



**Fakultät für Medizin**

**Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie**

**Untersuchungen zum Beitrag von Tumorzell-L1CAM  
zu frühen und späten Schritten der Metastasierung  
nicht-solider und solider Tumorzellen**

**Dirk Weinspach**

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

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

**Vorsitzender:** Univ.-Prof. Dr. P. A. Knolle

**Prüfer der Dissertation:**

1. apl. Prof. Dr. A. Krüger
2. Univ.-Prof. Dr. A. Itzen

Die Dissertation wurde am 11.11.2014 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.03.2015 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>5</b>
<b>Summary.....</b>	<b>7</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
2.1 Krebsepidemiologie, Modelle der Krebsentstehung und Krebsmarkenzeichen.....	8
2.2 Invasions-Metastasierungs-Kaskade und Zeitpunkt der Metastasierung .....	11
2.3 Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1CAM .....	14
2.4 Die funktionelle Rolle von L1CAM in der Tumorprogression und Metastasierung .....	15
2.5 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).....	16
2.6 MMP-2 (Gelatinase A): Struktur und funktionelle Bedeutung in der Tumorprogression und Metastasierung .....	17
2.7 MMP-9 (Gelatinase B): Struktur und funktionelle Bedeutung in der Tumorprogression und Metastasierung .....	18
<b>3 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>21</b>
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
4.1 Material .....	22
4.1.1 Verwendete Versuchstiere .....	22
4.1.2 Zelllinien .....	22
4.1.3 Bakterien .....	23
4.1.4 Plasmide.....	23
4.1.5 Oligonukleotide (Primer).....	24
4.1.6 Antikörper .....	25
4.1.7 Medien und Zellkultur-Lösungen .....	26
4.1.8 Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien .....	26
4.1.9 Puffer und Lösungen .....	27
4.1.10 Standards und Kits .....	29
4.1.11 Chemikalien.....	30
4.1.12 Verbrauchsmaterialien.....	31
4.1.13 Laborgeräte .....	33
4.1.14 Software .....	34
4.2 Methoden .....	35

4.2.1 Tierexperimentelle Methoden .....	35
4.2.1.1 Metastasierungsmodelle.....	35
4.2.1.2 Probengewinnung .....	36
4.2.2 Zellbiologische Methoden.....	36
4.2.2.1 Zellkulturmedien .....	36
4.2.2.2 Kultivierung von Zellen .....	37
4.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl .....	37
4.2.2.4 Produktion retroviraler Zellkulturüberstände in 293T-Zellen.....	38
4.2.2.5 Retrovirale Infektion adhärenter Zellen .....	38
4.2.2.6 Ko-Transfektion zur retroviralen Infektion von Suspensionszellen .....	39
4.2.2.7 Selektion infizierter Zellen mit Antibiotika .....	39
4.2.2.8 Proliferationsassay .....	40
4.2.2.9 <i>Boyden Chamber</i> -Migrationsassay .....	40
4.2.2.10 <i>Boyden Chamber</i> -Invasionsassay.....	41
4.2.3 Molekularbiologische Methoden .....	42
4.2.3.1 Transformation von Bakterien .....	42
4.2.3.2 Kultivierung und Selektion von Bakterien .....	42
4.2.3.3 DNA-Maxi-Präparation .....	43
4.2.3.4 RNA-Isolierung aus Gewebe .....	43
4.2.3.5 RNA-Isolierung aus Zellen.....	43
4.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	44
4.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	45
4.2.3.8 Reverse Transkription .....	45
4.2.3.9 <i>Real-time</i> Polymerasekettenreaktion.....	46
4.2.4 Proteinbiochemische Methoden .....	47
4.2.4.1 Immunpräzipitation .....	47
4.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	48
4.2.4.3 Western Blot.....	48
4.2.5 Immunologische Methoden .....	51
4.2.5.1 Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenmolekülen .....	51
4.2.5.2 Herstellung von Kryoschnitten.....	52
4.2.5.3 <i>In situ</i> -Zymographie.....	52
4.2.5.4 Herstellung von Paraffinschnitten.....	53
4.2.5.5 Immunhistochemische PCNA-Färbung .....	53

4.2.6 X-Gal-Färbungen.....	54
4.2.6.1 X-Gal-Färbung von Organen .....	54
4.2.6.2 X-Gal-Färbung von Kryoschnitten .....	55
4.2.7 Statistische Analysen .....	55
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
5.1 Die Suppression von L1CAM in murinen T-Lymphom-Zellen führte zu verringertes Migration und Invasion <i>in vitro</i> .....	56
5.2 L1CAM fördert die spontane Leber-Metastasierung von L-CI.5s T-Lymphom- Zellen.....	57
5.3 L1CAM ist notwendig für das Auswachsen von Metastasen und die Tumorzellproliferation in der Leber .....	60
5.4 Die Expression von L1CAM korreliert mit erhöhter Expression von Matrix- Metalloproteinasen <i>in vitro</i> und gelatinolytischer Aktivität <i>in vivo</i> .....	61
5.5 Die spezifische Inhibition von MMP-2 und MMP-9 durch den synthetischen Gelatinase-Inhibitor SB-3CT ahmt den Phänotyp der L1CAM-Suppression nach.....	63
5.6 L1CAM reguliert das metastatische Potential von SKOV3ip Ovarialkarzinomzellen positiv .....	65
5.7 Die Verminderung des metastatischen Potentials von L-CI.5s-Zellen wurde durch die Verwendung einer zweiten gegen L1CAM gerichteten shRNA bestätigt.....	67
5.8 Die Verminderung des intrinsischen metastatischen Potentials von SKOV3ip- Zellen wurde durch die Verwendung einer zweiten gegen L1CAM gerichteten shRNA bestätigt.....	70
<b>6 Diskussion.....</b>	<b>73</b>
6.1 Der Einfluss von Tumorzell-L1CAM auf die Proliferation von Tumorzellen <i>in</i> <i>vitro</i> und das Wachstum von Tumoren <i>in vivo</i> ist abhängig vom Kontext....	73
6.2 Tumorzell-L1CAM ist ein wichtiger Regulator des metastatischen Potentials von Tumorzellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	74
6.3 Tumorzell-L1CAM erhöht die Effizienz der Metastasierung, indem es das Auswachsen der Metastasen im Zielorgan der Metastasierung fördert.....	76
6.4 Tumorzell-L1CAM fördert die Metastasierung, indem es die Expression der pro-metastatischen Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sowie die gelatinolytische Aktivität hochreguliert.....	78
6.5 Mögliche molekulare Mechanismen der L1CAM-abhängigen Regulation der pro-metastatischen Gelatinasen MMP-2 und MMP-9.....	79
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>

<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>11</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>114</b>
	Anhang.....	116
	Eigene Publikationen.....	117

# 1 Zusammenfassung

Die metastatische Disseminierung von Tumorzellen ist eine der Hauptursachen für die hohe Sterblichkeitsrate bei Krebserkrankungen. Die erfolgreiche Durchquerung der metastatischen Kaskade, u. a. die Absiedelung der Tumorzellen vom Primärtumor, die Invasion in das umgebende Gewebe, das Überleben in der Zirkulation und die effiziente Bildung von Metastasen im Zielorgan, stellt Tumorzellen vor große Herausforderungen. Zelladhäsionsmoleküle (CAMs, engl. *cell adhesion molecules*) spielen eine wichtige Rolle für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen von normalen Zellen und Tumorzellen. Veränderungen in der Expression von CAMs sind mitverantwortlich für die veränderte Interaktion von Tumorzellen mit Nachbarzellen und der extrazellulären Matrix (EZM). Das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1CAM (engl. *L1 cell adhesion molecule*) ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF-CAMs) mit wichtigen Funktionen in der Entwicklung des Nervensystems. Gleichzeitig ist die Expression von L1CAM bei Krebserkrankungen häufig erhöht und mit schlechter Prognose solider Tumoren verbunden. Ziel dieser Arbeit war es, durch die gezielte Herunterregulation von L1CAM in Tumorzellen die funktionelle Rolle von L1CAM besonders für die Metastasierung nicht-solider Tumoren aufzuklären und die funktionelle Bedeutung von L1CAM für die individuellen Schritte der metastatischen Kaskade zu untersuchen. Durch die shRNA-vermittelte Suppression von L1CAM in murinen T-Lymphom-Zellen konnte in einem spontanen Metastasierungsmodell das Überleben der Mäuse signifikant verlängert werden, während das Wachstum dieser Zellen als Primärtumor nicht verändert war. Diese Beobachtung korrelierte mit deutlich verminderter spontaner Metastasierung in die Leber. Die L1CAM-Suppression unterdrückte das metastatische Potential von Lymphom-Zellen und Karzinomzellen, wie durch die reduzierte Migration und Invasion *in vitro* und die verminderte experimentelle Metastasierung demonstriert. Auf molekularer Ebene bewirkte die Modulation der L1CAM-Expression in Tumorzellen eine reduzierte Expression der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 *in vitro* und eine verminderte gelatinolytische Aktivität in Primärtumoren und Metastasen *in vivo*. Die Behandlung der Tumorzellen mit dem Gelatinase-spezifischen Inhibitor SB-3CT resultierte in einer vergleichbaren Inhibition der Migration, Invasion und der gelatinolytischen Aktivität *in vivo* wie das *Silencing* von Tumorzell-L1CAM. Der in dieser Arbeit gefundene Einfluss von Tumorzell-L1CAM auf individuelle Schritte der

metastatischen Kaskade und die Aktivität der Gelatinasen heben das Potential möglicher gegen L1CAM gerichteter anti-metastatischer Therapien hervor.

### Summary

Metastatic dissemination of tumor cells is one of the main causes of cancer lethality. The successful completion of the metastatic cascade, including detachment of tumor cells from the primary tumor, invasion of the surrounding tissue, survival in the circulation and efficient formation of metastases in the target organ, presents a major challenge for tumor cells. Cell adhesion molecules (CAMs) play an important role for cell-cell- and cell-matrix interactions of normal and tumor cells. Changes in the expression of CAMs are jointly responsible for altered interactions of tumor cells with neighboring cells and the extracellular matrix (ECM). The neuronal cell adhesion molecule L1CAM (L1 cell adhesion molecule) is a member of the immunoglobulin superfamily (IgSF) of CAMs with important function during nervous system development. At the same time expression of L1CAM is frequently elevated in cancer patients and linked with bad prognosis of solid tumors. The present work aimed at elucidating the functional role of L1CAM especially in the metastasis of non-solid tumors and at investigating the functional impact of L1CAM on individual steps of the metastatic cascade by downregulating the expression of L1CAM in tumor cells. ShRNA-mediated suppression of L1CAM in murine T-lymphoma cells significantly improved survival of mice in a spontaneous metastasis model, while it did not alter growth of these cells at the intradermal primary tumor site. This observation correlated with markedly reduced spontaneous metastasis formation in the liver. Suppression of L1CAM attenuated the metastatic potential of lymphoma and carcinoma cells as demonstrated by decreased migration and invasion in vitro and reduced experimental metastasis formation in vivo. These effects of L1CAM silencing on the metastatic capabilities of the tumor cells were accompanied at the molecular level by decreased expression of the gelatinases MMP-2 and MMP-9 in vitro and reduced gelatin-degrading activity in primary tumors and liver metastases in vivo. Treatment of the tumor cells with the gelatinase-specific inhibitor SB-3CT resulted in a comparable inhibition of migration, invasion and gelatinolytic activity in vivo as had been observed for silencing of tumor cell-derived L1CAM. The finding of the present work that tumor cell-derived L1CAM impacts on distinct steps of the metastatic cascade and on gelatinase activity emphasizes the potential of possible L1CAM-interfering strategies in the limitation of metastatic spread of highly aggressive non-solid and solid malignancies.



## 2 Einleitung

### 2.1 Krebsepidemiologie, Modelle der Krebsentstehung und Krebsmarkenzeichen

Krebserkrankungen sind eine Gruppe von Krankheiten, die durch abnormales Zellwachstum und Gewebeneubildung (Neoplasie, Hyperplasie) gekennzeichnet sind. Die Zahl der Krebsneuerkrankungen betrug im Jahr 2010 in Deutschland nach Angaben der Broschüre „Krebsdaten in Deutschland 2009/2010“ insgesamt 477 300 (Krebstote: 218 258).<sup>1</sup> Für Europa wird die Zahl der Neuerkrankungen für 2012 auf ca. 3,44 Mio. (Krebstote: 1,75 Mio.) geschätzt [1], und für die USA für 2014 auf 1,67 Mio. (Krebstote: 0,59 Mio.) taxiert [2]. Damit ist Krebs für ca. 23 % Prozent aller Todesfälle in den USA verantwortlich und liegt hinter Herz-Kreislauf-Erkrankungen an zweiter Stelle der Todesursachen [3]. Das *National Cancer Institute*<sup>2</sup> der USA teilt Krebserkrankungen in fünf Klassen ein: epitheliale Tumoren (Karzinome), mesenchymale Tumoren (Sarkome) und Tumoren der blutbildenden Zellen (Leukämien), Tumoren der Zellen des Immunsystems (Lymphome, Myelome) und Tumoren mit Ursprung im Gehirn oder im Rückenmark (Tumoren des zentralen Nervensystems)<sup>3</sup>. Über diese Einteilung hinaus werden benigne und maligne Tumoren unterschieden. Während benigne Tumoren lokal begrenzt wachsen, besitzen maligne Tumoren das Potential in benachbarte Gewebe zu invadieren und in entfernte Gewebe des Körpers zu streuen (disseminieren) und dort Metastasen (Tochtergeschwülste) zu bilden. Die Metastasierung der Tumorzellen ist die hauptsächliche Todesursache der meisten Krebserkrankungen [4].

Doch was ist die Ursache für die Entstehung der Krebserkrankungen? Basierend auf experimentellen Ergebnissen und mathematischen Modellen sind fünf Modelle der Karzinogenese formuliert worden [5]. Das erste Modell betrachtet extrinsische Kanzerogene (Mutagene), die direkte Veränderungen an der DNA hervorrufen [6], als Ursache der Karzinogenese. Die Kanzerogene werden in biologische (virale

---

<sup>1</sup> Aus der Broschüre: Krebs in Deutschland 2009/2010, 9. Ausgabe 2013, Herausgeber: Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2013/krebs\\_in\\_deutschland\\_2013.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf?__blob=publicationFile)

<sup>2</sup> <http://www.cancer.gov/>

<sup>3</sup> <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>, Stand: 09.09.2014, 10:27 Uhr

Onkogene) [7-9], chemische [10-12] und physikalische Kanzerogene (ionisierende Strahlung) [13-16] unterschieden und können Mutationen in der DNA-Sequenz und die Bildung von DNA-Addukten bewirken.

Das zweite Modell betrachtet die Beeinträchtigung der genomischen Stabilität als Hauptursache für die Krebsentstehung [17,18]. Nach diesem Modell führen inaktivierende Mutationen in Genen, die an der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität beteiligt sind, wie z. B. Tumorsuppressorgenen und DNA-Reparaturgenen, zu einer Abfolge von Prozessen, die die Frequenz von Mutationen erhöhen [19,20], wie in der Hypothese des Mutator-Phänotyps postuliert [21,22]. Beispiele sind die Mutation des Rb-Tumorsuppressorgens im Falle des Retinoblastoms [23,24] oder des BRCA1-Tumorsuppressorgens im Falle des erblichen Brust- und Eierstockkrebses [25,26]. Die Konsequenz ist eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von Mutationen, mit anderen Worten genomische Instabilität. Die genetische Ursache der Krebserkrankungen, nämlich Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, ist in das Modell der Multischritt-Karzinogenese integriert worden [27-29].

Das dritte Modell beruht auf Beobachtungen, dass *Lifestyle*-Faktoren, wie z. B. Ernährung und Übergewicht, das Krebsrisiko modulieren, ohne die DNA-Sequenz zu verändern. Es wird davon ausgegangen, dass diese Faktoren die Funktionalität der DNA möglicherweise durch epigenetische Mechanismen verändern [30-32].

Das vierte Modell basiert auf einer Darwinistischen Interpretation der Karzinogenese [33]. Dieses Modell betrachtet Krebsentstehung und Tumorprogression als Sequenz aus klonaler Evolution, genetischer Diversifizierung und klonaler Selektion von Tumorzellen durch die Mikroumgebung. Wiederholte Zyklen von Mutationen und natürlicher Selektion führen zur Generierung und Anreicherung von Zellen, die optimal an die Bedingungen der Umgebung adaptiert sind (gemäß der in der Darwin'schen Evolutionstheorie beschriebenen natürlichen Selektion<sup>4</sup>) [33-35]. Mögliche Formen des Selektionsdruckes der Umgebung auf die Tumorzellen sind z. B. Hypoxie [36,37], Azidose [38,39], DNA-Schädigungs- bzw. DNA-Replikations-Stress, proteotoxischer Stress, mitotischer Stress, metabolischer Stress oder oxidativer Stress [40]. Diese Faktoren können zu einer selektiven Expansion

---

<sup>4</sup> Im Zusammenhang mit der bei Darwin erwähnten „Natürlichen Selektion“ wird häufig die Wendung „survival oft he fittest“ verwendet. Dieser Ausdruck stammt jedoch nicht von Darwin selbst, sondern wurde vom Philosophen Herbert Spencer geprägt. In: Spencer, Herbert (1864), *The Principles of Biology*, Vol. 1, London: Williams and Norgate.

spezialisierte Tumorzellsubpopulationen mit einem stark malignen, metastatischen Phänotyp führen [22,34,41].

Das fünfte Modell betrachtet nicht die einzelne Zelle als Einheit der Krebsentstehung, sondern das Gewebe als Ganzes. Danach wird die Krebsentstehung durch eine Störung der molekularen Mechanismen, die der Organisation von Geweben zu Grunde liegen, ausgelöst. Die Störung der Gewebe-Organisation (gemäß der *Tissue organization field theory*) erfolgt durch extrinsische Faktoren, wie z. B. durch hormonal wirksame Substanzen, die endokrine Mechanismen stören und die Suszeptibilität für Krebs erhöhen [42]. Eine Variation dieses Modells betrachtet morphostatische Felder als organisierendes Prinzip der Gewebearchitektur im erwachsenen Organismus analog zu morphogenetischen Feldern im Embryo. Danach begünstigt die Fehlregulation dieser morphostatischen Felder oder Grenzzonen zwischen zwei verschiedenen morphogenetischen Feldern die Krebsentstehung [43,44]. In Übereinstimmung mit einer Mikroumgebung-zentrierten Sichtweise der Krebsentstehung lassen sich maligne Tumorzellen durch ihre Transplantation in eine embryonale Umgebung reprogrammieren [45,46].

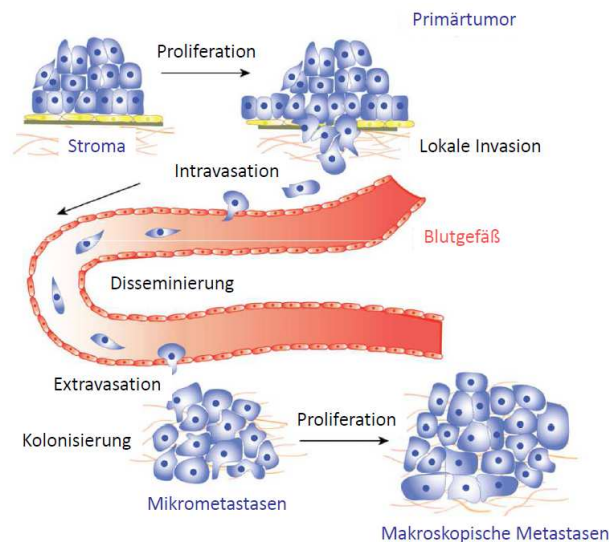
Epidemiologische Daten unterstützen die Hypothese, dass der limitierende Schritt der Karzinogenese nicht nur eine Zelle, sondern große Zahlen von Zellen betrifft. Für diese Sichtweise spricht, dass die Inzidenz der Krebserkrankungen für die Zahl der in einer Tumorzelle gefundenen Mutationen zu gering ist [47-49]. Als mögliche Erklärungen für diese Beobachtung werden zum einen das Auftreten eines Mutator-Phänotyps in einem frühen Stadium der Tumorprogression [21,22] und zum anderen die Kooperation von Zellen innerhalb eines Gewebes mit dem Ziel der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und des zellulären Phänotyps diskutiert [49]. Im zweiten Fall wäre eine Vielzahl von Mutationen verteilt über viele Zellen notwendig, um die genomische und die Gewebe-Integrität aufzuheben [49].

Tumorzellen sind durch eine Deregulation von Faktoren mit Onkogen- oder Tumorsuppressor-Funktion auf Gen- oder Proteinebene gekennzeichnet. Die Deregulation dieser Faktoren mit onkogener oder Tumor-supprimierender Funktion beruht auf somatischen Mutationen [50-52], Amplifikationen, Deletionen oder Fusionen von Genabschnitten [53-55], epigenetischen Mechanismen (Methylierung, Azetylierung) [56-58], deregulierten microRNAs [59,60] oder aberranten post-translationalen Modifikationen [61,62]. Mögliche Konsequenzen der erhöhten Aktivität eines Onkogenens oder der verringerten Aktivität eines

Tumorsuppressorgens [20,63,64] ist die aberrante Aktivierung von Signaltransduktionswegen [65,66] sowie der Erwerb von für (maligne) Tumorzellen charakteristische Markenzeichen (engl. *hallmarks of cancer*). Dazu zählen: die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren, Insensibilität gegenüber Wachstumsinhibierenden Signalen, Entgehen des programmierten Zelltods (Apoptose), unbegrenzte Replikation, fortgesetzte Angiogenese sowie Gewebe-Invasion und Metastasierung [67], die Deregulation des zellulären Energiemetabolismus' [68,69] und die Verhinderung der Vernichtung durch das Immunsystem [70]. Außerdem wird der Stress-Phänotyp von Tumorzellen, der die Anpassung von Tumorzellen an DNA-Schädigungs- bzw. DNA-Replikations-Stress, proteotoxischen Stress, mitotischen Stress, metabolischen Stress und oxidativen Stress umfasst, als Tumor-Markenzeichen diskutiert [40]. Jede dieser physiologischen Veränderungen ist mit dem Erwerb neuer molekularer Eigenschaften verbunden und bedeutet das erfolgreiche Durchbrechen eines zellulären anti-Tumor-Verteidigungsmechanismus' [67,70].

## **2.2 Invasions-Metastasierungs-Kaskade und Zeitpunkt der Metastasierung**

Die Metastasierung ist der entscheidende prognostische Parameter in fast allen neoplastischen, bösartigen Tumoren. Tatsächlich sterben ca. 90 % der Krebspatienten auf Grund der Ausbildung von Metastasen [4]. Bei Tumoren epithelialen Ursprungs müssen die Tumorzellen für die Ausbildung von Metastasen erfolgreich den Multi-Schritt-Prozess der Invasions-Metastasierungs-Kaskade durchlaufen (Abb. 1). Diese beinhaltet die Induktion der Angiogenese, die lokale Invasion der Tumorzellen in das umliegende Gewebe, die Intravasation der Tumorzellen in das Blutgefäßsystem, das Überleben der Tumorzellen in der Zirkulation, die Extravasation der Tumorzellen aus dem Blutgefäß am Zielort der Metastasierung, die Ausbildung von Mikrometastasen und das Auswachsen der Mikrometastasen zu sichtbaren Makrometastasen durch Wiederaufnahme der Proliferation [71,72]. Im Gegensatz dazu folgt die Disseminierung von nicht-soliden Tumoren, wie z. B. dem Lymphom, anderen Regeln und ist höchstwahrscheinlich die Konsequenz konservierten physiologischen Verhaltens der entarteten Zellen des Immunsystems [73].



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der metastatischen Kaskade für die Metastasierung solider Tumoren (modifiziert nach: Saxena & Christofori, 2013 Mol Oncol [74]). Diese beinhaltet die Proliferation der Tumorzellen im Primärtumor, die lokale Gewebeeinvasion der Tumorzellen, die Intravasation der Tumorzellen in die Zirkulation, das Überleben der Tumorzellen im Blutstrom, die Extravasation der Tumorzellen in das Zielorgan der Metastasierung, die Ausbildung von Mikrometastasen (Kolonisierung) und das Auswachsen zu Makrometastasen.

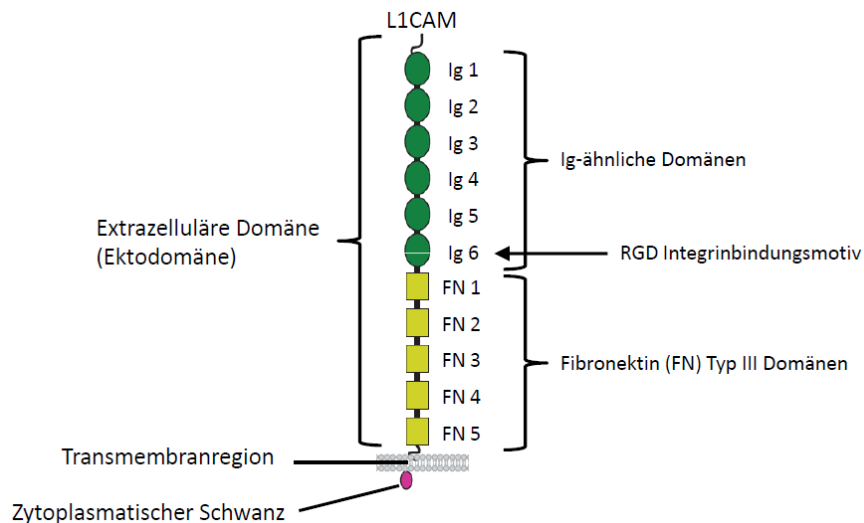
Hinsichtlich des Zeitpunktes der Metastasierung während der Progression des Primärtumors werden zwei verschiedene Modelle diskutiert, das Modell der klonalen Progression und das Modell der parallelen Progression [75]. Gemäß dem Modell der klonalen (oder linearen) Progression erfolgt die Disseminierung einzelner Tumorzellen ausgehend vom Primärtumor spät während der Tumorprogression, nachdem die Tumorzellen durch wiederholte Zyklen aus genetischer Veränderung und klonaler Selektion alle für die erfolgreiche Disseminierung notwendigen genetischen und phänotypischen Eigenschaften erlangt haben [41,76]. So weisen Primärtumoren und zugehörige Metastasen eine hohe Heterogenität und nur eine geringe Anzahl gleicher Mutationen auf, die auf eine gemeinsame klonale Vorläuferzelle hindeuten würden [77]. Die Analyse gemeinsamer Mutationen in Geweben von Patienten mit benignen, invasiven und metastatischen Kolorektalkarzinomen zeigte, dass die Progression eines großen benignen Tumors zu einem fortgeschrittenen, invasiven Tumor ca. 17 Jahre dauert, während ein fortgeschrittener Tumor die Fähigkeit zur Metastasierung innerhalb eines weniger als zwei Jahre umfassenden Zeitraums erwirbt. Außerdem sind nur wenige Mutationen notwendig, um eine invasive Tumorzelle zu einer metastasierenden Tumorzelle werden zu lassen [78]. Die Untersuchung sowohl des zeitlichen als auch des geographischen Verlaufs des Erwerbs von Mutationen während der

Tumorprogression sowie des klonalen Verhältnisses zwischen Metastasen und ihrem korrespondierenden Primärtumor in Pankreaskarzinompatienten zeigte, dass die Bildung von Metastasen ein spätes Ereignis während der Progression von Pankreaskarzinomen ist und dass Primärtumoren und Metastasen eine vergleichbare Heterogenität aufweisen [79]. Dagegen platziert das Modell der parallelen Progression die metastatische Disseminierung von Tumorzellen nicht an das zeitliche Ende der Tumorprogression, sondern geht davon aus, dass Tumorzellen bereits früh während der Tumorprogression den Primärtumor verlassen (disseminieren) und sie die genetischen Veränderungen, die sie für eine erfolgreiche Metastasierung benötigen, unabhängig vom Primärtumor erwerben [75]. Ergebnisse verschiedener Studien deuten tatsächlich darauf hin, dass Tumorzellen bereits früh während der Tumorprogression die Fähigkeit zur Disseminierung erlangen können [80-82]. So konnte in einem Brustkrebs-Mausmodell gezeigt werden, dass einzelne Tumorzellen die Basalmembran bereits im Stadium einer prä-invasiven atypischen Hyperplasie durchbrechen und disseminierte Tumorzellen (DTCs, engl. *disseminated tumor cells*) im Knochenmark und in der Lunge detektiert werden können, bevor der Primärtumor morphologische Anzeichen der Invasivität aufweist. Die Zellen exprimieren in diesem Stadium den EMT-regulierenden Transkriptionsfaktor Twist1 [83], welcher das migratorische und invasive Potential der Tumorzellen erhöht [84]. Außerdem generiert die Expression von Twist1 über die Induktion eines EMT Tumorzellen mit Stammzell-Charakteristika [85]. In Übereinstimmung damit sind Zellen mit Stammzell-Eigenschaften bereits im Stadium prä-maligner Läsionen und vor erfolgter Transformation in der Lage zu disseminieren [86]. Die Beobachtung, dass sich disseminierte Tumorzellen genetisch deutlich häufig von den entsprechenden Tumorzellen in Primärtumoren unterscheiden [83,87], macht deutlich, dass die genetische Heterogenität von Tumorzellen in Primärtumoren einerseits und von disseminierten und metastasierten Tumorzellen andererseits für eine erfolgreiche Behandlung von Krebspatienten berücksichtigt werden muss [88,89]. In ihrer Gesamtheit zeigen diese Ergebnisse, dass das Modell der linearen Progression als alleingültige Erklärung für die Abläufe während der Tumorprogression und der Entwicklung von Tumorzellen mit metastatischen Fähigkeiten nicht ausreicht [75,90]. Das Modell der parallelen Progression von Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen liefert für viele Beobachtungen in der Klinik bessere Erklärungen [75,91]. Unabhängig vom Zeitpunkt der Metastasierung benötigen Tumorzellen für

das erfolgreiche Durchlaufen der Invasions-Metastasierungs-Kaskade eine Vielzahl verschiedener Faktoren, wie z. B. Zelladhäsionsmoleküle [92,93], Proteasen [94,95], Zytokine und ihre Rezeptoren [96,97].

### 2.3 Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1CAM

Das L1 Zelladhäsionsmolekül (L1CAM, engl. *L1 cell adhesion molecule*) ist ein Transmembran-Glykoprotein aus der Immunglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle (IgSF-CAMs, engl. *immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules*) mit einer Größe von 200 bis 220 kDa. L1CAM ist das Gründungsmitglied der L1-Familie der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle bestehend aus L1CAM, CHL1 (engl. *close homolog of L1*) [98], Neurofascin [99] und Nr-CAM (engl. *NgCAM-related cell adhesion molecule*) [100]. Sequenz und Struktur von L1CAM sind evolutionär hochkonserviert [101,102]. L1CAM besteht aus sechs Immunglobulin (Ig)-Domänen, fünf Fibronektin Typ III-Wiederholungen, einer Transmembranregion und einer evolutionär stark konservierten zytoplasmatischen Region (Abb. 2) [103].



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von L1CAM (modifiziert nach: Shapiro et al., 2007 Annu Rev Neurosci [104]).

L1CAM besitzt wichtige Funktionen in der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems [105,106], indem es das Auswachsen von Neuriten [107,108], die Adhäsion und die Migration von Neuronen [109,110] sowie die Transduktion von Signalen vermittelt [111]. Die funktionelle Bedeutung von L1CAM für die Entwicklung des humanen Gehirns und die Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität wird durch Symptome in der Klinik, die mit Mutationen oder Polymorphismen des L1CAM-Gens auf dem q28-Lokus des X-Chromosoms einhergehen, wie die X-abhängige

geistige Retardierung oder Schizophrenie [112,113], und durch Studien an L1CAM-defizienten Mausmodellen [114,115] verdeutlicht. MASA (engl. *mental retardation, aphasia, shuffling gait, adducted thumbs*) [116,117] und CRASH (engl. *corpus callosum, retardation, adducted thumbs, spastic paraplegia and hydrocephalus*) [118] bezeichnen die klinischen Manifestationen des so genannten L1-Syndroms.

Die Funktion von L1CAM wird durch seine vielfältigen Interaktionen bestimmt. Die extrazelluläre Ektodomäne von L1CAM ist in der Lage, mit verschiedenen Bindungspartnern in *cis* (innerhalb der gleichen Plasmamembran) oder in *trans* (auf benachbarten Zellen) zu interagieren [119,120]. Es kann sowohl an sich selbst (homophil) [121,122] als auch heterophil an andere neurale Zelladhäsionsmoleküle [114,123], Integrine [124,125], CD24 [126], Neurocan [127], Neuropilin-1 [128,129] und FGFR [130,131] binden. Für die zytoplasmatische Domäne von L1CAM sind Interaktionen mit dem Strukturprotein Ankyrin [132], dem Protein der ERM (Ezrin, Radixin, Moesin)-Familie Ezrin [133], dem Gerüstprotein RanBPM (engl. *Ran binding protein M*) [134] und dem Clathrin-Adaptermolekül AP-2 [135] bekannt. Die Vielzahl seiner Interaktionen macht L1CAM zu einem multifunktionellen Protein sowohl in physiologischen als auch in pathophysiologischen Prozessen.

## **2.4 Die funktionelle Rolle von L1CAM in der Tumorprogression und Metastasierung**

Die Beteiligung der IgSF-CAMs an allen Schritten der metastatischen Kaskade ist etabliert [93,136,137]. Eines der am besten untersuchten Mitglieder der IgSF-CAMs ist das L1 Zelladhäsionsmolekül (L1CAM) [138,139]. Die erhöhte Expression von L1CAM kann bereits in Vorläufer-Läsionen des invasiven Pankreaskarzinoms (PanIN, engl. *pancreatic intraepithelial neoplasia*) detektiert werden [140] und ist in verschiedenen Tumorentitäten, u. a. Uterus- und Ovarialkarzinomen, mit verkürztem Überleben korreliert [141]. Im Kolonkarzinom wird die Transkription des L1CAM-Gens u. a. durch  $\beta$ -Catenin/TCF reguliert [142]. Im Zellkern lokalisiertes  $\beta$ -Catenin reguliert in Kooperation mit TCF die Expression vieler Gene, welche die Pluripotenz, Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen [143,144] oder – bei übermäßiger Aktivierung des Wnt-Signalwegs – die Tumorentität, die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen bewirken [145,146]. Interessanterweise wird L1CAM in verschiedenen Tumorentitäten an der invasiven Grenze zwischen Tumor und Wirtsgewebe exprimiert [142,147-149], was eine Beteiligung von L1CAM an



invasiven Prozessen der Tumorzell dissemination vermuten lässt [150,151]. Tatsächlich führt die erhöhte Expression von L1CAM zu einer Induktion der Expression der Cysteinprotease Cathepsin B [152], deren Expression mit erhöhtem invasivem und metastatischem Potential von Tumorzellen assoziiert ist [153,154]. Weiterhin führt die erhöhte Expression von L1CAM in Tumorzellen epithelialen Ursprungs zum Auftreten einer epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) [155-157]. Folgerichtig nehmen in Tumorzellen durch die erhöhte Expression von L1CAM die Migration [158,159] und Invasion [160,161] zu. Darüber hinaus ist die Expression von L1CAM nicht nur mit dem Tumorwachstum [162-165], sondern auch mit der Bildung von viszeralen Metastasen in der Leber [166-169], der Lunge [163,165] und Lymphknoten [140,163,164,169] sowohl in Patienten als auch in Tumormodellen in der Maus assoziiert. Diese Studien haben gegen L1CAM gerichtete, interferierende Strategien mit Antikörpern [170,171] und shRNAs (engl. *short interfering RNAs*) [163,164] motiviert, die zu einer Verringerung des Tumorwachstums und der Metastasierung führen. Die Beobachtung, dass Glioblastomzellen mit Stammzell-Eigenschaften L1CAM exprimieren [147,172-174], bildet die Grundlage dafür, dass L1CAM als mögliches Ziel für L1CAM-exprimierende, Therapie-resistente Tumorstammzellen diskutiert wird [175-177]. Trotz des enormen Fortschritts in der Untersuchung der funktionellen Bedeutung von L1CAM für die Tumorzellbiologie ist die genaue Funktion von L1CAM während verschiedener Schritte der metastatischen Kaskade immer noch unklar.

