken, so dass neue Regionen mit akutem Sauerstoffmangel entstehen. Auf diese Weise werden die Tumorzellen wiederholt zur Sezernierung von VEGF stimuliert und die Bildung neuer Blutgefäße wird initiiert [171].

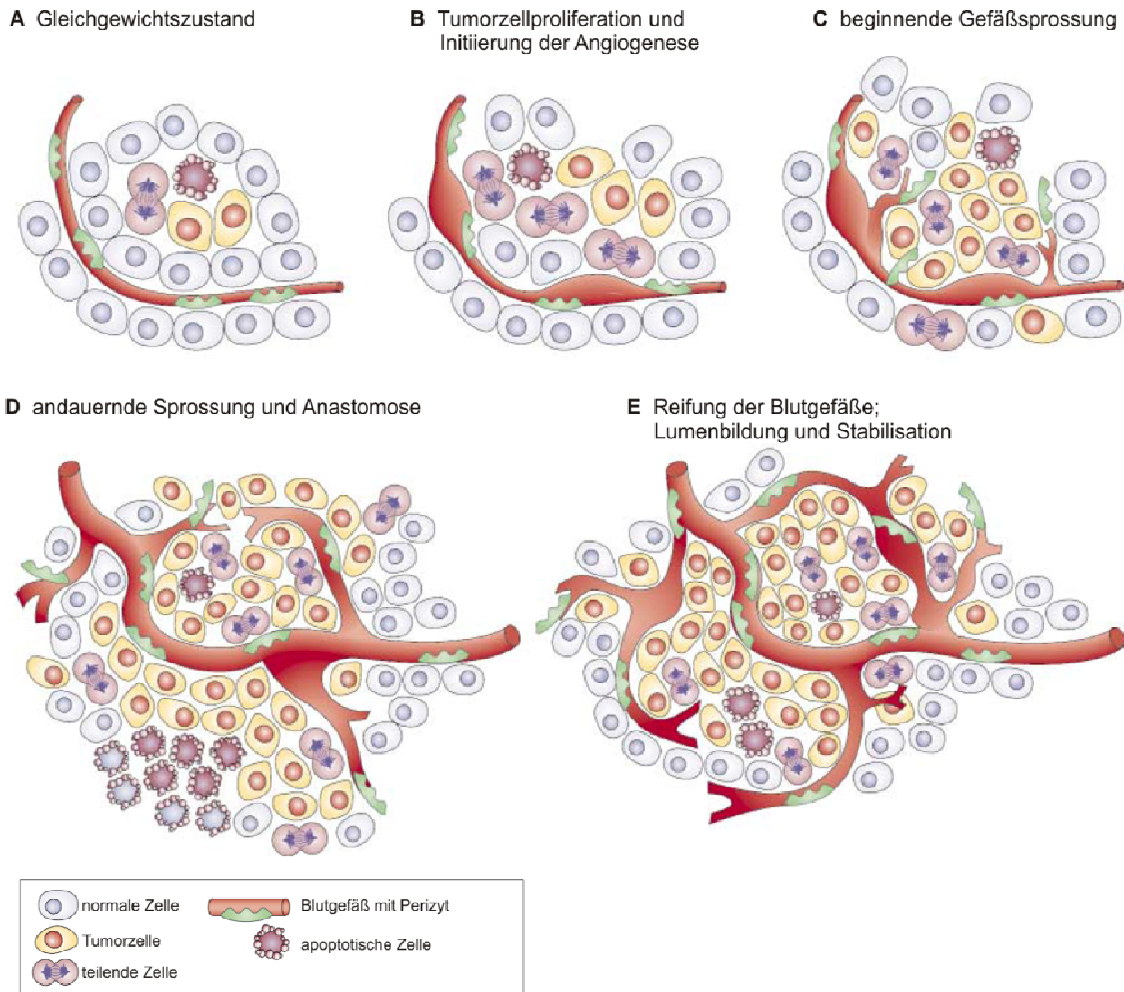


Abbildung I.4: Initiierung der Angiogenese

Die Blutgefäßneubildung ist ein separater Schritt während der Tumorentwicklung und kann zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Tumor-Progression stattfinden. Die Angiogenese wird maßgeblich von Interaktionen mit der Mikroumgebung beeinflusst. Viele Tumore befinden sich zunächst in einer Art Ruhezustand, der durch ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und dem Absterben der Zellen erreicht wird. Möglicherweise wird dieser Zustand durch Faktoren der Mikroumgebung ausgelöst, die die Mikrometastasen daran hindern, auf den angiogenen Phänotyp umzuschalten (A). Beginnt der Tumor zu proliferieren und wächst über eine bestimmte Größe hinaus, sezernieren hypoxische Tumorzellen infolge des Mangels an Sauerstoff und Glukose angiogene Wachstumsfaktoren. Daraufhin kommt es zur Initiierung der Angiogenese (B). Aufgrund der Gefäßerweiterung kommt es zur Einwanderung endothelialer Vorläuferzellen und die Gefäßsprossung beginnt (C). Die migrierenden und stark proliferierenden Endothelzellen umliegender Blutgefäße wandern in Richtung der Tumorzellen. Dabei spielen Interaktionen mit dem extrazellulären Matrixprotein Fibronektin eine wichtige Rolle. In räumlicher Nähe gelegene Gefäßsprosse fusionieren (Anastomose) und durch die anschließende Reifung wird die Lumenstruktur ausgebildet und stabilisiert (D, E). Die auf diese Weise neu entstandenen Gefäße versorgen den Tumor mit Sauerstoff und Nährstoffen und ermöglichen somit das Wachstum (Schema in Anlehnung an [150, 154]).

I.3.2. Mechanismen der organspezifischen Metastasierung

I.3.2.1. Metastasierung anatomisch benachbarter Organe

Bestimmte Krebstypen metastasieren bevorzugt in bestimmte Organe, während andere Gewebe nur selten kolonisiert werden. Dieser Organotropismus kann teilweise mit der Richtungsabhängigkeit des Blutstroms erklärt werden. Daher sind anatomisch benachbarte Organe mit vaskulärer Verbindung zu dem Primärtumor häufig von Metastasen betroffen. Dementsprechend erzeugen kolorektale Karzinome bevorzugt Lebermetastasen, welche auf die mesenteriale Zirkulation der Zellen vom Darm zu den leicht passierbaren Leberkapillaren zurückzuführen sind [172, 173]. Gefolgt dem Blutstrom, ist das zweithäufigste Organ, das von Metastasen des Darmkrebses befallen wird, die Lunge [174]. Jedoch trifft dieses Prinzip nur auf etwa ein Drittel der metastasierenden Tumore zu. Zum Beispiel bilden Brustkrebszellen viel häufiger Knochenmetastasen als die Anatomie vermuten ließe.

I.3.2.2. Strukturelle Eigenschaften der Kapillarwände

Die Infiltration von Tumorzellen kann ebenfalls durch strukturelle Eigenschaften der Kapillarwände in unterschiedlichen Organen beeinflusst werden (Abb. I.5). Die Kapillaren im Knochenmark werden als Sinusoid bezeichnet und weisen ein gefenstertes (fenestriertes) Endothel auf, um das Ein- bzw. Auswandern von hämatopoetischen Zellen zu erleichtern. Aus diesem Grund sind die Knochenmarksblutgefäße durchlässiger für zirkulierende Tumorzellen. Außerdem ist der Innendurchmesser der Sinusoiden relativ groß, was zu einem niedrigen Blutfluss im Vergleich zu den Kapillarnetzwerken anderer Gewebe führt [175, 176]. Infolgedessen wandern zirkulierende Brustkrebszellen bevorzugt in das Knochengewebe ein und bilden dort Fernmetastasen. Die Kapillaren der Leber sind ebenfalls fenestriert und werden im Vergleich zu anderen Organen von metastasierenden Zellen vorzugsweise durchquert [172, 173]. Im Gegensatz dazu sind Lungenkapillaren mit Endothelzellen ausgekleidet, die von einer Basalmembran und den angrenzenden alveolären Zellen umschlossen sind. Diese Basalmembran ist eine Barriere, die zirkulierende Tumorzellen nur überwinden können, wenn sie spezifische Mediatoren für die transendotheliale Migration exprimieren [177-180]. Die Blut-Hirn-Schranke stellt mit ihrer dichten Schicht von Endothelzellen und den sternförmig verzweigten Astrozyten, die die Kapillargefäße mit ihren Endfüßchen bedecken, eine weitaus größere Barriere dar. Demnach bedarf die Infiltration von zirkulierenden Tumorzellen in das Gehirnparenchym hoch spezialisierter Funktionen [181].

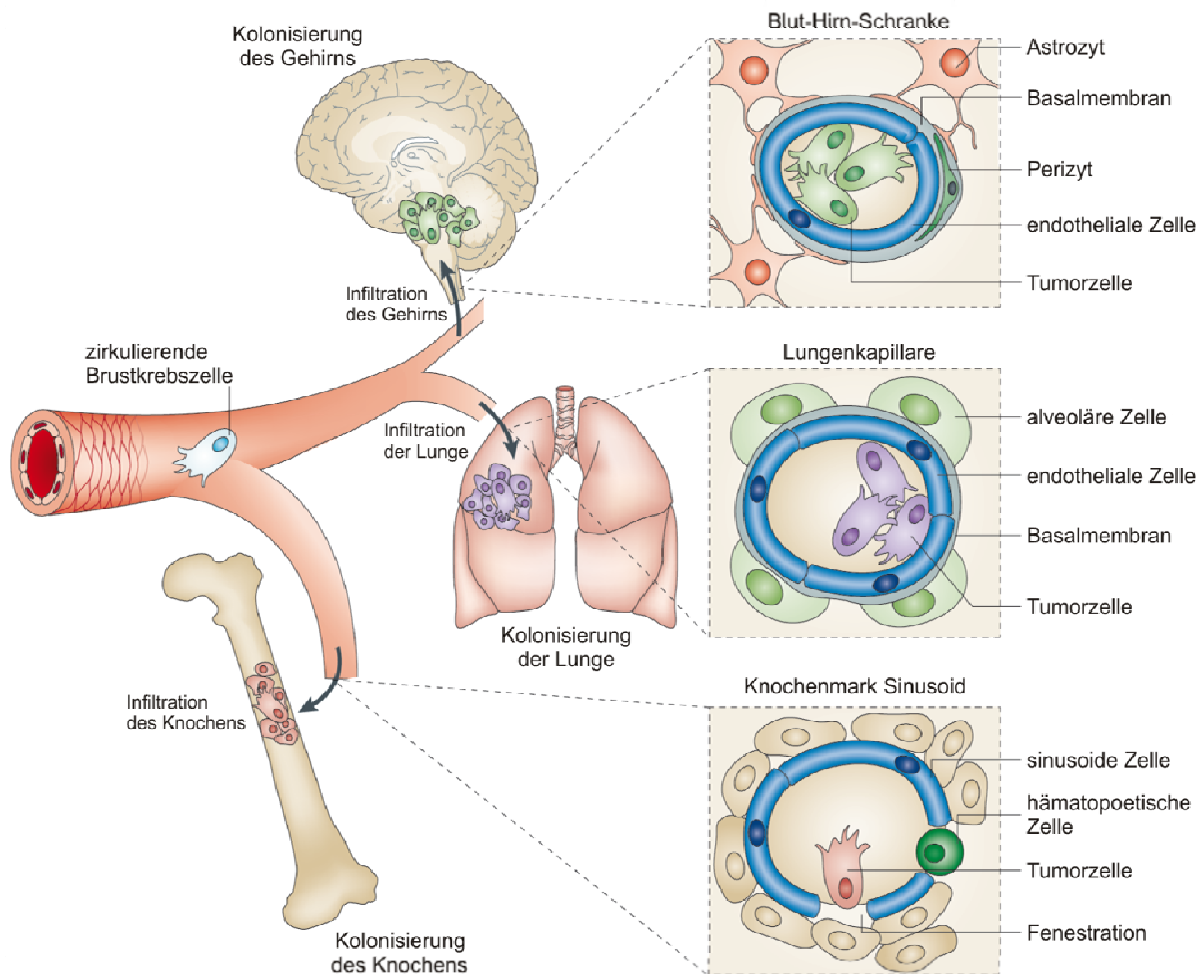


Abbildung I.5: Organspezifische Barrieren der metastatischen Infiltration

Schematische Darstellung potentieller Barrieren unterschiedlicher Organe, die zirkulierende Krebszellen während der Metastasierung überwinden müssen. Die Abbildung zeigt die anatomischen Unterschiede der Kapillarwände in diversen Organen. Krebszellen, die in den Blutkreislauf eintreten, können die organspezifischen Barrieren überwinden, wenn sie die notwendigen Funktionen für die Extravasation besitzen. Die fenestrierten Strukturen der sinusoiden Knochenmarkskapillaren sind, bezogen auf die Infiltration der Tumorzellen, durchlässiger, als die kontinuierlichen Strukturen der Lungenkapillarwände. Die Penetration der Gehirnkapillaren ist aufgrund des einzigartigen Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke problematischer. Die Überwindung dieser Barriere selektioniert Tumorzellen, die die notwendigen Extravasationfunktionen tragen. Diese Fertigkeiten können von Genen aktiviert werden, deren Expression in Primärtumoren unabhängig davon einen selektiven Wachstumsvorteil bietet oder aber von Genen, die dem Primärtumor nicht nützen, jedoch durch Signale der Mikroumgebung ausgelöst wurden (Schema in Anlehnung an [182]).

I.3.2.3. Rolle des Lymphgefäßsystems bei der Metastasierung

Die Metastasierung der regionalen Lymphknoten ist eines der frühen Anzeichen für die Ausbreitung bzw. Streuung maligner Tumore in Krebspatienten und geschieht etwa genauso häufig wie die hämatogene Dissimination von Tumorzellen [183, 184]. Lymphatische Mikrogefäße bestehen aus einem dünnwandigen Endothel, welches in der Regel nur spärlich mit Pericyten und vasculären glatten Muskelzellen bedeckt ist [185, 186]. Neueren Daten zur Folge bestehen peritumorale und intratumorale lymphatische Netzwerke aus desorganisierten Mikrogefäßen, de-

nen möglicherweise eine Drainage-Funktion fehlt [187, 188]. Die ineffiziente und undichte Struktur dieser Lymphgefäße ist vermutlich für die erleichterte Invasion der Tumorzellen verantwortlich [189]. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass lymphatische Endothelzellen tumorassoziierter lymphatischer Netzwerke von den Tumorzellen zur Sezernierung löslicher Faktoren stimuliert werden, die wiederum den Tumorzellen die Transmigration durch das Endothel erleichtern [190, 191]. Der genaue Mechanismus, wie die Tumorzellen in die Lymphgefäßen gelangen, ist jedoch immer noch unklar. Für etliche Tumore wurde eine Vermehrung und Vergrößerung der Lymphgefäße in der peritumoralen Umgebung gezeigt [192, 193]. Die Anzahl der Lymphgefäße korreliert mit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen [192, 193] und es konnte nachgewiesen werden, dass die Neubildung von Lymphgefäßen in der unmittelbaren Nähe eines Tumors die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung erhöht [194-196].

I.3.2.4. Adhäsion an Endothel

Neben diesen anatomisch begründeten Ursachen adhären unterschiedliche Karzinomzellen vorzugsweise an bestimmte Endothelien, so dass wahrscheinlich spezifische molekulare Mechanismen diese Vorgänge begünstigen [197]. So konnte für Brustkrebszellen, die das Zelladhäsionsmolekül Metadherin überexprimierten, im Mausmodell gezeigt werden, dass diese Zellen spezifisch an Lungengefäße adhärten und somit vermehrt Lungenmetastasen induzierten [198]. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass das von Brustkrebszellen exprimierte Integrin $\alpha_v\beta_3$ die Adhäsion an die Knochenmatrix ermöglicht. Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet an die RGD-Sequenz diverser Matrixproteine wie Fibronectin, Osteopontin, Vitronectin und Knochen-Sialoprotein [116].

I.3.2.5. Genexpressionsprofile korrelieren mit der Organspezifität

Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass die genetische Regulation und Aktivierung von spezifischen Chemokinen/Zytokinen und ihren Rezeptoren, sowie Integrine, Matrixmetalloproteasen und diverse sezernierte Faktoren, Tumorzellen dazu veranlassen, bestimmte Organe anzu-steuern. Für Brustkrebszellen konnten Genprofile identifiziert werden, welche in Kombination die zielgerichtete Metastasierung zum Knochen bzw. zur Lunge beeinflussten. Wiederholte Runden von *in vivo* Passagen humaner Tumorzellen und die anschließende organspezifische Selektion führte zur Isolation verschiedener Sublinien, die ausschließlich zu bestimmten Organen metastasierten [199-201]. Genexpressionsanalysen dieser organotropen Sublinien zeigten einen Zusammenhang zwischen bestimmten Genen und der organspezifischen Metastasierung. Für die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 konnte ein 43 Gene umfassendes Profil erstellt werden, welches die Metastasierung des Knochens kennzeichnete. Gene des knochenmetastasierenden Profils waren in verschiedenen Prozessen der Metastasierung involviert, wie *Homing*,

Angiogenese, Invasion und Osteoklasten-Rekrutierung [202]. Die Mehrheit der Gene kodierte jedoch für Proteine, die auf irgendeine Weise relevant für die Mikroumgebung des Knochens waren. Wenngleich keines dieser Gene durch Überexpression alleine dazu in der Lage war, den knochenmetastasierenden Phänotyp in der Ausgangslinie zu induzieren, so führte die kombinierte Expression von mehreren Genen zur zielgerichteten Metastasierung des Knochengewebes [202]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass dieser organotrope Phänotyp zumindest im Falle von Knochenmetastasen durch das Zusammenspiel verschiedener Gene mit komplementären Proteinfunktionen erzeugt wird [199, 202].

I.3.2.6. Chemokinrezeptor vermittelte Chemotaxis

Es wird vermutet, dass Chemokine im Zusammenhang mit Adhäsions-Rezeptoren das Festsetzen und die Extravasation von Tumorzellen beeinträchtigen. Tumorzellen exprimieren eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren, einschließlich CXCR4 (engl. „CXC motif chemokine receptor 4“), der als Rezeptor für SDF-1 (engl. „stromal cell-derived factor 1“; alternativ bezeichnet als CXCL12, engl. „chemokine CXC motif ligand 12“) dient [203]. SDF-1 steuert während der Entwicklung die Zellbewegung von hämatopoetischen Zellen, wobei es die Transmigration durch die Endothelzellbarrieren ermöglicht [204]. Vor allem reguliert SDF-1 die Migration hämatopoetischer Stammzellen in, bzw. aus dem Knochenmark heraus. Die Sekretion von SDF-1 durch im Wirtsstromagewebe lokalisierte Fibroblasten begünstigt offenbar die Chemotaxis von CXCR4 exprimierenden Tumorzellen und ist zumindest teilweise an der zielgerichteten Metastasierung bestimmter Tumortypen beteiligt (Abb. I.6). Zellen aus normalem Brustgewebe weisen eine niedrige Anzahl an CXCR4-Rezeptoren auf, wohingegen Brustkrebszellen auf ihrer Zelloberfläche vermehrt CXCR4 exprimieren [205]. Die erhöhte Expression von CXCR4 bei Prostata Tumoren konnte mit einer allgemein schlechten Überlebensrate von Prostatakrebspatienten assoziiert werden [206]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die SDF-1 vermittelte Signaltransduktion durch CXCR4 die Adhäsion von Tumorzellen an Knochenmarksendothelzellen über die Aktivierung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ bewirkt [207].

I.3.2.7. Interaktionen mit der Mikroumgebung

Die Fähigkeit von Tumorzellen zu metastasieren und Sekundärtumore zu bilden ist von den Interaktionen mit der Mikroumgebung, einschließlich der Wechselwirkungen mit benachbarten Zellen und der extrazellulären Matrix, abhängig [208]. Eine Erklärung für diese Beobachtungen wurde bereits vor 100 Jahren mit der „seed and soil“-Hypothese formuliert. Diese beschreibt Tumorzellen als Saat (engl. „seed“), deren Wachstum hauptsächlich von den Wechselwirkungen der Mikroumgebung (engl. „soil“, z.B. Ab- bzw. Anwesenheit von wachstumshemmenden oder -

stimulierenden Faktoren) beeinflusst wird. Demzufolge ist die Ausbildung einer proliferierenden Metastase nur dann möglich, wenn die Tumorzellen sich in einer für ihr Wachstum geeigneten Umgebung befinden [209].

I.3.2.7.1. Modellierung der Mikroumgebung

Ein Beispiel für die Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und der Mikroumgebung liefern die Prozesse, die bei der Etablierung von Knochenmetastasen ablaufen. Die Entwicklung und die Stimulation des Tumorzellwachstums im Knochen basieren auf komplexen und dynamischen Prozessen. Diese beruhen auf den biologischen Eigenschaften der Tumorzellen selbst, dem Mikromilieu des Knochenmarks und einem Netzwerk aus Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Matrixmetalloproteasen [210].

Tumorzellen, die im Knochengewebe Fernmetastasen bilden, führen zu einer Veränderung des Gleichgewichts zwischen Osteoklasten, den Knochensubstanz abbauenden Zellen und den Osteoblasten, den knochenbildenden Zellen [211-213]. Normalerweise besteht zwischen beiden Zellarten ein Gleichgewichtszustand, so dass die Knochensubstanz durch Aufbau- und Abbauvorgänge immer wieder an die verschiedenen mechanischen Belastungen angepasst werden kann [214]. Tumorzellen können den Knochenstoffwechsel in zwei unterschiedliche Richtungen beeinflussen. Durch die Freisetzung von Faktoren, die Osteoklasten zu einem vermehrten Knochenabbau stimulieren, entstehen osteolytische Knochenläsionen [215]. Wohingegen osteoblastische Metastasen Faktoren sezernieren, die die Proliferation, die Differenzierung und letztlich die Knochenformation durch Osteoblasten stimulieren [216]. Morphologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Knochenmetastasen zugleich Elemente osteolytischen und osteoblastischen Wachstums aufweisen. Jedoch überwiegt bei den meisten Krebstypen eine dieser Wachstumsformen [217]. In beiden Fällen führt der Knochenumbau zu einer Schwächung des Knochengewebes. Sowohl der Abbau von Knochensubstanz als auch der Aufbau eines instabilen Knochengengerüsts mit abnormer Knochenstruktur kann den mechanischen Belastungen nicht mehr so gut standhalten.

Brustkrebszellen sezernieren diverse Faktoren, die stimulierend auf Osteoblasten, Osteoklasten und andere Zellen im Knochenmark wirken. Diese setzen wiederum Substanzen frei, die die Tumorzellen zur Proliferation und zur Sekretion weiterer Faktoren anregen [218]. Der von den meisten humanen Brustkrebszellen gebildete Faktor PTHrP (engl. „parathyroid hormone-related peptide“) spielt bei der Osteoklasten-Aktivierung, und somit bei der Metastasierung des Knochenmarks, eine übergeordnete Rolle [219]. Mammakarzinomzellen, die Metastasen im Knochenmark gebildet haben, weisen eine deutlich höhere PTHrP-Expression auf als Metastasen in anderen Sekundärorganen [220, 221]. Weitere Faktoren, die zur Osteoklasten-Aktivierung beitragen, sind

IL-6 (Interleukin-6), IL-11, TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und M-CSF (engl. „macrophage colony-stimulating factor“). PTHrP, IL-6, IL-11 und TNF- α stimulieren Osteoblasten zur Expression von RANKL (engl. „receptor activator of nuclear factor κ -B ligand“) und hemmen gleichzeitig die Freisetzung des RANKL Antagonisten OPG (Osteoprotegerin). RANKL bindet an den entsprechenden Rezeptor RANK auf der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen und stimuliert zusammen mit M-CSF die Entwicklung aktivierter Osteoklasten [202, 217, 222, 223]. Letztere degradieren die Knochenmatrix und setzen dabei immobilisierte Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie TGF- β , IGFs (engl. „insulin-like growth factors“) und BMPs (engl. „bone morphogenetic proteins“), frei. Auf diese Weise wird ein Kreislauf in Gang gesetzt, der das Fortschreiten des Tumorwachstums zusätzlich verstärkt (Abb. I.6) [182].

Zelluläre Vorgänge, die für die knochenbildenden Prozesse osteoblastischer Metastasen verantwortlich sind, umfassen die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten, sowie die Apoptose von Osteoklasten [217]. Endothelin-1 ist ein bedeutender Wachstumsfaktor, der die Proliferation von Osteoblasten stimuliert und somit die Knochenbildung veranlasst. Endothelin-1 wird von diversen Prostatakarzinomen exprimiert, sowie von Brustkrebszellen, die vorrangig osteoblastische Metastasen bilden [222, 224]. Weitere mitogene Faktoren, die die Proliferation von Osteoblasten anregen, sind TGF- β , IGF, FGF (engl. „fibroblast growth factors“) und PDGF (engl. „platelet-derived growth factor“). TGF- β induziert außerdem die Apoptose von Osteoklasten und ist vermutlich für ihre begrenzte Lebensdauer verantwortlich [217]. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass diverse Prostatakarzinome RANKL und PTHrP sezernieren, welche wie zuvor beschrieben unmittelbar oder indirekt Osteoklasten stimulieren [225, 226], so dass das osteoblastische Tumorwachstum ebenfalls osteolytische Komponenten aufzeigt.

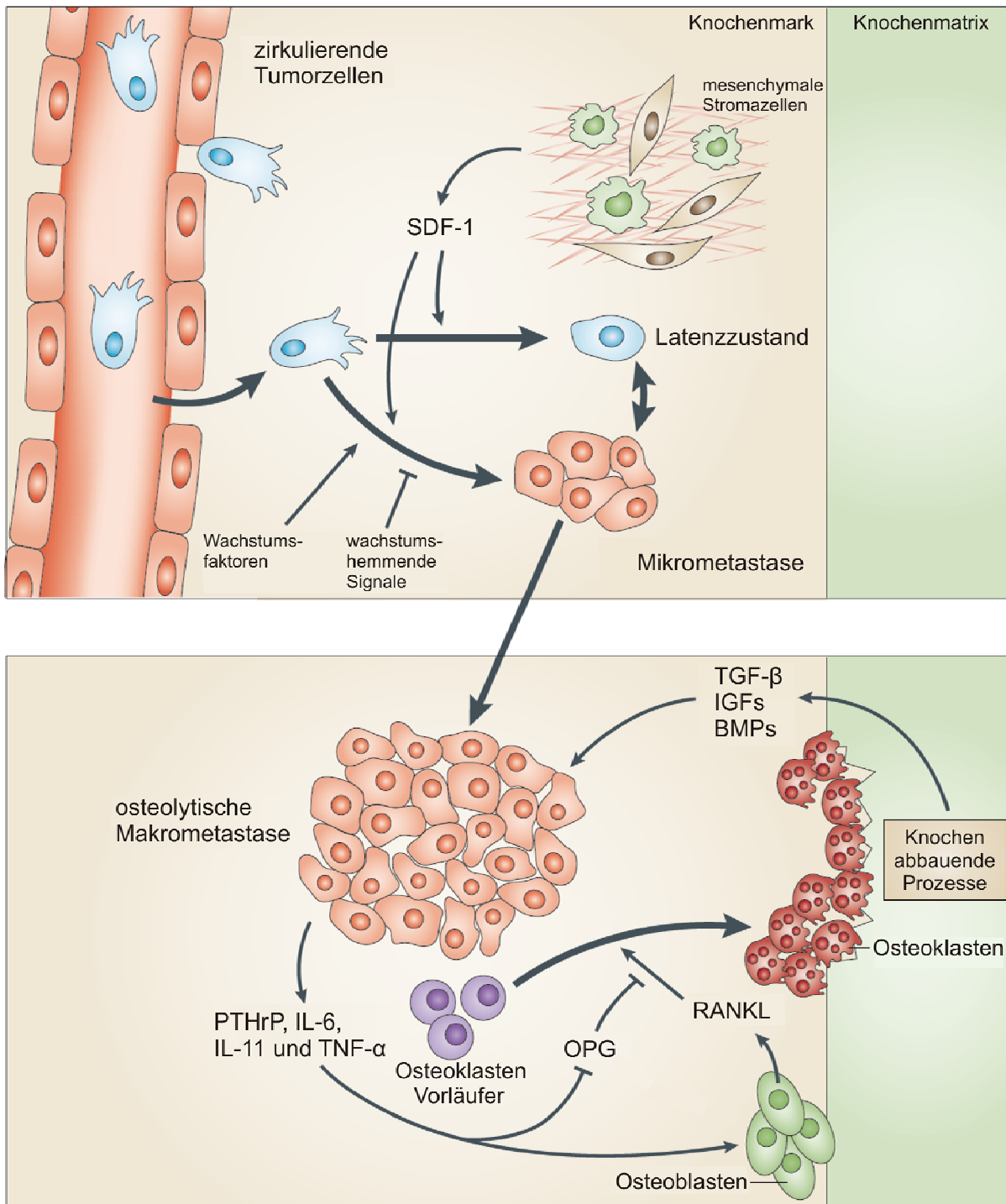


Abbildung I.6: Kaskade der osteolytischen Metastasierung

Im Wirtsstromagewebe lokalisierte Fibroblasten sezernieren SDF-1, welches chemotaktisch auf CXCR4 exprimierende Tumorzellen wirkt. Zirkulierende Tumorzellen wandern über die fenestrierten Sinusoiden in das Knochenmark ein. Wachstumshemmende oder -stimulierende Faktoren beeinflussen die Proliferation der Tumorzellen. Disseminierte Tumorzellen, die die Fähigkeit erlangen, PTHrP, TNF- α , IL-6 und/oder IL-11 zu sezernieren, hemmen die Freisetzung von OPG und stimulieren zugleich die Expression von RANKL durch Osteoblasten. RANKL bindet an entsprechende Rezeptoren und stimuliert die Entwicklung von Osteoklasten aus myeloiden Vorläuferzellen. Aktivierte Osteoklasten sondern in einem lokal begrenzten Bereich (Howship-Lakune) spezielle Proteasen und starke Säuren ab und degradieren auf diese Weise die Knochenmatrix. Dabei werden Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt, die normalerweise in der Knochensubstanz gebunden vorliegen. Diese Faktoren stimulieren wiederum die Proliferation der Tumorzellen. Die Größe der schematisch dargestellten Osteoklasten und Osteoblasten steht nicht im realen Verhältnis zueinander (modifiziert nach [182, 217]).

I.3.3. Das metastatische Nischen-Modell

Die Streuung maligner Zellen vom Primärtumor zu Sekundärorten wurde lange Zeit, bezogen auf die Tumorprogression und die Aneignung maligner Charakteristika, als ein relativ spät eintretendes Ereignis angesehen. Jedoch gibt es viele Hinweise darauf, dass die Initiierung der Metastasierung bereits zu einem früheren Zeitpunkt beginnt als bisher angenommen. Fortschrittliche immunzytochemische und molekularbiologische Methoden, die dazu in der Lage sind, selbst einzelne Tumorzellen nachzuweisen, haben gezeigt, dass zirkulierende Tumorzellen häufig im Blut oder Knochenmark von Krebspatienten belegt werden konnten, bevor Metastasen klinisch oder histopathologisch aufgezeigt wurden [227].

Vom Primärtumorverband abgelöste Zellen müssen die für ihr Überleben ungünstigen Bedingungen im Blutkreislauf überstehen und anschließend über einen intensiven Signalaustausch mit dem fremden Stroma kommunizieren. Diese komplexen Vorgänge könnten durch eine im Vorfeld entsprechend modifizierte Mikroumgebung erleichtert werden [228]. Nach erfolgter Extravasation und Invasion sekundärer Gewebe werden das Überleben und das Wachstum der Tumorzellen von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen der Mikroumgebung beeinflusst (siehe auch Kapitel I.1.3.1. und I.3.1.2.).

I.3.3.1. Die Stammzellnische im Knochenmark

In der Stammzellbiologie wird eine Nische als spezialisierte Mikroumgebung beschrieben, in der Stammzellen residieren, ein Selbsterneuerungsprogramm durchlaufen, sowie ihre Zellfunktion und Zellproliferation aktiv regulieren. Strukturell setzt sich die Nische aus unterstützenden Zellen zusammen, die eine optimale Mikroumgebung für die Stammzellen konstruieren. Innerhalb der Nische findet ein intensiver Signalaustausch zwischen den Stammzellen und den Nischenzellen statt, der bewirkt, dass die Stammzelle ihre Stammzeleigenschaften behält und sich nicht weiter differenziert [229-231]. Im Knochenmark konnten 2 unterschiedliche Nischen identifiziert werden, die das Wachstum hämatopoetischer Stammzellen begünstigen, und durch die Lokalisation und den vorrangigen Zelltyp charakterisiert werden. Es wird zwischen der vaskulären Nische, die im Bereich der sinusoidalen Blutgefäße angesiedelt ist, und der osteoblastischen Nische differenziert [103, 229, 231]. Ein ähnliches Modell wurde vorgeschlagen, um die Interaktionen von malignen Zellen mit der Mikroumgebung zu beschreiben [232-234].

I.3.3.2. Die metastatische Nische

Die Mikroumgebung des Primärtumors ist durch eine bestimmte strukturelle extrazelluläre Matrix-Architektur gekennzeichnet. Diese beinhaltet unterstützende (nicht maligne) Stromazellen, lösliche Faktoren, ein Gefäßnetzwerk und diverse Nährstoffe und Stoffwechselbestandteile [235-237]. Zusätzlich ist eine tumorpermissive immunologische oder inflammatorische Mikroumgebung notwendig, um ein optimales Tumorwachstum zu gewährleisten [238]. Das metastatische Nischenmodell geht davon aus, dass eine entsprechend geeignete Mikroumgebung vor dem eigentlichen Eintreffen metastasierender Tumorzellen entstehen muss (prämetastatische Nische), so dass es zur Einnistung (metastatische Nische) und Proliferation an Sekundärorten kommen kann (Transition von der Mikrometastase zur Makrometastase).

Es wird vermutet, dass Tumorzellen Faktoren sezernieren, die die Nischenbildung initiieren, oder dass bereits vorhandene physiologische Nischen (Stammzellnischen), wie die vaskuläre Nische oder die osteoblastische Nische, den Bedürfnissen der Tumorzellen entsprechend modifiziert werden [228]. Dabei ist die Adaption der Mikroumgebung eine essentielle Voraussetzung für das sekundäre Tumorwachstum disseminierter Zellen. Beweise für diese Hypothese basieren primär auf Beobachtungen in Mausmodellen und konzentrieren sich auf die Lunge als Zielorgan, wobei aber auch andere Organe wie Knochen, Leber oder Gehirn untersucht wurden [103, 239]. Ob dieses Modell generell auf die Metastasierung solider Tumore anwendbar ist oder nur auf bestimmte Krebstypen zutrifft, ist bisweilen nicht vollständig geklärt [228].

I.3.3.2.1. Initiierung der prämetastatischen Nische

Wachstumsfaktoren, die vom Primärtumor abgegeben werden, bereiten entfernte Gewebe auf die Besiedelung durch disseminierte Tumorzellen vor [103]. Alternativ könnten jedoch auch zirkulierende Tumorzellen, die selbst kein metastatisches Potential besitzen, Faktoren sezernieren, die die prämetastatische Nische für die Besiedelung durch invasivere Subpopulationen vorbereiten [240-242]. Für die Bildung von Lungenmetastasen konnte nachgewiesen werden, dass tumorzell-spezifische Faktoren Fibroblasten und ähnliche Zellen dazu anregen, vermehrt Fibronectin im Bereich zukünftiger Metastasen zu sezernieren. Dieses stellt attraktive Bindungsstellen für disseminierte Tumorzellen bereit [103, 208]. In Reaktion auf die erhöhte Fibronectinfreisetzung wandern tumorassoziierte Zellen, wie hämatopoetische Vorläuferzellen (engl. „haematopoietic progenitor cells“, HPCs) und Makrophagen, in das Zielgewebe ein und bereiten die Nische weiter für das Einwandern der Tumorzellen vor [103, 243]. Ob Fibronectin einzig von Wirtsstromazellen sezerniert wird oder die Tumorzellen ebenfalls Fibronectin in die extrazelluläre Matrix einlagern, ist bisher noch unklar. Jedoch haben Studien in immundefizienten Mäusen unter der Verwendung spezifischer Antikörper gegen humanes Fibronectin gezeigt, dass das neu synthetisierte Fibronectin

der metastatischen Nische zumindest teilweise von den Tumorzellen stammt [103, 239]. Zudem produzieren unterschiedliche Tumortypen verschiedenartige Faktoren, die ganz bestimmte Zielgewebe zur Fibronectinproduktion anregen. Dies würde auch erklären, warum die einzelnen Tumorarten bevorzugt in bestimmte Körpergewebe streuen. So erzeugen etwa Brust- und Prostata-tumore hauptsächlich Metastasen im Knochengewebe, wohingegen Lungentumore häufig Absiedelungen in Gehirn und Rückenmark bilden [103, 244].

I.3.3.2.2. Etablierung der Nische für das Tumorwachstum

Die Mobilisierung von Tumorzellen wird vorwiegend durch angiogene Zytokine, wie VEGF-A und PlGF (engl. „placenta growth factor“), ausgelöst, welche spezifisch an VEGFR-1 binden [103]. Aber auch diverse inflammatorische Zytokine, wie TGF- α und TGF- β , sind an den Rekrutierungsprozessen von hämatopoetischen Zellen und Tumorzellen zur prämetastatischen Nische beteiligt [243]. Im Bereich der prämetastatischen Nische kollaborieren gerade erst eingetroffene myeloide Zellen mit anderen Zelltypen, wie Stromazellen und Endothelzellen, die im Gewebeparenchym angesiedelt sind. In ihrer Gesamtheit stellen diese Zellen eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Matrix-Degradationsenzymen und Adhäsionsmolekülen bereit, die die Etablierung einer metastatischen Läsion beschleunigen [243]. Hierzu zählen die inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, RANKL und TNF- α [238, 245, 246]. Letzteres wird vorwiegend von myeloiden Wirtszellen freigesetzt und beeinflusst verschiedene Stufen des Metastasierungsprozesses, einschließlich Tumorzellproliferation, eine verstärkte vaskuläre Permeabilität und die Rekrutierung weiterer Wirtszellen. Auch Tumorzellen sezernieren Faktoren, die myeloide Zellen direkt dazu beeinflussen, wachstumsfördernde Zytokine, wie TNF- α , abzugeben [246]. Diese regen Makrophagen durch Interaktionen mit den Tumorzellen dazu an, TNF- α freizusetzen [246] (Abb. I.7).

Vermutlich ist eine der Hauptaufgaben tumorassoziierter myeloider Zellen, die Zellen des Immunsystems dahingehend zu manipulieren, dass sie einen immunsuppressiven bzw. anti-inflammatorischen Phänotyp annehmen. Auf diese Weise könnten die Tumorzellen der Detektion durch die Immunabwehr entkommen und ungehindert proliferieren [247]. Neben myeloiden Zellen wirken auch andere Zelltypen an der Etablierung der prämetastatischen Nische mit. So ist z.B. die Rekrutierung VEGFR-1⁺-hämatopoetischer Vorläuferzellen in wachsenden Tumoren abhängig von der Freisetzung von SDF-1 durch Thrombozyten [248]. Des Weiteren wäre es denkbar, dass Thrombozyten chemokine- und angiogeneseregulierende Faktoren freisetzen und somit die Etablierung und das Fortschreiten der Metastasen beeinflussen [249, 250].

Tumorassozierte Fibroblasten (CAF, engl. „cancer-associated fibroblast“) befinden sich, im Vergleich zu ruhenden Fibroblasten in benignen Geweben, in einem andauernden aktivierten Zustand, proliferieren schneller und lagern größere Mengen an extrazellulärer Matrix ab [251]. Tu-

morassozierte Fibroblasten übernehmen wichtige Aufgaben, bezogen auf die Initiierung der Tumorgenese sowie der malignen Progression, indem sie die Proliferation und die Motilität maligner Zellen beeinflussen [103, 239, 252]. Außerdem dienen sie als Quelle für Matrixmetalloproteasen, die wiederum die Degradation der extrazellulären Matrix einleiten [253].

I.3.3.2.3. Die Rolle der extrazellulären Matrix

Die Remodellierung der lokalen Umgebung ist unerlässlich, um die Tumorzell-Invasion sowie ein Tumorwachstum zu ermöglichen. Aus diesem Grund ist die Expression von Matrixmetalloproteasen (MMPs) in der prämetastatischen Nische ebenfalls hochreguliert [254]. Durch die Degradation der extrazellulären Matrix werden Wachstumsfaktoren und Chemokine freigesetzt, die ihrerseits wiederum Tumorzellen und hämatopoetische Vorläuferzellen rekrutieren [103].

Das Enzym Lysyloxidase (LOX) wird von humanen Tumorzellen bei Sauerstoffmangel vermehrt gebildet. Normalerweise verstärkt das Enzym die Struktur der extrazellulären Matrix, indem es Kollagene und Elastine vernetzt [255]. Die erhöhte Lysyloxidase-Expression steigert die invasive Migration von humanen Tumorzellen [256]. Außerdem ist die Lysyloxidase vermutlich bei der Etablierung der prämetastatischen Nische beteiligt, indem es Bestandteile der extrazellulären Matrix dahingehend modifiziert (z.B. durch Quervernetzung von Kollagenfibrillen), dass die Infiltration myeloider Zellen begünstigt wird [239]. Die Hemmung der Lysyloxidase-Synthese bei humanen Brustkrebszellen hatte eine verringerte Anzahl myeloider Zellen in prämetastatischen Organen zur Folge, was die Metastasierung verminderte [239]. In hypoxischem Gewebe kommt es zusätzlich zu einer erhöhten Bildung von Fibronectin [257]. Dieses ist dazu in der Lage, die Effektivität der Lysyloxidase zu steigern [258]. Somit begünstigt die Kolo-kalisation von Fibronectin und Lysyloxidase in der prämetastatischen Nische das Einwandern von myeloiden Zellen und trägt zur Initiierung der Nischenbildung bei [239]. Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob das von den Tumorzellen sezernierte Fibronectin und das Enzym Lysyloxidase lokal von disseminierenden Tumorzellen sezerniert werden, die sich sozusagen auf der „Durchreise“ befinden, oder zu einem früheren Zeitpunkt in der Entstehungsphase der prämetastatischen Nische abgegeben werden [228].

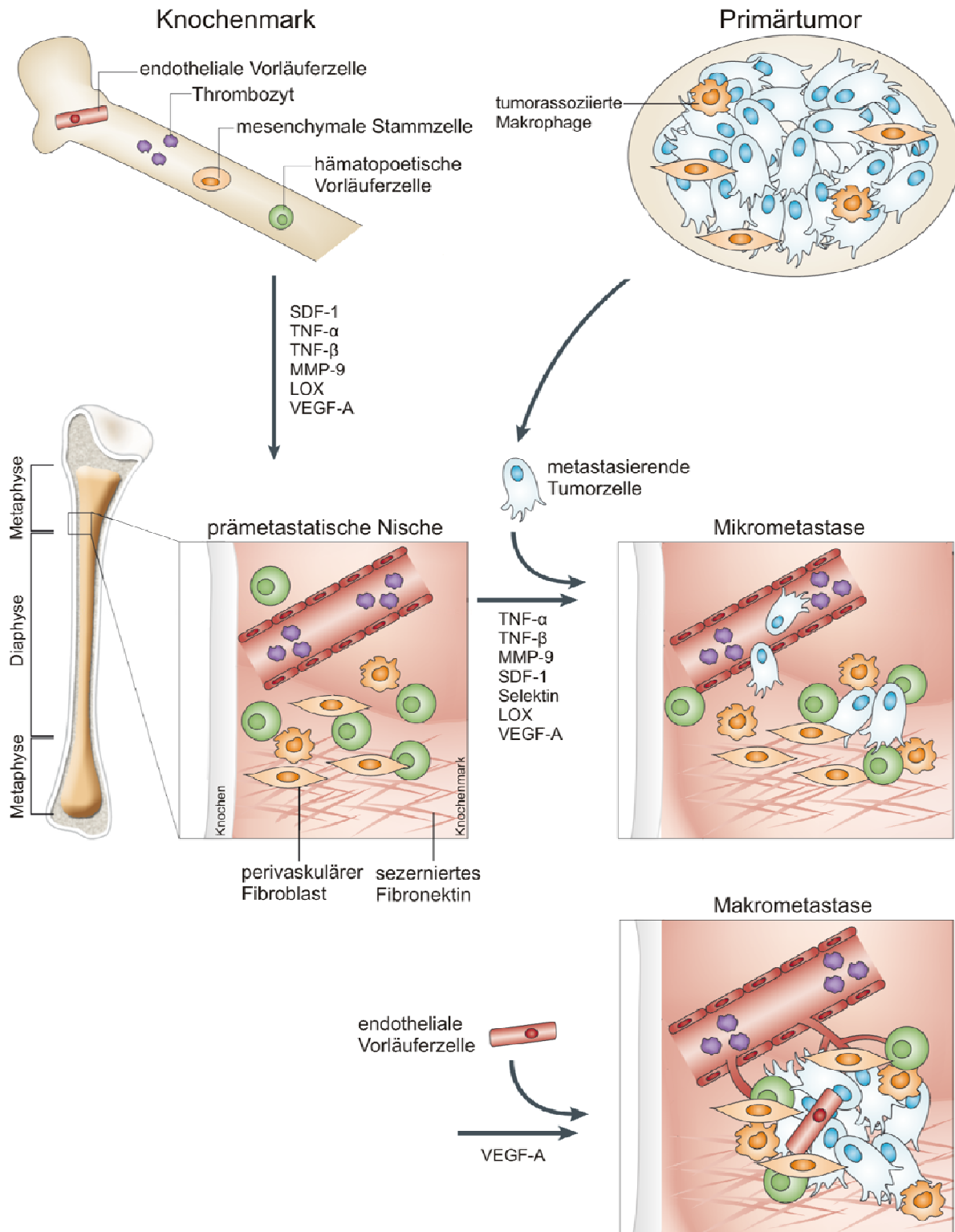


Abbildung I.7: Die Entwicklung der prämetastatischen Nische zur Makrometastase

Lösliche Faktoren, die von Tumorzellen sezerniert werden, veranlassen hämatopoetische Vorläuferzellen, Zellcluster im Bereich der prämetastatischen Nische zu bilden und stimulieren die Freisetzung diverser prämetastatischer Faktoren (z.B. TNF- α , MMP-9, LOX und SDF-1). Aktivierte Fibroblasten lagern Fibronectin in die extrazelluläre Matrix ein. Dieses stellt attraktive Bindungsstellen für disseminierte Tumorzellen bereit, die in die Nische einwandern. Die Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen leitet die Angiogenese ein und erlaubt das makrometastatische Wachstum (Schema in Anlehnung an [228, 231, 259]).

I.3.3.3. Besondere Stellung des Knochenmarks

Die Interaktionen zwischen Zellen und der Mikroumgebung im Knochenmark sind analog zu den Interaktionen von Tumorzellen und der entsprechenden Stroma-Mikroumgebung des Primärtumors. Aus dieser Sicht wäre es denkbar, dass die Knochenmarksnische bereits über eine geeignete Zusammensetzung verfügt, um als metastatische Nische zu dienen. Auch könnten bereits vorhandene physiologische Nischen wie die Stammzellnischen den Anforderungen der Tumorzellen entsprechend modifiziert werden [228]. Dies würde auch die höheren Überlebensraten der Tumorzellen im Knochenmark im Vergleich zu anderen Organen bei Krebspatienten erklären [227]. Die Mikroumgebung des Knochenmarks weist für Metastasen diverser Tumortypen besonders geeignete Spezifikationen auf. Dies kann einerseits auf die hohe Expression spezifischer Zytokine, wie SDF-1, welches das Tumorzell-*Homing* unterstützt, zurückgeführt werden und andererseits auf die hohe Anzahl an Wachstumsfaktoren, die während der Reifung hämatopoetischer Zellen oder der kontinuierlichen Remodellierungs-Prozesse des Knochens freigesetzt werden [260].

I.4. Spontane Tumorregression

Die spontane Rückbildung von Tumoren ohne medizinische Behandlung ist für verschiedene humane Krebsarten nachgewiesen worden. Möglicherweise existiert ein seltener, aber äußerst effektiver Mechanismus, um Tumorzellen selbst bei fortgeschrittenen Krebserkrankungen zu beseitigen. Allerdings finden sich in der Literatur nur unzureichende Erklärungen für dieses beim Menschen selten auftretende Phänomen [261-266].

Cui *et al.* konnten in ihrem Labor einen Mausstamm etablieren, der gegen verschiedene Krebstypen resistent war. Dieser Mausstamm geht auf einen Vorfahren zurück, der eine Resistenz gegenüber der hoch aggressiven Sarkomzelllinie S-180 (maligner Tumor, der aus dem Mesoderm hervorgeht) zeigte. Diese Zellen zeichnen sich durch die Abwesenheit des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, engl. „major histocompatibility complex“) aus und können deshalb Krebserkrankungen in allen Stämmen von Labormäusen [267, 268] und -ratten [269, 270] hervorrufen. S-180 Zellen wachsen vorwiegend in der Suspension der Bauchhöhle und führen zu einer Flüssigkeitsansammlung in der freien Bauchhöhle (Aszites). Aus diesem Grund sterben Mäuse, denen S-180 Zellen in die Bauchhöhle implantiert wurden, normalerweise nach 3-4 Wochen. Ein männliches Versuchstier zeigte auch nach wiederholten Applikationen unterschiedlicher Mengen an S-180 Zellen keine Anzeichen einer Krebserkrankung. Interessanterweise ergaben Kreuzungsexperimente, dass diese vollständige Resistenz (VR) gegenüber den Tumorzellen auf die

Nachkommen übertragbar war. Die Auswertung des Vererbungsmusters deutete an, dass es sich vermutlich um eine einzelne Mutation eines einzelnen Gens handelte, welches dominant vererbt wurde. In einem weiteren Versuchsansatz konnte nachgewiesen werden, dass die VR-Mäuse gegen diverse Krebstypen, wie Leukämie, Lymphome und Karzinome, resistent waren und dass die Resistenz nicht ortsgebunden war. Tumorzellen, die VR-Mäuse implantiert wurden, wurden innerhalb von 24 Stunden beseitigt. Dies war verbunden mit der Aggregation bzw. Umlagerung der Tumorzellen, bestehend aus zahlreichen Leukozyten. Vorwiegend handelte es sich um Zellen der angeborenen Immunität, wie neutrophilen Granulozyten, natürliche Killerzellen und Makrophagen, die eine Lyse der Tumorzellen verursachten. Dieser Resistenzmechanismus war tumorspezifisch und verlief ohne signifikante Schädigung des umliegenden Gewebes. Außerdem konnte mittels athymischer Mäuse, die nicht dazu in der Lage sind reife T-Zellen zu produzieren, nachgewiesen werden, dass der Resistenzmechanismus T-Zell unabhängig verläuft. Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die Resistenz gegenüber den Tumorzellen altersabhängig verlief. VR-Mäuse, denen Tumorzellen im Alter von 6 Wochen appliziert wurden, entwickelten zu keinem Zeitpunkt eine detektierbare Ansammlung von Tumorzellen. VR-Mäuse, denen hingegen Tumorzellen im Alter von 5 Monaten implantiert wurden, zeigten zunächst ein mit Kontrolltieren vergleichbares Tumorstadium. Wenn der Tumor jedoch nach 2-3 Wochen eine nachweisbare Größe erreicht hatte, kam es zu einer spontanen Verminderung der Tumorstadiumgröße, gefolgt von einer kompletten Regression (KR) des Tumors innerhalb weniger Tage. Mäuse, denen im Anschluss an die komplette Regression erneut Tumorzellen injiziert wurden, waren nun vollständig resistent gegenüber den Tumorzellen. Diese Tiere, waren gesund, tumorfrei und hatten eine normale Lebensdauer [271].

In einem weiteren Versuchsvorhaben wurden Kontrollmäusen Tumorzellen in Verbindung mit Leukozyten, die aus einer VR-Maus isoliert wurden, appliziert. Auch hier konnten die Immunzellen die Tumorzellen beseitigen, so dass allem Anschein nach keine anderen Zelltypen oder lösliche Faktoren für die Funktion der Immunzellen notwendig waren. Ferner war es möglich, subkutane Tumore von Kontrollmäusen durch die intraperitoneale Injektion von Immunzellen, die aus einer VR-Maus isoliert wurden, zu eliminieren. Die Depletion einzelner Immunzellen ergab, dass kein bestimmter Zelltyp des Host-eigenen Immunsystems die Tumorstadiumresistenz alleine vermittelte. Neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und Makrophagen hatten unabhängig voneinander die gleiche Tötungseffizienz wie die Kombination dieser Leukozyten. In einem Zellkulturexperiment konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die Lymphozyten spezifisch Tumorzellen zerstörten, andere Zellen wie Fibroblasten hingegen nicht. Dies deutet auf einen fundamentalen Unterschied zwischen Tumorzellen und normalen Zellen hin, der die spezifische Erkennung und zielgerichtete Abtötung der Tumorzellen ermöglicht [272].

I.5. Konditionelle Fibronectin-Knockoutmäuse

Damit die Rolle des Fibronectins bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren untersucht werden konnte, war es notwendig, endogenes Fibronectin im Knochenmark und in der Blutbahn (Plasmafibronectin) von Mäusen auszuschalten. Allerdings versterben Mäuseembryonen, deren Fibronectin-Gen inaktiviert wurde, etwa 8,5 Tage nach Gestation *in utero*. Aus diesem Grund wurden konditionelle Fibronectin-Knockoutmäuse erzeugt, deren Fibronectin-Gen im adulten Zustand inaktiviert werden konnte [3]. Dazu wurde das sequenzspezifische Cre//loxP Rekombinationssystem aus dem Bakteriophagen P1 genutzt [273]. Der Vorteil der Verwendung dieses Systems besteht darin, dass das Gen von Interesse zu einem gewünschten Zeitpunkt, zell- und gewebespezifisch, ausgeschaltet werden kann.

In diesem Zusammenhang wurden konditionelle Knockoutmäuse generiert, deren Fibronectin-Gen gefloxt war (engl. „flanked by loxP“). Das Fibronectin-Gen dieser Mäuse war dahingehend modifiziert worden, dass vor dem Translations-Startkodon ATG im ersten Exon und im ersten Intron loxP-Stellen (engl. „locus of crossing-over P1“) eingebracht wurden [3]. Diese 34 Basenpaare umfassenden loxP-Sequenzen werden von dem Enzym Cre-Rekombinase (engl. „causes recombination“) erkannt [274]. Das Enzym Cre-Rekombinase bindet an die entsprechenden loxP-Stellen und schneidet den dazwischenliegenden DNA-Bereich heraus. Im Anschluss an diesen als Exzision bezeichneten Prozess wird die DNA wieder verbunden. Da wichtige Abschnitte, wie das Translations-Startkodon des Gens, entfernt wurden, kommt es zum Funktionsverlust des Gens [275, 276]. Mäuse, deren Fibronectin-Gen im geflochten Zustand vorliegt, können anschließend mit Mäusen gekreuzt werden, die das Gen für das Enzym Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewünschten Promotors tragen, der zell- oder gewebespezifisch aktiviert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit immundefizienten Mäusen gearbeitet, die mit 2 unterschiedlichen konditionellen Fibronectin Knockout-Mauslinien verpaart wurden. Im Folgenden werden die Eigenschaften der Knockoutmäuse, die über den jeweiligen Promotor charakterisiert werden, kurz dargestellt werden:

Die MxCre-Linie wurde verwendet, um Fibronectin in der Blutbahn (Plasmafibronectin) und im Knochenmark auszuschalten. Hierfür wurden geflochte Fibronectin-Mäuse mit Tieren verpaart, die das Enzym Cre Rekombinase unter Kontrolle des exogen induzierbaren Mx-Promotors trugen [277]. Die MxCre vermittelte Ausschaltung von Fibronectin war, bezogen auf die Leber (Hepatozyten), vollständig und für wenigstens 8 Monate stabil. In anderen Organen, die eine Aktivität des Mx-Promotors aufwiesen, war der Umfang der Fibronectin-Suppression variabel und reichte von 94% in der Milz bis 8% im Gehirn. Dazwischen lagen in abfallender Reihenfolge

Zwölffingerdarm (75%), Herz (52%), Lunge (52%), Uterus (43%), Thymus (42%), Niere (39%) und Muskel (18%) [277].

Durch die Verwendung der ColCre-Linie war es möglich, Fibronectin spezifisch in den Osteoblasten und Osteozyten auszuschalten. Hierfür kamen Mäuse zum Einsatz, die das Gen für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines 2,3 Kilobasen (Kb) langen Fragments des Promotors der Kollagen Typ I α_1 -Kette trugen (simplifiziert, Col-Promotor). Die Aktivierung des Col-Promotors erfolgt, wenn ein Osteoblast mit der Synthese von Kollagen Typ I beginnt. Simultan kommt es zur Expression der Cre-Rekombinase und das Fibronectin-Gen wird in der Zelle irreversibel zerstört [278].

I.6. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle des Fibronektins bei der Entstehung und dem Wachstum von Knochenmetastasen untersucht.

Zu Beginn stellte sich die Frage, ob Fibronektin der extrazellulären Matrix den Prozess der Metastasierung beeinflusst. Um einen möglichen Effekt von Fibronektin *in vivo* zu untersuchen, wurden konditionelle Knockoutmäuse eingesetzt, bei denen eine Ausschaltung von Fibronektin in der Blutbahn (Plasmafibronektin) und im Knochenmark möglich war. Auf diese Weise sollte der Einfluss der Fibronektin-Deletion im Bereich der vaskulären Nische auf die Metastasierung untersucht werden. Des Weiteren wurde das Fibronektin-Gen spezifisch in den knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten, deletiert. Dementsprechend wird der Effekt der Fibronektin-Ausschaltung im Bereich der osteoblastischen Nische auf den Metastasierungsprozess herausgearbeitet. In einem weiteren Versuchsansatz soll die tumorzellspezifische Fibronektinexpression unterbunden werden und somit ein möglicher Einfluss von Tumorzell-Fibronektin auf die Infiltrationseigenschaften, die Etablierung und das Wachstum von Knochenmetastasen nachgewiesen werden.

Insgesamt will diese Arbeit einen Beitrag zum Verständnis leisten, inwieweit Fibronektin für die Tumoretablierung notwendig ist und welche Rolle dieses Molekül bei der Entwicklung von Tumoren einnimmt.

