

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung

Die neuronale *full-length* Isoform des Zelladhäsionsmoleküls  
L1 und nicht die alternativ gespleißte L1 $\Delta$ (2,27) Isoform  
erhöht das metastatische Potenzial von Tumorzellen

Laura Theresa Bickel

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

Doktors der Medizin (Dr. med.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. A. Krüger  
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 24.09.2010 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.02.2011 angenommen.

Für meine Familie und Freunde

*Man muss das Unmögliche versuchen,  
um das Mögliche zu erreichen.*

Hermann Hesse

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	- 1 -
2	Einleitung .....	- 2 -
2.1	Definition des Tumorbegriffs.....	- 2 -
2.2	Invasion und Metastasierung.....	- 3 -
2.3	Identifikation von Zielmolekülen antimetastatischer Therapien.....	- 7 -
2.4	Die Bedeutung von Zelladhäsionsmolekülen bei der Metastasierung .....	- 7 -
2.5	Die Bedeutung von Spleißvarianten in der Tumordiagnostik und Tumorprogression.....	- 9 -
2.6	Die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls L1 in der Tumorprogression.....	- 10 -
2.7	Die biologischen Funktionen der Exons 2 und 27 des L1 Zelladhäsionsmoleküls .....	- 12 -
3	Zielsetzung der Arbeit .....	- 15 -
4	Material und Methoden .....	- 16 -
4.1	Versuchstiere.....	- 16 -
4.2	Metastasierungsmodelle.....	- 16 -
4.2.1	SKOV3 <i>Xenograft</i> -Metastasierungsmodell .....	- 16 -
4.2.2	HT1080 <i>Xenograft</i> -Metastasierungsmodell.....	- 17 -
4.2.3	L-CI.5s Metastasierungsmodell .....	- 17 -
4.2.4	X-Gal Färbung von Organen .....	- 18 -
4.3	Zellexperimentelle Methoden .....	- 19 -
4.3.1	Verwendete Zelllinien.....	- 19 -
4.3.2	Zellkulturmedien.....	- 20 -
4.3.3	Kultivierung von Zellen.....	- 20 -
4.3.4	Bestimmung der Zellzahl.....	- 20 -
4.3.5	Kotransfektion von 293T-Zellen zur Herstellung retroviraler Zellkulturüberstände und Gewinnung retroviraler Zellkulturüberstände.....	- 21 -
4.3.6	Transduktion adhärenter Zellen .....	- 21 -
4.3.7	Transduktion von Suspensionszellen.....	- 22 -
4.3.8	Selektion nach viraler Transduktion .....	- 22 -
4.3.9	Herstellung von Zelllinien durch <i>limiting dilution</i> .....	- 22 -
4.3.10	Proliferationsassays .....	- 23 -
4.3.11	Boyden-Chamber-Invasionsassay.....	- 23 -
4.4	Molekularbiologische Methoden.....	- 24 -
4.4.1	Verwendeter Bakterienstamm.....	- 24 -
4.4.2	Verwendete cDNAs .....	- 24 -
4.4.3	Hergestellte und verwendete Plasmide .....	- 25 -
4.4.4	Konstruktion von hairpin siRNAs .....	- 30 -
4.4.5	Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA .....	- 30 -
4.4.6	DNA-Isolierung aus Bakterien .....	- 31 -
4.4.7	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren .....	- 32 -
4.4.8	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	- 33 -