## 2.5 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bilden eine Familie mit über 25 Mitgliedern in Vertebraten. Sechs Mitglieder weisen eine Transmembrandomäne auf und sind dadurch an der Zelloberfläche lokalisiert. Die übrigen MMPs werden sekretiert [178]. MMPs bestehen generell aus einer Pro-Domäne, einer katalytischen Domäne, einer Verbindungs-Region und einer Hemopexin-Domäne [179]. Die MMPs gehören zur Klasse der Zincine und werden innerhalb dieser zu der Metzincin-Familie gezählt. Die Metzincine weisen eine verlängerte Zink-Bindungs-Konsensussequenz (**HEXXHXXXGXXH/D**) auf. Darin koordinieren die drei Histidine zusammen mit einem Molekül des Lösungsmittels H<sub>2</sub>O das Zink-Ion (Zn<sup>2+</sup>) tetrahedral. Das Glutamat fungiert während der Katalyse als generelle Base. Außerdem besitzen die Metzincine einen konservierten Methionin-Rest in der Nähe des aktiven Zentrums, den so

genannten „Met-*turn*“ (normalerweise ALMYP). Das konservierte Methionin aus dem „Met-*turn*“ liefert eine hydrophobe Base für die Zinkbindungssequenz [178,180]. Die meisten MMPs werden als inaktive Zymogene mit einer N-terminalen Pro-Domäne sekretiert. Die Entfernung der Pro-Domäne ermöglicht dem Lösungsmittelmolekül (H<sub>2</sub>O) und dem Substrat in das aktive Zentrum zu gelangen. Dieses enthält als eine Determinante der Substratspezifität eine S<sub>1</sub>-Tasche. Die MMPs der Vertebraten können auf der Basis ihrer Substratspezifität, ihrer Sequenz-Homologie und ihrer Domänen-Organisation in sechs Gruppen unterteilt werden: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Membran-Typ MMPs (MT-MMPs) und andere MMPs [179].

### **2.6 MMP-2 (Gelatinase A): Struktur und funktionelle Bedeutung in der Tumorprogression und Metastasierung**

MMP-2 (auch: Gelatinase A, 72 kDa Typ IV Kollagenase) ist ein Mitglied der Klasse der Gelatinasen innerhalb der MMPs. Das MMP-2-Zymogen besitzt eine molekulare Masse von 72 kDa und besteht aus folgenden Domänen: Der N-terminale Bereich beginnt mit der Prä-Domäne, gefolgt von der Pro-Domäne, der katalytischen Metalloprotease-Domäne, der Kollagen/Gelatin-Bindungs-Domäne, einer aziden O-glykosylierten Verbindungs-Region und der Hemopexin-Domäne. Die Prä-Domäne (auch: Signalpeptid) der MMPs wird für ihre korrekte Sekretion benötigt [181]. Die Pro-Domäne bindet an das Zn<sup>2+</sup>-Ion innerhalb der katalytischen Domäne und bewahrt die Latenz des Zymogens. Die proteolytische Spaltung der latenten Pro-MMP-2-Spezies zur aktiven 62 kDa-MMP-2-Spezies [182-184] induziert einen Cystein-*Switch* und die Aktivierung von MMP-2 [185,186]. Die katalytische Domäne vermittelt die proteolytische Spaltung der MMP-2-Substrate [182]. Die Kollagen-Bindungs-Domäne mit den drei Fibronectin Typ II-Domänen wird für die Bindung von Kollagen benötigt [187,188], während die Hemopexin-Domäne die Interaktion von MMP-2 mit verschiedenen Interaktionspartnern, wie z. B. TIMP-2 [189,190], vermittelt.

Die erhöhte Expression von Gelatinase A besitzt eine große prognostische und funktionelle Bedeutung für verschiedene Tumorentitäten [191,192]. Eine erhöhte Expression oder Aktivität von MMP-2 ist für Mammakarzinome [193], Kolonkarzinome [194], Lungenkarzinome [195], Speicheldrüsenkarzinome [196], hepatozelluläre Karzinome [197], Magenkarzinome [198], Ovarialkarzinome [199],

Zervixkarzinome [200], Blasenkarzinome [201], Melanome [202] und Gliome [203] nachweisbar. In einer Vielzahl verschiedener Entitäten solider Tumoren ist die erhöhte Expression von MMP-2 mit der Progression [199,204] und mit schlechter Prognose [198,200] korreliert. Die erhöhte Expression von MMP-2 oder erhöhte Werte des Quotienten aus der Expression von MMP-2 und TIMP-2 sind mit einer Zunahme der Invasivität von Tumoren [194,196] und dem Auftreten von entfernten Metastasen in Lebern [205,206] und Lymphknoten [195,207] assoziiert.

Konsistent mit einer erhöhten Expression von MMP-2 in Biopsien von Krebspatienten im Verlauf der Tumorprogression führt die Suppression oder funktionale Inhibition von MMP-2 in Mausmodellen des humanen Ovarialkarzinoms [208], des Lungenkarzinoms [209], des Melanoms [210] und des Glioms [211] zu einer Verringerung des Tumorwachstums bzw. der Metastasierung. In MMP-2-defizienten Mäusen ist gezeigt worden, dass MMP-2 nicht nur wichtig für die invasive Kapazität von Tumorzellen ist, sondern auch zum Tumorwachstum, zur Tumorprogression und Angiogenese beiträgt [212]. Die durch MMP-2-abhängige Spaltung der extrazellulären Substrate Fibronectin und Vitronectin vermittelte Anlagerung von Tumorzellen an ihre Mikroumgebung spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für das Tumorwachstum und metastatische Disseminierung von humanen Ovarialkarzinomzellen [208]. *In vitro* führt die Suppression von MMP-2 zu einer Verringerung der Migration, der Invasion und der Angiogenese [209,211] sowie zur Induktion der Apoptose [213].

Die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) sind nicht nur für die Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) und den proteolytischen Abbau der Basalmembran (BM) verantwortlich, wie früher postuliert [214,215], sondern sind in fast alle Aspekte der Tumorbiologie involviert [216,217], indem sie durch die Remodellierung der EZM neue kryptische Sequenzen freilegen, Wachstumsfaktoren, Zytokine und weitere aktive EZM-Komponenten freisetzen [218] oder zur Signaltransduktion beitragen [219].

## **2.7 MMP-9 (Gelatinase B): Struktur und funktionelle Bedeutung in der Tumorprogression und Metastasierung**

MMP-9 (auch: Gelatinase B, 92 kDa Typ IV Kollagenase) gehört wie MMP-2 zur Gelatinase-Klasse der MMPs und wird als inaktives Zymogen (Pro-MMP-9) mit einer molekularen Masse von 92 kDa sekretiert. Die Domänenstruktur ist weitgehend

identisch zu MMP-2 und umfasst eine N-terminale Prä-Domäne, eine Pro-Domäne, eine Metalloprotease-Domäne, eine Kollagen/Gelatin-Bindungs-Domäne eine Verbindungs-Region und eine Hemopexin-Domäne [181,220]. Die Prä-Domäne vermittelt als Signalsequenz die korrekte Sekretion der Protease [181,221]. Eine Peptidsequenz innerhalb der Pro-Domäne fungiert als intramolekularer Inhibitor des MMP-9-Zymogens [184]. Die proteolytische Abspaltung der Pro-Domäne induziert einen Cystein-Switch und führt zur Bildung der aktiven 82 kDa-Form von MMP-9 [185,186]. Die Metalloprotease-Domäne enthält das aktive Zentrum von MMP-9 und wird für die proteolytische Spaltung der MMP-9-Substrate benötigt [222]. Die Kollagen/Gelatin-Bindungs-Domäne besteht aus drei Fibronectin Typ II-ähnlichen Domänen, die wichtig für die Bindung von Gelatin [223,224] und Kollagen [225] sowie für die proteolytische Aktivität von MMP-9 gegenüber Typ IV, V und XI Kollagen sind [226,227]. Die O-glykosylierte Verbindungs-Domäne und die Hemopexin-Domäne von MMP-9 spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Bioverfügbarkeit von MMP-9 [228]. Die Hemopexin-Domäne von MMP-9 vermittelt die Bindung von MMP-9 mit verschiedenen Interaktionspartnern, wie z. B. TIMP-1 [224] und Gelatin [229]. Die isolierte Hemopexin-Domäne fungiert als Inhibitor der MMP-9-Aktivität sowie als Inhibitor der Adhäsion, Migration und Invasion von Tumorzellen [229].

Für Krebserkrankungen ist die erhöhte Expression von MMP-9 u. a. bei Mammakarzinomen [230], Ovarialkarzinomen [231], Kolonkarzinomen [230], Lungenkarzinomen [230], Magenkarzinomen [232], Pankreaskarzinomen [205], Prostatakarzinom [233], Blasenkarzinom [201] und Gliomen [203] nachgewiesen. Die funktionelle Interferenz mit MMP-9 in Tumormodellen *in vivo* führt zu einer Verringerung des Tumorwachstums [234,235], der Angiogenese [234,236], der Invasion [234] sowie zu verstärkter Apoptose [235]. Die erhöhte Expression von MMP-9 geht beim Osteosarkom mit erhöhtem metastatischen Potential einher [237]. In verschiedenen Modellen der Karzinogenese und Metastasierung fördert die stromale Expression von MMP-9 die Karzinogenese [238] und die Bildung von Metastasen in Leber [239] und Lunge [240,241]. Diese Beobachtungen verdeutlichen die funktionelle Bedeutung von Wirts-MMP-9 für Tumorwachstum und erfolgreiche Metastasierung von Tumorzellen. In einem experimentellen syngenen T-Zelllymphom-Modell wird Tumorzell-MMP-9 für die invasiven Schritte der Lebermetastasierung benötigt [242]. Zusammenfassend zeigen diese

Beobachtungen, dass von Wirts- und Tumorzellen exprimiertes MMP-9 ein wichtiger Modulator des tumorigenen und metastatischen Potentials von Tumorzellen ist.

### 3 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Aufklärung der funktionellen Rolle von L1CAM für die Progression und Metastasierung nicht-solider Tumoren. Im Gegensatz zur funktionellen Rolle von L1CAM in der Progression und Metastasierung von soliden Tumoren ist über den Beitrag von L1CAM zur metastatischen Disseminierung von Tumoren hämatopoietischen Ursprungs wenig bekannt. Das L-CI.5s murine T-Zell-Lymphom ist ein aggressives, nicht-solides Tumormodell, welches sowohl in spontanen Metastasierungsassays nach intradermaler Inokulation der Tumorzellen als auch in experimentellen Metastasierungsassays nach Inokulation der Tumorzellen in die Schwanzvene syngener DBA/2-Mäuse zur Bildung von manifesten Metastasen in der Leber, einem auch bei Adenokarzinomen häufig von Metastasen betroffenen Organ, führt. Dieses Modell erlaubt die schnelle, reproduzierbare und zeitlich aufgelöste Analyse der Lebermetastasierung. Zunächst sollte L1CAM in L-CI.5s-Zellen mittels shRNA-vermittelter RNA-Interferenz supprimiert werden. Die Auswirkungen dieser Modulation der L1CAM-Expression auf tumorbiologische Parameter wie Proliferation, Migration und Invasion sollten *in vitro* analysiert werden. Die Bedeutung von L1CAM für das metastatische Potenzial der L-CI.5s-Zellen sollte in spontanen und experimentellen Metastasierungsassays *in vivo* untersucht werden. Über Metastasierungs-assoziierte Parameter, wie. z. B. Proliferation, invasive Prozesse und die Kolonisierung des Zielorgans, sollten neben molekularbiologischen Methoden auch immunhistochemische Methoden Aufschluss geben. Die Analyse der molekularen Mechanismen sollte durch Genexpressionsanalysen und die Analyse der Aktivität der die Invasion und Metastasierung fördernden Matrix-Metalloproteinasen durch zymographische Methoden *in vitro* und *in situ* erfolgen. Wichtige Erkenntnisse aus dem L-CI.5s T-Lymphom-Modell sollten in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip, einem typischen L1CAM-abhängigen Tumormodell, bestätigt und somit die Erkenntnisse aus dem nicht-soliden L-CI.5s T-Lymphom-Modell auf eine solide Tumorentität epithelialen Ursprungs (Karzinome) ausgeweitet werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Verwendete Versuchstiere

##### *DBA/2*

Für die tierexperimentellen Versuche dieser Arbeit wurden 8-10 Woche alte, Pathogen-freie, weibliche DBA/2-Mäuse verwendet, die von Janvier (Saint Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen wurden. Es handelt sich um einen immunkompetenten Mausstamm.

#### 4.1.2 Zelllinien

##### *293T*

293T-Zellen sind ursprünglich aus humanem, embryonalen Nierenepithel isoliert worden (HEK293) [243]. Sie lassen sich besonders gut transfizieren und werden deshalb als Verpackungszelllinie für die Produktion retro- und lentiviraler Partikel verwendet. Sie exprimieren sowohl die Gene E1A und E1B des humanen Adenovirus 5 als auch das SV40 T-Antigen. Diese Zelllinie wurde von der Invitrogen Deutschland GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

##### *L-CI.5s*

Die murine T-Lymphom-Zelllinie L-CI.5s ist eine *lacZ*-markierte Variante der ESb-Zelllinie. L-CI.5s-Zellen wurden durch Re-isolierung intradermal in DBA/2-Mäuse inokulierter ESb-T-Lymphom-Zellen aus spontanen Lebermetastasen erhalten [244]. Das Markergen *lacZ* kodiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase. Dieses Enzym setzt in Anwesenheit von Sauerstoff das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid) zu Galaktose und Indigo (blauer Farbstoff) um und ermöglicht damit den *post mortem*-Nachweis des Enzyms. Die Konzentration des Indigo-Farbstoffes im Zytoplasma der Zellen erlaubt die Identifizierung einzelner Tumorzellen in X-Gal-gefärbten Gewebeschnitten und auf der Oberfläche X-Gal-gefärbter Organe [245]. L-CI.5s-Zellen sind in der Lage sowohl in syngenen DBA/2-Mäusen als auch in immunsupprimierten Mäusen Tumoren zu bilden. L-CI.5s-Zellen bilden Metastasen in der Leber, in Lymphknoten und in der Milz sowohl nach

intradermaler Inokulation als auch nach intravenöser Inokulation in die Schwanzvene [244]. Einzelne Tumorzellen können darüber hinaus im Knochenmark nachgewiesen werden [246].

### *SKOV3ip-lacZ*

Die Zelllinie Skov-3ip stammt von der Parentalzelllinie Skov-3 ab. Letztere wurde 1973 ursprünglich aus Aszites einer 64-jährigen Patientin mit einem zystischen Adenokarzinom des Ovars isoliert. Skov3-ip-Zellen wurden nach intraperitonealer Inokulation von Skov-3-Zellen aus dem Peritoneum isoliert. Sie wachsen adhärent und besitzen epithelialen Charakter. Einzelne Zellen weisen spindelförmige Morphologie auf. Skov-3ip-Zellen sind tumorigen nach intraperitonealer Inokulation [170] und bilden Lungenmetastasen nach intravenöser Inokulation in die Schwanzvene [247]. Skov-3ip-Zellen wurden von Prof. Ellen Vitetta (University of Dallas, Texas, USA) zur Verfügung gestellt und von Prof. Peter Alevogt (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) bezogen.

### **4.1.3 Bakterien**

#### *TOP10*

Der *E. coli* Bakterienstamm TOP10 besitzt den folgenden Genotyp: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*. Dieser Bakterienstamm zeichnet sich durch seine gute Transformierbarkeit aus und eignet sich insbesondere für die Transformation unmethylierter DNA. Die Bakterien wurden von der Firma Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

### **4.1.4 Plasmide**

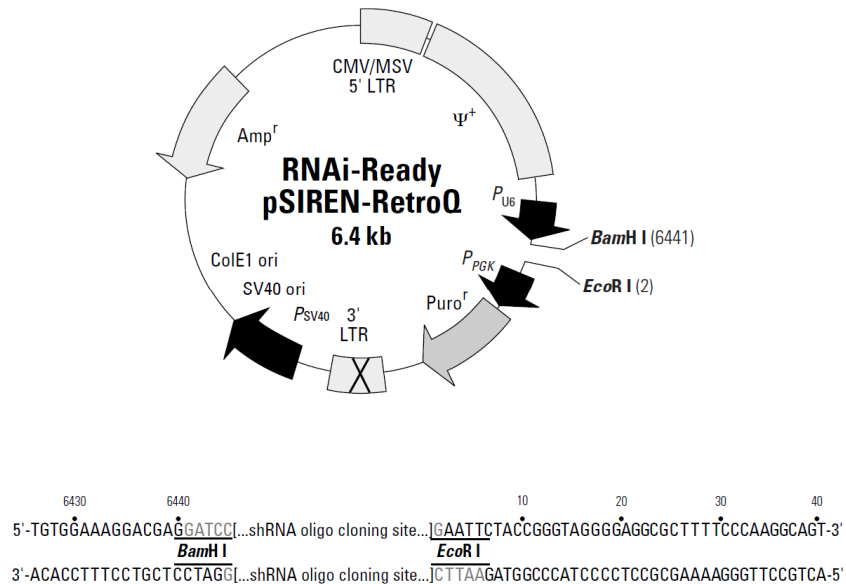
#### *pSIREN-RetroQ*

Dieses retrovirale Expressionsplasmid ist für die Expression von shRNAs optimiert. Das Plasmid (Katalog-Nr. 631526) wurde von Clontech/Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) bezogen.

Für die stabile Suppression der L1CAM-Genexpression in L-CI.5s- und SKOV3ip-*lacZ*-Zellen wurde shRNA-vermittelte RNA-Interferenz verwendet. Dazu wurden unter Verwendung des Programms *shRNA target finder* (Ambion/Life Technologies, Darmstadt, Germany) potentielle Zielsequenzen mit einer Länge von 19 bis 22 Nukleotiden innerhalb der Sequenz des L1CAM-mRNA identifiziert. Mögliche Off-



*target*-Effekte wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus ausgeschlossen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Die resultierenden Sequenzen wurden mit einem 5'-*Bam*HI-Überhang und einem 3'-*Eco*RI-Überhang versehen und unter Verwendung von Standard-Klonierungsprotokollen in den retroviralen Vektor pSIREN-RetroQ kloniert.



**Abb. 3:** Vektorkarte und Sequenz der *Multiple cloning site* (MCS) mit den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI des retroviralen shRNA-Expressionsplasmids pSiren-RetroQ. Die Abbildung stammt von der folgenden Internet-Adresse: [http://www.clontech.com/DE/Products/Viral\\_Transduction/Retroviral\\_Vector\\_Systems/ibcGetAttachment.jsp?cltemId=17680&fileId=5877944&siteX=10024:22372:US](http://www.clontech.com/DE/Products/Viral_Transduction/Retroviral_Vector_Systems/ibcGetAttachment.jsp?cltemId=17680&fileId=5877944&siteX=10024:22372:US) (Stand: 28.10.2014, 10:30 Uhr).

Die verwendeten shRNA-Sequenzen:

- *pSIREN-RetroQ-shL1-2* (murin)  
Sequenz: 5'-AACAAATATGGTCCTGGAGAA-3'
- *pSIREN-RetroQ-shL1-3* (murin)  
Sequenz: 5'-AAGCCACATAGTGGTACCTGC-3'
- *pSIREN-RetroQ-shL1-2* (human)  
Sequenz: 5'-AAGTACCGGATTCAGCGTGGC-3'
- *pSIREN-RetroQ-shL1-3* (human)  
Sequenz: 5'-AACTTCGGACACACAACCTGA-3'

#### 4.1.5 Oligonukleotide (Primer)

Die folgenden Gen-spezifischen Primer wurden in Kombination mit der Universal ProbeLibrary für die TaqMan®-basierte Genexpressionsanalyse verwendet. Die

Primer-Sequenzen wurden über das *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>) erhalten. Die Gen-spezifischen Primer wurden bei Metabion (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) bezogen.

**Tab. 1:** Für die TaqMan®-Analyse mittels Universal ProbeLibrary verwendete Sonden und Primer

Gen (#Sonde)	Primersequenzen
Humanes MMP-2 (Probe #34)	Linker Primer: cggtttctcgaatccatga Rechter Primer: ggtatccatcgccatgct
Humanes MMP-9 (Probe #24)	Linker Primer: aactacgaccgggacaagc Rechter Primer: ggaaagtgaaggggaagacg
Murines MMP-2 (Probe #85)	Linker Primer: gtgggacaagaaccagatcac Rechter Primer: gcatcatccacggtttcag
Murines MMP-9 (Probe #19)	Linker Primer: acgacatagacggcatcca Rechter Primer: gctgtggttcagttgtggtg

#### 4.1.6 Antikörper

**Tab. 2:** Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
Monoklonaler Ratte anti-Maus L1CAM Antikörper, Klon 324	Prof. Peter Altevogt, DKFZ, Heidelberg, Deutschland
Monoklonaler Ratte anti-Maus L1CAM Antikörper, Klon 555 (IgG-Isotyp)	Prof. Peter Altevogt, DKFZ, Heidelberg, Deutschland
Monoklonaler Maus anti-human L1CAM Antikörper UJ127.11 (IgG1-Isotyp)	Prof. Peter Altevogt, DKFZ, Heidelberg, Deutschland
Monoklonaler Maus anti-human L1CAM Antikörper L1-9.3 (IgG2a-Isotyp)	Prof. Peter Altevogt, DKFZ, Heidelberg, Deutschland
Monoklonaler Maus anti-human L1CAM Antikörper L1-14.10 (IgG1-Isotyp)	Prof. Peter Altevogt, DKFZ, Heidelberg, Deutschland
anti- $\alpha$ -Tubulin Maus mAb, Klon DM1A	Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland
Rabbit polyclonal antibody to PCNA	Abcam, Cambridge, UK

**Tab. 3:** Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
ECL mouse IgG, HRP-linked whole Ab	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany
Goat polyclonal Secondary Antibody to Rat IgG–H&L (PE), ab97058	Abcam, Cambridge, UK
PE Goat anti-mouse IgG (minimal x-reactivity), #405307	BioLegend, London, UK

#### 4.1.7 Medien und Zellkultur-Lösungen

**Tab. 4:** Verwendete Medien und Zellkulturlösungen

Medium/Lösung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Arginin (Arg), 55 mM	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Asparagin (Asp), 27 mM	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin (L-Glu), 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HEPES, 1 M	Gibco GmbH, Karlsruhe, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol, 50 mM	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
DMSO	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline), pH 7,4	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung, pH 7,4	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland

#### 4.1.8 Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien

**Tab. 5:** Für die Kultivierung von Bakterien verwendete Medien und Lösungen

Medium/Lösung	Zusammensetzung
Luria Broth (LB)-Medium	10 g Bacto™ Trypton 5 g Bacto™ Yeast Extract 5 g NaCl 15 g Bacto™ Agar (für LB-Platten) Mit 5 M NaOH auf pH 7,5 einstellen Mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen Autoklaviert für 20 min bei 120 °C Lagerung bei 4 °C.

#### 4.1.9 Puffer und Lösungen

**Tab. 6:** Für die X-Gal-Färbungen und IHC-Färbungen verwendete Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
10xPBS	80 g Natriumchlorid (NaCl) 2 g Kaliumchlorid (KCl) 14,4 g Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) 2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde mit ddH <sub>2</sub> O auf einen Liter aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.
10xTBS	500 mM Tris-Base 1,5 M NaCl Der pH- Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde mit ddH <sub>2</sub> O auf einen Liter aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.
TBS-T	10xTBS-Puffer 1:10 verdünnt Tween 20 1:1000 verdünnt 9 Teile ddH <sub>2</sub> O auf 10 Teile Gesamtvolumen. Lagerung bei Raumtemperatur.
Fixierlösung (Paraffinschnitte)	2 % Formaldehyd in 1x PBS
Mayer's Hämalaun Lösung	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
Eosinlösung, wässrig	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
Fixierlösung (Organe und Kryoschnitte)	2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in 1x PBS
X-Gal-Stock (40mg/ml)	1 g X-Gal in 25 ml Dimethylformamid gelöst. Lichtgeschützt bei -20 °C lagern.
X-Gal-Färbelösung	1,64 g K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> = Fe <sup>3+</sup> 2,10 g K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> = Fe <sup>2+</sup> 2 mL 1 M MgCl <sub>2</sub> 1 mL 10 % Natrium-Deoxycholat 2 mL 10 % NP-40 In 900 mL PBS lösen und auf pH = 7,1 einstellen. Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C

Ready-to-use X-Gal-Färbelösung	X-Gal-Stock 1:40 in X-Gal-Färbelösung verdünnen. Unmittelbar vor Färbung lichtgeschützt angesetzt.
--------------------------------	--

**Tab. 7:** Für die Gelelektrophorese verwendete Lösungen

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
6x Auftragspuffer	0,15 % (w/v) Bromphenolblau 60 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 60 % (v/v) Glycerin Aufgefüllt mit Nuklease-freiem ddH <sub>2</sub> O.
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris (pH 8,0) 1 mM EDTA 0,1 % Essigsäure

**Tab. 8:** Für die SDS-Gelelektrophorese und *Western Blotting* verwendete Lösungen

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
5xLaemmli-Auftragspuffer	100 mg Bromphenolblau 3,5 mL Glycerin 1,5 g SDS 3,2 mL 1 M Tris 2,5 mL β-Mercaptoethanol Aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
10xElektrophorese-Puffer	30,3 g Tris-Base 144,2 g Glycin 10 g SDS Aufgefüllt mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L, bei Raumtemperatur gelagert.
10xBlottingpuffer	3 g Tris-Base 11,25 g Glycin 10 % (v/v)Methanol Mit ddH <sub>2</sub> O auf einen Liter auffüllen. Lagerung bei Raumtemperatur.
10xTBS-Puffer	500 mM Tris-Base 1,5 M NaCl pH-Wert auf 7,6 einstellen und mit ddH <sub>2</sub> O auf einen Liter auffüllen. Lagerung bei Raumtemperatur.
1xTBS-T	10 x TBS-Puffer 1:10 verdünnen Tween 20 1:1000 verdünnen 9 Teile ddH <sub>2</sub> O auf 10 Teile Gesamtvolumen. Lagerung bei Raumtemperatur.
Cell Lysis Buffer (10x), #9803	Cell Signaling Technology Europe,

	Leiden, Niederlande
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
Clarity™ ECL Western Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

#### 4.1.10 Standards und Kits

**Tab. 9:** Verwendete DNA- und Protein-Größenstandards

Größenmarker	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb DNA ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
GeneRuler™ 100 bp DNA ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland

**Tab. 10:** Kits für die Aufreinigung von RNA und DNA, Kits und Assays für RT-PCR und qRT-PCR

Kits	Hersteller
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAGEN RNeasy® Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Environmental Master Mix 2.0	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assay humanes L1CAM (Hs00240928_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assay humanes MMP-2 (Hs00234422_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assay humanes MMP-9 (Hs00234579_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assay murines L1CAM (Mm00493049_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assay murines MMP-2 (Mm00439508_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assay murines MMP-9 (Mm00600163_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assay murines PCNA (Mm00448100_g1)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

TaqMan® Gene Expression Assay <i>lacZ</i> (LACZ1-LAC3)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assay 18S rRNA (4319413E, RefSeq: X03205.1)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
FastStart Universal Probe Master (Rox)	Roche, Penzberg, Deutschland
Universal ProbeLibrary Set, Human (04683633001)	Roche, Penzberg, Deutschland
Universal ProbeLibrary Set, Mouse (04683641001)	Roche, Penzberg, Deutschland

#### 4.1.11 Chemikalien

**Tab. 11:** Weitere verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
AbSolve™	NEN® Life Science Products, Zaventem, Belgien
peqGOLD Universal-Agarose	PeqLab, Erlangen, Deutschland
alamarBlue®-Reagenz	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Albumin bovine Fraction V (BSA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ampicillin, Ampicillin-Natriumsalz	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Bacto™ Agar	BD, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ Tryptone	BD, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ <i>Yeast Extract</i>	BD, Heidelberg, Deutschland
Chloroform	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
DAPI	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DQ™-Gelatine	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (Eisessig), 100 %, wasserfrei	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), reinst	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethanol (EtOH), zur Analyse, > 99,9 %	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethanol, 98 % für die Immunhistochemie	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd-Lösung, 50 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
HEPES, > 99,5 %	Fluka GmbH, Buchs, Schweiz

Isopropanol	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
Kaiser's Glycerin-Gelatine	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Magnesiumsulfatheptahydrat (MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Methanol (MeOH), zur Analyse, > 99,8 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat (NaAc), zur Analyse, wasserfrei	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl), reinst	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Fluka GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Fluka GmbH, Buchs, Schweiz
Nonidet-P40 (NP40)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ponceau S	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Roticlear™	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SB-3CT	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TEMED	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
TRIzol®-Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranoside)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

#### 4.1.12 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 12:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Zellkultur-Petrischalen: 10x2 cm, 15x2 cm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen: 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup>	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Testplatten: 6-Loch, 12-Loch, 24-Loch, 96-Loch, Flach- und Rundboden	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Pipettenspitzen:	Josef Peske GmbH & Co. KG, Aindling,



## Material und Methoden

0,5-10, 2-200, 100-1000 µL	Deutschland
Filter Tips Multi Guard Barrier Tips Pipettenspitzen mit Filter: 10, 10-200, 100-1000 µL	Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, UT, USA
Multipipette Tips Combitips plus: 1, 2.5, 5 und 10 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Steritop™ Filtereinheiten, 0.22 µm	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sterilfilter, 0,22 und 0,45 µm	Josef Peske GmbH & Co. KG, Aindling, Deutschland
Zellschaber, 30 cm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Serologische Pipetten, steril: 1, 2, 5, 10, 25, 50 mL	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Injektionsnadeln InjectR Luer Solo: 5, 10 mL	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Injektionsnadeln Omnifix-F Solo, 1 mL	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Injektionsnadeln Omnican 40 U-40 Insulin	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Hypodermic Injektionsnadeln StericanR	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Tissue embedding cassettes	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Falcon Zentrifugationsröhrchen, konisch 15 und 50 mL	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
FACS-Röhrchen, 5 mL, Rundboden, Polystyrol	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsgefäße: 0.5, 1.5, 2 mL	Josef Peske GmbH & Co. KG, Aindling, Deutschland
Amersham™ Hybond™ Nitrocellulose Membrane	GE Healthcare GmbH, München, Deutschland
Superfrost® Plus Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Deckgläschen, 24 x 50 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Tissue Tek® Einbettmedium	Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland
Thick Blot Filter Paper, #1703956	(Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland)
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

#### 4.1.13 Laborgeräte

**Tab. 13:** Verwendete Laborgeräte

<b>Laborgerät</b>	<b>Hersteller</b>
Eppendorf Reseach-Pipetten: 10, 20, 200 und 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multichannel-Pipette Eppendorf Reseach	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Repetitive Pipette Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waage PCE-LSM 2000	PCE Deutschland GmbH, Meschede, Deutschland
Waage Research RC210P	Sartorius AG, Gottingen, Deutschland
Mini centrifuge MCF-2360	LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal, Deutschland
Table centrifuge 5417R	LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal, Deutschland
Megafuge 2.0R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Microtiter shaker MTS 2/4	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mini rocker MR-1	G.Kisker GbR, Steinfurt, Deutschland
Vortex shaker Minishaker MS2	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Scientific CO <sub>2</sub> Water Jacketed Incubator	Thermo Quest, Egelsbach, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Wallac Victor	PerkinElmer, Weiterstadt, Deutschland
Microm HM355	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Microm HM560 Cryo Star	Richard-Allan Scientific, San Diego, CA, USA
WB Gelelektrophorese-System Mini PROTEAN System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
WB imager ChemiDoc™ MP System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Trans-Blot SD Cell Blotting-Apparatur	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
ABI PPRISM® 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Axiovert 25 and 135 with AxioCam MRc	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
AxiolmagerZ1 with ApoTome	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland

Leica DMR Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Nikon ECLIPSE TE2000-S Fluoreszenzmikroskop	Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, Niederlande

#### 4.1.14 Software

**Tab. 14:** Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
SDS2.2 Real time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
FACSDiva Flow cytometry	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FlowJo Version 8 Software	Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA
SPOT Advanced Software	SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, MI, USA
NIS Elements BR 3.10 Software	Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, Niederlande
SigmaStat for Windows Software version 3.00	SPSS Inc./IBM, Armonk, NY, USA
GraphPad Prism Software version 6.0.1	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Tierexperimentelle Methoden

#### 4.2.1.1 Metastasierungsmodelle

##### *Spontanes Metastasierungsmodell*

Für die Untersuchung des Einflusses von Tumorzell-L1CAM auf frühe und späte Schritte der Lebermetastasierung von Tumorzellen wurden  $1 \times 10^6$  L-CI.5s T-Lymphom-Zellen in 200  $\mu$ L PBS (pH = 7,4) intradermal (i. d.) in die linke Flanke Pathogen-freier, syngener DBA/2-Mäuse inokuliert. Die Zellen wurden vor der Inokulation auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt und bis zur Inokulation auf Eis gelagert bzw. transportiert. Alle Mäuse, denen Tumorzellen inokuliert wurden, entwickelten intradermale Primärtumoren (*tumor take* = 100 %), welche vergleichbar in ihrer Größe waren. Das Wachstum der Primärtumoren wurde durch visuelle Inaugenscheinnahme verfolgt und in regelmäßigen Abständen (zwei Tage) mit einer Schieblehre gemessen. Bei der ersten Durchführung des Experimentes wurden die Mäuse (in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Tierschutzgesetzes des Freistaates Bayern und anerkannt durch die Regierung von Oberbayern) geopfert, sobald die ersten Mäuse Anzeichen von Morbidität als Folge der Metastasierung aufwiesen (zehn bzw. elf Tage nach erfolgter Inokulation der Tumorzellen). Bei der zweiten Durchführung des Experimentes wurden die Mäuse geopfert und die Primärtumoren und Organe entnommen, sobald die ersten Tumoren einen Durchmesser von 1,0 cm erreichten.