II. Material und Methoden

II.1. Materialien

II.1.1. Herstellerverzeichnis

Abbott GmbH & Co. KG	Wiesbaden
Abcam plc	Cambridge, UK
Acris Antibodies GmbH	Hiddenhausen
Acros Organics	Geel, Belgien
Agfa HealthCare GmbH	Köln
Alcan Packaging	Neenah, Wisconsin, USA
Antisoma Research Laboratories	London, UK
AppliChem GmbH	Darmstadt
ASYS Hitech GmbH	Eugendorf, Österreich
Axxora Deutschland GmbH	Lörrach
Bender & Hobein AG	Zürich, Schweiz
BD Biosciences	Heidelberg,
Biometra GmbH	Göttingen
Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Biozym Scientific GmbH	Oldendorf
Buehler GmbH	Düsseldorf
Bruker Optik GmbH	Ettlingen
Canon Inc.	Tokyo, Japan
Caliper Life Sciences	Rüsselsheim
Carl Zeiss GmbH	Göttingen
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Charles River Laboratories	Sulzfeld
Daido Sangyo Co., Ltd	Tokyo, Japan
Dako Deutschland GmbH	Hamburg
Dianova GmbH	Hamburg
Dunn Labortechnik GmbH	Asbach
Ebioscience Corporation	San Diego, USA
Eppendorf AG	Hamburg
Fermentas GmbH	St. Leon-Rot

Field Emission Corporation	McMinnville, Oregon, USA
GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg
Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Grüssing GmbH	Filsum
Harlan Sera-Lab	Loughborough, UK
Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG	Wehrheim
Heraeus Sepatech GmbH	Osterode am Harz
Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Kern & Sohn GmbH	Balingen
Knick GmbH + Co. KG	Berlin
Korth Kristalle GmbH	Altenholz (Kiel)
Labinstruments Deutschland GmbH	Crailsheim
Lab & Vet Service GmbH	Wien, Österreich
Leica Microsystems	Wetzlar
LG Electronics	Seoul, Korea
Linaris Biologische Produkte GmbH	Wertheim
Memmert GmbH + Co KG	Schwabach
Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen
Merck KGaA	Darmstadt
Messer Group GmbH	Sulzbach
Minerva Biolabs	Berlin
MorphoSys AbD GmbH	Düsseldorf
New Brunswick Scientific	Edison NJ, USA
Nikon, GmbH	Düsseldorf
Olympus America Inc.	Center Valley PA, USA
Pall Life Sciences	Dreieich
PE Applied Biosystems	Waltham MA, USA
Pan Biotech GmbH	Aidenbach
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Polyscience Europe GmbH	Eppelheim
Qiagen GmbH	Hilden
Sakura Finetek Germany GmbH	Heppenheim
Sanofi-Aventis Deutschland GmbH	Frankfurt
Sarstedt	Nümbrecht
Scanco Medical AG	Brüttsellen, Schweiz
Semperit Technische Produkte GmbH	Wien, Österreich
Servoprax GmbH	Wesel
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen

Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz
Sony Corporation	Tokyo, Japan
Ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest
Synchem OHG	Felsberg / Altenburg
Systemec GmbH	Wettenberg
Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim
Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham MA, USA
Vitaris AG	Baar
Whatman International Ltd.	Maldstone, UK
Zentrallager Theoretikum	Heidelberg

II.1.2. Laborausstattung

Autoklav:	Tuttnauer Systemec 5075 EL, Systemec
Brutschrank:	Innova CO-170, New Brunswick Scientific
Blotsystem:	Blot Module Kit CE Mark EI0002, Invitrogen
Entwicklungsgerät:	Typ CP1000, Agfa
Einfrierbox:	#3043317, Nunc, Thermo Fisher Scientific
ELISA-Messgerät:	SLT Spectra, Labinstruments
FACS-Gerät:	LSRII, BD Biosciences
Fraktionssammler:	Pharmacia LKB FraC-200, GE Healthcare
Gelsystem DNA:	PerfectBlue 40-1410, Peqlab
Gelsystem Protein:	XCell Sure Lock Mini-Cell EI0002, Invitrogen
Geldokumentation:	Gel Doc 1000, Bio-Rad
Heizblock:	Thermomixer compact, Eppendorf
IVIS-100 Imaging System:	Xenogen bzw. Caliper Life Sciences
Kameras:	EOS 350 Digital, Canon (Spiegelreflex) DS-1QM, Nikon (CCD), Nikon Imaging Center (NIC) Heidelberg
Kryomikrotom:	Kryostat, CM 3050, Leica Reichert-Jung Biocut 2035, Leica
Magnetrührer:	Yellow line MSH basic, Roth
Mikroskope:	DM IL, inverses Routinemikroskop, Leica, mit Canon Kamera Eclipse 90i, Nikon, Nikon Imaging Center (NIC) Heidelberg
Mikrowellenherd:	MS-1715TU Multiwave, LG Electronics
Mikrotiterplatten Reader:	Typ 16039400, Sunrise Basic, Tecan
pH-Meter:	Typ 761 Calimatic, Knick
Pipettierhilfe:	Pipetboy comfort classic, IBS Integra

Plattenwascher:	anthos fluido Typ 24200, ASYS
Pumpe:	Pharmacia LKB Pump P1, GE Healthcare Econo, Bio-Rad
Röntgengerät:	Typ 8050-010, Faxitron, Field Emission Corporation
Säule:	Pharmacia Biotech XK16, GE Healthcare
Scanner:	Lide 60, Canon
Sterilbank:	Holten LaminAir 1.2, Thermo Fisher Scientific
Stickstofftank:	Chronos Biosafe, Messer
Stromversorger:	Standard Power Pack P25, Biometra
Thermocycler:	GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems T Personal Thermocycler, Biometra
Trockenschrank:	Sterilisator, Memmert
Ultragefrierschrank:	Innova U725, New Brunswick Scientific
Vortex:	Vortex Genie 2, Bender & Hobein
Waagen:	Laborwaage, PRS 4200-2, Kern Feinwaage, ABJ 120-4M, Kern
Wasserbad:	Typ 1004, Gesellschaft für Labortechnik
Zellzählapparatur:	Typ TT CASY®, Innovatis, Roche
Zentrifugen:	Typ 1-14, Sigma Laborzentrifugen Biofuge 15, Heraeus Heraeus Multifuge 1 S-R, Thermo Fisher Scientific

II.1.3. Verbrauchsmaterial

Abdeckfolie:	#30001358, Tecan
Alkoholtupfer:	#G602, Servoprax
Aluminiumfolie:	#2596.1, Roth
Augen- und Nasensalbe:	#2182442, Bepanthen, Bayer
Deckgläser:	#6101242, Marienfeld
Dialyseschlauch:	#44145, Servapor, Serva
Einmalinjektionskanüle:	#304000, Microlance, 30G, BD Biosciences #302200, Microlance, 27G, BD Biosciences
Einmalröhrchen:	#55.1578, Polypropylen, 12/75 mm, Sarstedt
Frischhaltefolie:	#59206, Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
Handschuhe:	#3780872, Sempercare, Semperit AG
Kryoröhrchen:	#123263, Greiner bio-one
Macrosep:	#OD100C36, Pall

Mikrotiterplatten:	#439454, MaxiSorp, Nunc #655061, Microlon, Greiner bio-one
Microvette:	#20.1288, 200 K3E (Blutplasma), Sarstedt #20.1291, 200 Z-Gel (Blutserum), Sarstedt)
Objektträger:	#4951PLUS, Thermo Fisher Scientific
Parafilm:	#PM-996, Alcan Packaging
Pasteurpipetten:	#197734230, neo lab
PCR-Reaktionsgefäße:	#711080, Biozym
Petrischalen:	#633171, Greiner bio-one
Pipettenspitzen:	#739296, #740290, Greiner bio-one
PVDF-Membran:	#RPN303F, Amersham Hybond-P, GE Healthcare
Reaktionsgefäße:	#72.706, 1,5 ml; #72.695 2 ml, Sarstedt
Röntgenfilme:	#10595000, Structurix D4 DW, AGFA #34090, CL-X Posure Filme, Pierce, Thermo Fisher Scientific
Serologische Pipetten:	(2, 5, 10 und 25 ml), Greiner bio-one
Spritzen:	#300013, Plastipak, BD Biosciences
Sterilfilter:	#SLGV033RS, Millex GV, 0,22 µm, PVDF-Membran, Millipore #SLHV033RS, Millex HV, 0,45 µm, PVDF-Membran, Millipore #1564020, Nalgene, Thermo Fisher Scientific
Whatman Papier:	#3030917, 3MM CHR, Whatman International Ltd.
Zellkulturflaschen:	#169900, 25 cm ² ; #156800, 75 cm ² ; #159926, 175 cm ² , Nunc
Zellkulturplatten:	#150239, 6-Loch; #15020 12-Loch; #144530, 24-Loch; #150787, 96-Loch, Nunc
Zellfilter:	#352360, 100 µm, Cell Strainer, BD Biosciences
Zentrifugenröhrchen:	#188271, 15 ml; #227261 50 ml, Greiner bio-one

II.1.4. Chemikalien

Aluminiumsulfat:	#192430050, Acros Organics
Borsäure:	#A3581,1000, Applichem
Brilliant Blau R250:	#3862.1, Roth
Bromphenolblau:	#T116.1, Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat:	#A3567, 0500, Applichem
EDTA:	#E5134, Sigma-Aldrich
Essigsäure:	#10296, Grüssing
Ethanol:	#32205, Riedel-de Haën
Formaldehyd:	#31245, Riedel-de Haën

Glycerin:	#7530.1, Roth
Glycin:	#A1377,1000, Applichem
Guanidin-HCl:	#0037.2, Roth
Harnstoff:	#U5128, Sigma-Aldrich
Hexadimethrine bromide:	#H9268, Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat:	#1.04873.1000, Merck
Kaliumchlorid:	#A3582,1000, Applichem
Milchpulver:	#T145.1, Roth
Mowiol 4-88 Reagent:	#475904, Calbiochem, Merck
2-Methylbutan:	#A1263,1000, Applichem
Natriumcarbonat:	#A4332,1000, Applichem
Natriumchlorid:	#0277, Mallinckrodt Baker
Natriumhydrogencarbonat:	#106323, Merck
Natriumorthovanadate:	#S6508, Sigma-Aldrich
Natriumthiosulfat:	#S7026, Sigma-Aldrich
Natriumzitat:	#S4641, Sigma-Aldrich
Ponceau Xylidine:	#81465, Fluka, Sigma-Aldrich
2-Propanol:	Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
Schwefelsäure:	#13073, Grüssing
Tris:	#4855.2, Roth
Tris-HCl:	#9090.3, Roth
Triton X-100:	#108603, Merck
Tween 20:	#9127.1, Roth

II.1.5. Puffer, Medien und Reagenzien

ACK-Puffer:	4,15 g Ammoniumchlorid / 0,5 g Kaliumhydrogencarbonat / 100 µl 0,5 M EDTA (pH=7,5) in 500 ml H ₂ O _d , sterilfiltriert 0,22 µm, Lagerung bei 4°C
Agarose:	#15510-027, Invitrogen
Albumin Fraktion V (BSA):	#8076.2, Roth
αMEM:	#22561, Gibco, Invitrogen
Blocklösung: (Western Blotting)	5 g Milchpulver in 100 ml TBS-T frisch ansetzen oder kurzfristig lagern bei 4°C
Blockierungspuffer (ELISA):	3% BSA in PBS-T
Coomassie-Entfärbelösung: (Membranen)	200 ml 2-Propanol / 70 ml Essigsäure in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT

Coomassie-Färbelösung: (Membranen)	400 ml 2-Propanol / 75 ml Essigsäure / 2 g Brilliant Blau R250 in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT
Coomassie-Färbelösung: (Protein-Gele)	Imperial Protein Stain (#24615, Pierce, Thermo Fisher Scientific), Färbung 1 h; Entfärben mit H ₂ O _d für >1 h
DAPI:	#6335.1, Roth
Desorptionspuffer (Säule):	0,1 M Glycin / 0,5 M NaCl / in PBS pH 2,5, Lagerung bei 4°C
Detektionsreagenz: (Western Blotting)	#32106, ECL Western Blotting Substrat, Pierce Thermo Fisher Scientific
DMEM:	#41966052, Gibco, Invitrogen
DMSO:	#D2650, Sigma-Aldrich
DNA-Lysepuffer:	100 mM Tris (pH 8,5) / 200 mM NaCl / 5 mM EDTA (pH 8) 0,2% SDS, in 10 ml H ₂ O _{dd} (autoklavieren)
DNA-Marker:	100 bp-DNA-Leiter extended, #T835.1, Roth
dNTPs:	#20-3012, Peqlab
DPBS:	#14190, Gibco, Invitrogen
Elutionspuffer (Säule):	4 M Harnstoff / 0,05 M Tris / in PBS pH 7,5, Lagerung bei RT
Enhancer (PCR):	#01-1030, Peqlab
Equilibrierungspuffer (Säule):	0,01 M Natriumzitat / 0,005 M EDTA / in PBS pH 7,2, Lagerung bei RT
Ethidiumbromid:	10 mg/ml, #2218.1, Roth
FCS:	#P30-3302, Pan Biotech
Gelatine Sepharose 4B:	#17-0956-01, GE Healthcare
Geneticin:	#10131027, Gibco, Invitrogen
Karbonat-Puffer: (ELISA)	0,78 g Na ₂ CO ₃ / 1,5 g NaHCO ₃ in 500 ml H ₂ O _{dd} , pH 9,6, Lagerung bei 4°C (2 Monate haltbar)
Knochenlysepuffer:	4 M Guanidin-HCl / 10 mM EDTA / 50 mM Tris pH 7,4
Luciferin:	# bc219, Synchem
Lysepuffer (DNA):	100 mM Tris pH 8,5 / 200 mM NaCl 5 mM EDTA pH 8,0 / 0,2% SDS autoklavieren/sterilfiltrieren, Lagerung bei RT
Lysepuffer (Protein):	20 mM Tris-HCl / 150 mM NaCl / 10% Glycerin / 0,5% Triton X-100 2 mM EDTA / 10 mM NaF / 1 mM Na ₃ VO ₄ , Lagerung bei 4°C
MgCl ₂ (PCR):	#01-1030, Peqlab
Mowiol (Elvanol):	5 g Mowiol 4-88 Reagent 20 ml PBS (pH 8); ü. N. rotieren lassen bei RT 10 ml Glycerin; 30 min bei 50°C im Wasserbad schütteln

	30 min. bei 5000 g zentrifugieren, Lagerung bei -20°C
NBF (10%):	36,5% Formaldehyd 1:10 in PBS verdünnt, stets frisch ansetzen
PBS:	100 ml PBS (10x), in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT
PBS (10x):	400 g NaCl / 58 g Na ₂ HPO ₄ / 10 g KH ₂ PO ₄ / 10 g KCl in 5 L H ₂ O _d , pH 7,0, Lagerung bei RT
PBS-T:	100 ml PBS (10x) / 0,5 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,05%) in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT
Penicillin/Streptomycin:	#15140-122, Gibco, Invitrogen
pl-pC:	# P9582, Sigma
Ponceau-Lösung:	#33427.01, Serva
Probenpuffer (DNA, 4x):	50% Glycerin in 4x TBE, etwas Bromphenolblau zugeben
Probenpuffer (Protein, 4x):	0,15 ml H ₂ O _d / 1,25 ml 0,5 M Tris (pH 6,8) / 1 ml Glycerin 2 ml 10% SDS / 0,1 ml 1% Bromphenolblau / 0,5 ml β-ME
Protein-Marker:	Precision Plus Protein Standard, unstained (#161-0363, Bio-Rad) Precision Plus Protein Standard, Dual Color (#161-0374, Bio-Rad) PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (#SM1811, Fermentas)
Proteinextraktion-Reagens:	#78503, Thermo Fisher Scientific
Puromycin:	#540411, Merck
Stopplösung (ELISA):	0,5 M H ₂ SO ₄
Taq-Reaktionspuffer rot:	#01-1030, Peqlab
TBE:	100 ml TBE (10x), in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT
TBE (10x):	108 g Tris / 55,6 g Borsäure / 4,65 g EDTA in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT
TBS:	100 ml TBS (10x), in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT
TBS (10x):	12 g Tris / 88 g NaCl
TBS-T:	100 ml TBS (10x) / 1 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,1%) in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT in 1 L H ₂ O _d , pH 7,5, Lagerung bei RT
Tissue-Tek:	#4583, O.C.T. Compound, Sakura
TMB:	#613544, Merck
Transferpuffer: (Western Blotting)	3 g Tris / 14,4 g Glycin in 1 L H ₂ O _d , frisch ansetzen oder kurzfristig lagern bei 4°C
Trypsin-EDTA:	#25300, Gibco, Invitrogen
Verdünnungspuffer (ELISA):	1,5% BSA in PBS-T

II.1.6. Antikörper

II.1.6.1. Primärantikörper

anti-human-FN	anti-human-Fibronektin-HRP konjugiert IgG aus Kaninchen (#P0246, Dako); WB: 1:5000
anti-human-FN	anti-human-Fibronektin-IgG aus Kaninchen (F3648, Sigma-Aldrich) ELISA: 1:500 (mpFN ELISA) und 1:2000 (pFN ELISA)
anti-CD31	anti-CD31 (bindet an C-Terminus von Maus CD31) aus Kaninchen (ab28364, Abcam); Schnitte: 1:50
anti-Maus-NKp46	Alexa Fluor® 647 konjugiert aus Ratte IgG2a, (#51-3351, eBioscience); FACS-Färbung: 1:100 (Marker für NK-Zellen)
anti-Maus-CD19	Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert aus Ratte IgG2a, (#12-0193, eBioscience); FACS-Färbung: 1:100, (Marker für B-Zellen)
anti-Maus-CD3	Cyanine 5 (Cy5) konjugiert aus Hamster IgG, (HM3411, Invitrogen); FACS-Färbung: 1:100 (Marker für T-Zellen)
anti-Maus-F4/80	Phycoerythrin (PE) konjugiert aus Ratte IgG2a, (#12-4801, eBioscience); FACS-Färbung: 1:100 (Marker für Monozyten)
anti-Maus-Ly-6G (Gr-1)	Alexa Fluor® 647 konjugiert aus Ratte IgG2b, (#51-5931, eBioscience); FACS-Färbung: 1:100 (Marker für Granulozyten)

II.1.6.2. Sekundärantikörper

anti-Kan-Alexa 555	anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor 555-konjugiert aus Ziege (#A21430, Molecular Probes, Invitrogen), Schnitte: 1:500-1000
anti-human-FN	anti-human-Fibronektin-HRP konjugiert IgG aus Kaninchen (#P0246, Dako) ELISA: 1:500 (mpFN ELISA) und 1:2000 (pFN ELISA)

II.1.7. Enzyme

BseDI	#ER1081, Fermentas
Proteinase-Inhibitoren	#535142, Cocktail Set I, Calbiochem, Merck
Proteinase K	#03115852001, Roche
Taq DNA-Polymerase	#01-1030, Peqlab

II.1.8. Synthetische Oligonukleotide

5'-FN	TGTCCCATATAAGCCTCTGCT	PCR-Produkt: 237 bp ohne loxP
3'-FN	ACCCCTGAGCATCTTGAGTG	PCR-Produkt: 279 bp mit loxP
5'-Col	CAGCTCTCCATCAAGATGGT	PCR-Produkt: ca. 500 bp
3'-Cre	ATGTTTAGCTGGCCCAAATG	
5'-Mx	GCAAGCTCAGGCTTTTTTCAC	PCR-Produkt: ca. 450 bp
3'-Cre	ATGTTTAGCTGGCCCAAATG	
5'-Nak	GGCCCAGCAGGCAGCCCAAG	Wildtyp: 90 bp, 53 bp, 20 bp
3'-Nak	AGGGATCTCCTCAAAGGCTTC	CD1 <i>nude</i> : 110 bp, 58 bp (heterozygot) (Erwartete Fragmentgrößen nach erfolgter Restriktion des PCR-Produkts)

II.2. Methoden

II.2.1. Tierexperimentelle Methoden

II.2.1.1. Verwendete Mausstämme

Die im folgenden Teil beschriebenen Mausstämme wurden in der interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg gezüchtet.

CD1 <i>nude</i> (CrI:CD1- <i>Foxn1nu</i>); Auszucht	Charles River; Sulzfeld
ColCre (FVB-Tg(Col1a1-cre)1Kry/Mmcd)	MMRRC (engl. Mutant Mouse Regional Resource Center); USA
FN fl/fl (129/C57-Tg(fn1)tm1Ref)	MPI für Biochemie; Martinsried
MxCre-FN fl/fl (C57BL/6xCBA-Tg(Mx1-cre)1Cgn//129/C57-Tg(fn1)tm1Ref)	MPI für Biochemie; Martinsried

II.2.1.1.1. Immundefiziente, athymische Nacktmäuse

CD1 *nude* (CD1 nu/nu) Mäuse wurden von Charles River bezogen. Diese immundefizienten Auszucht-Mäuse wurden aus dem Mausstamm CD1 (engl. „Caesarean Derived 1“) durch Transfer des *nude* Genes mittels einer Reihe von Kreuzungen und Rückkreuzungen generiert. CD1 *nude* Mäuse sind athymisch, unfähig, reife T-Zellen zu produzieren, und daher immundefizient. Des Weiteren zeichnen sich homozygote Tiere durch fehlende Körperbehaarung aus und weisen einen Albino Phänotyp auf.

CD1 *nude* Mäuse wurden mit den im Folgenden beschriebenen konditionellen Knockout-Mäusen verpaart. Dabei ist zu beachten, dass homozygote weibliche CD1 *nude* Tiere durch Probleme bei der Ovulation und ihr Unvermögen, Milch abzusondern, für die Zucht ungeeignet sind. Daher wurden für die Kreuzungen heterozygote weibliche und homozygote männliche CD1 *nude* Mäuse eingesetzt. Tiere, die für das *Xenotransplantat*-Metastasierungsmodell verwendet wurden, waren ausnahmslos homozygot für das Gen *nude* und folglich immundefizient.

II.2.1.2. Konditionelle Knockout-Mäuse

Für die spezifische Ausschaltung von Fibronectin wurden Mäuse verwendet, deren Fibronectin-Gen gefloxt war (FN fl/fl für Fibronectin floxed/floxed). Die Mauslinien wurden uns von Herrn Prof. Dr. Reinhard Fässler (Max-Planck-Institut für Biochemie; Abteilung Molekulare Medizin, Martinsried) zur Verfügung gestellt und mit den zuvor beschriebenen CD1 *nude* Tieren verpaart.

II.2.1.2.1. MxCre-Linie

Die MxCre-Linie wurde verwendet, um Fibronectin in der Blutbahn (Plasmafibronectin) und im Knochenmark auszuschalten. Hierfür wurden gefloxt Fibronectin Mäuse mit Tieren verpaart, die das Enzym Cre Rekombinase unter Kontrolle des Interferon und pI-pC (Polyinosinic-Polycytidylic Säure) induzierbaren Mx-Promotors trugen. MxCre positive Mäuse wurden mit CD1 *nude* Tieren verpaart, so dass nachfolgender Genotyp zur experimentellen Verwendung zur Verfügung stand: FN fl/fl MxCre/+ CD1 nu/nu.

II.2.1.2.2. ColCre-Linie

Durch die Verwendung der ColCre-Linie war es möglich, Fibronectin spezifisch in den Osteoblasten und Osteozyten auszuschalten. Hierfür kamen Mäuse zum Einsatz, die das Gen für

die Cre Rekombinase unter der Kontrolle eines 2,3 Kilobasen (Kb) langen Fragments des Promotors der Kollagen Typ I α_1 -Kette tragen (simplifiziert, Col-Promotor). Die Aktivierung des Col-Promotors erfolgt endogen (ab Tag 14,5) ohne Intervention während der Embryonalentwicklung [278].

Entsprechende Mäuse wurden über das MMRRC (USA) bezogen und mit Tieren verpaart, deren Fibronektin-Gen gefloxt war, so dass Tiere entstanden, die homozygot gefloxt (FN fl/fl) und positiv für den Col-Promotor waren. Anschließend wurden die auf diese Weise generierten Mäuse mit CD1 *nude* Tieren weiter verpaart, so dass letztlich Mäuse mit dem Genotyp FN fl/fl ColCre/+ CD1 nu/nu entstanden.

II.2.1.3. Intraperitoneal verabreichte Injektionen

II.2.1.3.1. Induktion des Mx-Promotors

Die Aktivierung des Mx-Promotors erfolgte bei 2-3 Wochen alten Mäusen, mittels 4 intraperitonealer Injektionen von 250 μ g pl-pC in 2-Tages Intervallen [3]. Das pl-pC Kaliumsalz wurde mit DPBS auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml gebracht und steril filtriert. Die Lagerung der Lösung erfolgte bis zur Verwendung bei -20°C .

II.2.1.3.2. Anästhesie von Versuchstieren

Für die intrakardiale Applikation von Tumorzellen und die Durchführung der Röntgenaufnahmen wurden die Versuchstiere im Vorfeld anästhesiert. Den Versuchstieren wurde ein Gemisch aus Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (16 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. Hierdurch konnte eine chirurgische Toleranz von ca. 30 Minuten erzielt werden. Den Tieren wurde während der Schlafdauer von 120-240 Minuten etwas Augensalbe aufgetragen, um einer Austrocknung der Cornea und einer Erblindung entgegenzuwirken.

II.2.1.3.3. Luciferin Applikation

Die Mäuse wurden zunächst in einer Inhalationskammer mit Isofluran narkotisiert. Anschließend wurde eine sterile Luciferin-Lösung (150 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. Fünf bis zehn Minuten nach der Luciferininjektion wurde die Luciferaseaktivität mit dem „IVIS-100 Imaging“ System bestimmt (II.2.1.5.2.).

II.2.1.4. Xenotransplantat-Metastasierungsmodell

Bei einer **Xenotransplantation** (griechisch, *xénos*: Fremder) handelt es sich um die Übertragung von lebensfähigen und funktionstüchtigen Zellen, Zellverbänden oder Organen zwischen unterschiedlichen Spezies [279].

Tiere, die für das *Xenotransplantat*-Metastasierungsmodell verwendet wurden, waren ausnahmslos homozygot für das Gen *nude* und somit athymisch, unfähig reife T-Zellen zu produzieren und daher immundefizient. Diese genetische Konstitution ermöglicht die Untersuchung humaner Tumorzellen im Mausmodell. Des Weiteren wurden Mäuse verwendet, deren Fibronectin-Gen gefloxt war und die das Gen Cre Rekombinase entweder unter der Kontrolle des Mx-Promotors, oder des Col-Promotors trugen.

II.2.1.4.1. Intrakardiale Applikation humaner Tumorzellen

Immundefizienten Mäusen wurden Knochenmetastasen durch die intrakardiale Applikation humaner Tumorzelllinien induziert. Diese, waren subkonfluent und wurden am Vortag mit frischem Kulturmedium versorgt (II.2.2.6).

Die 4-5 Wochen alten Mäuse wurden zunächst mit einem Gemisch aus Ketamin und Xylazin anästhesiert. Anschließend wurden 10^5 MDA- bzw. PC3-Zellen in 100 μ l D-PBS über einen Zeitraum von 20-50 Sekunden in den linken Herzventrikel injiziert. Hierfür wurde eine Einmalinjektionskanüle (30G) zwischen dem zweiten und dritten Interkostalraum vom Sternum aus ca. 2 mm nach rechts platziert. Die Injektionskanüle wurde dann leicht kaudal ausgerichtet und in einem 25° Winkel relativ zur Sagittalebene transkutan in den linken Ventrikel der Maus eingeführt. Der spontane, pulsierende Eintritt von hellem mit Sauerstoff angereichertem Blut in die transparente Injektionskanüle zeigt die richtige Positionierung der Nadel an [280]. Der Erfolg der Injektion wurde 10-60 Minuten im Anschluss an die Injektion mittels Biolumineszenz-Bildgebung evaluiert (Abb. III.1.)

II.2.1.4.2. Biolumineszenz-Bildgebung

Das Enzym Luciferase aus dem Leuchtkäfer (Lampyridae), das von den Tumorzellen exprimiert wird, katalysiert die Reaktion von Luciferin zu Licht. Das Biolumineszenz-Signal der Luciferase wird in einem Bereich von 500 bis 700 nm emittiert, mit einem Emissionsmaximum bei 612 nm bei 37°C. Dieses Emissionsspektrum und die optischen Eigenschaften von biologischem Gewebe erlauben es, dass das Licht mehrere Zentimeter Gewebe durchdringen kann. Die Photonenemis-

sion von Tumorzellen, die das Enzym Luciferase exprimieren und eine Knochenmetastase gebildet haben, kann im Anschluss an die Applikation des Substrates Luciferin, detektiert werden [281]. Biolumineszenz-Bildgebung wurde mit einer hoch sensitiven, gekühlten CCD Kamera vollzogen, die in einer lichtdichten Aufnahmekammer angebracht war (IVIS-100, Xenogen).

Für *in vivo* Messungen wurden Mäuse mittels Inhalationsnarkose (1-2% Isofluran) anästhesiert, anschließend wurde eine Luciferin-Lösung intraperitoneal verabreicht. Fünf bis zehn Minuten nach der Luciferininjektion wurde die Photonenemission mit dem „IVIS-100 Imaging“ System detektiert. Hierfür wurden maximal zwei Mäuse ventral bzw. dorsal auf einem elektronisch verstellbaren Probenstisch in der beheizten Aufnahmekammer (37°C) der bildgebenden Apparatur platziert. Die Aufnahmezeit betrug 10 Sekunden bis 5 Minuten und es wurden folgende Kameraeinstellungen verwendet: Der Aufnahmeausschnitt wurde mit dem verstellbaren Probenstisch so gewählt, dass der gesamte Körperumfang der Maus abgebildet werden konnte. Hierbei wurde die Entfernung der Kamera zum Messobjekt auf 10 cm eingestellt (*field of view* A, 10 cm; f-stop, f1) und eine mittlere Sensitivität bzw. Auflösung gewählt. War die Photonenemission gesättigt, wurde die Aufnahmezeit und Sensitivität herabgesetzt. Konnte kein Signal detektiert werden, wurden im Gegenzug die Auflösung und die Aufnahmezeit erhöht. Für jede Messung wurde zusätzlich zur Lumineszenzmessung ein photographisches Abbild erzeugt und als überlagernde Aufnahme abgespeichert.

Für *in vitro* Messungen wurden die zu analysierenden Zellen in DPBS aufgenommen und 100 µl der Zellsuspension in geeigneter Verdünnung in eine schwarze 96-Loch Platte pipettiert. Es wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich von 10^5 bis 500 Zellen je Vertiefung gewählt. 5-10 Minuten vor der Messung wurde 100 µl Luciferin/DPBS-Lösung (150 µg/ml) je Vertiefung hinzugegeben. Anschließend folgte die Biolumineszenz-Messung der Platte für 2-5 Minuten bei mittlerer Auflösung. Auf diese Weise konnten die pro Sekunde emittierten Photonen der Zellen erfasst werden.

Die Bildaufnahmen und Quantifizierung der Biolumineszenz-Signale erfolgten mit der Datenerfassungs- und Analysen-Software „Living Image“ (Version 2.50). Die emittierte Lichtleistung (Photonen/s/cm²/sr) spezifischer Interessensbereiche (ROI für engl. „regions of interest“) wurde als relative Lichteinheiten (RLU für engl. „relative light units“) quantifiziert. Das „IVIS-100 Imaging“ System wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr Günter J. Hämmerling (Deutsches Krebsforschungszentrum DKFZ; Abteilung Molekulare Immunologie, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

II.2.1.4.3. Detektion von Knochen-Läsionen mittels Radiographie

Die Etablierung von osteolytischen Läsionen wurde mittels Radiographie beurteilt. Röntgenaufnahmen dienten zur genauen Lokalisation von osteolytische Läsionen und zur Bestätigung der

mittels Biolumineszenz-Messung erworbenen Daten. Röntgenaufnahmen wurden mit der Röntgen-Apparatur Faxitron am Pathologischen Institut der Universität Heidelberg vollzogen. Dabei kamen lichtdichte, einzelverpackte Röntgenfilme zum Einsatz. Die Mäuse wurden mit einem Gemisch aus Ketamin und Xylazin anästhesiert und mittig auf dem Röntgenfilm in ventraler bzw. dorsaler Ausrichtung in der Röntgenkammer platziert. Die Röhrenspannung betrug 30 kv bei einer Bestrahlungsdauer von 90 Sekunden. Die Röntgenfilme wurden anschließend in einer Dunkelkammer entwickelt und eingescannt.

Die Fläche osteolytischer Läsionen der eingescannten radiographischen Aufnahmen wurde unter Verwendung des Computerprogramms „ImageJ“ (Wayne Rasband, NIH) bestimmt.

II.2.1.4.4. Tötung von Mäusen und Probenentnahme

Tiere die während der experimentellen Phase einen Gewichtsverlust von mehr als 20% und/oder offensichtliche Zeichen von Schmerz und/oder Lethargie aufwiesen, wurden im Anschluss an die Röntgenaufnahmen im narkotisierten Zustand mittels CO₂-Inhalation getötet. Unmittelbar nach der Tötung wurde den Tieren Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen. Für die Erzeugung von Blutplasma wurden 200 µl Vollblut in einer Microvette (mit Tri-Kalium-EDTA) bei 5000×g für 5 Minuten abzentrifugiert. Für die Gewinnung von Blutserum wurden 200 µl Vollblut in eine Z-Gel Microvette mit Gerinnungsaktivator gefüllt und diese bei 10000×g für 5 Minuten zentrifugiert. Das auf diese Weise erzeugte Plasma bzw. Serum wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Um eine spätere Genotypisierung der Versuchstiere zu ermöglichen, wurde im Anschluss an die Blutentnahme ein Stück Niere entnommen und bei -20°C eingefroren.

Knochen und Tumore wurden von umgebendem Muskelgewebe befreit und für zwei Stunden in 10% NBF (engl. „neutral buffered formalin“) fixiert. Anschließend wurden die Tumorproben einmal mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung gekühlt (4°C) in PBS gelagert. Zur späteren Anfertigung von Gefrierschnitten wurden bei der Tötung der Tiere wenn möglich etwas Tumorgewebe entnommen. Das Tumorgewebe wurde auf ein kleines Stück Whatman Papier gelegt, für 5-10 Sekunden in eiskaltes 2-Methylbutan und anschließend für 1-2 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Zusätzlich wurde bei ausgewählten Tieren die Milz entnommen und auf die gleiche Weise eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C. Die Durchführung der Gefrierschnitte und die immunhistochemische Färbung ist dem Abschnitt II.2.4.6.2. zu entnehmen

II.2.1.5. Versuchstierhaltung

Für die Experimente wurden Tiere beider Geschlechter mit der zuvor beschriebenen genetischen Konstitution herangezogen. Für die Zucht wurden spezifizierte pathogenfreie (SPF) Tiere verwendet, die unter standardisierten Bedingungen in einem abgeschlossenen Bereich untergebracht waren. Die Tiere wurden in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Makrolon) des Typs II (360 cm²) auf staubfreiem Weichholzgranulat (#LTE E-001; Lab & Vet Service GmbH) gehalten (Raumtemperatur 22±2°C; relative Luftfeuchtigkeit 55±5%; Belichtung 0700 bis 1900 MEZ). Die kontinuierliche Fütterung erfolgte mittels einer pelletierten Alleindiät (#V1166-341, ssniff Spezialdiäten GmbH; 23% Rohprotein, 6% Rohfett, 3,3% Rohfaser und 6,3% Rohasche; Angaben in % des Trockengewichts). Die umsetzbare Energie betrug 13,7 kJ/kg. Leitungswasser wurde über eine Trinkflasche zur Verfügung gestellt.

II.2.2. Zellexperimentelle Methoden

II.2.2.1. Verwendete Zelllinien

Die im Folgenden beschriebenen Zelllinien wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Marco Cecchini (Universität Bern; Abteilung Urologie/urologisches Forschungslaboratorium, Bern) zur Verfügung gestellt. Die Tumorzelllinien exprimierten das Reporter-Gen Luciferase. Für die Etablierung stabiler Transfektanten wurde ein CMV-Promotor gesteuerter Säugetiere-Expressionsvektor für Luciferase (CMV-Luc) generiert. Hierfür wurde das vollständige Gen der Leuchtkäfer-Luciferase cDNA21 in das Plasmid pcDNA3.1 kloniert. Anschließend wurden MDA-MB-231 bzw. PC-3M-Pro4 Zellen mit dem CMV-Luc Expressionsvektor transfiziert und stabile Transfektanten mit Geneticin (G418) selektioniert. Jeweils ein Klon mit der höchsten Luciferase Aktivität wurde für weitere Experimente verwendet (MDA-MB-231/luc⁺ bzw. PC-3M-Pro4/luc⁺). Die Zellen wurden über mehr als 40 Passagen kultiviert und es konnte gezeigt werden, dass die Luciferase-Expression unverändert blieb, selbst wenn die Zellen gelegentlich in Abwesenheit von Geneticin (G418) kultiviert wurden [200, 201].

II.2.2.1.1. MDA-MB-231B/luc⁺

MDA-MB-231 Zellen sind humane Adenokarzinomzellen. Bei diesen Zellen handelt es sich um adhärenz, als Monolage wachsende Zellen, hervorgegangen aus Brustdrüsengewebe. Diese Zelllinie stammt von einer 41-jährigen weiblichen kaukasischen Patientin und wurde aus dem

Pleuraerguss (engl. „pleural effusion“; abnorme Flüssigkeitsansammlung in der Pleurahöhle) isoliert [282].

Die Zelllinie wurde wie zuvor beschrieben stabil mit dem Reporter gen für Luciferase transfiziert (II.2.2.1.). Anschließend wurde ein Klon generiert, der im Anschluss an die intrakardiale Applikation der Tumorzellen, ausnahmslos Metastasen im Knochen induziert und keine anderen Gewebe oder Organe befällt. Hierfür wurden MDA-MB-231-B/luc⁺ Zellen in vier aufeinander folgenden Zyklen intrakardial *in vivo* (Nacktmaus) appliziert und die Zellpopulationen, resultierend aus den Knochenmetastasen, anschließend *in vitro* expandiert. Dieser „knochensuchende“ Klon (engl. „bone-seeking clone“) MDA-MB-231-B/luc⁺ verursacht vorrangig osteolytische Knochenläsionen und wurde als Ausgangslinie in der vorliegenden Arbeit verwendet [283].

II.2.2.1.2. PC-3M-Pro4/luc⁺

Die PC-3M Linie entstammt ursprünglich einer Knochenmetastase, eines Grad IV Prostata Adenokarzinoms, eines 62-jährigen männlichen kaukasischen Patienten [284].

PC-3M Zellen wurden in Vorsteherdrüsen athymischer Mäuse injiziert. Anschließend wurden Varianten mit gesteigertem metastatischem Potential ausgewählt. Diese Zellen aus Xenotransplantat-Tumoren wurden wiederum in die Prostata athymischer Mäuse innokuliert und dieser Selektionsprozess über mehrere Runden fortgesetzt [201]. Die auf diese Weise generierten PC-3M-Pro4 Zellen mit gesteigerter Malignität wurden wie zuvor beschrieben stabil mit dem Reporter gen für Luciferase transfiziert (II.2.2.1.) und dienten als Ausgangslinie in der vorliegenden Arbeit. PC-3M-Pro4/luc⁺ Zellen wachsen in Kultur ebenfalls adhärent als Monolage und induzieren im Anschluss an die intrakardiale Applikation überwiegend osteolytische Knochenmetastasen.

II.2.2.2. Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank (Innova CO-170, New Brunswick Scientific) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Die verwendeten Zelllinien wurden auf handelsüblichen Zellkulturschalen kultiviert und nach Standardprotokollen bei einer Konfluenz von 70-90% drei Mal wöchentlich passagiert. Dabei wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/L Trypsin/0,2 g/L EDTA) von dem Schalenboden gelöst. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vollständig abgelöst und die Enzymreaktion durch Zugabe von DMEM, versetzt mit 10% FCS, beendet. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 250×g zentrifugiert und das Pellet wurde in einer geeigneten Menge Kulturmedium

aufgenommen und die gewünschte Menge Zellen wurde auf Zellkulturschalen verteilt.

Als Kulturmedium wurde DMEM (4,5 g Glucose/L) mit einem FCS Gehalt von 10% verwendet. Für Passagen unter Selektionsdruck wurde das Medium für MDA-MB-231-B/luc⁺ Zellen mit 800 µg/ml Geneticin und für PC-3M-Pro4/luc⁺ Zellen mit 500 µg/ml Geneticin versetzt. Kulturmedium von Zellen, die zuvor lentiviral transduziert wurden (II.2.2.5.), und somit eine Puromycin-Resistenz besaßen, wurde zusätzlich 1 µg/ml Puromycin hinzugegeben. Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durch Verwendung einer Sterilwerkbank vollzogen.

II.2.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit der CASY[®] Zellzählapparatur der Firma Innovatis nach Angaben des Herstellers vollzogen. Mit Hilfe der Zellzählapparatur war es möglich, die Zellzahl, Vitalität und den Aggregationsgrad einer Zellsuspension genau zu bestimmen.

Zunächst wurden mit „Casy[®] blue“-Lösung Kontrollproben toter Zellen unter standardisierten Bedingungen hergestellt. Diese Kontrollproben wurden dazu verwendet, um bei der Vitalitätsmessung nach dem Stromausschlussverfahren die zelltypspezifische Position des Totpeaks zu ermitteln. Auf diese Weise ermöglicht die Zählapparatur eine simultane Differenzierung zwischen Zelltrümmern, toten Zellen, lebenden Zellen und Zellaggregaten. Die lebend/tot Differenzierung mit dem Stromausschlussverfahren beruht, analog zu den bekannten Farbstoffausschlussmethoden (z.B. Trypanblau), auf der Permeabilität der Zellmembran. Während die intakte Zellmembran vitaler Zellen als elektrischer Isolator wirkt und den Strom ausschließt, kann der Strom bei toten Zellen mit geschädigter Membran durch das Zytoplasma fließen. Von den toten Zellen wird nur das Matrixvolumen (Zellvolumen abzüglich Cytoplasmavolumen) erfasst, welches im Wesentlichen aus dem Volumen des Zellkerns besteht.

Für die Messung der Zellzahl wurden 50 µl einer Zellsuspension in 10 ml „Casy[®] ton“-Lösung, in ein „CASY[®] cup“ gegeben. Anschließend wurde die Zellzahl durch eine dreimalige Messung von jeweils 400 µl der Zellsuspension mit einer 150 µl Kapillare bestimmt.

II.2.2.4. Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Für die Kryokonservierung wurden Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und frei von Kontaminationen waren. Zellen wurden wie im Folgenden beschrieben eingefroren und bis zur weiteren Verwendung in der Gasphase eines Stickstofftanks (-150°C) gelagert. Dadurch wurde vermieden, dass die Zelllinien nicht permanent in Kultur gehalten werden können.

ten wurden und dass für die intrakardiale Applikation Zellen mit der gleichen Passage zur Verfügung standen.

Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA-Behandlung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und für drei Minuten bei 500×g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und in einer Einfrierbox, gefüllt mit Isopropanol, langsam (1°C pro Minute) bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank transferiert. Als intrazelluläres Kryoprotektivum wurde DMSO verwendet. Das Einfriermedium setzte sich zusammen aus 80% Standardmedium (DMEM; 800 bzw. 500 µg/ml Geneticin), 15% FCS und 5% DMSO. Das Volumen wurde so gewählt, dass ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Einfrierlösung resuspendiert wurden. Es folgte die Abnahme eines Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität.

Zum Auftauen kryokonservierter Zellen wurde dem Stickstofftank ein Aliquot der entsprechenden Zelllinie entnommen und im Wasserbad bei 37°C unter kreisenden Bewegungen aufgetaut. Die Zellen wurden nach dem Auftauen unverzüglich in eine Zellkulturschale mit vorgewärmtem Kulturmedium überführt. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium versorgt und anschließend für die weitere Verwendung expandiert.

II.2.2.5. Lentivirale Transduktion humaner Tumorzellen

Die endogene Fibronectinexpression der verwendeten Tumorzelllinien wurde mittels RNA-Interferenz (RNAi) ausgeschaltet. In diesem Zusammenhang wurden lentivirale Transduktionspartikel eingesetzt (bezogen über Sigma-Aldrich; MISSION® shRNA Lentivirale Transduktionspartikel, #SHVRS NM 002026). Hierbei handelt es sich um infektiöse Viren, die verwendet wurden, um nicht-virale, Fibronectin spezifische shRNA in die Zielzellen zu transferieren. Ein Vorteil war, dass Lentiviren ihr Genom in die Wirtschromosomen integrieren und so den stabilen, erblichen shRNA-Transfer in eukaryotische Zellen erleichtern, ohne die Zellfunktion negativ zu beeinflussen. Durch die Anwendung des Mechanismus der RNA-Interferenz können gezielt Fibronectin mRNA-Moleküle degradiert werden und dadurch die Expression von endogenem Fibronectin unterdrückt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Verarbeitung der shRNA, im Vergleich zur transienten Transfektion von siRNA, zur stabileren und längerfristigen Genausschaltung führt. Dies ermöglicht den Einsatz von transduzierten Tumorzellen über einen langen Zeitraum bei Xenotransplantat-Modellen [285-287].

Fünf verschiedene shRNA-Sequenzen zur RNAi-vermittelten Degradation von Fibronectin-mRNA wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet. Kontrollzellen wurden mit einem leeren Vektorkonstrukt (MISSION® pLKO.1-puro Kontroll-Transduktionspartikel, #SHC001V, Sigma) lentiviral transduziert. Die auf diese Weise generierten Zellen dienten als Negativkontrolle, die

den RNAi Mechanismus nicht aktivierten, da sie keine shRNA Insertion enthielten. Zellen, die mit dem leeren Vektorkonstrukt transduziert wurden, dienten als brauchbare Referenz, um die spezifische Knockdown-Effizienz zu beurteilen. Auch konnten auf diese Weise zelluläre Effekte des Transduktionsprozesses beobachtet und verglichen werden.

Für die virale Transduktion wurden die Tumorzellen in Duplikaten in eine 96-Loch Platte ausgesät. Dabei wurde für jede Vertiefung 125 µl Kulturmedium (DMEM/10% FCS, 800 bzw. 500 µg/ml Geneticin) eingesetzt und die Zellzahl so eingestellt, dass die Zellen eine Konfluenz von 70 % am Tag vor der Zugabe der viralen Partikel erreichten. Dies entsprach bei der Zelllinie MDA-MB-231B/luc⁺ 1,6×10⁴ Zellen pro Vertiefung und bei der Zelllinie PC-3M-Pro4/luc⁺ 8×10³ Zellen pro Vertiefung. Nach einer Inkubationsphase von 20 Stunden (37°C, 5% CO₂) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 110 µl frischem Kulturmedium versorgt, welches mit Hexadimethrinebromide (Endkonzentration: 8 µg/ml) versetzt wurde. Dadurch sollte die Aufnahme der Virus-RNA in die Zielzellen unterstützt werden. Anschließend wurde das Medium der Zielzellen gegen die Viren-Suspension ausgetauscht und die Zellen wurden erneut für 20 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um die optimale Menge lentiviraler Partikel pro Zelle zu bestimmen, die für die Transduktion notwendig waren, wurde im Vorfeld ein Bereich von 0,5, 1, 2 und 5 MOIs (engl. „multiplicity of infection“) getestet. Die für die Transduktion eingesetzte Menge lentiviraler Partikel pro Zelle wurde mit folgender Formel berechnet, wobei die zu transduzierenden Einheiten TU/ml bekannt waren:

Anzahl der pro Vertiefung eingesetzten Zellen × gewünschte MOI = benötigte Anzahl transduzierender Einheiten

$$\frac{\text{benötigte Anzahl transduzierender Einheiten (TU)}}{\text{TU/ml}} = \text{Menge lentiviraler Partikel pro Vertiefung in ml}$$

Im Anschluss an die Transduktion wurde das Medium mitsamt der lentiviralen Partikel abgesaugt und durch 125 µl frisches Kulturmedium ersetzt. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 20 Stunden (37°C, 5% CO₂) wurde das Medium durch puromycinhaltiges Kulturmedium (1 µg/ml) ersetzt und somit die Selektion stabiler Klone eingeleitet (II.2.2.5.1.).

Tumorzelllinien, die mit dem leeren Kontroll-Vektorkonstrukt (pLKO.1-puro) transduziert wurden, werden im Folgenden zur besseren Lesbarkeit mit CT (Kontrolle) abgekürzt. Zelllinien, die hingegen mit Fibronectin spezifischer shRNA transduziert wurden, werden zur Vereinfachung mit Kd („Knockdown“) abgekürzt.

II.2.2.5.1. Puromycin-Titration

Für die Selektion stabiler Klone wurde vor der viralen Transduktion die letale Konzentration an Puromycin für Zellen, die kein Resistenzgen enthalten, getestet. Hierbei ist es notwendig die minimale letale Dosis zu definieren, da überschüssiges Puromycin unerwünschte phänotypische Auswirkungen verursachen kann. Die zu untersuchenden Zellen wurden auf 96-Loch Zellkulturplatten ausplattiert ($1,6 \times 10^4$ Zellen/Vertiefung) und am nächsten Tag mit unterschiedlichen Konzentrationen von Puromycin (5 - 0,1 $\mu\text{g/ml}$) im Zellkulturmedium kultiviert. An den folgenden Tagen wurde das Überleben der Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Die Zellen wurden für 5-6 Tag kultiviert, dabei wurde das puromycinhaltige Medium alle drei Tage erneuert. Die optimale Konzentration an Puromycin führt zu einem Wachstumsstopp der Zellen und zu einem Absterben und Ablösen der Zellen innerhalb von 3-5 Tagen.

II.2.2.5.2. Selektion stabiler Klone

Für die Selektion lentiviral transduzierter Zellen, die die shRNA in ihr Genom integriert hatten, war ein Puromycin-Resistenz-Gen auf den für den Gentransfer verwendeten Vektoren vorhanden. Dadurch wurde gewährleistet, dass alle Zellen, die nicht durch Viren infiziert wurden und somit keine Puromycin-Resistenz erhielten, abgetötet wurden. Die für eine Selektion geeignete Puromycin-Konzentration wurde wie unter II.2.2.5.3. beschrieben mittels Puromycin Titration bestimmt. Zwei Tage nach der viralen Infektion wurde mit der Selektion begonnen. Hierfür wurde puromycinhaltiges Kulturmedium (1 $\mu\text{g/ml}$) alle 3-4 Tage erneuert bis resistente Kolonien identifiziert werden konnten (generell, 3-7 Tagen nach Selektionsbeginn). Bei guter Proliferation wurden die Zellen in eine 48-Loch Platte passagiert. Hierbei wurden die Zellen in geringer Konzentration ausgesät, damit der Selektionsdruck aufrecht erhalten wurde. Um andererseits eine optimale Konzentration an auto- und parakrin wirkenden Wachstumsmediatoren zu gewährleisten, sollten eine Konfluenz von 40% nicht unterschritten werden. Die auf diese Weise selektionierten Mischkulturen wurden weiter expandiert und zur Konservierung eingefroren.

II.2.2.5.3. Isolierung von Einzelkolonien

Da die lentivirale Integration in das Wirtsgenom zufällig geschieht, kann die Knockdown-Effizienz des Zielgens der Puromycin resistenten Kolonien stark variieren. Aus diesem Grund war es notwendig, Einzelkolonien aus den resistenten Mischkulturen zu isolieren, bei der jede Zelle mit allen anderen Zellen identisch ist. Zu diesem Zweck wurden Mischkulturen durch statistisches Verdünnen ausplattiert. Dabei wurden die Zellen in separaten 96-Loch Platten ausgesät (200 μl Selektionsmedium/Vertiefung), so dass jeder Ansatz in der Regel nur eine einzige Zelle enthielt.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde eine 96-Loch Platte mit fünf Zellen pro Vertiefung, zwei Platten mit einer Zelle je Vertiefung und vier Platten mit 0,3 Zellen pro Vertiefung ausplattiert. Anschließend wurden die Platten für ca. 3 Wochen im Brutschrank kultiviert und engmaschig unter dem Mikroskop kontrolliert. Das Selektionsmedium wurde wöchentlich erneuert. Konnten Einzelkolonien identifiziert werden, wurden diese expandiert, zur Konservierung eingefroren und auf die Fibronectin spezifische Knockdown-Effizienz überprüft (II.2.2.5.3.).

II.2.2.5.4. Analyse der Fibronectin spezifischen Knockdown-Effizienz

Für beide Zelllinien (MDA-MB-231/luc⁺ und PC-3M-Pro4/luc⁺) wurden wenigstens zehn Puromycin-resistente Einzelkolonien ausgewählt und im Hinblick auf die spezifische Fibronectin-expression untersucht. Auf diese Weise konnte die Knockdown-Effizienz der transduzierten shRNA-Konstrukte evaluiert und mit der Fibronectinexpression der Kontroll-Zellen verglichen werden.

Die zu analysierenden Einzelkolonien wurden mit einer definierten Zellzahl (MDA: $1,5 \times 10^6$ Zellen; PC3: 1×10^6 Zellen) in Zellkulturschalen (75 cm^2) ausplattiert. Das Kulturmedium (DMEM, $1 \mu\text{g/ml}$ Puromycin, 800 bzw. 500 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin) wurde mit 10% Fibronectin-freiem FCS (II.2.4.3) versetzt. Anschließend wurden die Zellen fünf Tage im Brutschrank kultiviert und es wurden täglich 500 μl Medium zur Analyse entnommen. Die Bestimmung des Gesamtfibronectingehalts erfolgte mittels ELISA (II.2.4.4.1). Kolonien mit einer hohen Knockdown-Effizienz und demnach niedrigem Fibronectingehalt wurden weiter expandiert. Im Anschluss an dieses Auswahlverfahren wurden Zelllysate hergestellt (II.2.4.1.2.) und diese nochmals auf ihren Fibronectingehalt mittels ELISA (II.2.4.4.1) und Western Blotting (II.2.4.1.5.) untersucht.

II.2.2.6. Vorbereitung von Tumorzellen für die intrakardiale Applikation

Zwei Tage vor der intrakardialen Injektion wurden $3,8 \times 10^6$ Zellen der Mammakarzinomzelllinie (MDA-CT oder MDA-Kd) bzw. $2,9 \times 10^6$ Zellen der Prostatakarzinomzelllinie (PC3-CT oder PC3-Kd) in eine 175 cm^2 große Zellkulturschale ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit jeweils 18 ml DPBS gewaschen und mit 65 ml frischem Kulturmedium (10% FCS) versorgt. Am Tag der intrakardialen Injektion hatten die Zellen eine Konfluenz von 70% erreicht, wurden dreimal mit 18 ml DPBS gewaschen und durch die Behandlung mit Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in 7 ml Kulturmedium (10% FCS) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert ($250 \times g$, 3 min., RT) und das Zellpellet in 8 ml DPBS aufgenommen. Danach wurde die Zellzahl mit einer Zellzählapparatur bestimmt (II.2.2.3), die Zellsuspension erneut pelletiert ($250 \times g$, 3 min, RT) und in der entsprechenden Menge DPBS aufgenommen,

damit eine Zellzahl von 10^5 Zellen/100 μ l erreicht wurde. Im Anschluss wurde die Zellsuspension durch zweimaliges Zentrifugieren und Resuspendieren in DPBS gewaschen. Dabei wurde nach jedem Zentrifugationsschritt die Zellzahl auf 10^5 Zellen/100 μ l eingestellt, um eine möglichst geringe Abweichung bezüglich der Zellzahl zu erreichen. Abschließend wurde die Zellsuspension aliquotiert (a 400 μ l) und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Für intrakardiale Injektionen wurden ausnahmslos Zellsuspensionen verwendet mit einer Lebendzellzahl größer als 96% und einem Aggregationsgrad kleiner als 1,3.

II.2.2.7. Isolation von Leukozyten aus der Milz

Für die im Folgenden beschriebenen durchflusszytometrischen Messungen und Chromfreisetzungstests wurden Leukozyten aus der Milz isoliert. Die Milz wurde direkt im Anschluss an die Tötung in kleine Stücke geschnitten und mit dem „stumpfen“ Ende eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb mit 40 μ m Porengröße gedrückt und mit 10 ml PBS (versetzt mit 5% FCS) für 10 Minuten bei $500\times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 12 ml ACK-Puffer resuspendiert. Das im ACK-Puffer enthaltene Ammoniumchlorid leitet die Lyse der Erythrozyten ein, die auf diese Weise aus der Zellsuspension entfernt wurden. Da auch die Leukozyten nach einer längeren Inkubationsphase mit ACK-Puffer ihre Lebensfähigkeit verlieren, ist darauf zu achten, dass diese Arbeitsschritte zügig vollzogen werden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei $500\times g$ wurde das Pellet erneut in 12 ml ACK-Puffer resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 20 ml PBS (versetzt mit 5% FCS) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Die auf diese Weise isolierten Leukozyten konnten entweder direkt für die FACS-Färbung (II.2.2.8.) verwendet werden, oder wurden für 3 Tage mit humanem IL-2 (1000 U/ml) stimuliert und im Chromfreisetzungstest (II.2.2.9.) eingesetzt. IL-2 fördert die Proliferation und Differenzierung von T-Helferzellen, sowie B-Zellen und natürlichen Killerzellen.

II.2.2.8. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie am FACS (engl. fluorescence activated cell scanner) erlaubt die Einteilung der Zellen nach Größe, Granularität und Expression bestimmter Moleküle. Die durchflusszytometrische Messung ermöglicht eine Analyse der Expression von spezifischen Zelloberflächenmolekülen über fluoreszenz-markierte Antikörper. Monoklonale Antikörper, die für FACS-Analysen verwendet wurden, waren mit Cy5 (Cyanine 5, Emissionsmaximum bei 670 nm), Alexa Fluor® 647 (Emissionsmaximum bei 668 nm), PE (Phycoerythrin, Emissionsmaximum bei 585 nm) oder FITC (Fluorescein-Isothiocyanat, Emissionsmaximum bei 530 nm) konjugiert.

Die zu analysierenden Zellen wurden abzentrifugiert (500×g, 10 min) und in FACS-Puffer (PBS, 2% FCS) aufgenommen. Pro Ansatz wurden 100 µl der Zellsuspension (ca. 10⁶ Zellen) mit 1 µl direkt konjugiertem Antikörper für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml eiskalter FACS-Puffer hinzugefügt und die Zellen für 10 Minuten bei 500×g zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden entweder in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und direkt gemessen, oder in 200 µl FACS-Puffer, versetzt mit 2% Formaldehyd, fixiert und innerhalb einer Woche gemessen (Lagerung 4°C, im Dunkeln). Als Negativkontrollen dienten ungefärbte Zellen bzw. nicht spezifisch bindende Antikörper mit den in der Messung verwendeten Isotypen (Isotypkontrollen).

Die Messung der Proben erfolgte am LSRII-Gerät der Firma BD Biosciences. Für die Messung und Auswertung wurde das Programm FACSDiva 5.0.2 (BD Biosciences) verwendet.

II.2.2.9. Chromfreisetzungstest

II.2.2.9.1. Vorbereitung der Zielzellen

Der Chromfreisetzungstest wurde durchgeführt, um die zellvermittelte Lyse der verschiedenen Leukozyten-Populationen zu analysieren. Hierfür wurden die Zielzellen mit radioaktivem Chrom (⁵¹Cr) markiert, das bei der Lyse der Zielzellen durch die Effektorzellen freigesetzt wird.