4.4.9	Agarose-Gelelektrophorese .....	- 33 -
4.4.10	Separation und Reinigung von DNA Fragmenten mittels Präparativer Gele und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	- 34 -
4.4.11	Auffüllen von DNA-Überhängen ( <i>blunt-end</i> Reaktion) .....	- 34 -
4.4.12	Behandlung mit Alkalischer Phosphatase .....	- 34 -
4.4.13	DNA-Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) und Ethanol-Fällung .....	- 35 -
4.4.14	Ligation von DNA-Fragmenten .....	- 35 -
4.4.15	Isolierung von RNA aus Zellen .....	- 35 -
4.4.16	Isolierung von RNA aus Gewebe .....	- 36 -
4.4.17	Reverse Transkription .....	- 36 -
4.4.18	<i>Real Time</i> -Polymerasekettenreaktion (TaqMan <sup>TM</sup> -RT-PCR) .....	- 37 -
4.5	Proteinbiochemische Verfahren .....	- 38 -
4.5.1	Isolierung von Proteinen aus Zellen .....	- 38 -
4.5.2	Proteinbestimmung mit BCA <sup>TM</sup> von Pierce .....	- 38 -
4.5.3	Western Blot Analyse .....	- 39 -
4.6	Statistische Analysen .....	- 40 -
5	Ergebnisse .....	- 41 -
5.1	Identifikation der neuronalen (FL-L1) und nicht-neuronalen L1CAM Variante (SV-L1) in humanen Gewebeproben von Metastasen ovariellen Ursprungs .....	- 41 -
5.1.1	Induktion der L1CAM Expression in <i>Omentum majus</i> Metastasen von Ovarialkarzinompatientinnen im Vergleich zum Kontrollgewebe .....	- 41 -
5.1.2	Überwiegender Anteil der L1CAM-Spleißvariante an der Gesamt-L1CAM-Expression in <i>Omentum majus</i> Metastasen des Ovarialkarzinoms .....	- 42 -
5.2	Signifikante Reduktion des <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Invasionspotentials der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip durch einen simultanen <i>knock down</i> der L1CAM Isoformen .....	- 43 -
5.2.1	Simultaner <i>knock down</i> von SV-L1CAM und FL-L1CAM in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip .....	- 43 -
5.2.2	Signifikante Reduktion der <i>in vitro</i> Invasion durch den <i>knock down</i> von L1CAM .....	- 45 -
5.2.3	Reduktion der experimentellen Lungenmetastasierung <i>in vivo</i> durch den simultanen <i>knock down</i> der L1CAM Varianten .....	- 46 -
5.2.4	Kein signifikanter Einfluss der Reduktion der endogenen L1CAM Expression auf die <i>in vitro</i> Proliferation der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip .....	- 47 -
5.3	Einfluss der L1CAM Spleißvariante und der L1 $\Delta$ 27 Variante auf das metastatische Potential der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip .....	- 48 -
5.3.1	Überexpression der L1CAM Spleißvariante und der L1 $\Delta$ 27 Variante in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip .....	- 48 -
5.3.2	Keine signifikant erhöhte Anzahl der Lungenmetastasen durch die Überexpression der Varianten SV-L1CAM und L1 $\Delta$ 27 in den Tumorzellen .....	- 49 -
5.4	Einfluss von neuronalem und nicht-neuronalem L1CAM auf das Metastasierungspotential der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 .....	- 51 -
5.4.1	Endogener L1CAM Expressionsspiegel der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip und der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 im Vergleich .....	- 51 -

5.4.2	Überexpression von der neuronalen L1CAM Variante und der L1CAM Spleißvariante in der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 .....	- 52 -
5.4.3	Einfluss der L1CAM Isoformen auf das metastatische Potential der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 bei der Metastasierung der Lunge .....	- 53 -
5.4.4	Einfluss der L1CAM Isoformen auf das metastatische Potential der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 bei der Metastasierung der Leber .....	- 55 -
5.5	Einfluss von neuronalem und nicht-neuronalem L1CAM auf das metastatische Potential der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s .....	- 56 -
5.5.1	Überexpression der neuronalen L1CAM Variante und der L1CAM Spleißvariante in der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s.....	- 56 -
5.5.2	Signifikante Erhöhung der experimentellen Metastasierung einer murinen T-Zell Lymphomzelllinie (L-CI.5s) durch die Expression von neuronalem L1CAM im Vergleich zur Kontrolle und zur L1CAM Spleißvariante.....	- 58 -
5.5.3	Keine signifikante Veränderung der <i>in vitro</i> Proliferation der T-Zell Lymphomzelllinie L-CI.5s durch die Expression von neuronalem und nicht-neuronalem L1CAM <i>in vitro</i> .....	- 59 -
6	Diskussion .....	- 61 -
6.1	Erhöhte Gesamt-L1CAM Expression in Ovarialkarzinommetastasen des <i>Omentum majus</i> im Vergleich zum Kontrollgewebe.....	- 61 -
6.2	Überwiegender Anteil der Tumorzell-assoziierten alternativ gespleißten Isoform des Zelladhäsionsmoleküls L1 an der Gesamt-L1CAM Expression in Ovarialkarzinommetastasen .....	- 62 -
6.3	Die endogene L1CAM Expression in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip fördert die Metastasierung.....	- 63 -
6.4	Das Vorhandensein der Exons 2 und 27 in der FL-L1CAM Isoform erhöht das metastatische Potential von Tumorzellen.....	- 64 -
7	Ausblick.....	- 68 -
8	Literaturverzeichnis .....	- 69 -
9	Abbildungsverzeichnis .....	- 77 -
10	Abkürzungsverzeichnis .....	- 79 -
11	Danksagung .....	- 80 -
12	Anhang .....	- 1 -