##### *Experimentelles Metastasierungsmodell*

Für die Untersuchung des Einflusses von Tumorzell-L1CAM auf späte Schritte der Lebermetastasierung von Tumorzellen wurden  $5 \times 10^3$  L-CI.5s T-Lymphom-Zellen in 200  $\mu$ L PBS (pH = 7,4) in die Schwanzvene (i. v.) syngener DBA/2-Mäuse inokuliert. Analog wurden  $1 \times 10^6$  SKOV3ip-*lacZ* Ovarialkarzinomzellen in 200  $\mu$ L PBS (pH = 7,4) in die Schwanzvene Pathogen-freier, athymischer CD1<sup>nu/nu</sup>-Nacktmäuse inokuliert. Um eine Dilatation der Venen und somit eine Erleichterung der Inokulation in die Schwanzvene zu erreichen, wurden die Mäuse kurz vor der Inokulation mit einer Infrarotwärmelampe bestrahlt. Die Mäuse wurden sieben Tage (L-CI.5s) bzw.

26 Tage (SKOV3ip-*lacZ*) nach erfolgter Tumorzellinokulation geopfert und die Organe entnommen.

### 4.2.1.2 Probengewinnung

Die Mäuse wurden am Ende der spontanen und experimentellen Metastasierungsassays durch CO<sub>2</sub> getötet, und sofort Primärtumor (spontanes Metastasierungsmodell), Leber, Lunge und Milz (spontane und experimentelle Metastasierungsmodelle) entnommen. Die Leber wurde in mehrere Teile zerteilt und einige Teile der Leber wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Untersuchung bei -80 °C gelagert. Ebenso wurde mit dem rechten Lungenflügel verfahren. Von jeder Leber wurden zwei Stücke in Tissue Tek®-Einbettmedium (Sakura Fine Tek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) für eine spätere Anfertigung von Kryoschnitten eingebettet und ebenfalls bei -80 °C aufbewahrt. Für eine spätere Anfertigung von Paraffinschnitten wurden Leberstücke über Nacht in Fixierlösung (2 % Formaldehyd in 1xPBS) fixiert, ein Paraffinbad getaucht und in Paraffin eingebettet. Die Leberlappen *lobus sinister medialis hepatis* und *lobus dexter medialis hepatis* wurden zur Beurteilung des Metastasierungsmusters mit X-Gal-Lösung gefärbt. Primärtumoren wurden halbiert und eine Hälfte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Untersuchung bei -80°C aufbewahrt. Die andere Hälfte wurde mit in Tissue Tek®-Einbettmedium für spätere Kryoschnitte eingebettet und bei -80°C gelagert.

## 4.2.2 Zellbiologische Methoden

### 4.2.2.1 Zellkulturmedien

Zelllinie	Verwendetes Medium
293T	DMEM, 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 mM HEPES, 0,27 mM Arginin, 0,55 mM Asparagin
L-CI.5s	RPMI, 10 % FCS (v/v) (PAA Gold), 2 mM L-Glutamin, 100 mM HEPES, 0,5 mM β-Mercaptoethanol
SKOV3ip- <i>lacZ</i>	DMEM, 10 % (v/v) FCS, 2mM L-Glutamin, 100 mM HEPES, 0,27 mM Arginin, 0,55 mM Asparagin

### 4.2.2.2 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden in Brutschränken für die Zellkultur bei 37 °C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % (*Scientific CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator*, Thermo Quest, Egelsbach, Deutschland) kultiviert, um optimale Bedingungen für das Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Alle Zelllinien wurden gemäß Laborprotokoll drei Mal pro Woche (montags, mittwochs und freitags) passagiert. Adhärente Zellen wurden auf 10 cm Zellkultur-Petrischalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) kultiviert und für die Passage mit Trypsin/EDTA-Lösung von Petrischalen unter mikroskopischer Sichtkontrolle abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in dem entsprechenden warmen Medium aufgenommen und in einem für die Zelle und die jeweilige Zelldichte spezifischen Verhältnis gesplittet. Die Suspensionszelllinie L-CI.5s wurde in Zellkulturflaschen mit Größen von T25 und T75 (TPP, Trasadingen, Schweiz) kultiviert. L-CI.5s-Zellen wurden in einem Verhältnis zwischen 1:4 und 1:10 gesplittet. Das Splitverhältnis richtete sich nach dem pH-Wert des Mediums, welcher am farbigen Indikator im Medium abgeschätzt wurde. Gemäß dem ermittelten Splitverhältnis wurden Zellen in eine Flasche mit frischem vorgelegtem Medium überführt und suspendiert.

### 4.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Einstellung der Zellzahl für Zell-basierte Assays und Tierversuche erforderte die Einstellung bestimmter Zellzahlen. Für die Zellzahl-Bestimmung adhärenter Zellen wurden diese mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in Medium resuspendiert. Danach wurden sowohl von adhärenenten als auch von Suspensionszellen 100 µL einer Einzelzellsuspension mit 100 µL Trypanblau-Lösung versetzt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Trypanblau-Lösung ermöglicht die Unterscheidung toter und lebender Zellen auf der Grundlage, dass ausschließlich tote Zellen angefärbt werden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch das Auszählen zweier diagonal gegenüberliegender großer Quadrate der Neubauer-Zählkammer. Ein Quadrat der Neubauer-Zählkammer entspricht der Zellzahl in 0,1 µL der unverdünnten Zellsuspension. Da die Zellsuspension jedoch zuvor durch die Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:2 verdünnt wurde, entspricht die Zellzahl zweier ausgezählter Quadrate der in 0,1 µL Suspension enthaltenen Zellzahl. Für die Berechnung der Zellzahl in 1 mL der Suspension wurde die für das Volumen von 0,1 µL erhaltene Zellzahl der Suspension mit dem Faktor 10<sup>4</sup> multipliziert.

### 4.2.2.4 Produktion retroviraler Zellkulturüberstände in 293T-Zellen

Für die Herstellung retroviraler Partikel wurden  $5 \times 10^6$  293T-Zellen auf Zellkultur-Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät. Einen Tag darauf erfolgten ein Mediumwechsel und 3 h später die Ko-Transfektion. Dafür wurden jeweils 10 µg der Helferplasmide pHIT60 (MoMuLV gag und pol exprimierendes Plasmid) [248] und 10 µg pHCMV-G (auch: pHCMV-VSV-G; enthält env-Gen des Vesikulostomatitisvirus, welches das Hüllprotein exprimiert) [249] sowie 10 µg Transferplasmid pSIREN-RetroQ-shscr bzw. pSIREN-RetroQ-shL1 (shL1-2, shL1-3) in einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt. Die Helferplasmide und das Transferplasmid wurden in 1,5 mL FCS-freiem Opti-MEM-Medium in einem 15 mL-Falconröhrchen aufgenommen. Diese Plasmidlösung wurde mit einer Lösung aus 36 µL Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) in 1,5 mL Opti-MEM-Medium (5 min bei Raumtemperatur inkubiert) gemischt und die resultierende Lösung für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss wurde diese Lösung tropfenweise auf die 293T-Zellen pipettiert, nachdem bei diesen Zellen zuvor das Medium gegen 5 mL Opti-MEM-Medium mit 10 % FCS ausgetauscht worden war. Die Zellen wurden für 6 h unter gelegentlichem Schwenken im Zellkultur-Inkubator inkubiert. Dann wurde das Transfektionsmedium von den 293T-Zellen abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Weitere 36 h später wurden die produzierten retroviralen Partikel geerntet, indem das Medium langsam unter Vermeidung von Scherkräften abgenommen wurde, und durch Filtration mit Sterilfiltern mit einer Porengröße von 0,45 µm (TPP, Trasadingen, Schweiz) im Medium möglicherweise enthaltene Zellen und Zelltrümmer abgetrennt wurden. Dazu wurde der Sterilfilter seitlich an die Innenwand eines 15 mL-Falconröhrchens gesetzt. Dieses Vorgehen ermöglichte das Filtrat zur Vermeidung von Scherkräften, welche die Virushülle beschädigen könnten, vorsichtig an der Röhrcheninnenwand herunterlaufen zu lassen. Die retroviralen Zellkulturüberstände wurden entweder sofort zur Infektion von Zielzellen benutzt oder aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

### 4.2.2.5 Retrovirale Infektion adhärenter Zellen

Für die Infektion adhärenter Zellen (SKOV3ip-*lacZ*) wurden am Vortag  $1,5 \times 10^5$  Zellen auf Zellkultur-Petrischalen mit 6 cm Durchmesser ausplattiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 mL virushaltigem Zellkulturüberstand und Polybren (Sigma GmbH, Deisenhofen,

Deutschland) mit einer finalen Konzentration von 8 µg/mL (Konzentration der Stocklösung: 800 µg/mL) infiziert. Am nächsten Tag wurde der virushaltige Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen mit 10 µg/mL Puromycin selektiert, bis die Zellen einer Puromycin-behandelten Wildtyp-Kontrolle abgestorben waren.

#### 4.2.2.6 Ko-Transfektion zur retroviralen Infektion von Suspensionszellen

Die Suspensionszelllinie L-CI.5s lässt sich durch retrovirale Partikel nur schlecht infizieren. Diese Zellen wurden durch eine Ko-Transfektion infiziert. Dazu wurden die L-CI.5s-Zellen auf zuvor mit Retroviren ko-transfizierte 293T-Zellen gegeben. Die 293T-Zellen wurden zunächst mit retroviralen Plasmiden ko-transfiziert. Am Tag nach der Ko-transfektion (24 h später) wurde das Medium von den Zellen der Verpackungszelllinie 293T abgenommen und  $1,5 \times 10^6$  LCI.-5s-Zellen in 10 mL Medium (Medium für L-CI.5s-Zellen) und 100 µL Polybren mit einer finalen Konzentration von 8 µg/mL (Konzentration der Stocklösung: 800 µg/mL) zugegeben. Weitere 48 h später wurde die Selektion der infizierten L-CI.5s-Zellen begonnen, indem 2 mL des Überstandes, der die infizierten L-CI.5s-Zellen enthielt, in T25-Zellkulturflaschen mit 3 mL vorgelegtem RPMI 1640-Medium überführt wurde.

#### 4.2.2.7 Selektion infizierter Zellen mit Antibiotika

Die verwendeten retroviralen Plasmide enthielten als Selektionsmarker ein Puromycin-Resistenzgen. Die mit retroviralen Partikeln infizierten Zellen wurden daher mit Puromycin selektiert, um Zellen mit erfolgreicher Aufnahme der retroviralen shRNA-Plasmide anzureichern und Zellen, die nicht Träger der shRNA-Plasmide sind zu töten. Die Zelllinien wurden mit Konzentrationen von 30 µg/mL (L-CI.5s) bzw. 10 µg/mL (SKOV3ip-*lacZ*) Puromycin selektiert. Die Selektion wurde so lange fortgesetzt bis alle Wildtyp-Zellen in der T25-Flasche (L-CI.5s) bzw. auf der Zellkultur-Petrischale (SKOV3ip-*lacZ*), welche als Kontrolle mitgeführt wurden, abgestorben waren. Mussten die Zellen während der Selektion passagiert werden, so wurden die Zellen mit der entsprechenden Konzentration an Puromycin (s. o.) in frischem Medium in neue Zellkultur-Gefäße gesplittet. Nach Ende der Selektion wurden die erfolgreich transduzierten Zellen ein weiteres Mal passagiert und je nach Zelldichte zwischen drei und vier Aliquots pro 10 cm-Zellkulturschale eingefroren. Die Effizienz der L1CAM-Suppression wurde nach Isolation und Umschreiben der RNA in cDNA durch quantitative RT-PCR ermittelt.



### 4.2.2.8 Proliferationsassay

Für die Analyse der Proliferation von Zellen wurden Proliferationsassays mit dem alamarBlue®-Reagenz (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden  $2 \times 10^3$  Zellen in 100  $\mu\text{L}$  Zell-spezifischem Medium in Quadruplikaten in die Löcher einer 96-Lochplatte pipettiert. Die Proliferation wurde für die Zeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h, 72 und 96 h bestimmt und pro Zeitpunkt eine 96-Lochplatte verwendet. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurden zu jedem Loch mit Zellen 10  $\mu\text{L}$  des alamarBlue®-Reagenzes pipettiert und die Zellen für 2 h im Zellkultur-Inkubator inkubiert. Danach wurde die Fluoreszenz bei einer Exzitationswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm für 0,2 s am Fluoreszenzphotometer gemessen (Wallac Victor, PerkinElmer, Weiterstadt, Deutschland). Die gemessenen Absorptionen wurden auf die für Medium ohne Zellen (Blank) gemessenen Fluoreszenzwerte normalisiert.

### 4.2.2.9 Boyden Chamber-Migrationsassay

Der *Boyden Chamber*-Migrationsassay wird routinemäßig zur Untersuchung der zweidimensionalen Migration eukaryotischer Zellen verwendet. Zur Durchführung wurden Trans-well®-Inserts (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) mit einer Porengröße von 3  $\mu\text{m}$  (L-CI.5s) bzw. 8  $\mu\text{m}$  (SKOV3ip-*lacZ*) verwendet. Nach Ablösen der adhären Zellen sowie zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in serumfreiem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und auf eine Zellzahl von  $3 \times 10^5/\text{mL}$  (L-CI.5s) bzw.  $6,66 \times 10^4/\text{mL}$  (SKOV3ip-*lacZ*) eingestellt. In die obere Kammer wurden  $1 \times 10^5$  Zellen (L-CI.5s) bzw.  $2 \times 10^4$  Zellen (SKOV3ip-*lacZ*) in 300  $\mu\text{L}$  serumfreiem Medium pipettiert. In die untere Kammer wurde 1 mL serumhaltiges Medium gegeben, in welchem FCS als chemotaktische wirksame Substanz die chemotaktische Migration der Zellen induzieren sollte. Die Zellen wurden für 48 h (L-CI.5s) bzw. 12 h (SKOV3ip-*lacZ*) im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zahl der migrierten Zellen bestimmt. Dabei unterschied sich das Vorgehen für Suspensions- (L-CI.5s) und adhären Zellen (SKOV3ip-*lacZ*).

L-CI.5s-Zellen: Die in die untere Kammer migrierten Zellen wurden in der Kammer resuspendiert. Dann wurden 950  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Die Zellen wurden für 5 min bei  $300 \times g$  abzentrifugiert, und vom Überstand 850  $\mu\text{L}$  abgenommen und verworfen. Die Zellpellets wurden in

den restlichen 100  $\mu\text{L}$  Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt (ohne Zugabe von Trypanblau).

*SKOV3ip-lacZ*-Zellen: Die Zellen aus dem Trans-well-Insert wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Die durch das Insert migrierten Zellen wurden durch Eintauchen des Insert in Diff-Quik®-Lösung (Dade Behring, Marburg, Deutschland) fixiert, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit DAPI-Lösung (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) angefärbt. Die migrierten Zellen wurden schließlich durch Auszählen der Zellen in 10 mikroskopischen Bildausschnitten quantifiziert.

In einigen *Boyden Chamber*-Migrationsassays wurde Gelatinase-spezifische Inhibitor SB-3CT verwendet. Dieser wurde in einer finalen Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  sowohl zum serumfreien Medium in die obere Kammer als auch zum serumhaltigen Medium in die untere Kammer pipettiert. Als Kontrolle für das Lösungsmittel wurde das entsprechende Volumen an DMSO verwendet.

#### 4.2.2.10 *Boyden Chamber*-Invasionsassay

Der *Boyden Chamber*-Invasions-Assay wird routinemäßig zur Untersuchung des invasiven Potentials von eukaryotischen Zellen eingesetzt [250,251]. Für die Durchführung der *Boyden Chamber*-Invasionsexperimente wurden Trans-well®-Inserts mit einer Porengröße von 3  $\mu\text{m}$  (L-CI.5s) bzw. 8  $\mu\text{m}$  (*SKOV3ip-lacZ*) mit einer Schicht aus Matrigel™ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) überschichtet. Matrigel ist eine künstlich hergestellte Basalmembran-Matrix bestehend aus den Proteinen Laminin, Kollagen Typ IV und Entactin der extrazellulären Matrix. Alle Lösungen wurden auf 4 °C und alle benötigten Verbrauchsmaterialien (Inserts und Pipettenspitzen) auf -20 °C vorgekühlt. Für die Überschichtung der Inserts wurde die entsprechende Anzahl 50  $\mu\text{L}$ -Aliquots der Matrigel-Stocklösung zunächst ausgehend von 9,3 mg/mL auf 1 mg/mL unter der Sterilbank mit sterilem 1xPBS verdünnt und durch 30-maliges Auf- und Abpipettieren und unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen sorgfältig vermischt. Dann wurden 100  $\mu\text{L}$  der Lösung von 1 mg/mL Matrigel in 1xPBS vorsichtig auf die Einsätze pipettiert. Das Matrigel wurde durch leichtes Klopfen gleichmäßig auf den Einsätzen verteilt und die 24-Loch-Platten mit den beschichteten Inserts zur Verfestigung des Matrigels für 4 h in den Zellkulturbrutschrank gestellt. Dann wurden die adhärenen Zellen (*SKOV3ip-lacZ*) von den Zellkultur-Petrischalen abgelöst und die Zellen (L-CI.5s und *SKOV3ip-lacZ*) zweimal mit warmem 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen gezählt

und in serumfreiem Medium auf eine Zellzahl von  $3,33 \times 10^6$ /mL (L-CI.5s) bzw.  $6,66 \times 10^5$  (SKOV3ip-*lacZ*) eingestellt und resuspendiert. Anschließend wurden 150  $\mu$ L der jeweiligen Zellsuspension (L-CI-5s:  $5 \times 10^5$  Zellen, SKOV3ip-*lacZ*:  $1 \times 10^5$ ) Zellen vorsichtig auf das Matrigel pipettiert. In die untere Kammer wurde 1 mL serumhaltiges Medium pipettiert, welches als chemotaktisch wirksame Substanz die Invasion der Zellen induzieren sollte. Die Zellen wurden für 48 h (L-CI.5s) bzw. 24 h (SKOV3ip-*lacZ*) im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Die Auszählung der invadierten Zellen erfolgte wie für den *Boyden Chamber*-Migrationsassay beschrieben.

In einigen *Boyden Chamber*-Invasionsassays wurde der Gelatinase-spezifische Inhibitor SB-3CT verwendet. Dieser wurde in einer finalen Konzentration von 20  $\mu$ M sowohl zum serumfreien Medium in die obere Kammer als auch zum serumhaltigen Medium in die untere Kammer pipettiert. Als Kontrolle für das Lösungsmittel wurde das entsprechende Volumen an DMSO verwendet.

### 4.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.3.1 Transformation von Bakterien

Zur Transformation chemisch kompetenter One Shot® TOP10 Bakterien mit retroviralen Plasmiden wurden 50  $\mu$ L Bakteriensuspension und 100 ng der jeweiligen Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 90 s im Heizblock auf 42 °C erhitzt und für 2 min auf Eis inkubiert. Für die Erholungskultur wurden die Bakterien in 4 mL LB-Flüssigmedium pipettiert, für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Dann wurden 200  $\mu$ L der Bakterienkultur auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 4.2.3.2 Kultivierung und Selektion von Bakterien

Für die Generierung von Einzelkolonien der Bakterienstämme wurden Bakterienkulturen auf LB-Ampicillin (Amp)-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die erfolgreich transformierten Bakterien wurden durch das Ampicillin im Nährmedium selektioniert. Die LB-Amp-Agarplatten mit den Bakterienkolonien wurden für das spätere Animpfen von Flüssigkulturen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Amplifikation der Plasmide erfolgte in LB-Flüssigkulturen. Die verwendeten Volumina betragen 4 mL LB-Medium in 13 mL-Bakterienkultur-röhrchen und 250 mL LB-Medium in 1 L-Erlenmeyerkolben.

Zum Animpfen wurden Einzelkolonien von LB-Amp-Agarplatten mit einem Zahnstocher in 4 mL Flüssigkulturen überführt, und die angeimpften Flüssigkulturen für 3 h bei 37 °C kultiviert. Die Kontrolle der optischen Dichte diente zur Bestimmung des Zeitpunktes, an dem mit 4 mL-Bakterienkulturen die 250 mL-Flüssigkulturen angeimpft wurden. Zur Selektion Plasmid-tragender Bakterien wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/mL addiert. Anschließend wurden die Kulturen über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator (*Series25 Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific Inc., New Jersey, USA) inkubiert.

### 4.2.3.3 DNA-Maxi-Präparation

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 250 mL einer Übernachtskultur von Bakterien mit dem gewünschten Plasmid gemäß Instruktionen des Herstellers verwendet. Zur Elution der isolierten DNA wurden 250 µL TE-Puffer auf die Säule gegeben, die DNA eluiert und bei 4 °C gelagert.

### 4.2.3.4 RNA-Isolierung aus Gewebe

Die Extraktion und Aufreinigung der RNA aus Gewebe von Lebern, Lungen und Primärtumoren wurde mit dem RNeasy® Midi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Hersteller-Angaben durchgeführt. Die Homogenisierung der Gewebeproben erfolgte mit einem Ultraturrax T25-Homogenisator (Janke & Kunkel; IKA Labortechnik).

### 4.2.3.5 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die RNA-Isolierung aus L-CI.5s-Suspensionszellen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen in ein 15 mL-Falcon-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (300×g, 5 min) und das Pellet zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 500 µL kaltem TRIzol®-Reagenz (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert. Die Zellen wurden in TRIzol-Reagenz in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Für die RNA-Isolierung aus adhärenenten SKOV3ip-*lacZ*-Zellen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen auf Zellkultur-Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät. 24 h später wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Dann wurde 1 mL kaltes Trizol®-Reagenz auf die Zellen pipettiert, die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte abgelöst, und das Gemisch in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Ab diesem Schritt wurden Suspensions- und adhärenente Zellen bis auf die verwendeten Volumina der Lösungen gleich behandelt. Die Zellen wurden für 5 min bei Raumtemperatur in TRIzol®-Reagenz inkubiert. Dann wurden unter dem Abzug 100 µL (L-Cl.5s) bzw. 200 µL (SKOV3ip-*lacZ*) Chloroform zugegeben und die Suspension für 15 s gevortext. Dann wurde für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 14000×g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. In dieser Zeit wurden in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß 250 µL (L-Cl.5s) bzw. 500 µL (SKOV3ip-*lacZ*) Isopropanol vorgelegt. Nach dem Ende der Zentrifugation wurde die obere, farblose Phase abgenommen und in das 1,5 mL-Reaktionsgefäß mit dem vorgelegten Isopropanol überführt. Nach Mischen des Gemisches durch mehrfaches Umschwenken und kurzes Vortexen folgte eine weitere Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde für 10 min bei 14000×g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Zum Pellet wurden 500 µL (L-Cl.5s) bzw. 1 mL (SKOV3ip-*lacZ*) 80 %iger Ethanol (Nuklease-frei) pipettiert. Dann wurde für 5 min bei 7600 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Danach wurde das RNA-Pellet für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 30 µL Nuklease-freiem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die RNA wurde über Nacht bei 4 °C gelöst und entweder direkt in cDNA umgeschrieben oder vor dem Umschreiben in cDNA für maximal fünf Tage bei -80 °C gelagert.

### 4.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch. Dafür wurden DNA- bzw. RNA-Lösungen zunächst 1:100 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Absorption dieser Verdünnung wurde in einer 100 µL Quarzküvette im Photometer bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen. Die gemessene Absorption bei 260 nm liefert über die folgende Formel

$$c \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = OD_{260} \times V \times F = OD_{260} \times 40 \times \frac{100}{1000}$$

die Konzentration der RNA. Darin sind  $c$  die Konzentration der Ausgangslösung,  $V$  der Verdünnungsfaktor und  $F$  ein spezifischer Multiplikationsfaktor (Absorptionskoeffizient, für RNA ist  $F = 40$ ). Für DNA ergibt folgende Formel

$$c \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = OD_{260} \times V \times F = OD_{260} \times 50 \times \frac{100}{1000}$$

die Konzentration der DNA. Für doppelsträngige DNA beträgt der spezifische Multiplikationsfaktor (Absorptionskoeffizient)  $F = 50$ , für einzelsträngige DNA ist  $F = 33$ . Für eine Protein-freie Lösung beträgt der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  zwischen 1,8 und 2,0 und lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der gemessenen Probe zu.

### 4.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Vor dem Umschreiben der RNA in cDNA durch die Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-PCR) wurde kontrolliert, ob die RNA intakt (nicht degradiert) war. Dafür wurde die RNA auf eine Konzentration von 100 ng/ $\mu$ L eingestellt und auf eine Agarosegel (1 % (w/v) in TAE-Puffer, 1  $\mu$ L Ethidiumbromid (EtBr) für ein 50 mL-Agarosegel) aufgetragen. Sowohl Gelgießapparatur als auch der Kamm für die Probenkammern des Gels wurden vor dem Gießen des Gels durch Einlegen in 2 % (v/v) AbSolve<sup>TM</sup>-Lösung für 30 min von kontaminierenden RNasen befreit, um eine Degradation der RNA im Gel zu vermeiden. Die RNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel für 10 min auf 65 °C erhitzt, um mögliche Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren, die das Laufverhalten der RNA im Gel und das Umschreiben der RNA in cDNA beeinträchtigen könnten. Dann wurde die denaturierte RNA für 2 min auf Eis inkubiert. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 5  $\mu$ L denaturierte RNA mit 5  $\mu$ L Nuklease-freiem ddH<sub>2</sub>O und 2  $\mu$ L 6xRNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die verbleibende Lösung denaturierter RNA wurde bis zur Durchführung der Reversen Transkription bei -20 °C gelagert. Nach erfolgter Auftrennung der RNA wurden die Gele an einer Imagestation fotografiert. Nicht degradierte RNA zeigt drei deutliche Banden, welche die drei ribosomalen RNA-Entitäten repräsentieren (28 S, 18 S und 5 S rRNA).

### 4.2.3.8 Reverse Transkription

Die cDNA für die quantitative *Real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR, engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*) wurde durch das Umschreiben der aus Zellen oder Gewebeproben isolierten RNA in cDNA durch Reverse Transkription erhalten. Für die Reverse Transkription wurde der High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach Hersteller-Protokoll verwendet. Dafür wurden 10  $\mu$ L der denaturierten RNA mit einer Konzentration von 100 ng/ $\mu$ L eingesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde bis zur weiteren Analysierung bei -20 °C gelagert.

### 4.2.3.9 *Real-time* Polymerasekettenreaktion

Die mRNA-Expressionslevel einzelner Gene wurde mittels quantitativer *Real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR bzw. TaqMan®-Analyse) analysiert. Dafür wurde die durch Reverse Transkription gewonnene cDNA eingesetzt. Die qRT-PCR basiert auf der Verwendung von Sonden, welche mit einem Fluoreszenzmolekül (VIC® oder FAM™) und einem Quencher (TAMRA™) gekoppelt sind. Während der Synthese des Gegenstranges kommt es zum Abbau der Sonde und damit zur Trennung von Fluoreszenzmolekül und Quencher. Dieses führt zum Anstieg eines spezifischen Fluoreszenzsignals, welches bei Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes ( $C_t$ -Wert, engl. *cycle threshold*) die Quantifizierung des untersuchten Gens erlaubt. Die Vergleichbarkeit der mRNA-Expressionslevel einzelner Gene zwischen verschiedenen Proben wurde durch die Normalisierung der mRNA-Expressionslevel dieser Gene auf den mRNA-Expressionslevel des Haushaltsgens (engl. *housekeeping gene*) 18S rRNA in der jeweiligen Probe ermöglicht (relative Quantifizierung).

Für die TaqMan®-Analyse wurden die Proben 1:100 (5 µL auf 500 µL) und 1:500 (100 µL der 1:100 Verdünnung auf 500 µL) mit Nuklease-freiem ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wurden die Proben in die Kavitäten einer MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) pipettiert. Die Messung der endogenen 18S rRNA-Kontrolle erfolgte in 10 µL der 1:500 verdünnten cDNA, die Messung des interessierenden Gens wurde in 10 µL der 1:100 verdünnten cDNA durchgeführt. Von allen Proben wurden Triplikate gemessen. In 2 Kavitäten wurden 10 µL Nuklease-freies ddH<sub>2</sub>O als Negativkontrolle ohne Probe (NTCs = *non template controls*) pipettiert, die als Kontrolle für eine mögliche Kontamination der verwendeten Reagenzien oder unsauberes Arbeiten dient.

Danach wurde die Reaktionslösung für die qRT-PCR hergestellt. Die Genexpressionsanalysen wurden mit zwei verschiedenen Ansätzen durchgeführt. (1) Für die Quantifizierung der folgenden Gene wurden TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt: humanes L1CAM (Hs00240928\_m1), humanes MMP-2 (Hs00234422\_m1), humanes MMP-9 (Hs00234579\_m1), murines L1CAM (Mm00493049\_m1), murines MMP-2 (Mm00439508\_m1), murines MMP-9 (Mm00600163\_m1), murines PCNA (Mm00448100\_g1), und *lacZ* (LACZ1-LAC3). Die Daten wurden auf humane 18 S rRNA (4319413E, RefSeq: X03205.1) normalisiert. Dafür wurden in ein 1,5 mL

Eppendorf-Reaktionsgefäß pro Probe jeweils 15 µL PCR-Reaktionslösung pipettiert, welche aus 12,5 µL TaqMan® Gene Expression Master Mix, 1,25 µL Primer-Sonde-Mix (Applied Biosystems) und 1,25 µL Nuklease-freiem ddH<sub>2</sub>O zusammengesetzt war. Für die Messung der *lacZ*-mRNA wurde der speziell gereinigte TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 verwendet. (2) Für die Quantifizierung der folgenden Gene wurden qRT-PCR-Assays aus Universal ProbeLibrary Set, Human (04683633001) und Universal ProbeLibrary Set, Mouse (04683641001) (Roche, Penzberg, Germany) in Kombination mit FastStart Universal Probe Master (Rox) und Gen-spezifischen Primern verwendet: humanes MMP-2 (Probe #34), humanes MMP-9 (Probe #24), murines MMP-2 (Probe #85) und murines MMP-9 (Probe #19). Die Primer-Sequenzen wurden über das Universal ProbeLibrary Assay Design Center (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>) erhalten. Die Quantifizierung der Genexpression mittels Universal ProbeLibrary erfolgte nach Hersteller-Angaben.

Die PCR-Reaktionslösung wurde mittels einer Multipipette zu den in die Kavitäten vorgelegten Proben pipettiert. Danach wurde die MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate mit einer Folie versiegelt und die Platten kurz zentrifugiert. Dadurch werden eventuell vorhandene Luftblasen entfernt und der PCR-Ansatz im unteren Teil der Kavität gesammelt. Die Messung der Proben erfolgte in einem ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SDS 2.2 (Applied Biosystems) durch relative Quantifizierung.

### 4.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.2.4.1 Immunpräzipitation

Für den Nachweis von murinem L1CAM durch Western Blot-Analyse in Zelllysaten von L-CI.5s-Zellen wurde das Protein zunächst immunpräzipitiert. Dafür wurde zunächst in einem 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß 1 µg des monoklonalen anti-human L1CAM Antikörpers L1-14.10 zu einem 30 µL *Slurry* Protein G-Sepharose gegeben. Die Bindung erfolgte durch Inkubation auf einem Drehrad für 2 h bei 4 °C. Danach wurden Zelllysate mit einer Gesamtproteinmenge von 1 mg hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Der Komplex aus murinem L1CAM und an Protein G-Sepharose-Kügelchen gebundenem Antikörper wurde zweimal mit



jeweils 1 mL 1xPBS gewaschen, wobei die Sepharose G-Kügelchen durch Zentrifugation bei 600xg sedimentiert und die Überstände verworfen wurden. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand bis auf einen kleinen Rest abgenommen, 20 µL 2xLaemmli-Puffer zugegeben und die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die immunpräzipitierten Proben wurden mittels Western-Blot analysiert.

### 4.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentrationen von Zelllysaten wurden photometrisch und unter Verwendung des Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) bestimmt. Für die Herstellung der Zelllysate wurde 1xCell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology Europe, Leiden, Niederlande) nach Hersteller-Instruktionen verwendet. Für die Proteinbestimmung wurden die Zelllysate je nach Konzentration zwischen 1:10 und 1:20 verdünnt. Dann wurden jeweils 10 µL dieser Verdünnungen in Duplikaten in die Löcher einer 96-Loch-Platte pipettiert. Dann wurde aus dem im Kit enthaltenen BSA (bovines Serumalbumin)-Standard eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL und 0,06125 mg/mL. Auch von den Lösungen des Standards wurden jeweils 10 µL in Duplikaten in die Löcher der 96-Loch-Platte pipettiert. Danach wurden die beiden im Kit enthaltenen Lösungen Reagenz A und Reagenz B entsprechend dem benötigten Volumen im Verhältnis 1:50 (Reagenz A : Reagenz B) gemischt. Von diesem Reaktionsgemisch wurden mit einer Multipipette jeweils 200 µL zu den vorgelegten Proben pipettiert. Das Gemisch aus Proben und Reagenz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Absorption am Photometer (Wallac Victor, PerkinElmer, Weiterstadt, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 590 nm für 0,1 s gemessen. Aus den gemessenen Absorptionen und den bekannten Konzentrationen der BSA-Standardreihe wurde eine Standardkurve erstellt. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden aus den gemessenen Absorptionen über die Formel der resultierenden Geradengleichung berechnet.

### 4.2.4.3 Western Blot

Für die Analyse von L1CAM in Zelllysaten wurden Western Blots durchgeführt. L1CAM ist mit 220 kDa ein großes Protein, welches in 10 %igen Trenngelen ein optimales Laufverhalten aufweist. Das Laufverhalten (die elektrophoretische Mobilität) eines Proteins wird hauptsächlich durch die Maschenweite des

polymerisierten Polyacrylamid-Gels bestimmt. Für die Herstellung 10 %iger Trenngel wurden 8,75 mL steriles ddH<sub>2</sub>O, 6,25 mL PAA (40 %, 29:1, AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 5 mL 1,5 M TRIS (pH 8,6 inkl. 0,4 % SDS), 115 µL 10 % (w/v) APS und 30 µL TEMED in einem 50 mL-Falcon-Röhrchen gemischt. Das noch flüssige Gel wurde sofort in zuvor mit 70 %igem Alkohol gereinigte Gelkassetten (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit einem Glasplatten-Abstandhalter (*Spacer*) von 1,5 mm gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten und das Austrocknen der Gele zu verhindern. Für die Polymerisation des Polyacrylamids wurden die Gele für 1 h stehen gelassen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und die Geloberfläche mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gespült, um Reste des Isopropanols zu beseitigen. Diese könnten später den effizienten Übertritt der Proteine vom Sammel- in das Trenngel stören.

Das Sammelgel wurde aus 6,1 mL sterilem ddH<sub>2</sub>O, 1,25 mL PAA (40 %, 29:1), 2,5 mL 1,5 M TRIS (pH 6,8) und 10 µL TEMED gemischt und auf das Trenngel geschichtet. Dann wurden die Kämme für die Geltaschen zwischen die Glasplatten eingesetzt. Nach 45 min und erfolgter Polymerisation des Sammelgels wurden die Glaskassetten aus der Gelgießvorrichtung genommen, die Kämme entfernt und die Gele verwendet oder zum Schutz vor Austrocknung in mit Elektrophoresepuffer getränkte Papiertücher gewickelt und verschlossen in einer Plastiktüte bei 4 °C für maximal eine Woche gelagert werden.