Die Zielzellen wurden zunächst unter Verwendung von Zell-Dissoziations-Puffer (# 13151-014, GIBCO) vom Boden der Kulturflasche abgelöst, in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und für 10 Minuten bei 500×g zentrifugiert. Etwa 5×10⁵ Zellen in 80 µl Kulturmedium wurden mit 20 µl ⁵¹Cr versetzt und für 1 Stunde auf einem Schwenkrad bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dabei kommt es zur Aufnahme des radioaktiven Nuklids durch die Zielzellen. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 500×g pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zielzellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und für 5 Minuten bei 500×g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt, um nicht aufgenommenes ⁵¹Cr zu entfernen. Im Anschluss wurden die pelletierten Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und wie im Folgenden beschrieben auf die Effektorzellen verteilt.

II.2.2.9.2. Zellvermittelte Lyse

Die mindestens 3 Tage mit IL-2 (fördert die Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten) stimulierten Effektorzellen (vor allem natürliche Killerzellen) wurden auf 96-Loch-Rundboden-

Platten in abnehmenden Zellzahlen ausgesät. Hierbei wurden 10^6 Effektorzellen in jeweils 100 μ l vorgelegtes Kulturmedium pipettiert und sechsfach titriert. Die Ratio lag zwischen 100:1 und 3:1 (Effektorzellen zu Zielzellen). Die chrommarkierten und gewaschenen Zielzellen wurden in konstanter Zahl mit 5000 Zellen (100 μ l) pro Vertiefung auf die Effektorzellen (100 μ l) verteilt. Nach Ablauf einer vierstündigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde der Überstand geerntet und die Chromfreisetzung wurde mit einem Gammastrahlungs-Zählgerät gemessen. Alle Proben wurden in Triplikaten bestimmt. Zur Bestimmung der spontanen Chromfreisetzung wurden ausschließlich Zielzellen inkubiert. Für die maximale Chromfreisetzung wurden die Zielzellen in 2% Triton X lysiert. Die prozentuale zellvermittelte Lyse wurde folgendermaßen berechnet: $[(\text{experimentelle Chromfreisetzung} - \text{spontane Chromfreisetzung}) \div (\text{maximale Chromfreisetzung} - \text{spontane Chromfreisetzung})] \times 100$. Die Ratio zwischen der maximalen und der spontanen Chromfreisetzung entsprach für alle durchgeführten Experimente mindestens dem Faktor 4, ansonsten wurde das Experiment verworfen.

II.2.3. Molekularbiologische Methoden

II.2.3.1. Isolierung und Aufreinigung von genomischer DNA

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden im Alter von drei Wochen ein ca. 0,5 mm großes Stück der Schwanzspitze entfernt und in 92 μ l DNA-Lysepuffer, versetzt mit 8 μ l Proteinase K-Stocklösung (20 mg/ml), über Nacht bei 55°C verdaut. Die Lyse des Gewebes wurde durch mehrmaliges Vortexen beschleunigt. Das so gewonnene Lysat wurde zur Inaktivierung der Proteinase K für 10 Minuten auf 99°C erhitzt. Die folgende Zentrifugation bei 13000 \times g für 20 Minuten trennte restliche Gewebebruchstücke von der gelösten DNA, die zur PCR-Analyse abgenommen wurde. Um eine Nachgenotypisierung der Versuchstiere zu ermöglichen, wurde den Tieren bei der Tötung ein ca. 0,5 mm großes Stück Nierengewebe entnommen. Die anschließende Lyse erfolgte wie zuvor beschrieben.

II.2.3.2. PCR-Analyse zur Genotypisierung der isolierten DNA

Um die Analyse der Genotypen zu vereinfachen, wurde für alle Primer (II.1.8.) die im Folgenden beschriebene „touch down“-PCR angewandt. Somit konnten alle Proben mit einem einheitlichen PCR-Programm untersucht werden.

Bedingungen für 1 Ansatz:PCR-Programm:

H ₂ O _{dd}	15,25	µl	95°C	3 min	
10× Reaktionspuffer rot	2,5	µl	95°C	30 s) ×10
Enhancer	2	µl	63°C	30 s (-1°C/Zyklus)	
MgCl ₂	1,5	µl	72°C	30 s	
dNTPs	1	µl	95°C	30 s) ×35
5'-Primer (25 pmol/µl)	1	µl	53°C	30 s	
3'-Primer (25 pmol/µl)	1	µl	72°C	30 s	
DNA-Lysat	0,5	µl	72°C	3 min	
Taq (5 U/µl)	0,25	µl	4°C	∞	
	Σ 25	µl			

II.2.3.3. DNA-Analyse mittels Gelelektrophorese

Zur Größenfraktionierung von Nukleinsäuren wurden horizontale Agarosegele verwendet. Die Konzentration der Agarose in den Gelen betrug je nach Fragmentlänge der aufzutrennenden DNA 2-4%. Zum Lösen der Agarose diente TBS, der ebenfalls als Laufpuffer verwendet wurde. Nach Aufkochen des Agarose/TBS-Gemisches im Mikrowellenherd und anschließender kurzer Abkühlphase auf 70°C wurden 5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml der Gel-Lösung zugegeben. Nachfolgend wurde die flüssige Gelmasse direkt in eine mit einem Elektrophoresekamm präparierte Gelkammer bis zu einer Schichtdicke von 5-6 mm gegossen. Nach ca. 30 Minuten waren die Gele vollständig polymerisiert und wurden in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Anschließend wurde der zur Bildung der Taschen eingesteckte Elektrophoresekamm entfernt. Die DNA-Proben (10 µl PCR-Ansatz) wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{4}$ Volumen DNA-Probenpuffer gemischt und in die einzelnen Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Laufstrecke des Probenpuffers war farblich abgegrenzt, entsprach der Laufstrecke eines ca. 300 bp großen DNA-Fragments und diente als Hinweis, wann der Elektrophoreselauf beendet werden sollte. Die DNA-Moleküle wurden für ca. 45 Minuten bei einer Spannung von 1-5 V/cm, gemessen an der Distanz zwischen positiver und negativer Elektrode (16 cm), aufgetrennt. Um die Länge der aufgetrennten DNA-Fragmente zu bestimmen, wurde DNA-Marker neben den DNA-Proben mit auf das Gel aufgetragen.

Die Fragmentgrößen der PCR-Produkte, der für die Genotypisierung verwendeten Primer, können dem Abschnitt II.1.8. entnommen werden. Der PCR-Ansatz, der für die Bestimmung des *nude* Genotyps vollzogen wurde, musste zunächst einem Restriktionsverdau unterzogen werden (II.2.3.5.).

II.2.3.4. Restriktionsverdau von DNA zur Bestimmung des *nude* Genotyps

Der Verdau von DNA für die Bestimmung des *nude* Genotyps wurde mit der Restriktionsendonuklease BseDI durchgeführt. Die Auswahl des Puffers und der Temperatur, bei der das Enzym seine höchste katalytische Aktivität besitzt, erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers „MBI Fermentas“. Der Restriktionsansatz enthielten in einem Gesamtvolumen von 10 µl: 4 µl unaufgereinigtes PCR-Produkt, 0,5 µl BseDI, 1,2 µl 10×Restriktionspuffer (gelb) und 4,3 µl H₂O_{dd}. Die Restriktionsansätze wurden für 2 Stunden bei 55°C inkubiert und nach Zusatz von 5 µl Ladepuffer auf einem 4% Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde photographisch dokumentiert und die Fragmentgrößen anhand mit aufgetragener DNA-Längenstandards bestimmt. Erwartete Fragmentgrößen nach erfolgter Restriktion des PCR-Produkts: Wildtyp: 90 bp, 53 bp, 20 bp; CD1 *nude*: 110 bp, 58 bp (heterozygot).

II.2.3.5. Nachweis von Mycoplasmen mittels PCR

Mycoplasmen sind die kleinsten Prokaryoten. Da sie pleiomorph (variable Form) sind, schwankt ihr Durchmesser zwischen 0,1-2 µm. Dadurch können sie die üblichen Sterilfilter mit Porengrößen um 0,22 µm passieren. Kontaminationen von Zellkulturen mit Mycoplasmen sind relativ häufig, schwer zu erkennen und meist schwierig zu behandeln. Da Mycoplasmen zahlreiche negative Effekte auf in Kultur befindliche Zellen haben, muss eine Kontamination ausgeschlossen werden [288]. Aus diesem Grund wurden Medienüberstände konfluenter Zellen (90-100%) regelmäßig mittels PCR (VenorGeM[®], Minerva Biolabs, Berlin) auf Mycoplasmen-Kontamination getestet. Dabei wurden 100 µl Zellkulturüberstand 5 Minuten bei 99°C erhitzt und anschließend 5 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert.

<u>Bedingungen für 1 Ansatz:</u>			<u>PCR-Programm:</u>	
H ₂ O _d (PCR grade)	15,3	µl	95°C	3 min
10× Reaktionspuffer	2,5	µl	95°C	30 s
Primer/Nukleotid-Mix	2,5	µl	55°C	30 s
Internal Control DNA	2,5	µl	72°C	30 s
Taq (5 U/µl)	0,2	µl	4°C	∞
	Σ 23	µl		

) ×39

Der Mastermix wurde a 23 µl auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt und mit 2 µl H₂O_d als Negativkontrolle bzw. 2 µl Probe oder 2 µl Positivkontrolle versetzt. Nach der PCR wurde je 10 µl mit 1/4 Volumen DNA-Probenpuffer gemischt und auf einem 1,5%-Agarosegel analysiert. Die interne Kontrolle zeigt die korrekte Durchführung der PCR durch eine Bandengröße bei 191 bp an. Bei

einer Mycoplasmen-Kontamination und der Positivkontrolle kann ein Amplikon bei 265-268 bp nachgewiesen werden.

II.2.4. Biochemische Methoden

II.2.4.1. Detektion und Analyse von Proteinen

II.2.4.1.1. Herstellung von Proteinextrakten

Für die Gewinnung von Proteinextrakten wurden ca. 10^7 Zellen (ca. 50 mg) nach Zentrifugation (2500×g, 3 min) und Abnahme des Überstandes in DPBS resuspendiert, um das im Kulturmedium enthaltene Phenolrot zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (2500×g, 10 min) und in 500 µl Proteinextraktion-Reagens (versetzt mit Protease Inhibitoren; Cocktail Set I, #535142, Calbiochem, Merck) aufgenommen. Die Proteinextraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers (Thermo Fischer Scientific) für 10 Minuten auf einer Schwenkplatte. Die Zellrümpfer wurden durch Zentrifugation entfernt (15 min, 14000×g), das Proteinlysate aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die so gewonnenen Proteinextrakte konnten zur Bestimmung des Gesamtfibronektingehalts direkt im ELISA oder Western Blotting eingesetzt werden.

II.2.4.1.2. Herstellung von Knochen- und Knochenmarkslysaten

Zur Herstellung von Knochen- bzw. Knochenmarkslysaten wurden die Röhrenknochen (Femur und Tibia) ausgewählter Mäuse freipräpariert und nach Abschneiden der Epiphysen (Knochenenden) das Knochenmark mit 100 µl DPBS herausgespült. Das Knochenmark wurde zur weiteren Analyse in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen, abzentrifugiert (200×g, 5 min) und das Sediment anschließend in 200 µl Protein-Lysepuffer (versetzt mit Proteinase-Inhibitoren; II.1.5.) aufgenommen. Der Knochenmarksextrakt wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert, gefolgt von einer 5-minütigen Zentrifugation bei 14000×g. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und bis zur Quantifizierung des Gesamtfibronektingehalts mittels ELISA bei -20°C gelagert. Die Knochen wurden nochmals gründlich von Gewebsresten und verbliebenem Knochenmark befreit und dann in Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Knochen unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Knochenpulver gemörsert, welches in 1 ml Knochenlysepuffer (versetzt mit Proteinase-Inhibitoren; II.1.5.) aufgenommen wurde. Die Lyse erfolgte für 24 Stunden auf ei-

nem Rotator bei 4°C. Für die Analyse der Knochenlysate mittels Western Blotting musste das im Lysepuffer enthaltene Guanidin-HCl entfernt werden. Dazu wurden 100 µl des Knochenlysats mit 95% Ethanol ü. N. bei 4°C gefällt und die Präzipitate anschließend pelletiert (13000×g, 20 min, 4°C). Das Pellet wurde für zwei Stunden bei 4°C mit TBS (1:10 in 95% Ethanol) gewaschen, nochmals zentrifugiert, getrocknet und dann in Protein-Probenpuffer aufgenommen. Die bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzten Proteinmengen unterschiedlicher Knochenlysate wurden angeglichen, indem zuvor die Proteinkonzentration bestimmt wurde (II.2.4.1.3.).

II.2.4.1.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinmengenbestimmungen aus Proteinextrakten wurden mit dem „Micro BCA™ Protein Assay Kit“ von Pierce (#23235, Thermo Fischer Scientific) durchgeführt. Auf diese Weise konnten die im ELISA oder Western Blotting eingesetzten Proteinmengen angeglichen werden.

Zellysate wurden vor Bestimmung der Proteinkonzentration 1:200 bzw. 1:400 mit H₂O_{dd} verdünnt. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte in einer 96-Loch Platte nach den Empfehlungen des Herstellers. Die Absorption wurde mit einem Mikrotiterplatten Lesegerät bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration anschließend mit der Software Magellan V6.4 bestimmt.

II.2.4.1.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) diente der Größenfraktionierung denaturierter Proteine. Je nach Anteil des Polyacrylamids und dessen Vernetzungsgrades verändert sich die Porengröße und somit die Trenneigenschaften des Gels. Abhängig von der Proteingröße wurden 12%ige Bis-Tris-Gele (NuPAGE Novex, 1 mm Dicke) oder 3-8%ige Tris-Azetat-Gele (NuPAGE Novex, 1 mm Dicke) der Firma „Invitrogen“ verwendet. Die Proteine, die durch im Probenpuffer enthaltenes β-Mercaptoethanol reduziert wurden und durch das SDS eine negative Ladung erhielten, wurden vor dem Auftragen für 3 min auf 99°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer molaren Masse erfolgte bei 150 Volt für 1-2 Stunden. Als Laufpuffer diente Tris-Azetat-Puffer (NuPAGE, #LA0041) bzw. für die Bis-Tris-Gele ein MOPS-Laufpuffer (NuPAGE, #NP0001). Im Anschluss folgte die Färbung des Gels mittels einer Coomassie-Färbelösung (#24615, Pierce, Thermo Fisher Scientific) für 1 Stunde und eine Entfärbung mit H₂O_d ebenfalls für 1 Stunde. Das fertig gelaufene Gel wurde getrocknet in Folie aufbewahrt. Die Coomassie-Färbung entfiel für Gele, die für das Western-Blotting eingesetzt wurden.

II.2.4.1.5. Protein-Blotting

Beim Western-Blotting wurden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung mittels SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran (II.1.3.) überführt und dort einer proteinspezifischen Nachweisreaktion unterzogen. Die PVDF-Membran wurde vor ihrer Verwendung in Isopropanol getränkt und anschließend mit H_2O_d gewaschen. Die auf diese Weise aktivierte Membran wurde zwischen mehrere Lagen feuchter Schwämme luftblasenfrei auf dem Gel positioniert und in die mit Transferpuffer (II.1.5.) gefüllte Blotapparatur übertragen (Nassblotverfahren). Der Transfer erfolgte bei ca. 25 Volt für 1 Stunde und wurde anschließend mittels Ponceau-Färbung (#33427.01, Serva) überprüft. Die Entfärbung erfolgte für 5 Minuten mit H_2O_d .

II.2.4.1.6. Immundetektion von Proteinen nach dem Western-Blotting

Für die Immundetektion der Proteine wurden Antikörper verwendet, die gegen das nachzuweisende Protein gerichtet waren. Die geblotteten Membranen wurden über Nacht bei 4 °C (oder alternativ zwei Stunden bei RT) mit dem spezifischen Primärantikörper inkubiert (II.1.6.1.). Hierfür wurde der entsprechend konzentrierte Antikörper in Blocklösung (II.1.5.) auf die Membran gegeben und in einen Folienbeutel eingeschweißt. Anschließend wurde vierfach jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur in TBS-T gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Im Anschluss daran wurde die Membran mit dem entsprechenden in Blocklösung verdünnten sekundären Antikörper (II.1.6.2.) für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einer Schwenkplatte inkubiert. Danach erfolgten zur Entfernung nichtgebundener Antikörper ein dreimaliges Waschen in TBS-T für jeweils 5 min und ein abschließender Waschschrift in TBS. Die Detektion membrangebundener Proteine erfolgte nach Empfehlungen des Herstellers mit dem Pierce ECL Western-Blotting-Substrat. Hierbei oxidiert die Peroxidase des sekundären Antikörpers das cyclische Diacylhydrazid Luminol zu einem instabilen Zwischenprodukt, welches anschließend unter Lichtemission wieder in den Grundzustand übergeht. Das emittierte Licht wird durch Auflegen eines Röntgenfilmes (CL-X Posure) auf die mit Frischhaltefolie abgedeckte Membran detektiert. Die Inkubationszeit musste individuell an die Aktivität der jeweiligen Antikörper angepasst werden und lag gewöhnlich zwischen 30 Sekunden und zwei Minuten. Anschließend wurden die Röntgenfilme mit einem Entwicklungsgerät in einer Dunkelkammer entwickelt. Quantitativ konnten die so erhaltenen Proteinbanden schließlich densitometrisch erfasst werden. Nach erfolgreicher Immundetektion wurde die Membran mit Coomassie für wenige Sekunden gefärbt, für 1-3 Stunden in Coomassie-Entfärbelösung (II.1.5.) entfärbt und darauffolgend im getrockneten Zustand aufbewahrt.

II.2.4.2. Isolation von Fibronectin über eine Gelatine-Sepharose-Säule

Die Aufreinigung von Plasmafibronectin (pFN) aus humanem Gefrierfrischplasma (Blutbank, Uniklinik Heidelberg) erfolgte über eine Gelatine-Säule. Hierbei wurde die starke Affinität von Fibronectin zu denaturiertem Kollagen ausgenutzt [289].

Zunächst wurde ein luftblasenfreies Gelbett, bestehend aus Gelatine Sepharose 4B (12 ml), in einer Glassäule erzeugt und mit 150 ml Equilibrierungspuffer gespült (Laufgeschwindigkeit: 1,5 ml/min). Die Säule wurde mit 250 ml humanem Gefrierfrischplasma beladen (Laufgeschwindigkeit: 1 ml/min) und anschließend mit 150 ml Equilibrierungspuffer gewaschen. Das an die stationäre Phase gebundene Fibronectin wurde mit Elutionspuffer herausgelöst. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen und die Proteinkonzentration photometrisch (280 nm) bestimmt. Fraktionen mit einem Proteingehalt unter 0,1 mg/ml wurden verworfen. Die Lagerung der Fibronectinlösung erfolgte je nach Bedarf steril auf 4°C bzw. aliquotiert bei -20°C. Zuvor wurde die Qualität des gewonnenen Fibronectins mittels PAGE überprüft. Abschließend wurde die Säule nochmals mit 100 ml Equilibrierungspuffer gewaschen bzw. zuvor eine optionale Desorption der Säule (100 ml Desorptionspuffer; Laufgeschwindigkeit 1,2 ml/min) durchgeführt. Nach Gebrauch wurde die Säule in 20% Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

II.2.4.3. Fibronectin-Depletion des fetalen Kälberserums

Wie zuvor beschrieben wurde die fibronectinspezifische Knockdown-Effizienz der lentiviral transduzierten Tumorzellen analysiert, indem der Gesamtfibronectingehalt von kultivierten Zellen in Mediumüberständen bestimmt wurde (II.2.5.3.). Fetales Kälberserum (FCS) war ein wichtiger Bestandteil des Kulturmediums, in dessen Abwesenheit Zellkulturen sehr eingeschränkte bzw. abnorme Wachstumseigenschaften zeigten. FCS enthielt beträchtliche Mengen an Fibronectin, das im ELISA nicht von dem endogen produzierten Fibronectin der Tumorzellen unterschieden werden konnte. Aus diesem Grund war es notwendig, Fibronectin aus dem FCS zu entfernen. Dies erfolgte, wie zuvor beschrieben, über eine Gelatine-Sepharose-Säule. Dazu wurde die Säule wiederholt (3-5 Zyklen) mit FCS beladen und das an die Säule gebundene Fibronectin eluiert und verworfen. Die ersten 5 ml und die letzten 5 ml des Durchflusses wurden ebenfalls verworfen. Der restliche Durchfluss (Fibronectin-freies FCS) wurde aufgefangen, sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nachfolgend wurde der Gesamtfibronectingehalt mittels pFN-ELISA bestimmt (II.2.4.5.1.).

II.2.4.4. Proteinkonzentrierung und Dialyse

Ist die Konzentration einer Proteinlösung zu gering, muss das Volumen mittels Zentrifugation eingengt werden. Hierfür wurden spezielle Zentrifugenröhrchen (Macrosep) nach Angaben des Herstellers verwendet. Während der Zentrifugation wurden die Proteinlösungen über eine spezielle Membran gefiltert. Hierbei wurde die Porengröße der Membran so gewählt, dass das gewünschte Protein die Membran nicht passieren konnte und anhand des Molekulargewichts von der Lösung getrennt wurde.

Die über die Gelatine-Sepharose-Säule isolierte Fibronectinlösung wurde im Anschluss an die Konzentrierung wiederholt gegen PBS dialysiert, um den im Elutionspuffer befindlichen Harnstoff möglichst vollständig zu entfernen.

II.2.4.5. Immunoassays

II.2.4.5.1. Gesamtfibronectin-ELISA

Der Sandwich-ELISA ist ein immunologisches Verfahren zur Quantifizierung löslicher Proteine. Das zu quantifizierende Protein wird hierbei mit einem primären Antikörper an die feste Phase gebunden und mit einem sekundären Antikörper, der ein anderes proteinspezifisches Epitop erkennt, detektiert. Das an den Zweitantikörper konjugierte Enzym Peroxidase leitet nach Zugabe einer Substratlösung eine Farbreaktion ein. Die Intensität der Farbreaktion wird dann anhand einer Standardkurve quantifiziert [290].

Der Gesamtfibronectingehalt in Blutplasma, Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde auf diese Weise bestimmt. Die Methode wurde in Anlehnung an ein bereits veröffentlichtes Protokoll modifiziert angewandt [44]. Hierzu wurde eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit dem gegen humanes Fibronectin gerichteten primären Antikörper beschichtet. Der Antikörper wurde entsprechend in Karbonat-Puffer verdünnt (anti-human Fibronectin, Endkonzentration 0,12 µg/ml) und je Vertiefung wurden 50 µl der Suspension ü. N. bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte dreimal mit 350 µl TBS-T je Vertiefung gewaschen und verbliebene freie Bindungsstellen mit 50 µl Blockierungspuffer (II.1.5.) pro Vertiefung für eine Stunde bei RT abgesättigt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 50 µl der zu analysierenden Proteinlösung, der Standardreihe und der Kontrollen, in Verdünnungspuffer (II.1.5.) aufgetragen und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal gewaschen und der Peroxidase konjugierte sekundäre Antikörper (anti-human Fibronectin-HRP konjugiert) in Verdünnungspuffer hinzugegeben. Für humane Plasma-proben, Zellkulturmedien und Zelllysate wurde der Zweitantikörper in einer Verdünnung von

1:2000 eingesetzt. Für Mausplasma und murine Knochenlysate wurde der Antikörper in einer 1:500 Verdünnung verwendet. Nach einer Inkubationsphase von 45 Minuten und fünfmaligem Waschen der Platte wurden 50 µl TMB Substratlösung pro Vertiefung zugegeben und die Farb-reaktion nach 30 Minuten mit Stopplösung beendet. Unmittelbar nach dem Abstoppen erfolgte die Messung der Platte bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten Lesegerät der Firma Tecan. Für die Kurvenanpassung wurde die Vier-Parameter logistische Funktion verwendet (Software Magellan; V6.4). Der Nullwert wurde von jedem Messwert abgezogen. Die Quantifizierung basierte für humane Proben auf einer Fibronectin-Standardreihe von 0-2000 ng/ml (2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 0 ng/ml). Für die Standardreihe wurde über die Gelatine-Säule aufgereinigtes Fibronectin verwendet (II.2.4.2.). Als Standard für murine Proben wurde Mausplasmafibronectin (#IMFBN, Dunn) in Konzentrationen zwischen 0-4000 ng/ml (4000, 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 ng/ml) verwendet.

II.2.4.5.2. Zellproliferations-ELISA

Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgte mit dem BrdU-Zellproliferations-ELISA (#1647229, Roche) nach Angaben des Herstellers. Die Messung basiert auf dem Einbau von BrdU (Bromdesoxyuridin) an Stelle von Thymidin während der DNA-Synthese. Die bei diesem Testverfahren nachgewiesene BrdU Menge ist ein direktes Maß für die Proliferationsaktivität der untersuchten Zelllinien. Hierzu wurden in eine 96-Loch-Platte 8×10^3 Zellen pro Vertiefung in 100 µl Kulturmedium ausgesät und für 24 Stunden in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die BrdU Markierungslösung hinzugegeben und die Zellen für weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Fixierung, Denaturierung und die Behandlung mit dem Anti-BrdU-Antikörper erfolgte nach Herstellerangaben. Fünfundzwanzig Minuten nach Zugabe der Substratlösung wurde die Farbreaktion mit 50 µl 0,5 M Schwefelsäure beendet und die Absorption der Proben bei 450 nm gemessen. Die Auswertung der Messdaten erfolgte nach Abzug des Nullwerts mit der Software Magellan (V6.4).

II.2.4.5.3. Zell-Adhäsions-Array

Die relative Anhaftung der Tumorzelllinien an unterschiedliche extrazelluläre Matrix Proteine wurde unter Verwendung des Zell-Adhäsions-Arrays (#CBA083, Calbiochem, Merck) bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Empfehlungen des Herstellers. Dabei wurden jeweils 30000 Tumorzellen (in 100 µl Kulturmedium) pro Vertiefung, in eine 96-Loch Platte ausgesät die mit 6 unterschiedlichen extrazellulären Matrix-Proteinen (Laminin-I, Fibronectin, Vitronectin, Kollagen I, Kollagen III und Kollagen IV) beschichteten war. Im Anschluss an eine zweistündige Inkubation bei 37°C in einem Zellkultur-Inkubator, folgte ein Waschschritt mit 200 µl PBS. Adhätierende Zellen

wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein markiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz jeder Vertiefung mit einem Plattenlesegerät („Wallac Viktor² 1420 Multilabel Counter“, PerkinElmer Life Sciences) bestimmt (Anregungswellenlänge ca. 485 nm; Emissionswellenlänge ca. 520 nm; Messdauer: 1 s/Vertiefung). Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software „Wallac 1420 Workstation“ (V3.00.0.53).

II.2.4.6. Histologische Untersuchungen an Tumorgeweben

II.2.4.6.1. Entkalkifizierung der Knochentumore

Die Entkalkifizierung (Entkalkung) ermöglicht die Fertigung von Gefrierschnitten und die anschließende immunhistochemische Antikörperfärbung der Knochentumore. Hierfür wurden die in NBF fixierten (II.2.1.5.4.) Knochentumore mit einer EDTA-Lösung (5-10% EDTA, pH 7, 4°C) entkalkt. Die Entkalkifizierung wurde über einen Zeitraum von zwei Wochen bei 4°C vollzogen, dabei wurde die EDTA-Lösung im Abstand von 2-3 Tagen erneuert. Anschließend wurden die Proben mit einer aufsteigenden Saccharosereihe (10% für 1 h, RT / 20% für 1 h, RT / 30% ü. N. bei 4°C; in PBS) auf die Gefriereinbettung vorbereitet. Die entmineralisierten, flexiblen Gewebeproben wurden, wie im Folgenden beschrieben, mit einem Kryomikrotom (Kryotom) geschnitten.

II.2.4.6.2. Immunhistochemie

Die Blutgefäße der Knochentumore wurden immunhistochemisch, durch Verwendung eines gegen den Blutgefäßmarker CD31 gerichteten Antikörpers, sichtbar gemacht. Hierfür wurden die entkalkten bzw. in Stickstoff schockgefrorenen Knochentumore mit Tissue-Tek luftblasenfrei eingebettet. Anschließend wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und jeweils zwei Schnitte auf den Objektträger gebracht. Als optimale Bedingungen für die Anfertigung der Schnitte erwiesen sich eine Temperatur von -24°C im Innenbereich des Kryotoms und eine Objekttemperatur von -14°C. Anschließend wurden die Schnitte für einige Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und entweder sogleich weiterverwendet (s. unten) oder aber bei -20°C gelagert.

Die auf dem Objektträger befindlichen Gewebeschnitte wurden zunächst mit einer Flüssigkeitsbarriere („Pap pen“, Sangyo) ummantelt. Dadurch konnte in den folgenden Schritten die Menge an eingesetzter Antikörperlösung reduziert werden. Es folgten die Rehydrierung der Schnitte in PBS und die Zugabe des Primäantikörpers (anti-CD31) in der entsprechenden Verdünnung (1:50 in PBS mit 5% Ziegenserum). Die Übersichtung erfolgte gerade so weit, dass das gesamte Präparat mit ca. 50 µl der Antikörperlösung bedeckt war. Nach Inkubation in einer feuchten

Kammer ü. N. bei 4°C wurden die Präparate mindestens dreimal mit PBS gewaschen (je 5 min, RT) und die Behandlung mit dem sekundären Antikörper abgeschlossen. Hierfür wurde der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper (anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor 555-konjugiert aus Ziege) 1:500 in PBS mit 5% Ziegenserum verdünnt, und wie zuvor für den Primäantikörper beschrieben, aufgetragen. Zur Darstellung der Zellkerne wurde dem verdünnten Sekundäantikörper der fluoreszierende DNA-Farbstoff DAPI (0,3 µg/ml) hinzugefügt. Nach einer Inkubationsphase von einer Stunde bei RT wurden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen (je 5 min, RT) mit PBS entfernt. Die Präparate konnten direkt im Anschluss luftblasenfrei mit Mowiol und einem Deckgläschen eingedeckt werden. Die Lagerung der Schnitte erfolgte für maximal eine Woche bei 4°C. Die Präparate wurden am „Nikon Imaging Center“ der Universität Heidelberg, mit dem Nikon 90i, in 20-facher Vergrößerung abfotografiert und mit der Software „ImageJ“ (Wayne Rasband, NIH) ausgewertet.

II.2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit den Programmen SPSS (V11.0, Chicago, IL, USA), GraphPad Prism (V3., GraphPad Software Inc., USA) und Microsoft Excel. Für die Evaluierung statistischer Unterschiede wurde der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben oder der nichtparametrische Mann-Whitney-Test, verwendet. Für die Bestimmung der mittleren Überlebenszeiten der Mäuse nach intrakardialer Injektion wurde eine Kaplan-Meier Analyse durchgeführt. Statistische Unterschiede der Überlebensverteilung wurden mit dem Mantel-Cox-Test bzw. dem Gehan-Breslow-Wilcoxon Test berechnet. Alle Fehlerraten sind als Standardfehler angegeben (SEM für engl. „standard error of the mean“).

III. Ergebnisse

III.1. Induktion von Knochenmetastasen

Immundefizienten Mäusen wurden Knochenmetastasen durch die intrakardiale Applikation humaner Tumorzellen induziert. Die für die Injektion eingesetzten luciferaseexprimierenden Zellen basierten auf dem Mammakarzinom MDA-MB-231-B/luc⁺ (im Folgenden als MDA bezeichnet), bzw. dem Prostata-Adenokarzinom PC-3M-Pro4/luc⁺ (im Folgenden als PC3 bezeichnet). Eine Kontamination mit Mycoplasmen konnte für die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien ausgeschlossen werden. Der „knochensuchende“ Klon MDA-MB-231-B/luc⁺ bewirkt im Anschluss an die intrakardiale Injektion ausnahmslos eine Metastasierung der Knochen und verursacht vorrangig osteolytische Knochenläsionen. Tumorzellen der PC3-Linie infiltrieren ebenfalls vorzugsweise Knochengewebe und bewirken überwiegend osteolytische Läsionen.

III.1.1. Verifizierung einer erfolgreichen intrakardialen Injektion

Die intrakardiale Applikation von Tumorzellen ist ein diffiziles Verfahren, welches einer Erfolgskontrolle bedarf. Hierbei muss einerseits sichergestellt werden, dass eine äquivalente Anzahl der Tumorzellen injiziert wurde, andererseits ist die lagebezogene Verabreichung der Tumorzellen in den linken Herzventrikel für die Metastasierung des Knochens entscheidend. In der Literatur wurde beschrieben, dass der mittels Biolumineszenz-Bildgebung erbrachte Nachweis über die Verteilung der Tumorzellen 10-60 Minuten im Anschluss an die intrakardiale Applikation als Verifizierung einer erfolgreichen Injektion dient. Zusätzlich wurde die Photonenemission der Tumorzellen 24 Stunden und 3 Wochen nach der Innokulation bestimmt.

Tatsächlich konnte die frühe Verteilung der luciferaseexprimierenden Tumorzellen im Anschluss an die intrakardiale Applikation nachgewiesen werden. Dieses Nachweisverfahren konnte für die Gesamtheit der in dieser Arbeit genutzten Mauslinien im Zusammenhang mit allen verwendeten Tumorzelllinien bestätigt werden. Zehn Minuten nach der Innokulation wurde mittels Biolumineszenz-Bildgebung die Photonenemission der zirkulierenden Tumorzellen über den gesamten Körper der Maus detektiert. Nach 24 Stunden wurde hingegen kein Biolumineszenz-Signal nachgewiesen. Drei Wochen im Anschluss an die Injektion konnten erste Regionen von Photonenanhäufungen ausgemacht werden, die den jeweiligen metastatischen Läsionen entsprachen (Abb. III.1). Für die weiteren Experimente wurde der Erfolg der intrakardialen Injektion jeweils 10-60 Minuten

im Anschluss an die Inokulation evaluiert. Die von den Tumorzellen emittierte Lichtleistung spezifischer Interessensbereiche (Metastasen) konnte als relative Lichteinheiten (RLU) quantifiziert werden. Die im Anschluss an die Luciferin-Applikation erzeugte Photonenemission erhöhte sich von Woche zu Woche und spiegelte das Tumorwachstum der induzierten Metastasen wieder.

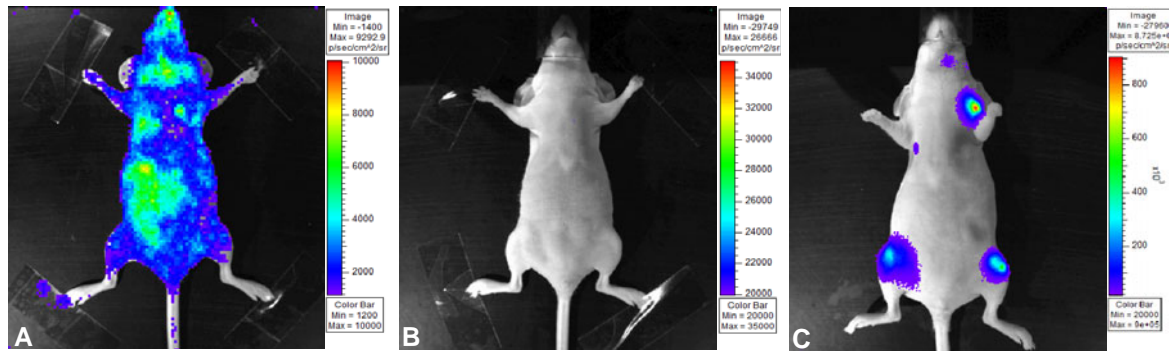


Abbildung III.1: Evaluierung einer erfolgreichen intrakardialen Injektion mittels Biolumineszenz-Bildgebung

Zehn Minuten im Anschluss an die intrakardiale Applikation der Tumorzellen (MDA-CT) konnte mittels Biolumineszenz-Bildgebung eine diffus über den gesamten Körper der Maus verteilte Photonenanhäufung beobachtet werden (A). Nach 24 Stunden wurde bei demselben Tier kein Signal detektiert (B). Drei Wochen nach Inokulation der Tumorzellen waren eindeutige Regionen von Photonenanhäufung im Bereich der Hinterbeine, des Oberarms und des Kieferbereichs zu erkennen (C).

III.1.2. Quantifizierung osteolytischer Läsionen

Um die Fläche osteolytischer Läsionen zu bestimmen, wurden Röntgenaufnahmen eingescannt und am Computer analysiert (ImageJ, Wayne Rasband, NIH). Gegen Ende der experimentellen Phase wurden die mittels Biolumineszenz-Bildgebung identifizierten Metastasen anhand von radiographisch erhaltenen Daten abgeglichen. Die Röntgenaufnahmen dienten einerseits dazu, die mittels Biolumineszenz-Bildgebung lokalisierten Metastasen zu verifizieren, andererseits konnte auf diese Weise die Fläche des Knochenverlusts bestimmt werden (Abb. III.2). Im Gegensatz zur Biolumineszenz-Bildgebung, bei der die gesamte Tumorzellmasse erfasst wird, gibt die Quantifizierung der Fläche osteolytischer Läsionen Aufschluss über das destruktive Wachstum von Tumoren und dem damit verbundenen Verlust an Knochensubstanz. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurden die Röntgenaufnahmen zum jeweiligen Todeszeitpunkt aufgenommen und die osteolytische Fläche bestimmt. Tiere, bei denen mittels Biolumineszenz-Bildgebung eine spontane Tumorrückbildung (Regression) beobachtet werden konnte, wurden nach dem vollständigen Verlust der Photonenemission in regelmäßigen Abständen (3-4 Wochen) geröntgt. Auf diese Weise konnten eventuell auftretende Heilungsprozesse auf Knochenebene nachvollzogen werden.

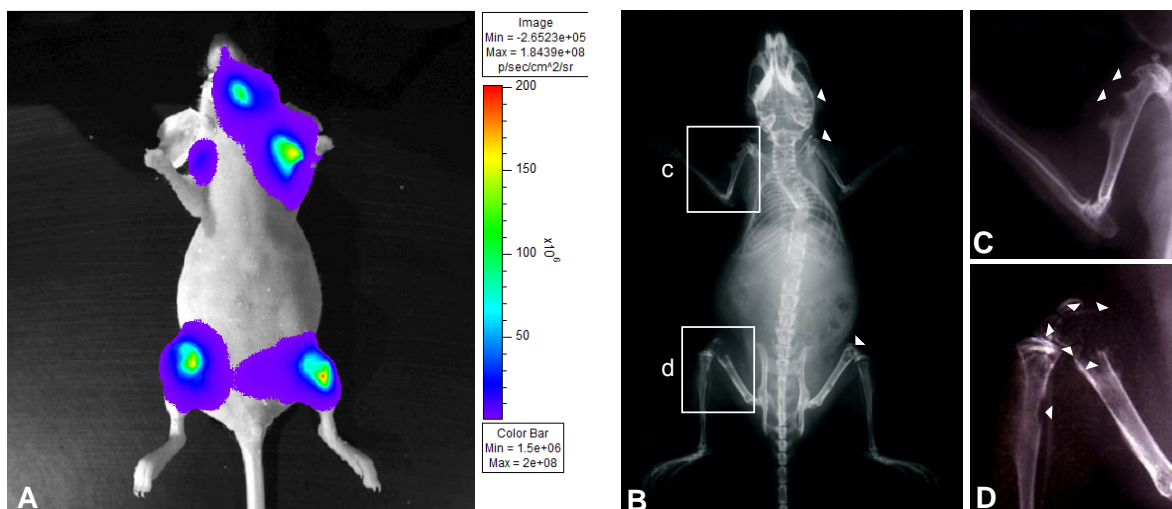


Abbildung III.2: Biolumineszenz-Bildgebung und Röntgenaufnahme im Vergleich

Sechs Wochen im Anschluss an die intrakardiale Injektion der Tumorzellen konnten mittels Biolumineszenz-Bildgebung eindeutige Regionen von Photonenanhäufungen der Femora, der linken Tibia, der Humeri und der Mandibula ermittelt werden (A). Im Vergleich zum Biolumineszenz-Signal, welches 3 Wochen nach der Tumordinjektion detektiert wurde, konnte eine beträchtliche Zunahme der Photonenemission festgestellt werden, die dem Wachstum der Tumore entsprach (Vergleiche Abb.III.1 C mit Abb. III.2 A). Die äquivalente Röntgenaufnahme zeigt 6 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen deutliche osteolytische Läsionen (B). Die vergrößerte Darstellung der osteolytischen Läsion des rechten Humerus (C) und des rechten Femurs (D) kennzeichnet die Destruktion des Knochengewebes. Die Pfeilspitzen markieren Regionen verlorener Knochensubstanz.

III.2. Einfluss von Fibronectin der Mikroumgebung auf die Etablierung und das Wachstum von Knochenmetastasen

Es wird vermutet, dass vor dem eigentlichen Eintreffen metastasierender Tumorzellen im Bereich der prämetastatischen Nische eine geeignete Mikroumgebung entsteht, so dass es zur Einnistung und Proliferation an Sekundärorten kommen kann. Um die Rolle des Fibronectins der Mikroumgebung bei der Metastasierung *in vivo* zu untersuchen, wurde mit konditionellen Knockoutmäusen gearbeitet, die eine Ausschaltung von Fibronectin im Knochenmark über den Mx-Promotor (Mx cKO: konditionelle Mx-Knockoutmäuse) bzw. die Deletion von Fibronectin der Osteoblasten mittels Col-Promotor (Col cKO: konditionelle Mx-Knockoutmäuse) ermöglichten.

III.2.1. Die Rolle des Fibronektins der Blutzirkulation und des Knochenmarks bei der Metastasierung

Um einen möglichen Effekt von Knochenmarks-Fibronectin auf den Metastasierungsprozess zu untersuchen, musste sichergestellt werden, dass die Ausschaltung von Fibronectin in der Blutbahn und im Knochenmark zum Zeitpunkt der intrakardialen Applikation der Tumorzellen gewährleistet war. In diesem Zusammenhang wurden immundefiziente Mäuse eingesetzt, deren Fibronectin-Gen unter Verwendung des Mx-Promotors (II.2.1.3.1.) ausgeschaltet wurde.

Die exogene Aktivierung des Mx-Promotors erfolgte bei 2-3 Wochen alten Mäusen mittels 4 intraperitonealer Injektionen von pl-pC. Zu einem früheren Zeitpunkt wurde die Verabreichung von pl-pC nicht durchgeführt, da dies mit einem vermehrten Versterben einhergegangen wäre. Knochenmetastasen wurden 3 Tage im Anschluss an die letzte pl-pC Applikation induziert.

III.2.1.1. Ausschaltung des Plasmafibronectins in konditionellen Knockoutmäusen

Bereits 24 Stunden im Anschluss an die Induktion des Mx-Promotors konnte eine Reduktion des Fibronectingehalts von mehr als 85% beobachtet werden. Achtundvierzig Stunden nach der Induktion des Mx-Promotors war der Fibronectingehalt im Plasma im Vergleich zu den Kontrollen um mehr als 89% vermindert. Der höchste Ausschaltungsgrad wurde nach 3 Wochen erreicht und die Deletion des Plasmafibronectins war für mindestens 2 Monate stabil (CT 199 ± 34 vs. Mx cKO 16 ± 9 $\mu\text{g/ml}$, $n=8/8$, $p<0,0001$; Abb. III.3).

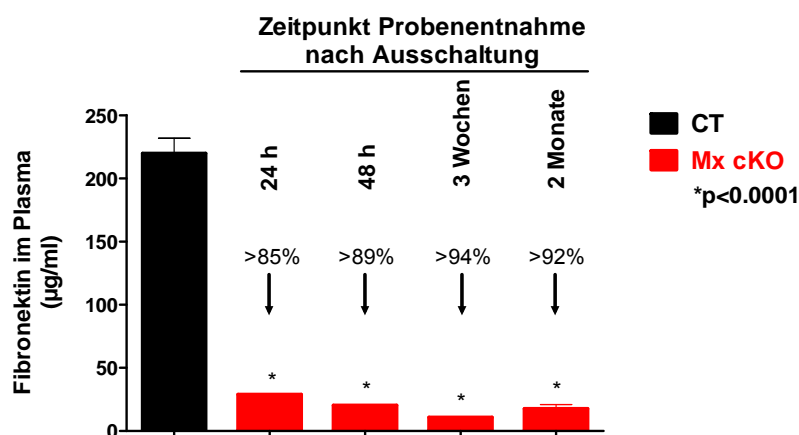


Abbildung III.3: Ausschaltung von Plasmafibronectin mittels Mx-Promotor

Der Gesamtfibronectin ELISA zeigte, dass die konditionellen Knockouts signifikant weniger Fibronectin im Blutplasma aufwiesen. Bereits 48 Stunden im Anschluss an die Induktion des Mx-Promotors war der Fibronectingehalt im Plasma um mehr als 89% reduziert.

III.2.1.2. Beweis der Ausschaltung des Fibronektins im Knochenmark

Um den MxCre vermittelten Ausschaltungsgrad von Fibronektin im Knochenmark zu beurteilen, wurden Röhrenknochen (Femur und Tibia) von Kontroll- bzw. Mx-Knockouttieren freipräpariert und nach dem Entfernen der Epiphysen das Knochenmark herausgespült. Der Ausschaltungsgrad der Knochenmarkslysate wurde mittels ELISA analysiert und zum Gesamtproteingehalt korrigiert (Abb. III.4).

Vierundzwanzig Stunden im Anschluss an die Ausschaltung des Fibronektin-Gens konnte in den Knochenmarkslysaten der konditionellen Knockoutmäuse 60% weniger Fibronektin detektiert werden (CT 87 ± 5 vs. Mx cKO $35 \pm 0,3$ ng Fibronektin/g Protein, $p < 0,0015$). Nach 48 Stunden war der Gesamtfibronektingehalt der Mx-Knockouts im Vergleich zu den Kontrolltieren um 75% reduziert (CT 87 ± 5 vs. Mx cKO $21 \pm 0,2$ ng Fibronektin/g Protein, $p < 0,001$). Zwei Wochen im Anschluss an die Induktion des Mx-Promotors war der Fibronektingehalt im Knochenmark der konditionellen Knockouts signifikant um 90% vermindert (CT 87 ± 5 vs. Mx cKO 9 ± 1 ng Fibronektin/g Protein, $p < 0,0001$).

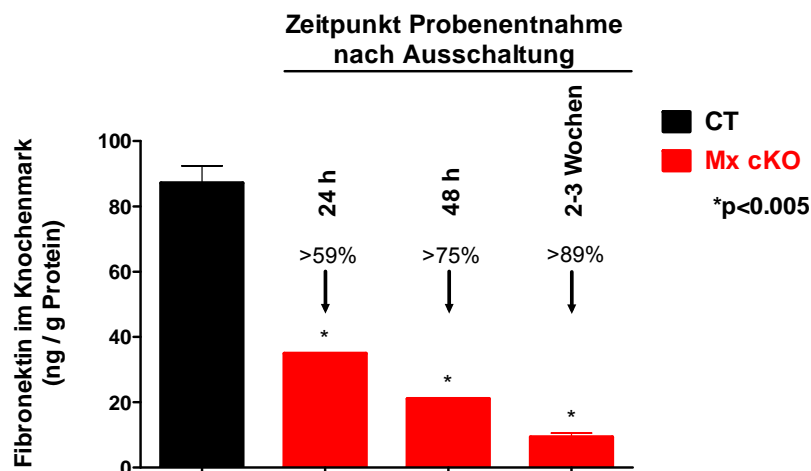


Abbildung III.4: Ausschaltung von Fibronektin im Knochenmark

Der Gesamtfibronektin-ELISA der Knochenmarkszelllysate zeigte, dass die konditionellen Knockouts signifikant weniger Fibronektin im Knochenmark aufwiesen. Bereits 48 Stunden im Anschluss an die Induktion des Mx-Promotors war der Fibronektingehalt im Knochenmark um mehr als 75% reduziert.

III.2.1.3. Überlebensraten

Nachdem die Ausschaltung des Fibronektins in der Blutbahn und im Knochenmark der Mx-Knockouttiere nachgewiesen worden war, wurde unter Berücksichtigung der 21-stündigen Halbwertszeit von Plasmafibronektin [291] entschieden, die intrakardiale Applikation der Tumorzellen drei Tage nach der letzten pl-pC Gabe zu vollziehen. Knockoutmäusen und Kontrolltieren wurden

Knochenmetastasen durch die intrakardiale Applikation der humanen Brustkrebszellelinie MDA-CT induziert. Die Evaluierung der entstehenden Knochenmetastasen erfolgte mittels Biolumineszenz-Bildgebung.

Drei Wochen im Anschluss an die intrakardiale Applikation der Tumorzellen konnte das Auftreten erster Metastasen beobachtet werden. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Photonenemission der Tumore einmal wöchentlich mittels Biolumineszenz-Bildgebung beurteilt. Tiere, die während der experimentellen Phase eine starke Verschlechterung des Allgemeinzustandes aufwiesen, wurden getötet (II.2.1.5.4).

Wie die Kaplan-Meier-Analyse in Abbildung III.5 zeigt, wurde durch die Ausschaltung von Fibronectin in der Blutbahn und im Knochenmark die Überlebensdauer der Mäuse signifikant verlängert ($p < 0,01$). Während Kontrollmäuse, denen die Brustkrebszelllinie inokuliert wurde, im Mittel bereits nach 6,6 Wochen verstarben ($n=15$), zeigten Mäuse, bei denen Fibronectin in der Blutbahn und im Knochenmark ausgeschaltet war, eine mediane Überlebensdauer von 8,7 Wochen ($n=11$).

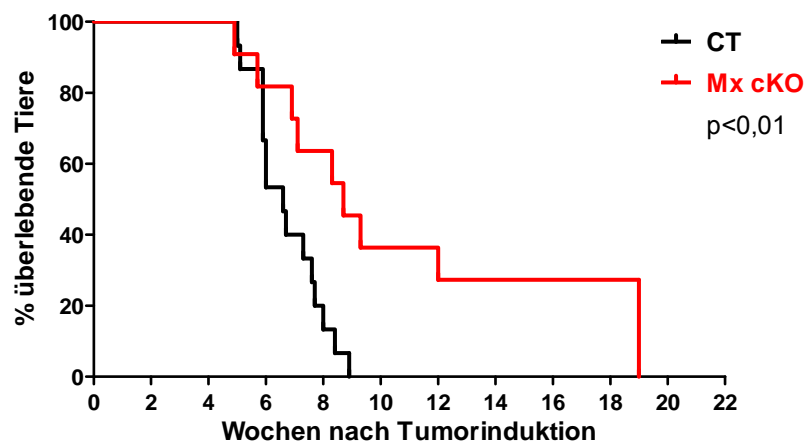


Abbildung III.5: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensdauer (CT vs. Mx cKO)

Knockoutmäuse (Mx cKO) und Kontrolltieren (CT) wurden Knochenmetastasen durch die intrakardiale Applikation des humanen Mammakarzinoms MDA-CT induziert. Konditionelle Mx-Knockouttiere zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren einen signifikanten Überlebensvorteil (mediane Überlebensdauer: CT 6,6 vs. Mx cKO 8,7 Wochen, $n=15/11$, $p < 0,01$).

Während 6 bis 7 Wochen nach der Tumorinduktion bereits 50% der Kontrolltiere verstarben, bzw. aufgrund einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes sakrifiziert wurden, überlebten 82% der Mx-Knockouts diesen Zeitraum. Acht bis 9 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen waren bereits 93% der Tiere aus der Kontrollgruppe verstorben, im Gegensatz zu 50% der Fibronectin-Knockoutmäuse (Abb. III.6).

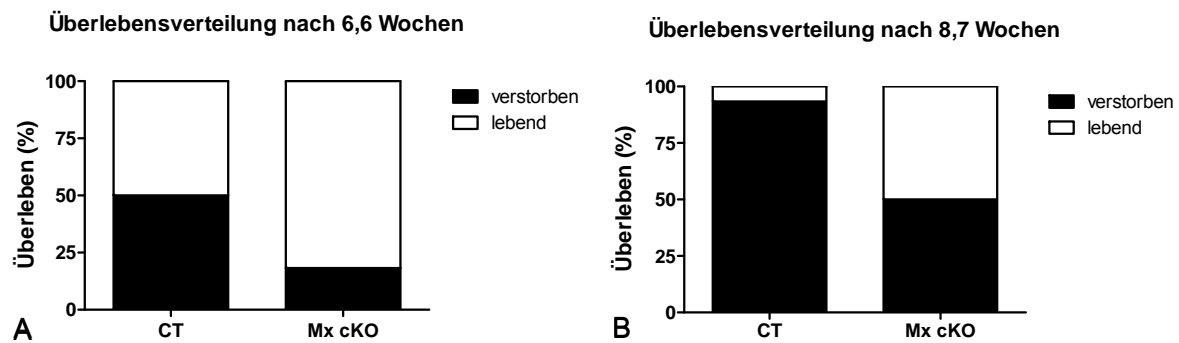


Abbildung III.6: Überlebensverteilung zu ausgewählten Zeitpunkten (CT vs. Mx cKO)

6,6 Wochen nach der Induktion der Knochenmetastasen waren bereits 50% der Kontrollmäuse verstorben. Im Gegensatz dazu waren zu diesem Zeitpunkt 9 der 11 Mx-Knockouttiere am Leben (A). Während 6 der 11 konditionellen Knockouttiere einen Zeitraum von 8,7 Wochen im Anschluss an die Tumorinduktion überlebten, war es in der Kontrollgruppe nur 1 Tier (B).

III.2.1.4. Anzahl gebildeter Metastasen

Um zu evaluieren, ob die Ausschaltung von Fibronectin in Blutbahn und Knochenmark einen Einfluss auf die Infiltrations-Eigenschaften der Tumorzellen zum Knochenmark hatte, wurde die Anzahl der entstandenen Metastasen zwischen Mx-Knockoutmäusen und Kontrolltieren verglichen.

Drei bis sechs Wochen nach der Applikation der Tumorzellen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen konditionellen Knockoutmäusen und Kontrollen festgestellt werden (Woche 3: CT $7,8 \pm 1,0$ vs. Mx cKO $5,5 \pm 2,5$ Metastasen je Tier, $n=12/6$, $p=NS$; 4 Wochen: CT $8,2 \pm 0,8$ vs. Mx cKO $5,9 \pm 1,5$ Metastasen je Tier, $n=15/10$, $p=NS$; 5 Wochen: CT $8,0 \pm 0,9$ vs. Mx cKO $6,5 \pm 1,5$ Metastasen je Tier, $n=15/10$, $p=NS$; 6 Wochen: CT $7,1 \pm 1,0$ vs. Mx cKO $5,8 \pm 1,1$ Metastasen je Tier, $n=14/9$, $p=NS$). Die *Homing*-Eigenschaften der Tumorzellen zu ihrem Zielorgan, dem Knochenmark, waren demnach durch die MxCre vermittelte Ausschaltung von Fibronectin vermutlich nicht beeinflusst. Mehr als die Hälfte der Tiere aus der Kontrollgruppe war bis zur 7. Woche bereits verstorben. Aus diesem Grund wurde die Tumoranzahl in Abbildung III.7 lediglich bis Woche 6 dargestellt.

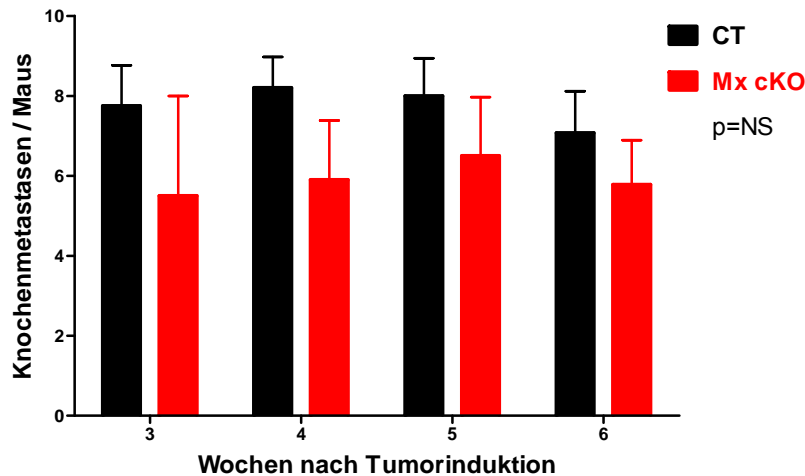


Abbildung III.7: Anzahl der entstandenen Knochenmetastasen (CT vs. Mx cKO)

Zwischen konditionellen Knockoutmäusen (Mx cKO) und Kontrollen (CT) konnte über den Beobachtungszeitraum von 3-6 Wochen kein signifikanter Unterschied, bezogen auf die Anzahl etablierter Metastasen, festgestellt werden (*NS* \triangleq nicht signifikant).

III.2.1.5. Gesamttumorbelastung

Die Tumorbelastung je Maus wurde ermittelt, indem die Gesamtlichtleistung der Metastasen eines Tieres summiert und anschließend der Mittelwert für die unterschiedlichen Versuchstiergruppen gebildet wurde. Die mittlere emittierte Lichtleistung dient als Hinweis für die Gesamttumorbelastung der Tiere.

Die Gesamttumorbelastung war in den Mx-Knockouttieren 3-6 Wochen nach der Tumorinduktion signifikant vermindert (3 Wochen: CT $6,3 \pm 1,9 \times 10^6$ vs. Mx cKO $0,5 \pm 0,3 \times 10^6$ RLU, $n=12/6$, $p<0,05$; 4 Wochen: CT $3,5 \pm 0,9 \times 10^7$ vs. Mx cKO $0,6 \pm 0,3 \times 10^7$ RLU, $n=14/7$, $p<0,01$; 5 Wochen: CT $1,7 \pm 0,5 \times 10^8$ vs. Mx cKO $0,4 \pm 0,1 \times 10^8$ RLU, $n=13/10$, $p<0,05$; 6 Wochen: CT $9,0 \pm 4,4 \times 10^8$ vs. Mx cKO $0,5 \pm 0,3 \times 10^8$ RLU, $n=11/6$, $p<0,005$). Dabei konnte die größte Differenz der Tumorlast 6 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen ermittelt werden (Abb. III.8). Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise darauf, dass die Wachstumseigenschaften der Tumorzellen durch die MxCre vermittelte Ausschaltung von Fibronectin beeinträchtigt waren.

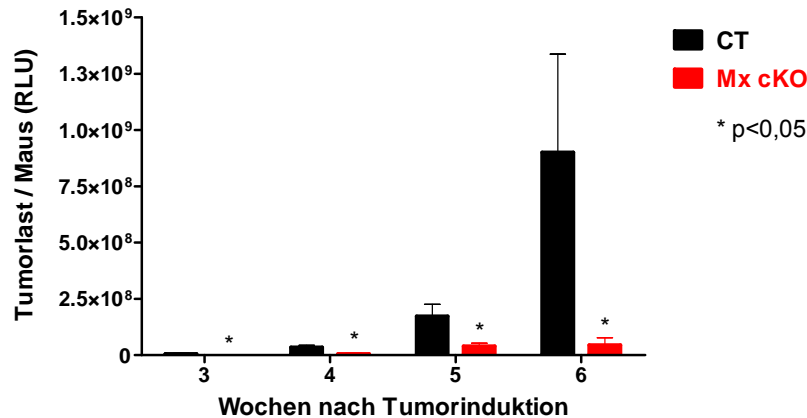


Abbildung III.8: Analyse der Gesamttumorbelastung pro Maus (CT vs. Mx cKO)

Verglichen mit den Kontrollen (CT) ließ sich bei den konditionellen Knockouttieren (Mx cKO) eine signifikante Verminderung der Gesamttumorbelastung je Maus feststellen.