## 1 Zusammenfassung

Die Expression unterschiedlicher Spleißvarianten von Zelladhäsionsmolekülen in Tumoren hat einen bedeutenden Einfluss auf das maligne Potential von Tumorzellen. Von dem Zelladhäsionsmolekül L1 (L1CAM) sind bisher zwei sowohl physiologisch als auch pathologisch - in Nervengewebe und Tumorzellen - exprimierte Isoformen beschrieben. Die *full-length* Isoform von L1CAM (FL-L1) spielt insbesondere bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems eine bedeutende Rolle. Die alternativ gespleißte L1 $\Delta$ (2,27) Variante (SV-L1) wird hingegen überwiegend von Zellen außerhalb des zentralen Nervensystems und von Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs exprimiert. Derzeit ist das Zelladhäsionsmolekül L1 und seine Bedeutung in der Tumorprogression Gegenstand intensiver Forschung. In klinischen Studien wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die Expressionsspiegel von L1CAM in Primärtumoren unterschiedlichen Ursprungs mit einer ungünstigen Prognose von Tumorpatienten korrelieren. Bei diesen Untersuchungen wurde bisher jedoch nicht zwischen den beiden Isoformen des Zelladhäsionsmoleküls L1 unterschieden. In einer Orientierungsanalyse konnte in der hier vorliegenden Arbeit unter Verwendung von quantitativer RT-PCR mit Isoform-spezifischen Primern gezeigt werden, dass in Gewebeproben von Metastasen ovariellen Ursprungs deutlich mehr SV-L1 als FL-L1 exprimiert wurde. Daraufhin stellte sich die Frage dieser Arbeit: Inwiefern beeinflusst die Expression unterschiedlicher Isoformen des Zelladhäsionsmoleküls L1 das metastatische Potential von Tumorzellen? Zunächst wurde der metastasierungsfördernde Effekt des Zelladhäsionsmoleküls L1 in einem *Xenograft*-Metastasierungsmodell bestätigt, indem die endogene L1CAM mRNA Expression in einer humanen Ovarialkarzinomzelllinie, unter Verwendung der shRNAi-Technologie, supprimiert wurde. Um den Einfluss der physiologisch vorkommenden Varianten FL-L1 und SV-L1 im Hinblick auf die hämatogene Metastasierung getrennt zu untersuchen, wurden diese selektiv in Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs überexprimiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *full-length* L1CAM (FL-L1) und nicht die Tumorzell-assoziierte Spleißvariante (SV-L1) das metastatische Potential von Tumorzellen fördert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Suppression beider Isoformen das metastatische Potential von Tumorzellen reduziert. Da FL-L1 einen prometastatischen Effekt und SV-L1 keinen antimetastatischen Effekt aufwies, unterstützen die erhobenen Daten die Erwägung von L1CAM als therapeutisches Zielmolekül einer Antikörper-basierten Therapie von Krebspatienten.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Definition des Tumorbegriffs**

Eine Volumenzunahme eines Gewebes durch eine verstärkte, autonome Vermehrung von körpereigenen transformierten (entarteten) Zellen wird im engeren Sinne als Tumor (Syn. Neoplasie) bezeichnet. Der Begriff sagt nichts über das biologische bzw. klinische Verhalten - die Dignität - des Krankheitsherdes aus. Man differenziert zwischen gutartigen (benigen) und bösartigen (malignen) Tumoren. Benigne Tumoren wachsen langsam, expansiv-verdrängend und sind meist gut begrenzt. Durch die Tumormasse kommt es im umliegenden Gewebe häufig zu einer Druckatrophie und zur Kompression angrenzender anatomischer Strukturen (Böcker et al., 2004). Benigne Tumoren zeichnen sich durch einen hohen Differenzierungsgrad aus, d.h. sie haben ähnliche histologische und funktionelle Eigenschaften wie das Normalgewebe, aus dem sie hervorgegangen sind. Sie führen selten zu schwerwiegenden Komplikationen und können bei frühzeitiger Diagnostik und günstiger Lage chirurgisch entfernt werden. Maligne Tumoren wachsen lokal infiltrierend und sind zur Metastasierung befähigt. Unter der Metastasierung versteht man im Allgemeinen die Loslösung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor und die anschließende Besiedelung sekundärer Organe. Maligne Primärtumoren sind meist unscharf gegenüber dem umliegenden Normalgewebe abgegrenzt und gering differenziert, d.h. die Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe ist verloren gegangen (Böcker et al., 2004). Aufgrund der unscharfen Begrenzung und der früh eintretenden Tumorzell dissemination können maligne Tumoren durch chirurgische Exzision häufig nicht vollständig reseziert werden. Die Prognose von Krebspatienten ist somit abhängig von einer frühen Diagnosestellung. Da bei vielen malignen Tumorerkrankungen Frühsymptome fehlen, befinden sich viele Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bzw. zum Zeitpunkt der chirurgischen Therapie bereits im metastasierten Stadium ihrer Erkrankung (Steeg, 1992). Bei den malignen Tumoren unterscheidet man zwischen Karzinomen (epithelialen Ursprungs), Sarkomen (mesenchymalen Ursprungs) und den Tumoren des lymphatischen Systems. Die Mehrheit der Tumoren geht aus dem Epithelgewebe hervor (Karzinome), darunter Tumoren des Gastrointestinaltrakts, der Lunge, der Haut, der Brustdrüse, des Pankreas und des Ovars (Weinberg, 2007). Karzinome sind für über 80% der Krebstodesfälle in der westlichen Welt verantwortlich (Weinberg, 2007). Die restlichen malignen Tumoren gehen aus nicht-epithelialen Geweben hervor.