Während der Polymerisation des Sammelgels erfolgte die Vorbereitung der Zellysate. Diese wurden auf einen Proteingehalt von 40 µg eingestellt und im Verhältnis 1:5 mit 5xLaemmli-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden. Während der Probenvorbereitung wurden je 2 Gelkassetten in die Gelelektrophoresekammer gestellt und die Kammer mit 1xGelelektrophoresepuffer gefüllt. Dann wurden maximal 40 µL der jeweiligen Proben pro Tasche auf die Gele aufgetragen. Als Größenmarker wurden in jeweils eine Tasche pro Gel Gels 5 µL PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Thermo Scientific, Bonn, Deutschland) aufgetragen, die Apparatur verschlossen und die Gelelektrophorese gestartet. Die Elektrophorese erfolgte mit 40 mA pro Gel für ca. 2 h.

Kurz vor dem Ende der Gelelektrophorese wurde die Blotting-Apparatur für den Transfer der Proteine vom Gel auf Nitrozellulose-Membran (Amersham™ Hybond™ Blotting Membrane, GE Healthcare, München, Deutschland) vorbereitet. Dafür wurden pro Gel eine Nitrozellulose-Membran mit einer Größe von 6×8 cm und zwei Filterpapieren (Thick Blot Filter Paper, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) mit der gleichen Größe zugeschnitten und für 10 min in 1×Blottingpuffer gelegt. Nach dieser Zeit wurden für jedes Gel auf die untere Platte (Anode) der Blotting-Apparatur (*Trans-Blot SD cell*, BioRad) ein Filterpapier und eine Nitrozellulose-Membran übereinander gelegt. Nach dem Ende der Elektrophorese wurden die Gelkassetten aus der Gelelektrophoresekammer genommen, die Gele vorsichtig aus den Gelkassetten gelöst und auf Nitrozellulose-Membran und Filterpapier gelegt. Dann wurde das Gel mit einem Filterpapier bedeckt. Zur Entfernung von Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen aus Papier, Nitrozellulose-Membran, Gel und Papier wurde eine Stabpipette vorsichtig über den Stapel gerollt. Schließlich wurde die Kathode der Blotting-Apparatur auf den Stapel gesetzt und der Proteintransfer gestartet. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte bei 12 V für 75 min.

Die weitere Behandlung der Nitrozellulose-Membran erfolgte mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben. Die Effizienz des Proteintransfers wurde durch Färbung mit Ponceau S-Lösung überprüft. Dafür wurde die Membran mit einer Pinzette aus der Blotting-Apparatur genommen, direkt in die Ponceau S-Lösung gelegt und kurz geschwenkt. Die Hintergrund-Färbung wurde durch Waschen der Membran mit ddH<sub>2</sub>O reduziert. Nach erfolgter Kontrolle wurde die Membran vier Mal für jeweils 5 min mit 1×TBS-T gewaschen, in eine Lösung von 5 % (w/v) BSA in TBS-T gegeben und bei Raumtemperatur eine Stunde lang geschwenkt. Das BSA sollte die unspezifische Bindung der Antikörper an Proteine auf der Membran verhindern. Dann wurde die Membran erneut vier Mal für 5 min mit frischem 1×TBS-T gewaschen.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran mit den entsprechenden Primärantikörpern in 5 % (w/v) BSA in 1×TBS-T über Nacht bei 4 °C. Danach wurde erneut vier Mal für 5 min mit 1×TBS-T gewaschen, bevor die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur folgte. Dann wurde die Membran zur Entfernung von nicht-gebundenem Sekundärantikörper wiederum vier Mal für je 5 min mit 1×TBS-T gewaschen.

Der Nachweis des interessierenden Proteins erfolgte schließlich durch Zugabe von Clarity™ ECL Western Substrate (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland), einem luminogenen Detektionsreagenz und Substrat der Meerrettich-Peroxidase. Hierzu wurden je 0,5 mL der beiden Lösungen auf eine sterile Petrischale Folie pipettiert, gemischt und die Membran mit der Oberseite nach unten in die Lösung gelegt. Dann wurde die Membran auf eine vorbereitete Folie mit der Oberseite nach oben in den Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories GmbH) gelegt und Bilder der Membran mit den durch das Substrat lumineszierenden Banden mittels ImageLab Version 4.0 Software (Bio-Rad Laboratories GmbH) dokumentiert. Je nach Signalstärke wurden die Membranen zwischen 5 s und 1 min belichtet. Die Membranen konnten für mehrere Wochen bei 4 °C in 1×TBS-T aufbewahrt werden.

### 4.2.5 Immunologische Methoden

#### 4.2.5.1 Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenmolekülen

Die Analyse der L1CAM-Zelloberflächenlevel erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurden die Zellen auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen/mL in 1×PBS mit 10 % (v/v) FCS eingestellt. Dann wurden 200 µL der Zellsuspension (entsprechend  $1 \times 10^5$  Zellen) in 5 mL-Röhrchen mit konischem Boden (Falcon™ Round-bottom Polystyrene tubes; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) überführt. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden für 5 min bei  $900 \times g$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µL 1×PBS mit 3 % (w/v) BSA und dem jeweiligen Primärantikörper vorsichtig (zur Vermeidung von Luftblasen) resuspendiert. Als Primärantikörper wurden der monoklonale Ratte anti-Maus L1CAM-Antikörper, Klon 555 (L-CI.5s) bzw. der monoklonale Maus anti-human L1CAM-Antikörper L1-9.3 (SKOV3ip-*lacZ*) verwendet, welche freundlicherweise von Prof. Peter Altevogt (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1 h bei 4 °C im Kühlraum auf einem Schwenkschüttler. Danach wurden die Zellen durch vorsichtiges Resuspendieren in 4 mL 1×PBS mit 3 % (w/v) BSA gewaschen, die Zellen für 5 min bei  $900 \times g$  zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dann wurden die Zellen in 100 µL 1×PBS mit 1:50 verdünntem Sekundärantikörper Goat polyclonal Secondary Antibody to Rat IgG-H&L (PE) (Abcam, Cambridge, Großbritannien) bzw. PE Goat

anti-mouse IgG (minimal x-reactivity) (BioLegend, London, Großbritannien) resuspendiert. Für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Röhren zum Schutz vor Lichteinstrahlung mit Aluminiumfolie abgedeckt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1 h bei 4 °C im Kühlraum auf einem Schwenkschüttler. Danach wurden die Zellen durch vorsichtiges Resuspendieren in 4 mL 1xPBS mit 3 % (w/v) BSA gewaschen, die Zellen für 5 min bei 900xg zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Schließlich wurden die Zellen in 200 µL 1xPBS mit 3 % (w/v) BSA resuspendiert. Die Messung wurde an einem BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Version 8 Software (Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA).

#### 4.2.5.2 Herstellung von Kryoschnitten

Die Primärtumoren und Lebern wurde nach Entnahme zerteilt, mehrere Stücke in Tissue Tek® einbettet und auf Trockeneis eingefroren. Anschließend wurden die eingebetteten Proben bis zur Verwendung für Kryoschnitte bei -70 °C gelagert.

Zur Gewinnung von 8 µm dicken Kryoschnitten wurden die eingebetteten Stücke von Primärtumoren und Lebern bei -17 °C mit einem Kryo-Mikrotom (Microm HM560 Cryo Star, Richard-Allan Scientific, San Diego, CA, USA) geschnitten, mit SuperFrost® Objektträgern (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.5.3 *In situ*-Zymographie

Zunächst wurden die Kryoschnitte für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurden je Objektträger 178 µL 1 %iger Agarose aufgeköcht und im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt. Zur flüssigen Agarose wurden 22 µL einer Lösung von DQ™-Gelatine (Molecular Probes®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gegeben (20 µL der 0,1 mg/mL Stocklösung; 2 µL einer 100 µL/mL DAPI-Stocklösung). Nach zügigem Auf- und Abpipettieren wurde die Agarose-DQ™-Gelatine-DAPI-Lösung auf die Schnitte pipettiert und die Schnitte mit einem Deckgläschen bedeckt. Danach wurden die Schnitte lichtgeschützt bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer (mit Aluminiumfolie umwickelt) für 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgte an einem Nikon ECLIPSE TE2000-S Fluoreszenzmikroskop mit der NIS Elements BR 3.10 Software (beides Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, Niederlande).

Bei einigen der *in situ*-Zymographien wurden 200 µM des Gelatinase-spezifischen Inhibitors SB-3CT zu der Agarose-DQ<sup>TM</sup>-Gelatine-DAPI-Lösung pipettiert. Als Lösungsmittel-Kontrolle diente das entsprechende Volumen von DMSO.

#### 4.2.5.4 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Leber wurde sofort nach Entnahme in kleine Stücke geschnitten. Stücke der Leber wurden über Nacht bei 4°C in Fixierlösung fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet (durchgeführt vom Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München). Dann wurden von den Paraffinblöcken mittels eines elektrischen Rotationsmikrotoms (Microm HM355, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) Schnitte mit einer Dicke von 3,5 µm bis 5 µm angefertigt, und diese zur Glättung mit einem Pinsel in ein mit Wasser gefülltes Paraffinstreckbad (44 °C) überführt. Die so geglätteten Paraffinschnitte wurden auf SuperFrost®-Objektträger aufgezoogen und getrocknet.

#### 4.2.5.5 Immunhistochemische PCNA-Färbung

Zur Entfernung des Paraffins wurden die Paraffinschnitte unmittelbar vor der immunhistologischen Färbung nacheinander durch eine absteigende Alkoholreihe bestehend aus drei Roticlear<sup>TM</sup>-Bädern (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), zwei Alkoholbädern (100 % EtOH), zwei Alkoholbädern (90 % EtOH) geführt und in jedem dieser Bäder für 3 min stehen gelassen. Dann wurden die Schnitte in TBS (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH = 7,6) rehydriert.

Die entparaffinierten und rehydrierten Paraffinschnitte wurden zur Antigen-demaskierung für 15 min in einer Mikrowellenküvette (Dako Deutschland, Hamburg, Deutschland) mit Citrat-Puffer (10 mM Zitronensäure, 0,05 % Tween 20, pH = 6,0) gekocht und nach 15-minütiger Abkühlung für 5 min mit TBS gewaschen. Durch eine 5-minütige Inkubation mit einer 3 %-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in TBS wurden endogen vorkommende Peroxidasen inaktiviert. Die Schnitte wurden anschließend 5 min in TBS inkubiert. Dann wurden die Objektträger aus der Lösung entfernt und anhaftende Lösung durch vorsichtiges Tupfen mit fussselfreien Papiertüchern entfernt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Fettstift (Dako Deutschland) eingekreist. Dieser Schritt sollte die gleichmäßige Bedeckung des Gewebes mit den Lösungen gewährleisten.

Die immunhistochemische Färbung von PCNA wurden 200 µL des Primärantikörpers Rabbit polyclonal antibody to PCNA (Abcam, Cambridge, Großbritannien) in einer

1:2000-Verdünnung in TBS-T vorsichtig auf die Schnitte pipettiert und für 20 h bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Kontrolle wurde reines TBS-T verwendet. Danach wurden die Gewebeschnitte zwei Mal für 10 min in einer Standkuvette mit TBS gewaschen. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit dem Cell and Tissue Staining Kit (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) nach Hersteller-Angaben bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Substrat (Dako Deutschland) verwendet. Dieses wurde auf die Schnitte getropft und die Farbreaktion durch Addition von ddH<sub>2</sub>O gestoppt. Die Schnitte wurden dann für 5 min in TBS gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland). Dafür wurden die Objektträger für 5 min in Hämalaun-Lösung gegeben, drei Mal mit Leitungswasser gewaschen und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut (leichter Wasserstrahl in die Kuvette fließen lassen). Abschließend wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine und einem Deckgläschen bedeckt. Die Auswertung erfolgte durch Dokumentation am Leica DMR-Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) mit der SPOT Advanced Software (SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, MI, USA).

### 4.2.6 X-Gal-Färbungen

#### 4.2.6.1 X-Gal-Färbung von Organen

Die Organe wurden direkt nach Entnahme aus den Mäusen durch kurzes Schwenken in einem mit 1×PBS gefüllten Becherglas gewaschen und in einem mit Fixierlösung (2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in 1×PBS) gefüllten Greiner-Töpfchen für 1 bis 2 h fixiert. Dann wurden die Organe drei Mal mit 1×PBS gewaschen, und 10 mL *ready-to-use* X-Gal-Färbelösung zu den Organen gegeben. Die Greiner-Töpfchen wurden mit lose aufgelegtem, nicht verschlossenem Deckel (ermöglicht den Austausch von für die Färbung benötigtem Sauerstoff mit der umgebenden Luft) für 3 bis 7 h bei 37 °C inkubiert, und die Färbung über Nacht bei 4 °C fortgesetzt. Am folgenden Tag wurden die Organe einmal mit 1×PBS gewaschen und schließlich mit 10 mL Fixierlösung bedeckt. Die gefärbten Organe wurden in der Fixierlösung gelagert.

### 4.2.6.2 X-Gal-Färbung von Kryoschnitten

X-Gal-Färbungen wurden auf Kryoschnitten durchgeführt, um *lacZ*-markierte Tumorzellen in Primärtumoren und Lebermetastasen sichtbar zu machen. Die Kryoschnitte wurden in einer Standküvette für 10 min in Fixierlösung (2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in 1xPBS) fixiert sowie für jeweils 10 min in Waschlösung (2 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS) und Detergenslösung (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Natriumdeoxycholat, 0,02 % Nonidet-P40) gewaschen. Dann wurden die Kryoschnitte für 6 h bei 37 °C mit *ready-to-use* X-Gal-Lösung inkubiert, mit 1xPBS gewaschen und mit Hämalaun- und Eosin-Lösungen (H&E-Färbung) gegengefärbt. Das Ergebnis der Färbung wurde mit einem Leica DMR Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und SPOT Advanced Software (SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, MI, USA) dokumentiert.

### 4.2.7 Statistische Analysen

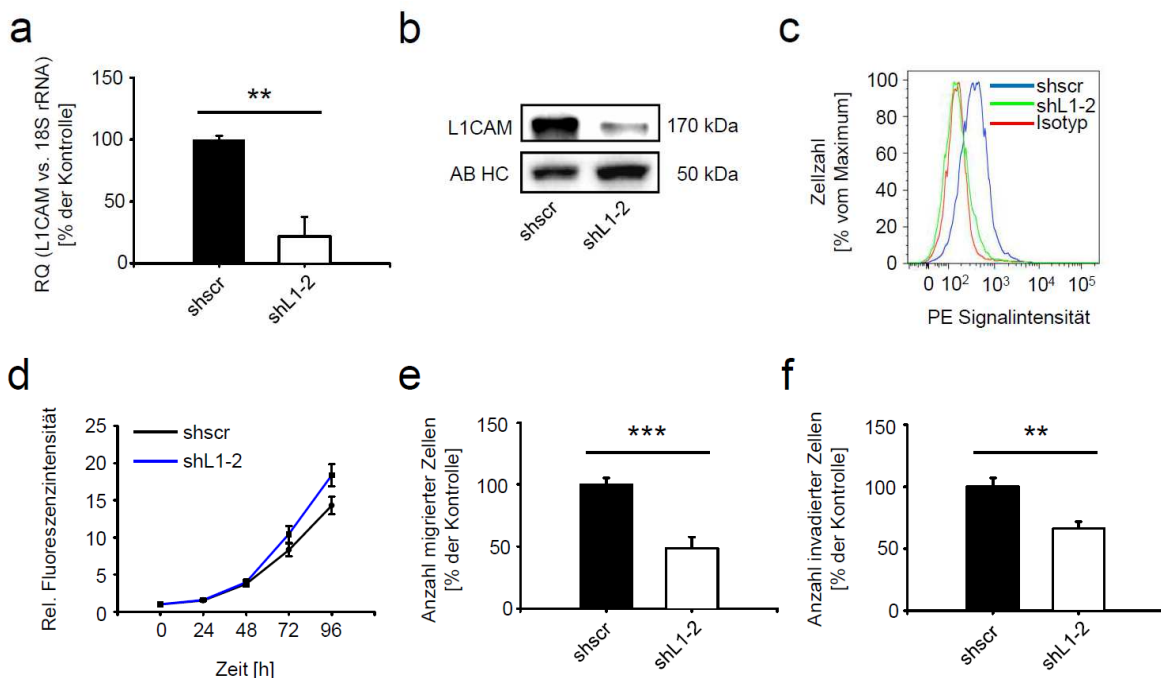
Die Normalverteilung der Daten wurde durch Kolmogorov–Smirnov-Test und gleiche Varianz durch Levene-Median-Test ermittelt. Zwei-Gruppen-Experimente mit normal verteilten Daten wurden mit ungepaartem t-Test auf Signifikanz getestet. Zwei-Gruppen-Experimente mit nicht-normalverteilten Daten wurden mittels Mann-Whitney Rangsummentest auf Signifikanz getestet. Experimente mit drei oder mehr Gruppen mit normal-verteilten Daten wurden durch einfaktorielle Varianzanalyse und anschließenden *post hoc*-Test mittels Holm-Sidak-Methode auf statistische Signifikanz getestet. Experimente mit drei Gruppen und nicht-normalverteilten Daten wurden durch Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse und nachfolgenden *post hoc*-Vergleich mittels Dunn-Methode auf statistische Signifikanz getestet. Statistische Signifikanz wurde wie folgt angegeben:  $p < 0.05$  (\*, signifikant),  $p < 0.01$  (\*\*, hoch signifikant), und  $p < 0.001$  (\*\*\*, extrem signifikant). Alle statistischen Analysen wurden mit der Software SigmaStat für Windows Version 3.00 (SPSS Inc./IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Die Kaplan-Meier-Analyse für das Überleben und der Log-Rank-Test für statistische Signifikanz der Überlebensdaten wurden mit der Software GraphPad Prism Version 6.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Die Suppression von L1CAM in murinen T-Lymphom-Zellen führte zu verringerter Migration und Invasion *in vitro*

Die erhöhte Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM ist mit der Malignität von Tumoren und mit schlechter Prognose assoziiert [141,252]. Außerdem sind hohe Expressionslevel von L1CAM mit dem Auftreten von Lebermetastasen sowohl in Patienten als auch in Tumormodellen in der Maus verbunden [166,169,253]. Um den Einfluss der Suppression von L1CAM auf das metastatische Potential eines nicht-soliden Tumormodells zu untersuchen, wurde L1CAM durch den Einsatz der shRNAi-Technologie in der T-Lymphom-Zelllinie L-CI.5s mit retroviralen Vektoren, die gegen L1CAM gerichtete shRNAs exprimieren, supprimiert. Die Suppression von L1CAM wurde sowohl auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR (Abb. 4a) als auch auf Proteinebene mittels Western Blot (Abb. 4b) und Durchflusszytometrie (Abb. 4c) bestätigt.



**Abb. 4.:** Tumorzell-L1CAM ist ein wichtiger Regulator des metastatischen Potentials *in vitro*. L-CI.5s-Zellen wurden mit Retroviren, die eine gegen murines L1CAM gerichtete shRNA-Sequenz (shL1-2) oder eine zufällige, nicht-zielgerichtete shRNA-Sequenz (shscr, scrambled shRNA) enthalten, transduziert. **a.** Die qRT-PCR-Analyse der L1CAM-mRNA-Expression  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) in L-CI.5s-Zellen. L1CAM-mRNA-Expressionslevel wurden auf die Level der 18 S rRNA normalisiert und der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr: 100,00  $\pm$  1,65,  $n = 3$ ; shL1-2: 21,63  $\pm$  9,18,  $n = 3$  (shL1-2 vs. shscr:  $**p = 0,001$ ). **b.** Western Blot-Analyse von

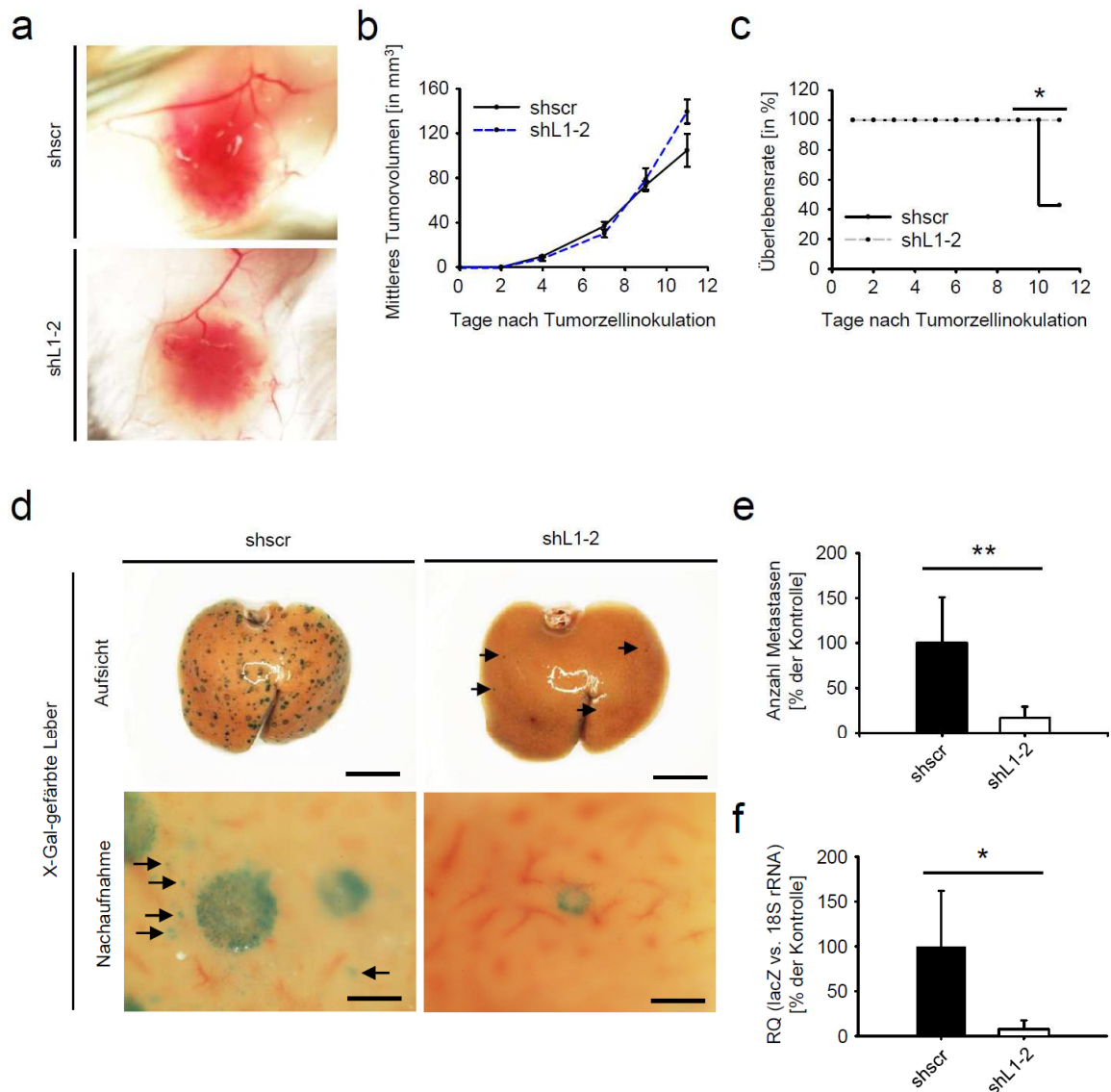
immunopräzipitiertem L1CAM von L-CI.5s-Zellen **c.** Durchflusszytometrische Analyse der L1CAM-Expression in L-CI.5s-Zellen. **d.** Proliferation der L-CI.5s-Zellen quantifiziert mittels alamarBlue®-Assay. Die Mittelwerte beider Gruppen wurden auf den jeweiligen 0 h-Wert normalisiert und der 0 h-Wert gleich 1 gesetzt. Shscr, 0 h:  $1,00 \pm 0,00$ ,  $n = 6$ ; shscr, 24 h:  $1,53 \pm 0,10$ ,  $n = 6$ ; shscr, 48 h:  $3,74 \pm 0,30$ ,  $n = 6$ ; shscr, 72 h:  $8,31 \pm 0,84$ ,  $n = 6$ ; shscr, 96 h:  $14,06 \pm 0,76$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, 0 h:  $1,00 \pm 0,00$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, 24 h:  $1,60 \pm 0,13$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, 48 h:  $4,01 \pm 0,35$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, 72 h:  $10,45 \pm 1,23$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, 96 h:  $17,63 \pm 1,06$ ,  $n = 6$ . **e.** Mittlere Anzahl der migrierten Zellen pro Bildausschnitt  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) im Trans-well-Migrationsexperiment. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 5,10$ ,  $n = 6$ ; shL1-2:  $48,64 \pm 9,02$ ,  $n = 6$  (shL1-2 vs. shscr:  $***p \leq 0,001$ ). **f.** Mittlere Anzahl der invadierten Zellen pro Bildausschnitt  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) im Matrigel-Invasionsexperiment. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 7,30$ ,  $n = 6$ ; shL1-2:  $66,35 \pm 5,62$ ,  $n = 6$  (shL1-2 vs. shscr:  $**p = 0,003$ ).

---

Die Suppression von L1CAM zeigte keinen Effekt auf die Proliferation im alamarBlue®-Assay (Abb. 4d). Dagegen resultierte der *Knockdown* von L1CAM in einer signifikant reduzierten migratorischen Kapazität in Trans-well-Migrationsassays (Abb. 4e) und einer signifikant verringerten Invasion in Matrigel-Invasionsassays (Abb. 4f). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Suppression von L1CAM zu einer Verringerung des metastatischen Potentials *in vitro* führen, und deuten auf eine mögliche Rolle von L1CAM in der Metastasierung von L-CI.5s-Zellen hin.

## 5.2 L1CAM fördert die spontane Leber-Metastasierung von L-CI.5s T-Lymphom-Zellen

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob die verringerte Tumorzellmotilität das metastatische Verhalten der L-CI.5s-Zellen *in vivo* beeinflusst. Dafür wurden L-CI.5s-Zellen intradermal (i. d.) in die Flanke von syngenem DBA/2-Mäusen inokuliert und das Primärtumorwachstum beobachtet. Dabei wurde gefunden, dass das *Silencing* von L1CAM zu keiner Veränderung des intradermalen Tumorwachstums führte (Abb. 5a, b), dass jedoch das Überleben der Mäuse im Vergleich mit der shscr-Kontrollgruppe signifikant verlängert wurde (Abb. 5c). In Einklang damit führte die Suppression von L1CAM zu einer dramatisch reduzierten spontanen Metastasierung in die Leber (Abb. 5d). In Übereinstimmung damit waren sowohl die Anzahl der metastatischen Kolonien nach X-Gal-Färbung (Abb. 5e) als auch die Gesamtumorlast der Leber, welche mittels qRT-PCR für *lacZ* bestimmt wurde (Abb. 5f), verglichen mit der shscr-Kontrolle signifikant reduziert.

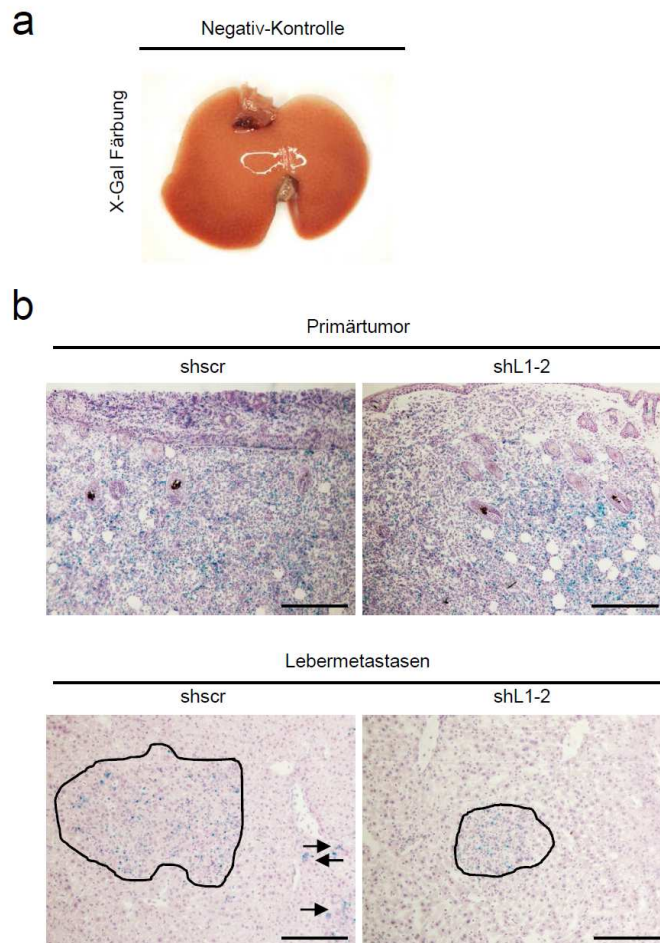


**Abb. 5:** Von Tumorzellen exprimiertes L1CAM ist ein wichtiger Regulator des metastatischen Potentials *in vivo* und invers korreliert mit dem Überleben der Mäuse. **a.** Gezeigt sind Bilder repräsentativer Tumoren aus spontanen Metastasierungsexperimenten an Tag 8. **b.** Tumorumvolumina wurden auf der Basis der Messungen des Tumor-Durchmessers berechnet. Dargestellt ist das mittlere Tumorumvolumen  $\pm$  SEM (Punkte  $\pm$  Fehlerbalken) bis einschließlich Tag 11. shscr, Tag 0:  $0,00 \pm 0,00$ ,  $n = 7$ ; shscr, Tag 2:  $0,19 \pm 0,10$ ,  $n = 7$ ; Tag 4:  $9,86 \pm 0,82$ ,  $n = 7$ ; Tag 7:  $37,12 \pm 3,64$ ,  $n = 7$ ; Tag 9:  $73,40 \pm 3,87$ ,  $n = 7$ ; Tag 11:  $104,78 \pm 15,02$ ,  $n = 7$ ; shL1-2, Tag 0:  $0,00 \pm 0,00$ ,  $n = 5$ ; shL1-2, Tag 2:  $0,05 \pm 0,05$ ,  $n = 5$ ; shL1-2, Tag 4:  $7,75 \pm 2,14$ ,  $n = 5$ ; Tag 7:  $30,33 \pm 3,72$ ,  $n = 5$ ; Tag 9:  $78,52 \pm 10,16$ ,  $n = 5$ ; Tag 11:  $139,40 \pm 10,65$ ,  $n = 5$ . **c.** Ein theoretisches Gesamtüberleben wurde basierend auf dem dokumentierten Gesundheitsstatus der Mäuse an Tag 11 kalkuliert. Moribunde Mäuse wurden für die Berechnung als tote Mäuse gewertet, und um das Leiden der Tiere zu minimieren (shscr:  $n = 7$ ; shL1-2:  $n = 6$ ;  $*p 0,033$ ). **d.** X-Gal-Färbung (indigoblaue Fokusse) der präparierten Lebern aus dem spontanen Metastasierungsexperiment an Tag 8 (Balken: 5 mm (makroskopische Aufnahme), 0,3 mm (Nachaufnahme)). **e.** Mittlere Anzahl spontaner Lebermetastasen  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) aus dem spontanen Metastasierungs-Experiment. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 19,23$ ,  $n = 7$ ; shL1-2:  $16,88 \pm 5,05$ ,  $n = 6$  (shL1-2 vs. shscr:  $**p = 0,001$ ). **f.** Mittlere mRNA-Expression des bakteriellen *lacZ*-Gens in Lebern  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken). *lacZ*-Level wurden auf die Expressionslevel von 18 S rRNA normalisiert, und der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde

## Ergebnisse

gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 25,28$ ,  $n = 7$ ; shL1-2:  $7,69 \pm 3,97$ ,  $n = 6$  (shL1-2 vs. shscr:  $*p = 0.005$ ).

Als Negativ-Kontrolle für die X-Gal-Färbung ist eine X-Gal-gefärbte, Tumorzell-freie Leber gezeigt (Abb. 6a). Die X-Gal-Färbung von Kryoschnitten der Primärtumoren und Metastasen-tragenden Lebern des spontanen Metastasierungs experimentes zeigte eine deutliche Präsenz *lacZ*-markierter Tumorzellen (Abb. 6b).

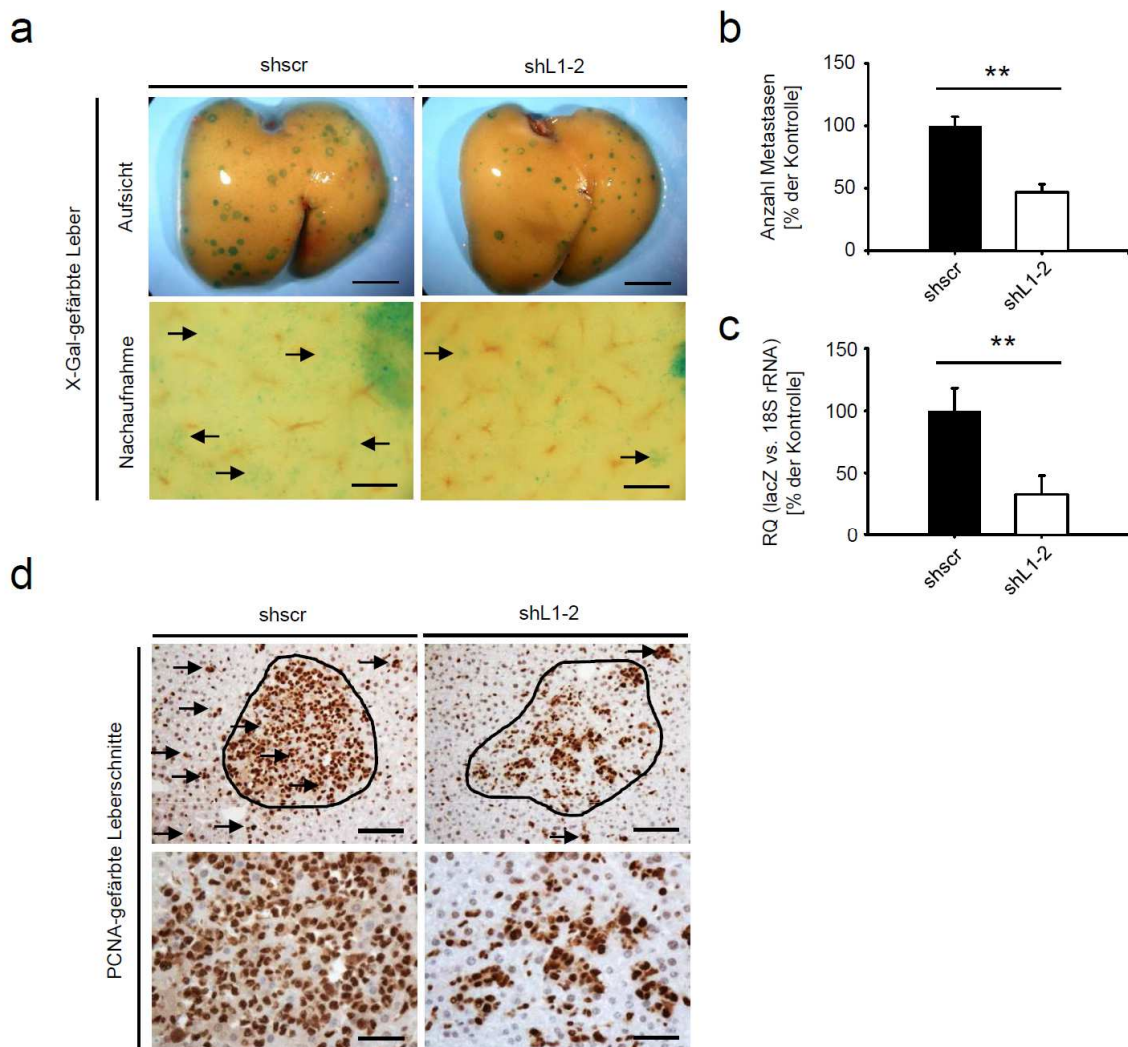


**Abb. 6:** X-Gal-Färbungen einer Tumorzell-freien Leber als Negativkontrolle für die X-Gal-gefärbten, Tumorzellen-tragenden Lebern und X-Gal-Färbungen von Kryoschnitten eines Primärtumors und einer Leber aus dem spontanen Metastasierungs experiment. **a.** X-Gal-Färbung einer Tumorzell-freien Leber aus DBA/2-Mäusen. Ohne die Präsenz von  $\beta$ -Galaktosidase-markierten Tumorzellen in der Leber sind keine für die X-Gal-Färbung typischen blauen Fokusse auf der Leberoberfläche zu sehen. **b.** Hämatoxylin & Eosin (H & E)-Färbung von Kryoschnitten des Primärtumors und der Leber aus dem spontanen Metastasierungs assay mit L-CI.5s-Zellen als Kontrolle für die *in situ*-Zymographie in Abb. 8c, d. Die H & E-Färbung zeigt die Präsenz von Hämatoxylin-positiven Zellkernen im Bereich des Primärtumors in der Nähe der Epidermis (obere Reihe) sowie die höhere Dichte von Hämatoxylin-positiven Zellkernen in Bereichen der Lebermetastasen (untere Reihe, siehe Markierung und Pfeile).