III.2.1.6. Tumorwachstum

Um Rückschlüsse auf das Wachstum der induzierten Metastasen zu ziehen, wurde die Tumorlast der metastatischen Läsionen ermittelt, indem die Gesamtbiolumineszenz der Tumore summiert und durch die Anzahl der Metastasen dividiert wurde. Der für die unterschiedlichen Versuchstiergruppen generierte Mittelwert ist in Abb. III.9 graphisch dargestellt. Die Tumorlast je Metastase war bei den Mx-Knockouttieren 3-6 Wochen im Anschluss an die Inokulation der Tumorzellen statistisch signifikant vermindert (3 Wochen: CT $8,2 \pm 1,2 \times 10^5$ vs. Mx cKO $0,9 \pm 0,2 \times 10^5$ RLU, $n=93/33$, $p<0,0001$; 4 Wochen: CT $4,2 \pm 0,6 \times 10^6$ vs. Mx cKO $1,4 \pm 0,4 \times 10^6$ RLU, $n=118/30$, $p<0,01$; 5 Wochen: CT $2,0 \pm 0,3 \times 10^7$ vs. Mx cKO $0,6 \pm 0,1 \times 10^7$ RLU, $n=114/65$, $p<0,001$; 6 Wochen: CT $1,1 \pm 0,2 \times 10^8$ vs. Mx cKO $0,1 \pm 0,04 \times 10^8$ RLU, $n=91/24$, $p<0,001$). Dies impliziert ein reduziertes Tumorwachstum in Abwesenheit von Fibronectin im Bereich der vaskulären Nische.

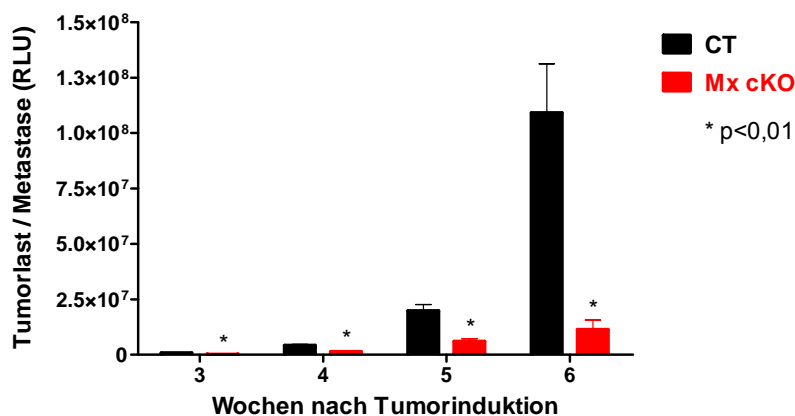


Abbildung III.9: Analyse der Tumorlast pro Metastase (CT vs. Mx cKO)

Die Analyse der emittierten Lichtleistung ergab, dass die Tumorlast je Metastase und damit verbunden das Tumorwachstum in den konditionellen Knockoutmäusen (Mx cKO) signifikant vermindert war.

III.2.1.7. Radiographische Analyse osteolytischer Läsionen

Die Röntgenbilder wurden am Tötungstag der Mäuse erstellt. Aufgrund des signifikanten Überlebensvorteils der Fibronectin-Knockoutmäuse gegenüber den Kontrolltieren (mediane Überlebensdauer: CT 6,6 vs. Mx cKO 8,7 Wochen) variiert das Alter der Mäuse zum Tötungszeitpunkt und damit verbunden die Aufnahmen der Röntgenbilder beträchtlich. Die durchschnittliche Fläche osteolytischer Läsionen der eingescannten radiographischen Aufnahmen wurde unter Verwendung des Computerprogramms „ImageJ“ ermittelt und je Maus (Abb. III.10 A), bzw. je Metastase bestimmt (Abb. III.10 B).

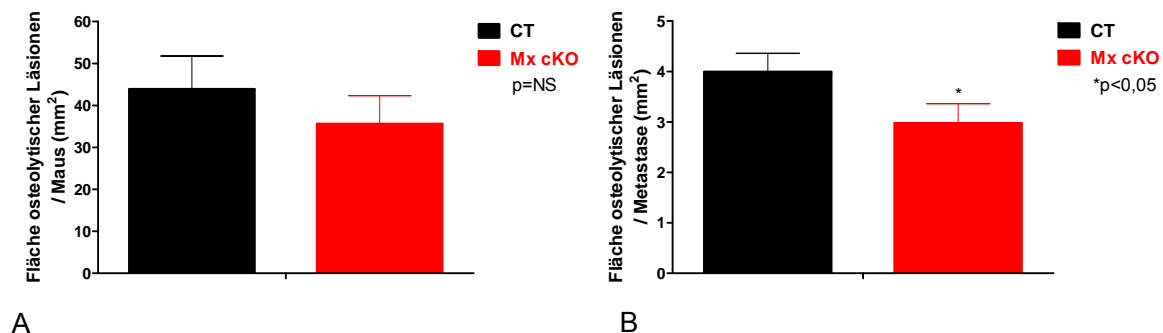


Abbildung III.10: Radiographische Analyse des tumorinduzierten Knochenverlusts (CT vs. Mx cKO)

(A) Zwischen konditionellen Knockoutmäusen (Mx cKO) und Kontrollen (CT) konnte bezüglich der durchschnittlichen Fläche osteolytischer Läsionen je Maus kein Unterschied festgestellt werden. (B) Die durchschnittliche Fläche lytischer Läsionen je Metastase war in den Fibronectin-Knockoutmäusen signifikant niedriger (25%).

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der durchschnittlichen Fläche osteolytischer Läsionen je Maus zwischen Mx-Knockouttieren und Kontrollen festgestellt werden (CT $43,8 \pm 8,0$ vs. Mx cKO $35,6 \pm 7,0$ mm² osteolytische Fläche, p=NS, n=8/5). Obwohl konditionelle Knockouttiere im Mittel 2 Wochen nach den Kontrolltieren getötet wurden, war die durchschnittliche Fläche lytischer Läsionen je Metastase in Abwesenheit von Fibronectin signifikant vermindert (CT $4,0 \pm 0,4$ vs. Mx cKO $3,0 \pm 0,4$ mm² osteolytische Fläche, p<0,05, n=88/60).

III.2.1.8. Untersuchung der mikrovaskulären Gefäßdichte

Die Ergebnisse der Biolumineszenz-Messung wiesen darauf hin, dass das Wachstum der Tumore beeinträchtigt war. Da Fibronectin für die Bildung neuer Gefäße notwendig ist, wurde die Zahl der Blutgefäße in Tumorgewebsproben aus Kontroll- bzw. Knockoutmäusen untersucht. Um zu klären, ob das reduzierte Wachstum auf einer Verminderung der Angiogenese in Abwesenheit von Fibronectin zurückzuführen war, wurde die mikrovaskuläre Gefäßdichte als Parameter der

angiogenen Aktivität evaluiert. Die Anzahl der Blutgefäße wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung des Endothelzellmarkers Anti-CD31 bestimmt (Abb. III.11).

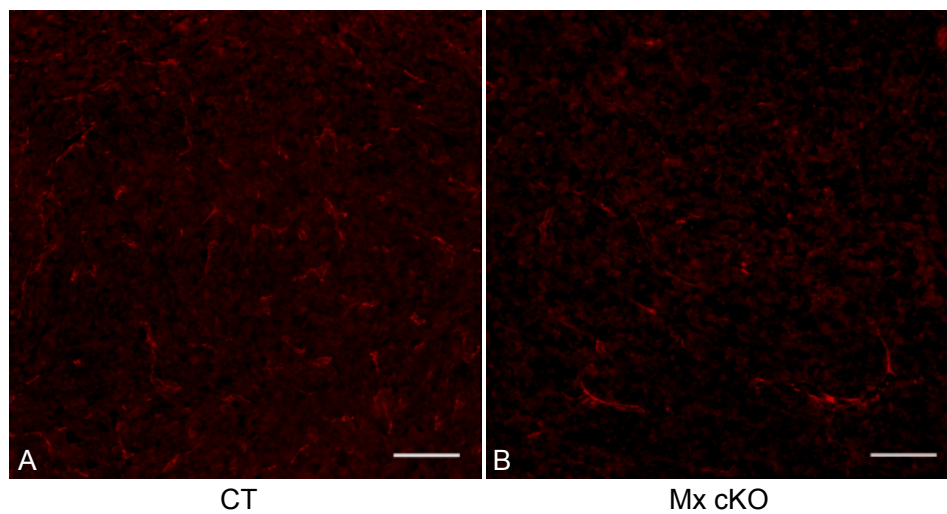


Abbildung III.11: Immunhistochemische Färbung der Blutgefäße

Die Aufnahmen zeigen die mittels Anti-CD31 immunhistochemisch gefärbten Tumorgewebschnitte der Kontrolltumore (A) und Tumorschnitte der Mx-Knockouttiere (B). Die mikrovaskuläre Gefäßdichte war in den konditionellen Knockouts (Mx cKO) im Vergleich zu den Kontrollen (CT) deutlich reduziert. Die Balken entsprechen 100 μm .

Die Tumorgewebeprobe der Versuchstiere, bei denen Fibronectin in der Blutbahn und im Knochenmark ausgeschaltet war, zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant reduzierte Dichte der Blutgefäße (82 ± 18 vs. 64 ± 14 Blutgefäße/ mm^2 , $p < 0,05$). Bei den Knockoutmäusen konnten somit 22% weniger Blutgefäße pro mm^2 nachgewiesen werden (Abb. III.12). Daher könnte das reduzierte Wachstum auf eine schlechtere Blutversorgung der Tumore zurückgeführt werden.

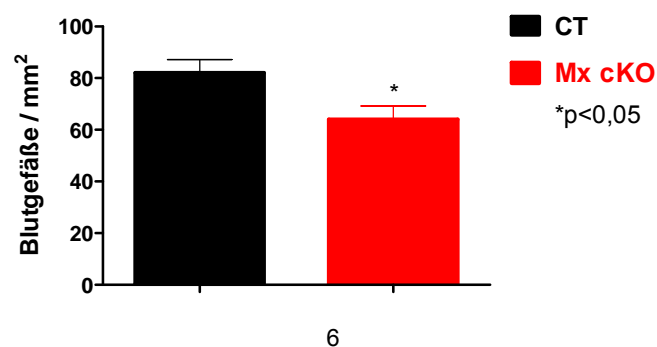


Abbildung III.12: Einfluss von Fibronectin auf die vaskuläre Gefäßdichte

Die Gefäße wurden immunhistochemisch mit Anti-CD31 gefärbt und quantifiziert. Die Tumorgewebeprobe der Mx-Knockouttiere zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine um 22% reduzierte Blutgefäßdichte.

III.2.1.9. Verifizierung der Ergebnisse unter Verwendung eines Prostatakarzinoms

Die vorangegangenen Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die Ausschaltung von Fibronectin in der Blutbahn und im Bereich der vaskulären Nische des Knochenmarks zu einem eingeschränkten Tumorwachstum und zu einer Verlängerung des Überlebens führte. Um die erworbenen Daten mit einer alternativen Tumorzelllinie zu bestätigen, wurden die *in vivo* Experimente erneut mit einem Prostatakarzinom durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden männlichen Fibronectin-Knockoutmäusen (Mx cKO) und Kontrolltieren (CT) Knochenmetastasen durch die intrakardiale Applikation des humanen Prostatakarzinoms PC3-CT induziert.

Wie die Kaplan-Meier-Analyse in Abbildung III.13 zeigt, wurde durch die Ausschaltung von Fibronectin in der Blutbahn und im Knochenmark die Überlebensdauer der Mäuse signifikant verlängert ($p < 0,01$). Während Kontrollmäuse, denen die Prostatakarzinomlinie inokuliert wurde, im Durchschnitt bereits nach 10 Wochen verstarben ($n=13$), zeigten Mäuse, bei denen Fibronectin in der Blutbahn und im Knochenmark ausgeschaltet war, eine mediane Überlebensdauer von 14,6 Wochen ($n=9$; Abb. III. 13 A). Die Ausschaltung von Fibronectin in der Blutbahn und im Bereich der vaskulären Nische hatte keine statistisch signifikante Auswirkung auf die durchschnittliche Anzahl etablierter Tumore ($p > 0,1$; Abb. III. 13 B). Die Infiltrationseigenschaften der PC3-CT Zellen zu ihrem Zielorgan, dem Knochen, waren demnach durch die Ausschaltung von Fibronectin über den Mx-Promotor nicht beeinträchtigt.

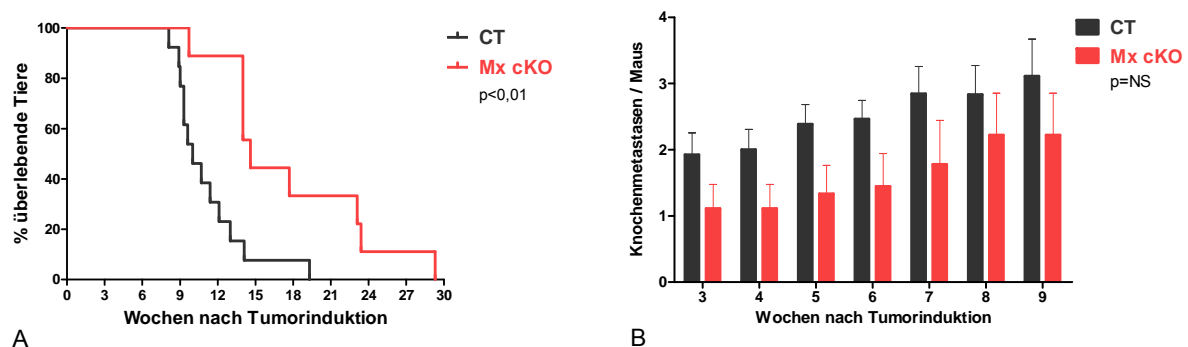


Abbildung III.13: Effekt der Fibronectin-Deletion im Bereich der vaskulären Nische auf die Metastasierung
Die Kaplan-Meier-Analyse ergab eine statistisch signifikant verlängerte Überlebensdauer der konditionellen Mx-Knockouttiere, denen Knochenmetastasen unter Verwendung der PC3-CT Linie induziert wurden (A). Zwischen konditionellen Knockoutmäusen (Mx cKO) und Kontrollen (CT) konnte über den Beobachtungszeitraum kein signifikanter Unterschied, bezogen auf die Anzahl etablierter Metastasen, festgestellt werden (B).

Metastasen der PC3-Linie wiesen ein eingeschränktes Tumorwachstum auf. Diese Ergebnisse waren vergleichbar mit den bereits für das Mammakarzinom dargestellten Daten. Jedoch war das quantifizierte Biolumineszenz-Signal der PC3 Tumore 3-6 Wochen im Anschluss an die Induktion

der Metastasen im Vergleich zur MDA-Linie geringer. Folglich konnte aufgrund des ohnehin eingeschränkten Zuwachses des detektierten Biolumineszenz-Signals in diesem Beobachtungszeitraum kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Gesamttumorbelastung war in den Mx-Knockouttieren 7 Wochen (CT $1,3 \pm 0,6 \times 10^8$ vs. Mx cKO $0,5 \pm 0,3 \times 10^8$ RLU, $n=13/9$, $p<0,05$), 8 Wochen (CT $5,3 \pm 1,7 \times 10^8$ vs. Mx cKO $2,9 \pm 2,6 \times 10^8$ RLU, $n=12/9$, $p<0,05$) und 9 Wochen (CT $9,8 \pm 4,0 \times 10^8$ vs. Mx cKO $5,8 \pm 5,1 \times 10^8$ RLU, $n=9/9$, $p<0,05$) nach der Tumorinduktion statistisch signifikant vermindert (Abb. III. 14 A). Die Tumorlast je Metastase war bei den konditionellen Knockouttieren 3 Wochen (CT $4,7 \pm 1,2 \times 10^5$ vs. Mx cKO $1,4 \pm 0,6 \times 10^5$ RLU, $n=27/13$, $p<0,05$), 7 Wochen (CT $4,7 \pm 1,8 \times 10^7$ vs. Mx cKO $2,1 \pm 1,3 \times 10^7$ RLU, $n=37/19$, $p<0,05$), 8 Wochen (CT $1,9 \pm 0,5 \times 10^8$ vs. Mx cKO $1,2 \pm 0,8 \times 10^8$ RLU, $n=34/22$, $p<0,0015$) und 9 Wochen (CT $3,2 \pm 1,4 \times 10^8$ vs. Mx cKO $2,4 \pm 1,6 \times 10^8$ RLU, $n=27/22$, $p<0,05$) im Anschluss an die Inokulation der Tumorzellen signifikant niedriger (Abb. III. 14 B). Die Unterschiede bezüglich des Tumorzustands waren in Abwesenheit von Fibronectin unter Verwendung der PC3-Linie im Vergleich zur MDA-Linie nicht annähernd so ausgeprägt.

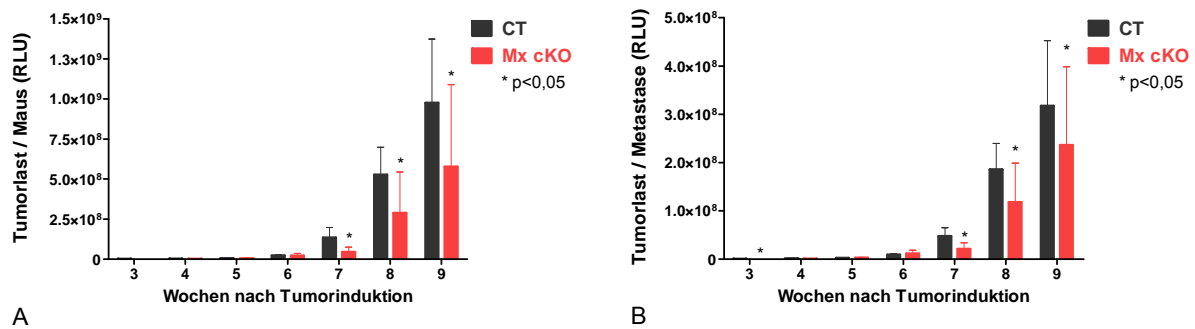


Abbildung III.14: Effekt der Fibronectin-Deletion im Bereich der vaskulären Nische auf das Wachstum
Mx-Knockouttiere zeigten 7-9 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen eine signifikante Verminderung der Gesamttumorbelastung je Maus (A). Die Tumorlast je Metastase war 3, 7, 8 und 9 Wochen nach der Tumorinduktion in Abwesenheit von Fibronectin im Bereich der vaskulären Nische signifikant vermindert (B).

III.2.2. Die Rolle des Fibronectins der osteoblastischen Nische bei der Metastasierung

Kontrolltieren und Mäusen der ColCre-Linie wurden Knochenmetastasen induziert, um die Rolle von osteoblastenspezifischem Fibronectin bei der Metastasierung humaner Tumorzellen *in vivo* zu klären.

III.2.2.1. Überlebensraten

Drei Wochen im Anschluss an die intrakardiale Applikation der Tumorzellen konnten mittels Biolumineszenz-Bildgebung erste Metastasen identifiziert werden. Wie die Kaplan-Meier-Analyse in Abbildung III.15 zeigt, wurde durch die Ausschaltung von osteoblastenspezifischem Fibronectin die mittlere Überlebensdauer der konditionellen Knockouttiere (Col cKO) signifikant verlängert ($p < 0,05$). Während Kontrollmäuse, die mit der Brustkrebslinie inokuliert wurden, eine mediane Überlebensdauer von 6,6 Wochen aufwiesen ($n=15$), lebten Mäuse, bei denen Fibronectin osteoblastenspezifisch deletiert wurde, im Mittel 7,6 Wochen ($n=11$).

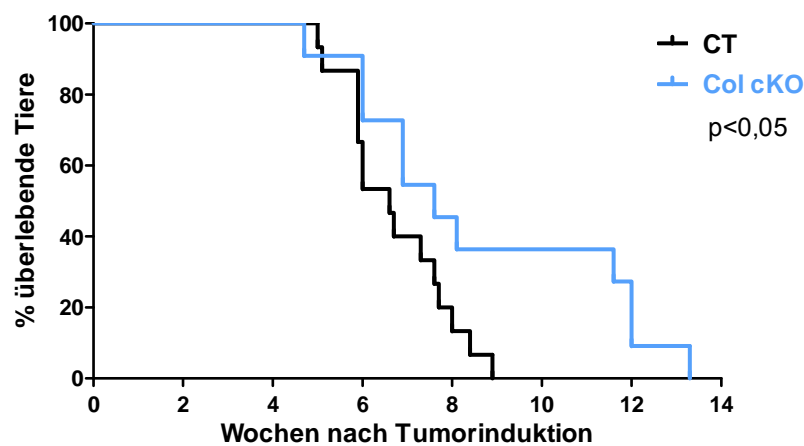


Abbildung III.15: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensdauer (CT vs. Col cKO)

Nach der Inokulation der Tumorzellen (MDA-CT) zeigten Mäuse, bei denen Fibronectin osteoblastenspezifisch ausgeschaltet wurde, im Vergleich zu den Kontrollen einen signifikanten Überlebensvorteil (mediane Überlebensdauer: CT 6,6 vs. Col cKO 7,6 Wochen, $n=15/11$, $p < 0,05$).

Während 6,6 Wochen nach der Tumorinduktion bereits die Hälfte der Kontrolltiere verstorben waren, bzw. aufgrund einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes sakrifiziert wurden, überlebten 8 der 11 Col Knockouttiere diesen Zeitraum. Nur 4 der 15 Kontrolltiere überlebten einen Zeitraum von 7,6 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen, im Gegensatz zu 50% der konditionellen Knockoutmäuse (Abb. III.16).

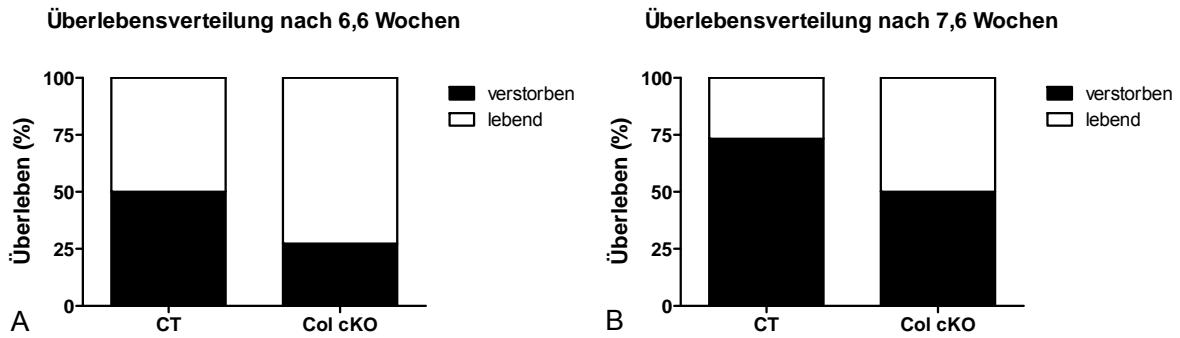


Abbildung III.16: Überlebensverteilung zu ausgewählten Zeitpunkten (CT vs. Col cKO)

6,6 Wochen nach der Tumorentlastung waren 50% der Kontrollmäuse verstorben. Im Gegensatz dazu überlebten 8 der 11 Col Knockouttiere diesen Zeitpunkt (A). Während 6 der 11 konditionellen Knockouttiere einen Zeitraum von 7,6 Wochen im Anschluss an die Tumorentlastung überlebten, waren es in der Kontrollgruppe 4 der 15 Tiere (B).

III.2.2.2. Anzahl gebildeter Metastasen

Die Anzahl der etablierten Metastasen war 3 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen in den Col Knockouttieren signifikant vermindert (CT $7,8 \pm 1,0$ vs. Col cKO $3,6 \pm 1,1$ Metastasen je Tier, $n=12/8$, $p<0,05$). Dieser Effekt auf die frühe Entwicklung der Metastasen konnte 4 Wochen nach der Tumorentlastung nicht mehr beobachtet werden (CT $8,2 \pm 0,8$ vs. Col cKO $5,9 \pm 1,4$ Metastasen je Tier, $n=15/10$, $p=NS$). Ebenfalls konnte im weiteren Krankheitsverlauf, bezogen auf die Gesamtanzahl der Metastasen, kein statistisch signifikanter Unterschied ausgemacht werden (Woche 5: CT $8,0 \pm 0,9$ vs. Col cKO $6,7 \pm 1,5$ Metastasen je Tier, $n=15/11$, $p=NS$; Woche 6: CT $7,1 \pm 1,0$ vs. Col cKO $6,6 \pm 1,6$ Metastasen je Tier, $n=14/10$, $p=NS$; Abb. III.17).

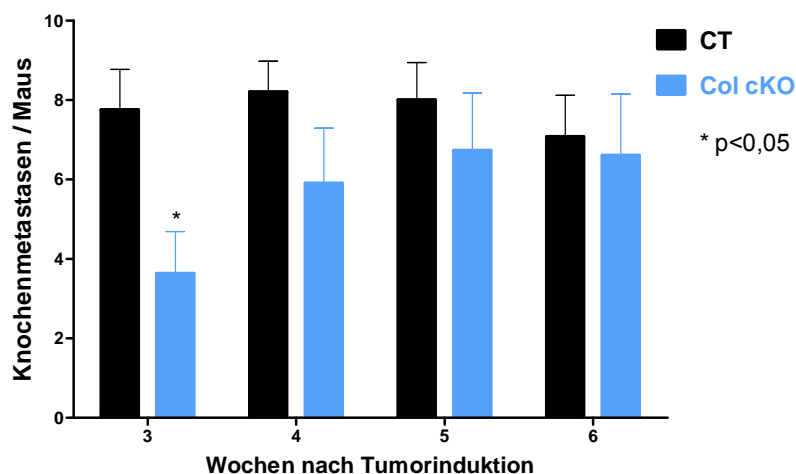


Abbildung III.17: Anzahl der Knochenmetastasen pro Maus (CT vs. Col cKO)

Die Anzahl der etablierten Metastasen war in den konditionellen Knockoutmäusen (Col cKO) im Vergleich zu den Kontrollen 3 Wochen im Anschluss an die Inokulation der Tumorzellen signifikant niedriger. Im weiteren Krankheitsverlauf konnte, bezogen auf die Anzahl der Metastasen, kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Interessanterweise zeigten die Tumore, bezogen auf die Anzahl, ein um eine Woche verzögertes Auftreten, so dass sich die Anzahl der Metastasen der Col Knockoutmäuse 4, 5, 6 und 7 Wochen nach der Tumorinduktion nicht von der Anzahl der Tumore der Kontrolltiere zum Zeitpunkt von 3, 4, 5 und 6 Wochen unterschied (Abb. III.18).

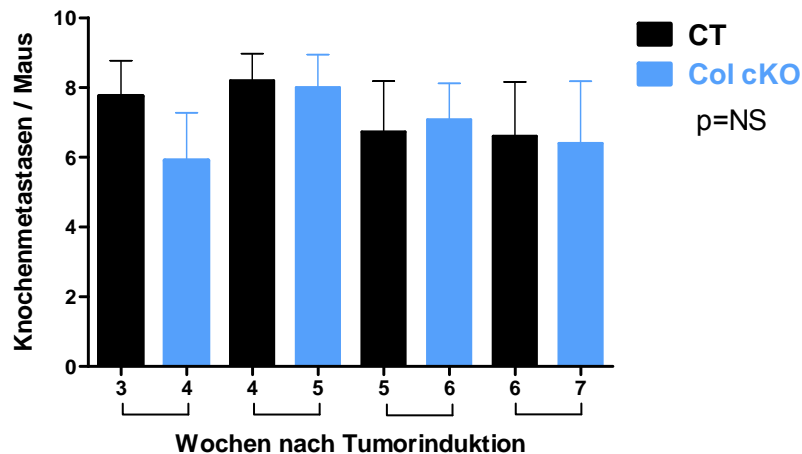


Abbildung III.18: Zeitversetzte Betrachtung der Anzahl etablierter Knochenmetastasen

Betrachtet man die Anzahl der induzierten Tumore zeitversetzt um eine Woche, so konnte kein Unterschied zwischen Col cKO und den Kontrolltieren ermittelt werden.

III.2.2.3. Gesamttumorbelastung

Die Gesamttumorbelastung war in den Col Knockouttieren 3 Wochen (CT $6,3 \pm 1,9 \times 10^6$ vs. Col cKO $0,3 \pm 0,1 \times 10^6$ RLU, $n=12/8$, $p<0,01$) und 4 Wochen (CT $3,5 \pm 0,9 \times 10^7$ vs. Col cKO $0,7 \pm 0,3 \times 10^7$ RLU, $n=14/10$, $p<0,01$) im Anschluss an die Inokulation der Tumorzellen signifikant vermindert. Im weiteren Verlauf konnte bezüglich der Gesamttumorbelastung kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet werden (Woche 5: CT $1,7 \pm 0,5 \times 10^8$ vs. Col cKO $0,6 \pm 0,1 \times 10^8$ RLU, $n=13/11$, $p=NS$; Woche 6: CT $9,0 \pm 4,4 \times 10^8$ vs. Col cKO $2,3 \pm 0,9 \times 10^8$ RLU, $n=11/10$, $p=NS$; Abb. III.19).

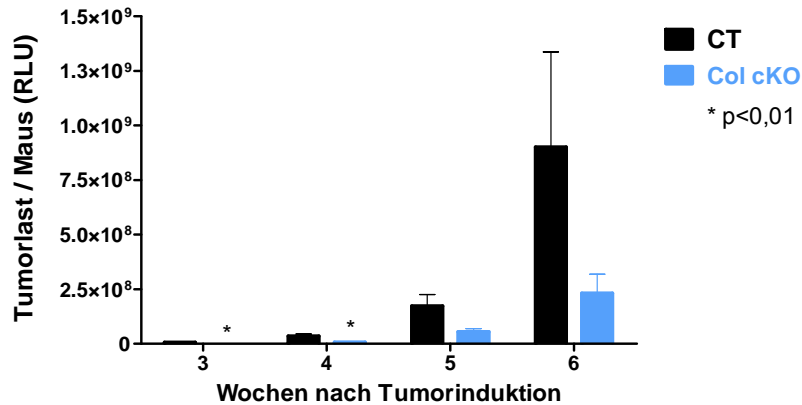


Abbildung III.19: Analyse der Gesamtumorlast pro Maus (CT vs. Col cKO)

Verglichen mit den Kontrollen (CT) war die Gesamtumorlast der konditionellen Knockouts (Col cKO) 3 und 4 Wochen im Anschluss an die Inokulation der Tumorzellen signifikant niedriger. Im Gegensatz dazu konnte 5 und 6 Wochen nach der Tumorinduktion kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Wurde der Verlauf der Gesamtumorlast um eine Woche phasenverschoben betrachtet, so war die Gesamtumorlast der Col Knockoutmäuse 4 Wochen nach der Tumorinduktion nicht von der Tumorlast der Kontrolltiere, zum Zeitpunkt von 3 Wochen, zu unterscheiden. Dies war für 3 aufeinanderfolgende Wochen zutreffend (Abb. III.20).

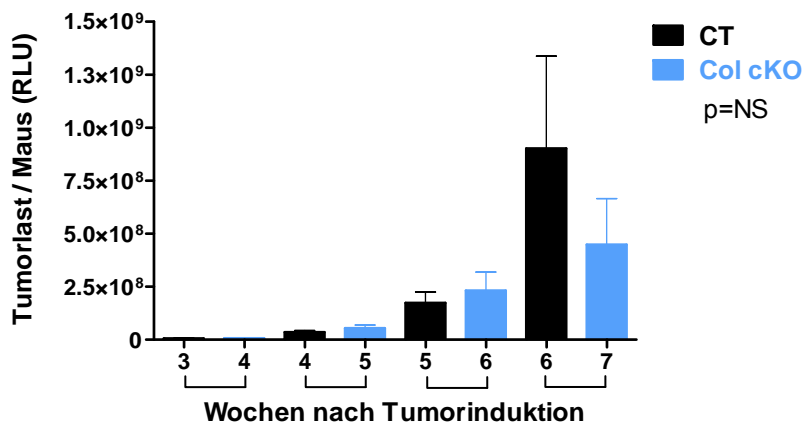


Abbildung III.20: Zeitversetzte Betrachtung der Gesamtumorlast

Es konnte keine signifikanter Unterschied festgestellt werden, wenn die Gesamtumorlast je Maus um eine Woche phasenverschoben betrachtet wurde.

III.2.2.4. Tumorwachstum

Die in Abbildung III.21 dargestellte Tumorlast je Metastase war in den Col Knockouttieren 3-6 Wochen im Anschluss an die Inokulation der Tumorzellen signifikant vermindert (Woche 3: CT $8,2 \pm 1,2 \times 10^5$ vs. Col cKO $0,7 \pm 0,2 \times 10^5$ RLU, $n=93/33$, $p < 0,0001$; Woche 4: CT $4,2 \pm 0,6 \times 10^6$ vs.

Col cKO $1,2 \pm 0,4 \times 10^6$ RLU, n=118/59, $p < 0,0001$; Woche 5: CT $2,0 \pm 0,3 \times 10^7$ vs. Col cKO $0,8 \pm 0,2 \times 10^7$ RLU, n=114/74, $p < 0,005$; Woche 6: CT $1,1 \pm 0,2 \times 10^8$ vs. Col cKO $3,5 \pm 0,8 \times 10^7$ RLU, n=91/66, $p < 0,05$).

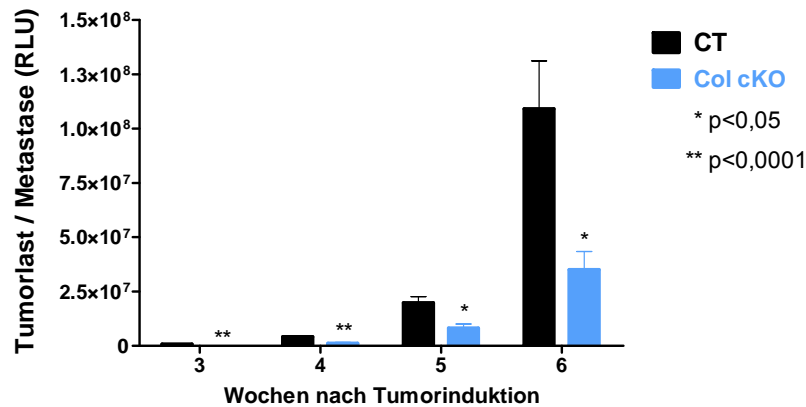


Abbildung III.21: Analyse der Tumorlast je Metastase (CT vs. Col cKO)

Die Analyse der emittierten Lichtleistung ergab, dass die Tumorlast je Metastase und damit verbunden das Tumorwachstum in den konditionellen Knockoutmäusen (Col cKO) signifikant vermindert war.

Das Wachstum der Metastasen zeigte auch hier einen um eine Woche verzögerten Verlauf. Infolgedessen war die durchschnittliche Tumorlast je Metastase der Col Knockoutmäuse 3, 4, 5 und 7 Wochen im Anschluss an die Tumorinduktion vergleichbar mit der Tumorlast der Kontrolltiere 4, 5, 6 und 7 Wochen nach der Inokulation der Tumorzellen (Abb. III.22).

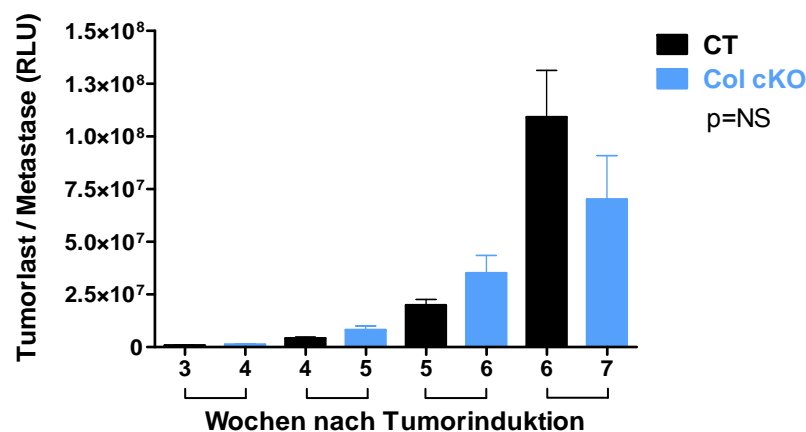


Abbildung III.22: Zeitversetzte Betrachtung der Tumorlast je Metastase

Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, wenn das Tumorwachstum um eine Woche phasenverschoben betrachtet wurde.

Zusammenfassend ergab die zeitversetzte Betrachtungsweise, dass die Ausschaltung des Osteoblasten-Fibronektin scheinbar die frühen Entwicklungsstadien der Tumore beeinflusste.

Wurde die Anzahl der etablierten Knochenmetastasen, die Gesamttumorbelastung je Maus sowie die Tumorlast je Metastase um eine Woche phasenverschoben betrachtet, so konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Diese Erkenntnisse lieferten erste Hinweise darauf, dass das Tumorwachstum wenn es einmal initialisiert wurde, unabhängig von osteoblastenspezifischem Fibronektin verläuft.

III.2.2.5. Radiographische Analyse osteolytischer Läsionen

Wie zuvor für die konditionellen Mx-Knockouts beschrieben wurde die Evaluierung der Fläche osteolytischer Läsionen der eingescannten radiographischen Aufnahmen zum jeweiligen Tötungszeitpunkt der Tiere vollzogen. Aufgrund der im Anschluss an die Tumorinduktion signifikant verlängerten Lebensdauer der Col Knockouttiere (mediane Überlebensdauer: CT 6,6 vs. Col cKO 7,6 Wochen) wurden die Röntgenbilder der Knockouts im Durchschnitt eine Woche nach den Kontrollen aufgenommen. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Fläche osteolytischer Läsionen je Maus (Mittelwert: CT 44 ± 8 vs. Col cKO 45 ± 7 mm² osteolytische Fläche, $p=NS$, $n=8/9$) bzw. je Metastase (Mittelwert: CT $4,0 \pm 0,4$ vs. Col cKO $3,8 \pm 0,3$ mm² osteolytische Fläche, $p=NS$, $n=88/105$) zwischen Col Knockouttieren und Kontrollen festgestellt werden (Abb. III.23).

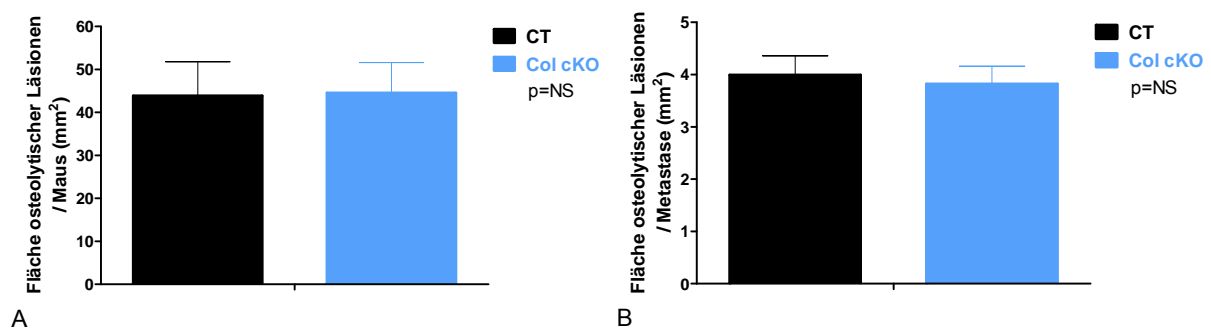


Abbildung III.23: Radiologische Analyse des tumorinduzierten Knochenverlusts (CT vs. Col cKO)
Zwischen Kontrollen (CT) und konditionellen Knockoutmäusen (Col cKO) konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Fläche osteolytischer Läsionen je Maus (A) bzw. je Metastase (B) festgestellt werden.

III.2.2.6. Untersuchungen der mikrovaskulären Gefäßdichte

Die Blutgefäße wurden immunhistochemisch mit dem Endothelzellmarker Anti-CD31 gefärbt und quantifiziert. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der mikrovaskulären Gefäßdichte zwischen den Tumorgewebeproben der Col Knockouttiere und den Kontrollen festgestellt werden (82 ± 18 vs. 76 ± 14 Blutgefäße/mm², $p=NS$; Abb. III.24).

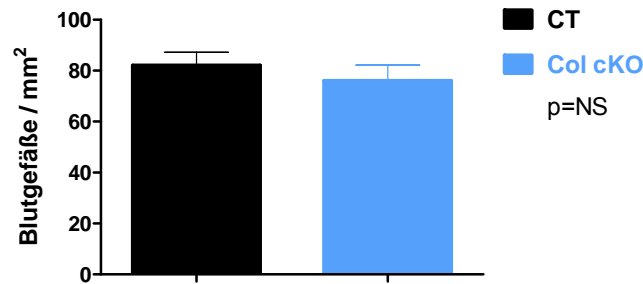


Abbildung III.24: Einfluss von Osteoblasten-Fibronectin auf die mikrovaskuläre Gefäßdichte der Tumore
Die Tumorgewebeproben der konditionellen Knockouts (Col cKO) zeigten im Vergleich zu den Kontrollen (CT) keine signifikante Abweichung der Blutgefäßdichte.

III.3. Einfluss von tumorzellenspezifischem Fibronectin auf die Etablierung und das Wachstum von Knochenmetastasen

Die verwendeten Tumorzelllinien exprimierten endogenes Fibronectin. Dessen Einfluss auf die Etablierung und auf das Wachstum eines Tumors kann *in vivo* nicht von dem Effekt des Fibronectins aus der den Tumor umgebenden Matrix unterschieden werden.

III.3.1. Ausschaltung der endogenen Fibronectinexpression

Um herauszufinden, ob die Metastasierung in Abwesenheit von tumorzellenspezifischem Fibronectin beeinträchtigt war, wurde die endogene Fibronectinexpression mittels RNA-Interferenz (RNAi) unterbunden. Fünf unterschiedliche shRNA-Sequenzen zur RNAi-vermittelten Degradation von Fibronectin-mRNA wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231B/luc⁺ bzw. die Prostatakarzinomzelllinie PC-3M-Pro4/luc⁺ getestet. Außerdem wurden Kontrollzellen mit einem leeren Vektorkonstrukt transduziert. Die auf diese Weise generierten Zellen dienten als Negativkontrolle, die den RNAi Mechanismus nicht aktivierten, da sie keine shRNA Insertion enthielten. Zellen, die mit dem leeren Vektorkonstrukt transduziert wurden, konnten als brauchbare Referenz verwendet werden, um die spezifische Knockdown-Effizienz zu beurteilen. Ebenfalls konnten auf diese Weise eventuell auftretende zelluläre Effekte des Transduktionsprozesses ausgeschlossen werden. Tumorzelllinien, die mit dem leeren Kontroll-Vektorkonstrukt transduziert wurden, werden im Folgenden zur besseren Lesbarkeit mit CT (MDA-CT bzw. PC3-CT) abgekürzt. Fibronectin-Knockoutlinien, die hingegen mit fibronectin-

spezifischer shRNA transduziert wurden, werden zur Vereinfachung mit Kd für Knockdown (MDA-Kd bzw. PC3-Kd) bezeichnet.

Der Fibronektin Gehalt in Zellkulturüberständen (Abb. III.25 und Abb. III.27), bzw. in Zelllysaten (Abb. III.26 und III.28) wurde mittels pFN-ELISA bestimmt. Abbildung III.25 zeigt exemplarisch das Auswahlverfahren der transduzierten Zelllinie MDA-MB-231B/luc⁺. Zur Veranschaulichung der integrationsabhängigen Knockdown-Effizienz wurden für die 5 unterschiedlichen shRNA Sequenzen (A-E) jeweils 2 der 10 untersuchten Kolonien ausgewählt. Abhängig davon, in welchen Chromosomenbereich die shRNA integriert wurde, konnten große Unterschiede bezüglich der endogenen Fibronektinexpression ermittelt werden. Eine Kolonie MDA-Kd C II zeigte im Vergleich zur Kontrolllinie eine signifikante Verminderung des Fibronektin Gehalts in Zellkulturüberständen um mehr als 97% (MDA-CT 151±2,9 vs. MDA-Kd 4,3±0,2 ng Fibronektin/ml Medium, p<0,001). Im weiteren Verlauf beziehen sich alle Angaben auf diesen Klon, der im Folgenden zur Vereinfachung mit MDA-Kd bezeichnet wird. Der Fibronektin Gehalt der Ausgangslinie (MDA-MB-231B/luc⁺) war im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit dem leeren Vektorkonstrukt transduziert wurden, nicht beeinträchtigt (MDA-MB-231B/luc⁺ 149±5,9 ng vs. MDA-CT 151±2,9 ng Fibronektin/ml Medium, p=NS).

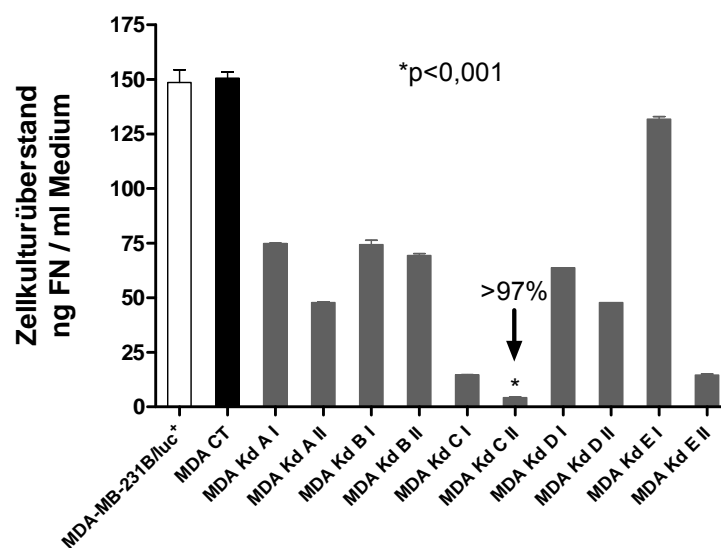


Abbildung III.25: Auswahlverfahren der transduzierten MDA-MB-231B/luc⁺ Zellen

Die Zellkulturüberstände von jeweils 2 transduzierten Kolonien (I und II) der 5 getesteten shRNA Sequenzen (A-E) wurden im pFN-ELISA auf ihren Fibronektin Gehalt untersucht. Verglichen mit der Kontrolle (MDA-CT) war die endogene Fibronektinexpression der Kolonie MDA-Kd C II signifikant um mehr als 97% niedriger.

Zusätzlich zur Analyse der Zellkulturüberstände wurden Zelllysate ausgewählter Kolonien hergestellt, der Fibronektin Gehalt mittels pFN-ELISA bestimmt und zum Gesamtproteingehalt korrigiert (Abb. III.26). Die mit fibronektinspezifischer shRNA transduzierten Zellen (MDA-Kd) zeigten im Vergleich zu der Kontrolllinie (MDA-CT) eine signifikante Reduktion der endogenen Fibronektin-

expression um 98% (MDA-CT $4,8 \pm 0,01$ vs. MDA-Kd $0,09 \pm 0,006$ ng Fibronectin/mg Gesamtprotein, $p < 0,001$). Der Fibronectingehalt der Ausgangslinie (MDA-MB-231B/luc⁺) war im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit dem leeren Vektorkonstrukt transduziert wurden, nicht beeinflusst (MDA-MB-231B/luc⁺ $4,6 \pm 0,08$ vs. MDA-CT $4,8 \pm 0,01$ ng Fibronectin/mg Gesamtprotein, $p = \text{NS}$).

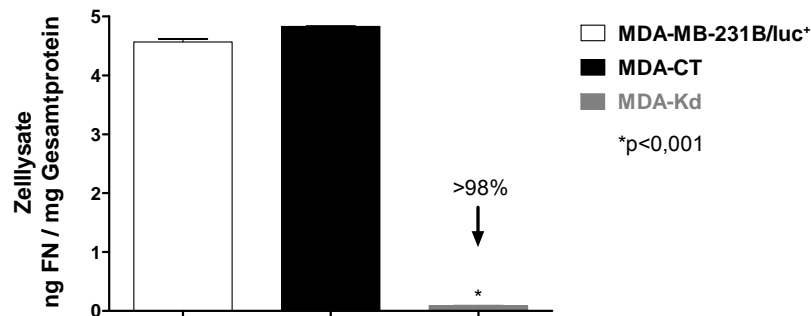


Abbildung III.26: Erfolgreiche Fibronectin-Ausschaltung der MDA-Linie

Die Ausgangszelllinie (MDA-MB-231B/luc⁺) wurde mit einem leeren Kontrollvektorkonstrukt (MDA-CT) oder mit fibronectinspezifischer shRNA (MDA-Kd) lentiviral transduziert. Die endogene Fibronectinexpression der MDA-Kd Zellen war im Vergleich zu der Kontrolllinie um mehr als 98% reduziert.

In weiteren Experimenten wurde das Prostatakarzinom PC-3M-Pro4/luc⁺ lentiviral mit fibronectinspezifischer shRNA, bzw. dem leeren Kontrollvektorkonstrukt transduziert. Die in Abbildung III.27 dargestellte Analyse der Zellkulturüberstände ergab für die PC3-Kd-Linie einen Fibronectin-Ausschaltungsgrad von mehr als 94% (PC3-CT $32,6 \pm 0,001$ vs. PC3-Kd $2,1 \pm 0,001$ ng Fibronectin/ml Medium, $p < 0,0001$). Der Fibronectingehalt der Ausgangslinie (PC-3M-Pro4/luc⁺) war im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit dem leeren Vektorkonstrukt transduziert wurden, nicht beeinflusst (PC-3M-Pro4/luc⁺ $35,3 \pm 1,5$ vs. PC3-CT $32,6 \pm 0,001$ ng Fibronectin/ml Medium, $p = \text{NS}$).

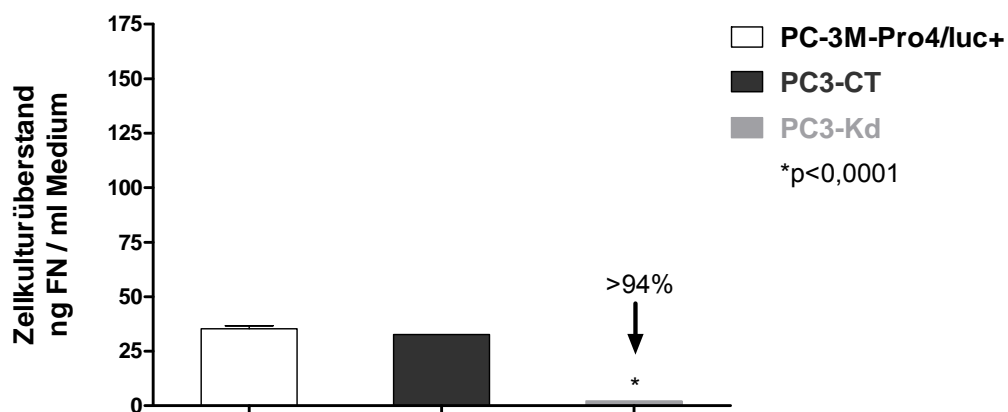


Abbildung III.27: Erfolgreicher Fibronectin-Ausschaltungsgrad der PC3-Linie

Die Zellkulturüberstände der transduzierten Zellen wurden im pFN-ELISA auf ihren Fibronectingehalt untersucht. Verglichen mit der Kontrolle (PC3-CT) war die endogene Fibronectinexpression der PC3-Kd-Linie signifikant um mehr als 93% vermindert.

Der shRNA vermittelte Fibronectin-Ausschaltungsgrad der Zelllysate wurde mittels pFN-ELISAs analysiert und zum Gesamtproteingehalt korrigiert (Abb. III.28). Die endogene Fibronectin-expression der mit fibronektinspezifischer shRNA transduzierten Zellen (PC3-Kd) war im Vergleich zu den Kontrollzellen (PC3-CT) signifikant um mehr als 97% reduziert (PC3-CT $0,8 \pm 0,003$ vs. PC3-Kd $0,02 \pm 0,002$ ng Fibronectin/mg Gesamtprotein, $p < 0,001$). Die Ausgangslinie (PC-3M-Pro4/luc⁺) und die Kontrollzellen zeigten keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Fibronectinexpression (PC-3M-Pro4/luc⁺ $0,8 \pm 0,006$ vs. PC3-CT $0,8 \pm 0,003$ ng Fibronectin/mg Gesamtprotein, $p = \text{NS}$).

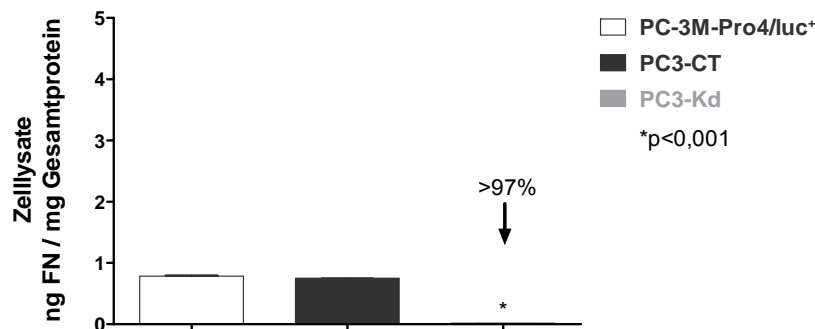


Abbildung III.28: Erfolgreiche Fibronectin-Ausschaltung der PC3-Linie

Verglichen mit den Kontrollen (PC3-CT) war der Fibronectingehalt in Zelllysaten der PC3-Kd Zellen signifikant um mehr als 97% vermindert.

Der Fibronectingehalt der PC3-Linie war im Vergleich zur MDA-Linie in Zellkulturüberständen um den Faktor 4 vermindert (MDA-MB-231B/luc⁺ $151 \pm 2,9$ ng vs. PC-3M-Pro4/luc⁺ $35,3 \pm 1,5$ ng Fibronectin/ml Medium, $p < 0,01$) bzw. in Zelllysaten, die zum Gesamtproteingehalt korrigiert wurden, um ein Sechsfaches niedriger (MDA-MB-231B/luc⁺ $4,6 \pm 0,08$ ng vs. PC-3M-Pro4/luc⁺ $0,8 \pm 0,006$ ng Fibronectin/mg Gesamtprotein, $p < 0,001$).

III.3.1.1. Morphologische Untersuchungen transduzierter Zellen

Die transduzierten Tumorzelllinien wurden mikroskopisch betrachtet und morphologisch mit der Ausgangslinie verglichen. Zellen, die mit dem leeren Vektorkonstrukt transduziert wurden (MDA-CT bzw. PC3-CT), bzw. deren endogene Fibronectinexpression mittels fibronektinspezifischer shRNA ausgeschaltet worden war (MDA-Kd bzw. PC3-Kd), zeigten im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangslinien keine morphologischen Unterschiede (Abb. III. 29).

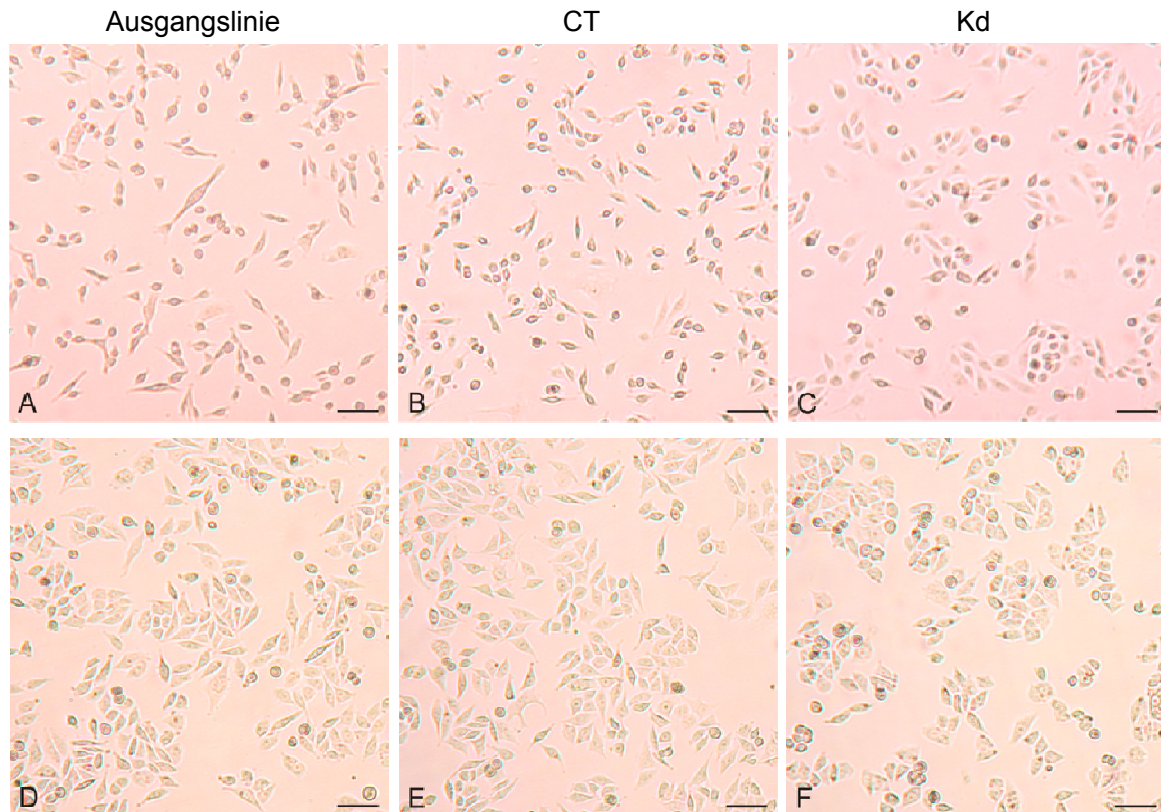


Abbildung III.29: Morphologische Betrachtung

Die für die lentivirale Transduktion verwendeten Ausgangslinien MDA-MB-231B/luc⁺ (A) und PC-3M-Pro4/luc⁺ (D) wiesen im Vergleich zu Zellen, die mit dem leeren Vektor konstrukt transduziert wurden, MDA-CT (B) bzw. PC3-CT (E) keine erkennbaren morphologischen Unterschiede auf. Im Vergleich zur Ausgangslinie, bzw. der transduzierten Kontrolllinie, konnten bei den Zellen, die kein endogenes Fibronectin exprimierten, MDA-Kd (C) bzw. PC3-Kd (F), keine deutlichen Veränderungen beobachtet werden.

III.3.1.2. *In vitro* Bestimmung der Zellproliferation und Zellviabilität

Um herauszufinden, ob die Metastasierung in Abwesenheit von endogenem Fibronectin beeinträchtigt wird, sollte ein negativer Einfluss der shRNA-Integration auf die Zellproliferation und Zellviabilität im Anschluss an die lentivirale Transduktion ausgeschlossen werden. Die Quantifizierung der Zellproliferation wurde mit dem BrdU-Zellproliferations-ELISA vollzogen. Die Messung basierte auf der Einlagerung von BrdU während der DNA-Synthese. Die bei diesem Testverfahren nachgewiesene BrdU-Menge ist ein direktes Maß für die Proliferationsaktivität der untersuchten Zelllinien (Abb. III.30).

Bezogen auf die Zellproliferation konnte weder für die transduzierte Mammakarzinomzelllinie (MDA) noch für die Prostatakarzinomzelllinie (PC3), im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangslinien, ein signifikanter Unterschied ermittelt werden (MDA-MB-231B/luc⁺ $1,06 \pm 0,05$ vs. MDA-CT $1,03 \pm 0,03$ vs. MDA-Kd $1,05 \pm 0,04$ Absorption bei 450 nm, p=NS; PC-3M-Pro4/luc⁺ $1,3 \pm 0,03$ vs. PC3-CT $1,25 \pm 0,03$ vs. PC3-Kd $1,24 \pm 0,04$ Absorption bei 450 nm, p=NS). Die Zellproliferation

wurde demnach durch die lentivirale Integration der Fremd-DNA ins Wirtsgenom der Zielzellen nicht beeinträchtigt.

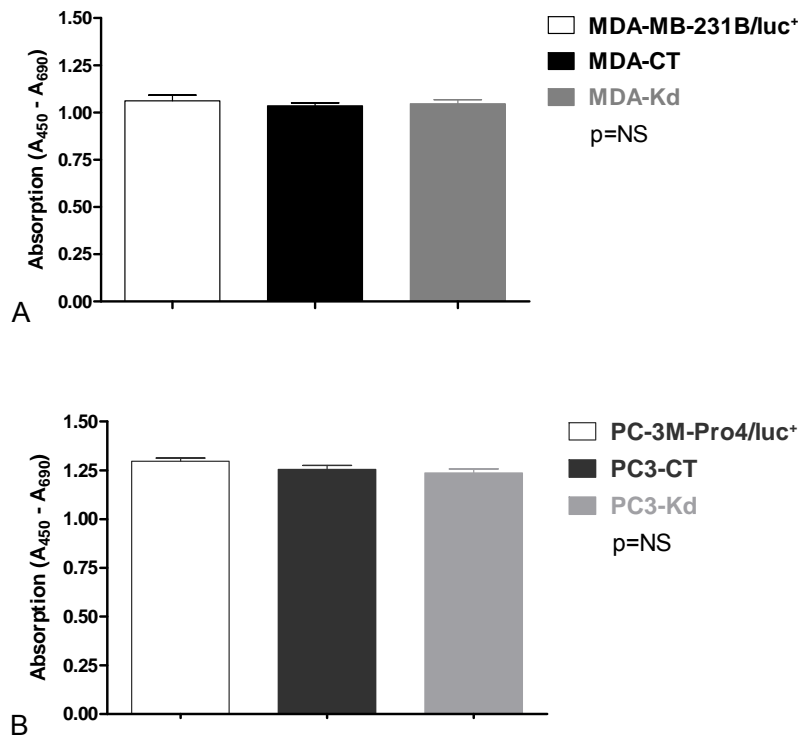


Abbildung III.30: Zellproliferation

Die Zellproliferation der lentiviral mit fibronektinspezifischer shRNA (MDA-Kd bzw. PC3-Kd), bzw. mit dem leeren Kontrollvektorkonstrukt (MDA-CT bzw. PC3-CT) transduzierten Zellen war nicht beeinflusst. Weder die transduzierten Zellen der MDA-Linie (A) noch die transduzierten Zellen der PC3-Linie (B) zeigten, im Vergleich zur Ausgangslinie, bezogen auf die Zellproliferation einen statistisch signifikanten Unterschied.

Zusätzlich zum Proliferations-ELISA wurde das Wachstum der transduzierten Zelllinien über einen Zeitraum von 2 Wochen während der Kultivierung in Zellkulturschalen betrachtet. Diesbezüglich wurde eine definierte Zellzahl der jeweiligen Kolonie ausplattiert und diese dreimal wöchentlich passagiert. Dabei wurde die Zellzahl und Zellviabilität untersucht und wiederum eine definierte Menge der Zellen auf neue Kulturschalen verteilt. Im Vergleich zur Kontrolllinie konnte bei transduzierten Zellen keine Beeinträchtigung der Zellproliferation festgestellt werden (mittlere Zellproliferationsrate: MDA-CT $1,4 \pm 0,06$ vs. MDA-Kd $1,4 \pm 0,08$ Zellverdopplungsrate nach zweitägigem Wachstum, $p=NS$).

Die Zellviabilität gibt den prozentualen Anteil lebender Zellen im Anschluss an das Ablösen der Zellen vom Kulturschalenboden wieder. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Tumorzellen durch die Behandlung mit Trypsin/EDTA nicht geschädigt wurden. Außerdem ist die Zellviabilität ein wichtiges Maß im Hinblick auf die Verwendung der Tumorzellen beim *Xenotransplantat*-Metastasierungsmodell und somit für die Induktion von Knochenmetastasen. Es konnte kein Unterschied bezüglich der Zellviabilität der transduzierten Zelllinien im Vergleich zu

den Kontrollen festgestellt werden (Zellviabilität: MDA-CT $96,2 \pm 0,5$ vs. MDA-Kd $96,4 \pm 0,6$ prozentualer Anteil lebender Zellen, $p=NS$).

Die Untersuchung der transduzierten PC3-Linie führte zu einem vergleichbaren Ergebnis. Die Zellproliferation und Zellviabilität waren im Anschluss an die lentivirale Transduktion unverändert (mittlere Zellproliferationsrate: PC3-CT $1,9 \pm 0,2$ vs. PC3-Kd $2,0 \pm 0,3$ Zellverdopplungsrate nach zweitägigem Wachstum, $p=NS$; Zellviabilität: PC3-CT $96,4 \pm 0,4$ vs. PC3-Kd $96,2 \pm 0,5$ prozentualer Anteil lebender Zellen, $p=NS$).

III.3.1.3. Analyse der Luciferase-Expression

Um die Biolumineszenz-Signale der CT- und Kd-Linien *in vivo* vergleichen zu können, musste als nächstes sichergestellt werden, dass die Luciferase-Expression der transduzierten Zellen unverändert war. In diesem Zusammenhang wurde die Luciferaseaktivität der beiden Tumorzelllinien *in vitro* mittels Biolumineszenz-Bildgebung analysiert. Anhand der detektierten Lichtmenge und der eingesetzten Zellzahl konnte die Photonenemission pro Sekunde je Zelle bestimmt werden (Abb. III.31).

Beim Vergleich der transduzierten Kolonien mit der entsprechenden Ausgangslinie konnte kein Unterschied bezüglich der Luciferase-Expression festgestellt werden. Die mittlere detektierte Photonenemission lag bei der MDA-Linie mit 1-18 Photonen pro Sekunde je Zelle, im Vergleich zur PC3-Linie mit 1-9 Photonen pro Sekunde, etwas höher (10^5 Zellen/Vertiefung: MDA-MB-231B/luc⁺ $16,6 \pm 3,8$ vs. MDA-CT $18,2 \pm 3,6$ Photonen/s/Zelle, $p=NS$; MDA-CT $18,2 \pm 3,6$ vs. MDA-Kd $18,4 \pm 3,5$ Photonen/s/Zelle, $p=NS$; 10^3 Zellen/Vertiefung: MDA-MB-231B/luc⁺ $1,0 \pm 0,2$ vs. MDA-CT $1,0 \pm 0,01$ Photonen/s/Zelle, $p=NS$; MDA-CT $1,0 \pm 0,01$ vs. MDA-Kd $0,8 \pm 0,09$ Photonen/s/Zelle, $p=NS$; 10^5 Zellen/Vertiefung: PC-3M-Pro4⁺ $8,7 \pm 0,4$ vs. PC3-CT $9,2 \pm 0,02$ Photonen/s/Zelle, $p=NS$; PC3-CT $9,2 \pm 0,02$ vs. PC3-Kd $9,2 \pm 0,5$ Photonen/s/Zelle, $p=NS$; 10^3 Zellen/Vertiefung: PC-3M-Pro4⁺ $0,6 \pm 0,1$ vs. PC3-CT $0,4 \pm 0,09$ Photonen/s/Zelle, $p=NS$; PC3-CT $0,4 \pm 0,09$ vs. PC3-Kd $0,6 \pm 0,03$ Photonen/s/Zelle, $p=NS$).

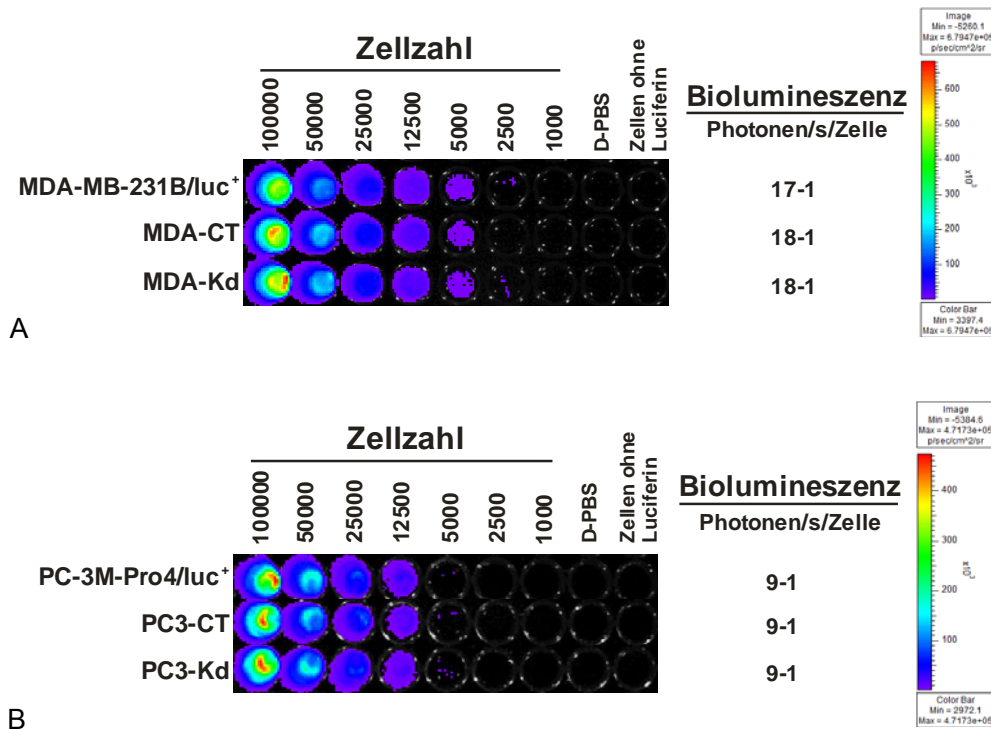


Abbildung III.31: Luciferase-Expression

Seriell verdünnte Zellen (100000-1000 Zellen/Vertiefung) der MDA-Linie (A) und PC3-Linie (B). Nach Zugabe von Luciferin konnte die Photonenemission der für die Transduktion eingesetzten Ausgangslinien (MDA-MB-231B/luc⁺ und PC-3M-Pro4/luc⁺) mit den Kontrollzellen (MDA-CT und PC3-CT), bzw. den Fibronectin-Knockdownzellen (MDA-Kd bzw. PC3-Kd) verglichen werden. Es wurden keine Unterschiede bezüglich der Luciferase-Expression festgestellt. Anhand des detektierten Biolumineszenz-Signals und der je Vertiefung eingesetzten Zellzahl konnte die emittierte Photonenzahl pro Sekunde je Zelle bestimmt werden. Dabei konnten abhängig von der jeweiligen Zellzahl für die MDA-Linie 1-18 Photonen/s/Zelle und für die PC3-Linie 1-9 Photonen/s/Zelle detektiert werden.

III.3.1.4. Charakterisierung der Adhäsionseigenschaften der Tumorzellen

Die relative Anhaftung der Tumorzelllinien an unterschiedliche extrazelluläre Matrix-Proteine wurde unter Verwendung eines Zell-Adhäsions-Arrays bestimmt. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte als relative Fluoreszenz-Einheiten (RFU, engl. „relativ fluorescence unit“).

Zellen der MDA-Linie, deren endogene Fibronectinexpression ausgeschaltet wurde, zeigten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen eine signifikant niedrigere Bindungsaffinität an Laminin, Kollagen I, Kollagen II und Kollagen IV (Laminin-1: MDA-CT $89,9 \pm 10,5 \times 10^3$ vs. MDA-Kd $23,8 \pm 1,2 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p < 0,005$; Kollagen I: MDA-CT $87,1 \pm 2,2 \times 10^3$ vs. MDA-Kd $20,7 \pm 1,0 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p < 0,0001$; Kollagen III: MDA-CT $89,9 \pm 1,5 \times 10^3$ vs. MDA-Kd $21,1 \pm 1,0 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p < 0,0001$; Kollagen IV: MDA-CT $11,3 \pm 5,8 \times 10^3$ vs. MDA-Kd $37,7 \pm 1,4 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p < 0,001$; negativ Kontrolle BSA: MDA-CT $0,8 \pm 0,1 \times 10^3$ vs. MDA-Kd $0,9 \pm 0,02 \times 10^3$ RFU, $n=2$, $p=NS$). Die Adhäsion an Vitronectin und Fibronectin war hingegen nicht beeinträchtigt (Fibronectin: MDA-CT $21,1 \pm 0,4 \times 10^3$ vs. MDA-Kd $21,2 \pm 0,9 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p=NS$; Vitronectin: MDA-CT $44,1 \pm 3,3 \times 10^3$ vs. MDA-Kd $38,1 \pm 3,3 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p=NS$; Abb. III. 32).

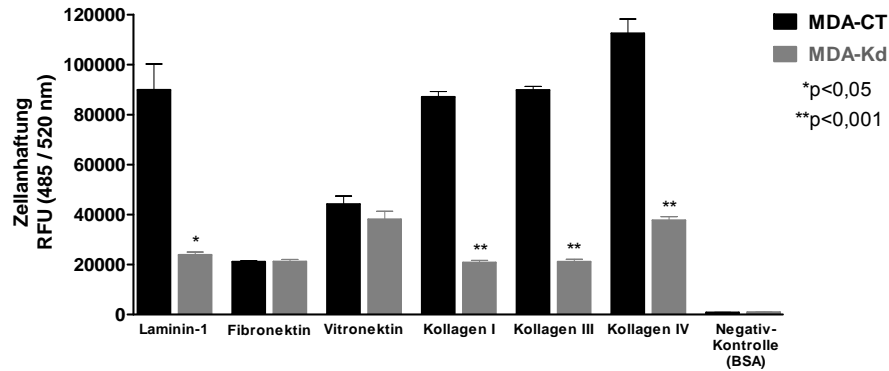


Abbildung III.32: Bindungsaffinität der MDA-Linie an unterschiedliche extrazelluläre Matrixbestandteile

Die Zellanhaftung an die extrazellulären Matrixsubstrate Laminin-1, Kollagen I, Kollagen III und Kollagen IV war im Vergleich zu den Kontrollen (MDA-CT) bei fibronektindeletierten Zellen (MDA-Kd) signifikant vermindert. Die Bindungsaffinität an Vitronektin und Fibronektin war vergleichbar mit den Kontrollzellen.

Fibronektindeletierte Zellen der PC3-Linie zeigten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen, keine signifikante Verminderung der Adhäsion an Laminin, Kollagen III, Fibronektin und Vitronektin (Laminin-1: PC3-CT $50,6 \pm 6,2 \times 10^3$ vs. PC3-Kd $60,2 \pm 5,8 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p=NS$; Kollagen III: PC3-CT $86,6 \pm 11,5 \times 10^3$ vs. PC3-Kd $82,6 \pm 12,0 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p=NS$; Fibronektin: PC3-CT $14,2 \pm 0,2 \times 10^3$ vs. PC3-Kd $13,3 \pm 0,6 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p=NS$; Vitronektin: PC3-CT $12,0 \pm 27,7 \times 10^3$ vs. PC3-Kd $10,3 \pm 10,8 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p=NS$; negativ Kontrolle BSA: PC3-CT $1,3 \pm 0,04 \times 10^3$ vs. PC3-Kd $1,3 \pm 0,03 \times 10^3$ RFU, $n=2$, $p=NS$). Die Bindungsaffinität der PC3-Kd Zellen an die Matrixbestandteile Kollagen I und Kollagen IV war statistisch signifikant vermindert (Kollagen I: PC3-CT $89,4 \pm 3,1 \times 10^3$ vs. PC3-Kd $73,0 \pm 2,3 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p < 0,05$; Kollagen IV: PC3-CT $20,1 \pm 8,7 \times 10^3$ vs. PC3-Kd $16,7 \pm 6,6 \times 10^3$ RFU, $n=3$, $p < 0,05$; Abb. III.33).

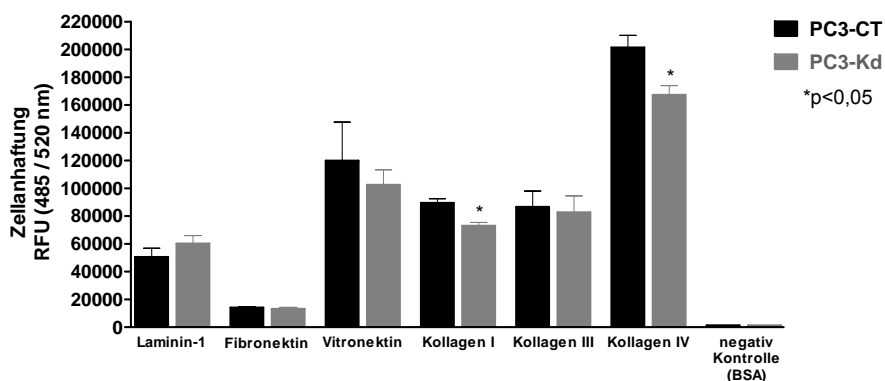


Abbildung III.33: Bindungsaffinität der PC3-Linie an unterschiedliche extrazelluläre Matrixbestandteile

Zellen, deren endogene Fibronektinexpression unterbunden wurde (PC3-Kd), zeigten im Vergleich zu den Kontrollen (PC3-CT) eine signifikante Verminderung der Zellanhaftung an die extrazellulären Matrixsubstrate Kollagen I und Kollagen IV. Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Bindungsaffinität an Laminin-I, Vitronektin und Kollagen III beobachtet werden.

III.3.2. Die Rolle des Tumorzell-Fibronektins bei der Metastasierung

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass die endogene Fibronektinexpression der Tumorzellen (MDA-Kd) mittels fibronektinspezifischer shRNA um mehr als 97% vermindert werden konnte. Die Zellproliferation und die Luciferase-Expression der transduzierten Zellen waren durch die Integration der Fremd-DNA nicht beeinträchtigt. Um die Rolle des tumorzellenspezifischen Fibronektins bei der Metastasierung zu klären, wurden immundefizienten Mäusen Knochenmetastasen durch die intrakardiale Applikation der humanen Brustkrebszellen MDA-CT, bzw. MDA-Kd induziert.

III.3.2.1. Überlebensraten

Wie die Kaplan-Meier-Analyse in Abbildung III.34 zeigt, war die Überlebensdauer der Mäuse, denen Metastasen unter Verwendung der MDA-Kd-Linie induziert wurden, statistisch signifikant verlängert ($p < 0,0001$). Die mittlere Überlebensrate war hier mit 17,8 Wochen ($n=22$) nahezu dreimal so hoch wie die der Tiere, denen die Kontrolllinie (MDA-CT) verabreicht wurde (6,6 Wochen, $n=15$).

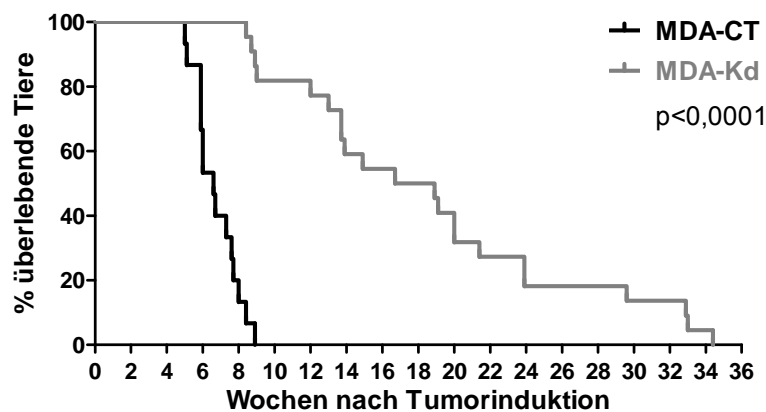


Abbildung III.34: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensdauer (MDA-CT vs. MDA-Kd)

Tiere, denen Tumore mit der Fibronektin Knockdown-Linie (MDA-Kd) induziert wurden, zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren (MDA-CT) einen signifikanten Überlebensvorteil (mediane Überlebensdauer: MDA CT 6,6 vs. MDA-Kd 17,8 Wochen, $n=15/22$, $p < 0,0001$).

Während 6,6 Wochen im Anschluss an die intrakardiale Applikation der Kontrollzellen bereits 50% der Tiere verstorben waren, bzw. aufgrund einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes sakrifiziert wurden, war zu diesem Zeitpunkt keines der Tiere verstorben, denen die Fibronektin-

Knockdown-Linie innokuliert wurde. 9 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen MDA-CT waren sämtliche Tiere der Kontrollgruppe bereits verstorben. Im Gegensatz hierzu waren erst 3 der 22 Tiere verstorben, denen die MDA-Kd-Linie injiziert worden war (Abb. III.35). Die Ausschaltung der endogenen Fibronectinexpression der Tumorzellen hatte demnach einen beträchtlichen Einfluss auf die Überlebensraten der Tiere.

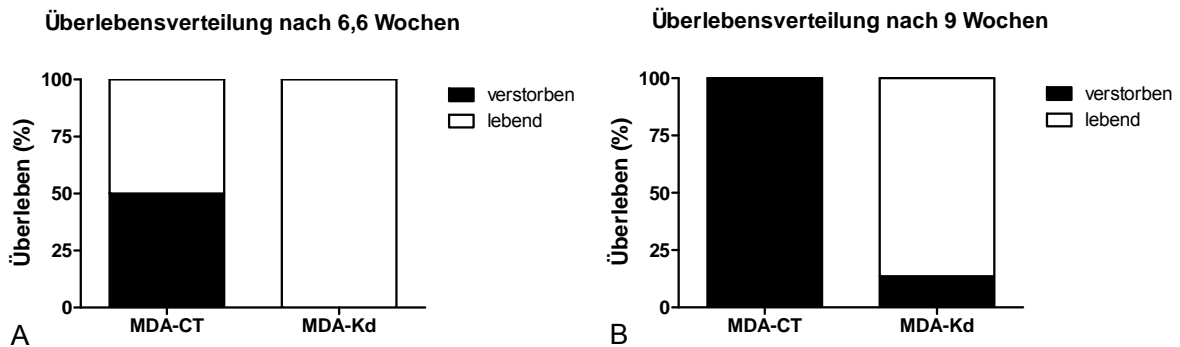


Abbildung III.35: Überlebensverteilung zu ausgewählten Zeitpunkten (MDA CT vs. MDA Kd)

6,6 Wochen nach Induktion der Knochenmetastasen waren bereits 50% der Tiere verstorben, denen die MDA-CT Linie verabreicht worden war. Im Gegensatz dazu war zu diesem Zeitpunkt noch keines der Tiere verstorben, denen die Fibronectin-Knockdown-Linie (MDA-Kd) appliziert wurde (A). Während 9 Wochen im Anschluss an die Tumorinduktion sämtliche Tiere der Kontrollgruppe gestorben waren, waren in der Gruppe, denen die MDA-Kd-Linie verabreicht wurde, 85% der Tiere am Leben (B).

III.3.2.2. Anzahl gebildeter Metastasen

Die Anzahl der etablierten Metastasen war 3-6 Wochen nach Applikation der Tumorzellen bei Tieren, denen die MDA-Kd-Linie verabreicht wurde, signifikant vermindert (Woche 3: MDA-CT $7,6 \pm 1,0$ vs. MDA-Kd $0,3 \pm 0,1$ Metastasen pro Maus, $n=12/16$, $p < 0,0001$; Woche 4: MDA-CT $8,2 \pm 0,8$ vs. MDA-Kd $1,6 \pm 0,4$ Metastasen pro Maus, $n=15/19$, $p < 0,0001$; Woche 5: MDA-CT $8,6 \pm 0,8$ vs. MDA-Kd $2,3 \pm 0,6$ Metastasen pro Maus, $n=14/11$, $p < 0,0001$; Woche 6: MDA-CT $8,3 \pm 0,8$ vs. MDA-Kd $2,5 \pm 0,6$, $n=12/13$, $p < 0,0001$). 3 Wochen nach der Tumorinduktion wiesen nur 4 der Tiere, die mit der Fibronectin Knockdown-Linie innokuliert wurden, eine nachweisbare Ansammlung von Tumorzellen auf. Im Gegensatz dazu konnten bei sämtlichen Tieren, denen die Kontrolllinie appliziert wurde, Metastasen detektiert werden. Mehr als die Hälfte der Tiere aus der Kontrollgruppe war bis zur 7. Woche bereits verstorben. Aus diesem Grund wurde die Tumoranzahl in Abbildung III.36 lediglich bis Woche 6 dargestellt.

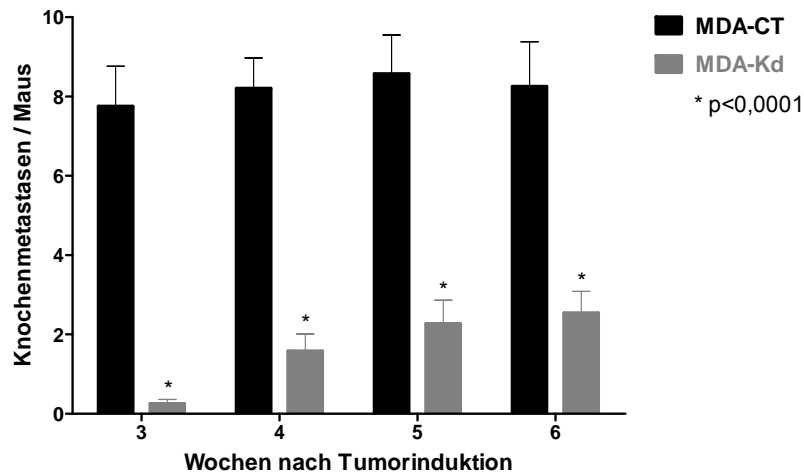


Abbildung III.36: Anzahl der Knochenmetastasen pro Maus (MDA-CT vs. MDA-Kd)

Verglichen mit den Kontrollen (MDA-CT) war die Anzahl der etablierten Metastasen bei Tieren, denen die Fibronectin-Knockdown-Linie (MDA-Kd) verabreicht wurde, signifikant vermindert.

Wurde die durchschnittliche Anzahl der induzierten Tumore über den gesamten Beobachtungszeitraum betrachtet, so war die mittlere Anzahl der Metastasen je Tier im Vergleich zu den Kontrollen bei Tieren, denen die MDA-Kd-Linie innokuliert wurde, signifikant niedriger (MDA-CT $7,9 \pm 0,8$ vs. MDA-Kd $2,4 \pm 0,4$ Metastasen je Tier, $n=15/22$, $p < 0,0001$; Abb. III.37). Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise auf eine Beeinträchtigung der *Homing*-Eigenschaften der Tumorzellen zu ihrem Zielorgan, dem Knochenmark, in Abwesenheit von tumorzellenspezifischem Fibronectin.

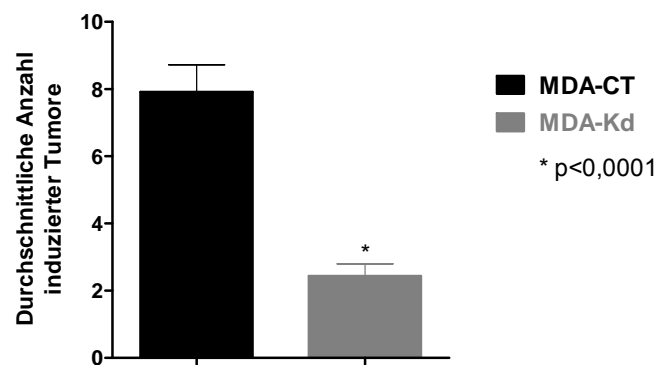


Abbildung III.37: Durchschnittliche Anzahl induzierter Tumore (MDA-CT vs. MDA-Kd)

Die durchschnittliche Anzahl etablierter Metastasen war über den gesamten Beobachtungszeitraum betrachtet bei Tieren, denen die Fibronectin Knockdown-Linie verabreicht wurde, signifikant vermindert.

III.3.2.3. Gesamttumorbelastung

Tiere, denen die Fibronectin Knockdown-Linie verabreicht wurde, zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine statistisch signifikant niedrigere Gesamttumorbelastung (Woche 3: MDA-CT $6,3 \pm 1,9 \times 10^6$ vs. MDA-Kd $0,006 \pm 0,003 \times 10^6$ RLU, $n=12/16$, $p < 0,0001$; Woche 4: MDA-CT $3,5 \pm 0,9 \times 10^7$ vs. MDA-Kd $0,02 \pm 0,008 \times 10^7$ RLU, $n=14/19$, $p < 0,0001$; Woche 5: MDA-CT $1,7 \pm 0,5 \times 10^8$ vs. MDA-Kd $0,02 \pm 0,005 \times 10^8$ RLU, $n=13/11$, $p < 0,0001$; Woche 6: MDA-CT $9,0 \pm 4,4 \times 10^8$ vs. MDA-Kd $0,07 \pm 0,03 \times 10^8$ RLU, $n=11/13$, $p < 0,0001$). Das durchschnittliche Biolumineszenz-Signal hatte bei der MDA-Kd-Gruppe 6 Wochen nach der Tumorinduktion nur 0,7% der Intensität der Kontrollgruppe erreicht (Abb. III.38).

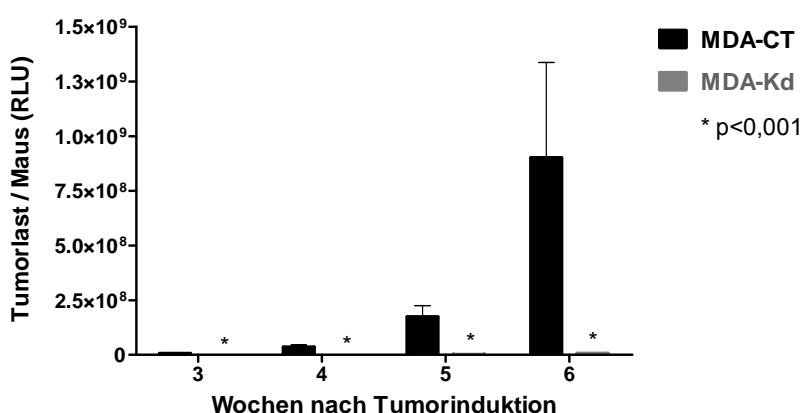


Abbildung III.38: Analyse der Gesamttumorbelastung (MDA-CT vs. MDA-Kd)

Verglichen mit der Kontrollgruppe (MDA-CT) ließ sich bei Tieren, denen die MDA-Kd-Linie appliziert wurde, eine statistisch signifikante Verminderung der Gesamttumorbelastung je Maus feststellen.

III.3.2.4. Tumorwachstum

Die Tumorlast, bezogen auf die metastatischen Läsionen, war unter Verwendung der Fibronectin Knockdown-Linie (MDA-Kd) statistisch signifikant niedriger (Woche 3: MDA-CT $8,2 \pm 1,2 \times 10^5$ vs. MDA-Kd $0,2 \pm 0,06 \times 10^5$ RLU, $n=93/4$, $p < 0,01$; Woche 4: MDA-CT $4,2 \pm 0,6 \times 10^6$ vs. MDA-Kd $0,1 \pm 0,03 \times 10^6$ RLU, $n=118/29$, $p < 0,0001$; Woche 5: MDA-CT $2,0 \pm 0,03 \times 10^7$ vs. MDA-Kd $0,07 \pm 0,02 \times 10^7$ RLU, $n=114/25$, $p < 0,0001$; Woche 6: MDA-CT $1,1 \pm 0,2 \times 10^8$ vs. MDA-Kd $0,03 \pm 0,008 \times 10^8$ RLU, $n=91/32$, $p < 0,0001$; Abb. III.39). Dies impliziert ein reduziertes Tumorstadium in Abwesenheit von tumorzellenspezifischem Fibronectin. Die durchschnittliche Lichtintensität je Metastase hatte bei MDA-Kd-Tumoren 6 Wochen im Anschluss an die Tumorinduktion im Vergleich zu der Kontrollgruppe nur 2,5% der Photonenemission erreicht.

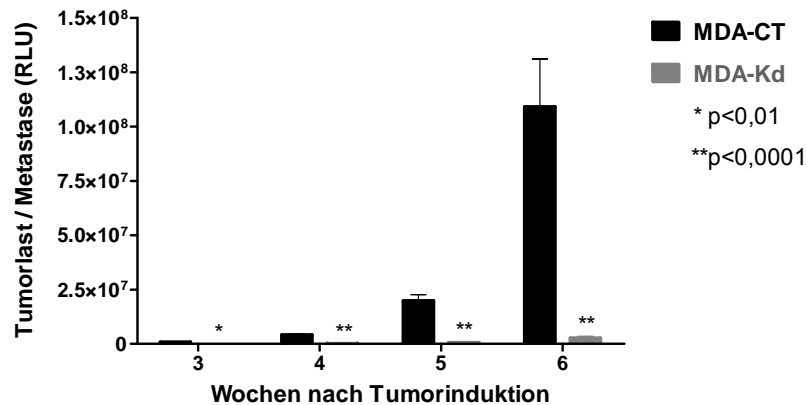


Abbildung III.39: Analyse der Tumorlast per Metastase (MDA-CT vs. MDA-Kd)

Die detektierte Photonenermission je Metastase war bei Tieren, denen die MDA-Kd-Linie appliziert wurde, im Vergleich zu der Kontrollgruppe (MDA-CT) signifikant vermindert.

III.3.2.5. Radiographische Analyse osteolytischer Läsionen

Wie bereits beschrieben wurden die Röntgenbilder am Tötungstag der Mäuse erstellt. Aufgrund des signifikanten Überlebensvorteils der Mäuse, denen Metastasen unter Verwendung der Fibronectin-Knockoutlinie (MDA-Kd) induziert wurden, variiert das Alter der Mäuse zum Tötungszeitpunkt und damit verbunden die Aufnahmen der Röntgenbilder mitunter um mehr als 11 Wochen (Abb. III.34).

Die durchschnittliche Fläche der osteolytischen Läsionen je Maus war unter Verwendung der MDA-Kd-Linie signifikant niedriger (Mittelwert: MDA-CT $43,8 \pm 8,0$ vs. MDA-Kd $18,8 \pm 4,0$ mm² osteolytische Fläche, p < 0,05, n = 8/8; Abb. III.40 A). Auch die Fläche der lytischen Läsionen je Metastase war im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren signifikant vermindert (Mittelwert: CT $4,0 \pm 0,4$ vs. Mx cKO $1,5 \pm 0,2$ mm² osteolytische Fläche, p < 0,0001, n = 88/98; Abb. III.40 B). Die Ausschaltung der tumorzellspezifischen Fibronectinexpression hatte bezüglich der osteolytischen Eigenschaften der Tumorzellen ein geringeres destruktives Wachstum zur Folge. Obwohl einzelne Metastasen der MDA-Kd-Linie ein progressives Tumorwachstum über mehrere Monate aufwiesen, war der Verlust an Knochensubstanz im Vergleich zu Metastasen der Kontrolllinie niedriger.

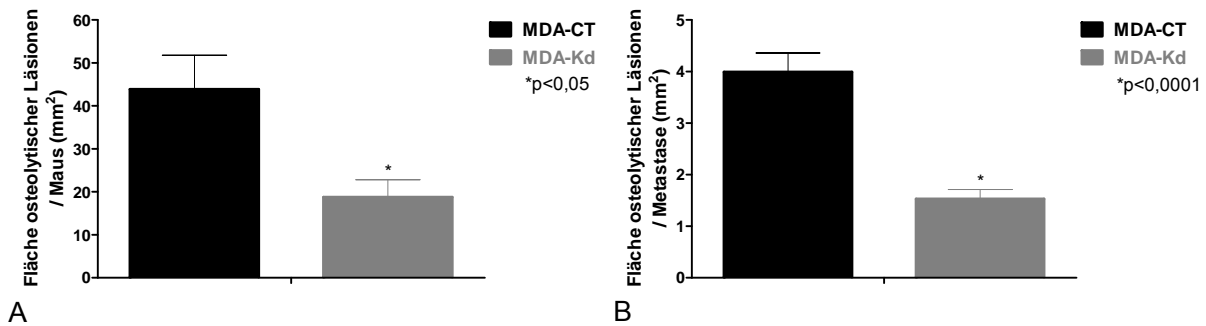


Abbildung III.40: Radiologische Analyse des tumorinduzierten Knochenverlustes (MDA-CT vs. MDA-Kd)
 A) Die durchschnittliche Fläche osteolytischer Läsionen je Maus war unter Verwendung der MDA-Kd-Linie statistisch signifikant vermindert (50%). (B) Im Vergleich zu den Kontrollen war die durchschnittliche Fläche lytischer Läsionen je Metastase der Fibronectin-Knockoutlinie signifikant niedriger (60%).

III.3.2.6. Untersuchung der mikrovaskulären Gefäßdichte

Die Blutgefäße aus MDA-CT bzw. MDA-Kd Tumorgewebsproben wurden immunhistochemisch mit dem Endothelzellmarker Anti-CD31 gefärbt und quantifiziert. Im Vergleich zu den Kontrollen war die mikrovaskuläre Gefäßdichte der MDA-Kd Tumore signifikant vermindert (82 ± 18 vs. 52 ± 19 Blutgefäße/mm², $p < 0,001$). Somit konnten bei MDA-Kd-Tumoren 37% weniger Blutgefäße pro mm² nachgewiesen werden (Abb. III.41). Daher könnten die unterschiedlichen Wachstumseigenschaften der Tumore auf eine mangelnde Angiogenese zurückgeführt werden.

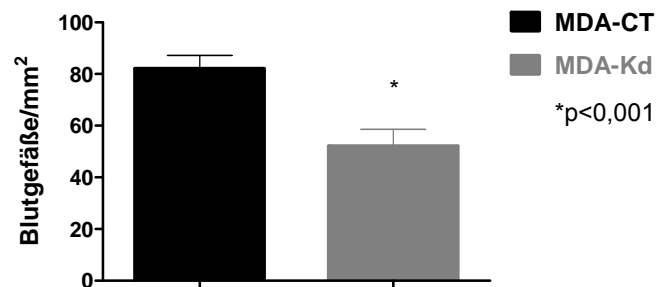


Abbildung III.41: Einfluss von endogenem Fibronectin auf die mikrovaskuläre Gefäßdichte
 Im Vergleich zu den Kontrolltumoren war die mikrovaskuläre Gefäßdichte der MDA-Kd Tumore signifikant um ein Drittel niedriger.

III.3.2.7. Verifizierung der Ergebnisse unter Verwendung eines Prostatakarzinoms

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass die Ausschaltung der tumorzellspezifischen Fibronectinexpression das Überleben der Mäuse und den Metastasierungs-Prozess beeinträchtigte. Die Experimente wurden mit einer alternativen Prostatakarzinomzelllinie in männlichen Tie-

ren durchgeführt, um herauszufinden, ob die beobachteten Ergebnisse zelllinienunabhängig auftraten.

Wie die Kaplan-Meier-Analyse in Abbildung III.42 zeigt, war die Ausschaltung des Tumorzell-Fibronektins mit einer signifikant verlängerten Überlebensdauer der Versuchstiere verbunden ($p < 0,001$). Während Kontrollmäuse, denen Metastasen unter Verwendung der PC3-CT-Linie induziert wurden, im Durchschnitt bereits nach 10 Wochen verstarben ($n=13$), zeigten Tiere, denen die Fibronektin-Knockoutlinie (PC3-Kd) verabreicht wurde, eine mediane Überlebensdauer von 18 Wochen ($n=9$). Die Ausschaltung von Tumorzell-Fibronektin hatte jedoch im Gegensatz zu den zuvor für die MDA-Linie beschriebenen Beobachtungen keine statistisch signifikante Auswirkung auf die durchschnittliche Anzahl etablierter Tumore ($p > 0,05$).

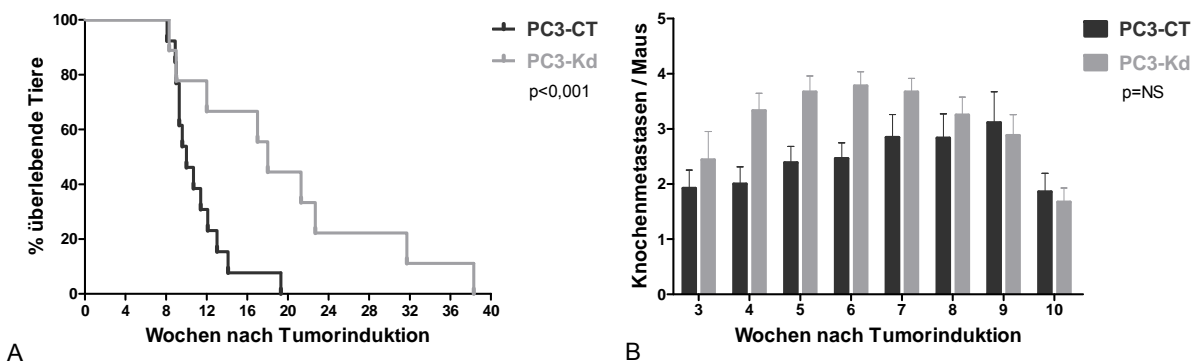


Abbildung III.42: Effekt der tumorzellspezifischen Fibronektin-Deletion der PC3-Linie auf das Überleben und die Metastasierung

(A) Die Kaplan-Meier-Analyse ergab eine statistisch signifikant verlängerte Überlebensdauer der Tiere, denen Knochenmetastasen unter Verwendung der PC3-Kd-Linie induziert wurden (mediane Überlebensdauer: PC3-CT 10 Wochen vs. PC3-Kd 18 Wochen, $n=13/9$, $p < 0,001$). (B) Die Anzahl der über den Beobachtungszeitraum entstandenen Tumore war durch die Ausschaltung von Tumorzell-Fibronektin nicht beeinträchtigt.

Tiere, denen die Fibronektin Knockdown-Linie verabreicht wurde, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe 7-10 Wochen nach der Inokulation der Tumorzellen eine statistisch signifikant niedrigere Gesamtumorbelastung (Woche 7: PC3-CT $1,3 \pm 0,6 \times 10^8$ vs. PC3-Kd $0,5 \pm 0,2 \times 10^8$ RLU, $n=13/9$, $p < 0,05$; Woche 8: PC3-CT $5,3 \pm 1,7 \times 10^8$ vs. PC3-Kd $1,3 \pm 0,9 \times 10^8$ RLU, $n=12/8$, $p < 0,05$; Woche 9: PC3-CT $9,7 \pm 4,0 \times 10^8$ vs. PC3-Kd $2,3 \pm 1,8 \times 10^8$ RLU, $n=9/8$, $p < 0,05$; Woche 10: PC3-CT $1,4 \pm 0,9 \times 10^9$ vs. PC3-Kd $0,03 \pm 0,02 \times 10^9$ RLU, $n=6/6$, $p < 0,01$; Abb. III.43 A). Die durchschnittliche Tumorlast je Metastase war unter Verwendung der Fibronektin Knockdown-Linie 6-10 Wochen im Anschluss an die Induktion der Tumore ebenfalls signifikant niedriger (Woche 6: PC3-CT $9,1 \pm 2,5 \times 10^6$ vs. PC3-Kd $5,9 \pm 2,2 \times 10^6$ RLU, $n=32/36$, $p < 0,01$; Woche 7: PC3-CT $4,7 \pm 1,8 \times 10^7$ vs. PC3-Kd $1,1 \pm 0,4 \times 10^7$ RLU, $n=37/36$, $p < 0,01$; Woche 8: PC3-CT $1,9 \pm 0,5 \times 10^8$ vs. PC3-Kd $0,3 \pm 0,2 \times 10^8$ RLU, $n=34/31$, $p < 0,001$; Woche 9: PC3-CT $3,2 \pm 1,4 \times 10^8$ vs. PC3-Kd $0,6 \pm 0,3 \times 10^8$

RLU, n=27/31, p<0,001; Woche 10: PC3-CT $6,5 \pm 4,0 \times 10^8$ vs. PC3-Kd $0,09 \pm 0,04 \times 10^8$ RLU, n=13/20, p<0,05; Abb. III.43 B).

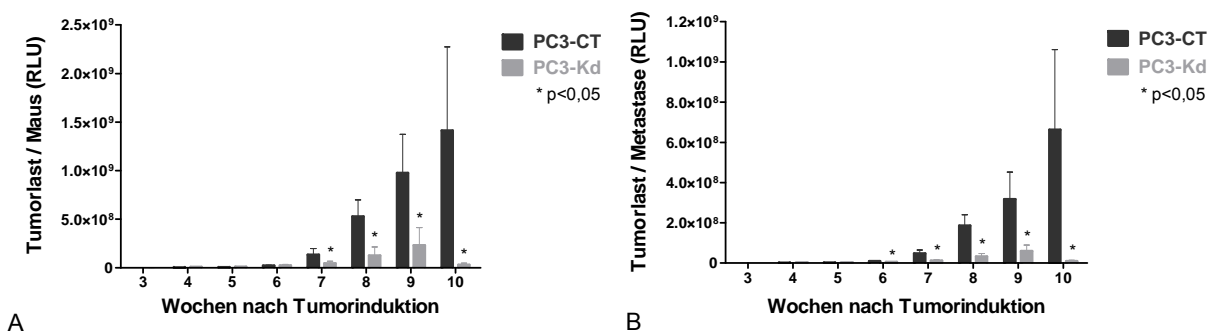


Abbildung III.43: Effekt der tumorzellenspezifischen Fibronectin-Deletion auf die Metastasierung

(A) Tiere, denen die PC3-Kd-Linie verabreicht wurde, zeigten 7-10 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen eine signifikante Verminderung der Gesamttumorbelastung je Maus. (B) Die Tumorlast je Metastase war 6-10 Wochen nach der Tumorinduktion signifikant vermindert.

III.4. Auswirkungen der kombinierten Ausschaltung von zirkulierendem Fibronectin, Knochenmarks- und Tumorzell-Fibronectin auf die Etablierung und das Wachstum von Knochenmetastasen

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass durch das Fehlen des Fibronectins der Blutzirkulation und des Knochenmarks-Fibronectins sowohl das Überleben der Mäuse als auch das Wachstum der Tumore beeinträchtigt war. Die Ausschaltung von tumorzellenspezifischem Fibronectin der MDA-Linie hatte vermutlich Auswirkungen auf die Infiltrationseigenschaften der Tumorzellen zum Knochenmark und beeinträchtigte ebenfalls das Wachstum der Tumore. Um zu klären, ob die kombinierte Ausschaltung von zirkulierendem Fibronectin, Knochenmarks-Fibronectin und Tumorzell-Fibronectin die Tumorentwicklung additiv beeinflusste, wurden Mx-Knockouttieren Knochenmetastasen unter Verwendung der MDA-Kd-Linie induziert.

Um den direkten Vergleich mit Kontrollen und Mx-Knockouttieren, denen die MDA-CT-Linie verabreicht wurde, zu erleichtern, wurden die in den Abschnitten III.2.1.4.-III.2.1.6. dargestellten Resultate im Folgenden abermals abgebildet.

III.4.1.1. Überlebensraten

Wie die Kaplan-Meier-Analyse in Abbildung III.44 zeigt, wurde die mittlere Überlebensdauer der Tiere, denen Metastasen unter Verwendung der MDA-Kd-Linie induziert wurden und deren Knochenmarks-Fibronektin über den Mx-Promotor ausgeschaltet wurde, im Vergleich zu Tieren, denen die MDA-CT-Linie injiziert wurde, statistisch signifikant verlängert ($p < 0,0001$).

Während Kontrollmäuse, denen die MDA-CT-Linie inokuliert wurde, im Mittel bereits nach 6,6 Wochen verstarben ($n=15$; schwarz dargestellt), zeigten Mx-Knockoutmäuse eine mediane Überlebensdauer von 8,7 Wochen ($n=11$; rot dargestellt). Die Deletion von tumorzellenspezifischem Fibronektin (MDA-Kd) führte zu durchschnittlichen Überlebensraten von 18,7 Wochen ($n=22$; grau dargestellt). Wurden konditionellen Mx-Knockouttieren Tumore mit der MDA-Kd-Linie induziert, so verstarben diese Tiere im Mittel nach 26,3 Wochen ($n=8$, $p < 0,0001$; rosa dargestellt; Abb. III.44). Obwohl bei Mx-Knockouttieren, denen die MDA-Kd-Linie innokuliert wurde, im Gegensatz zu Kontrolltieren (CT/MDA-Kd) ein durchschnittlicher Überlebensvorteil von 7,4 Wochen beobachtet werden konnte, war dieser statistisch nicht signifikant (mediane Überlebensdauer: CT/MDA-Kd 18,9 Wochen vs. Mx cKO/MDA-Kd 26,3 Wochen, $n=24/8$, $p=NS$).

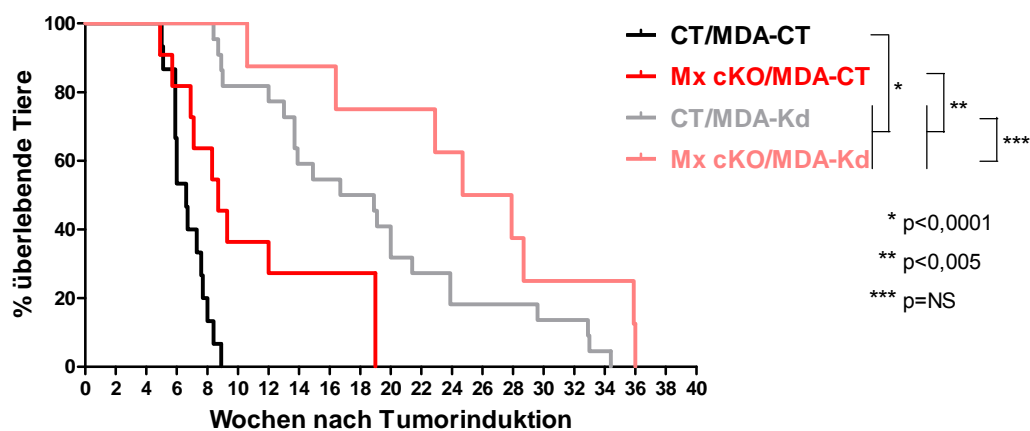


Abbildung III.44: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensdauer (MDA-CT vs. MDA-Kd vs. MDA-Kd Mx cKO)
Konditionelle Mx-Knockouts und Kontrollen, denen Tumore mit der Fibronektin Knockdown-Linie (MDA-Kd) induziert wurden, zeigten im Vergleich zu Tieren (CT; Mx cKO), denen die MDA-CT-Linie appliziert wurde, einen signifikanten Überlebensvorteil. Konditionelle Mx-Knockoutmäuse und Kontrolltiere, denen MDA-Kd-Tumore induziert wurden, zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der medianen Überlebensdauer.

Um die Unterschiede zwischen Kontrolltieren (CT) und konditionellen Knockoutmäusen (Mx cKO), denen die MDA-Kd-Linie appliziert wurde, zu verdeutlichen, wurde in den folgenden Abschnitten der Vergleich zu Tieren (CT und Mx cKO), denen die MDA-CT-Linie verabreicht wurde, getrennt dargestellt. Aufgrund der verlängerten Überlebensraten wurde der Verlauf der Metastasierung bei Tieren, denen die Fibronektin-Knockoutlinie (MDA-Kd) innokuliert wurde, über einen

längeren Zeitraum untersucht. Die Messung des Biolumineszenz-Signals erfolgte ab der 4. Woche in einem zweiwöchentlichen Intervall. Dementsprechend konnte in den folgenden Abschnitten die Analyse der Photonenemission der Wochen 5, 6, 8 und 10 nicht dargestellt werden.

III.4.1.2. Anzahl gebildeter Metastasen

Vergleichbar mit den bereits für die MDA-CT-Linie dargestellten Daten, hatte die Ausschaltung von Fibronektin im Knochenmark keine statistisch signifikante Auswirkung auf die durchschnittliche Anzahl etablierter MDA-Kd-Tumore (Woche 3: CT/MDA-Kd $0,3 \pm 0,1$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $0,4 \pm 0,4$ Metastasen je Tier, $n=16/8$, $p=NS$; Woche 4: CT/MDA-Kd $1,6 \pm 0,4$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $0,8 \pm 0,4$ Metastasen je Tier, $n=19/6$, $p=NS$; Woche 7: CT/MDA-Kd $2,8 \pm 0,5$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $1,6 \pm 0,6$ Metastasen je Tier, $n=22/8$, $p=NS$; Woche 9: CT/MDA-Kd $2,6 \pm 0,4$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $1,8 \pm 0,7$ Metastasen je Tier, $n=19/8$, $p=NS$; Woche 11: CT/MDA-Kd $2,6 \pm 0,4$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $1,9 \pm 0,8$ Metastasen je Tier, $n=18/8$, $p=NS$; Abb. II.45 A). Die MxCre vermittelte Ausschaltung von Knochenmarks-Fibronektin hatte demzufolge vermutlich keinen Einfluss auf die *Homing*-Eigenschaften der MDA-Zellen zu ihrem Zielorgan, dem Knochenmark, wie es bereits für die MDA-CT-Linie vorgeschlagen wurde (III.2.1.4., Abb. III.7).

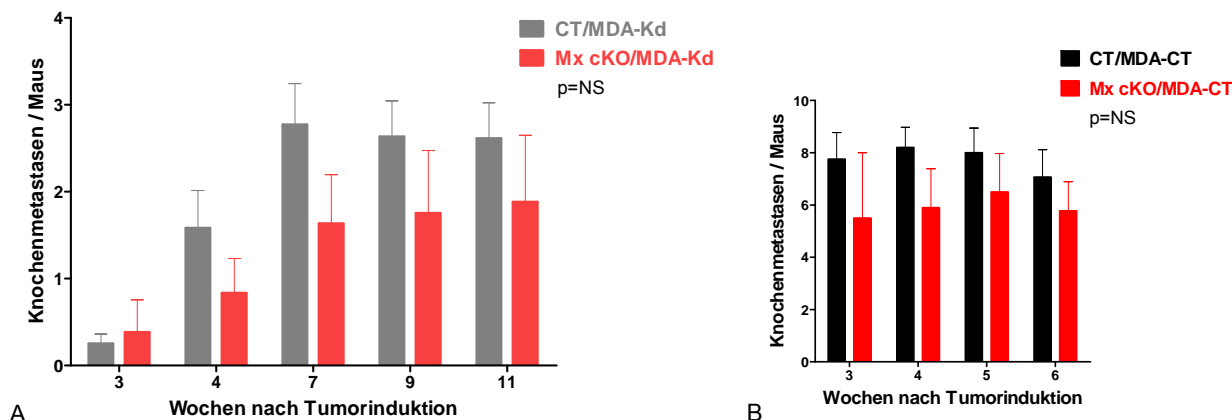


Abbildung III.45: Anzahl der Knochenmetastasen pro Maus

Knockoutmäusen (Mx cKO) und Kontrolltieren (CT) wurden Knochenmetastasen durch die intrakardiale Applikation des humanen Mammakarzinoms MDA-Kd (A) bzw. MDA-CT (B; vergleiche Paragraph III.2.1.4., Abb. III.7) induziert. Die Anzahl der über den Beobachtungszeitraum entstandenen metastatischen Läsionen je Maus war in den Mx-Knockouts im Vergleich zu den Kontrollen statistisch nicht signifikant verschieden.

III.4.1.3. Gesamttumorbelastung

Mx-Knockouttiere und Kontrolltiere, denen Tumore unter Verwendung der MDA-Kd-Linie induziert wurden, wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Gesamttumorbelastung auf (Woche 3: CT/MDA-Kd $5,9 \pm 3,0 \times 10^3$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $0,3 \pm 0,3 \times 10^3$ RLU, $n=16/8$, $p=NS$;

Woche 4: CT/MDA-Kd $1,8 \pm 0,8 \times 10^5$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $0,03 \pm 0,03 \times 10^5$ RLU, $n=19/7$, $p=NS$;
 Woche 7: CT/MDA-Kd $3,0 \pm 1,4 \times 10^7$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $0,3 \pm 0,3 \times 10^7$ RLU, $n=22/8$, $p=0,053$;
 Woche 9: CT/MDA-Kd $4,5 \pm 1,5 \times 10^7$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $2,1 \pm 1,9 \times 10^7$ RLU, $n=18/8$, $p=NS$;
 Woche 11: CT/MDA-Kd $1,1 \pm 0,5 \times 10^8$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $0,4 \pm 0,3 \times 10^8$ RLU, $n=17/8$, $p=NS$;
 Abb. III.46 A). Im Vergleich zu den Kontrollen konnte bei den Mx-Knockouttieren, denen die MDA-Kd-Linie appliziert wurde, der Eindruck eines Trends in Richtung einer reduzierten Gesamttumorbelastung entstehen. Im Gegensatz dazu war die Gesamttumorbelastung der Mx-Knockouttiere, denen die MDA-CT-Linie innokuliert wurde, über den gesamten Beobachtungszeitraum statistisch signifikant reduziert (III.2.1.5., Abb. III.8).