Zusammengefasst suggerieren diese Ergebnisse, dass Tumorzell-L1CAM wichtig für die Disseminierung von Tumorzellen vom Primärtumor und für das *Homing* zum Zielorgan der Metastasierung ist.

### 5.3 L1CAM ist für das Auswachsen von Metastasen und die Tumorzellproliferation in der Leber notwendig

Im Anschluss daran sollte bestimmt werden, ob der *Knockdown* von L1CAM einen Einfluss auf die Ausbildung von metastatischen Kolonien im Zielorgan der Metastasierung hat. Um spezifisch die Kolonisierung des Zielorgans durch Tumorzellen zu beobachten, wurde ein experimentelles Metastasierungsexperiment durchgeführt. Bemerkenswerterweise führte die Suppression von L1CAM zu einer signifikant reduzierten Anzahl von metastatischen Kolonien in der Leber nach X-Gal-Färbung (Abb. 7a, b), während Lebern von Mäusen, in die keine Tumorzellen inokuliert worden waren, keine Färbung durch X-Gal aufwiesen (Abb. 6a).



**Abb. 7:** L1CAM ist notwendig für das metastatische Auswachsen und die Proliferation von Tumorzellen in der Leber. **a.** X-Gal-Färbung (indigoblaue Fokusse) der entfernten Lebern. Representative Aufnahmen der Leberoberflächen sind gezeigt (Balken: 6 mm (makroskopisch), 0,3 mm (Nachaufnahme)). **b.** Mittlere Anzahl der Lebermetastasen  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken). Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 7,24$ ,  $n = 4$ ; shL1-2:  $46,83 \pm 6,30$ ,  $n = 4$  (shL1-2 vs. shscr:  $**p = 0,001$ ). **c.** Mittlere mRNA-Expression des



bakteriellen *lacZ*-Gens in Lebern  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken). *lacZ*-Level wurden auf die Expressionslevel von 18 S rRNA normalisiert, und der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 9,00$ ,  $n = 4$ ; shL1-2:  $33,16 \pm 7,36$ ,  $n = 4$  (shL1-2 vs. shscr:  $**p = 0.001$ ). **d.** Immunhistochemische Färbung von PCNA auf Paraffin-eingebetteten Formalinfixierten Leberschnitten. PCNA-exprimierende Zellen sind braun gefärbt (Balken: 100  $\mu$ m (obere Reihe), 50  $\mu$ m (untere Reihe)). (Der initiale Tierversuch wurde von Dr. Stephanie Hauser durchgeführt.)

---

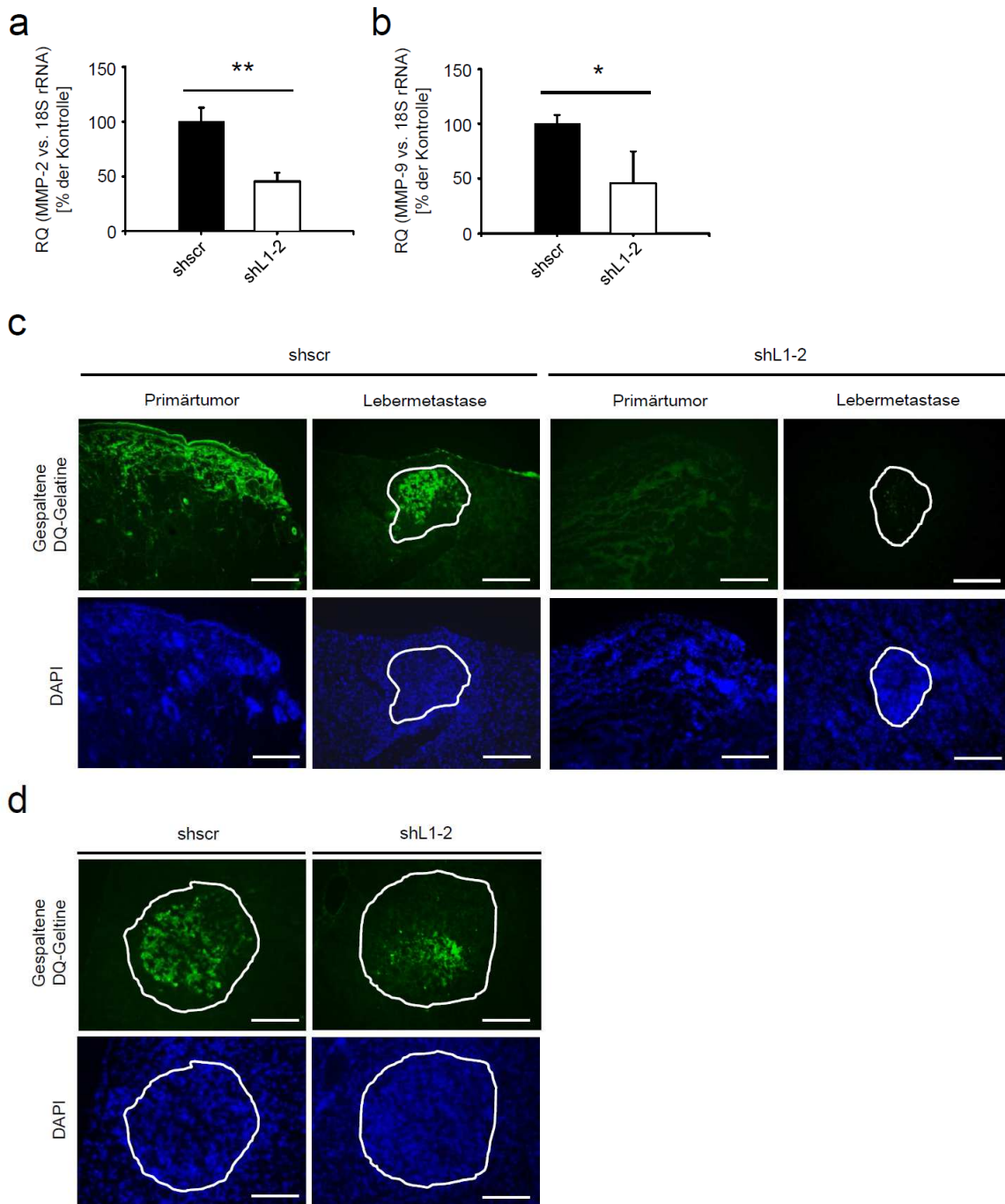
Die Suppression von L1CAM reduzierte außerdem die Streuung (*Scattering*) der Tumorzellen innerhalb der gesamten Leber (Abb. 7a, Pfeile) und die Gesamtumorlast der Leber (Abb. 7c).

Als nächstes wurde die Frage untersucht, ob die Suppression von L1CAM die Proliferation der Tumorzellen im Zielorgan der Metastasierung beeinflusst. Zur Unterscheidung der stark proliferierenden Tumorzellen vom umgebenden Leberparenchym wurde eine immunhistochemische Färbung von PCNA (engl. *Proliferating cell nuclear antigen*) durchgeführt. Tatsächlich führte der *Knockdown* von L1CAM zu einer verringerten Anzahl an PCNA-positiven Zellen innerhalb der Metastasen im Vergleich mit der shscr-Kontrolle. Darüber hinaus wurde die verringerte Proliferation der Tumorzellen in Metastasen begleitet von einem reduzierten *Scattering* der Tumorzellen innerhalb der gesamten Leber (Abb. 7d, Pfeile). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass L1CAM notwendig für das Auswachsen der Tumorzellen im Zielorgan der Metastasierung ist.

#### **5.4 Die Expression von L1CAM korreliert mit erhöhter Expression von Matrix-Metalloproteinasen *in vitro* und gelatinolytischer Aktivität *in vivo***

Im Vorfeld haben wir berichtet, dass die von Tumorzellen stammenden Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 wichtige Faktoren für die metastatische Kolonisierung der Leber durch Tumorzellen sind [242]. Daher wurde analysiert, ob der *Knockdown* von L1CAM die Expression der Gelatinasen reduziert. Die qRT-PCR-Analyse deckte signifikant verringerte mRNA-Expressionslevel von MMP-2 (Fig. 8a) und MMP-9 (Fig. 8b) als Folge des L1CAM-*Knockdown* auf. Um die Aktivität der beiden Gelatinasen *in vivo* zu testen, wurde eine *in situ*-Zymographie mit DQ<sup>TM</sup>-Gelatine als Substrat auf Kryoschnitten von Primärtumoren durchgeführt. Bereiche von Primärtumorgewebe und Lebermetastasen wurden durch Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbungen repräsentativer Kryoschnitte identifiziert (Abb. 6b). Primärtumoren

aus der Gruppe mit L1CAM-Knockdown wiesen deutlich reduzierte Gelatinase-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abb. 8c).



**Abb. 8:** L1CAM korreliert mit erhöhter Expression von Matrix-Metalloproteinasen *in vitro* und gelatinolytischer Aktivität *in vivo*. **a.** Mittlere MMP-2 mRNA-Expression ± SEM (Säulen ± Fehlerbalken) in den verschiedenen L-C1.5s-Zellen. Die MMP-2-mRNA-Level wurden auf 18 S rrRNA-Level normalisiert. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr: 100,00 ± 9,01,  $n = 3$ ; shL1-2: 45,45 ± 4,55,  $n = 3$  (shL1-2 vs. shscr:  $**p = 0,003$ ). **b.** Mittlere MMP-9-mRNA-Expression ± SEM (Säulen ± Fehlerbalken) in den verschiedenen L-C1.5s-Zellen. Die Expressionslevel der MMP-9-mRNA wurden auf die Level der 18S rRNA normalisiert, und der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr: 100,00 ± 4,55,  $n = 3$ ; shL1-2: 45,74 ± 16,66,  $n = 3$  (shL1-2 vs. shscr:  $*p = 0,035$ ). **c.** Die gezeigte *in situ*-Zymographie wurde auf Kryoschnitten von Primärtumoren (linke Spalte innerhalb der jeweiligen Gruppe) und Metastasen-

tragenden Lebern (rechte Spalte innerhalb der jeweiligen Gruppe) aus dem L-C1.5s spontanen Metastasierungs-Experiment durchgeführt. Repräsentative Aufnahmen sind gezeigt (Balken: 100 µm; obere Reihe (grünes Signal): degradierte DQ<sup>TM</sup>-Gelatine; untere Reihe (blaues Signal): DAPI-Gegenfärbung). **d.** Die gezeigte *in situ*-Zymographie wurde auf Kryoschnitten von Metastasen-tragenden Lebern aus dem experimentellen Metastasierungs-Experiment durchgeführt. Repräsentative Aufnahmen sind gezeigt (Balken: 100 µm; obere Reihe (grünes Signal): degradierte DQ<sup>TM</sup>-Gelatine; untere Reihe (blaues Signal): DAPI-Gegenfärbung).

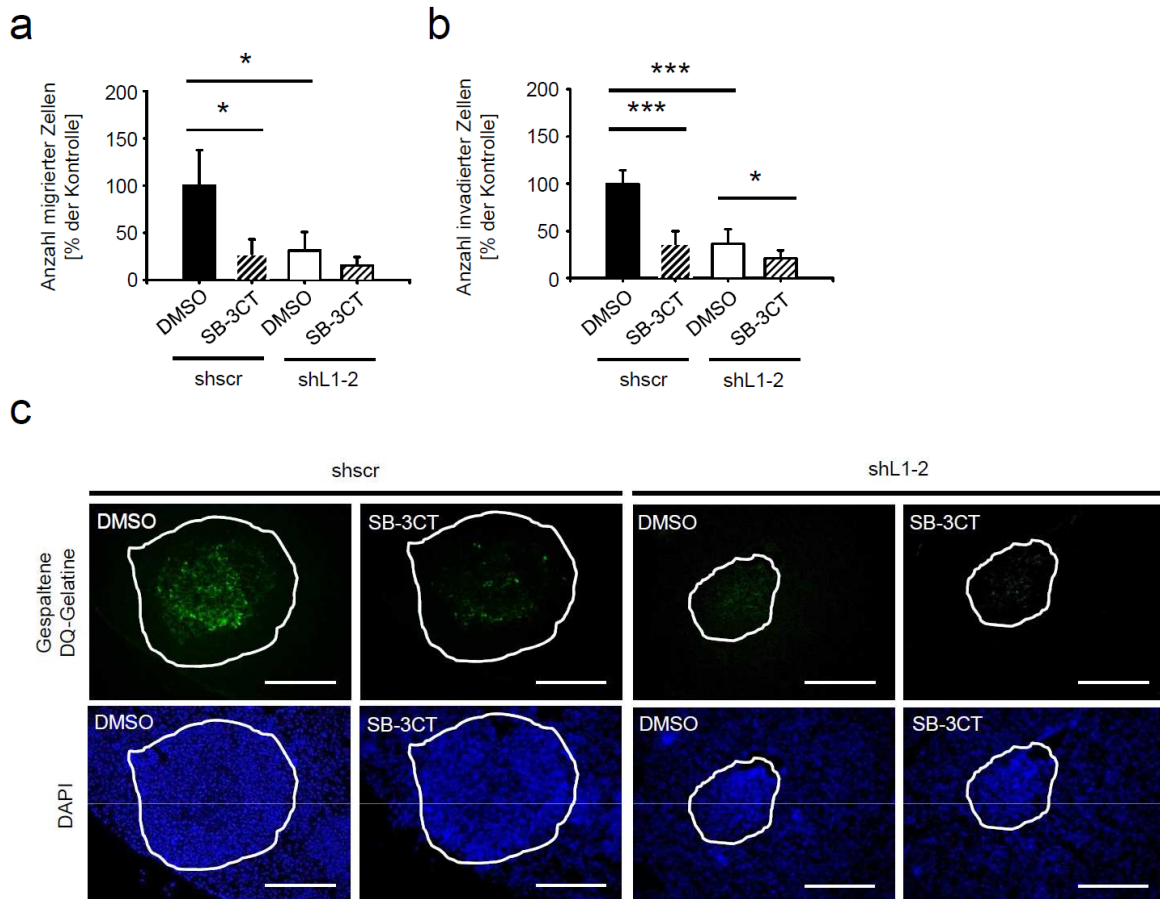
---

Darüber hinaus führte die Suppression von L1CAM in den Tumorzellen zu verringerter gelatinolytischer Aktivität in Lebermetastasen von Mäusen, denen Tumorzellen inokuliert worden waren, sowohl in spontanen als auch experimentellen Metastasierungsexperimenten (Abb. 8c, d). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse an, dass L1CAM die Lebermetastasierung von Tumorzellen durch die Regulation der Expression und Aktivität pro-metastatischer Gelatinasen fördert.

### **5.5 Die spezifische Inhibition von MMP-2 und MMP-9 durch den synthetischen Gelatinase-Inhibitor SB-3CT ahmt den Phänotyp der L1CAM-Suppression nach**

Um zu untersuchen, ob die reduzierte MMP-2- und MMP-9-Aktivität für das verringerte metastatische Potential der Tumorzellen nach L1CAM-*Knockdown* verantwortlich sind, wurde der spezifische Gelatinase-Inhibitor SB-3CT verwendet. Inkubationsexperimente machten deutlich, dass Behandlung mit SB-3CT zu verringerter Migration in Trans-well-Migrationsexperimenten (Abb. 9a) und zu reduzierter Invasion in Matrigel-Invasionsexperimenten führte (Abb. 9b). Diese war vergleichbar mit den Effekten, die in Experimenten mit L1CAM-*Knockdown* beobachtet worden waren. Inhibition von MMP-2 und MMP-9 durch SB-3CT führte zu keiner signifikanten, weitergehenden Reduktion der Zellmigration, aber zu signifikant reduzierter Matrigel-Invasion der shL1-Zellen. Als nächstes wurde analysiert, ob die Behandlung mit SB-3CT die gelatinolytische Aktivität *in vivo* blockieren kann. Tatsächlich wurde beobachtet, dass die gelatinolytische Aktivität sowohl in Primärtumoren als auch in Lebermetastasen des spontanen Metastasierungsmodells nach Anwendung von SB-3CT in einem Ausmaß verringert war, welches vergleichbar war mit dem Effekt des L1CAM-*Knockdown* (Abb. 9c).



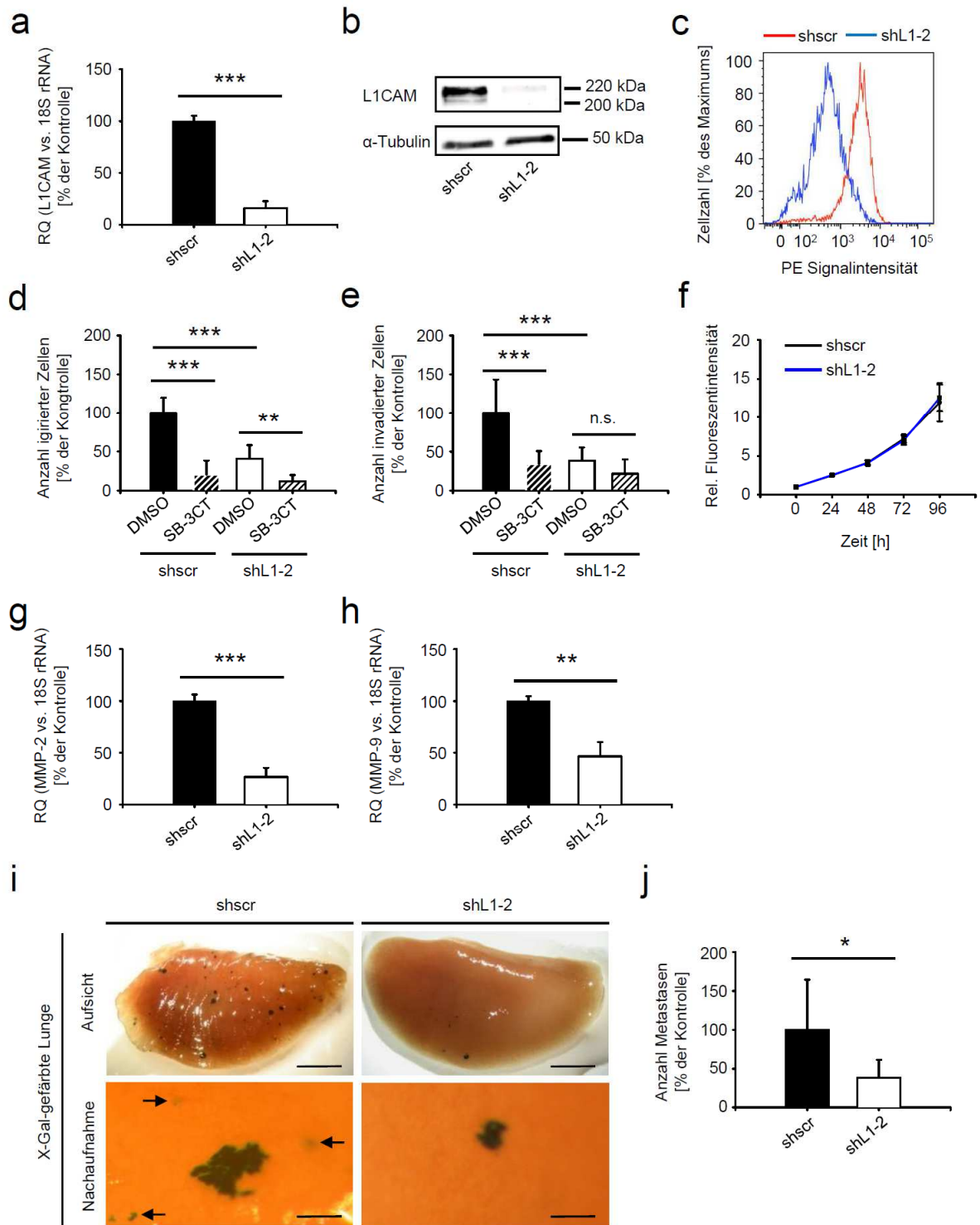


**Abb. 9:** Spezifische Inhibition von MMP-2 und MMP-9 mit dem spezifischen Gelatinase-Inhibitor SB-3CT ähnelt dem Phänotyp des L1CAM-Knockdown. **a.** Mittlere Anzahl migrierter Zellen pro Bildausschnitt ± SEM (Säulen ± Fehlerbalken) für die verschiedenen L-CI.5s-Zellen wie mittels Transwell-Migrationsexperimenten bestimmt. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr, DMSO) wurde gleich 100 % gesetzt: shscr, DMSO: 100,00 ± 14,25,  $n = 6$ ; shscr, SB-3CT: 27,40 ± 5,56,  $n = 6$ ; shL1-2, DMSO: 31,44 ± 7,38,  $n = 6$ ; shL1-2, SB-3CT: 15,57 ± 3,33,  $n = 6$  (Vergleich zwischen allen Gruppen:  $**p \leq 0,001$ ; shscr, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $*p < 0,05$ ; shL1-2, DMSO vs. shscr, DMSO:  $*p < 0,05$ ; shL1-2, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $*p < 0,05$ ). **b.** Mittlere Anzahl invadierter Zellen pro Bildausschnitt ± SEM (Säulen ± Fehlerbalken) für die verschiedenen L-CI.5s-Zellen wie mittels Matrigel-Invasionsexperimenten bestimmt. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr, DMSO) wurde gleich 100 % gesetzt: shscr, DMSO: 100,00 ± 5,44,  $n = 6$ ; shscr, SB-3CT: 36,36 ± 4,80,  $n = 6$ ; shL1-2, DMSO: 36,30 ± 5,90,  $n = 6$ ; shL1-3, SB-3CT: 20,94 ± 2,96,  $n = 6$  (Vergleich aller Gruppen:  $*p \leq 0,001$ ; shscr, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-2, DMSO vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-2, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-2, SB-3CT vs. shL1-2, DMSO:  $*p = 0,032$ ). **c.** Die *in situ*-Zymographie wurde auf Kryoschnitten von Metastasen-tragenden Lebern aus dem spontanen Metastasierungs-Experiment mit L-CI.5s-Zellen durchgeführt. Die Schnitte wurden entweder mit 200  $\mu\text{m}$  SB-3CT (rechte Spalte innerhalb der jeweiligen Gruppe) oder mit DMSO als Kontrolle (linke Spalte innerhalb der jeweiligen Gruppe) inkubiert. Repräsentative Aufnahmen sind gezeigt (Balken: 100  $\mu\text{m}$ ; obere Reihe (grünes Signal): degradierte DQ<sup>TM</sup>-Gelatine; untere Reihe (blaues Signal): DAPI-Gegenfärbung der Zellkerne).

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Präsenz von L1CAM für die gelatinolytische Aktivität von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* notwendig ist.

## 5.6 L1CAM reguliert das metastatische Potential von SKOV3ip Ovarialkarzinomzellen positiv

Die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip repräsentiert ein typisches, solides L1CAM-abhängiges Tumormodell, welches im experimentellen Metastasierungssassay reproduzierbar zu Metastasenbildung in der Lunge führt. Stabile Suppression von L1CAM in SKOV3ip-*lacZ*-Zellen wurde mittels qRT-PCR (Abb. 10a), Western Blot (Abb. 10b) und Durchflusszytometrie (Abb. 10c) bestätigt. Sowohl die Tumorzellmigration (Abb. 10d) als auch die Matrigel-Invasion (Abb. 10e) waren als Folge der L1CAM-Suppression signifikant reduziert, während die Tumorzellproliferation unverändert war (Abb. 10f). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für das T-Lymphom-Modell eines nicht-soliden Tumors führte das *Silencing* von L1CAM in SKOV3ip-*lacZ*-Zellen zu signifikant reduzierter mRNA-Expression von MMP-2 (Abb. 10g) und MMP-9 (Abb. 10h). Bemerkenswerterweise reduzierte der Gelatinase-spezifische Inhibitor SB-3CT das *in vitro* migratorische (Abb. 10e) und invasive Potential (Abb. 10f) der Tumorzellen in einem vergleichbaren Ausmaß wie die Suppression von L1CAM. Schließlich wurde auch die experimentelle Metastasierung der SKOV3ip-*lacZ*-Zellen in die Lunge durch den L1CAM-*Knockdown* signifikant reduziert (Abb. 10i, j). Zusammenfassend legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass L1CAM positiv zur Bildung von Metastasen solider Tumoren beiträgt, indem es die pro-metastatischen Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 hochreguliert.



**Abb. 10:** L1CAM reguliert das metastatische Potential von Ovarialkarzinomzellen positiv. SKOV3ip-*lacZ*-Zellen wurden mit Retroviren, die gegen humanes L1CAM gerichtete shRNA-Sequenzen (shL1-2) oder eine nicht-zielgerichtete shRNA-Sequenz (shscr, *scrambled* shRA) enthalten, transduziert. **a.** qRT-PCR-Analyse der L1CAM mRNA-Expression in SKOV3ip-*lacZ*-Zellen. Mittlere L1CAM mRNA-Expression  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) in SKOV3ip-*lacZ*-Zellen. L1CAM mRNA-Expressionslevel wurden auf 18 S rRNA normalisiert, und der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr: 100,00  $\pm$  3,02,  $n = 3$ ; shL1-2: 16,04  $\pm$  3,84,  $n = 3$  (shL1-2 vs. shscr: \*\*\* $p \leq 0,001$ ). **b.** Western Blot-Analyse und **c.** durchflusszytometrische Analyse der L1CAM Proteinlevel. **d.** Mittlere Anzahl migrierter Zellen pro Bildausschnitt  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) für die verschiedenen SKOV3ip-*lacZ*-Zellen wie durch Trans-well-Migrationsexperimente ermittelt. Der Mittelwert der

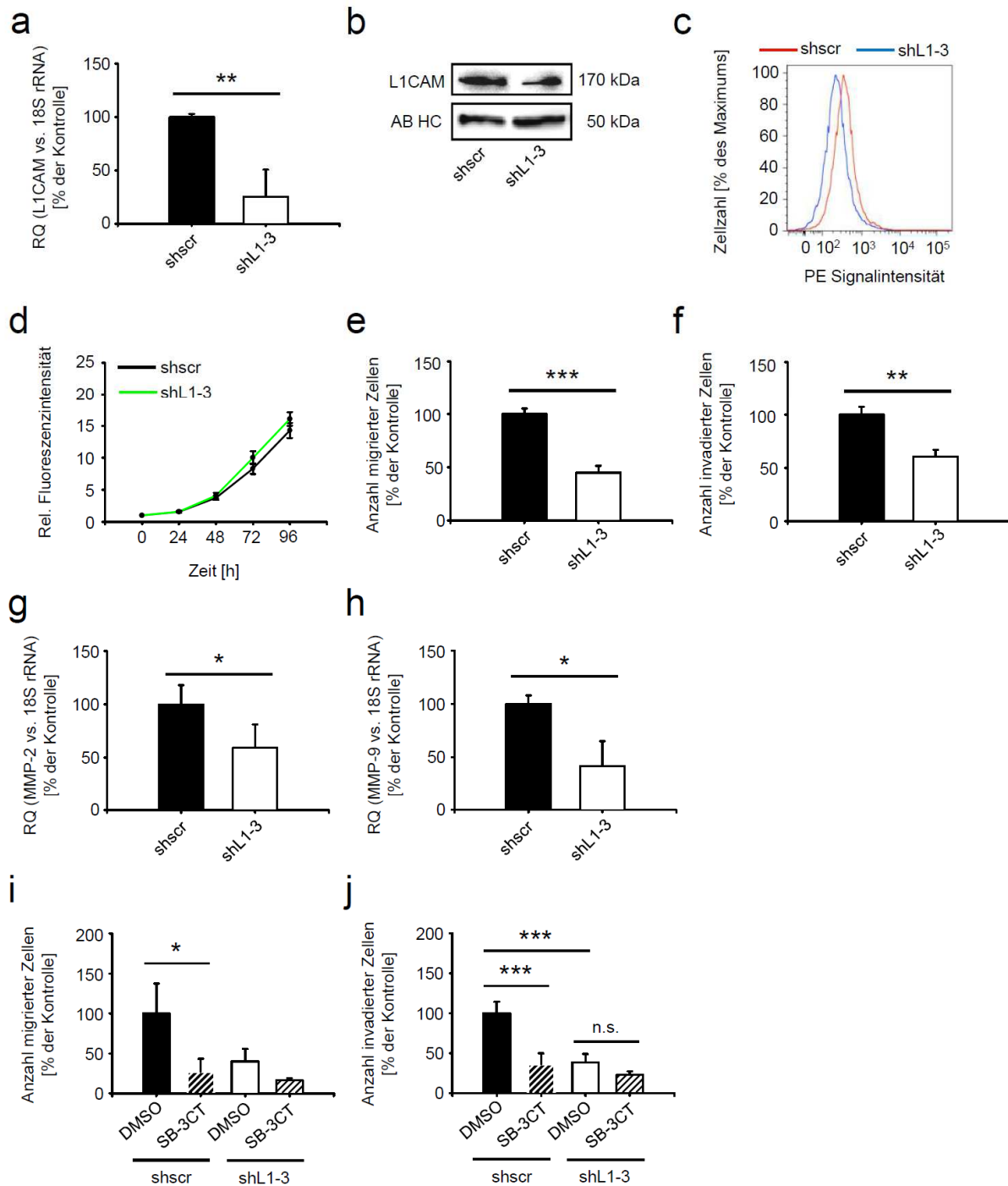
Kontrollgruppe (shscr, DMSO) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr, DMSO:  $100,00 \pm 7,09$ ,  $n = 6$ ; shscr, SB-3CT:  $20,21 \pm 6,80$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, DMSO:  $40,52 \pm 6,74$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, SB-3CT:  $11,65 \pm 2,91$ ,  $n = 6$  (Vergleich aller Gruppen:  $***p \leq 0,001$ ; Vergleich der Einzelgruppen: shscr, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-2, DMSO vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-2, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-2, SB-3CT vs. shL1-2, DMSO:  $**p = 0,002$ ). **e.** Mittlere Anzahl invadierter Zellen pro Bildausschnitt  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) für die verschiedenen SKOV3ip-*lacZ*-Zellen wie durch Matrigel-Invasionsexperimente ermittelt. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr, DMSO) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr, DMSO:  $100,00 \pm 15,26$ ,  $n = 6$ ; shscr, SB-3CT:  $34,02 \pm 6,76$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, DMSO:  $38,38 \pm 6,38$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, SB-3CT:  $21,50 \pm 6,52$ ,  $n = 6$  (Vergleich aller Gruppen:  $***p \leq 0,001$ ; Vergleich der Einzelgruppen: shscr, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-2, DMSO vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-2, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-2, SB-3CT vs. shL1-2, DMSO:  $p = 0,242$ ). **f.** Analyse der Zellviabilität mittels alamarBlue®-Proliferationsassay. Die Mittelwerte beider Gruppen wurden auf den jeweiligen 0 h-Wert normalisiert und der 0 h-Wert gleich 1 gesetzt. Shscr, 0 h:  $1,00 \pm 0,00$ ,  $n = 6$ ; shscr, 24 h:  $1,49 \pm 0,09$ ,  $n = 6$ ; shscr, 48 h:  $2,01 \pm 0,18$ ,  $n = 6$ ; shscr, 72 h:  $3,00 \pm 0,35$ ,  $n = 6$ ; shscr, 96 h:  $5,03 \pm 1,43$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, 0 h:  $1,00 \pm 0,00$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, 24 h:  $1,54 \pm 0,11$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, 48 h:  $2,06 \pm 0,22$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, 72 h:  $3,03 \pm 0,37$ ,  $n = 6$ ; shL1-2, 96 h:  $5,50 \pm 1,35$ ,  $n = 6$ . **g.** Mittlere MMP-2-mRNA-Expression  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) in SKOV3ip-*lacZ*-Zellen. MMP-2 mRNA-Expressionslevel wurden auf die Expressionslevel der 18 S rRNA normalisiert und der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 3,64$ ,  $n = 3$ ; shL1-2:  $26,58 \pm 5,15$ ,  $n = 3$  (shL1-2 vs. shscr:  $***p \leq 0,001$ ). **h.** Mittlere MMP-9-mRNA-Expression  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) in SKOV3ip-*lacZ*-Zellen. MMP-9 mRNA-Expressionslevel wurden auf die Expressionslevel der 18 S rRNA normalisiert und der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 2,68$ ,  $n = 3$ ; shL1-2:  $46,60 \pm 8,00$ ,  $n = 3$  (shL1-2 vs. shscr:  $**p = 0,003$ ). **i.** X-Gal-Färbung (indigoblaue Fokusse) der entfernten Lungen. Repräsentative Aufnahmen der Lungenoberfläche sind gezeigt (Balken: 2 mm (makroskopische Aufnahmen), 0,2 mm (Nachaufnahmen)). **j.** Mittlere Anzahl der Makrometastasen in den Lungen  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken). Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 26,30$ ,  $n = 6$ ; shL1-2:  $38,42 \pm 7,25$ ,  $n = 10$  (shL1-2 vs. shscr:  $*p = 0,034$ ). (Der initiale Tierversuch wurde von Dr. Laura Bickel durchgeführt.)

---

### **5.7 Die Verminderung des metastatischen Potentials von L-C1.5s-Zellen wurde durch die Verwendung einer zweiten gegen L1CAM gerichteten shRNA bestätigt**

Das Transfektion bzw. Transduktion von Zellen mit siRNAs bzw. shRNAs, die gegen ein bestimmtes mRNA-Transkript gerichtet sind, kann zu einer nicht beabsichtigten, unspezifischen Herunterregulation einer Vielzahl von mRNA-Transkripten führen, die eine mit der *Seed*-Region komplementäre Sequenz besitzen. Dieses Phänomen wird als *Off-Target-Effekt* bezeichnet [254,255]. Unterschieden werden dabei zwei Arten von *Off-Target*-Effekten: einerseits eine unspezifische Interferon-Antwort, andererseits ein von durch gegen verschiedene Sequenzabschnitte des eigentlichen Ziel-mRNA-Transkripts gerichteten siRNAs oder shRNAs vermittelter Effekt, der eine unspezifische Herunterregulation alternativer mRNA-Transkripte verursacht [254]. Um mögliche *Off-Target*-Effekte durch die Verwendung der gegen murines und

humanes L1CAM gerichteten shRNAs auszuschließen, wurden wichtige *in vitro*-Experimente in L-CI.5s-Zellen mit einer zweiten, gegen eine alternative Zielsequenz von L1CAM gerichteten shRNA durchgeführt. Dazu wurden L-CI.5s-Zellen stabil mit retroviralen Vektoren, die eine gegen L1CAM gerichtete shRNA (shL1-3) oder eine unspezifische shRNA (shscr, *scrambled* shRNA) enthalten, transduziert. Die Suppression von L1CAM führte zu einer signifikanten Reduktion der L1CAM-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 11a) und Proteinebene (Abb. 11b, c). Der *Knockdown* von L1CAM führte auch hier zu keiner Veränderung der Proliferation (Abb. 11d). Dagegen waren das migratorische und invasive Potential in Trans-well-Migrationsexperimenten (Abb. 11e) und Matrigel-Invasionsexperimenten (Abb. 11f) nach L1CAM-Suppression im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Darüber hinaus waren die mRNA-Expressionslevel sowohl von MMP-2 (Abb. 11g) als auch von MMP-9 (Abb. 11h) signifikant erniedrigt. Die Inkubation der L-CI.5s-Zellen mit dem spezifischen Gelatinase-Inhibitor SB-3CT führte auch hier zu einer signifikanten Reduktion der Trans-well-Migration (Abb. 11i) und Matrigel-Invasion (Abb. 11j) in einem vergleichbaren Ausmaß wie das *Silencing* von L1CAM. Die Inkubation mit SB-3CT führte innerhalb der Gruppe des L1CAM-*Knockdown* zu einer signifikanten Reduktion der Invasion, nicht aber der Migration, im Vergleich zur Inkubation mit der DMSO-Kontrolle. Dieser Effekt war entsprechend auch schon mit der ersten shRNA beobachtet worden (vgl. Abb. 9b).



**Abb. 11:** Der Effekt von Tumorzell-L1CAM auf das metastatische Potential von L-C15s-Zellen und die Gelatinase-Expression *in vitro* wurde durch eine zweite shRNA bestätigt. **a.** Mittlere L1CAM-mRNA-Expression  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) in L-C15s-Zellen. L1CAM-mRNA-Expressionslevel wurden auf Level der 18 S rRNA normalisiert und der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 1,65$ ,  $n = 3$ ; shL1-3:  $25,39 \pm 14,65$ ,  $n = 3$  (shL1-3 vs. shscr:  $**p = 0,007$ ). **b.** Western Blot-Analyse von immunpräzipitiertem L1CAM. **c.** Durchflusszytometrische Analyse der L1CAM-Expression in L-C15s-Zellen. **d.** Analyse der Zellviabilität (Proliferation) mittels alamarBlue<sup>®</sup>-Assay. Die Mittelwerte beider Gruppen wurden auf den jeweiligen 0 h-Wert normalisiert und der 0 h-Wert gleich 1 gesetzt. Shscr, 0 h:  $1,00 \pm 0,00$ ,  $n = 6$ ; shscr, 24 h:  $1,53 \pm 0,10$ ,  $n = 6$ ; shscr, 48 h:  $3,74 \pm 0,30$ ,  $n = 6$ ; shscr, 72 h:  $8,31 \pm 0,84$ ,  $n = 6$ ; shscr, 96 h:  $14,06 \pm 0,76$ ,  $n = 6$ ; shL1-3, 0 h:  $1,00 \pm 0,00$ ,  $n = 6$ ; shL1-3, 24 h:  $1,58 \pm 0,13$ ,  $n = 6$ ; shL1-3, 48 h:  $4,09 \pm 0,43$ ,  $n = 6$ ; shL1-3, 72 h:  $10,04 \pm 1,00$ ,  $n = 6$ ; shL1-3, 96 h:  $15,98 \pm 0,68$ ,  $n = 6$ . **e.** Mittlere Anzahl der migrierten Zellen pro Bildausschnitt  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) für die verschiedenen L-C15s-Zellen wie durch Trans-

well-Migrationsexperimente bestimmt. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 5,10$ ,  $n = 6$ ; shL1-3:  $45,04 \pm 6,43$ ,  $n = 6$  (shL1-3 vs. shscr:  $***p \leq 0,001$ ). **f.** Mittlere Anzahl der invadierten Zellen pro Bildausschnitt  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) für die verschiedenen L-CI.5s-Zellen wie durch Matrigel-Invasionsexperimente bestimmt. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 7,30$ ,  $n = 6$ ; shL1-3:  $60,69 \pm 6,46$ ,  $n = 6$  (shL1-3 vs. shscr:  $**p = 0,005$ ). **g.** Mittlere MMP-2-mRNA-Expression  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) in L-CI.5s-Zellen. Die MMP-2-mRNA-Level wurden auf 18 S rRNA-Level normalisiert, und der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 9,01$ ,  $n = 3$ ; shL1-3:  $59,29 \pm 10,95$ ,  $n = 3$  (shL1-3 vs. shscr:  $*p = 0,028$ ). **h.** Mittlere MMP-9-mRNA-Expression  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) in den verschiedenen L-CI.5s-Zellen. Die MMP-9-mRNA-Level wurden auf 18S rRNA-Level normalisiert, und der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr:  $100,00 \pm 4,55$ ,  $n = 3$ ; shL1-3:  $41,75 \pm 13,48$ ,  $n = 3$  (shL1-3 vs. shscr:  $*p = 0,015$ ). **i.** Mittlere Anzahl migrierter Zellen pro Bildausschnitt  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) für L-CI.5s-Zellen in Trans-well-Migrationsexperimenten. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr, DMSO) wurde gleich 100 % gesetzt: shscr, DMSO:  $100,00 \pm 14,25$ ,  $n = 6$ ; shscr, SB-3CT:  $27,40 \pm 5,56$ ,  $n = 6$ ; shL1-3, DMSO:  $40,12 \pm 7,92$ ,  $n = 6$ ; shL1-3, SB-3CT:  $16,31 \pm 1,38$ ,  $n = 6$  (Vergleich zwischen allen Gruppen:  $**p \leq 0,001$ ; shscr, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $*p < 0,05$ ; shL1-3, DMSO vs. shscr, DMSO:  $p > 0,05$ ; shL1-3, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $*p < 0,05$ ). **j.** Mittlere Anzahl invadierter Zellen pro Bildausschnitt  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) für die verschiedenen L-CI.5s-Zellen wie mittels Matrigel-Invasionsexperimenten bestimmt. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr, DMSO) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr, DMSO:  $100,00 \pm 5,44$ ,  $n = 6$ ; shscr, SB-3CT:  $36,36 \pm 4,80$ ,  $n = 6$ ; shL1-3, DMSO:  $38,58 \pm 5,23$ ,  $n = 6$ ; shL1-3, SB-3CT:  $22,94 \pm 2,14$ ,  $n = 6$  (Vergleich aller Gruppen:  $**p \leq 0,001$ ; shscr, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-3, DMSO vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-3, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $***p < 0,001$ ; shL1-3, SB-3CT vs. shL1-3, DMSO:  $p = 0,090$ ).

---

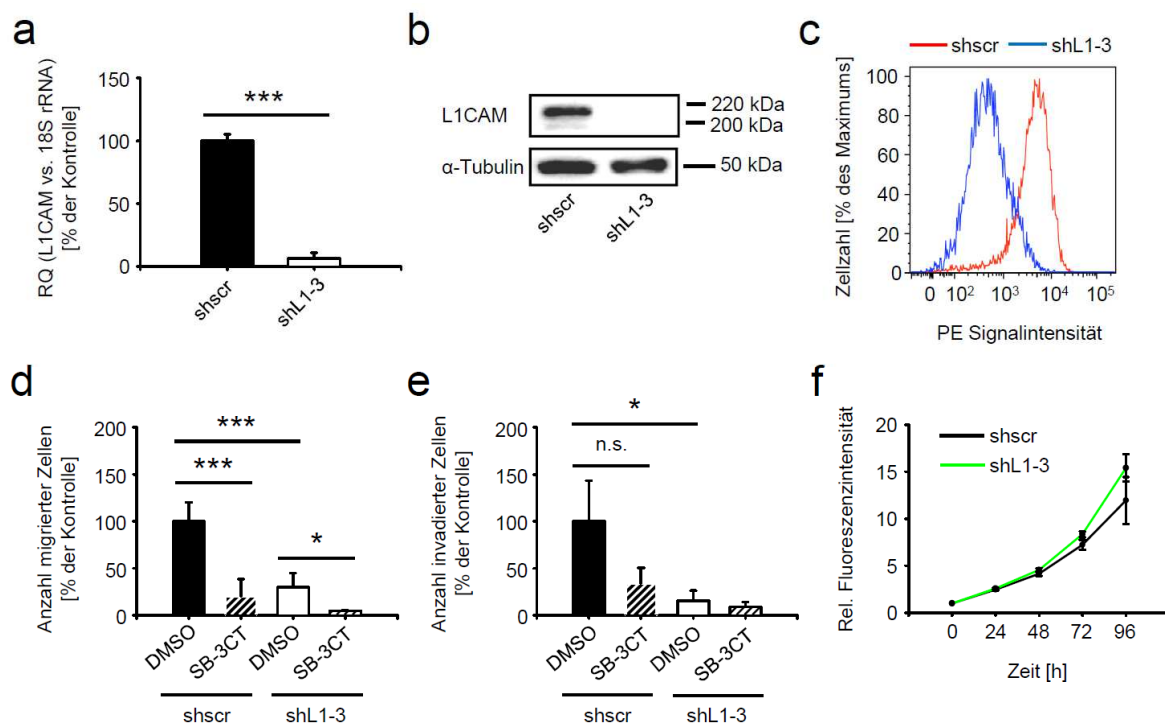
Diese Ergebnisse zeigen einmal mehr, dass L1CAM das metastatische Potential von L-CI.5s-Zellen über die Regulation der pro-metastatischen Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 fördert.

### **5.8 Die Verminderung des intrinsischen metastatischen Potentials von SKOV3ip-Zellen wurde durch die Verwendung einer zweiten gegen L1CAM gerichteten shRNA bestätigt**

Um mögliche *Off-Target*-Effekte auszuschließen und um zu untersuchen, ob der L1CAM-Knockdown in SKOV3ip-lacZ-Zellen spezifisch erfolgte, wurden SKOV3ip-lacZ-Zellen stabil mit einer zweiten gegen L1CAM gerichteten shRNA (shL1-3) transduziert. Das Einbringen dieser shRNA führte in SKOV3ip-lacZ-Zellen zu einer signifikanten Suppression der L1CAM-Expression sowohl auf mRNA-Ebene (Abb. 12a) als auch auf Proteinebene (Abb. 12b, c). Das *Silencing* von L1CAM führte zu einer signifikanten Reduktion der Migration in Trans-well-Migrationsexperimenten (Abb. 12d) und zu einer signifikanten Verringerung des invasiven Potentials in Matrigel-Invasionsexperimenten (Abb. 12e). Die Inkubation von SKOV3ip-lacZ-Zellen



mit dem spezifischen Gelatinase-Inhibitor SB-3CT führte zu einer signifikanten Reduktion der Migration in der Kontrollzelllinie, welche in ihrem Ausmaß mit der durch die Suppression von L1CAM erreichten Verringerung der Migration vergleichbar war. Durch den Einsatz von SB-3CT konnte die Migration in shL1-Zellen noch einmal signifikant reduziert werden. Demgegenüber war zwar eine deutliche Reduktion der Invasion durch SB-3CT in der Kontrollzelllinie zu beobachten, diese war jedoch nicht signifikant. Auch innerhalb der Gruppe des L1CAM-Knockdown war der Effekt der Inkubation mit SB-3CT gegenüber DMSO nicht signifikant. Die Proliferation war in SKOV3ip-*lacZ*-Zellen zwar leicht erhöht (Abb. 12f), jedoch war diese Erhöhung der Proliferation ebenfalls nicht signifikant.



**Abb. 12:** Der Effekt von Tumorzell-L1CAM auf das metastatische Potential von Ovarialkarzinomzellen *in vitro* wurde durch eine zweite shRNA bestätigt. **a.** Mittlere L1CAM-mRNA-Expression  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) in SKOV3ip-*lacZ*-Zellen. L1CAM-mRNA-Expressionslevel wurden auf 18 S rRNA normalisiert, und der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr: 100,00  $\pm$  3,02,  $n = 3$ ; shL1-3: 6,25  $\pm$  2,53,  $n = 3$  (shL1-3 vs. shscr: \*\*\* $p \leq 0,001$ ). **b.** Western Blot-Analyse und **c.** durchflusszytometrische Analyse der L1CAM Proteinlevel. **d.** Mittlere Anzahl migrierter Zellen pro Bildausschnitt  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) für SKOV3ip-*lacZ*-Zellen im Trans-well-Migrationsexperiment. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr, DMSO) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr, DMSO: 100,00  $\pm$  7,09,  $n = 6$ ; shscr, SB-3CT: 20,21  $\pm$  6,80,  $n = 6$ ; shL1-3, DMSO: 29,94  $\pm$  7,44,  $n = 6$ ; shL1-3, SB-3CT: 4,66  $\pm$  0,33,  $n = 6$  (Vergleich aller Gruppen: \*\*\* $p \leq 0,001$ ; Vergleich der Einzelgruppen: shscr, SB-3CT vs. shscr, DMSO: \*\*\* $p < 0,001$ ; shL1-3, DMSO vs. shscr, DMSO: \*\*\* $p < 0,001$ ; shL1-3, SB-3CT vs. shscr, DMSO: \*\*\* $p < 0,001$ ; shL1-3, SB-3CT vs. shL1-3, DMSO: \* $p = 0,048$ ). **e.** Mittlere Anzahl invadierter Zellen pro Bildausschnitt  $\pm$  SEM (Säulen  $\pm$  Fehlerbalken) für SKOV3ip-*lacZ*-Zellen im Matrigel-Invasionsexperiment. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (shscr, DMSO) wurde gleich 100 % gesetzt. Shscr, DMSO: 100,00  $\pm$  15,26,  $n = 6$ ; shscr, SB-3CT:



## Ergebnisse

---

34,02 ± 6,76,  $n = 6$ ; shL1-3, DMSO: 15,33 ± 5,33,  $n = 6$ ; shL1-3, SB-3CT: 9,20 ± 2,57,  $n = 6$  (Vergleich aller Gruppen: \*\*\* $p \leq 0,001$ ; Vergleich der Einzelgruppen: shscr, SB-3CT vs. shscr, DMSO:  $p > 0,05$ ; shL1-3, DMSO vs. shscr, DMSO: \* $p < 0,05$ ; shL1-3, SB-3CT vs. shscr, DMSO: \* $p < 0,05$ ; shL1-3, SB-3CT vs. shL1-3, DMSO:  $p > 0,05$ ). f. Zellviabilität/Proliferation der SKOV3ip-*lacZ*-Zellen im alamarBlue®-Proliferationsassay. Die Mittelwerte beider Gruppen wurden auf den jeweiligen 0 h-Wert normalisiert und der 0 h-Wert gleich 1 gesetzt. Shscr, 0 h: 1,00 ± 0,00,  $n = 6$ ; shscr, 24 h: 1,49 ± 0,09,  $n = 6$ ; shscr, 48 h: 2,01 ± 0,18,  $n = 6$ ; shscr, 72 h: 3,00 ± 0,35,  $n = 6$ ; shscr, 96 h: 5,03 ± 1,43,  $n = 6$ ; shL1-3, 0 h: 1,00 ± 0,00,  $n = 6$ ; shL1-3, 24 h: 1,49 ± 0,11,  $n = 6$ ; shL1-3, 48 h: 2,03 ± 0,22,  $n = 6$ ; shL1-3, 72 h: 3,18 ± 0,48,  $n = 6$ ; shL1-3, 96 h: 5,79 ± 1,43,  $n = 6$ .

---

Zusammengefasst bestätigen diese Ergebnisse, dass die Präsenz von L1CAM zu einer Erhöhung des metastatischen Potentials führt und die pro-metastatischen Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 wichtige Effektoren des L1CAM-vermittelten migratorischen und invasiven Potentials darstellen.

## 6 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen zum Verständnis der Rolle von Tumorzell-L1CAM für die Bildung von Metastasen bei. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass L1CAM spezifisch die Disseminierung der Tumorzellen ausgehend vom Primärtumor und das metastatische Auswachsen der Tumorzellen im Zielorgan der Metastasierung beeinflusst, indem es die pro-metastatischen Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 in soliden und nicht-soliden Tumorentitäten reguliert. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die funktionelle Interferenz mit L1CAM einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz für die spezifische Inhibition der metastatischen Streuung solider und nicht-solider Tumoren darstellt.

### 6.1 Der Einfluss von Tumorzell-L1CAM auf die Proliferation von Tumorzellen *in vitro* und das Wachstum von Tumoren *in vivo* ist abhängig vom Kontext

Zelladhäsionsmoleküle werden in vier verschiedene Familien unterteilt: Cadherine, Selektine, Integrine und Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Familie. Zelladhäsionsmoleküle sind wichtige Mediatoren der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion und spielen eine wichtige Rolle in der Transduktion von Signalen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Im Verlauf der Tumorprogression trägt die deregulierte Expression der Zelladhäsionsmoleküle zur veränderten Adhäsion, Migration, Invasion und Angiogenese sowie zur Organ-spezifischen Metastasierung von Tumorzellen bei [256-258]. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Antikörper-basierte funktionelle Interferenz mit L1CAM *in vitro* zu verminderter Tumorzell-Proliferation führt [170,259]. Laut einer kürzlich veröffentlichten Studie kann die Antikörper-basierte funktionelle Interferenz mit L1CAM – je nach Bindungsregion des jeweiligen Antikörper-Fragments – sowohl anti-proliferativ als auch pro-proliferativ wirken [260]. Auch der Einfluss der Suppression von L1CAM auf die Tumorzellproliferation ist unklar. Während Hung und Kollegen verminderte Tumorzellproliferation nach L1CAM-*Knockdown* gezeigt haben [164], haben Hai und Kollegen gefunden, dass die Suppression von L1CAM die Tumorzellproliferation nicht verändert [163]. In Übereinstimmung mit Hai und

Kollegen konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass die Suppression von L1CAM die Tumorzellproliferation nicht beeinflusst. Bereits früher konnten Hauser und Kollegen zeigen, dass die Überexpression von L1CAM in verschiedenen Tumorzellen keinen Einfluss auf die Proliferation verschiedener Tumorentitäten hat [247]. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass der Effekt der Überexpression oder der Suppression von L1CAM auf die Proliferation von Tumorzellen zwischen verschiedenen Modellsystemen variiert und deuten auf einen Kontext-abhängigen Beitrag von L1CAM auf die Tumorzellproliferation hin. Nachfolgende *in vivo*-Studien haben gezeigt, dass die Überexpression von L1CAM das ektope Tumorwachstum beim Ovarialkarzinom verstärkt [152,162], während die funktionelle Interferenz mit L1CAM das Tumorwachstum in orthotopen [163-165] und transgenen Tumormodellen [261] reduziert. Bemerkenswerterweise führt auch das Fehlen von oder die funktionelle Interferenz mit L1CAM in Endothelzellen zu vermindertem Tumorwachstum [262]. Im Gegensatz zu diesen Studien konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Suppression von Tumorzell-L1CAM das Primärtumorwachstum nicht verändert, jedoch ein verlängertes Gesamtüberleben der Mäuse bewirkt. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen aus der Klinik, wo die erhöhte Expression von L1CAM in Krebspatienten mit schlechter Prognose und höheren Tumorstadien korreliert [141,252,263,264]. Die in dieser Arbeit gezeigte Korrelation der L1CAM-Expression mit dem verminderten Überleben der Mäuse im spontanen Metastasierungsexperiment suggeriert, dass L1CAM möglicherweise über seine pro-metastatische Funktion für die Unterschiede im Überleben der Mäuse im aggressiven L-CI.5s-T-Lymphom-Modell [242,244] verantwortlich sein könnte.

### **6.2 Tumorzell-L1CAM ist ein wichtiger Regulator des metastatischen Potentials von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo***

Die Beteiligung der IgSF-CAMs an allen Schritten des metastatischen Prozesses ist weitgehend akzeptiert [93,136,137]. L1CAM ist eines der am besten untersuchten Mitglieder der IgSF-CAMs [138,139]. Die *in vitro* migratorischen und invasiven Eigenschaften von Tumorzellen werden routinemäßig untersucht und gelten als wichtige tumorbiologische Indikatoren für die Abschätzung des malignen Phänotyps von Tumorzellen. Darüber hinaus dient die Bestimmung dieser Parameter der

Identifizierung therapeutischer Zielstrukturen [250,265,266]. Die Motilität von Tumorzellen ist eine wichtige Voraussetzung für die effiziente Metastasierung, und häufig korreliert die *in vitro*-Motilität mit dem metastatischen Potential von Tumorzellen in Tumormodellen *in vivo* [267,268]. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass die ektope Expression von L1CAM die Migration und Invasion fördert [142,161,263], während die funktionelle Interferenz mit L1CAM eine Verringerung der Tumorzellmotilität bewirkt [163,263,269]. In Übereinstimmung damit wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass das *Silencing* von L1CAM die Migration und Invasion von nicht-soliden (L-CI.5s T-Lymphom) und soliden (SKOV3ip Ovarialkarzinom) Tumorentitäten vermindert, was auf eine mögliche Beteiligung von L1CAM am metastatischen Geschehen in den untersuchten Tumorentitäten hindeutet. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Überexpression von L1CAM in Tumorzellen eine verstärkte Metastasierung in verschiedenen Tumorentitäten bewirkt [166,247,253], wohingegen die funktionelle Interferenz mit L1CAM in Tumorzellen [163,165,263] und Endothelzellen [262] zu verminderter Ausbildung von Metastasen führt. Diese Beobachtungen zusammen mit der in dieser Arbeit gezeigten Korrelation der L1CAM-Expression mit dem verminderten Überleben der Mäuse im spontanen Metastasierungsexperiment suggerieren, dass L1CAM möglicherweise über seine pro-metastatische Funktion für die Unterschiede im Überleben der Mäuse im aggressiven L-CI.5s-T-Lymphom-Modell [242,244] verantwortlich sein könnte. Tatsächlich wurde in dieser Arbeit gefunden, dass die Suppression von L1CAM die Bildung von Lebermetastasen im spontanen Metastasierungsexperiment dramatisch reduziert, was die funktionelle Bedeutung von L1CAM für die Metastasierung in diesem Modell verdeutlicht. Jedoch ist der Beitrag von L1CAM zu spezifischen Schritten der metastatischen Kaskade bisher nicht untersucht worden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Suppression von L1CAM die Bildung von Lebermetastasen im spontanen Metastasierungsexperiment (~ 90 %, vgl. Abb. 5e, f) deutlich stärker reduzierte als im experimentellen Metastasierungsexperiment (~ 60 %, vgl. Abb. 7b, c). Im experimentellen Metastasierungsexperiment werden lediglich späte Schritte der metastatischen Kaskade abgebildet, wie z. B. die Extravasation, die Kolonisierung des Zielorgans der Metastasierung und das Wiedereinsetzen der Proliferation, während im spontanen Metastasierungsexperiment die gesamte metastatische Kaskade inklusive der frühen Schritte, wie z. B. Angiogenese und lokale Invasion, untersucht wird [74,270-272]. Demzufolge

deuten diese Ergebnisse auf eine wichtige Funktion von Tumorzell-L1CAM in frühen Schritten der metastatischen Kaskade, beispielsweise in der Invasion des lokalen, den Tumor umgebenden Gewebes und in der Disseminierung von Tumorzellen ausgehend vom Primärtumor, hin.

### **6.3 Tumorzell-L1CAM erhöht die Effizienz der Metastasierung, indem es das Auswachsen der Metastasen im Zielorgan der Metastasierung fördert**

Quantitative Analysen des Schicksals von disseminierten Tumorzellen haben gezeigt, dass die frühen Schritte innerhalb der hämatogenen metastatischen Kaskade, welche u. a. die Disseminierung umfassen, hochgradig effizient sind. Während die meisten Tumorzellen erfolgreich extravadiieren [273-275], ist nur eine geringe Anzahl von Tumorzellen in der Lage, am Ort der Metastasierung zu proliferieren, Mikrometastasen zu bilden und ausgehend von diesen zu Makrometastasen auszuwachsen [275-277]. Tumorzellen und Leukozyten nutzen sowohl ähnliche als auch verschiedene Mechanismen für ihre Migration durch Gewebe, für die Durchquerung der Basalmembran und für den Eintritt in Blutgefäße hinein und aus ihnen heraus [278]. Die Rekrutierung von Leukozyten in entzündete Gewebe erfolgt durch die so genannte Leukozyten-Adhäsions-Kaskade und wird primär durch Zelladhäsionsmoleküle der Selektin-Familie vermittelt [279]. Allerdings scheinen diese Rekrutierungsprozesse auch von Zelladhäsionsmolekülen der IgSF-Familie, wie z. B. L1CAM, beeinflusst zu werden. So verstärkt L1CAM beim Mammakarzinom die Adhäsion an Endothelzellen [165,280] und fördert auf diese Weise die vaskuläre Metastasierung in die Lunge [165]. Außerdem ist L1CAM in der Lage, die transendotheliale Migration von Tumorzellen [281,282] und Dendritischen Zellen [283] zu vermitteln. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, ob L1CAM von Tumorzellen bzw. Immunzellen oder von Endothelzellen exprimiert wird. Entscheidend scheint vielmehr zu sein, dass L1CAM in *trans* an geeignete Faktoren binden kann, indem es entweder homophil (mit sich selbst) [280,283] oder heterophil (z. B. mit Integrin  $\alpha\beta3$  oder ALCAM) [280,282] interagiert. Nach erfolgreicher Extravasation tritt ein großer Prozentanteil der Tumorzellen entweder in einen Zustand des Zellzyklus-Arrests, die so genannte Dormanz, ein [276,284] oder stirbt durch Apoptose [285]. Diese Beobachtungen erklären die geringe Effizienz des gesamten metastatischen Prozesses [286]. Ob eine Tumorzelle am Zielort der

Metastasierung proliferieren kann, hängt gemäß der von Stephen Paget postulierten ‚Seed and soil‘-Hypothese stark von der Kompatibilität der Tumorzelle (der Saat, engl. *seed*) mit der Mikroumgebung im spezifischen Zielorgan (dem Boden, engl. *soil*) ab [287]. Mittlerweile gilt als akzeptiert, dass die Kompatibilität der Tumorzellen mit der Mikroumgebung auf molekularer Ebene durch die Präsenz von Wachstumsfaktoren, spezifischen Zelloberflächenrezeptoren und Zelladhäsionsmolekülen bestimmt wird [71]. Tumorzellen sind durch die direkte oder indirekte Interaktion mit Zellen der Organ-Mikroumgebung in der Lage, ihre Adaptation an die Bedingungen am Zielorgan der Metastasierung zu fördern [288]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von L1CAM wichtig für das Auswachsen der Tumorzellen im Zielorgan der Metastasierung nach erfolgter Extravasation war, was indiziert, dass L1CAM die Adaptation von Tumorzellen an fremde Gewebe, das Überleben früher Mikrometastasen und die Wiederaufnahme der Proliferation ermöglicht. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass L1CAM beim Lungenkarzinom zum Auswachsen von Metastasen im Gehirn beiträgt [289]. Da bekannt ist, dass L1CAM die Apoptose von Tumorzellen inhibiert [290,291], ist eine mögliche Interpretation, dass L1CAM die Metastasierung fördert, indem es das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose zugunsten des metastatischen Wachstums verschiebt. Gemäß dieser Sichtweise versetzt L1CAM die Tumorzellen in die Lage, die limitierenden Schritte der metastatischen Kaskade zu überwinden und liefert eine Erklärung dafür, warum die Suppression von L1CAM nicht nur die spontane Metastasierung der L-CI.5s-Zellen, sondern auch die experimentelle Metastasierung deutlich vermindert.

Beobachtungen aus der Klinik legen nahe, dass L1CAM eine wichtige Rolle für die Lebermetastasierung spielt, da nahezu 100 % der untersuchten Lebermetastasen von Melanom- und Pankreaskarzinompatienten erhöhte Expression von L1CAM aufweisen [140,169]. Konsistent damit zeigt die vorliegende Arbeit, dass L1CAM ein entscheidender Faktor für die Bildung von Lebermetastasen im L-CI.5s T-Lymphom-Modell ist. Darüber hinaus fördert Tumorzell-L1CAM auch die Kolonisierung der Lunge durch Tumorzellen im SKOV3ip-Ovarialkarzinom-Modell, einer typischen soliden, L1CAM-abhängigen Tumorentität. Die L1CAM-abhängige Förderung der Lungenmetastasierung ist auch in einem spontanen Metastasierungsexperiment mit hypoxischen Mammakarzinomzellen beobachtet worden [165]. Darüber hinaus trägt L1CAM zur Bildung von Metastasen im Gehirn [289] und in Knochen [292] bei. Diese

Beobachtungen deuten darauf hin, dass der pro-metastatische Effekt von L1CAM und die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen weder auf eine einzelne Tumorentität noch auf ein spezifisches Zielorgan der Metastasierung begrenzt sind.

#### **6.4 Tumorzell-L1CAM fördert die Metastasierung, indem es die Expression der pro-metastatischen Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sowie die gelatinolytische Aktivität hochreguliert**

Über die Re-initiierung der Proliferation hinaus stellen Tumorzellmigration und -invasion wichtige Voraussetzungen für die Effizienz der Metastasierung dar [151,268]. Diese Prozesse sind in hohem Maße abhängig von der proteolytischen Aktivität Matrix-degradierender Enzyme [181,293-295]. Tatsächlich ist bei Kolon-, Ovarial- und Pankreaskarzinompatienten eine erhöhte Expression von L1CAM im Bereich der invasiven Front des Tumorgewebes lokalisiert [142,148,149], was einen Beitrag von L1CAM zum invasiven Phänotyp dieser Tumorentitäten suggeriert. In Übereinstimmung mit diesen Studien demonstriert diese Arbeit, dass L1CAM die mRNA-Expression der pro-metastatischen Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 *in vitro* sowohl in L-CI.5s T-Lymphom-Zellen als auch in SKOV3ip-Ovarialkarzinomzellen positiv reguliert und außerdem mit erhöhter gelatinolytischer Aktivität *in vivo* assoziiert ist. Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass die spezifische Inhibition von MMP-2 und MMP-9 effizient die Lebermetastasierung im L-CI.5s T-Lymphom-Modell inhibiert [242,296]. In diesem Modell ist Tumorzell-MMP-9 wichtig für die invasiven Schritte der Leberkolonisierung, während MMP-2 zum effizienten Wachstum der metastatischen Kolonien beiträgt [242]. Die vorliegende Arbeit konnte die Effekte der Suppression von L1CAM auf das metastatische Potential von Tumorzellen durch die Verwendung des synthetischen MMP-2- und MMP-9-Inhibitors SB-3CT nachahmen. Auch im humanen Prostatakarzinom [292] und im humanen Fibrosarkom [247] werden MMP-2 und MMP-9 in Abhängigkeit von L1CAM reguliert. Zusammengefasst indizieren diese Ergebnisse eine Abhängigkeit der Gelatinase-Expression von der L1CAM-Präsenz und suggerieren, dass diese Faktoren in Kooperation den invasiven Phänotyp von Tumorzellen fördern und zur metastatischen Kolonisierung verschiedener Organe beitragen.

## 6.5 Mögliche molekulare Mechanismen der L1CAM-abhängigen Regulation der pro-metastatischen Gelatinasen MMP-2 und MMP-9

### *L1CAM-abhängige Mechanismen der Signaltransduktion*

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die pro-metastatischen Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 in Abhängigkeit von L1CAM reguliert werden [247,292]. Nach wie vor sind die zu Grunde liegenden Mechanismen und Signalwege nicht identifiziert. Die zahlreichen Interaktionen von L1CAM lassen verschiedene molekulare Mechanismen der L1CAM-abhängigen Regulation von MMP-2 und MMP-9 zu: L1CAM-assistierte Signaltransduktion, L1CAM *forward* Signaltransduktion und L1CAM *reverse* Signaltransduktion [297].

Bei der L1CAM-assistierten Signaltransduktion bewirkt die Interaktion von L1CAM mit Rezeptortyrosinkinasen [298], Integrinen [299] oder Neuropilin [129] in *cis* (auf der Zelloberfläche derselben Zelle) oder *trans* (auf einer benachbarten Zelle) die Aktivierung abwärts gelegener Signalwege, u. a. FAK/MAPK/Erk und PI3K-Akt [299,300]. So stimuliert z. B. die Bindung eines L1CAM-Peptids an FGFR über die Aktivierung des Rezeptors das Auswachsen von Neuriten [130,131]. Die Interaktion von löslichem L1CAM und FGFR verstärkt die Proliferation und Motilität von Gliomzellen [301]. Die homophile Bindung von L1CAM resultiert in der Adhäsions-abhängigen Aktivierung des EGF-Rezeptors [302]. Die Verstärkung der PDGF-induzierten Erk-Aktivierung in Fibroblasten durch L1CAM in Abhängigkeit von der Zelldichte [303] deutet darauf hin, dass die homophile L1CAM-Bindung auch die PDGF-induzierte Signaltransduktion fördert. Die Aktivierung der MAPK/Erk- und PI3K/Akt-Signalwege führt zu erhöhter Expression und Aktivität von MMP-2 und MMP-9 [304-307], was eine Beteiligung der L1CAM-assistierten Signaltransduktion an der Regulation der Gelatinasen suggeriert.

Die L1CAM *forward* Signaltransduktion beruht auf einer Sequenz von proteolytischen Schritten und führt schließlich zur Freisetzung der zytoplasmatischen Domäne von L1CAM (L1cyt) sowie zu deren Translokation in den Nukleus, wo sie auf bislang unbekannt Weise an der Regulation der Genexpression beteiligt ist [308,309]. Diese Sequenz proteolytischer Schritte erfolgt in einer zur Spaltung von Notch analogen Weise [310]. Der erste Schritt dieser sequentiellen Proteolyse von L1CAM ist die Membran-proximale Spaltung von L1CAM durch eine der beiden ADAM-Proteasen



ADAM-10 oder ADAM-17 [308,311]. Dabei wird ein Ektodomänen-Fragment von L1CAM (L1ecto) mit einer Größe von ca. 200 kDa freigesetzt. Die ADAM-10/-17-vermittelte Spaltung ist Voraussetzung für den zweiten proteolytischen Schritt, die Bildung eines zytoplasmatischen Fragments von L1CAM mit einer Größe von 28 kDa durch  $\gamma$ -Sekretase-abhängige regulierte Intramembranproteolyse (RIP, engl. *regulated intramembrane proteolysis*) [308]. Für die RIP-abhängige nukleäre Translokation der L1cyt und die Regulation der Genexpression durch L1cyt ist die Präsenz der RGD-Integrinbindungssequenz notwendig [161], was suggeriert, dass die Bindung von L1CAM an Integrine wichtig für die nukleäre Translokation und die L1cyt-vermittelte Regulation der Genexpression ist.