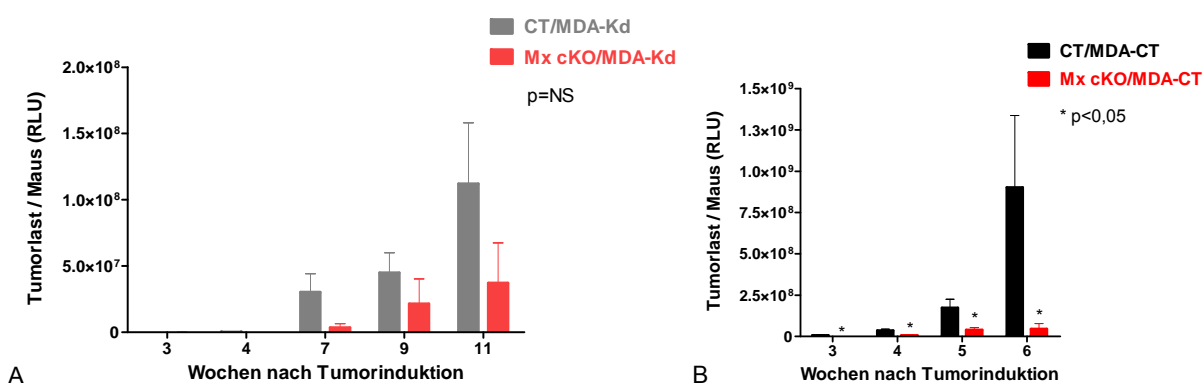


Abbildung III.46: Analyse der Gesamttumorbelastung pro Maus

Im Vergleich zu den Kontrollen (CT/MDA-Kd) war die Gesamttumorbelastung der konditionellen Mx-Knockouts, denen MDA-Kd Tumore induziert wurden, statistisch nicht signifikant verschieden (A). Mx-Knockouts, denen Tumore mit der MDA-CT-Linie induziert wurden, wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Verminderung der Gesamttumorbelastung je Maus auf (B; Vergleiche Paragraph III.2.1.5., Abb. III.8).

III.4.1.4. Tumorwachstum

Im Vergleich zu den Kontrolltieren war die Tumorlast je Metastase der Mx-Knockouttiere, denen die MDA-Kd-Linie verabreicht wurde, 3, 4, 7 und 11 Wochen im Anschluss an die Tumorinduktion signifikant niedriger (Woche 3: CT/MDA-Kd $2,4 \pm 1,3 \times 10^4$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $0,1 \pm 0,06 \times 10^4$ RLU, $n=4/2$, $p<0,05$; Woche 4: CT/MDA-Kd $1,2 \pm 0,3 \times 10^5$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $0,1 \pm 0,08 \times 10^5$ RLU, $n=29/3$, $p<0,05$; Woche 7: CT/MDA-Kd $1,1 \pm 0,3 \times 10^7$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $0,2 \pm 0,09 \times 10^7$ RLU, $n=61/13$, $p<0,05$; Woche 9: CT/MDA-Kd $1,8 \pm 0,5 \times 10^7$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $1,2 \pm 0,6 \times 10^7$ RLU, $n=48/14$, $p=NS$; Woche 11: CT/MDA-Kd $4,4 \pm 1,4 \times 10^7$ vs. Mx cKO/MDA-Kd $2,0 \pm 1,4 \times 10^7$ RLU, $n=44/15$, $p<0,05$). Die Abwesenheit von Fibronectin in der Blutbahn und im Knochenmark der Mx-Knockouttiere beeinflusste, wie bereits für die MDA-CT-Linie gezeigt, ebenfalls das Wachstum der MDA-Kd-Tumore. Die Auswirkungen der tumorzellspezifischen Fibronectin-Ausschaltung auf das Tumorwachstum wurde durch das Fehlen von Knochenmarks-Fibronectin wahrscheinlich zusätzlich verstärkt (Abb. III.47).

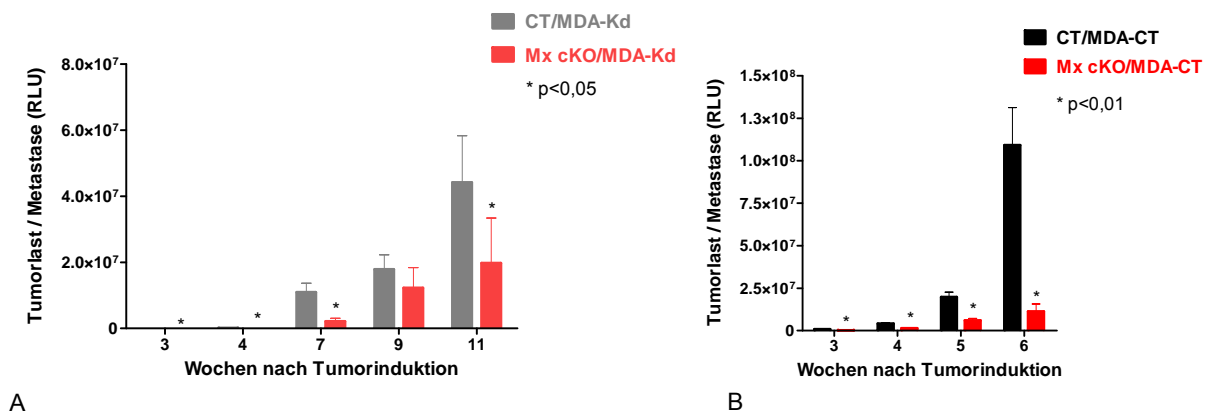


Abbildung III.47: Analyse der Tumorlast pro Metastase

Die durchschnittliche Tumorlast je metastatischer Läsion war bei den Mx-Knockoutmäusen 3, 4, 7 und 11 Wochen im Anschluss an die Inokulation der Tumorzellen MDA-Kd statistisch signifikant vermindert (A). Im Vergleich zu den Kontrollen war die Tumorlast je Metastase bei Mx-Knockouts, denen Tumore unter Verwendung der MDA-CT-Linie induziert wurden, signifikant niedriger (B; Vergleiche Paragraph III.2.1.6., Abb. III.9).

III.5. Spontane Tumorregression

III.5.1. Komplette- und partielle Regression der Tumore

Drei der 11 Mx-Knockouttiere, denen Knochenmetastasen durch die intrakardiale Applikation der Kontrolllinie MDA-CT induziert wurden, zeigten eine spontane Rückbildung der Tumore. Diese konnte über mehrere Wochen mittels Biolumineszenz-Bildgebung verfolgt werden (Abb. III.50). Dabei zeigten 2 der 11 Tiere eine komplette Regression, wohingegen bei einem der 11 Tiere eine partielle Regression beobachtet werden konnte. Im Verlauf der partiellen Regression verminderte sich das detektierte Biolumineszenz-Signal lokaler Metastasen über mehrere aufeinanderfolgende Wochen um 50% oder war vollständig verschwunden, obgleich die Photonenemission der restlichen Tumore stetig zunahm (Abb. III.48).

Sechs der 24 Kontrolltiere, denen Knochenmetastasen unter Verwendung der Fibronectin-Knockoutlinie MDA-Kd induziert wurden, zeigten eine komplette Regression, wohingegen 3 der 24 Tiere eine partielle Regression aufwiesen.

Bei 3 von 8 Mx-Knockouttieren, denen Tumore mit der Fibronectin-Knockoutlinie (MDA-Kd) induziert wurden, wurde eine spontane Rückbildung der Tumore beobachtet. Dabei zeigten 2 der Tiere eine komplette Regression, wohingegen bei dem anderen Tier eine partielle Regression vorlag.

Kontrolltiere, denen die MDA-CT-Linie inokuliert wurde, zeigten weder das Auftreten einer partiellen Regression, noch konnte eine komplette Regression beobachtet werden. Die Tumore wiesen ein durchgängiges fortschreitendes Wachstum auf, bis die Kontrolltiere verstarben, bzw. aufgrund einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes sakrifiziert wurden.

Somit wurden insgesamt 10 Tiere identifiziert, die eine komplette Regression aufwiesen. Zwei dieser Mäuse entwickelten, nachdem sie mehrere Wochen tumorfrei waren, an anderen Orten Metastasen und verstarben wenige Wochen später. Die übrigen Tiere, die eine komplette Regression zeigten, waren gesund, tumorfrei und hatten eine normale Lebensdauer.

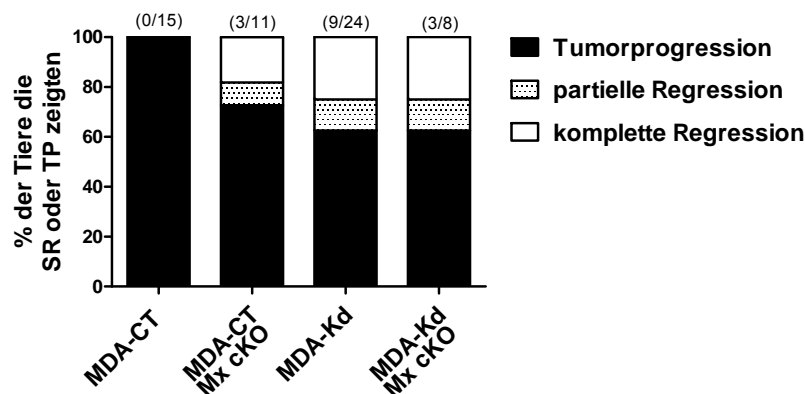


Abbildung III.48: Verteilung der Tiere, die eine Regression oder Progression der Tumore zeigten

Kontrolltiere, denen die MDA-CT-Linie inokuliert wurde, zeigten ausnahmslos ein fortschreitendes Tumorstadium (Tumorprogression). Demgegenüber konnte bei 3 von 11 Mx-Knockouttieren, die die MDA-CT-Linie verabreicht bekamen, eine spontane Tumorregression festgestellt werden (Mx cKO/MDA-CT: 1 partielle Regression, 2 komplette Regressionen). 9 der 24 Kontrolltiere sowie 3 der 8 Mx-Knockouttiere, denen die Fibronectin-Knockoutlinie (MDA-Kd) injiziert wurde, zeigten eine spontane Tumorrückbildung (CT/MDA-Kd: 3 partielle Regressionen, 6 komplette Regressionen; Mx cKO/MDA-Kd: 1 partielle Regression, 2 komplette Regressionen).

III.5.2. Zeitliche Eingrenzung der spontanen Tumorregression

Das Auftreten der spontanen Regression konnte 8-17 Wochen im Anschluss an die Induktion der Tumore beobachtet werden. Allerdings konnte die spontane Rückbildung der Tumore ausschließlich bei Tieren nachgewiesen werden, deren Fibronectin-Gen über den Mx-Promotor deletiert wurde bzw. bei Tieren, denen die Fibronectin Knockout-Linie (MDA-Kd) inokuliert wurde. Die in Abbildung III.49 dargestellte zeitliche Analyse verdeutlicht das vermehrte Auftreten der Tumorregression 13-17 Wochen nach der Injektion der Tumorzellen. In diesem Zeitraum konnten 3 partielle Regressionen und 6 komplette Regressionen nachgewiesen werden. Zwischen der achten und zwölften Woche konnten hingegen 2 partielle Regressionen und 4 komplette Regressionen vermerkt werden. Nur 3 der 15 Kontrolltiere denen die MDA-CT-Linie verabreicht wurde überlebten den Zeitraum von 8 Wochen und somit den Zeitpunkt einer möglichen Regression.

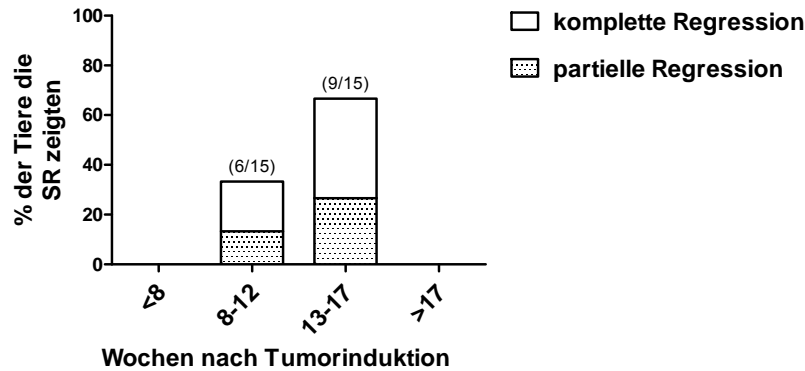


Abbildung III.49: Zeitliche Eingrenzung der spontanen Regression

Tiere, die eine spontane Regression zeigten, konnten vorwiegend 13 bis 17 Wochen im Anschluss an die Tumorinduktion beobachtet werden. Während dieses Zeitraumes konnten 6 komplette Regressionen und 3 partielle Regressionen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten 8 bis 12 Wochen im Anschluss an die Inokulation der Tumorzellen 4 Mäuse eine komplette Regression und 2 Mäuse eine partielle Regression der Tumore.

III.5.3. Evaluierung der spontanen Tumorregression

III.5.3.1. Nachweis der vollständigen Regression mittels Biolumineszenz-Bildgebung

Abbildung III.50 zeigt eine spontane, vollständige Regression, die mittels Biolumineszenz-Bildgebung über mehrere Wochen verfolgt wurde. Vier Wochen im Anschluss an die intrakardiale Applikation der Tumorzellen (MDA-Kd) konnten erste Anzeichen einer Metastasierung des Humerus beobachtet werden. In den folgenden Wochen war eine stetige Zunahme der Photonenemission zu verzeichnen, die dem Tumorwachstum entsprach. 7 Wochen im Anschluss an die Tumorinduktion konnte die höchste emittierte Lichtleistung detektiert werden. Ab diesem Zeitpunkt nahm das gemessene Biolumineszenz-Signal von Woche zu Woche stetig ab, bis 14 Wochen nach der Tumorinduktion keine Photonenemission mehr nachgewiesen werden konnte. Selbst 30 Wochen im Anschluss an die intrakardiale Applikation der Tumorzellen konnte bei demselben Tier kein Biolumineszenz-Signal festgestellt werden.

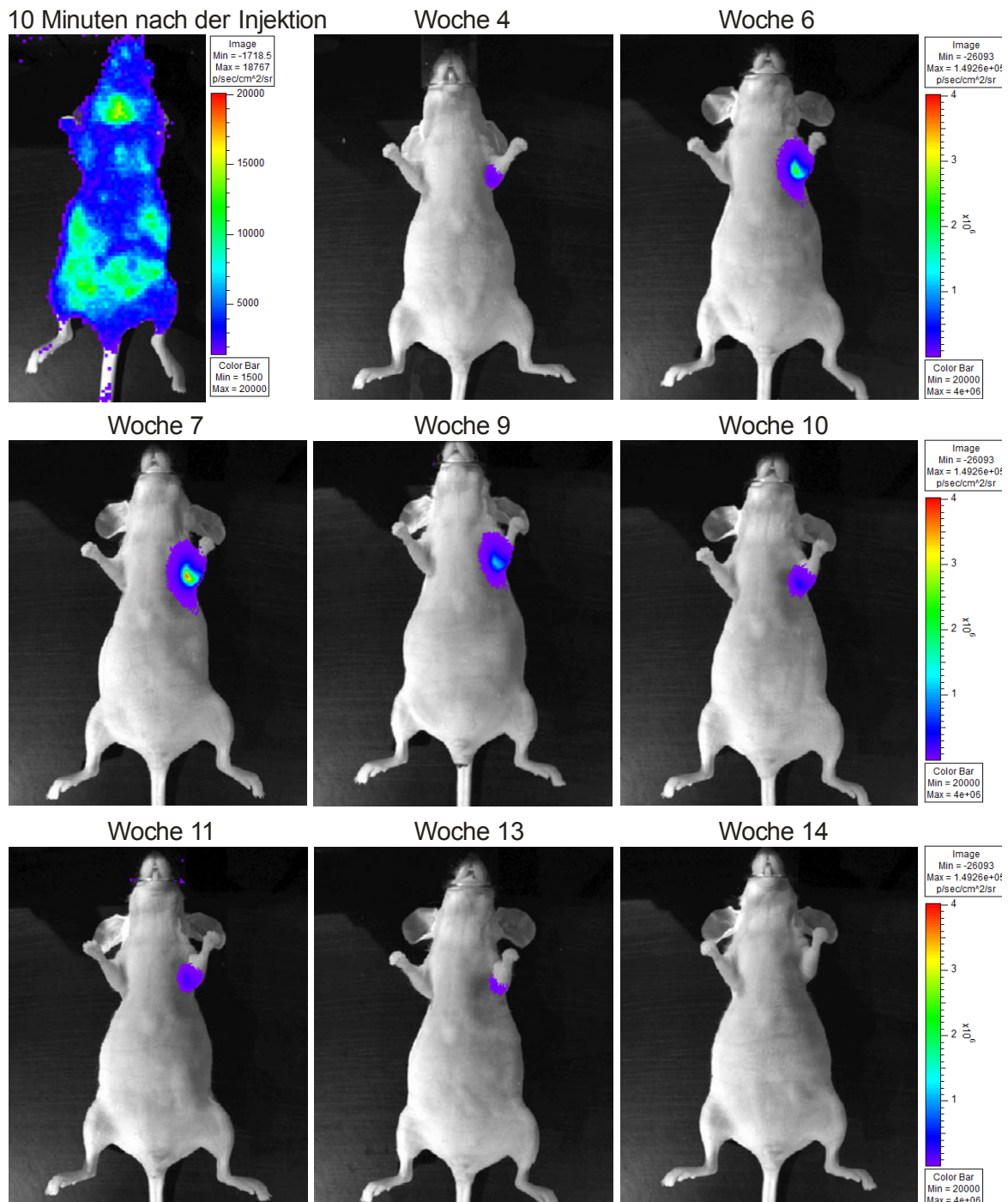


Abbildung III.50: Nachweis einer spontanen Tumorregression mittels Biolumineszenz-Bildgebung

Der Maus wurden die humanen Mammakarzinomzellen MDA-Kd verabreicht. Zehn Minuten im Anschluss an die intrakardiale Applikation der Tumorzellen konnte mittels Biolumineszenz-Bildgebung eine diffus über den gesamten Körper der Maus verteilte Photonenanreicherung beobachtet werden. Demzufolge war die intrakardiale Injektion der Tumorzellen erfolgreich. Vier Wochen nach der Tumorinduktion konnte eine Metastase am distalen Ende des linken Humerus nachgewiesen werden. Das Biolumineszenz-Signal nahm bis zur 7. Woche stetig zu. Ab diesem Zeitpunkt konnte die spontane und vollständige Tumorregression beobachtet werden. Die detektierte Photonenemission nahm ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich ab, bis 14 Wochen im Anschluss an die intrakardiale Applikation der Tumorzellen kein Biolumineszenz-Signal mehr festgestellt werden konnte.

III.5.3.2. Radiologische Untersuchung der Tumorregression

Um sicherzustellen, dass die beobachtete spontane Tumorregression nicht darauf beruhte, dass die Tumorzellen die Fähigkeit verloren hatten, das für die Lichtreaktion notwendige Enzym Luciferase zu bilden, wurden die Regressions-Mäuse radiographisch untersucht. Die Röntgenaufnahmen bewiesen, dass sich die durch die Tumorzellen verursachten osteolytischen Knochenläsionen nach dem Einsetzen der Regression nicht vergrößerten. Desweiteren konnte mit Hilfe der radiologischen Untersuchungen der über mehrere Wochen andauernde Heilungsprozess des Knochengewebes betrachtet werden (Abb. III.51).

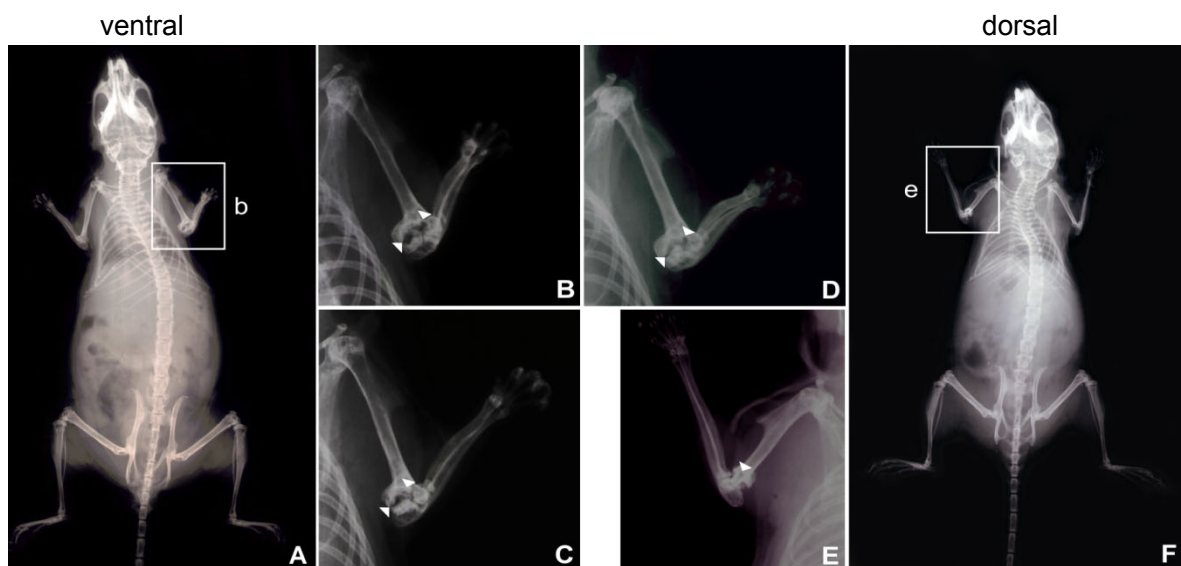


Abbildung III.51: Radiologischer Nachweis der spontanen Tumorregression

Äquivalente radiographische Darstellung der zuvor für die Biolumineszenz-Bildgebung gezeigten Maus (Abb. III.50). Die ventrale Ansicht zeigt die von den MDA-Kd-Zellen ausgelöste Destruktion des Oberarmknochens (A). Der entsprechend vergrößerte Ausschnitt verdeutlicht die osteolytischen Läsionen des Humerus (B). Auffällig ist die Verdichtung des Knochengewebes im Bereich der Läsionen 5 Wochen (C) und 8 Wochen (ventral D und dorsal E) nach vollständiger Tumorregression, die den Heilungsprozess demonstriert. Die dorsale Ansicht beweist ebenfalls, dass sich keine Metastasen abseits des Primärtumors gebildet hatten (F). Pfeilspitzen kennzeichnen die von den Tumorzellen induzierten osteolytischen Läsionen.

III.5.3.3. Leukozytenvermittelte Zytotoxizität

Die spontane Regression der Tumore konnte überwiegend bei Tieren beobachtet werden, denen Knochenmetastasen unter Verwendung der Fibronectin-Knockoutlinie MDA-Kd induziert wurden. Aus diesem Grund wurde die zellvermittelte spezifische Lyse unterschiedlicher Leukozytenpopulationen auf die Zielzellen MDA-Kd und MDA-CT untersucht. In Abbildung III.52 ist die spezifische Lyse der Zielzellen exemplarisch für 2 unterschiedliche Leukozytenpopulationen gezeigt. Es konnte kein Unterschied, bezogen auf die zellvermittelte Lyse der Zielzellen MDA-Kd und MDA-CT, festgestellt werden.

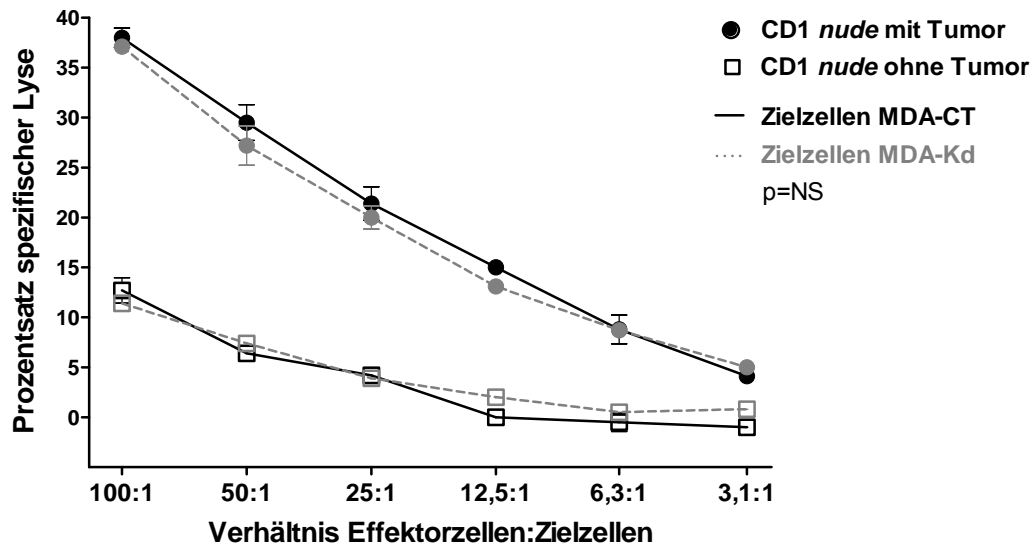


Abbildung III.52: Leukozytenvermittelte Zytotoxizität im Chromfreisetzungstest

IL-2 stimulierte Splenozyten wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit den radioaktiv markierten Zielzellen (MDA-CT/MDA-Kd) inkubiert. Exemplarisch dargestellt ist die leukozytenvermittelte spezifische Lyse der Zielzellen für 2 unterschiedliche Spendertiere. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied, bezogen auf die spezifische Lyse der Zielzellen MDA-Kd und MDA-CT, festgestellt werden ($p=NS$).

Um zu klären, ob die zytotoxische Aktivität der Leukozyten in Tieren, die eine komplette Tumorrückbildung zeigten, erhöht war, wurde die zellvermittelte spezifische Lyse der Effektorzellen (Leukozyten) aus unterschiedlichen Spendertieren untersucht. Der Prozentsatz der spezifischen Lyse variierte je nach Spendertier beträchtlich. Jedoch konnte kein Zusammenhang einer erhöhten Aktivität der Leukozyten aus Tieren, die eine komplette Tumorrückbildung aufwiesen und Kontrolltieren mit bzw. ohne Tumore festgestellt werden (Abb. III.53). Allerdings war es noch nicht möglich, Leukozyten mit dem Chromfreisetzungverfahren zu analysieren, die sich unmittelbar in der Regression befanden.

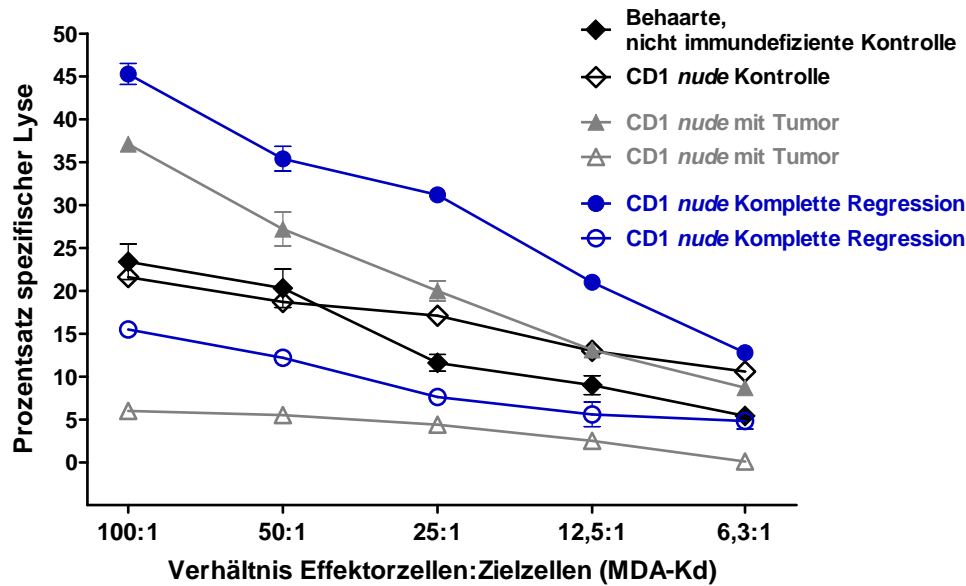


Abbildung III.53: Leukozytenvermittelte Zytotoxizität unterschiedlicher Leukozyten-Populationen

IL-2 stimulierte Splenozyten wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit den radioaktiv markierten Zielzellen (MDA-CT/MDA-Kd) inkubiert. Dargestellt ist die leukozytenvermittelte spezifische Lyse der Zielzellen (MDA-Kd). Je nach Spendertier variierte die Aktivität der Effektorzellen (Leukozyten) beträchtlich. Die zellvermittelte spezifische Lyse der Zielzellen MDA-Kd und MDA-CT war identisch. Zur Vereinfachung wurde auf die Darstellung der MDA-CT Zellen verzichtet.

III.5.3.4. Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen

Um die Verteilung der unterschiedlichen Leukozyten-Subpopulationen zu charakterisieren, wurde eine FACS-Messung durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine Analyse der Expression von bestimmten Zellmolekülen über fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper. Auf diese Weise konnte der prozentuale Anteil an Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten aus isolierten Milzzellen (Splenozyten) unterschiedlicher Versuchstiere ermittelt werden. Abbildung III.54 zeigt exemplarisch die FACS-Färbung der verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen einer Maus mit durchschnittlicher Tumorbelastung (MDA-Kd) und einem Kontrolltier ohne Tumor.

Die FACS-Analyse der Splenozyten ergab für das Tier mit durchschnittlicher Tumorbelastung einen prozentualen Anteil der Leukozyten-Subpopulationen von 52,4% B-Zellen, 1,4% NK-Zellen, 0,1% T-Zellen, 68% Granulozyten und 14,9% Monozyten. Die isolierten Milzzellen der Kontrollmaus ohne Tumor setzten sich aus 81,4% B-Zellen, 4,6% NK-Zellen, 4% T-Zellen, 7,6% Granulozyten und 9,8% Monozyten zusammen.

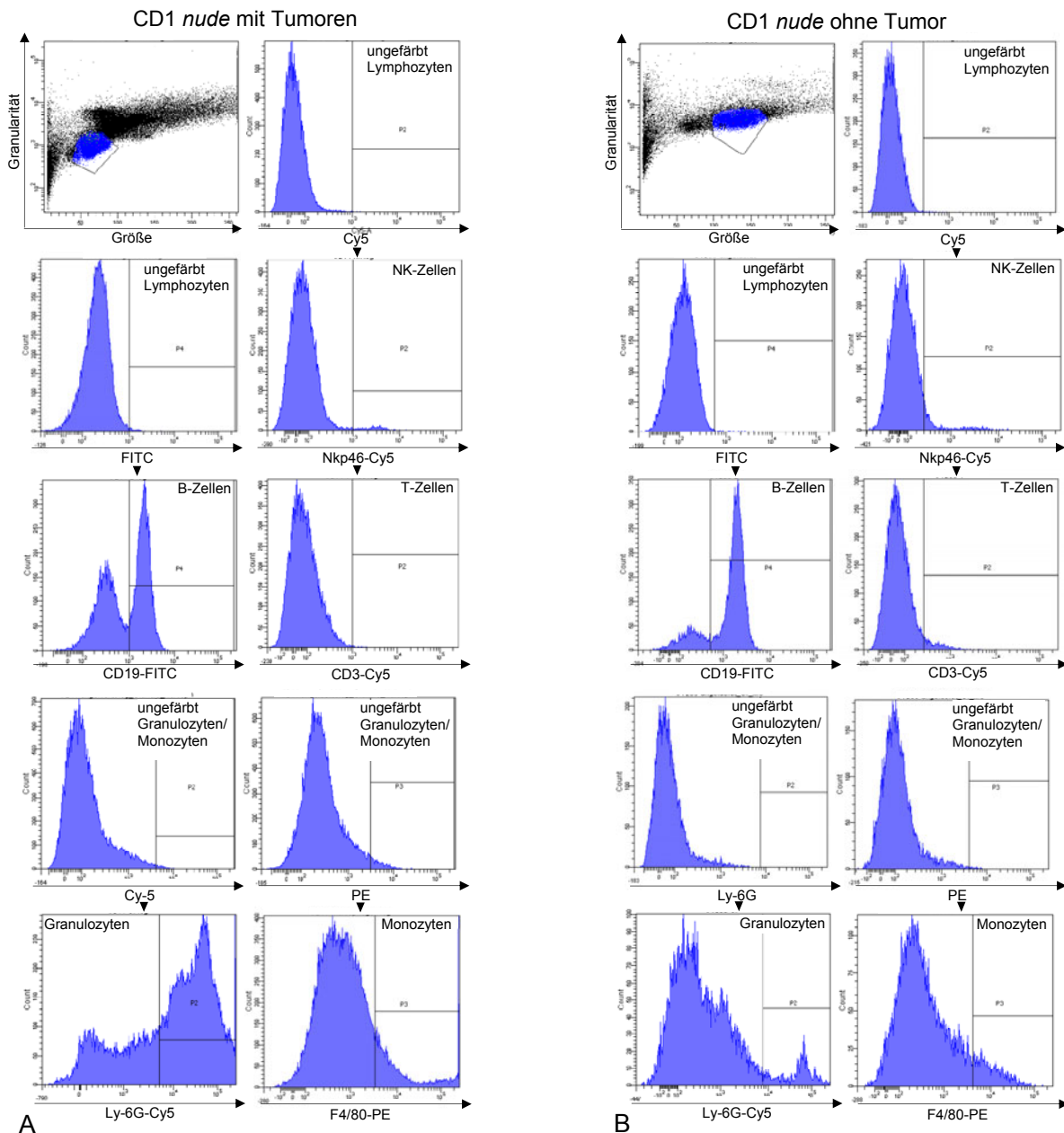


Abbildung III.54: Durchflusszytometrische Färbung der Leukozyten-Subpopulationen der Milz

Exemplarisch gezeigt ist die FACS-Färbung der Leukozyten einer CD1 *nude* Maus mit Tumor (MDA-Kd) (A) im Vergleich zu einer CD1 *nude* Kontrollmaus ohne Tumor (B). Die aus der Milz isolierten mononukleären Leukozyten wurden jeweils mit den Antikörpern Nkp46-Cy5 (NK-Zellen), CD3-Cy5 (T-Zellen), CD19-FITC (B-Zellen), Ly-6G-Cy5 (Granulozyten) und F4/80-PE (Monozyten/Makrophagen) gefärbt. Bei der FACS-Auswertung wurden die Zellen nach Größe und Granularität definiert. Anschließend wurde auf die Lymphozyten bzw. Granulozyten/Monozyten gated. Über die Histogramme der jeweiligen Fluoreszenz werden die verschiedenen Marker als positiv bzw. negativ definiert und der prozentuale Anteil der markierten Immunzellen bestimmt (CD1 *nude* mit Tumoren: prozentualer Anteil an Lymphozyten, B-Zellen: 52,4%, NK-Zellen: 1,4%, T-Zellen: 0,1%; prozentualer Anteil an Granulozyten/Monozyten, Granulozyten: 68%, Monozyten: 14,9%; CD1 *nude* ohne Tumor: prozentualer Anteil an Lymphozyten, B-Zellen: 81,4%; NK-Zellen: 4,6%; T-Zellen: 4%; prozentualer Anteil an Granulozyten/Monozyten, Granulozyten: 7,6%; Monozyten: 9,8%).

Die statistische Beurteilung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie unterschiedlicher Versuchstiergruppen ist in Abbildung III.55 graphisch dargestellt. Es konnte kein Unterschied in der Anzahl der Lymphozyten-Populationen (B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen) zwischen nackten Kontrolltieren (CT) und Tieren mit Kd-Tumoren, bzw. Tieren, die eine komplette Regression aufzeigten, beobachtet werden (B-Zellen: CT $79\pm 2\%$ vs. mit Tumor $67\pm 7\%$ vs. Komplette Regression $71\pm 1\%$, $p=NS$ für alle Paare; NK-Zellen: CT $5\pm 1\%$ vs. mit Tumor $3\pm 2\%$ vs. Komplette Regression $3\pm 1\%$, $p=NS$; T-Zellen: CT $5\pm 1\%$ vs. mit Tumor $2\pm 1\%$ vs. Komplette Regression $3\pm 1\%$, $p=NS$). Behaarte, nicht immundefiziente Tiere, zeigten im Vergleich zu den immundefizienten CD1 *nude* Tieren erwartungsgemäß einen signifikant höheren Anteil an T-Zellen (T-Zellen: behaart $38\pm 0,2\%$ vs. CT $5\pm 1\%$ vs. mit Tumor $2\pm 1\%$ vs. Komplette Regression $3\pm 1\%$; $p<0,05$ im Vergleich zu behaarten Tieren). Des Weiteren war der prozentuale Anteil der B-Zellen der behaarten Tiere signifikant reduziert (B-Zellen: behaart $25\pm 0,1\%$ vs. CT $79\pm 2\%$ vs. mit Tumor $67\pm 7\%$ vs. Komplette Regression $71\pm 1\%$, $p<0,05$). Die Anzahl der natürlichen Killerzellen war im Vergleich zu den nackten Kontrolltieren statistisch nicht signifikant verschieden (NK-Zellen: behaart $5\pm 0,1\%$ vs. CT $5\pm 1\%$ vs. mit Tumor $3\pm 2\%$ vs. Komplette Regression $3\pm 1\%$, $p=NS$)

Die Anzahl der Granulozyten und Monozyten/Makrophagen war in Mäusen, die eine mittlere Tumorbilastung aufwiesen, im Vergleich zu Kontrollmäusen ohne Tumor statistisch signifikant erhöht (Granulozyten: CT $14\pm 3\%$ vs. mit Tumor $47\pm 6\%$, $p<0,01$; Monozyten/Makrophagen: CT $9\pm 1\%$ vs. mit Tumor $17\pm 3\%$, $p<0,05$). Bei Tieren, die eine komplette Regression aufwiesen, zum Zeitpunkt der FACS-Analyse hingegen als tumorfrei einzustufen waren, könnte im Vergleich zu den Kontrollen der Eindruck eines Trends zu einer erhöhten Anzahl an Granulozyten entstehen. Jedoch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (Granulozyten: CT $14\pm 3\%$ vs. Komplette Regression $33\pm 9\%$, $p=0,13$). Die mittels FACS-Analyse ermittelte Anzahl an Monozyten/Makrophagen war in der Regressions-Gruppe unverändert und vergleichbar mit denen der Kontrolltiere (Monozyten/Makrophagen: CT $9\pm 1\%$ vs. Komplette Regression $12\pm 5\%$, $p=NS$).

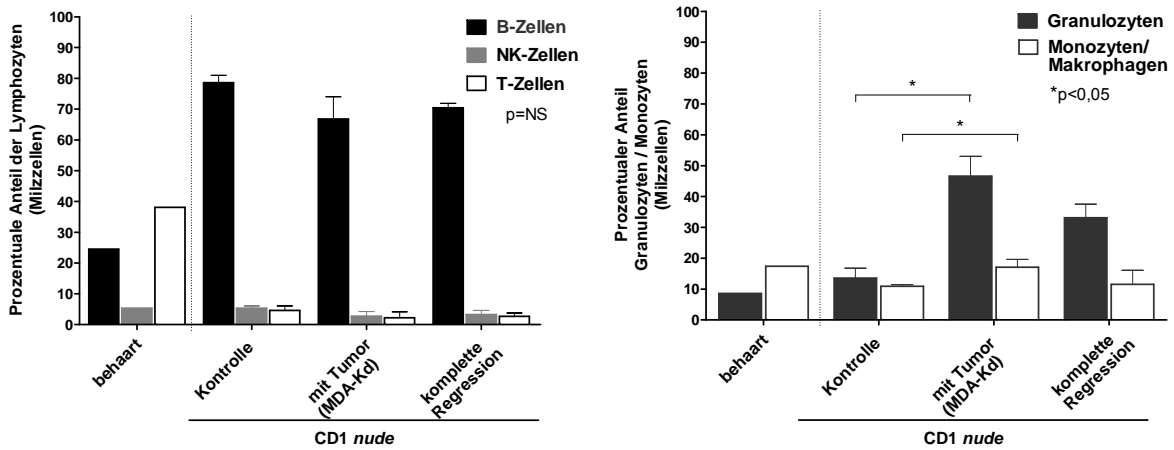


Abbildung III.55: Statistische Auswertung der FACS-Analyse

Graphisch dargestellt sind die mittels Durchflusszytometrie erworbenen prozentualen Mittelwerte der Leukozyten-Subpopulationen unterschiedlicher Versuchstiergruppen. Die aus der Milz isolierten mononukleären Leukozyten wurden mit NKp46, CD3, CD19, Ly-6G und F4/80 Antikörpern gefärbt. Bei der FACS-Auswertung wurde auf die Lymphozyten bzw. die Granulozyten/Monozyten getaget und der prozentuale Anteil der markierten Immunzellen bestimmt. Die Anzahl der Granulozyten und Monozyten/Makrophagen war bei Mäusen mit einer durchschnittlichen Tumorbelastung im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant erhöht.

IV. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Fibronektins auf die Entstehung und das Wachstum von Knochenmetastasen untersucht. Dabei konnte anhand eines Metastasierungsmodells erstmals nachgewiesen werden, dass Fibronektin im Bereich der vaskulären Nische den Prozess der Metastasierung beeinträchtigt. Die mausspezifische Inaktivierung von Fibronektin des zirkulierenden Blutes und des Knochenmarks hatte ein verlangsamtes bzw. eingeschränktes Tumorwachstum zur Folge, welches auf eine verminderte Blutgefäßbildung zurückgeführt werden kann. Das äußerte sich im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen in einer verlängerten mittleren Überlebensdauer. Außerdem konnte ein Effekt von osteoblastenspezifischem Fibronektin auf die frühe Tumorentwicklung beobachtet werden. Demzufolge beeinträchtigte Fibronektin der Mikroumgebung des Knochenmarks das Wachstum bzw. die frühen Entwicklungsstadien der Tumore.

Ein weitaus größerer Einfluss von tumorzellenspezifischem Fibronektin konnte auf die Etablierung und das Wachstum von Metastasen nachgewiesen werden. Tumorzellen, deren endogene Fibronektinexpression mittels RNAi um 98% reduziert worden war, bildeten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen deutlich weniger Metastasen. Das deutete auf eine Beeinträchtigung der Infiltrationseigenschaften von Tumorzellen zu ihrem Zielorgan, dem Knochenmark, hin. Zusätzlich zeigten die Tumorzellen *in vivo* ein stark eingeschränktes Wachstum, welches ebenfalls mit einer Verminderung der mikrovaskulären Gefäßdichte assoziiert war. Folglich waren die Überlebensraten dieser Tiere von durchschnittlichen 7 auf 18 Wochen verlängert. Die Fähigkeit von Tumorzellen, zu metastasieren und Sekundärtumore zu bilden, wird also maßgeblich von tumorzelleigenem Fibronektin beeinträchtigt. Unsere Daten weisen darauf hin, dass tumorzellenspezifisches Fibronektin nicht nur eine wichtige Rolle beim *Homing* der Tumorzellen zum Knochenmark einnimmt sondern auch die für das Wachstum von Tumoren essentielle Angiogenese beeinträchtigt.

Interessanterweise konnte bei einigen Tieren, bei denen Metastasen induziert wurden, eine spontane Rückbildung der Tumore beobachtet werden. Die Tumorregression erfolgte ohne medizinisches Einwirken und konnte über mehrere Wochen verfolgt werden. Dabei wurde zwischen einer kompletten Regression, bei der eine Rückbildung aller Tumore beobachtet werden konnte, und einer partiellen Regression, von der nur einzelne Tumore betroffen waren, unterschieden. Die spontane Regression war altersabhängig und trat vorwiegend 8-17 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen auf. Die komplette Regression der osteolytischen Knochenläsionen war verbunden mit dem Heilungsprozess des Knochengewebes, der sich in einer Verdichtung der Knochensubstanz äußerte.

IV.1. Die Rolle des Fibronektins bei der Metastasierung

IV.1.1. Metastasierungsmodelle

Um den Ablauf der Metastasierung genauer zu untersuchen bzw. um neue anti-metastatisch wirkende Therapien entwickeln zu können, ist man auf Tiermodelle angewiesen, welche ein möglichst genaues Abbild der im Krebspatienten ablaufenden Prozesse widerspiegeln. Die äußerst komplexen Vorgänge der Tumor-Progression lassen sich *in vitro* mit Zellkulturmethoden nur unzureichend nachahmen. Beispielsweise zeigte keiner von 171 in der Klinik zur Anwendung kommenden chemotherapeutischen Wirkstoffe eine *in vitro* Selektivität gegenüber unterschiedlichen Melanom- und Brustkrebszelllinien [292]. Ohne die notwendigen *in vivo* Analysen wäre die klinische Relevanz dieser Wirkstoffe aller Wahrscheinlichkeit nach übersehen worden. Folglich sollte der Einfluss des Fibronektins auf die Metastasierung von Tumoren im Mausmodell untersucht werden, um eine Voraussetzung für die Übertragbarkeit wichtiger Erkenntnisse auf den Menschen zu schaffen.

Für die experimentelle Untersuchung der Metastasierung können verschiedene *in vivo* Modelle zur Anwendung kommen. Dabei wird zwischen syngenem Tumormodellen, bei denen die Tumorzellen und der Wirt der gleichen Spezies (genetisch identisch) angehören, und Xenograftmodellen, bei denen lebensfähige und funktionstüchtige Zellen zwischen unterschiedlichen Spezies übertragen werden, differenziert. Der Vorteil der Xenotransplantation liegt gegenüber der Verwendung eines syngenem Maus-Tumormodells in der Verwendung humaner Zellen im Mausmodell, so dass die gewonnenen Erkenntnisse leichter auf den Menschen übertragbar sind. Jedoch müssen bei dieser Anwendung immundefiziente Tiere verwendet werden, um eine Immunreaktion und die damit verbundene Abwehr artfremder Tumorzellen zu unterbinden. Aus diesem Grund kann der Einfluss des Immunsystems auf die Metastasierung nur bedingt beurteilt werden. Syngene Tumormodelle ermöglichen den Einsatz immunkompetenter Tiere, so dass der Beitrag des Wirtsimmunsystems untersucht werden kann. Es bleibt anzumerken, dass syngene Modelle in der Regel durch einen sehr aggressiven Krankheitsverlauf gekennzeichnet sind und dass das einen stark limitierten Beobachtungs- und Untersuchungszeitraum der Tumorprogression zur Folge hat. Auch unterscheiden sich das humane und das murine Immunsystem in vielen Punkten voneinander, so dass eine direkte Übertragung der Befunde auf den Menschen nur bedingt möglich ist [279]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem Xenotransplantat-Metastasierungsmodell gearbeitet. Die Etablierung der Metastasen sowie das Wachstum und die damit verbundene Angiogenese konnten so über einen Beobachtungszeitraum von 6-10 Wochen erfolgen.

Man kann zwischen spontaner und experimenteller Metastasierung unterscheiden. Bei der spontanen Metastasierung kommt es zur Absiedlung der Tumorzellen von einem wachsenden Primärtumor. Demzufolge können alle Schritte der metastatischen Kaskade, wie Abtrennung vom Zellkollektiv, Invasion, Intravasation, Zirkulation, Extravasation und die metastatische Kolonisierung verfolgt werden. Die Erzeugung des Primärtumors kann hier durch Karzinogene, hervorgerufene Genom-Mutationen [293] oder durch die direkte Applikation der Tumorzellen (z.B. subkutan oder intramuskulär) [294] erfolgen. Jedoch kann bei diesem Ansatz eine Metastasierung unter Umständen erst nach einem relativ langen Zeitraum ausgelöst werden oder bleibt sogar vollständig aus, da es sich um einen spontanen, unkontrollierten Prozess handelt. Ferner ist es nicht möglich, die Anzahl der metastasierenden Tumorzellen bei einer experimentellen Anwendung zu vereinheitlichen. Im Gegensatz dazu wird bei der experimentellen Metastasierung eine definierte Zellzahl an Tumorzellen intravasal bzw. intrakardial verabreicht. Dementsprechend können die metastatischen Prozesse der Zirkulation, der Extravasation und der Kolonisierung im Sekundärorgan untersucht werden. Die standardisierten Bedingungen dieses Ansatzes ermöglichen sowohl die Quantifizierung der Anzahl der etablierten Metastasen als auch die Tumorprogression und die Gefäßbildung unter verschiedenen Gegebenheiten, z.B. unter Abwesenheit von Fibronectin zu untersuchen. Obwohl die spontane Metastasierung das näher an der Klinik orientierte Modell darstellt, ist die experimentelle Metastasierung besser geeignet, standardisierte Bedingungen zu erzielen [294] und wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt.

IV.1.2. Induktion von Knochenmetastasen

IV.1.2.1. Biolumineszenz-Bildgebung

Für die experimentelle Induktion von Knochenmetastasen wurde eine definierte Zellzahl luciferaseexprimierender Tumorzellen intrakardial verabreicht. Die frühe Distribution dieser Tumorzellen, wie in Kapitel III.1.1. (Abb. III.1) gezeigt, konnte 10-60 Minuten im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen nachgewiesen werden. Die diffus über den gesamten Körper der Maus verteilte Photonenanhäufung wurde wahrscheinlich von Tumorzellen emittiert, die noch nicht aus den Blutgefäßen in das Gewebe übergetreten waren. Bei Regionen, in denen ein höheres Biolumineszenz-Signal detektiert wurde, handelt es sich vorzugsweise um stark durchblutete Organe. Vierundzwanzig Stunden im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen konnte keine Photonenemission mehr nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen raschen Eliminierung der Mehrheit an intrakardial injizierten Tumorzellen [295]. Es wird vermutet, dass Tumorzellen bereits während der ersten Passage durch die Blutzirkulation in der Lunge beseitigt werden. Dies würde auch das Ausbleiben der Tu-

morbildung im Anschluss an die intravenöse Injektion (z.B. der Schwanzvene) von Tumorzellen erklären [200]. Gleichzeitig unterstützt diese Annahme die Notwendigkeit der intrakardialen Applikation in den linken Herzventrikel.

Die räumliche, zeitliche und quantitative Analyse des Tumorwachstums erfolgte mittels Biolumineszenz-Bildgebung. Die Sensitivität der Detektion ist abhängig von der Photonen-Ausbeute der enzymatischen Reaktion, der gewebespezifischen Absorption und Streuung des Lichts [296], sowie der Sensitivität der Messeinheit [297]. Die Absorption und Streuung des Lichts sind die wichtigsten limitierenden Faktoren für die Biolumineszenz-Messung *in vivo*, da sie eine direkte Verringerung der Empfindlichkeit und Auflösung zur Folge haben. Die Photonenabsorption beruht im Wesentlichen auf dem Lichtemissionsspektrum, wohingegen die Lichtstreuung maßgeblich durch die Zusammensetzung des Gewebes beeinflusst wird. Das ubiquitär verbreitete Hämoglobin absorbiert beispielsweise vorwiegend die kurzwelligeren blauen und grünen Anteile des Lichtspektrums. Demgegenüber kann bei Wellenlängen über 600 nm weniger Absorption verzeichnet werden. Infolgedessen eignen sich die roten Anteile des emittierten Lichtspektrums der verwendeten Luciferase besonders für die Biolumineszenz-Bildgebung im lebenden Organismus. Die von den Tumorzellen exprimierte Luciferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* emittiert Licht in einem Bereich von 530 bis 640 nm mit einem Maximum bei 612 nm (37° C). Dieses Emissionsspektrum und die optischen Eigenschaften von biologischem Gewebe erlauben es, dass das Licht mehrere Zentimeter Gewebe durchdringen kann [298]. Jedoch würde die Körperbehaarung der Mäuse oder eine dunkle Hautfarbe das von den Tumorzellen erzeugte Biolumineszenz-Signal insoweit abschwächen, dass eine Detektion der emittierten Photonen nur bedingt möglich wäre. Demzufolge sollten für die Biolumineszenz-Bildgebung haarlose weiße Mäuse eingesetzt werden, um eine direkte Verringerung der Empfindlichkeit und Auflösung zu vermeiden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten immundefizienten weißen Nachtmäuse ermöglichten somit das Versuchsvorhaben.

Die Vorzüge der Biolumineszenz-Bildgebung liegen in der höheren Sensibilität und Reliabilität, sowie der statistischen Aussagekraft der erworbenen Daten. So konnten 3-6 Wochen im Anschluss an die Inokulation der MDA-Kd-Tumore bereits signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Außerdem ermöglicht die Biolumineszenz-Bildgebung, die Viabilität und das Wachstum von Tumoren zu beurteilen.

IV.1.2.2. Radiographische Analyse

Die radiographische Betrachtungsweise detektiert im Gegensatz zur Biolumineszenz-Bildgebung nicht die eigentliche Tumorbelastung, sondern ermöglicht alleinige Rückschlüsse bezüglich der Osteolyse [283]. Der Verlust an Knochensubstanz ist ein indirektes und inkonsistentes Maß für

die Gegenwart eines Tumors. Des Weiteren ist das Auftreten evidenter osteolytischer Knochenläsionen ein Ereignis auf makroskopischer Ebene, welches erst in der späten Phase der Tumorentwicklung radiologisch beurteilt werden kann [200]. Das Ausmaß der osteolytischen Läsion wird maßgeblich von der Fähigkeit der Tumorzellen beeinflusst, knochenresorbierende Zytokine zu sezernieren. Evidente osteolytische Läsionen der MDA-Kd-Linie konnten mittels der radiologischen Untersuchung erstmals 6 Wochen im Anschluss an die Inokulation der Tumorzellen dokumentiert werden. Infolgedessen trug die Biolumineszenz-Messung dazu bei, Unterschiede bezüglich der Anzahl und des Wachstums der Tumore festzustellen, während die radiologische Auswertung den Beweis lieferte, dass die Metastasen aufgrund ihres verminderten Wachstums ebenfalls weniger Osteolyse zur Folge hatten. Eine zusätzliche histomorphometrische Analyse, die das umliegende Gewebe mit einschließt, wäre außerdem notwendig, um eine Aussage über die eigentliche Tumorgöße zu treffen [283, 299]. Mx-Knockouttiere zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant verminderte Tumorlast je Metastase (III.2.1.6, Abb. III.9). Ergänzend dazu ergab die radiologische Untersuchung der Fläche osteolytischer Läsionen einen signifikanten Unterschied (III.2.1.7, Abb. III.10 B). Dementsprechend lieferte die Biolumineszenz-Bildgebung erste Hinweise auf eine Beeinträchtigung des Tumorwachstums in Abwesenheit von Fibronectin im Knochenmark, welches mit Hilfe der radiologischen Betrachtungsweise bestätigt werden konnte. Hätte die Ausschaltung von Fibronectin im Knochenmark keinen Einfluss auf das Tumorwachstum, so wären weder das Biolumineszenz-Signal noch die Fläche der osteolytischen Läsionen signifikant verschieden.

IV.1.3. Die Rolle des Fibronectins der Mikroumgebung bei der Metastasierung

Das Knochenmark bietet optimale Umgebungsbedingungen für Mikrometastasen des Brust- und Prostatakrebses. Die Tumorzellen setzen sich in so genannte „Nischen“, die ähnlich oder identisch zu den „Stammzellnischen“ sind [229]. Strukturell setzen sich diese Nischen aus unterstützenden Zellen zusammen, die eine optimale Mikroumgebung konstruieren und somit Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen haben. Im Knochenmark konnten 2 unterschiedliche Nischen identifiziert werden, die das Wachstum von hämatopoetischen Stammzellen begünstigen und durch die Lokalisation und den vorrangigen Zelltyp charakterisiert werden. Es wird zwischen der vaskulären Nische, die im Bereich der sinusoidalen Blutgefäße angesiedelt ist und der osteoblastischen Nische differenziert [103, 229, 231]. Einige Studien lieferten Hinweise darauf, dass bereits vorhandene physiologische Nischen wie die vaskuläre Nische oder die osteoblastische Nische den Bedürfnissen der Tumorzellen entsprechend modifiziert werden [228]. Darüber hinaus sind Zellen, die sich in diesen Nischen befinden, in eine extrazelluläre Matrix eingebettet. Letztere hat eine unterstützende Wirkung auf die Zellen der Nischen. Fibronectin ist ein Bestandteil dieser

Matrix, welcher sowohl die Migration von Tumorzellen als auch deren maligne Transformation beeinträchtigen kann [103, 300].

Fibronektin wurde in konditionellen Knockoutmäusen mittels *Cre/loxP*-Systems ausgeschaltet. Die Expression der Cre Rekombinase unter der Kontrolle eines bestimmten Promotors in Mäusen, deren Fibronektin-Gen gefloxt war, führte zur Deletion von Fibronektin in Zellen, die eine Aktivität des Promotors aufwiesen. Die Ausschaltung über den Mx-Promotor hatte die Deletion von Fibronektin der Blutzirkulation und des Knochenmarks und somit der Zellen im Bereich der vasculären Nische zur Folge. Die Verwendung des Col-Promotors ermöglichte hingegen die spezifische Ausschaltung von Fibronektin in den Osteoblasten und Osteozyten und somit der osteoblastischen Nische.

IV.1.3.1. Bedeutung des Fibronektins der Blutzirkulation und des Knochenmarks für die Metastasierung

In vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass Fibronektin aus der Blutzirkulation heraus das Knochengewebe infiltriert und in die Knochenmatrix eingelagert wird [301]. Entgegen der allgemeinen Annahme wird ein Großteil des Fibronektins der Knochenmatrix nicht von den knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten, sezerniert. Vielmehr wird das von den Hepatozyten der Leber gebildete lösliche Plasmafibronektin in die extrazelluläre Matrix des Knochens eingebaut und macht somit den Hauptanteil des Fibronektins des Knochens aus [77]. Die Tatsache, dass Fibronektin aus der Blutzirkulation heraus in das Knochenmark bzw. den Knochen infiltriert, demonstriert die Notwendigkeit der Ausschaltung des Fibronektins der Blutzirkulation für das geplante Versuchsvorhaben. Es existieren 2 Promotoren, die für die Ausschaltung von Molekülen in der Leber in Frage kommen: Der Albumin-Promotor (Alb-Promotor) ist hochspezifisch für die Leber, da Albumin ausschließlich von den Hepatozyten exprimiert wird. Ein Nachteil dieses Promotors ist, dass er erst relativ spät in der Entwicklung der Maus seine maximale Aktivität entfaltet. Dadurch wäre eine vollständige Ausschaltung von Plasmafibronektin in den konditionellen Knockoutmäusen erst in einem Alter von 8-12 Wochen erreicht [3, 302-304]. Als ein weiterer Nachteil des Alb-Promotors ist die im Vergleich zum Mx-Promotor geringere reprimierende Wirkung bezüglich des Plasmafibronektins zu werten [77]. Infolgedessen kam in der vorliegenden Arbeit der zweite Promotor, der in den Hepatozyten aktiv ist, der Mx-Promotor zum Einsatz, da er nicht nur von seinen reprimierenden Eigenschaften und der Induzierbarkeit, sondern auch wegen seiner Aktivität in den hämatopoetischen Kompartimenten [305, 306] für das geplante Versuchsvorhaben die geeignetsten Voraussetzungen aufwies. Die geringe Spezifität und die damit verbundene stark variable Aktivität in unterschiedlichen Organen ist durchaus als Nachteil des Mx-Promotors zu werten, jedoch überwiegen die zuvor genannten Vorzüge für die experimentelle Anwendung.

Die Ausschaltung des Plasmafibronektins unter Verwendung der MxCre-Linie zeigte, dass bereits 48 Stunden im Anschluss an die Induktion des Mx-Promotors der Fibronektin Gehalt im Blutplasma um ca. 90% reduziert war. Dieser Ausschaltungsgrad konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum aufrecht erhalten werden. Zudem wurde durch die Ausschaltung des Plasmafibronektins eine Reduktion des Fibronektin Gehalts im Knochenmark um mehr als 89% erreicht. Diese Daten stehen im Einklang mit Publikationen, die gezeigt haben, dass die MxCre vermittelte Fibronektin-Ausschaltung bezogen auf die Leber (Hepatozyten) vollständig und für wenigstens 8 Monate stabil war [3]. Es wurde berichtet, dass die vollständige Induktion des Mx-Promotors bereits drei Tage im Anschluss an die ersten pl-pC Applikationen erlangt war [3]. Dies stimmt mit der 21-stündigen Halbwertszeit von Plasmafibronektin überein [291].