Die L1CAM *reverse* Signaltransduktion beinhaltet die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Die Zusammenlagerung von L1CAM und Integrinen führt über die Aktivierung von ILK zur Genexpression und Sekretion von IL-1 $\beta$ . Dieses bindet an den Interleukin-1-Rezeptor Typ I (IL-1RI) und bewirkt die Phosphorylierung, Aktivierung und nukleäre Translokation der p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B. Bei diesem molekularen Mechanismus erfolgt die L1CAM-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B unabhängig von der proteolytischen Spaltung von L1CAM [156,312]. Die Interaktion von L1CAM mit den Integrin-Untereinheiten  $\alpha$ v,  $\alpha$ 5 und  $\beta$ 1 bewirkt die Bindung und Aktivierung der intrazellulären Proteine ILK, FAK und Src, welche Schlüsselregulatoren der Integrin-abhängigen Signaltransduktion sind [313,314], und führt schließlich zur Aktivierung von PI3K und NF- $\kappa$ B sowie zur Transkription von NF- $\kappa$ B-Zielgenen [156,312], darunter möglicherweise auch MMP-2 und MMP-9 [304,315,316]. Darüber hinaus existieren indirekte Evidenzen, dass die Bindung von löslichem L1CAM an die Integrine  $\alpha$ v $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 5, and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 zur Aktivierung von FAK und zu erhöhter Motilität führt [317]. Alternativ kann das Ezrin-abhängige *Clustering* von L1CAM auf der Zelloberfläche die Aktivierung von NF- $\kappa$ B bewirken [167]. So sind NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Ezrin für die L1CAM-vermittelte Lebermetastasierung von Kolonkarzinomzellen verantwortlich [167,168]. Der Beitrag der L1CAM-induzierten Aktivierung der Erk- [303], Akt- [263] und NF- $\kappa$ B-Signalwege [167] zur L1CAM-vermittelten Motilität, Invasion und Metastasierung impliziert, dass L1CAM die Expression und Aktivität der pro-metastatischen Gelatinasen über einen oder mehrere dieser Signalwege induziert.

### *Proteolytische Prozessierung von L1CAM*

Zusätzliche Variabilität in der L1CAM-abhängigen Signaltransduktion entsteht durch die proteolytische Freisetzung der L1CAM-Ektodomäne im ersten Schritt der L1CAM *forward* Signaltransduktion. Die lösliche L1CAM-Ektodomäne ist in verschiedenen Tumorentitäten als Marker im Serum von Patienten [141,252,318] und in durch Tumorzellen konditioniertem Medium [317,319] nachweisbar. Interessanterweise ist auch die Expression von ADAM-10 [141,320] und ADAM-17 [321,322], den verantwortlichen L1CAM-*Sheddases*, in einer Vielzahl von Tumorentitäten erhöht. Die Beobachtungen, dass ADAM-10 das konstitutive *Shedding* von L1CAM in nicht-neuronalen Zellen [309,320] vermittelt, während ADAM-17 für das induzierte *Shedding* von L1CAM in nicht-neuronalen Zellen verantwortlich ist [308,323], suggerieren, dass das ADAM-10/-17-vermittelte L1CAM-*Shedding* zur Tumorphysion beiträgt. Tatsächlich werden ADAM-10 und L1CAM in invasiven Bereichen des Kolonkarzinoms ko-exprimiert [142]. Außerdem fördert ADAM-10 die Lebermetastasierung endogen oder ektop L1CAM-exprimierender Kolonkarzinomzellen [166]. In migrierenden Gliomzellen wird die Expression von ADAM-10 hochreguliert, während gleichzeitig die Zelloberflächenpräsenz von L1CAM abnimmt [317]. Die ADAM-10/-17-vermittelte Spaltung von L1CAM verringert die L1CAM-abhängige Zelladhäsion und fördert die L1CAM-abhängige Zellmigration [308]. In Übereinstimmung damit deuten Studien zur Funktion der löslichen L1CAM-Ektodomäne auf eine pro-metastatische Funktion hin. So verstärkt lösliches L1CAM-Fc-Fusionsprotein (Aminosäuren 1-1117 [127]) die Migration von CHO-Zellen in gleicher Weise wie konditioniertes Medium von L1CAM-überexprimierenden CHO-Zellen [311]. Neben ADAM-10 und ADAM-17 sind die Serinproteasen Plasmin [324], Neuropsin/Kallikrein 8 [325] und MBC (engl. *Myelin basic protein*) [326], die Pro-Protein-Konvertase PC5A [327], die Aspartylproteasen BACE1 [328] (328) und Cathepsin E [329] in der Lage, die L1CAM-Ektodomäne an unterschiedlichen Positionen proteolytisch zu spalten. Die Tatsache, dass L1CAM von insgesamt acht verschiedenen Proteasen proteolytisch gespalten wird, verdeutlicht die große Bedeutung der proteolytischen Prozessierung von L1CAM für die Modulation seiner physiologischen und pathologischen Funktionen. Damit übereinstimmend belegt eine zunehmende Zahl von Studien, dass die proteolytische Spaltung von Zelladhäsionsmolekülen, wie z. B. von E-Cadherin [330], CD44 [331], N-Cadherin [332] und L1CAM [308,311] bzw. die löslichen Ektodomänen von Zelladhäsionsmolekülen

[330,333,334] die Zelladhäsion modulieren und das migratorische und invasive Potential von Zellen erhöhen. Diese Beobachtungen haben zu der Hypothese geführt, dass Tumorzellen durch Ektodomänen-*Shedding* aktiv die Zelloberflächenpräsenz ihrer homophilen Zelladhäsionsmoleküle herunterregulieren, um die Kontaktinhibition der Proliferation zu überwinden und ihre Motilität zu erhöhen [335,336].

### *L1CAM, MMP-2 und MMP-9 sind in Tumorzell-sekretierten Exosomen nachweisbar*

Exosomen sind kleine, sekretierte Membranvesikel mit einer Größe von 40 bis 100 nm, die ihren Ursprung im späten endosomalen Kompartiment der Multivesikulären Körperchen (MVB, engl. *multivesicular bodies*) haben [337,338]. Diese Mikrovesikel besitzen wichtige Funktionen für die Herunterregulation aktivierter Rezeptoren [339], für die Immunstimulation [340] und für die interzelluläre Kommunikation [341]. Ubiquitin fungiert als Signal für die Sortierung von Proteinen in diesen zellulären Transportweg [339], der verschiedene bioaktive Moleküle, u. a. Membranrezeptoren, Proteine, DNA, mRNAs, microRNAs und Organellen von der Ursprungszelle zur Zielzelle transportiert [342,343]. Exosomen sind in Körperflüssigkeiten von gesunden Spendern [344] und Krebspatienten [345,346] sowie in konditioniertem Zellkulturmedium von Tumorzellen [346,347] nachweisbar.

Exosomen dienen Tumorzellen als Plattformen für das Ektodomänen-*Shedding* von Membranproteinen [348,349]. L1CAM ist für verschiedene Tumorentitäten als Bestandteil von Exosomen identifiziert worden [317,345]. Wie L1CAM wird auch ADAM-10 in Exosomen sortiert [350,351]. In Ovarialkarzinomzellen erfolgt das Ektodomänen-*Shedding* von L1CAM durch ADAM-10 und ADAM-17 im endosomalen Kompartiment und führt zur Freisetzung von Exosomen, die sowohl funktionell aktives ADAM-10 und ADAM-17 als auch den zytoplasmatischen Bereich von L1CAM (L1cyt) enthalten [323,345,352], was eine mögliche Beteiligung von Exosomen an der L1cyt-vermittelten Regulation der Genexpression durch den interzellulären Transfer von L1cyt suggeriert. Die neuronale Isoform von L1CAM (FL-L1CAM) wird auf der Basis des RSLE-Sortiersignals, welches der nicht-neuralen L1CAM-Isoform SV-L1CAM fehlt, in Exosomen sortiert [352] und dort durch ADAM-10 gespalten [323,352]. Lösliches L1CAM (L1ecto) aus sekretierten Vesikeln induziert die Migration und die Aktivierung des Erk-Signalwegs [317,353]. Zusammen mit der Förderung der Metastasierung durch die gemeinsame Expression von ADAM-10 und L1CAM [166] liefern diese Beobachtungen eine mögliche Erklärung für die

exklusiv durch die FL-L1CAM-Isoform vermittelte pro-metastatische Funktion von L1CAM [247].

Interessanterweise sind auch die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 in Exosomen aus Körperflüssigkeiten von Krebspatienten [354] und in Exosomen aus Tumorzellen [355-357] nachweisbar. Von Prostatakarzinomzellen sekretierte Mikrovesikel enthalten MMP-9 und den extrazellulären Induktor der MMP-Expression Basigin (EMMPRIN, engl. *extracellular matrix metalloproteinase inducer*) [345,358]. Exosomen enthalten außerdem uPA [355], MT1-MMP (MMP-14) [359], Plasminogen und Hsp90 $\alpha$  [360,361], welche zur Aktivierung von pro-MMP-2 und pro-MMP-9 beitragen und die Motilität und Invasivität von Tumorzellen fördern. Blutplättchen-sekretierte Mikrovesikel induzieren in Lungenkarzinomzellen die Genexpression von MMP-9 und verstärken ihre Metastasierung [362]. Von humanen Nierenzellkarzinom-Stammzellen sekretierte Mikrovesikel induzieren in der Lunge die Expression von MMP-2 und MMP-9 [357]. Exosomen von Nierenzellkarzinomzellen induzieren die Genexpression von MMP-9 und fördern die Migration und Invasion der Tumorzellen [363]. Exosomen aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzieren in Melanomzellen die Aktivierung von Erk und NF- $\kappa$ B sowie die Genexpression von MMP-9 und fördern so das migratorische, invasive und metastatische Potential der Tumorzellen [364]. Außerdem induzieren Tumorzell-sekretierte Mikrovesikel die Aktivierung von Fibroblasten, wie durch die Aktivierung von Erk1/2 und die Hochregulation von MMP-9 gezeigt, erhöhen die Motilität der Fibroblasten und ihre Resistenz gegenüber Apoptose und fördern darüber hinaus ihrerseits die Freisetzung von Mikrovesikeln durch Fibroblasten. Die Fibroblasten-sekretierten Mikrovesikel erhöhen wiederum die Motilität und Invasivität der Prostatakarzinomzellen [358]. Weiterhin sind von Tumorzellen oder Fibroblasten sekretierte Exosomen an der Etablierung einer pro-tumorigenen und pro-metastatischen Nische beteiligt [346,365,366], indem sie zum Austausch von genetischer Information zwischen Tumorzellen untereinander [367] sowie zwischen Tumorzellen und Stromazellen [346] bzw. zwischen Tumorzellen und Zellen des Zielorgans der Metastasierung beitragen [368]. Darüber hinaus fungieren Exosomen als potente Immunsuppressoren, indem sie Apoptose in aktivierten T-Zellen induzieren, die Differenzierung von Monozyten in Dendritische Zellen verhindern und die Bildung Myeloider Suppressorzellen (MDSCs, engl. *myeloid-derived suppressor cells*) induzieren [369]. Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass Exosomen sowohl L1CAM als auch MMP-2 und MMP-9 enthalten, und

identifizieren Exosomen als eine bedeutende Quelle gelatinolytischer Aktivität. Die Beobachtungen zeigen darüber hinaus, dass Exosomen die gelatinolytische Aktivität sowohl in Tumorzellen als auch in Stromazellen induzieren können, und suggerieren, dass Exosomen über verschiedene Mechanismen zum malignen Phänotyp von Tumorzellen beitragen können.

Schlussfolgernd, heben die Ergebnisse dieser Arbeit, dass L1CAM die Disseminierung von Tumorzellen, die Kolonisierung und das Auswachsen von Tumorzellen im Zielorgan der Metastasierung durch die Hochregulation der Expression pro-metastatischer Gelatinasen und durch die Induktion der Tumorzellproliferation am Ort des sekundären Tumorwachstums fördert, L1CAM als ein vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Begrenzung der metastatischen Streuung hochgradig aggressiver nicht-solider und solider Tumoren hervor.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, u. a. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49:1374-1403, 2013.
- [2] Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64: 9-29, 2014.
- [3] Heron M. Deaths: leading causes for 2010. *Natl Vital Stat Rep* 62: 1-96, 2013.
- [4] Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 347: 1377-1381, 1996.
- [5] Vineis P, Schatzkin A, Potter JD. Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis* 31: 1703-1709, 2010.
- [6] Trosko JE, Chang CC. Environmental carcinogenesis: an integrative model. *Q Rev Biol* 53: 115-141, 1978.
- [7] Carrel A, Ebeling AH. The transformation of monocytes into fibroblasts through the action of Rous virus. *J Exp Med.* 43: 461-468, 1926.
- [8] Huebner RJ, Todaro GJ. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64: 1087-1094, 1969.
- [9] Rous P. A. Transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl). *J Exp Med* 12: 696–705, 1910.
- [10] Berenblum, I. The mechanism of carcinogenesis. A study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena. *Cancer Res* 1: 807-814, 1941.
- [11] Berenblum I, Shubik P. An experimental study of the initiating state of carcinogenesis, and a re-examination of the somatic cell mutation theory of cancer. *Br J Cancer* 3: 109-118, 1949.
- [12] Riegel B, Wartman WB, Hill WT, Reeb BB, Shubik P, Stanger DW. Delay of methylcholanthrene skin carcinogenesis in mice by 1,2,5,6-dibenzofluorene. *Cancer Res* 11: 301-303, 1951.
- [13] Babcock EB, Collins JL. Natural ionising radiation and rate of mutation. *Nature.* 124: 227-228, 1929.
- [14] Goodspeed TH, Olson AR. The production of variation in nicotiana species by X-ray treatment of sex cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 14: 66-69, 1928.
- [15] Muller HJ. Artificial transmutation of the gene. *Science* 66: 84-87, 1927.
- [16] Olson AR, Lewis GN. Natural reactivity and the origin of species. *Nature* 121: 673-674, 1928.
- [17] Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374, 2001.
- [18] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649, 1998.
- [19] Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability – an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 220-228, 2010.
- [20] Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 116: 235-246, 2004.

- [21] Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51: 3075-3079, 1991.
- [22] Loeb LA. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer* 11:450-457, 2011.
- [23] Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature* 476:163-169, 2011.
- [24] Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 157-162, 2001.
- [25] Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med* 7:552-556, 2001.
- [26] Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 4: 814-819, 2004.
- [27] Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9: 138-141, 1993.
- [28] Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10: 789-799, 2004.
- [29] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 339: 1546–1558, 2013.
- [30] Davis CD, Ross SA. Dietary components impact histone modifications and cancer risk. *Nutr Rev* 65: 88-94, 2007.
- [31] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358: 1148-1159, 2008.
- [32] Renehan AG, Frystyk J, Flyvbjerg A. Obesity and cancer risk: the role of the insulin-IGF axis. *Trends Endocrinol Metab* 17: 328-336, 2006.
- [33] Greaves M. Darwinian medicine: a case for cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 213-221, 2007.
- [34] Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 481: 306-313, 2012.
- [35] Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 6: 924-935, 2006.
- [36] Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer* 8: 180-192, 2008.
- [37] Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* 26: 319-331, 2007.
- [38] Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* 18: 330-337, 2008.
- [39] Gillies RJ, Gatenby RA. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 26: 311-317, 2007.
- [40] Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136: 823-837, 2009.
- [41] Talmadge JE. Clonal selection of metastasis within the life history of a tumor. *Cancer Res* 67: 11471-11475, 2007.
- [42] Soto AM, Sonnenschein C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nat Rev Endocrinol* 6: 363-370, 2010.

- [43] Potter JD. Morphogens, morphostats, microarchitecture and malignancy. *Nat Rev Cancer* 7: 464-474, 2007.
- [44] Van den Brink GR, Offerhaus GJ. The morphogenetic code and colon cancer development. *Cancer Cell* 11: 109-117, 2007.
- [45] Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM, Postovit LM. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer* 7: 246-255, 2007.
- [46] Kasemeier-Kulesa JC, Teddy JM, Postovit LM, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ, u. a. Reprogramming multipotent tumor cells with the embryonic neural crest microenvironment. *Dev Dyn* 237: 2657–2666, 2008.
- [47] Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* 17: 320-329, 2011.
- [48] DeGregori J. Evolved tumor suppression: why are we so good at not getting cancer? *Cancer Res* 71: 3739-3744, 2011.
- [49] Steen HB. The origin of oncogenic mutations: where is the primary damage? *Carcinogenesis* 21: 1773-1776, 2000.
- [50] Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, u. a. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 4: 177-183, 2004.
- [51] Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 458: 719-724, 2009.
- [52] Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat Rev Genet* 14: 703-718, 2013.
- [53] Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34: 369-376, 2003.
- [54] Brenner JC, Chinnaiyan AM. Translocations in epithelial cancers. *Biochim Biophys Acta* 1796: 201-215, 2009.
- [55] Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 497-511, 2008.
- [56] Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150: 12-27, 2012.
- [57] Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8: 286-298, 2007.
- [58] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 128: 683-692, 2007.
- [59] Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10: 704-714, 2009.
- [60] Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 12: 580-587, 2006.
- [61] Dai C, Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med* 16: 528-536, 2010.
- [62] Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov* 6: 541-555, 2007.



- [63] Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 9: M57-M60, 1999.
- [64] Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am* 275: 62-70, 1996.
- [65] Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411: 355-365, 2001.
- [66] Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141: 1117-1134, 2010.
- [67] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, 2000.
- [68] Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 85-95, 2011.
- [69] Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13: 472-482, 2008.
- [70] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674, 2011.
- [71] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3: 453-458, 2003.
- [72] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147: 275-292, 2011.
- [73] Pals ST, de Gorter DJ, Spaargaren M. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood* 110: 3102-3111, 2007.
- [74] Saxena M, Christofori G. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Mol Oncol* 7: 283-296, 2013.
- [75] Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 9: 302-312, 2009.
- [76] Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28, 1976.
- [77] Bissig H, Richter J, Desper R, Meier V, Schraml P, Schäffer AA, u. a. Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 155: 267-274, 1999.
- [78] Jones S, Chen WD, Parmigiani G, Diehl F, Beerewinkel N, Antal T, u. a. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 4283-4288, 2008.
- [79] Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, u. a. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467: 1114-1117, 2010.
- [80] Podsypanina K, Du YC, Jechlinger M, Beverly LJ, Hambardzumyan D, Varmus H. Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science* 321: 1841-1844, 2008.
- [81] Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhrmann C, u. a. Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell* 8: 227-239, 2005.

- [82] Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, u. a. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7737-7742, 2003.
- [83] Hüseemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, u. a. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13: 58-68, 2008.
- [84] Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, u. a. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117: 927-939, 2004.
- [85] Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, u. a. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704-715, 2008.
- [86] Weng D, Penzner JH, Song B, Koido S, Calderwood SK, Gong J. Metastasis is an early event in mouse mammary carcinomas and is associated with cells bearing stem cell markers. *Breast Cancer Res* 14: R18, 2012.
- [87] Vecchi M, Confalonieri S, Nuciforo P, Viganò MA, Capra M, Bianchi M, u. a. Breast cancer metastases are molecularly distinct from their primary tumors. *Oncogene* 27: 2148-2158, 2008.
- [88] Klein CA, Stoecklein NH. Lessons from an aggressive cancer: evolutionary dynamics in esophageal carcinoma. *Cancer Res* 69: 5285-5288, 2009.
- [89] Klein CA. Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* 501: 365-372, 2013.
- [90] Stoecklein NH, Klein CA. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int J Cancer* 126: 589-598, 2010.
- [91] Klein CA. Cancer. The metastasis cascade. *Science* 321: 1785-1787, 2008.
- [92] Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta* 1552: 39-45, 2001.
- [93] Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 118-132, 2004.
- [94] Arvatz G, Shafat I, Levy-Adam F, Ilan N, Vlodaysky I. The heparanase system and tumor metastasis: is heparanase the seed and soil? *Cancer Metastasis Rev* 30: 253-268, 2011.
- [95] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52-67, 2010.
- [96] Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med* 16: 133-144, 2010.
- [97] Mantovani A, Savino B, Locati M, Zammataro L, Allavena P, Bonecchi R. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 27-39, 2010.
- [98] Holm J, Hillenbrand R, Steuber V, Bartsch U, Moos M, Lübbert H, u. a. Structural features of a close homologue of L1 (CHL1) in the mouse: a new

- member of the L1 family of neural recognition molecules. *Eur J Neurosci* 8: 1613-1629, 1996.
- [99] Rathjen FG, Wolff JM, Chang S, Bonhoeffer F, Raper JA. Neurofascin: a novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell* 51: 841-849, 1987.
- [100] Grumet M, Mauro V, Burgoon MP, Edelman GM, Cunningham BA. Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 113: 1399-1412, 1991.
- [101] Coutelle O, Nyakatura G, Taudien S, Elgar G, Brenner S, Platzer M, u. a. The neural cell adhesion molecule L1: genomic organisation and differential splicing is conserved between man and the pufferfish *Fugu*. *Gene* 208: 7-15, 1998.
- [102] Hlavin ML, Lemmon V. Molecular structure and functional testing of human L1CAM: an interspecies comparison. *Genomics* 11: 416-423, 1991.
- [103] Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Früh K, Schachner M. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334: 701-703, 1988.
- [104] Shapiro L, Love J, Colman DR. Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annu Rev Neurosci* 30: 451-474, 2007.
- [105] Faissner A, Kruse J, Nieke J, Schachner M. Expression of neural cell adhesion molecule L1 during development, in neurological mutants and in the peripheral nervous system. *Brain Res* 317: 69-82, 1984.
- [106] Persohn E, Schachner M. Immunoelectron microscopic localization of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM during postnatal development of the mouse cerebellum. *J Cell Biol* 105: 569-576, 1987.
- [107] Chang S, Rathjen FG, Raper JA. Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. *J Cell Biol* 104: 355-362, 1987.
- [108] Lemmon V, Farr KL, Lagenaur C. L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2: 1597-1603, 1989.
- [109] Keilhauer G, Faissner A, Schachner M. Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* 316: 728-730, 1985.
- [110] Lindner J, Rathjen FG, Schachner M. L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305: 427-430, 1983.
- [111] Maness PF, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 10: 19-26, 2007.
- [112] Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Friez MJ, Inbar D, Korenreich L, Shohat M, u. a. Expanding the phenotypic spectrum of L1CAM-associated disease. *Clin Genet* 69: 414-419, 2006.

- [113] Okamoto N, Wada Y, Goto M. Hydrocephalus and Hirschsprung's disease in a patient with a mutation of L1CAM. *J Med Genet* 34: 670-671, 1997.
- [114] Itoh K, Cheng L, Kamei Y, Fushiki S, Kamiguchi H, Gutwein P, u. a. Brain development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion. *J Cell Biol* 165: 145-154, 2004.
- [115] Kamiguchi H, Hlavin ML, Lemmon V. Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol Cell Neurosci* 12: 48-55, 1998.
- [116] Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G, MacFarlane J, Stevenson R, Paterson J, u. a. X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat Genet* 7: 402-407, 1994.
- [117] Vits L, Van Camp G, Coucke P, Fransen E, De Boule K, Reyniers E, u. a. MASA syndrome is due to mutations in the neural cell adhesion gene L1CAM. *Nat Genet* 7: 408-413, 1994.
- [118] Fransen E, Lemmon V, Van Camp G, Vits L, Coucke P, Willems PJ. CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur J Hum Genet* 3: 273-284, 1995.
- [119] Haspel J, Grumet M. The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes. *Front Biosci* 8:s1210-s1225, 2003.
- [120] Kadmon G, Altevogt P. The cell adhesion molecule L1: species- and cell-type-dependent multiple binding mechanisms. *Differentiation* 61: 143-150, 1997.
- [121] Gouveia RM, Gomes CM, Sousa M, Alves PM, Costa J. Kinetic analysis of L1 homophilic interaction: role of the first four immunoglobulin domains and implications on binding mechanism. *J Biol Chem* 283: 28038-28047, 2008.
- [122] He Y, Jensen GJ, Bjorkman PJ. Cryo-electron tomography of homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule L1. *Structure* 17: 460-471, 2009.
- [123] Kuhn TB, Stoeckli ET, Condrau MA, Rathjen FG, Sonderegger P. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol* 115: 1113-1126, 1991.
- [124] Ebeling O, Duczmal A, Aigner S, Geiger C, Schöllhammer S, Kemshead JT, u. a. L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur J Immunol* 26: 2508-2516, 1996.
- [125] Ruppert M, Aigner S, Hubbe M, Yagita H, Altevogt P. The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J Cell Biol* 131: 1881-1891, 1995.
- [126] Kadmon G, von Bohlen und Halbach F, Horstkorte R, Eckert M, Altevogt P, Schachner M. Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur J Neurosci* 7: 993-1004, 1995.
- [127] Oleszewski M, Beer S, Katich S, Geiger C, Zeller Y, Rauch U, u. a. Integrin and neurocan binding to L1 involves distinct Ig domains. *J Biol Chem* 274: 24602-24610, 1999.

- [128] Castellani V, Chédotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27: 237-249, 2000.
- [129] Castellani V, De Angelis E, Kenwrick S, Rougon G. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J* 21: 6348-6357, 2002.
- [130] Doherty P, Williams E, Walsh FS. A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron* 14: 57-66, 1995.
- [131] Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 13: 583-594, 1994.
- [132] Davis JQ, Bennett V. Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 269: 27163-27166, 1994.
- [133] Dickson TC, Mintz CD, Benson DL, Salton SRJ. Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J Cell Biol* 157: 1105-1112, 2002.
- [134] Cheng L, Lemmon S, Lemmon V. RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 94: 1102-1110, 2005.
- [135] Kamiguchi H, Long KE, Pendergast M, Schaefer AW, Rapoport I, Kirchhausen T, u. a. The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 18: 5311-5321, 1998.
- [136] Kiefel H, Bondong S, Hazin J, Ridinger J, Schirmer U, Riedle S, u. a. L1CAM: a major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adhes Migr* 6: 374-384, 2012.
- [137] Wai Wong C, Dye DE, Coombe DR. The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *Int J Cell Biol* 2012: 340296, 2012.
- [138] Gavert N, Ben-Shmuel A, Raveh S, Ben-Ze'ev A. L1-CAM in cancerous tissues. *Expert Opin Biol Ther* 8: 1749-1757, 2008.
- [139] Raveh S, Gavert N, Ben-Ze'ev A. L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors. *Cancer Lett* 282: 137-145, 2009.
- [140] Bergmann F, Wandschneider F, Sipos B, Moldenhauer G, Schniewind B, Welsch T, u. a. Elevated L1CAM expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep* 24: 909-915, 2010.
- [141] Fogel M, Gutwein P, Mechttersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, u. a. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362: 869-875, 2003.
- [142] Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, u. a. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* 168: 633-642, 2005.

- [143] Miki T, Yasuda S, Kahn M. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Rev* 7: 836-846, 2011.
- [144] Watanabe K, Dai X. A WNTer revisit: new faces of  $\beta$ -catenin and TCFs in pluripotency. *Sci Signal* 4: pe41, 2011.
- [145] Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells – an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5: 744-749, 2005.
- [146] Gavert N, Ben-Ze'ev A.  $\beta$ -Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 102: 820-828, 2007.
- [147] Cheng L, Wu Q, Guryanova OA, Huang Z, Huang Q, Rich JN, u. a. Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 406: 643-648, 2011.
- [148] Tsutsumi S, Morohashi S, Kudo Y, Akasaka H, Ogasawara H, Ono M, u. a. L1 cell adhesion molecule (L1CAM) expression at the cancer invasive front is a novel prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 103: 669-673, 2011.
- [149] Zecchini S, Bianchi M, Colombo N, Fasani R, Goisis G, Casadio C, u. a. The differential role of L1 in ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelium. *Cancer Res* 68: 1110-1118, 2008.
- [150] Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature* 441: 444-450, 2006.
- [151] Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147: 992-1009, 2011.
- [152] Gast D, Riedle S, Issa Y, Pfeifer M, Beckhove P, Sanderson MP, u. a. The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies. *Oncogene* 27: 1281-1289, 2008.
- [153] Krueger S, Haeckel C, Buehling F, Roessner A. Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Res* 59: 6010-6014, 1999.
- [154] Mohanam S, Jasti SL, Kondraganti SR, Chandrasekar N, Lakka SS, Kin Y, u. a. Down-regulation of cathepsin B expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells. *Oncogene* 20: 3665-3673, 2001.
- [155] Huszar M, Pfeifer M, Schirmer U, Kiefel H, Konecny GE, Ben-Arie A, u. a. Up-regulation of L1CAM is linked to loss of hormone receptors and E-cadherin in aggressive subtypes of endometrial carcinomas. *J Pathol* 220: 551-561, 2010.
- [156] Kiefel H, Bondong S, Pfeifer M, Schirmer U, Erbe-Hoffmann N, Schäfer H, u. a. EMT-associated up-regulation of L1CAM provides insights into L1CAM-mediated integrin signalling and NF- $\kappa$ B activation. *Carcinogenesis* 33: 1919-1929, 2012.
- [157] Shtutman M, Levina E, Ohouo P, Baig M, Roninson IB. Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res* 66: 11370-11380, 2006.

- [158] Balasenthil S, Chen N, Lott ST, Chen J, Carter J, Grizzle WE, u. a. A migration signature and plasma biomarker panel for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)* 4: 137-149, 2011.
- [159] Meier F, Busch S, Gast D, Göppert A, Altevogt P, Maczey E, u. a. The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression. *Int J Cancer* 119: 549-555, 2006.
- [160] Ben QW, Wang JC, Liu J, Zhu Y, Yuan F, Yao WY, u. a. Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 17: 2213-2221, 2010.
- [161] Gast D, Riedle S, Kiefel H, Muerköster SS, Schäfer H, Schäfer MK, u. a. The RGD integrin binding site in human L1-CAM is important for nuclear signaling. *Exp Cell Res* 314: 2411-2418, 2008.
- [162] Gast D, Riedle S, Riedle S, Schabath H, Schlich S, Schneider A, u. a. L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 115: 658-665, 2005.
- [163] Hai J, Zhu CQ, Bandarchi B, Wang YH, Navab R, Shepherd FA, u. a. L1 cell adhesion molecule promotes tumorigenicity and metastatic potential in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 18: 1914-1924, 2012.
- [164] Hung S-C, Wu I-H, Hsue S-S, Liao C-H, Wang H-C, Chuang P-H, u. a. Targeting I1 cell adhesion molecule using lentivirus-mediated short hairpin RNA interference reverses aggressiveness of oral squamous cell carcinoma. *Mol Pharm* 7: 2312-2323, 2010.
- [165] Zhang H, Wong CC, Wei H, Gilkes DM, Korangath P, Chaturvedi P, u. a. HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene* 31: 1757-1770, 2012.
- [166] Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T, u. a. Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res* 67: 7703-7712, 2007.
- [167] Gavert N, Ben-Shmuel A, Lemmon V, Brabletz T, Ben-Ze'ev A. Nuclear factor- $\kappa$ B signaling and ezrin are essential for L1-mediated metastasis of colon cancer cells. *J Cell Sci* 123: 2135-2143, 2010.
- [168] Gavert N, Vivanti A, Hazin J, Brabletz T, Ben-Ze'ev A. L1-mediated colon cancer cell metastasis does not require changes in EMT and cancer stem cell markers. *Mol Cancer Res* 9: 14-24, 2011.
- [169] Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze H-J, Brunner G, u. a. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* 38: 1708-1716, 2002.
- [170] Arlt MJ, Novak-Hofer I, Gast D, Gschwend V, Moldenhauer G, Grünberg J, u. a. Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment. *Cancer Res* 66: 936-943, 2006.
- [171] Fischer E, Grünberg J, Cohrs S, Hohn A, Waldner-Knogler K, Jeger S, u. a. L1-CAM-targeted antibody therapy and (177)Lu-radioimmunotherapy of disseminated ovarian cancer. *Int J Cancer* 130: 2715-2721, 2012.

- [172] Bao S, Wu Q, Li Z, Sathornsumetee S, Wang H, McLendon RE, u. a. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res* 68: 6043-6048, 2008.
- [173] Cheng L, Wu Q, Huang Z, Guryanova OA, Huang Q, Shou W, u. a. L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. *EMBO J* 30: 800-813, 2011.
- [174] Nakata S, Campos B, Bageritz J, Bermejo JL, Becker N, Engel F, u. a. LGR5 is a marker of poor prognosis in glioblastoma and is required for survival of brain cancer stem-like cells. *Brain Pathol* 23: 60-72, 2013.
- [175] Deonarain MP, Kousparou CA, Epenetos AA. Antibodies targeting cancer stem cells: a new paradigm in immunotherapy? *mAbs* 1: 12-25, 2009.
- [176] Huang Z, Cheng L, Guryanova OA, Wu Q, Bao S. Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell* 1: 638-655, 2010.
- [177] Schatton T, Frank NY, Frank MH. Identification and targeting of cancer stem cells. *BioEssays* 31: 1038-1049, 2009.
- [178] Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516, 2001.
- [179] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839, 2003.
- [180] Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta* 1803: 20-28, 2010.
- [181] Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1755: 37-69, 2005.
- [182] Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, u. a. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science* 284: 1667-1670, 1999.
- [183] Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Wachter MP, Margulies IM, Liotta LA. The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *J Biol Chem* 264: 1353-1356, 1989.
- [184] Stetler-Stevenson WG, Talano JA, Gallagher ME, Kruttsch HC, Liotta LA. Inhibition of human type IV collagenase by a highly conserved peptide sequence derived from its prosegment. *Am J Med Sci* 302: 163-170, 1991.
- [185] Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 364-368, 1990.
- [186] Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5578-5582, 1990.



- [187] Bányai L, Patthy L. Evidence for the involvement of type II domains in collagen binding by 72 kDa type IV procollagenase. *FEBS Lett* 282: 23-25, 1991.
- [188] Steffensen B, Wallon UM, Overall CM. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem* 270: 11555-11566, 1995.
- [189] Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Tryggvason K. Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7414-7419, 2002.
- [190] Overall CM, Tam E, McQuibban GA, Morrison C, Wallon UM, Bigg HF, u. a. Domain interactions in the gelatinase A.TIMP-2.MT1-MMP activation complex. The ectodomain of the 44-kDa form of membrane type-1 matrix metalloproteinase does not modulate gelatinase A activation. *J Biol Chem* 275: 39497-39506, 2000.
- [191] Mook ORF, Frederiks WM, Van Noorden CJF. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1705: 69-89, 2004.
- [192] Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 87: 287-297, 2005.
- [193] Hanemaaijer R, Verheijen JH, Maguire TM, Visser H, Toet K, McDermott E, u. a. Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. *Int J Cancer* 86: 204-207, 2000.
- [194] Emmert-Buck MR, Roth MJ, Zhuang Z, Campo E, Rozhin J, Sloane BF, u. a. Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples. *Am J Pathol* 145: 1285-1290, 1994.
- [195] Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M. Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 64: 355-359, 1995.
- [196] Nagel H, Laskawi R, Wahlers A, Hemmerlein B. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and -3 in benign and malignant tumours of the salivary gland. *Histopathology* 44: 222-231, 2004.
- [197] Määttä M, Soini Y, Liakka A, Autio-Harmanen H. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical prognosis. *Clin Cancer Res* 6: 2726-2734, 2000.
- [198] Allgayer H, Babic R, Beyer BC, Grützner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, u. a. Prognostic relevance of MMP-2 (72-kD collagenase IV) in gastric cancer. *Oncology* 55: 152-160, 1998.
- [199] Schmalfeldt B, Prechtel D, Härting K, Späthe K, Rutke S, Konik E, u. a. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 7: 2396-2404, 2001.