IV.1.3.1.1. Einfluss des zirkulierenden und des Knochenmark-Fibronektins auf das *Homing* der Tumorzellen

Unsere Untersuchungen zeigen, dass durch die Ausschaltung des Plasma- bzw. des Knochenmark-Fibronektins die Infiltrationseigenschaften der innokulierten Tumorzellen zu ihrem Zielorgan, dem Knochenmark, vermutlich nicht beeinträchtigt waren. Als Hinweis diente die mittels Biolumineszenz-Bildgebung nachgewiesene Anzahl gebildeter Metastasen 3-6 Wochen nach der Applikation der Tumorzellen. Mx-Knockouts zeigten im Vergleich zu den Kontrollen, bezogen auf die Anzahl der etablierten Tumore, keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Das metastatische Nischen-Modell geht davon aus, dass eine für die Einnistung und Proliferation geeignete Mikroumgebung vor der eigentlichen Ankunft metastasierender Tumorzellen entsteht. Einen wichtigen Bestandteil dieser Mikroumgebung stellt Fibronektin dar, welches offenbar vor dem Eintreffen der Tumorzellen vermehrt in die extrazelluläre Matrix eingelagert wird [103]. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete MxCre-Metastasierungsmodell diente der Untersuchung der Auswirkungen der Fibronektin-Deletion im Bereich der vaskulären Nische auf den metastatischen Prozess der Zirkulation, der Extravasation und der Kolonisierung des Knochengewebes. Die Verifizierung der Injektion zeigte, dass schon 60 Minuten im Anschluss an die Inokulation der Tumorzellen eine diffus über den Körper der Maus verteilte Photonenanhäufung nachgewiesen werden konnte. Vermutlich wurden diese Photonen von Tumorzellen emittiert, die noch nicht aus den Blutgefäßen in das Knochengewebe eingewandert waren. Eine alternative Erklärung wäre auch, dass sich heterotypische Tumorzellaggregate zunächst in den Kapillaren des Knochengewebes festsetzen, lokal zu proliferieren beginnen, die Kapillarwand zerstören und anschließend das lokale Parenchym erschließen [128, 129]. Ebenfalls wäre es möglich, dass Tumorzellen im Anschluss an die Adhäsion des Gefäßendothels einige Zeit verharren, bevor sie in das lokale Gewebe eindringen. Es scheint denkbar, dass zirkulierende Tumorzellen zunächst vereinzelt das Knochengewebe infiltrieren und die prämetastatische Nischenbildung initiieren, indem sie ver-

mehrt Fibronectin und andere Faktoren sezernieren. Folglich würden diese Tumorzellen die prämetastatische Nische für die Besiedelung weiterer Tumorzellen vorbereiten und somit die Tumorbildung fördern. Für diese Hypothese spricht auch, dass Studien in immundefizienten Mäusen gezeigt haben, dass das neu synthetisierte Fibronectin im Bereich der metastatischen Nische zumindest teilweise von den Tumorzellen stammt [103, 239]. Darüber hinaus würde dieser Interpretationsansatz unsere Beobachtungen an Fibronectin-Knockoutmäusen bestätigen, die zeigten, dass die Ausschaltung von Fibronectin im Bereich der vaskulären Nische wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Infiltrationsfähigkeiten und somit auf das metastatische Potential zirkulierender Tumorzellen hatte. Im Gegensatz dazu resultierte die Ausschaltung von Tumorzell-Fibronectin im Vergleich zu den Kontrollen in einer signifikant reduzierten Anzahl gebildeter Tumore. Dies könnte als ein weiterer Hinweis interpretiert werden, dass zirkulierende Tumorzellen die prämetastatische Nischenbildung durch die Sezernierung von Fibronectin initiieren und auf diese Weise die Tumorbildung fördern.

Unseren Daten nach zu urteilen ist eine erhöhte lokale und nischenspezifische Expression von Tumorzell-Fibronectin im Hinblick auf die Initiierung der Nischenbildung wahrscheinlicher. Hierbei bleibt anzumerken, dass anhand der Untersuchungen an Fibronectin-Knockoutmäusen der Einfluss auf die *Homing*-Eigenschaften von Fibronectin, welches von Fibroblasten und anderen nicht ausgeschalteten Zellen in die extrazelluläre Knochenmatrix eingelagert wurde, nicht beurteilt werden konnte. In diesem Zusammenhang wäre eine vollständige Deletion von Fibronectin aller fibronectinproduzierenden Zellen im Knochenmark notwendig. Dieser Nachweis ist nach dem derzeitigen Stand der Forschung jedoch noch nicht möglich. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein gewisser Fibronectin-Grenzwert der Knochenmatrix das *Homing* zirkulierender Tumorzellen beeinträchtigt und dass die verbleibende Restmenge an Fibronectin im Knochenmark (10%) der konditionellen Mx-Mäuse ausreicht, um genügend Fibronectin in der zukünftigen Nische bereitzustellen.

IV.1.3.1.2. Einfluss des Knochenmark-Fibronectins auf das Wachstum von Tumoren

Obwohl die Infiltrationsfähigkeiten zirkulierender Tumorzellen in Fibronectin-Knockouttieren nicht beeinträchtigt waren, konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass Fibronectin der Mikroumgebung das Wachstum von Tumoren beeinträchtigt. Im zeitlichen Verlauf konnte mittels Biolumineszenz-Bildgebung nachgewiesen werden, dass sowohl die Gesamttumorbelastung je Maus als auch die Tumorlast pro Metastase der Fibronectin-Knockouttiere stark vermindert war. Dies äußerte sich im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen in einem durchschnittlich um 2 Wochen verlängerten Überleben der Tiere.

Wenngleich konditionelle Knockouttiere im Mittel 2 Wochen nach den Kontrolltieren getötet wurden, war die durchschnittliche Fläche lytischer Läsionen je Metastase in Abwesenheit von Fibronectin im Knochenmark und in der Blutbahn signifikant niedriger. Metastatische Tumorzellen selbst können den Knochen nicht angreifen, setzen aber zahlreiche Faktoren (PTHrP, IL-6, IL-11 und TNF- α) frei, die letztendlich Osteoklasten aktivieren und die Degradation der Knochensubstanz vorantreiben. Durch den osteoklastenvermittelten Knochenabbau werden wiederum Wachstumsfaktoren wie TGF- β freigesetzt, die die Proliferation der Tumorzellen fördern [202, 217, 222, 223]. TGF- β stimuliert die Expression von PTHrP [222, 307] und setzt somit einen Kreislauf in Gang, der das Fortschreiten des osteolytischen Tumorwachstums zusätzlich verstärkt [182]. Es konnte gezeigt werden, dass Fibronectin sowohl für den Einbau von TGF- β in die extrazelluläre Matrix notwendig ist [78], als auch dessen Aktivierung reguliert [81]. Es stellte sich daher die Frage, ob eine fibronectinreiche Mikroumgebung die Tumorzellen zur Freisetzung dieser Faktoren stimuliert. Demzufolge könnte die geringere Fläche osteolytischer Läsionen je Metastase und das eingeschränkte Tumorwachstum im Zusammenhang mit der reduzierten Zytokin-Freisetzung in Abwesenheit von Fibronectin im Knochenmark stehen. Die Klärung dieses Zusammenhangs bedarf weiterer Untersuchungen.

IV.1.3.1.3. Einfluss des Knochenmark-Fibronectins auf die Angiogenese

Die Ausschaltung des Plasmafibronectins und die Reduktion der Gesamtfibronectinmenge im Knochenmark um mehr als 89% waren mit einer Abnahme der mikrovaskulären Gefäßdichte der Tumore assoziiert. Tumorgewebe, welches aus Fibronectin-Knockouttieren isoliert wurde, wies bis zu einem Drittel weniger Blutgefäße auf. Demnach könnte das verlangsamte Tumorwachstum mit einer verminderten angiogenen Aktivität begründet werden.

Die induktive Formation neuer Blutgefäße ist der wichtigste Schritt, um die essentielle Versorgung des wachsenden Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten [139, 150]. Während des Prozesses der Angiogenese beginnen Endothelzellen auf Reaktion bestimmter, von den Tumorzellen sezernierter Faktoren, entlang der extrazellulären Matrix zu migrieren. Einer der Hauptfaktoren für die Initiierung und die Regulation der Gefäßneubildung ist VEGF, der von hypoxischen Tumorzellen vermehrt sezerniert wird [157, 160]. Hypoxische Bedingungen führen zu einer Verminderung des extrazellulären pH-Wertes, und es konnte gezeigt werden, dass die Interaktionen zwischen VEGF und Fibronectin bei saurem pH zunehmen [159, 160]. Es wurde vorgeschlagen, dass VEGF in Bereichen mit niedrigem pH-Wert aufgrund der erhöhten Bindung an Fibronectin in die extrazelluläre Matrix eingelagert wird. Auf diese Weise könnte der saure extrazelluläre pH-Wert zur gesteigerten VEGF-Speicherung in hypoxischen Arealen mit hohem vasikulärem Bedarf beitragen. Es konnte nachgewiesen werden, dass VEGF, welches an die Matrix gebunden war und anschließend dissoziierte, seine biologische Aktivität beibehält und dazu im-

stande war, Endothelzellen zu stimulieren [159]. Der Definition nach befinden sich hypoxische Bereiche nicht in der unmittelbaren räumlichen Nähe zu existenten Blutgefäßen. Dementsprechend sind die endothelialen Zielzellen nicht in der direkten Umgebung des sezernierten VEGF lokalisiert. Folglich könnte dieses Matrix-Speichersystem zur Erzeugung eines VEGF-Konzentrationsgradienten durch die reversible Bindung von VEGF an Matrix-Fibronectin beitragen [159]. Obwohl die Gesamtmenge des in der extrazellulären Matrix gespeicherten VEGF in Richtung bestehender Blutgefäße abnimmt, würde die relative Verteilung von VEGF, welches in einer aktiven versus gebundenen Form vorliegt, zunehmen. Insofern könnten Schwellenwertkonzentrationen des aktiven VEGF die Angiogenese initiieren und die zielgerichtete Sprossung und das Wachstum der Blutgefäße in Richtung höherer VEGF-Konzentrationen bewirken [159]. Erschließen neue Blutgefäße Areale mit niedrigem pH-Wert und hohem gebundenem VEGF-Gehalt, steigt der pH-Wert in diesen Bereichen, gebundenes VEGF wird freigesetzt und stimuliert zusätzlich die zielgerichtete Migration und das Wachstum neuer Blutgefäße [159]. Aufgrund dessen könnte die Abwesenheit von Fibronectin im Knochenmark die Einlagerung von VEGF in die extrazelluläre Matrix und somit das zielgerichtete Wachstum und die Migration neuer Blutgefäße erschweren.

Des Weiteren vermittelt Fibronectin, welches in gebundener Form innerhalb der Knochenmarkmatrix vorliegt, über Interaktionen mit Transmembranrezeptoren (z.B. Integrine) der Endothelzellen deren Haptotaxis [169]. Es bleibt anzumerken, dass Endothelzellen selbst dazu in der Lage sind, Fibronectin zu synthetisieren und dieses in die extrazelluläre Matrix einzulagern [167, 168]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die migrierende Spitzenzelle des wachsenden Gefäßsprosses Fibronectin sezerniert, welches zusammen mit dem Fibronectin der extrazellulären Matrix als eine Art adhäsiver Gradienten für nachfolgende Endothelzellen dient [163, 165, 166]. Vor diesem Hintergrund erscheint es denkbar, dass die Reduktion des Fibronectins der Knochenmarkmatrix die Migrationsfähigkeiten der Endothelzellen einschränkt, da potentielle Bindungsstellen fehlen. Dies wäre eine weitere mögliche Erklärung für die beobachtete verringerte Angiogenese und das eingeschränkte Tumorstadium in Abwesenheit von Fibronectin.

Ferner sind Endothelzellen sehr empfänglich für apoptotische Signale, wenn sie den Kontakt zu benachbarten Zellen oder der extrazellulären Matrix verlieren. Fibronectin ist in der Lage, über zahlreiche Bindungsstellen mit Integrinrezeptoren zu interagieren. Dabei könnten Signaltransduktionswege initiiert werden, die in der Folge antiapoptotisch wirken und die Proliferation und das Überleben der Zellen sichern [74, 308, 309]. Ein Unterbinden dieser notwendigen Wechselwirkungen kann zum Erliegen des Zellzyklus führen und die Apoptose einleiten. Das wurde dadurch bestätigt, dass die Bindung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ an Fibronectin Endothelzellen vor dem kontrollierten Zelltod bewahrt [308]. Zudem leitete die Inhibierung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ in angiogenen Gefäßen die Apoptose der Endothelzellen ein [309]. In einer weiteren Studie konnte außerdem eine antiapoptotische Funktionsweise von zirkulierendem Fibronectin nachgewiesen

werden. Mäuse, denen experimentell eine Ischämie im Gehirn erzeugt wurde, wiesen in Abwesenheit von zirkulierendem Fibronectin größere nekrotische Bereiche auf als die entsprechenden Kontrolltiere. Die Autoren schlussfolgerten ebenfalls, dass zirkulierendes Fibronectin über Interaktionen mit Integrinen und der daraus resultierenden Aktivierung interner Signaltransduktionswege die Zellen vor der Apoptose bewahrt [3, 75]. Demnach könnten die Deletion des zirkulierenden Fibronectins und dem damit einhergehenden reduzierten Fibronectingehalt der Knochenmarkmatrix zu einem erhöhten Absterben angiogener Endothelzellen führen. Das würde die verringerte mikrovaskulären Gefäßdichte und das daraus resultierende eingeschränkte Tumorwachstum erklären.

IV.1.3.2. Einfluss von Fibronectin der osteoblastischen Nische auf die frühe Entwicklung von Knochenmetastasen

Ähnlich wie hämatopoetische Stammzellen, die im Knochenmark in einer speziellen Mikroumgebung residieren, scheinen auch Krebszellen während des Metastasierungsprozesses besondere Nischen im Knochenmark aufzusuchen. Osteoblasten-Subtypen nehmen in der Zusammensetzung der Stammzellnische eine tragende Rolle ein [231, 239, 310]. Dabei konstruieren Osteoblasten einerseits eine unterstützende Mikroumgebung, andererseits bewirken sie, dass die Stammzellen ihre Stammzeleigenschaften behalten und sich nicht weiter differenzieren [229-231]. Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Osteoblasten in Mäusen einen erheblichen Rückgang der Anzahl an lymphoiden, erythroiden und myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark zur Folge hatte, gefolgt von der Abnahme der absoluten Anzahl hämatopoetischer Stammzellen und einer reduzierten zellulären Knochenmarksstruktur [311]. Diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass Osteoblasten eine wichtige Rolle bei der Bestandhaltung der Stammzellen sowie der Regulation der Hämatopoese (Bildung der Blutzellen) einnehmen. Osteoblasten sezernieren eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, wie RANKL, der eine essentielle Rolle bei der Differenzierung von Osteoklasten einnimmt [312, 313]. Darüber hinaus interagieren Tumorzellen auf vielfältige Weise mit Osteoblasten und es wird vermutet, dass Osteoblasten bzw. die osteoblastische Nische eine wichtige Rolle bei der Metastasierung spielt. Verschiedene Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass humane Tumorzellen Faktoren sezernieren, die Osteoblasten zur Expression von RANKL stimulieren und schließlich die Degradation der Knochenmatrix durch aktivierte Osteoklasten verursachen [202, 217, 222, 223]. Diese Modulation der Mikroumgebung und die dabei freigesetzten Wachstumsfaktoren sind ausschlaggebend für die erfolgreiche Etablierung und das Wachstum von Knochenmetastasen.

Es konnte gezeigt werden, dass Fibronectin im Bereich der prämetastatischen Nische vor der Ankunft zirkulierender Tumorzellen vermehrt gebildet wird [103]. Vermutlich initiiert Fibronectin in diesem Zusammenhang die zelluläre Clusterformation und somit die Nischenbildung. Zusätzlich

stellt Fibronectin attraktive Bindungsstellen für disseminierte Tumorzellen bereit [103, 208]. Es war bekannt, dass Osteoblasten Fibronectin während der Proliferation und Differenzierung sezernieren [314]. Um einen möglichen Effekt von osteoblastenspezifischem Fibronectin auf den Metastasierungsprozess zu untersuchen, wurden konditionelle Knockoutmäuse verwendet. In der Literatur finden sich unterschiedliche Promotoren, über die die Ausschaltung eines geflochten Gens in Osteoblasten erreicht werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde Osteoblasten-Fibronectin unter Verwendung des 2,3 Kb $\alpha_1(I)$ Kollagen-Promotors (Col-Promotor) deletiert [315]. Im Gegensatz zu verschiedenen Osteokalzin-Promotoren, die die Cre vermittelte Rekombination zum Teil nur schwach aktivieren [278] und erst in der späten Reifephase der Osteoblasten aktiv werden [316], werden Fibronectin und Kollagen Typ I bereits in den frühen Entwicklungsstadien der Osteoblasten exprimiert [314]. Aus diesem Grund erschien die Verwendung des Col-Promotors für das geplante Versuchsvorhaben besonders aussichtsreich. Ein weiterer Promotor, der von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde, ist der 3,6 Kb $\alpha_1(I)$ Kollagen-Promotor. Jedoch ist dieser weniger spezifisch und wird neben den Osteoblasten auch in Knorpelzellen, Fibroblasten sowie in Zellen der Sehnen und der Haut aktiviert [317, 318]. Der 2,3 Kb $\alpha_1(I)$ Kollagen-Promotor führte hingegen zu einer stringenten Expression der Cre Rekombinase in Osteoblasten und somit konnte ein möglicher Effekt von Osteoblasten-Fibronectin auf die Metastasierung einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden. In einer veröffentlichten Publikation unserer Arbeitsgruppe konnte die Spezifität des verwendeten Col-Promotor, sowie die Ausschaltung des Osteoblasten-Fibronectins bestätigt werden [77].

Die Zusammensetzung der osteoblastischen Nische wird allerdings kontrovers diskutiert. Es wurde vorgeschlagen, dass Prä-Osteoblasten diese Nische bilden [319, 320]. Diese Annahme steht im Gegensatz zu der in dieser Arbeit gefundenen möglichen Beeinträchtigung der osteoblastenspezifischen Fibronectin-Ausschaltung auf die frühen Entwicklungsstadien der Tumore. Der verwendete Col-Promotor führte zu einer ausreichenden Repression des Fibronectins in differenzierenden Osteoblasten [77], aber nicht der Prä-Osteoblasten. Demzufolge beruhte der in dieser Arbeit beobachtete Effekt auf die frühe Tumorentwicklung auf der Ausschaltung von Fibronectin in differenzierenden Osteoblasten. Das unterstützt die Annahme, dass die osteoblastische Nische zumindest teilweise von reifen Osteoblasten gebildet wird.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die osteoblastenspezifische Deletion von Fibronectin vermutlich die frühen Entwicklungsstadien der Tumore beeinträchtigte. Obwohl Mäuse, deren Fibronectin-Gen osteoblastenspezifisch inaktiviert wurde, 3 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen eine signifikant niedrigere Anzahl an Metastasen aufzeigten, konnte dieser Unterschied bereits 4 Wochen nach der Inokulation der Tumorzellen nicht mehr festgestellt werden. Aufgrund dessen ist ein Effekt von Osteoblasten-Fibronectin auf die *Homing*-Eigenschaften der Tumorzellen eher unwahrscheinlich und die beobachteten Resultate sind vermutlich auf eine Beeinflussung der frühen Entwicklungsstadien der Tumore zurückzuführen. Diese Annahme wird

durch eine zeitversetzte Betrachtungsweise der ermittelten Biolumineszenzdaten gestützt. Mäuse, deren Fibronectin-Gen osteoblastenspezifisch inaktiviert wurde, zeigten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen einen mittleren Überlebensvorteil von einer Woche. Wurde die Anzahl der etablierten Tumore zeitversetzt um eine Woche betrachtet, konnte kein Unterschied bezüglich der Tumoranzahl ermittelt werden (III.2.2.2.; Abb. III.18) . Ebenfalls konnte keine signifikante Abweichung erfasst werden, wenn das Tumorwachstum um eine Woche phasenverschoben betrachtet wurde. Osteoblastenspezifisches Fibronectin beeinflusste offenbar die frühen Entwicklungsstadien der Tumore. War das Tumorwachstum jedoch erst einmal im Gange, konnte, bezogen auf die Tumorprogression, kein Unterschied mehr festgestellt werden. Dementsprechend zeigten Tumoren, die aus Knockouttieren stammten, deren Osteoblasten-Fibronectin deletiert worden war, im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen keine Varianz bezüglich der mikrovaskulären Gefäßdichte. Hierbei bleibt anzumerken, dass das für die Untersuchung verwendete Tumorgewebe direkt im Anschluss an die Tötung entnommen wurde und somit Tiere, deren Osteoblasten-Fibronectin zuvor deletiert worden war, aufgrund der verlängerten Überlebensraten durchschnittlich 1 Woche nach den Kontrolltieren sakrifiziert wurden. Infolgedessen war der Entwicklungsstand der Tumore und somit die Angiogenese erwartungsgemäß identisch. Möglicherweise würde die zeitgleiche Probenentnahme Unterschiede bezüglich der mikrovaskulären Gefäßdichte aufzeigen.

Vorausgegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass die osteoblastenspezifische Ausschaltung von Fibronectin im Mausmodell die Funktion und die Anzahl der Osteoblasten im Knochen beeinflusste. Die beeinträchtigte Funktion der fibronectindeletierten Osteoblasten war sowohl auf einen verlängerten Zeitraum, der für die Mineralisierung des abgelagerten Osteoids (noch nicht mineralisierte Matrix des Knochengewebes) benötigt wurde, als auch auf eine verminderte Knochenbildungsaktivität pro Osteoblastenkollektiv zurückzuführen. Obwohl eine erhöhte Osteoblastenzahl in den konditionellen Knockoutmäusen der ColCre-Linie nachgewiesen wurde, konnten in Abwesenheit des Osteoblasten-Fibronectins sowohl eine erhöhte Proliferation als auch verminderte Apoptoseraten der Osteoblasten ausgeschlossen werden. Infolgedessen wurde als mögliche Erklärung eine verlangsamte Differenzierung der Osteoblasten in Betracht gezogen [77]. Die eingeschränkte Funktionsweise der Osteoblasten könnte eine Erklärung für den in dieser Arbeit beobachteten Effekt von Osteoblasten-Fibronectin auf die Metastasierung liefern. Tumorzellen, die das Knochengewebe infiltriert haben, sezernieren diverse Faktoren, die stimulierend auf Osteoblasten wirken [218]. Letztere unterstützen ihrerseits die Bildung aktivierter Osteoklasten und durch die daraus resultierende Degradation der Knochenmatrix werden für das Tumorwachstum notwendige, immobilisierte Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt [182]. Möglicherweise hat die verlangsamte Differenzierung bzw. die eingeschränkte Funktion der Osteoblasten in Abwesenheit von osteoblastenspezifischem Fibronectin Auswirkungen auf die Aktivierung der Osteoklasten. Dementsprechend könnte der beobachtete Effekt von

Osteoblasten-Fibronectin auf die frühe Entwicklung der Tumore auf einer verringerten Freisetzung immobilisierter Wachstumsfaktoren durch aktivierte Osteoklasten beruhen.

Vermutlich benötigen Tumorzellen für die Initiierung der Proliferation stimulierende Einflüsse eines benachbarten Osteoblasten/Osteoklasten-Kollektivs, um die Transition von der Mikrometastase zur Makrometastase zu vollziehen, welche durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren in der unmittelbaren Nähe einer Mikrometastase gestützt wird. Dies deckt sich mit klinischen und experimentellen Beobachtungen, die hohe Gesamtumsatzraten des Knochens (engl. „bone turnover“) mit der vorrangigen Entwicklung hämatogener Metastasen an Orten aktiver Knochenremodellierung korrelierten [321, 322]. Daher bietet die eingeschränkte Osteoblasten/Osteoklasten-Wirkungsweise in unserem Modell eine mögliche Erklärung für die anfängliche Verzögerung des Tumorwachstums.

Vorangegangene Experimente unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass Fibronectin der Blutzirkulation den Effekt von osteoblastenspezifischem Fibronectin auf die Funktionalität der Osteoblasten nicht kompensieren konnte. Das deutet auf unterschiedliche Funktionsweisen der verschiedenen Isoformen hin. Tatsächlich sezernieren Osteoblasten Fibronectin, welches die Domänen EDA und EDB enthält [323]. Plasmafibronektin beinhaltet diese Domänen üblicherweise nicht [1]. Es scheint denkbar, dass osteoblastenspezifische Fibronectin-Isoformen in einer Art Rückkopplungsschleife lokal die Differenzierung der Osteoblasten modulieren. So konnte nachgewiesen werden, dass EDA⁺ Fibronectin die Zellausbreitung und die Progression des Zellzyklus unterstützt [31, 32]. EDA-haltiges Fibronectin kann die Zelladhäsion [29] sowie die Motilität von Tumorzellen erhöhen [30]. Außerdem stimuliert die erhöhte Bindungsaffinität der EDA-Domäne zu dem Fibronectin-Rezeptor $\alpha_5\beta_1$ das Fortschreiten des Zellzyklus, indem intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert werden. Da Tumorzellen selbst dazu in der Lage sind, zelluläres Fibronectin zu sezernieren, welches die Domänen EDA und EDB enthält [30] scheint es denkbar, dass tumorzellspezifisches Fibronectin den Einfluss des deletierten Osteoblasten-Fibronectins zu einem späteren Entwicklungsstadium kompensiert. Eine ausführliche histomorphometrische Untersuchung könnte dazu beitragen, diese Frage zu beantworten. Es bleibt anzumerken, dass bei dieser Betrachtungsweise der Effekt einer möglichen Abweichung der Fibronectin-Menge, die auf Osteoblasten wirkt, nicht berücksichtigt wird.

IV.1.4. Die Rolle des Tumorzell-Fibronektins bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren

IV.1.4.1. Ausschaltung des Tumorzell-Fibronektins

Um einen Effekt von Tumorzell-Fibronektin auf den Metastasierungsprozess nachzuweisen, wurde zunächst die endogene Fibronektinexpression der Tumorzellen mittels RNA-Interferenz unterbunden. Im Gegensatz zur transienten Transfektion von siRNA, die eine Protein-Suppression über einen relativ kurzen Zeitraum mit gradueller Reduktion der Inhibition bewirkt, ermöglicht die Verwendung des shRNA-Mechanismus eine stabile und langfristige Proteinausschaltung auf einem konstanten Niveau [285-287]. Der Nachweis der Deletion des Tumorzell-Fibronektins erfolgte mittels ELISA. Kulturmedium-Überstände und Tumorzelllysate wurden auf ihren Fibronektin Gehalt hin untersucht. Dabei wurde ein Ausschaltungsgrad der endogenen Fibronektinexpression von mehr als 97% nachgewiesen, der über mehrere Monate stabil war. *In vitro* konnte mittels Biolumineszenz aufgezeigt werden, dass die Luciferaseaktivität der transduzierten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen unverändert war. Das ist für die folgende experimentelle Quantifizierung der Biolumineszenz-Signale im Metastasierungsmodell von außerordentlicher Relevanz. Unterschiede bezüglich der Luciferase-Expression würden bei der experimentellen Anwendung zu fälschlichen Resultaten führen, und in der Folge wäre ein Vergleich des Tumorwachstums nicht durchführbar.

IV.1.4.2. Die Bedeutung des Tumorzell-Fibronektins bei der Metastasierung

IV.1.4.2.1. Einfluss von Tumorzell-Fibronektin auf das *Homing* der Tumorzellen

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Ausschaltung des Tumorzell-Fibronektins vermutlich einen Einfluss auf das *Homing* von Tumorzellen zu ihrem Zielorgan, dem Knochenmark, hat. Die Deletion des tumorzellspezifischen Fibronektins führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl etablierter Knochenmetastasen. Durchschnittlich war die Anzahl induzierter Tumore in Abwesenheit von Tumorzell-Fibronektin um mehr als 70% verringert. Infolgedessen war die Gesamttumorbelastung der über den Beobachtungszeitraum entstandenen Metastasen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen um ein Vielfaches niedriger.

Obwohl die Ausschaltung der endogenen Fibronectinexpression keine Auswirkungen auf die Morphologie der Tumorzellen hatte (Abb. III.29), waren die Zelladhäsionsfähigkeiten der Tumorzellen zu unterschiedlichen extrazellulären Matrixmolekülen wie Laminin-1 und Kollagen (I, III, IV) in Abwesenheit von Tumorzell-Fibronectin signifikant niedriger. Im Knochenmark werden 3 der 15 Lamininisoformen exprimiert. Hierbei handelt es sich um die extrazellulären Matrixbestandteile Laminin-211 (Laminin-2 bzw. $\alpha 2\beta 1\gamma 1$), Laminin-411 (Laminin-8 bzw. $\alpha 4\beta 1\gamma 1$) und Laminin-511 (Laminin-10 bzw. $\alpha 5\beta 1\gamma 1$) [324]. Für die Tumorzellanhaftung ist insbesondere die Rolle des Laminin-511 hervorzuheben. Es konnte nachgewiesen werden, dass Tumorzellen der MDA-MB-231-Linie über die Interaktionen mit α_3 -Integrinen an Laminin-511 binden [325]. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass eine reduzierte Zelladhäsion der fibronectindeletierten Tumorzellen an Laminin im Knochenmark die Ursache für die Verminderung des *Homings* war. Auch unterstützt Laminin-511 die Degradation der extrazellulären Matrix mittels MMP-9, und es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Integrins $\alpha_3\beta_1$ bei diesen Prozessen eine Rolle spielt [326]. Somit könnte eine verringerte Expression dieses Integrins ein reduziertes Wachstum der MDA-Kd-Tumore zur Folge haben. Nach Bestätigung der Verminderung der Adhäsion der MDA-Kd-Linie zu Laminin-511 würde die Analyse der Expression und die Charakterisierung der Aktivität des Integrins $\alpha_3\beta_1$ der Tumorzelllinie MDA-CT im Vergleich zu MDA-Kd dazu beitragen, die Rolle dieses Integrins bezüglich der Metastasierung zu klären.

Die im Blutkreislauf zirkulierenden Tumorzellen sind blutstromverursachenden Scherkräften sowie mechanischen Belastungen durch die Kollision mit anderen zirkulierenden Zellen oder Blutgefäßwänden ausgesetzt. Die Tumorzellen können auch beim Durchqueren enger Kompartimente der Zirkulation oder durch Abwehrmechanismen des Immunsystems geschädigt werden. Infolgedessen erzeugen unter physiologischen Bedingungen weniger als 1% der Tumorzellen, die in den Blutkreislauf eintreten, Metastasen [119-123]. Für die experimentelle Anwendung bedeutet das, dass eine vergleichsweise hohe Anzahl an Tumorzellen (10^5) in die Blutzirkulation eingebracht werden muss, um eine erfolgreiche Metastasierung zu erreichen. In der Literatur finden sich in diesem Zusammenhang zahlreiche Hinweise [200, 280, 283, 327]. Wie es scheint, sind zirkulierende Tumorzellen dazu in der Lage, heterotypische Aggregate mit Thrombozyten und/oder Leukozyten zu bilden [124, 125], aber auch homotypische, einzig aus Tumorzellen bestehende Aggregate sind möglich [126, 127]. Einerseits dient die Aggregation dazu, den negativen Faktoren der Blutzirkulation zu entgehen, andererseits können sich diese Mikroemboli in Kapillaren diverser Organe festsetzen und somit die Extravasation erleichtern. Zusätzlich können diese Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten die Adhäsion an mikrovaskuläres Endothel der Zielorgane und somit die Metastasierung begünstigen [130]. Thrombozyten exprimieren den Integrin-Rezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$, der die RGD-Sequenz von Fibronectin erkennt [125, 131]. Es konnte gezeigt werden, dass gegen Fibronectin gerichtete Antikörper die Bindungsfähigkeit von Tumorzellen an Thrombozyten *in vitro* herabsetzen. Demzufolge wäre es denkbar, dass die Deletion des Tumorzell-Fibronectins die Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozy-

ten herabsetzt und sich somit negativ auf das Überleben der Tumorzellen in der Blutzirkulation auswirkt. Tumorzellen sind dazu in der Lage, homotypische Aggregate bzw. Komplexe mit Leukozyten zu bilden [124-127], die ähnliche Aufgaben übernehmen können. Zusätzlich könnte die Extravasation der Tumorzellen in das Knochenmark erschwert sein, da gezeigt werden konnte, dass synthetische Peptide die Fibronektin-Zellinteraktionen inhibierten die Adhäsion von Tumorzellen an Blutgefäße beeinträchtigten [328]. Außerdem zeigen *in vivo* Daten, dass Antikörper, die gegen einen thrombozytenspezifischen Adhäsionsrezeptor für Fibronektin, den Von-Willebrand-Faktor und Fibrinogen gerichtet waren, die Metastasierung herabsetzen [125]. Bestätigend setzte die Ausschaltung von Fibrinogen ebenfalls die Metastasierung von Zelllinien, die Lungenkarzinome und Melanome verursachten, herab [329]. Da zirkulierendes Fibronektin bei der Gerinnung zur Stabilität des Thrombus beiträgt [86, 87], wäre es denkbar, dass in Abwesenheit von Fibronektin die Tumorzellaggregate weniger stabil und somit anfälliger für mechanische Belastungen und/oder immunzellvermittelte Destruktionen sind.

Eine weitere mögliche Erklärung liefern Erkenntnisse, die zu der Formulierung der Hypothese des prämetastatischen Nischenmodells geführt haben. Alle diese Veröffentlichungen sowie unsere eigenen Untersuchungen weisen darauf hin, dass vor der eigentlichen Ankunft metastasierender Tumorzellen eine für die Einnistung und Proliferation geeignete Mikroumgebung entsteht und das Fibronektin dabei eine wichtige Rolle einnimmt [103]. Entgegen der in der Literatur verbreiteten Annahme, dass Fibronektin im Bereich der prämetastatischen Nische von Stromazellen sezerniert wird, lieferte diese Arbeit erste Hinweise darauf, dass zirkulierenden Tumorzellen das Nischenfibronektin in die extrazelluläre Matrix einlagern und auf diese Weise den Metastasierungsprozess begünstigt. Diese Vermutung würde eine Erklärung für die verminderten Infiltrationseigenschaften der fibronektindeletierten Tumorzellen und somit für die reduzierte Anzahl etablierter Knochenmetastasen liefern. Möglicherweise hatte die Ausschaltung des tumorzellspezifischen Fibronektins inhibierende Auswirkungen auf die initiiierenden Schritte der prämetastatischen Nischenbildung. Einerseits könnte die Abwesenheit von Tumorzell-Fibronektin die für die Nischenbildung notwendige Zellclusterformation negativ beeinflussen. Andererseits stellt Fibronektin zusätzlich attraktive Bindungsstellen für disseminierte Tumorzellen bereit [103, 208], deren Fehlen die Infiltration von Tumorzellen herabsetzen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimierten Integrins $\alpha_4\beta_1$ an Fibronektin eine erhöhte Expression von Matrixmetalloproteasen zur Folge hatte. In diesem Zusammenhang kommt es zur Modifizierung der lokalen Mikroumgebung und in der Folge zur Degradation der Basalmembran. Diese Vorgänge begünstigen das Einwandern zirkulierender Tumorzellen, und somit könnte die Abwesenheit von Tumorzell-Fibronektin den Metastasierungsprozess erschweren. Ebenfalls wird diese Annahme von der Tatsache gestützt, dass die Deletion von Fibronektin im Bereich der vaskulären Nische keinen Einfluss auf die Anzahl der etablierten Tumore hatte.

Vor kurzem konnte nachgewiesen werden, dass das von Tumorzellen exprimierte Enzym Lysyloxidase (LOX) die Metastasierung steigert [256]. Dabei nimmt LOX eine wichtige Rolle bei der Etablierung der metastatischen Nische im Zielorgan ein, indem es Bestandteile der extrazellulären Matrix dahingehend modifiziert (z.B. durch Quervernetzung von Kollagenfibrillen), dass die Infiltration myeloider Zellen begünstigt wird [239, 253]. Es wurde vermutet, dass die Kolo-kalisation von Fibronektin und Lysyloxidase dabei eine wichtige Rolle einnimmt [239], indem Fibronektin unter anderem die Effektivität der Lysyloxidase steigert [239, 258]. Somit könnte das nachgewiesene geringere metastatische Potential der fibronektindeletierten Tumorzellen und die damit verbundene vielfach niedrigere Anzahl an etablierten Knochentumoren auf der eingeschränkten Fähigkeit der Tumorzellen beruhen, die prämetastatische Nischenbildung in Abwesenheit von Tumorzell-Fibronektin zu initiieren.

IV.1.4.2.2. Einfluss von Tumorzell-Fibronektin auf das Wachstum der Tumore

In unseren Experimenten war nicht nur die Zahl der Tumorherde vermindert, sondern es konnte in dieser Arbeit auch erstmalig gezeigt werden, dass Tumorzell-Fibronektin das Wachstum von Tumoren beeinträchtigte. Die Tumormast je Metastase, als Parameter der Tumorprogression, war bei fibronektindeletierten Tumoren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant niedriger. Das führte im Anschluss an die Inokulation der fibronektindeletierten Tumorzellen zu einer Verlängerung des durchschnittlichen Überlebenszeitraumes um mehr als 11 Wochen. Die eingeschränkte Tumorprogression war vermutlich auf eine verminderte Blutgefäßbildung zurückzuführen. Die mikrovaskuläre Gefäßdichte war bei fibronektindeletierten Tumoren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltumoren signifikant um mehr als ein Drittel reduziert. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben (Abschnitt IV.2.2.), war dies vermutlich auf eine Beeinträchtigung der während der Angiogenese ablaufenden Prozesse zurückzuführen. So vermag Fibronektin, welches von Tumorzellen in die extrazelluläre Matrix eingelagert wird, über Inter-aktionen mit Transmembranrezeptoren der Endothelzellen zu interagieren und deren Haptotaxis zu vermitteln [169]. Dementsprechend würde die Ausschaltung des Tumorzell-Fibronektins vermutlich die Migrationsfähigkeiten der Endothelzellen und somit die Angiogenese verlangsamen, da potentielle Bindungsstellen fehlen. Da Fibronektin antiapoptotisch auf Endothelzellen wirkt [308], könnten die Ausschaltung des tumorspezifischen Fibronektins und der damit einhergehende reduzierte Fibronektin-gehalt der Knochenmarkmatrix zu einem erhöhten Absterben angiogener Endothelzellen führen. Dies würde zur Erklärung der verringerten mikrovaskulären Gefäßdichte und dem daraus resultierenden eingeschränkten Tumorwachstum der fibronektindeletierten Tumore beitragen.

IV.2. Spontane Tumorregression

Die spontane Tumorregression ist ein äußerst selten auftretendes Ereignis, welches beim Menschen schätzungsweise in einem von 140000 Fällen einer Krebserkrankung eintritt [330]. Die Mehrheit der dokumentierten Fälle bezieht sich auf Patienten mit Neuroblastomen, Nierenzellkarzinomen, malignen Melanomen und Lymphomen bzw. Leukämien [331]. Das derzeit einzige Modell, welches die Untersuchung der spontanen Tumorrückbildung ermöglicht, beruht auf einem Mausstamm, der von Cui *et al.* zufällig entdeckt wurde und gegen verschiedene Krebsstypen resistent war.

Interessanterweise zeigten 38% der Tiere, denen Metastasen unter Verwendung der MDA-Kd-Linie induziert wurden, eine spontane Rückbildung der Tumore. Dies war nicht auf einen Funktionsverlust des Enzyms Luciferase zurückzuführen, da die vollständige Rückbildung der osteolytischen Knochenläsionen sowohl mit dem Heilungsprozess des Knochengewebes, welcher sich in einer Verdichtung der Knochensubstanz äußerte, verbunden war, als auch ausnahmslos alle Metastasen, die mit Hilfe der Röntgenaufnahmen detektiert wurden, ebenfalls ein Biolumineszenz-Signal zeigten. 27% der Mx-Knockouttiere, denen Tumore unter Verwendung der MDA-CT-Linie induziert wurden, wiesen eine spontane Tumorregression auf. Die spontane Rückbildung der Tumore war vermutlich altersabhängig und trat sowohl bei Fibronectin-Knockdown-Tumoren als auch bei Tieren der MxCre-Linie vorwiegend 8-17 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen auf. Diese zeitliche Eingrenzung würde erklären, warum Kontrolltiere, die mit der MDA-CT-Linie inokuliert wurden, keine Tumorregression verzeichneten. Diese Tiere hatten, verursacht durch das aggressive Tumorwachstum, eine durchschnittliche Überlebensdauer von 6,6 Wochen und verstarben demnach bereits vor dem Zeitpunkt einer möglichen Regression. Zudem war das Tumorwachstum der Kontrolltiere 8 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen bereits so weit fortgeschritten, dass die Überlebenschancen selbst bei einsetzender Regression als äußerst gering einzuschätzen wären.

Die Fähigkeit des Immunsystems, Tumorzellen aufzuspüren und zu zerstören, wird als Immunüberwachung (engl. „immune surveillance“) bezeichnet und in der Literatur kontrovers diskutiert [332, 333]. Eine Immunantwort auf Tumore kann gegen tumorspezifische Antigene (Moleküle, die einzigartig für Tumorzellen sind) oder tumorassoziierte Antigene (Moleküle, die im Vergleich zu normalen Zellen von Tumorzellen in unterschiedlicher Weise exprimiert werden) gerichtet sein [334]. Die Tumormunität und der damit verbundene Prozess der Tumoreliminierung umfasst Komponenten der angeborenen sowie der adaptiven Immunantwort. Das Immunsystem von Mäusen, wie auch des Menschen, setzt sich aus vier Hauptgruppen an Effektorzelltypen zusammen, welche Zielzellen direkt angreifen. Hierzu zählen cytotoxische T-Lymphozyten, natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), Granulozyten (neutrophile und eosinophile Granulozyten) und Makro-

phagen. Cytotoxische T-Lymphozyten gehören zur adaptiven Immunantwort, deren Aktivierung der vorherigen Antigenexposition und Etablierung von T-Gedächtniszellen bedarf. Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), Granulozyten und Makrophagen zählen zur angeborenen Immunität. Deren Aktivierung erfordert nicht die vorherige Antigenpräsentation, sondern beruht auf der direkten Erkennung spezifischer Oberflächenstrukturen auf den Zielzellen [272, 335]. Tierversuche haben gezeigt, dass T-Zellen eine entscheidende Vermittlerrolle bei der Tumormunität übernehmen [336, 337]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten immundefizienten CD1 *nude* Mäuse waren athymisch und daher unfähig, reife T-Zellen zu produzieren. Demzufolge konnte die spontane Tumorrogression nicht auf eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion zurückgeführt werden.

Die spontane Rückbildung der Tumore konnte überwiegend bei Tieren beobachtet werden, denen Knochenmetastasen unter Verwendung der Fibronectin-Knockoutlinie MDA-Kd induziert wurden. Es scheint denkbar, dass zelluläre Unterschiede (z.B. abnorme Expressionsmuster) der MDA-Kd-Linie im Vergleich zu den Kontrollzellen (MDA-CT) die spontane Tumorrogression begünstigen. Möglicherweise führte die Ausschaltung von Tumorzell-Fibronectin zu einer gesteigerten Erkennung der Zielzellen und einer damit verbundenen erhöhten Zytotoxizität der Immunzellen. In diesem Zusammenhang wurden unterschiedliche Leukozyten-Populationen aus der Milz isoliert und die spezifische Lyse der Zielzellen im Chromfreisetzungstest analysiert. Es konnte kein Unterschied bezüglich der zellvermittelten Lyse der Zielzellen MDA-Kd und MDA-CT festgestellt werden. Demzufolge nehmen wir an, dass die spontane Tumorrogression vermutlich nicht auf zellulären Unterschieden der Zelllinien bzw. auf Auswirkungen der tumorzellspezifischen Ausschaltung von Fibronectin auf die Zytotoxizität der analysierten Leukozyten-Populationen beruhte. Darüber hinaus konnten keine Unterschiede der zellvermittelten zytotoxischen Aktivität der mit IL-2 stimulierten Leukozyten-Populationen ermittelt werden, zwischen Tieren, die eine komplette Tumorrückbildung aufwiesen und Kontrolltieren mit bzw. ohne Tumor, da der Prozentsatz der spezifischen Lyse je nach Spendertier beträchtlich variierte. Die beobachteten Unterschiede bezüglich der leukozytenvermittelten Zytotoxizität waren vermutlich auf natürliche Schwankungen der Leukozyten-Aktivität zurückzuführen. Es bleibt anzumerken, dass es noch nicht möglich war, Leukozyten von Mäusen zu analysieren, die sich unmittelbar in der Regression befanden. Möglicherweise würden entsprechende Untersuchungen neue Hinweise zur Klärung dieser Fragestellung liefern.

Für die Untersuchung der spezifischen Lyse der natürlichen Killerzellen wurden diese im Vorfeld mit IL-2 behandelt, welches die Proliferation und Differenzierung fördert [338, 339]. Es kann nicht vorhergesagt werden, ob die zusätzliche Stimulation von Makrophagen und Granulozyten Unterschiede bezüglich der spezifischen Lyse der Zielzellen aufzeigen würde. Eine weitere Einschränkung des Chromfreisetzungstest ist die zeitliche Begrenzung der Durchführung. Das von den Zielzellen aufgenommene Chrom, das bei der leukozytenvermittelten Lyse freigesetzt wurde und als Parameter der Zytotoxizität dient, verbleibt nicht unbegrenzt innerhalb der Zellen, sondern

entweicht fortwährend. Daher sollte die spezifische Lyse der Zielzellen einen Zeitraum von ca. 4 Stunden nicht überschreiten. Allerdings bedarf die leukozytenvermittelte Lyse der Zielzellen oft einer gewissen Latenzzeit (>12 Stunden) [271], so dass der Chromfreisetzungstest für die Beantwortung der Fragestellung womöglich nicht ausreichend Informationen bereitstellt.

Die Charakterisierung der unterschiedlichen Leukozyten-Subpopulationen erfolgte mittels FACS-Analyse. Auf diese Weise konnte der prozentuale Anteil an Lymphozyten (B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen), Granulozyten und Monozyten unterschiedlicher Versuchstiere ermittelt werden. Die Verteilung der Lymphozyten-Populationen war zwischen Kontrolltieren und Tieren mit Tumoren bzw. Tieren, die eine vollständige Tumorrégression aufzeigten, nicht verschieden. Behaarte Kontrolltiere zeigten im Vergleich zu den immundefizienten CD1 *nude* Tieren erwartungsgemäß einen deutlich höheren Anteil an T-Zellen. Dass athymische CD1 *nude* Mäuse dennoch einen geringen Anteil an als positiv definierten T-Zellen aufwiesen ist damit zu erklären, dass die *nude* Mutation im Gen *foxn1* (engl. „forkhead box N1“) das Fehlen des Thymus hervorruft [340, 341]. Die Reifung der T-Zellen ist in Abwesenheit des Thymus unterbunden und somit liegen keine funktionsfähigen T-Zellen vor. Die Tatsache, dass CD1 *nude* Mäuse Transplantate von verschiedenen Spezies akzeptieren, ohne eine Immunreaktion hervorzurufen, ist Grund genug zu der Annahme, dass die verbliebenen T-Zellen eine erfolgreiche Heterotransplantation nicht beeinträchtigen können [271].

Die Anzahl der Granulozyten und Monozyten/Makrophagen der Mäuse, die eine mittlere Tumorbelastrung aufwiesen, war im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Tiere, die eine vollständige Rückbildung der Tumore aufzeigten, zum Zeitpunkt der FACS-Analyse hingegen als tumorfrei einzustufen waren, erweckten im Vergleich zu den Kontrollen den Eindruck eines Trends zu einer erhöhten Granulozyten-Anzahl. Diese Zunahme ließ sich jedoch statistisch nicht absichern. Granulozyten sind relativ kurzlebig und werden während einer Immunantwort vermehrt gebildet [335]. Untersuchungen haben gezeigt, dass eosinophile Granulozyten in großer Zahl Tumore infiltrieren und dazu in der Lage sind, IL-4 und IL-13 zu sezernieren, welche im Zusammenhang mit dem Absterben unterschiedlicher Tumorarten stehen [342]. Womöglich leiten eosinophile Granulozyten die spontane Tumorrückbildung durch zytotoxische Effekte ein und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Immunüberwachung [343]. Infolgedessen scheint es durchaus denkbar, dass neutrophile oder eosinophile Granulozyten die spontane Rückbildung der Tumore veranlassen [271, 272, 343, 344]. Eine mögliche Erklärung, die weiter geprüft werden muss, wäre, dass die Granulozyten mit dem Einsetzen der Régression hochreguliert wurden, die vollständige Eliminierung der Tumorzellen veranlassten und sich anschließend ihre Anzahl wieder auf den Normwert einpendelte. Das wäre eine Erklärung, warum Tiere, die eine komplette Régression durchlaufen hatten, zum Zeitpunkt der FACS-Analyse keine signifikant erhöhte Anzahl an Granulozyten mehr aufzeigten. Für diese Hypothese sprechen die von Cui *et al.* gemachten Beobachtungen. Die spontane Tumorrégression des beschriebenen krebseresistenten Maus-

stammes beruhte auf Zellen der angeborenen Immunität, wie neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen und Makrophagen, die eine Lyse der Tumorzellen verursachten. Der Resistenzmechanismus verlief T-Zell-unabhängig und konnte nicht auf einen einzelnen Immunzelltyp zurückgeführt werden [271, 272, 345]. Neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und Makrophagen hatten unabhängig voneinander die gleiche Tötungseffizienz wie die Kombination dieser Leukozyten [272].

Obgleich diese Daten einige Parallelen zu unseren Beobachtungen aufweisen, wären weitere Mechanismen denkbar, die eine Erklärungen für dieses Phänomen liefern würden. Die Tumorregression könnte auch durch genomische Instabilität ausgelöst werden. So wurde das Enzym Telomerase mit der zellulären Immortalität und der Tumorgenese in Verbindung gebracht. Es konnte belegt werden, dass Tumore, die sich in der Regression befinden, reduzierte Telomer-Wiederholungssequenzen und abnorme multizentrische Chromosomen und Ringchromosomen aufwiesen [346]. Außerdem wurde für unterschiedliche Tumore gezeigt, dass der programmierte Zelltod (Apoptose) einen weiteren Mechanismus darstellt, der die spontane Tumorregression erklären könnte. In diesem Zusammenhang wurde auch die durch Zytokine vermittelte Tumorzellapoptose genannt [347-349]. Die Angiogenese ist für die Entwicklung von Tumoren entscheidend und somit könnte die Tumorregression durch antiangiogene Faktoren ausgelöst werden [350, 351]. Es wurde vorgeschlagen, dass die Tumorregression auf der Entstehung großer hypoxischer Areale im Inneren des Tumors beruht und einer Nekrose somit kein Einhalt geboten werden kann [261-266]. Als eine weitere mögliche Erklärung wurde eine virale Infektion der Tumorzellen vorgeschlagen, die eine Erkennung durch Immunzellen erleichtern würde [352].

Der genaue Mechanismus, der der Tumorregression in Abwesenheit von Fibronectin zugrunde liegt, konnte im Einzelnen noch nicht aufgeschlüsselt werden. Um diese Fragestellung zu klären, sind weitere Experimente notwendig. Allerdings lieferte die FACS-Analyse erste Hinweise darauf, dass die spontane Tumorregression auf eine mögliche Beteiligung von Granulozyten zurückzuführen ist. Weitere Untersuchungen der zugrundeliegenden genetischen, zellulären und biochemischen Mechanismen der spontanen Tumorregression sollten zu einem vertieften Verständnis führen, auf welche Weise Tumorzellen die Abstoßungsmechanismen des Wirtsimmunsystems umgehen. Sollte es durch Experimente gelingen, den Mechanismus der spontanen Tumorrückbildung weiter zu entschlüsseln und dabei womöglich bestimmte Gene zu identifizieren, über die der Hauptteil der Wirkung vermittelt wird, hätte man eventuell ein Werkzeug in der Hand, das für eine Behandlung von Tumorpatienten genutzt werden könnte, um der Entstehung oder dem Fortschreiten einer Krebserkrankung entgegenzuwirken.

V. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Rolle des Fibronektins für die Entstehung und des Wachstums von Knochenmetastasen.

Tumorzellspezifische Faktoren bereiten entfernte Gewebe auf die Besiedelung durch disseminierte Tumorzellen vor. Dabei wird Fibronektin im Bereich der prämetastatischen Nische vermehrt gebildet. Dies führte zu der Annahme, dass Fibronektin eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren einnimmt. Um die Bedeutung des Fibronektins bezüglich des Metastasierungsprozesses näher zu charakterisieren, wurde dieses im Bereich der vaskulären Nische über das Cre/loxP-System ausgeschaltet. Die Inaktivierung von zirkulierendem Fibronektin und Knochenmarks-Fibronektin *in vivo* hatte ein verlangsamtes Tumorstadium zur Folge, welches auf eine um 22% verminderte Angiogenese zurückzuführen war. Im Gegensatz dazu beeinträchtigte die Ausschaltung des Osteoblasten-Fibronektins lediglich die frühen Entwicklungsstadien der Tumore. Diese Beobachtungen könnten einerseits mit der eingeschränkten Funktionsweise der Osteoblasten in Abwesenheit von Fibronektin erklärt werden, andererseits könnte der Einfluss auf das Fehlen osteoblastenspezifischer Fibronektin-Isoformen zurückgeführt werden, die die Metastasierung, Zelladhäsion, Proliferation und Motilität von Tumorzellen erhöhen.

Die Deletion des Tumorzell-Fibronektins hatte eine durchschnittlich um 60% reduzierte Anzahl gebildeter Metastasen, ein eingeschränktes Tumorstadium, hervorgerufen durch eine um 37% verminderte Blutgefäßanzahl, und letztendlich eine dreifache Verlängerung der mittleren Überlebensraten zur Folge. Die kombinierte Ausschaltung von lokalem Fibronektin und Tumorzell-Fibronektin vermochte den Einfluss auf die Etablierung und das Wachstum der Tumore zu verstärken.

Ein Drittel der Tiere, denen Metastasen induziert wurden, zeigten eine spontane Rückbildung der Tumore, ohne dass eine medizinische Intervention erfolgte. Dabei wurde zwischen einer kompletten Regression, bei der eine vollständige Rückbildung aller Tumore beobachtet werden konnte, und einer partiellen Regression, von der nur einzelne Tumore betroffen waren, unterschieden. Die spontane Regression war altersabhängig und trat 8-17 Wochen im Anschluss an die Applikation der Tumorzellen auf. Die vollständige Rückbildung der osteolytischen Knochenläsionen war mit dem Heilungsprozess des Knochengewebes verbunden, der sich in einer Verdichtung der Knochensubstanz äußerte. Erste Ergebnisse lieferten Hinweise darauf, dass die spontane Tumorstadium auf eine mögliche Beteiligung von Granulozyten zurückzuführen war.

Zusammenfassend zeigten unsere Untersuchungen, dass sowohl Fibronektin der Mikroumgebung als auch Tumorzell-Fibronektin die Entwicklung und das Wachstum von Tumoren beeinträchtigte. Diese Arbeit lieferte erste Hinweise auf die Existenz eines sehr effektiven Mechanismus, der in Zusammenhang mit Fibronektin steht und dazu in der Lage ist, Tumorzellen selbst bei fortgeschrittenen Krebserkrankungen zu beseitigen.

VI. Summary

This PhD thesis discusses the role of fibronectin in the establishment and growth of bone metastases.

Tumor-cell specific factors prepare distant organs for colonization by disseminating tumor cells. Fibronectin is upregulated in the pre-metastatic niche, which raises the possibility of a critical role of fibronectin in tumor formation. To characterize how fibronectin affects metastasis formation, it was deleted in the bone marrow in the area around the vascular niche using the cre-loxP system. Fibronectin deletion in the circulation and bone marrow *in vivo* resulted in a decrease in tumor growth, which was attributed to a 22% reduction in blood vessel formation. In contrast, deletion of fibronectin in the osteoblasts affected early tumor establishment. These findings could be due to a defective osteoblast function or to the absence of osteoblast-specific fibronectin isoforms. Such isoforms are known to be involved in metastasis, cell adhesion, proliferation and motility of tumor cells.

Deletion of fibronectin in the tumor cells themselves resulted in a 60% decrease in the number of metastatic foci. In addition foci were smaller, and this was due to a 37% reduction in blood vessel numbers. The endresult was a threefold increase in median survival compared to control cells. The combined deletion of bone marrow fibronectin and tumor cell fibronectin suppressed tumor formation and growth of tumors further.

Spontaneous tumor regression was observed in a third of the mice. A distinction was made between complete regression, in which all tumors resolved, and partial regression, which affected only single foci. Spontaneous regression appeared to be age-dependent and could be observed 8-17 weeks following tumor cell injection. Furthermore, complete regression was associated with healing of lytic bone lesions. Preliminary experiments suggest that granulocytes were involved in the spontaneous regression of tumors.

In summary, our work showed that both fibronectin of the microenvironment as well as tumor cell fibronectin affected the establishment and growth of tumors. It also suggests the presence of an effective mechanism related to fibronectin, which is able to eliminate tumor cells even in advanced tumors.

VII. Literaturverzeichnis

1. Hynes RO (ed.): **Fibronectins**: Springer-Verlag, New York; 1990.
2. Mosher DF (ed.): **Biology of Extracellular Matrix: Fibronectin**: Academic Press, California; 1989.
3. Sakai T, Johnson KJ, Murozono M, Sakai K, Magnuson MA, Wieloch T, Cronberg T, Isshiki A, Erickson HP, Fassler R: **Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis**. *Nature medicine* 2001, **7**(3):324-330.
4. Mao Y, Schwarzbauer JE: **Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process**. *Matrix Biol* 2005, **24**(6):389-399.
5. Pankov R, Yamada KM: **Fibronectin at a glance**. *Journal of cell science* 2002, **115**(Pt 20):3861-3863.
6. Magnusson MK, Mosher DF: **Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications**. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1998, **18**(9):1363-1370.
7. Gaggioli C, Deckert M, Robert G, Abbe P, Batoz M, Ehrenguber MU, Ortonne JP, Ballotti R, Tartare-Deckert S: **HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1**. *Oncogene* 2005, **24**(8):1423-1433.
8. George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO: **Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin**. *Development (Cambridge, England)* 1993, **119**(4):1079-1091.
9. Patel RS, Odermatt E, Schwarzbauer JE, Hynes RO: **Organization of the fibronectin gene provides evidence for exon shuffling during evolution**. *The EMBO journal* 1987, **6**(9):2565-2572.
10. Olden K, Pratt RM, Yamada KM: **Role of carbohydrate in biological function of the adhesive glycoprotein fibronectin**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979, **76**(7):3343-3347.
11. Wang XQ, Chen L, Pan R, Zhao J, Liu Y, He RQ: **An earthworm protease cleaving serum fibronectin and decreasing HBeAg in HepG2.2.15 cells**. *BMC Biochem* 2008, **9**:30.
12. French-Constant C: **Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions**. *Experimental cell research* 1995, **221**(2):261-271.
13. Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D: **Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects**. *Virchows Arch* 1996, **429**(6):311-322.
14. Vibe-Pedersen K, Kornblihtt AR, Baralle FE: **Expression of a human alpha-globin/fibronectin gene hybrid generates two mRNAs by alternative splicing**. *The EMBO journal* 1984, **3**(11):2511-2516.
15. Gutman A, Kornblihtt AR: **Identification of a third region of cell-specific alternative splicing in human fibronectin mRNA**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, **84**(20):7179-7182.
16. Kornblihtt AR, Umezawa K, Vibe-Pedersen K, Baralle FE: **Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene**. *The EMBO journal* 1985, **4**(7):1755-1759.
17. Mosesson MW, Chen AB, Huseby RM: **The cold-insoluble globulin of human plasma: studies of its essential structural features**. *Biochimica et biophysica acta* 1975, **386**(2):509-524.
18. Ruoslahti E, Engvall E, Hayman EG, Spiro RG: **Comparative studies on amniotic fluid and plasma fibronectins**. *The Biochemical journal* 1981, **193**(1):295-299.
19. Tajiri M, Yoshida S, Wada Y: **Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment**. *Glycobiology* 2005, **15**(12):1332-1340.
20. Matsuura H, Hakomori S: **The oncofetal domain of fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6: its presence in fibronectins from fetal and tumor tissues and its absence in those from normal adult tissues and plasma**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985, **82**(19):6517-6521.
21. Matsuura H, Greene T, Hakomori S: **An alpha-N-acetylgalactosamylation at the threonine residue of a defined peptide sequence creates the oncofetal peptide epitope in human fibronectin**. *The Journal of biological chemistry* 1989, **264**(18):10472-10476.

22. Borsi L, Carnemolla B, Castellani P, Rosellini C, Vecchio D, Allemanni G, Chang SE, Taylor-Papadimitriou J, Pande H, Zardi L: **Monoclonal antibodies in the analysis of fibronectin isoforms generated by alternative splicing of mRNA precursors in normal and transformed human cells.** *The Journal of cell biology* 1987, **104**(3):595-600.
23. Carnemolla B, Balza E, Siri A, Zardi L, Nicotra MR, Bigotti A, Natali PG: **A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors.** *The Journal of cell biology* 1989, **108**(3):1139-1148.
24. Castellani P, Siri A, Rosellini C, Infusini E, Borsi L, Zardi L: **Transformed human cells release different fibronectin variants than do normal cells.** *The Journal of cell biology* 1986, **103**(5):1671-1677.
25. Oyama F, Hirohashi S, Shimosato Y, Titani K, Sekiguchi K: **Deregulation of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in malignant human liver tumors.** *The Journal of biological chemistry* 1989, **264**(18):10331-10334.
26. Zardi L, Carnemolla B, Siri A, Petersen TE, Paoletta G, Sebastio G, Baralle FE: **Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon.** *The EMBO journal* 1987, **6**(8):2337-2342.
27. Vartio T, Laitinen L, Narvanen O, Cutolo M, Thornell LE, Zardi L, Virtanen I: **Differential expression of the ED sequence-containing form of cellular fibronectin in embryonic and adult human tissues.** *Journal of cell science* 1987, **88 (Pt 4)**:419-430.
28. Brown LF, Dubin D, Lavigne L, Logan B, Dvorak HF, Van de Water L: **Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing.** *The American journal of pathology* 1993, **142**(3):793-801.
29. Xia P, Culp LA: **Adhesion activity in fibronectin's alternatively spliced domain EDa (EIIIA) and its neighboring type III repeats: oncogene-dependent regulation.** *Experimental cell research* 1994, **213**(1):253-265.
30. Shimao Y, Nabeshima K, Inoue T, Koono M: **Role of fibroblasts in HGF/SF-induced cohort migration of human colorectal carcinoma cells: fibroblasts stimulate migration associated with increased fibronectin production via upregulated TGF-beta1.** *International journal of cancer* 1999, **82**(3):449-458.
31. Manabe R, Ohe N, Maeda T, Fukuda T, Sekiguchi K: **Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment.** *The Journal of cell biology* 1997, **139**(1):295-307.
32. Manabe R, Oh-e N, Sekiguchi K: **Alternatively spliced EDA segment regulates fibronectin-dependent cell cycle progression and mitogenic signal transduction.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(9):5919-5924.
33. Satoi S, Kitade H, Hiramatsu Y, Kwon AH, Takahashi H, Sekiguchi K, Uehara M, Oda M, Yanagimoto Y, Miyashita K *et al*: **Increased extra domain-A containing fibronectin and hepatic dysfunction during septic response: an in vivo and in vitro study.** *Shock (Augusta, Ga)* 2000, **13**(6):492-496.
34. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, 3rd: **The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(13):10229-10233.
35. Caputi M, Melo CA, Baralle FE: **Regulation of fibronectin expression in rat regenerating liver.** *Nucleic Acids Res* 1995, **23**(2):238-243.
36. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G: **The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1.** *The Journal of cell biology* 1998, **142**(3):873-881.
37. Saito S, Yamaji N, Yasunaga K, Saito T, Matsumoto S, Katoh M, Kobayashi S, Masuho Y: **The fibronectin extra domain A activates matrix metalloproteinase gene expression by an interleukin-1-dependent mechanism.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(43):30756-30763.
38. Wang A, Cohen DS, Palmer E, Sheppard D: **Polarized regulation of fibronectin secretion and alternative splicing by transforming growth factor.** *The Journal of biological chemistry* 1991, **266**(24):15598-15601.
39. Guan JL, Trevithick JE, Hynes RO: **Retroviral expression of alternatively spliced forms of rat fibronectin.** *The Journal of cell biology* 1990, **110**(3):833-847.
40. Peters JH, Sporn LA, Ginsberg MH, Wagner DD: **Human endothelial cells synthesize, process, and secrete fibronectin molecules bearing an alternatively spliced type III homology (ED1).** *Blood* 1990, **75**(9):1801-1808.
41. Hackl NJ, Bersch C, Feick P, Antoni C, Franke A, Singer MV, Nakchbandi IA: **Circulating Fibronectin Isoforms Predict the Degree of Fibrosis in Chronic Hepatitis C.** *Scand J Gastroenterol* 2010, *in press*.

42. Ting KM, Rothaupt D, McCormick TS, Hammerberg C, Chen G, Gilliam AC, Stevens S, Culp L, Cooper KD: **Overexpression of the oncofetal Fn variant containing the EDA splice-in segment in the dermal-epidermal junction of psoriatic uninvolved skin.** *The Journal of investigative dermatology* 2000, **114**(4):706-711.
43. Chevalier X, Claudepierre P, Grout N, Zardi L, Hornebeck W: **Presence of ED-A containing fibronectin in human articular cartilage from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 1996, **23**(6):1022-1030.
44. Kanters SD, Banga JD, Algra A, Frijns RC, Beutler JJ, Fijnheer R: **Plasma levels of cellular fibronectin in diabetes.** *Diabetes care* 2001, **24**(2):323-327.
45. Leahy DJ, Aukhil I, Erickson HP: **2.0 A crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region.** *Cell* 1996, **84**(1):155-164.
46. Carnemolla B, Leprini A, Allemanni G, Saginati M, Zardi L: **The inclusion of the type III repeat ED-B in the fibronectin molecule generates conformational modifications that unmask a cryptic sequence.** *The Journal of biological chemistry* 1992, **267**(34):24689-24692.
47. Magnuson VL, Young M, Schattenberg DG, Mancini MA, Chen DL, Steffensen B, Klebe RJ: **The alternative splicing of fibronectin pre-mRNA is altered during aging and in response to growth factors.** *The Journal of biological chemistry* 1991, **266**(22):14654-14662.
48. Ffrench-Constant C, Van de Water L, Dvorak HF, Hynes RO: **Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat.** *The Journal of cell biology* 1989, **109**(2):903-914.
49. Astrof S, Crowley D, George EL, Fukuda T, Sekiguchi K, Hanahan D, Hynes RO: **Direct test of potential roles of EIIIA and EIIB alternatively spliced segments of fibronectin in physiological and tumor angiogenesis.** *Molecular and cellular biology* 2004, **24**(19):8662-8670.
50. Nicolo G, Salvi S, Oliveri G, Borsi L, Castellani P, Zardi L: **Expression of tenascin and of the ED-B containing oncofetal fibronectin isoform in human cancer.** *Cell Differ Dev* 1990, **32**(3):401-408.
51. Halin C, Zardi L, Neri D: **Antibody-based targeting of angiogenesis.** *News Physiol Sci* 2001, **16**:191-194.
52. Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L: **The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis.** *International journal of cancer* 1994, **59**(5):612-618.
53. Kaczmarek J, Castellani P, Nicolo G, Spina B, Allemanni G, Zardi L: **Distribution of oncofetal fibronectin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues.** *International journal of cancer* 1994, **59**(1):11-16.
54. Santimaria M, Moscatelli G, Viale GL, Giovannoni L, Neri G, Viti F, Leprini A, Borsi L, Castellani P, Zardi L *et al*: **Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(2):571-579.
55. Fukuda T, Yoshida N, Kataoka Y, Manabe R, Mizuno-Horikawa Y, Sato M, Kuriyama K, Yasui N, Sekiguchi K: **Mice lacking the EDB segment of fibronectin develop normally but exhibit reduced cell growth and fibronectin matrix assembly in vitro.** *Cancer research* 2002, **62**(19):5603-5610.
56. Astrof S, Crowley D, Hynes RO: **Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin.** *Dev Biol* 2007, **311**(1):11-24.
57. White ES, Baralle FE, Muro AF: **New insights into form and function of fibronectin splice variants.** *J Pathol* 2008, **216**(1):1-14.
58. Schwarzbauer JE, Spencer CS, Wilson CL: **Selective secretion of alternatively spliced fibronectin variants.** *The Journal of cell biology* 1989, **109**(6 Pt 2):3445-3453.
59. Wilson CL, Schwarzbauer JE: **The alternatively spliced V region contributes to the differential incorporation of plasma and cellular fibronectins into fibrin clots.** *The Journal of cell biology* 1992, **119**(4):923-933.
60. Leiss M, Beckmann K, Giros A, Costell M, Fassler R: **The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo.** *Curr Opin Cell Biol* 2008, **20**(5):502-507.
61. Katagiri YU, Murakami M, Mori K, Iizuka J, Hara T, Tanaka K, Jia WY, Chambers AF, Ueda T: **Non-RGD domains of osteopontin promote cell adhesion without involving alpha v integrins.** *Journal of cellular biochemistry* 1996, **62**(1):123-131.
62. Ruoslahti E, Pierschbacher MD: **Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal.** *Cell* 1986, **44**(4):517-518.

63. Sakamoto H, Broekelmann T, Cheresh DA, Ramirez F, Rosenbloom J, Mecham RP: **Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1.** *The Journal of biological chemistry* 1996, **271**(9):4916-4922.
64. Liao YF, Gotwals PJ, Kotliansky VE, Sheppard D, Van De Water L: **The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1 providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(17):14467-14474.
65. Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E: **Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor.** *Cell* 1985, **40**(1):191-198.
66. Aota S, Nomizu M, Yamada KM: **The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function.** *The Journal of biological chemistry* 1994, **269**(40):24756-24761.
67. Chada D, Mather T, Nollert MU: **The synergy site of fibronectin is required for strong interaction with the platelet integrin alphaIIb beta3.** *Ann Biomed Eng* 2006, **34**(10):1542-1552.
68. Shinde AV, Bystroff C, Wang C, Vogelesang MG, Vincent PA, Hynes RO, Van De Water L: **Identification of the peptide sequences within the EIIIA (EDA) segment of fibronectin that mediate integrin alpha9beta1-dependent cellular activities.** *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(5):2858-2870.
69. Guan JL, Hynes RO: **Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1.** *Cell* 1990, **60**(1):53-61.
70. Wayner EA, Garcia-Pardo A, Humphries MJ, McDonald JA, Carter WG: **Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin.** *The Journal of cell biology* 1989, **109**(3):1321-1330.
71. Schwarzbauer JE, Tamkun JW, Lemischka IR, Hynes RO: **Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region.** *Cell* 1983, **35**(2 Pt 1):421-431.
72. Jalkanen S, Jalkanen M: **Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin.** *The Journal of cell biology* 1992, **116**(3):817-825.
73. Woods A, Longley RL, Tumova S, Couchman JR: **Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts.** *Archives of biochemistry and biophysics* 2000, **374**(1):66-72.
74. Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E: **The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(13):6161-6165.
75. Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C *et al*: **Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia.** *Neuron* 1994, **13**(4):1017-1030.
76. Moretti FA, Chauhan AK, Iaconcig A, Porro F, Baralle FE, Muro AF: **A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(38):28057-28062.
77. Bentmann A, Kawelke N, Moss D, Zentgraf H, Bala Y, Berger I, Gasser JA, Nakchbandi IA: **Circulating Fibronectin Affects Bone Matrix While Osteoblast Fibronectin Modulates Osteoblast Function.** *J Bone Miner Res* 2009.
78. Dallas SL, Sivakumar P, Jones CJ, Chen Q, Peters DM, Mosher DF, Humphries MJ, Kielty CM: **Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(19):18871-18880.
79. Vakonakis I, Campbell ID: **Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure.** *Curr Opin Cell Biol* 2007, **19**(5):578-583.
80. Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM: **The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling.** *Curr Opin Cell Biol* 2006, **18**(5):463-471.
81. Fontana L, Chen Y, Prijatelj P, Sakai T, Fassler R, Sakai LY, Rifkin DB: **Fibronectin is required for integrin alpha v beta 6-mediated activation of latent TGF-beta complexes containing LTBP-1.** *Faseb J* 2005, **19**(13):1798-1808.
82. Luo BH, Carman CV, Springer TA: **Structural basis of integrin regulation and signaling.** *Annu Rev Immunol* 2007, **25**:619-647.

83. Baneyx G, Baugh L, Vogel V: **Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(8):5139-5143.
84. Pankov R, Cukierman E, Katz BZ, Matsumoto K, Lin DC, Lin S, Hahn C, Yamada KM: **Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis.** *The Journal of cell biology* 2000, **148**(5):1075-1090.
85. Ohashi T, Kiehart DP, Erickson HP: **Dynamics and elasticity of the fibronectin matrix in living cell culture visualized by fibronectin-green fluorescent protein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(5):2153-2158.
86. Cho J, Mosher DF: **Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation.** *J Thromb Haemost* 2006, **4**(7):1461-1469.
87. Ni H, Yuen PS, Papalia JM, Trevithick JE, Sakai T, Fassler R, Hynes RO, Wagner DD: **Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(5):2415-2419.
88. Grinnell F, Billingham RE, Burgess L: **Distribution of fibronectin during wound healing in vivo.** *The Journal of investigative dermatology* 1981, **76**(3):181-189.
89. Mosher DF: **Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor.** *The Journal of biological chemistry* 1975, **250**(16):6614-6621.
90. Grinnell F, Phan TV: **Deposition of fibronectin on material surfaces exposed to plasma: quantitative and biological studies.** *Journal of cellular physiology* 1983, **116**(3):289-296.
91. Takashima A, Billingham RE, Grinnell F: **Activation of rabbit keratinocyte fibronectin receptor function in vivo during wound healing.** *The Journal of investigative dermatology* 1986, **86**(5):585-590.
92. Clark RA: **Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair.** *Arch Dermatol* 1988, **124**(2):201-206.
93. Singer AJ, Clark RA: **Cutaneous wound healing.** *The New England journal of medicine* 1999, **341**(10):738-746.
94. Hausen z: **Krebs - eine Herausforderung für die Forschung.** *Spektrum der Wissenschaft* 2003, **Spezial Krebsmedizin II**:6-11.
95. Pschyrembel W: **Klinisches Wörterbuch.** Berlin: Walter de Gruyter; 1998.
96. Alison MR: **The Cancer Handbook.** London: Nature Publishing Group; 2002.
97. Pecorino L: **Molecular Biology of Cancer.** Oxford: Oxford University Press; 2008.
98. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
99. Blettner M: **Risikante Umwelt – riskantes Verhalten.** *Spektrum der Wissenschaft* 2003, **Spezial Krebsmedizin II**:34-38.
100. Gibbs WW: **Chaos in der Erbsubstanz** *Spektrum der Wissenschaft* 2003, **Spezial Krebsmedizin II**:12-22.
101. Barcellos-Hoff MH, Ravani SA: **Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells.** *Cancer research* 2000, **60**(5):1254-1260.
102. Milde F, Bergdorf M, Koumoutsakos P: **A hybrid model for three-dimensional simulations of sprouting angiogenesis.** *Biophys J* 2008, **95**(7):3146-3160.
103. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA *et al*: **VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche.** *Nature* 2005, **438**(7069):820-827.
104. De Petro G, Barlati S, Vartio T, Vaheri A: **Transformation-enhancing activity of gelatin-binding fragments of fibronectin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981, **78**(8):4965-4969.
105. Werb Z, Tremble PM, Behrendtsen O, Crowley E, Damsky CH: **Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression.** *The Journal of cell biology* 1989, **109**(2):877-889.
106. Yi M, Ruoslahti E: **A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(2):620-624.
107. Kaspar M, Zardi L, Neri D: **Fibronectin as target for tumor therapy.** *International journal of cancer* 2006, **118**(6):1331-1339.
108. Steeg PS: **Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges.** *Nature medicine* 2006, **12**(8):895-904.
109. Bacac M, Stamenkovic I: **Metastatic cancer cell.** *Annu Rev Pathol* 2008, **3**:221-247.

110. Lauwaet T, Oliveira MJ, Mareel M, Leroy A: **Molecular mechanisms of invasion by cancer cells, leukocytes and microorganisms.** *Microbes Infect* 2000, **2**(8):923-931.
111. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A: **The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer.** *The Journal of clinical investigation* 2002, **109**(8):987-991.
112. Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E: **Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions.** *Cell* 2003, **112**(4):535-548.
113. Martin SS, Vuori K: **Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis.** *Biochimica et biophysica acta* 2004, **1692**(2-3):145-157.
114. Glinsky GV: **Genomic models of metastatic cancer: functional analysis of death-from-cancer signature genes reveals aneuploid, anoikis-resistant, metastasis-enabling phenotype with altered cell cycle control and activated Polycomb Group (PcG) protein chromatin silencing pathway.** *Cell Cycle* 2006, **5**(11):1208-1216.
115. Egeblad M, Werb Z: **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(3):161-174.
116. Harms JF, Welch DR, Samant RS, Shevde LA, Miele ME, Babu GR, Goldberg SF, Gilman VR, Sosnowski DM, Campo DA *et al*: **A small molecule antagonist of the alpha(v)beta3 integrin suppresses MDA-MB-435 skeletal metastasis.** *Clin Exp Metastasis* 2004, **21**(2):119-128.
117. Hynes RO: **Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.** *Cell* 2002, **110**(6):673-687.
118. Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L: **Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay.** *Cell* 1998, **94**(3):353-362.
119. Fidler IJ, Nicolson GL: **Fate of recirculating B16 melanoma metastatic variant cells in parabiotic syngeneic recipients.** *J Natl Cancer Inst* 1977, **58**(6):1867-1872.
120. Liotta LA, Kohn E: **Cancer invasion and metastases.** *JAMA* 1990, **263**(8):1123-1126.
121. Fidler IJ: **Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine.** *J Natl Cancer Inst* 1970, **45**(4):773-782.
122. Liotta LA, Vembu D, Saini RK, Boone C: **In vivo monitoring of the death rate of artificial murine pulmonary micrometastases.** *Cancer research* 1978, **38**(5):1231-1236.
123. Varani J, Lovett EJ, Elgebaly S, Lundy J, Ward PA: **In vitro and in vivo adherence of tumor cell variants correlated with tumor formation.** *The American journal of pathology* 1980, **101**(2):345-352.
124. Walz DA, Fenton JW: **The role of thrombin in tumor cell metastasis.** *Invasion Metastasis* 1994, **14**(1-6):303-308.
125. Karparkin S, Pearlstein E, Ambrogio C, Collier BS: **Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo.** *The Journal of clinical investigation* 1988, **81**(4):1012-1019.
126. Updyke TV, Nicolson GL: **Malignant melanoma cell lines selected in vitro for increased homotypic adhesion properties have increased experimental metastatic potential.** *Clin Exp Metastasis* 1986, **4**(4):273-284.
127. Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV, Huxley VH, Turk JR, Mossine VV, Deutscher SL, Pienta KJ, Quinn TP: **Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium.** *Cancer research* 2003, **63**(13):3805-3811.
128. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(8):563-572.
129. Rosen SD: **Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond.** *Annu Rev Immunol* 2004, **22**:129-156.
130. Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA, Muschel RJ: **Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation.** *Cancer research* 2004, **64**(23):8613-8619.
131. Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, Hughes PE, Pampori N, Shattil SJ, Saven A *et al*: **Integrin activation controls metastasis in human breast cancer.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(4):1853-1858.
132. Laubli H, Stevenson JL, Varki A, Varki NM, Borsig L: **L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest.** *Cancer research* 2006, **66**(3):1536-1542.
133. Kim YJ, Borsig L, Han HL, Varki NM, Varki A: **Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium.** *The American journal of pathology* 1999, **155**(2):461-472.

134. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A: **P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(16):9325-9330.
135. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A: **Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(6):3352-3357.
136. Taichman DB, Cybulsky MI, Djaffar I, Longenecker BM, Teixido J, Rice GE, Aruffo A, Bevilacqua MP: **Tumor cell surface alpha 4 beta 1 integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1**. *Cell Regul* 1991, **2**(5):347-355.
137. Fukuda M: **Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens**. *Cancer research* 1996, **56**(10):2237-2244.
138. Sackstein R: **The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm**. *Curr Opin Hematol* 2005, **12**(6):444-450.
139. Varghese HJ, Davidson MT, MacDonald IC, Wilson SM, Nadkarni KV, Groom AC, Chambers AF: **Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases**. *Cancer research* 2002, **62**(3):887-891.
140. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ: **Breast cancer metastasis: markers and models**. *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(8):591-602.
141. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP: **Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene**. *Cell* 1989, **56**(3):345-355.
142. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J: **Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression**. *Nature medicine* 1995, **1**(2):149-153.
143. Murray C: **Tumour dormancy: not so sleepy after all**. *Nature medicine* 1995, **1**(2):117-118.
144. Folkman J, Kalluri R: **Cancer without disease**. *Nature* 2004, **427**(6977):787.
145. Saudemont A, Quesnel B: **In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis**. *Blood* 2004, **104**(7):2124-2133.
146. Saudemont A, Jouy N, Hetuin D, Quesnel B: **NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells**. *Blood* 2005, **105**(6):2428-2435.
147. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N: **Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1**. *Science (New York, NY)* 1994, **265**(5178):1582-1584.
148. Nyberg P, Xie L, Kalluri R: **Endogenous inhibitors of angiogenesis**. *Cancer research* 2005, **65**(10):3967-3979.
149. Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V: **Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis**. *Science (New York, NY)* 2008, **319**(5860):195-198.
150. Bergers G, Benjamin LE: **Tumorigenesis and the angiogenic switch**. *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(6):401-410.
151. Folkman J: **Angiogenesis**. *Annu Rev Med* 2006, **57**:1-18.
152. Gimbrone MA, Jr., Leapman SB, Cotran RS, Folkman J: **Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization**. *The Journal of experimental medicine* 1972, **136**(2):261-276.
153. Paweletz N, Knierim M: **Tumor-related angiogenesis**. *Crit Rev Oncol Hematol* 1989, **9**(3):197-242.
154. Folkman J: **Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?** *Nat Rev Drug Discov* 2007, **6**(4):273-286.
155. Carmeliet P: **VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer**. *Oncology* 2005, **69 Suppl 3**:4-10.
156. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E: **Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(3):768-772.
157. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: **The biology of VEGF and its receptors**. *Nature medicine* 2003, **9**(6):669-676.
158. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J: **Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch**. *Cell Cycle* 2006, **5**(16):1779-1787.

159. Goerges AL, Nugent MA: **pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(3):2307-2315.
160. Goerges AL, Nugent MA: **Regulation of vascular endothelial growth factor binding and activity by extracellular pH.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(21):19518-19525.
161. Mac Gabhann F, Popel AS: **Model of competitive binding of vascular endothelial growth factor and placental growth factor to VEGF receptors on endothelial cells.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, **286**(1):H153-164.
162. Mac Gabhann F, Popel AS: **Interactions of VEGF isoforms with VEGFR-1, VEGFR-2, and neuropilin in vivo: a computational model of human skeletal muscle.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, **292**(1):H459-474.
163. Davis GE, Senger DR: **Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization.** *Circulation research* 2005, **97**(11):1093-1107.
164. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D *et al*: **VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia.** *The Journal of cell biology* 2003, **161**(6):1163-1177.
165. Iruela-Arispe ML, Hasselaar P, Sage H: **Differential expression of extracellular proteins is correlated with angiogenesis in vitro.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1991, **64**(2):174-186.
166. Iruela-Arispe ML, Diglio CA, Sage EH: **Modulation of extracellular matrix proteins by endothelial cells undergoing angiogenesis in vitro.** *Arterioscler Thromb* 1991, **11**(4):805-815.
167. Robey PG, Boskey AL: **The biochemistry of bone.** In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J (eds.) **Osteoporosis.** Academic Press, San Diego. 1996:95-183.
168. Robey PG, Boskey AL: **Extracellular Matrix and Biomineralization of Bone.** In: **Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.** ASBMR, Washington, D. C. 2006, **6**:12-19.
169. Serini G, Valdembri D, Bussolino F: **Integrins and angiogenesis: a sticky business.** *Experimental cell research* 2006, **312**(5):651-658.
170. Jain RK: **Molecular regulation of vessel maturation.** *Nature medicine* 2003, **9**(6):685-693.
171. Brown JM: **Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation.** *Br J Radiol* 1979, **52**(620):650-656.
172. Paku S, Dome B, Toth R, Timar J: **Organ-specificity of the extravasation process: an ultrastructural study.** *Clin Exp Metastasis* 2000, **18**(6):481-492.
173. Lalor PF, Lai WK, Curbishley SM, Shetty S, Adams DH: **Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo.** *World J Gastroenterol* 2006, **12**(34):5429-5439.
174. Hess KR, Varadhachary GR, Taylor SH, Wei W, Raber MN, Lenzi R, Abbruzzese JL: **Metastatic patterns in adenocarcinoma.** *Cancer* 2006, **106**(7):1624-1633.
175. Kopp HG, AVECILLA ST, Hooper AT, Rafii S: **The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization.** *Physiology (Bethesda)* 2005, **20**:349-356.
176. Mazo IB, von Andrian UH: **Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels.** *J Leukoc Biol* 1999, **66**(1):25-32.
177. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D: **Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis.** *The Journal of cell biology* 2004, **167**(2):223-229.
178. Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C, Gomis RR, Manova-Todorova K, Massague J: **Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis.** *Nature* 2007, **446**(7137):765-770.
179. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA: **Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis.** *Nature* 2007, **449**(7162):557-563.
180. Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massague J: **TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4.** *Cell* 2008, **133**(1):66-77.
181. Weil RJ, Palmieri DC, Bronder JL, Stark AM, Steeg PS: **Breast cancer metastasis to the central nervous system.** *The American journal of pathology* 2005, **167**(4):913-920.
182. Nguyen DX, Bos PD, Massague J: **Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**(4):274-284.
183. Kuroda H, Sakamoto G, Ohnisi K, Itoyama S: **Clinical and pathologic features of invasive micropapillary carcinoma.** *Breast Cancer* 2004, **11**(2):169-174.

184. Cao Y: **Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(9):735-743.
185. Leak LV: **Studies on the permeability of lymphatic capillaries.** *The Journal of cell biology* 1971, **50**(2):300-323.
186. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K: **Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation.** *Trends Immunol* 2004, **25**(7):387-395.
187. Isaka N, Padera TP, Hagendoorn J, Fukumura D, Jain RK: **Peritumor lymphatics induced by vascular endothelial growth factor-C exhibit abnormal function.** *Cancer research* 2004, **64**(13):4400-4404.
188. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ *et al*: **Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics.** *Science (New York, NY 2002)*, **296**(5574):1883-1886.
189. Kim U, Park HC, Choi KH: **Differential permeability of lymphatic and blood vessels in determining the route of metastasis as demonstrated by indirect lymphography.** *Clin Exp Metastasis* 1988, **6**(4):291-299.
190. Pepper MS, Skobe M: **Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties.** *The Journal of cell biology* 2003, **163**(2):209-213.
191. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M: **Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis.** *Nature medicine* 2001, **7**(2):192-198.
192. Bono P, Wasenius VM, Heikkila P, Lundin J, Jackson DG, Joensuu H: **High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(21):7144-7149.
193. Dadras SS, Paul T, Bertocini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, Ellwanger U, Garbe C, Mihm MC, Detmar M: **Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival.** *The American journal of pathology* 2003, **162**(6):1951-1960.
194. Cao R, Bjorn Dahl MA, Religa P, Clasper S, Garvin S, Galter D, Meister B, Ikomi F, Tritsarlis K, Dissing S *et al*: **PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis.** *Cancer Cell* 2004, **6**(4):333-345.
195. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yla-Herttuala S, Jaattela M, Alitalo K: **Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth.** *Cancer research* 2001, **61**(5):1786-1790.
196. Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, Jackson DG, Alitalo K, Harkonen PL: **VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors.** *International journal of cancer* 2002, **98**(6):946-951.
197. Schluter K, Gassmann P, Enns A, Korb T, Hemping-Bovenkerk A, Holzen J, Haier J: **Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential.** *The American journal of pathology* 2006, **169**(3):1064-1073.
198. Brown DM, Ruoslahti E: **Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis.** *Cancer Cell* 2004, **5**(4):365-374.
199. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massague J: **Genes that mediate breast cancer metastasis to lung.** *Nature* 2005, **436**(7050):518-524.
200. Wetterwald A, van der Pluijm G, Que I, Sijmons B, Buijs J, Karperien M, Lowik CW, Gautschi E, Thalmann GN, Cecchini MG: **Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease.** *The American journal of pathology* 2002, **160**(3):1143-1153.
201. Buijs JT, Rentsch CA, van der Horst G, van Overveld PG, Wetterwald A, Schwaninger R, Henriquez NV, Ten Dijke P, Borovecki F, Markwalder R *et al*: **BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo.** *The American journal of pathology* 2007, **171**(3):1047-1057.
202. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massague J: **A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone.** *Cancer Cell* 2003, **3**(6):537-549.
203. Janowski M: **Functional diversity of SDF-1 splicing variants.** *Cell Adh Migr* 2009, **3**(3):243-249.
204. Mohle R, Moore MA, Nachman RL, Rafii S: **Transendothelial migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line.** *Blood* 1997, **89**(1):72-80.

205. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN *et al*: **Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.** *Nature* 2001, **410**(6824):50-56.
206. Sun YX, Wang J, Shelburne CE, Lopatin DE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Pienta KJ, Taichman RS: **Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo.** *Journal of cellular biochemistry* 2003, **89**(3):462-473.
207. Sun YX, Fang M, Wang J, Cooper CR, Pienta KJ, Taichman RS: **Expression and activation of alpha v beta 3 integrins by SDF-1/CXC12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells.** *Prostate* 2007, **67**(1):61-73.
208. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D: **Preparing the "soil": the premetastatic niche.** *Cancer research* 2006, **66**(23):11089-11093.
209. Paget S: **The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889.** *Cancer Metastasis Rev* 1989, **8**(2):98-101.
210. Keck A-V, Pecherstorfer M: **Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen.** *Journal für Mineralstoffwechsel* 2003, **10**(2):6-11.
211. Teitelbaum SL: **Bone resorption by osteoclasts.** *Science (New York, NY)* 2000, **289**(5484):1504-1508.
212. Boyde A, Maconnachie E, Reid SA, Delling G, Mundy GR: **Scanning electron microscopy in bone pathology: review of methods, potential and applications.** *Scan Electron Microsc* 1986(Pt 4):1537-1554.
213. Charhon SA, Chapuy MC, Delvin EE, Valentin-Opran A, Edouard CM, Meunier PJ: **Histomorphometric analysis of sclerotic bone metastases from prostatic carcinoma special reference to osteomalacia.** *Cancer* 1983, **51**(5):918-924.
214. Manolagas SC: **Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis.** *Endocrine reviews* 2000, **21**(2):115-137.
215. Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Hiraga T: **Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma.** *Cancer* 2000, **88**(12 Suppl):2979-2988.
216. Pelger RC, Hamdy NA, Zwinderman AH, Lycklama a Nijeholt AA, Papapoulos SE: **Effects of the bisphosphonate olpadronate in patients with carcinoma of the prostate metastatic to the skeleton.** *Bone* 1998, **22**(4):403-408.
217. Mundy GR: **Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(8):584-593.
218. Guise TA, Kozlow WM, Heras-Herzig A, Padalecki SS, Yin JJ, Chirgwin JM: **Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone.** *Clin Breast Cancer* 2005, **5** Suppl(2):S46-53.
219. Mundy GR: **Mechanisms of osteolytic bone destruction.** *Bone* 1991, **12** Suppl 1:S1-6.
220. Powell GJ, Southby J, Danks JA, Stillwell RG, Hayman JA, Henderson MA, Bennett RC, Martin TJ: **Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites.** *Cancer research* 1991, **51**(11):3059-3061.
221. Southby J, Kissin MW, Danks JA, Hayman JA, Moseley JM, Henderson MA, Bennett RC, Martin TJ: **Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in human breast cancer.** *Cancer research* 1990, **50**(23):7710-7716.
222. Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR, Guise TA: **TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development.** *The Journal of clinical investigation* 1999, **103**(2):197-206.
223. Park BK, Zhang H, Zeng Q, Dai J, Keller ET, Giordano T, Gu K, Shah V, Pei L, Zarbo RJ *et al*: **NF-kappaB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF.** *Nature medicine* 2007, **13**(1):62-69.
224. Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberger MA, Simons JW: **Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate.** *Nature medicine* 1995, **1**(9):944-949.
225. Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, Elliott J, Horwood NJ, Martin TJ, Gillespie MT: **Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation.** *Endocrinology* 1999, **140**(10):4451-4458.
226. Zhang J, Dai J, Qi Y, Lin DL, Smith P, Strayhorn C, Mizokami A, Fu Z, Westman J, Keller ET: **Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone.** *The Journal of clinical investigation* 2001, **107**(10):1235-1244.

227. Alix-Panabieres C, Riethdorf S, Pantel K: **Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(16):5013-5021.
228. Psaila B, Lyden D: **The metastatic niche: adapting the foreign soil.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**(4):285-293.
229. Li L, Neaves WB: **Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters.** *Cancer research* 2006, **66**(9):4553-4557.
230. Zhang J, Li L: **Stem cell niche: microenvironment and beyond.** *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(15):9499-9503.
231. Yin T, Li L: **The stem cell niches in bone.** *The Journal of clinical investigation* 2006, **116**(5):1195-1201.
232. Psaila B, Kaplan RN, Port ER, Lyden D: **Priming the 'soil' for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche.** *Breast Dis* 2006, **26**:65-74.
233. Scadden DT: **The stem-cell niche as an entity of action.** *Nature* 2006, **441**(7097):1075-1079.
234. Sneddon JB, Werb Z: **Location, location, location: the cancer stem cell niche.** *Cell Stem Cell* 2007, **1**(6):607-611.
235. Folkman J: **Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis.** *Semin Oncol* 2002, **29**(6 Suppl 16):15-18.
236. Joyce JA, Hanahan D: **Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer.** *Cell Cycle* 2004, **3**(12):1516-1619.
237. Weigelt B, Bissell MJ: **Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer.** *Semin Cancer Biol* 2008, **18**(5):311-321.
238. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F: **Cancer-related inflammation.** *Nature* 2008, **454**(7203):436-444.
239. Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, Le QT, Giaccia AJ: **Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche.** *Cancer Cell* 2009, **15**(1):35-44.
240. Bidard FC, Pierga JY, Vincent-Salomon A, Poupon MF: **A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis?** *Cancer Metastasis Rev* 2008, **27**(1):5-10.
241. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC: **Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases.** *The American journal of pathology* 1998, **153**(3):865-873.
242. Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, Chambers AF, MacDonald IC: **Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency.** *Cancer research* 2000, **60**(9):2541-2546.
243. Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y: **Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis.** *Nat Cell Biol* 2006, **8**(12):1369-1375.
244. Siclari VA, Guise TA, Chirgwin JM: **Molecular interactions between breast cancer cells and the bone microenvironment drive skeletal metastases.** *Cancer Metastasis Rev* 2006, **25**(4):621-633.
245. Mantovani A: **Cancer: Inflaming metastasis.** *Nature* 2009, **457**(7225):36-37.
246. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL, Karin M: **Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis.** *Nature* 2009, **457**(7225):102-106.
247. Yang L, Moses HL: **Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer?** *Cancer research* 2008, **68**(22):9107-9111.
248. Jin DK, Shido K, Kopp HG, Petit I, Shmelkov SV, Young LM, Hooper AT, Amano H, Avecilla ST, Heissig B *et al*: **Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes.** *Nature medicine* 2006, **12**(5):557-567.
249. Italiano JE, Jr., Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL: **Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released.** *Blood* 2008, **111**(3):1227-1233.
250. Rafii DC, Psaila B, Butler J, Jin DK, Lyden D: **Regulation of vasculogenesis by platelet-mediated recruitment of bone marrow-derived cells.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008, **28**(2):217-222.
251. Kalluri R, Zeisberg M: **Fibroblasts in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(5):392-401.
252. Cheng JD, Weiner LM: **Tumors and their microenvironments: tilling the soil. Commentary re: A. M. Scott et al., A Phase I dose-escalation study of sibtuzumab in**

- patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin. Cancer Res.*, **9**: 1639-1647, 2003. *Clin Cancer Res* 2003, **9**(5):1590-1595.
253. van Deventer HW, Wu QP, Bergstralh DT, Davis BK, O'Connor BP, Ting JP, Serody JS: **C-C chemokine receptor 5 on pulmonary fibrocytes facilitates migration and promotes metastasis via matrix metalloproteinase 9.** *The American journal of pathology* 2008, **173**(1):253-264.
254. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M: **MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis.** *Cancer Cell* 2002, **2**(4):289-300.
255. Denko NC, Fontana LA, Hudson KM, Sutphin PD, Raychaudhuri S, Altman R, Giaccia AJ: **Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns.** *Oncogene* 2003, **22**(37):5907-5914.
256. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ: **Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis.** *Nature* 2006, **440**(7088):1222-1226.
257. Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, Post M: **Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3).** *The Journal of clinical investigation* 2000, **105**(5):577-587.
258. Fogelgren B, Polgar N, Szauter KM, Ujfaludi Z, Laczko R, Fong KS, Csiszar K: **Cellular fibronectin binds to lysyl oxidase with high affinity and is critical for its proteolytic activation.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(26):24690-24697.
259. http://www.osteoporosezentrum-hamburg.de/index.php?EPquery=fragen_zur_osteoporose
260. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, Morony S, Rubin E, Sarao R, Hojilla CV *et al*: **Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL.** *Nature* 2006, **440**(7084):692-696.
261. Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE, Kaiser HE: **The spontaneous regression of neoplasms in mammals: possible mechanisms and their application in immunotherapy.** *In Vivo* 1998, **12**(1):107-122.
262. Challis GB, Stam HJ: **The spontaneous regression of cancer. A review of cases from 1900 to 1987.** *Acta Oncol* 1990, **29**(5):545-550.
263. Cole WH: **Efforts to explain spontaneous regression of cancer.** *J Surg Oncol* 1981, **17**(3):201-209.
264. Everson TC: **Spontaneous regression of cancer.** *Prog Clin Cancer* 1967, **3**:79-95.
265. Kalager M, Bretthauer M: **Spontaneous regression of invasive breast cancer: does this study answer the question?** *Arch Intern Med* 2009, **169**(10):997.
266. Papac RJ: **Spontaneous regression of cancer: possible mechanisms.** *In Vivo* 1998, **12**(6):571-578.
267. Tarnowski GS, Mountain IM, Stock CC: **Influence of genotype of host on regression of solid and ascitic forms of sarcoma 180 and effect of chemotherapy on the solid form.** *Cancer research* 1973, **33**(8):1885-1888.
268. Alfaro G, Lomeli C, Ocadiz R, Ortega V, Barrera R, Ramirez M, Nava G: **Immunologic and genetic characterization of S180, a cell line of murine origin capable of growing in different inbred strains of mice.** *Vet Immunol Immunopathol* 1992, **30**(4):385-398.
269. Coffey JW, Hansen HJ: **Sequential synthesis of two 7 S lysins by rats challenged with mouse sarcoma-180 tumor cells.** *J Immunol* 1966, **96**(6):1021-1026.
270. Salaun J: **[Interactions between a malignant tumor and a teratoma grafted experimentally in the mouse and in the rat. II. The growth in the same host of a malignant tumor and a benign tumor].** *Eur J Cancer* 1968, **4**(4):413-424.
271. Cui Z, Willingham MC, Hicks AM, Alexander-Miller MA, Howard TD, Hawkins GA, Miller MS, Weir HM, Du W, DeLong CJ: **Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(11):6682-6687.
272. Hicks AM, Riedlinger G, Willingham MC, Alexander-Miller MA, Von Kap-Herr C, Pettenati MJ, Sanders AM, Weir HM, Du W, Kim J *et al*: **Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(20):7753-7758.
273. Austin S, Ziese M, Sternberg N: **A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons.** *Cell* 1981, **25**(3):729-736.
274. Nagy A: **Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring.** *Genesis* 2000, **26**(2):99-109.

275. Metzger D, Chambon P: **Site- and time-specific gene targeting in the mouse.** *Methods* 2001, **24**(1):71-80.
276. Sauer B, Henderson N: **Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, **85**(14):5166-5170.
277. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K: **Inducible gene targeting in mice.** *Science (New York, NY)* 1995, **269**(5229):1427-1429.
278. Dacquin R, Starbuck M, Schinke T, Karsenty G: **Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast.** *Dev Dyn* 2002, **224**(2):245-251.
279. Watson SA, Morris TM: **Theoretical Considerations in Using Animal Models of Metastasis and Brief Methodology for In Vivo Colorectal Cancer Models in SCID and Nude Mice.** In., vol. 58; 2001: 195-204.
280. Arguello F, Baggs RB, Frantz CN: **A murine model of experimental metastasis to bone and bone marrow.** *Cancer research* 1988, **48**(23):6876-6881.
281. Sadikot RT, Blackwell TS: **Bioluminescence imaging.** *Proc Am Thorac Soc* 2005, **2**(6):537-540, 511-532.
282. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr.: **Breast tumor cell lines from pleural effusions.** *J Natl Cancer Inst* 1974, **53**(3):661-674.
283. van der Pluijm G, Que I, Sijmons B, Buijs JT, Lowik CW, Wetterwald A, Thalmann GN, Papapoulos SE, Cecchini MG: **Interference with the microenvironmental support impairs the de novo formation of bone metastases in vivo.** *Cancer research* 2005, **65**(17):7682-7690.
284. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW: **Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).** *Invest Urol* 1979, **17**(1):16-23.
285. Konnikova L, Kotecki M, Kruger MM, Cochran BH: **Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells.** *BMC Cancer* 2003, **3**:23.
286. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA *et al*: **Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells.** *RNA* 2003, **9**(4):493-501.
287. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D: **Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery.** *Journal of virology* 1998, **72**(12):9873-9880.
288. Schmitz S: **Der Experimentator: Zellkultur.** Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag 2007:134-136.
289. Engvall E, Ruoslahti E: **Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen.** *International journal of cancer* 1977, **20**(1):1-5.
290. Engvall E, Perlmann P: **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.** *Immunochemistry* 1971, **8**(9):871-874.
291. Deno DC, Saba TM, Lewis EP: **Kinetics of endogenously labeled plasma fibronectin: incorporation into tissues.** *The American journal of physiology* 1983, **245**(4):R564-575.
292. Freije JM, Lawrence JA, Hollingshead MG, De la Rosa A, Narayanan V, Grever M, Sausville EA, Paull K, Steeg PS: **Identification of compounds with preferential inhibitory activity against low-Nm23-expressing human breast carcinoma and melanoma cell lines.** *Nature medicine* 1997, **3**(4):395-401.
293. Guy CT, Cardoso G: **Transgenic Animal Models.** In., vol. 58; 2001: 231-249.
294. Price JE: **Xenograft Models in Immunodeficient Animals.** In., vol. 58; 2001: 205-213.
295. Basse P, Hokland P, Heron I, Hokland M: **Fate of tumor cells injected into left ventricle of heart in BALB/c mice: role of natural killer cells.** *J Natl Cancer Inst* 1988, **80**(9):657-665.
296. Rice BW, Cable MD, Nelson MB: **In vivo imaging of light-emitting probes.** *Journal of biomedical optics* 2001, **6**(4):432-440.
297. Miloud T, Henrich C, Hammerling GJ: **Quantitative comparison of click beetle and firefly luciferases for in vivo bioluminescence imaging.** *Journal of biomedical optics* 2007, **12**(5):054018.
298. Zhao H, Doyle TC, Coquoz O, Kalish F, Rice BW, Contag CH: **Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection in vivo.** *Journal of biomedical optics* 2005, **10**(4):41210.
299. van der Pluijm G, Sijmons B, Vloedgraven H, Deckers M, Papapoulos S, Lowik C: **Monitoring metastatic behavior of human tumor cells in mice with species-specific polymerase chain reaction: elevated expression of angiogenesis and bone resorption stimulators by breast cancer in bone metastases.** *J Bone Miner Res* 2001, **16**(6):1077-1091.

300. Ohnishi T, Hiraga S, Izumoto S, Matsumura H, Kanemura Y, Arita N, Hayakawa T: **Role of fibronectin-stimulated tumor cell migration in glioma invasion in vivo: clinical significance of fibronectin and fibronectin receptor expressed in human glioma tissues.** *Clin Exp Metastasis* 1998, **16**(8):729-741.
301. Kawelke N, Bentmann A, Hackl N, Hager HD, Feick P, Geursen A, Singer MV, Nakchbandi IA: **Isoform of fibronectin mediates bone loss in patients with primary biliary cirrhosis by suppressing bone formation.** *J Bone Miner Res* 2008, **23**(8):1278-1286.
302. Pinkert CA, Ornitz DM, Brinster RL, Palmiter RD: **An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice.** *Genes & development* 1987, **1**(3):268-276.
303. Postic C, Magnuson MA: **DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age.** *Genesis* 2000, **26**(2):149-150.
304. Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, Shelton KD, Lindner J, Cherrington AD, Magnuson MA: **Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(1):305-315.
305. Ricote M, Snyder CS, Leung HY, Chen J, Chien KR, Glass CK: **Normal hematopoiesis after conditional targeting of RXRalpha in murine hematopoietic stem/progenitor cells.** *J Leukoc Biol* 2006, **80**(4):850-861.
306. Schneider A, Zhang Y, Guan Y, Davis LS, Breyer MD: **Differential, inducible gene targeting in renal epithelia, vascular endothelium, and viscera of Mx1Cre mice.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2003, **284**(2):F411-417.
307. Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, Boyce BF, Yoneda T, Mundy GR: **Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis.** *The Journal of clinical investigation* 1996, **98**(7):1544-1549.
308. Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM: **NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival.** *The Journal of cell biology* 1998, **141**(4):1083-1093.
309. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA: **Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels.** *Cell* 1994, **79**(7):1157-1164.
310. Wilson A, Trumpp A: **Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches.** *Nat Rev Immunol* 2006, **6**(2):93-106.
311. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL: **Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency.** *Blood* 2004, **103**(9):3258-3264.
312. Taichman R, Reilly M, Verma R, Ehrenman K, Emerson S: **Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors.** *Br J Haematol* 2001, **112**(2):438-448.
313. Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG: **Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures.** *Blood* 1996, **87**(2):518-524.
314. Stein GS, Lian JB: **Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype.** *Endocrine reviews* 1993, **14**(4):424-442.
315. Rossert J, Eberspaecher H, de Crombrughe B: **Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice.** *The Journal of cell biology* 1995, **129**(5):1421-1432.
316. Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, Malluche H, Zhao G, Rosen CJ, Efstratiadis A *et al*: **Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(46):44005-44012.
317. Dacic S, Kalajzic I, Visnjic D, Lichtler AC, Rowe DW: **Col1a1-driven transgenic markers of osteoblast lineage progression.** *J Bone Miner Res* 2001, **16**(7):1228-1236.
318. Liu F, Woitge HW, Braut A, Kronenberg MS, Lichtler AC, Mina M, Kream BE: **Expression and activity of osteoblast-targeted Cre recombinase transgenes in murine skeletal tissues.** *The International journal of developmental biology* 2004, **48**(7):645-653.
319. Xie Y, Yin T, Wiegand W, He XC, Miller D, Stark D, Perko K, Alexander R, Schwartz J, Grindley JC *et al*: **Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging.** *Nature* 2009, **457**(7225):97-101.
320. Askmyr M, Sims NA, Martin TJ, Purton LE: **What is the true nature of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche?** *Trends Endocrinol Metab* 2009, **20**(6):303-309.

321. Brown JE, Cook RJ, Major P, Lipton A, Saad F, Smith M, Lee KA, Zheng M, Hei YJ, Coleman RE: **Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer, and other solid tumors.** *J Natl Cancer Inst* 2005, **97**(1):59-69.
322. Costa L, Demers LM, Gouveia-Oliveira A, Schaller J, Costa EB, de Moura MC, Lipton A: **Prospective evaluation of the peptide-bound collagen type I cross-links N-telopeptide and C-telopeptide in predicting bone metastases status.** *J Clin Oncol* 2002, **20**(3):850-856.
323. Kilian O, Dahse R, Alt V, Zardi L, Rosenhahn J, Exner U, Battmann A, Schnettler R, Kosmehl H: **Expression of EDA+ and EDB+ fibronectin splice variants in bone.** *Bone* 2004, **35**(6):1334-1345.
324. Gu Y, Sorokin L, Durbeej M, Hjalt T, Jonsson JI, Ekblom M: **Characterization of bone marrow laminins and identification of alpha5-containing laminins as adhesive proteins for multipotent hematopoietic FDCP-Mix cells.** *Blood* 1999, **93**(8):2533-2542.
325. Chia J, Kusuma N, Anderson R, Parker B, Bidwell B, Zamurs L, Nice E, Pouliot N: **Evidence for a role of tumor-derived laminin-511 in the metastatic progression of breast cancer.** *The American journal of pathology* 2007, **170**(6):2135-2148.
326. Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R, Noonan DM, Natali PG, Albini A: **The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity.** *International journal of cancer* 2000, **87**(3):336-342.
327. Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, Ponomarev V, Gerald WL, Blasberg R, Massague J: **Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors.** *The Journal of clinical investigation* 2005, **115**(1):44-55.
328. Humphries MJ, Olden K, Yamada KM: **A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells.** *Science (New York, NY)* 1986, **233**(4762):467-470.
329. Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL, Bugge TH: **Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells.** *Blood* 2000, **96**(10):3302-3309.
330. Akasu R, From L, Kahn HJ: **Characterization of the mononuclear infiltrate involved in regression of halo nevi.** *J Cutan Pathol* 1994, **21**(4):302-311.
331. Papac RJ: **Spontaneous regression of cancer.** *Cancer Treat Rev* 1996, **22**(6):395-423.
332. Burnet FM: **Immunological surveillance in neoplasia.** *Transplant Rev* 1971, **7**:3-25.
333. Thomas L: **On immunosurveillance in human cancer.** *Yale J Biol Med* 1982, **55**(3-4):329-333.
334. Graziano DF, Finn OJ: **Tumor antigens and tumor antigen discovery.** *Cancer Treat Res* 2005, **123**:89-111.
335. Janeway C, Murphy KP, Travers P, Walport M: **Janeway's immuno biology.** New York: Garland Science; 2008.
336. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD: **The three Es of cancer immunoediting.** *Annu Rev Immunol* 2004, **22**:329-360.
337. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC: **Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells.** *Science (New York, NY)* 2001, **294**(5542):605-609.
338. Smith KA: **Interleukin-2: inception, impact, and implications.** *Science (New York, NY)* 1988, **240**(4856):1169-1176.
339. Talmadge JE: **Immunoregulation and immunostimulation of murine lymphocytes by recombinant human interleukin-2.** *J Biol Response Mod* 1985, **4**(1):18-34.
340. Ikehara S, Pahwa RN, Fernandes G, Hansen CT, Good RA: **Functional T cells in athymic nude mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984, **81**(3):886-888.
341. Maleckar JR, Sherman LA: **The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice.** *J Immunol* 1987, **138**(11):3873-3876.
342. Debinski W, Obiri NI, Pastan I, Puri RK: **A novel chimeric protein composed of interleukin 13 and Pseudomonas exotoxin is highly cytotoxic to human carcinoma cells expressing receptors for interleukin 13 and interleukin 4.** *The Journal of biological chemistry* 1995, **270**(28):16775-16780.
343. Cormier SA, Taranova AG, Bedient C, Nguyen T, Protheroe C, Pero R, Dimina D, Ochkur SI, O'Neill K, Colbert D *et al*: **Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response.** *J Leukoc Biol* 2006, **79**(6):1131-1139.
344. Jacobsen EA, Taranova AG, Lee NA, Lee JJ: **Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation?** *J Allergy Clin Immunol* 2007, **119**(6):1313-1320.

-
345. Hicks AM, Willingham MC, Du W, Pang CS, Old LJ, Cui Z: **Effector mechanisms of the anti-cancer immune responses of macrophages in SR/CR mice.** *Cancer Immun* 2006, **6**:11.
346. Hiyama E, Hiyama K, Nishiyama M, Reynolds CP, Shay JW, Yokoyama T: **Differential gene expression profiles between neuroblastomas with high telomerase activity and low telomerase activity.** *J Pediatr Surg* 2003, **38**(12):1730-1734.
347. Inoue T, Yoneda K, Kakurai M, Fujita S, Manabe M, Demitsu T: **Alteration of mast cell proliferation/apoptosis and expression of stem cell factor in the regression of mastocytoma--report of a case and a serial immunohistochemical study.** *J Cutan Pathol* 2002, **29**(5):305-312.
348. Kitanaka C, Kato K, Ijiri R, Sakurada K, Tomiyama A, Noguchi K, Nagashima Y, Nakagawara A, Momoi T, Toyoda Y *et al*: **Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression.** *J Natl Cancer Inst* 2002, **94**(5):358-368.
349. Nakagawara A, Nakamura Y, Ikeda H, Hiwasa T, Kuida K, Su MS, Zhao H, Cnaan A, Sakiyama S: **High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) and CPP32 in favorable human neuroblastomas.** *Cancer research* 1997, **57**(20):4578-4584.
350. Lan L, Trempus C, Gilmour SK: **Inhibition of ornithine decarboxylase (ODC) decreases tumor vascularization and reverses spontaneous tumors in ODC/Ras transgenic mice.** *Cancer research* 2000, **60**(20):5696-5703.
351. Sparano JA, Gray R, Giantonio B, O'Dwyer P, Comis RL: **Evaluating antiangiogenesis agents in the clinic: the Eastern Cooperative Oncology Group Portfolio of Clinical Trials.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(4):1206-1211.
352. Pakhmode V: **Understanding the possible mechanisms of spontaneous regression of oral cancer.** *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 2007, **11**(1):2-4.

VIII. Anhang

VIII.1. Vektorkarte

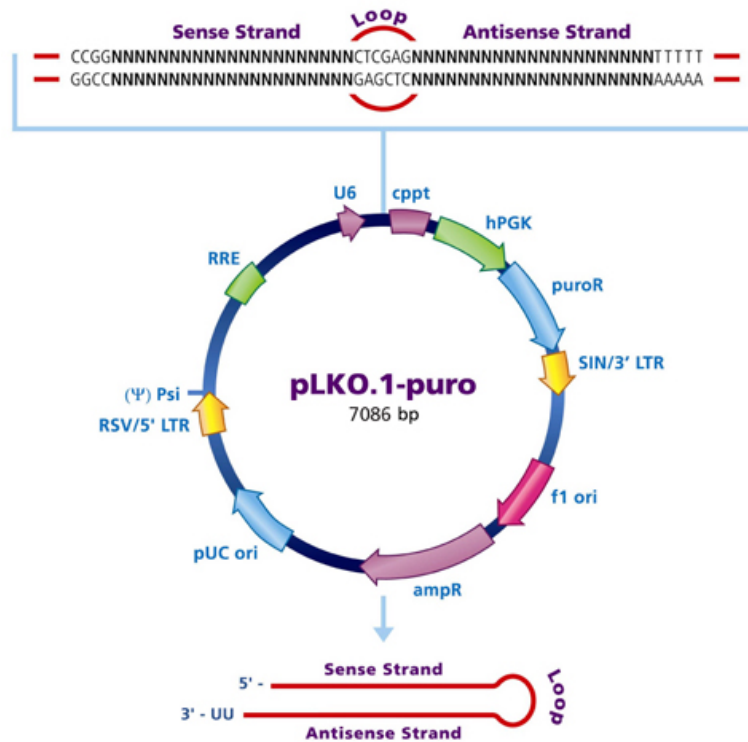


Abbildung VIII.1: Vektorkarte des Vektorkonstrukt MISSION® pLKO.1-puro

Schematische Darstellung der Vektorkarte des leeren Vektorkonstrukts, welches in lentivirale Transduktions-Partikel verpackt, für die virale Transduktion der Tumorzelllinien (MDA bzw. PC3) verwendet wurde. Des Weiteren wurden Vektorkonstrukte mit 5 unterschiedliche shRNA-Sequenzen zur RNAi-vermittelten Degradation von Fibronectin-mRNA im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt (nicht dargestellt). RSV/5' LTR: chimäres LTR (engl. „long terminal repeat“) involviert bei Replikation und Integration; Psi (ψ): Verpackungs- und Dimerisierungssignal; RRE: Beteiligt beim Kernexport des viralen Genoms; U6: Polymerase III Promoter präzise Initiation und Termination der Transkription der jeweiligen shRNA Insertion; cPPT: Rolle bei der cDNA Synthese und Kernimport der Zielzellen; hPGK: Promoter des Puromycin-Resistenz-Gen; puroR: Puromycin-Resistenz-Gen für die stabile Selektion transduzierter Zellen; SIN/3' LTR: LTR involviert bei Replikation und Integration

Lebenslauf

*personenbezogene Angaben sind aus Datenschutzgründen aus dieser elektronischen Version entfernt worden

Danksagungen

*personenbezogene Angaben sind aus Datenschutzgründen aus dieser elektronischen Version entfernt worden

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, den 04.01.2010

Norman Hackl