- [200] Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, u. a. MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma – a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. *Gynecol Oncol* 73: 372-382, 1999.
- [201] Gerhards S, Jung K, Koenig F, Daniltchenko D, Hauptmann S, Schnorr D, u. a. Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. *Urology* 57: 675-679, 2001.
- [202] Väisänen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol* 186: 51-58, 1998.
- [203] Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik H, u. a. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer* 79: 1828-1835, 1999.
- [204] Parsons SL, Watson SA, Collins HM, Griffin NR, Clarke PA, Steele RJ. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy. *Br J Cancer* 78: 1495-1502, 1998.
- [205] Matsuyama Y, Takao S, Aikou T. Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J Surg Oncol* 80: 105-110, 2002.
- [206] Okada N, Ishida H, Murata N, Hashimoto D, Seyama Y, Kubota S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in bile as a marker of liver metastasis in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 212-216, 2001.
- [207] Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, u. a. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med* 10: 499-510, 2006.
- [208] Kenny HA, Kaur S, Coussens LM, Lengyel E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest* 118, 1367-1379, 2008.
- [209] Chetty C, Bhoopathi P, Joseph P, Chittivelu S, Rao JS, Lakka S. Adenovirus-mediated small interfering RNA against matrix metalloproteinase-2 suppresses tumor growth and lung metastasis in mice. *Mol Cancer Ther* 5: 2289-2299, 2006.
- [210] Tsung AJ, Kargiotis O, Chetty C, Lakka SS, Gujrati M, Spomar DG, u. a. Downregulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) utilizing adenovirus-mediated transfer of small interfering RNA (siRNA) in a novel spinal metastatic melanoma model. *Int J Oncol* 32: 557-564, 2008.
- [211] Kargiotis O, Chetty C, Gondi CS, Tsung AJ, Dinh DH, Gujrati M, u. a. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP-2 mRNA results in impaired invasion and tumor-induced angiogenesis, induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth in vivo in glioblastoma. *Oncogene* 27: 4830-4840, 2008.
- [212] Itoh Y, Ito A, Iwata K, Tanzawa K, Mori Y, Nagase H. Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface. *J Biol Chem* 273: 24360-24367, 1998.

- [213] Gondi CS, Talluri L, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. RNAi-mediated downregulation of MMP-2 activates the extrinsic apoptotic pathway in human glioma xenograft cells. *Int J Oncol* 35: 851-859, 2009.
- [214] Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays* 14: 455-463, 1992.
- [215] Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 73: 161-195, 1993.
- [216] Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89: 1260-1270, 1997.
- [217] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-174, 2002.
- [218] Giannelli G, Antonaci S. Gelatinases and their inhibitors in tumor metastasis: from biological research to medical applications. *Histol Histopathol* 17: 339-345, 2002.
- [219] Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1825: 29-36, 2012.
- [220] Gerhards S, Jung K, Koenig F, Daniltchenko D, Hauptmann S, Schnorr D, u. a. Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. *Urology* 57: 675-679, 2001.
- [221] Mannello F, Tonti G, Papa S. Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 5: 285-298, 2005.
- [222] Sadatmansoori S, MacDougall J, Khademi S, Cooke LS, Guarino L, Meyer EF, u. a. Construction, expression, and characterization of a baculovirally expressed catalytic domain of human matrix metalloproteinase-9. *Protein Expr Purif* 23: 447-452, 2001.
- [223] Collier IE, Krasnov PA, Strongin AY, Birkedal-Hansen H, Goldberg GI. Alanine scanning mutagenesis and functional analysis of the fibronectin-like collagen-binding domain from human 92-kDa type IV collagenase. *J Biol Chem* 267: 6776-6781, 1992.
- [224] Strongin AY, Collier IE, Krasnov PA, Genrich LT, Marmer BL, Goldberg GI. Human 92 kDa type IV collagenase: functional analysis of fibronectin and carboxyl-end domains. *Kidney Int* 43: 158-162, 1993.
- [225] Murphy G, Nguyen Q, Cockett MI, Atkinson SJ, Allan JA, Knight CG, u. a. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem* 269: 6632-6636, 1994.
- [226] O'Farrell TJ, Pourmotabbed T. The fibronectin-like domain is required for the type V and XI collagenolytic activity of gelatinase B. *Arch Biochem Biophys* 354: 24-30, 1998.
- [227] Pourmotabbed T. Relation between substrate specificity and domain structure of 92-kDa type IV collagenase. *Ann N Y Acad Sci* 732: 372-374, 1994.
- [228] Van den Steen PE, Van Aelst I, Hvidberg V, Piccard H, Fiten P, Jacobsen C, u. a. The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9

- bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J Biol Chem* 281: 18626-18637, 2006.
- [229] Roeb E, Schleinkofer K, Kernebeck T, Pötsch S, Jansen B, Behrmann I, u. a. The matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *J Biol Chem* 277: 50326-50332, 2002.
- [230] Kossakowska AE, Huchcroft SA, Urbanski SJ, Edwards DR. Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans. *Br J Cancer* 73: 1401-1408, 1996.
- [231] Lengyel E, Schmalfeldt B, Konik E, Späthe K, Härting K, Fenn A, u. a. Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 82: 291-298, 2001.
- [232] Sier CF, Kubben FJ, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R, u. a. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 74: 413-417.
- [233] Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, de Sousa-Canavez JM, Dall'Oglio MF, Passerotti CC, u. a. MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK underexpression is associated with prognosis in prostate cancer. *Int J Biol Markers* 26: 255-261, 2011.
- [234] Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, u. a. Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth. *Cancer Res* 63: 2454-2461, 2003.
- [235] London CA, Sekhon HS, Arora V, Stein DA, Iversen PL, Devi GR. A novel antisense inhibitor of MMP-9 attenuates angiogenesis, human prostate cancer cell invasion and tumorigenicity. *Cancer Gene Ther* 10: 823-832, 2003.
- [236] Kunigal S, Lakka SS, Gondi CS, Estes N, Rao JS. RNAi-mediated downregulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloprotease-9 in human breast cancer cells results in decreased tumor invasion, angiogenesis and growth. *Int J Cancer* 121: 2307-2316, 2007.
- [237] Kido A, Tsutsumi M, Iki K, Takahama M, Tsujiuchi T, Morishita T, u. a. Overexpression of matrix metalloproteinase (MMP)-9 correlates with metastatic potency of spontaneous and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO)-induced transplantable osteosarcomas in rats. *Cancer Lett* 137: 209-216, 1999.
- [238] Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103: 481-490, 2000.
- [239] Nicoud IB, Jones CM, Pierce JM, Earl TM, Matrisian LM, Chari RS, u. a. Warm hepatic ischemia-reperfusion promotes growth of colorectal carcinoma micrometastases in mouse liver via matrix metalloproteinase-9 induction. *Cancer Res* 67: 2720-2728, 2007.

- [240] Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, u. a. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2: 289-300, 2002.
- [241] Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R, u. a. Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* 17: 177-181, 1999.
- [242] Gerg M, Kopitz C, Schaten S, Tschukes A, Kahlert C, Stangl M, u. a. Distinct functionality of tumor cell-derived gelatinases during formation of liver metastases. *Mol Cancer Res* 6: 341-351, 2008.
- [243] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74, 1977.
- [244] Krüger A, Schirmacher V, von Hoegen P. Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of lacZ-labeled metastasized lymphoma cells. *Int J Cancer* 58: 275-284, 1994.
- [245] Krüger A, Schirmacher V, Khokha R. The bacterial lacZ gene: an important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev* 17: 285-294, 1998-1999.
- [246] Krüger A, Umansky V, Rocha M, Hacker HJ, Schirmacher V, von Hoegen P. Pattern and load of spontaneous liver metastasis dependent on host immune status studied with a lacZ transduced lymphoma. *Blood* 84: 3166-3174, 1994.
- [247] Hauser S, Bickel L, Weinspach D, Gerg M, Schäfer MK, Pfeifer M, u. a. Full-length L1CAM and not its  $\Delta 2\Delta 27$  splice variant promotes metastasis through induction of gelatinase expression. *PLoS One* 6: e18989, 2011.
- [248] Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM, u. a. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 23: 628-633, 1995.
- [249] Yee JK, Miyanochara A, LaPorte P, Bouic K, Burns JC, Friedmann T. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9564-9568, 1994.
- [250] Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, u. a. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47: 3239-3245, 1987.
- [251] Albini A, Benelli R. The chemoinvasion assay: a method to assess tumor and endothelial cell invasion and its modulation. *Nat Protoc* 2: 504-511, 2007.
- [252] Bondong S, Kiefel H, Hielscher T, Zeimet AG, Zeillinger R, Pils D, u. a. Prognostic significance of L1CAM in ovarian cancer and its role in constitutive NF- $\kappa$ B activation. *Ann Oncol* 23: 1795-1802, 2012.
- [253] Schäfer H, Geismann C, Heneweer C, Egberts JH, Korniienko O, Kiefel H, u. a. Myofibroblast-induced tumorigenicity of pancreatic ductal epithelial cells is L1CAM dependent. *Carcinogenesis* 33: 84-93, 2012.
- [254] Jackson AL, Linsley PS. Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet* 20: 521-524, 2004.

- [255] Rao DD, Senzer N, Cleary MA, Nemunaitis J. Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: what is slowing clinical development. *Cancer Gene Ther* 16: 807-809, 2009.
- [256] Hale JS, Li M, Lathia JD. The malignant social network: cell-cell adhesion and communication in cancer stem cells. *Cell Adhes Migr* 6: 346-355, 2012.
- [257] Li DM, Feng YM. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. *Breast Cancer Res Treat* 128: 7-21, 2011.
- [258] Makrilia N, Kollias A, Manolopoulos L, Syrigos K. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest* 27: 1023-1037, 2009.
- [259] Wolterink S, Moldenhauer G, Fogel M, Kiefel H, Pfeifer M, Lüttgau S, u. a. Therapeutic antibodies to human L1CAM: functional characterization and application in a mouse model for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 70: 2504-2515, 2010.
- [260] Wang Y, Loers G, Pan HC, Gouveia R, Zhao WJ, Shen YQ, u. a. Antibody fragments directed against different portions of the human neural cell adhesion molecule L1 act as inhibitors or activators of L1 function. *PloS One* 7: e52404, 2012.
- [261] Doberstein K, Harter PN, Haberkorn U, Bretz NP, Arnold B, Caretero R, u. a. Antibody therapy to human L1CAM in a transgenic mouse model blocks local tumor growth but induces EMT. *Int J Cancer* 136: E326-E339, 2015.
- [262] Magrini E, Villa A, Angiolini F, Doni A, Mazzarol G, Rudini N, u. a. Endothelial deficiency of L1 reduces tumor angiogenesis and promotes vessel normalization. *J Clin Invest* 124: 4335-4350, 2014.
- [263] Chen D, Zeng Z, Yang J, Ren C, Wang D, Wu W, u. a. L1cam promotes tumor progression and metastasis and is an independent unfavorable prognostic factor in gastric cancer. *J Hematol Oncol* 6: 43, 2013.
- [264] Guo X, Xiong L, Zou L, Sun T, Zhang J, Li H, u. a. L1 cell adhesion molecule overexpression in hepatocellular carcinoma associates with advanced tumor progression and poor patient survival. *Diagn Pathol* 7: 96, 2012.
- [265] Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Fidler IJ. A simple quantitative assay for studying the invasive potential of high and low human metastatic variants. *Cancer Lett* 38: 137-147, 1987.
- [266] Hulkower KI, Herber RL. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics* 3: 107-124, 2011.
- [267] Condeelis J, Singer RH, Segall JE. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 695-718, 2005.
- [268] Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res* 8: 629-642, 2010.
- [269] Yi YS, Baek KS, Cho JY. L1 cell adhesion molecule induces melanoma cell motility by activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Pharmazie* 69: 461-467, 2014.

- [270] Francia G, Cruz-Munoz W, Man S, Xu P, Kerbel RS. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat Rev Cancer* 11: 135-141, 2011.
- [271] Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 26: 513-523, 2005.
- [272] Welch DR. Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clin Exp Metastasis* 15: 272-306, 1997.
- [273] Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, u. a. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 60: 2541-2546, 2000.
- [274] Koop S, Schmidt EE, MacDonald IC, Morris VL, Khokha R, Grattan M, u. a. Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11080-11084, 1996.
- [275] Morris VL, Koop S, MacDonald IC, Schmidt EE, Grattan M, Percy D, u. a. Mammary carcinoma cell lines of high and low metastatic potential differ not in extravasation but in subsequent migration and growth. *Clin Exp Metastasis* 12: 357-367, 1994.
- [276] Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, u. a. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153: 865-873, 1998.
- [277] Zijlstra A, Mellor R, Panzarella G, Aimes RT, Hooper JD, Marchenko ND, u. a. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res* 62: 7083-7092, 2002.
- [278] Madsen CD, Sahai E. Cancer dissemination – lessons from leukocytes. *Dev Cell*. 20. Juli 2010;19(1):13–26.
- [279] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678-689, 2007.
- [280] Dippel V, Milde-Langosch K, Wicklein D, Schumacher U, Altevogt P, Oliveira-Ferrer L, u. a. Influence of L1-CAM expression of breast cancer cells on adhesion to endothelial cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 139: 107-121, 2013.
- [281] Issa Y, Nummer D, Seibel T, Muerköster SS, Koch M, Schmitz-Winnenthal F-H, u. a. Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration. *J Mol Med* 87: 99-112, 2009.
- [282] Voura EB, Ramjeesingh RA, Montgomery AM, Siu CH. Involvement of integrin  $\alpha\beta 3$  and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell* 12: 2699-2710, 2001.
- [283] Maddaluno L, Verbrugge SE, Martinoli C, Matteoli G, Chiavelli A, Zeng Y, u. a. The adhesion molecule L1 regulates transendothelial migration and trafficking of dendritic cells. *J Exp Med* 206: 623-635, 2009.

- [284] Naumov GN, MacDonald IC, Weinmeister PM, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Wilson SM, u. a. Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. *Cancer Res* 62: 2162-2168, 2002.
- [285] Varghese HJ, Davidson MTM, MacDonald IC, Wilson SM, Nadkarni KV, Groom AC, u. a. Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases. *Cancer Res* 62: 887-891, 2002.
- [286] Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2: 563-572, 2002.
- [287] Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 133: 571-573, 1889.
- [288] Langley RR, Fidler IJ. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev* 28: 297-321, 2007.
- [289] Valiente M, Obenauf AC, Jin X, Chen Q, Zhang XH, Lee DJ, u. a. Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell* 156: 1002-1016, 2014.
- [290] Sebens Mürköster S, Werbing V, Sipos B, Debus MA, Witt M, Grossmann M, u. a. Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Oncogene* 26: 2759-2768, 2007.
- [291] Stoeck A, Gast D, Sanderson MP, Issa Y, Gutwein P, Altevogt P. L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 104: 461-469, 2007.
- [292] Sung SY, Wu IH, Chuang PH, Petros JA, Wu HC, Zeng HJ, u. a. Targeting L1 cell adhesion molecule expression using liposome-encapsulated siRNA suppresses prostate cancer bone metastasis and growth. *Oncotarget* 5: 9911-9929, 2014.
- [293] Chetty C, Vanamala SK, Gondi CS, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells. *Cell Signal* 24: 549-559, 2012.
- [294] Dufour A, Sampson NS, Zucker S, Cao J. Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration. *J Cell Physiol* 217: 643-651, 2008.
- [295] Dufour A, Zucker S, Sampson NS, Kuscu C, Cao J. Role of matrix metalloproteinase-9 dimers in cell migration: design of inhibitory peptides. *J Biol Chem* 285: 35944-35956, 2010.
- [296] Krüger A, Arlt MJE, Gerg M, Kopitz C, Bernardo MM, Chang M, u. a. Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res* 65: 3523-3526, 2005.
- [297] Kiefel H, Pfeifer M, Bondong S, Hazin J, Altevogt P. Linking L1CAM-mediated signaling to NF- $\kappa$ B activation. *Trends Mol Med* 17: 178-187, 2011.
- [298] Kulahin N, Li S, Hinsby A, Kiselyov V, Berezin V, Bock E. Fibronectin type III (FN3) modules of the neuronal cell adhesion molecule L1 interact directly with the fibroblast growth factor (FGF) receptor. *Mol Cell Neurosci* 37: 528-536, 2008.



- [299] Thelen K, Kedar V, Panicker AK, Schmid R-S, Midkiff BR, Maness PF. The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J Neurosci* 22: 4918-4931, 2002.
- [300] Bechara A, Nawabi H, Moret F, Yaron A, Weaver E, Bozon M, u. a. FAK-MAPK-dependent adhesion disassembly downstream of L1 contributes to semaphorin3A-induced collapse. *EMBO J* 27: 1549-1562, 2008.
- [301] Mohanan V, Temburni MK, Kappes JC, Galileo DS. L1CAM stimulates glioma cell motility and proliferation through the fibroblast growth factor receptor. *Clin Exp Metastasis* 30: 507-520, 2013.
- [302] Islam R, Kristiansen LV, Romani S, Garcia-Alonso L, Hortsch M. Activation of EGF receptor kinase by L1-mediated homophilic cell interactions. *Mol Biol Cell* 15: 2003-2012, 2004.
- [303] Silletti S, Yebra M, Perez B, Cirulli V, McMahon M, Montgomery AM. Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. *J Biol Chem* 279: 28880-28888, 2004.
- [304] Lee SJ, Bae SS, Kim KH, Lee WS, Rhim BY, Hong KW, u. a. High glucose enhances MMP-2 production in adventitial fibroblasts via Akt1-dependent NF-kappaB pathway. *FEBS Lett* 581: 4189-4194, 2007.
- [305] Hsieh YS, Chu SC, Yang SF, Chen PN, Liu YC, Lu KH. Silibinin suppresses human osteosarcoma MG-63 cell invasion by inhibiting the ERK-dependent c-Jun/AP-1 induction of MMP-2. *Carcinogenesis* 28: 977-987, 2007.
- [306] Iizumi M, Bandyopadhyay S, Pai SK, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, u. a. RhoC promotes metastasis via activation of the Pyk2 pathway in prostate cancer. *Cancer Res* 68: 7613-7620, 2008.
- [307] Ito H, Duxbury M, Benoit E, Clancy TE, Zinner MJ, Ashley SW, u. a. Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res* 64: 7439-7446, 2004.
- [308] Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, u. a. L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol* 25: 9040-9053, 2005.
- [309] Riedle S, Kiefel H, Gast D, Bondong S, Wolterink S, Gutwein P, u. a. Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *Biochem J* 420: 391-402, 2009.
- [310] Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* 138: 3593-3612, 2011.
- [311] Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S, u. a. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 155: 661-673, 2001.
- [312] Kiefel H, Bondong S, Erbe-Hoffmann N, Hazin J, Riedle S, Wolf J, u. a. L1CAM-integrin interaction induces constitutive NF-kB activation in pancreatic adenocarcinoma cells by enhancing IL-1 $\beta$  expression. *Oncogene* 29: 4766-4778, 2010.

- [313] Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Fässler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 20-31, 2006.
- [314] Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* 18: 516-523, 2006.
- [315] Felix M, Guyot M-C, Isler M, Turcotte RE, Doyon J, Khatib A-M, u. a. Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF- $\kappa$ B in human osteosarcoma. *Clin Sci* 110, 645-654, 2006.
- [316] O-charoenrat P, Wongkajornsilp A, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Signaling pathways required for matrix metalloproteinase-9 induction by betacellulin in head-and-neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 111: 174-183, 2004.
- [317] Yang M, Li Y, Chilukuri K, Brady OA, Boulos MI, Kappes JC, u. a. L1 stimulation of human glioma cell motility correlates with FAK activation. *J Neurooncol* 105: 27-44, 2011.
- [318] Zander H, Rawnaq T, von Wedemeyer M, Tachezy M, Kunkel M, Wolters G, u. a. Circulating levels of cell adhesion molecule L1 as a prognostic marker in gastrointestinal stromal tumor patients. *BMC Cancer* 11: 189, 2011.
- [319] Doberstein K, Pfeilschifter J, Gutwein P. The transcription factor PAX2 regulates ADAM10 expression in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 32: 1713-1723, 2011.
- [320] Lee SB, Schramme A, Doberstein K, Dummer R, Abdel-Bakky MS, Keller S, u. a. ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma. *J Invest Dermatol* 130: 763-773, 2010.
- [321] McGowan PM, Ryan BM, Hill ADK, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression. *Clin Cancer Res* 13: 2335-2343, 2007.
- [322] Merchant NB, Voskresensky I, Rogers CM, Lafleur B, Dempsey PJ, Graves-Deal R, u. a. TACE/ADAM-17: a component of the epidermal growth factor receptor axis and a promising therapeutic target in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14: 1182-1191, 2008.
- [323] Stoeck A, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F, u. a. A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 393: 609-618, 2006.
- [324] Nayeem N, Silletti S, Yang X, Lemmon VP, Reisfeld RA, Stallcup WB, u. a. A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J Cell Sci* 112: 4739-4749, 1999.
- [325] Matsumoto-Miyai K, Ninomiya A, Yamasaki H, Tamura H, Nakamura Y, Shiosaka S. NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23: 7727-7736, 2003.
- [326] Lutz D, Loers G, Kleene R, Oezen I, Kataria H, Katagihallimath N, u. a. Myelin basic protein cleaves cell adhesion molecule L1 and promotes neuritogenesis and cell survival. *J Biol Chem* 289: 13503-13518, 2014.
- [327] Kalus I, Schnegelsberg B, Seidah NG, Kleene R, Schachner M. The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic

- processing of the neural adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 278: 10381-10388, 2003.
- [328] Kuhn P-H, Koroniak K, Hogl S, Colombo A, Zeitschel U, Willem M, u. a. Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO J* 31: 3157-3168, 2012.
- [329] Lutz D, Wolters-Eisfeld G, Schachner M, Kleene R. Cathepsin E generates a sumoylated intracellular fragment of the cell adhesion molecule L1 to promote neuronal and Schwann cell migration as well as myelination. *J Neurochem* 128: 713-724, 2014.
- [330] Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, u. a. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9182-9187, 2005.
- [331] Pan Y, Han C, Wang C, Hu G, Luo C, Gan X, u. a. ADAM10 promotes pituitary adenoma cell migration by regulating cleavage of CD44 and L1. *J Mol Endocrinol* 49: 21-33, 2012.
- [332] Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, u. a. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 24: 742-752, 2005.
- [333] Brouxhon SM, Kyrkanides S, Teng X, Athar M, Ghazizadeh S, Simon M, u. a. Soluble E-cadherin: a critical oncogene modulating receptor tyrosine kinases, MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling. *Oncogene* 33: 225-235, 2014.
- [334] Conacci-Sorrell M, Kaplan A, Raveh S, Gavert N, Sakurai T, Ben-Ze'ev A. The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation. *Cancer Res* 65: 11605-11612, 2005.
- [335] Craig SEL, Brady-Kalnay SM. Cancer cells cut homophilic cell adhesion molecules and run. *Cancer Res* 71: 303-309, 2011.
- [336] Reiss K, Ludwig A, Saftig P. Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacol Ther* 111: 985-1006, 2006.
- [337] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30: 255-289, 2014.
- [338] Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21: 575-581, 2009.
- [339] Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 893-905, 2002.
- [340] Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16: 415-421, 2004.
- [341] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* 78:838-848, 2010.

- [342] D'Souza-Schorey C, Clancy JW. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev* 26: 1287-1299, 2012.
- [343] Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol* 33: 455-467, 2011.
- [344] Keller S, Ridinger J, Rupp A-K, Janssen JWG, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med* 9: 86, 2011.
- [345] Keller S, König A-K, Marmé F, Runz S, Wolterink S, Koensgen D, u. a. Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett* 278: 73-81, 2009.
- [346] Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, u. a. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18: 883-891, 2012.
- [347] Mears R, Craven RA, Hanrahan S, Totty N, Upton C, Young SL, u. a. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4: 4019-4031, 2004.
- [348] Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* 107: 102-108, 2006.
- [349] Shimoda M, Khokha R. Proteolytic factors in exosomes. *Proteomics* 13: 1624-1636, 2013.
- [350] Choi DS, Lee JM, Park GW, Lim HW, Bang JY, Kim YK, u. a. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *J Proteome Res* 6: 4646-4655, 2007.
- [351] Escrevente C, Morais VA, Keller S, Soares CM, Altevogt P, Costa J. Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1780: 905-913, 2008.
- [352] Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Gast D, Joumaa S, u. a. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J* 17: 292-294, 2003.
- [353] Gutwein P, Stoeck A, Riedle S, Gast D, Runz S, Condon TP, u. a. Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 11: 2492-2501, 2005.
- [354] Runz S, Keller S, Rupp C, Stoeck A, Issa Y, Koensgen D, u. a. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecol Oncol* 107: 563-571, 2007.
- [355] Ginestra A, Monea S, Seghezzi G, Dolo V, Nagase H, Mignatti P, u. a. Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Biol Chem* 272: 17216-17222, 1997.
- [356] Dolo V, Ginestra A, Cassarà D, Violini S, Lucania G, Torrisi MR, u. a. Selective localization of matrix metalloproteinase 9,  $\beta$ 1 integrins, and human lymphocyte

- antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res* 58: 4468-4474, 1998.
- [357] Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, u. a. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res* 71: 5346-5356, 2011.
- [358] Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, Panaro MA, Mitolo V, Freyssinet JM, u. a. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res* 69: 785-793, 2009.
- [359] Hakulinen J, Sankkila L, Sugiyama N, Lehti K, Keski-Oja J. Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *J Cell Biochem* 105: 1211-1218, 2008.
- [360] Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, u. a. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol* 6: 507-514, 2004.
- [361] McCreedy J, Sims JD, Chan D, Jay DG. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 10: 294, 2010.
- [362] Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, u. a. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 113: 752-760, 2005.
- [363] Chen G, Zhang Y, Wu X. 786-0 Renal cancer cell line-derived exosomes promote 786-0 cell migration and invasion in vitro. *Oncol Lett* 7: 1576-1580, 2014.
- [364] Cai Z, Yang F, Yu L, Yu Z, Jiang L, Wang Q, u. a. Activated T cell exosomes promote tumor invasion via Fas signaling pathway. *J Immunol* 188: 5954-5961, 2012.
- [365] Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, u. a. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 151: 1542-1556, 2012.
- [366] Shimoda M, Principe S, Jackson HW, Luga V, Fang H, Molyneux SD, u. a. Loss of the Timp gene family is sufficient for the acquisition of the CAF-like cell state. *Nat Cell Biol* 16: 889-901, 2014.
- [367] Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 11: 108, 2011.
- [368] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res* 1: 98-110, 2011.
- [369] Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, u. a. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ* 15: 80-88, 2008.

## 8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung der metastatischen Kaskade für die Metastasierung solider Tumoren
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von L1CAM
- Abbildung 3:** Vektorkarte und Sequenz der *Multiple cloning site* (MCS) mit den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI des retroviralen shRNA-Expressionsplasmids pSiren-RetroQ.
- Abbildung 4.:** Tumorzell-L1CAM ist ein wichtiger Regulator des metastatischen Potentials *in vitro*.
- Abbildung. 5:** Von Tumorzellen exprimiertes L1CAM ist ein wichtiger Regulator des metastatischen Potentials *in vivo* und invers korreliert mit dem Überleben der Mäuse.
- Abbildung 6:** X-Gal-Färbungen einer Tumorzell-freien Leber als Negativkontrolle für die X-Gal-gefärbten, Tumorzellen-tragenden Lebern und X-Gal-Färbungen von Kryoschnitten eines Primärtumors und einer Leber aus dem spontanen Metastasierungsexperiment.
- Abbildung 7:** L1CAM ist notwendig für das metastatische Auswachsen und die Proliferation von Tumorzellen in der Leber.
- Abbildung 8:** L1CAM korreliert mit erhöhter Expression von Matrix-Metalloproteinasen *in vitro* und gelatinolytischer Aktivität *in vivo*.
- Abbildung 9:** Spezifische Inhibition von MMP-2 und MMP-9 mit dem spezifischen Gelatinase-Inhibitor SB-3CT ähnelt dem Phänotyp des L1CAM-*Knockdown*.
- Abbildung 10:** L1CAM reguliert das metastatische Potential von Ovarialkarzinomzellen positiv.
- Abbildung 11:** Der Effekt von Tumorzell-L1CAM auf das metastatische Potential von L-CI5s-Zellen und die Gelatinase-Expression *in vitro* wurde durch eine zweite shRNA bestätigt.
- Abbildung 12:** Der Effekt von Tumorzell-L1CAM auf das metastatische Potential von Ovarialkarzinomzellen *in vitro* wurde durch eine zweite shRNA bestätigt.

## 9 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Für die TaqMan®-Analyse mittels Universal ProbeLibrary verwendete Sonden und Primer
- Tabelle 2:** Verwendete Primärantikörper
- Tabelle 3:** Verwendete Sekundärantikörper
- Tabelle 4:** Verwendete Medien und Zellkulturlösungen
- Tabelle 5:** Für die Kultivierung von Bakterien verwendete Medien und Lösungen
- Tabelle 6:** Für die X-Gal-Färbungen und IHC-Färbungen verwendete Lösungen
- Tabelle 7:** Für die Gelelektrophorese verwendete Lösungen
- Tabelle 8:** Für die SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting verwendete Lösungen
- Tabelle 9:** DNA- und Protein-Größenstandards
- Tabelle 10:** Kits für die Aufreinigung von RNA und DNA, Kits und Assays für RT-PCR und qRT-PCR
- Tabelle 11:** Weitere verwendete Chemikalien
- Tabelle 12:** Verwendete Verbrauchsmaterialien
- Tabelle 13:** Verwendete Laborgeräte
- Tabelle 14:** Verwendete Software

## 10 Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
ALCAM	<i>Activated leukocyte adhesion molecule</i>
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
AP-2	<i>Accessory protein-2</i>
BACE1	<i>β-site of APP cleaving enzyme</i>
BM	Basalmembran
CAM	<i>Cell adhesion molecule</i>
cDNA	codogene DNA
CHL1	<i>Close homolog of L1</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CRASH	<i>Corpus callosum, retardation, adducted thumbs, spastic paraplegia and hydrocephalus</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DQ <sup>TM</sup> -Gelatine	Farbstoff-gelöschte Gelatine (engl. <i>dye-quenched gelatin</i> )
DTCs	<i>Disseminated tumor cells</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMMPRIN,	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer, Basigin</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
EOC	<i>Epithelial ovarian carcinoma</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERM	<i>Ezrin, Radixin, Moesin</i> (Proteinfamilie)
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>



FL-L1CAM	<i>Full-length L1CAM</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
H&E	Hämatoxylin & Eosin
Hsp90 $\alpha$	<i>Heat shock protein 90<math>\alpha</math></i>
i.d.	intradermal
Ig	Immunoglobulin
IgSF	Immunoglobulin-Superfamilie
IgSF CAMs	<i>Immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules</i>
IL(-1 $\beta$ )	Interleukin-1 $\beta$
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
IL-1RI	Interleukin-1-Rezeptor Typ I
kDa	Kilodalton
L	Liter
L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i>
L1cyt	zytoplasmatischen Domäne von L1CAM
L1ecto	lösliche Ektodomäne von L1CAM
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MASA	<i>Mental retardation, aphasia, shuffling gait, adducted thumbs</i>
MBC	<i>Myelin basic protein</i>
MDSCs	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mM	millimol/L,
$\mu$ m	micrometer
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT-MMPs	Membran-Typ MMP
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
Ng-CAM	<i>Neuron glia cell adhesion molecule</i>
nm	Nanometer
Nr-CAM	<i>NgCAM-related cell adhesion molecule</i>

PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
Plg	Plasminogen
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RIP	Regulierte Intramembranproteolyse
RanBPM	<i>Ran binding protein M</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
shRNAs	<i>short hairpin RNAs</i>
shscr	<i>scrambled shRNA</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SV-L1CAM	<i>Splice variant-L1CAM</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
Zn	Zink

## 11 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Achim Krüger* für die Möglichkeit diese Dissertation unter seiner Anleitung durchzuführen. Seine außerordentliche engagierte Betreuung, seine vielfältige Unterstützung in jeglicher Hinsicht, jedoch vor allem beim Erstellen von Manuskripten für Veröffentlichungen, und die vielen kritischen und fruchtbaren Diskussionen trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Ebenso möchte ich ihm für die Inokulation der Tumorzellen danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn *Prof. Dr. Aymelt Itzen* für seine Unterstützung und seine Betreuung auf Seiten der Naturwissenschaftlichen Fakultät der TU München bedanken, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit am Klinikum rechts der Isar der TU München nicht möglich gewesen wäre. Ebenso möchte ich mich bei Herrn *Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler* für die Übernahme des Mentorats bedanken.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn *Prof. Peter Altevogt* für die vielfältige Unterstützung, die großzügige Bereitstellung der anti-L1CAM-Antikörper und die vielen fruchtbaren Diskussionen, die enorm zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau *Dr. Susanne Schaten* bin ich für die exzellente Einführung in die Techniken der Immunhistologie, sowie für ihre fachlichen Ratschläge und ihre Unterstützung bei der Durchführung immunhistochemischer Experimente sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau *Katja Honert* für ihre Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Experimente und das Ertragen meiner Launen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Bastian Seubert*, der mir während der letzten zwei Jahre meiner Doktorandenzeit in vielfältiger Weise zur Seite gestanden hat. Auch unsere gemeinsamen Schreibtage in der Bibliothek werden mir in guter Erinnerung bleiben.

Frau *Barbara Grünwald* und Frau *Haissi Cui* danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der *in vivo* Versuche sowie für die vielen Diskussionen – während und außerhalb der Arbeitszeit –, die die Doktorandenzeit enorm bereichert haben.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Krüger für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt vor allem auch Frau *Edelburga Hammerschmidt* für die vielfältige Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen. Frau *Brigitte Kätzel* gilt mein besonderer Dank für die Hilfe bei allen organisatorischen Problemen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn *Prof. Dr. Gänsbacher* für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen, bedanken. Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung für die freundliche Aufnahme und gute Arbeitsatmosphäre während der gesamten Zeit.

Besonders bin ich meinen Eltern *Annelie* und *Bernd Weinspach* für ihre Unterstützung dankbar, ohne die mein bisheriger Weg nicht möglich gewesen wäre.

## **Anhang**

## Eigene Publikationen

**Weinspach D**, Seubert B, Schaten S, Honert K, Sebens S, Altevogt P, Krüger A. Role of L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in the metastatic cascade: Promotion of dissemination, colonization, and metastatic growth. Clin Exp Metastasis 31: 87-100, 2014.

Hauser S, Bickel L, **Weinspach D**, Gerg M, Schäfer MK, Pfeifer M, Hazin J, Schelter F, Weidle UH, Ramser J, Volkmann J, Meindl A, Schmitt M, Schrötzlmair F, Altevogt P, Krüger A. Full-length L1CAM and not its  $\Delta 2\Delta 27$  splice variant promotes metastasis through induction of gelatinase expression. PLoS ONE 6: e18989, 2011.

## Konferenzen

Full-length L1CAM and not its  $\Delta 2\Delta 27$  splice variant promotes metastasis through induction of gelatinase expression. 27<sup>th</sup> Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers, Südtirol, Italien, 2010.