## 2.2 Invasion und Metastasierung

In Bezug auf den klinischen Verlauf und die klinische Symptomatik weisen Tumore ein heterogenes Krankheitsbild auf. Abhängig von der Primärtumorlokalisation und von der Dignität des Primärtumors, können Tumoren bei entsprechender therapeutischer Intervention mit einer normalen Lebenserwartung einhergehen, oder unabhängig von der Therapie zum baldigen Tod des Patienten führen. Ab einer gewissen Größe des Tumors kommt es durch die Kompression von angrenzenden anatomischen Strukturen und Hohlsystemen zur Beeinträchtigung wichtiger Organfunktionen. Geht der Primärtumor in ein infiltratives Wachstum über, kommt es zudem zur Zerstörung der normalen Gewebearchitektur. Prozentual gesehen sterben nur 10% der Krebspatienten an ihrem Primärtumor (Weigelt et al., 2005). Die restlichen 90% der Krebstodesfälle sind nicht auf das Primärtumorwachstum zurückzuführen, sondern vielmehr auf die Bildung von Metastasen (Weigelt et al., 2005). Als Metastase wird ein Krankheitsherd in Lymphknoten (Lymphknotenmetastasen) oder anderen Körpergeweben (Fern- oder Organmetastasen) bezeichnet. Metastasen entstehen aus Absiedelungen einzelner Tumorzellen aus einem malignen Primärtumor. Prinzipiell wird zwischen der Tumorausbreitung über die Lymphwege (lymphogene Metastasierung) und der Tumorausbreitung über das Blutgefäßsystem (hämatogene Metastasierung) unterschieden. Der Prozess der hämatogenen Metastasierung ist in seiner Gesamtheit sehr komplex und lässt sich in eine Abfolge von Einzelschritten (metastatische Kaskade) untergliedern. Die einzelnen Schritte der metastatischen Kaskade sind das Ablösen einzelner Zellen vom Gewebeverband des Primärtumors, das Durchbrechen der Basalmembran, die Interaktion der Tumorzellen mit Thrombozyten, Lymphozyten und weiteren Komponenten des Blutes, das Eintreten der Zellen in den Blutkreislauf, das Überleben der Zellen im Blutstrom, die Adhärenz von Tumorzellen am Endothel, das Durchdringen des Endothels der Blutgefäße sowie das Überleben und das Auswachsen der Tumorzellen in sekundären Zielorganen (Fidler, 2003, Weinberg, 2007). Dabei ist jeder dieser Schritte limitierend, d.h. prinzipiell kann an jedem dieser Schritte der gesamte Prozess der Metastasierung anhalten (Fidler, 2003). Zudem wurde in Tumormodellen gezeigt, dass die hämatogene Metastasierung ein ineffizienter Prozess ist. Selbst wenn in Tumormodellen einige Schritte der metastatischen Kaskade übersprungen werden und zur Metastasierung befähigte Krebszellen direkt in den Blutkreislauf gespritzt werden, etablieren nur 0,01% aller klonalen Tumorzellen metastatische Kolonien (Fidler, 1970). Der letzte Schritt der metastatischen Kaskade, das Auswachsen der Tumorzellen in sekundären Zielorganen, wird als einer der ineffizientesten Schritte der metastatischen Kaskade erachtet (Fidler, 2003). Da über 80% der lebensbedrohlichen Tumore epithelialen Ursprungs sind, soll

die metastatische Kaskade im folgenden Abschnitt am Beispiel von Karzinomen detaillierter beschrieben werden (Weinberg, 2007). Die Dissoziation (Loslösung der Tumorzellen vom Primärtumor und die lokale Invasion) ist ein Balanceakt von mehreren ihr zu Grunde liegenden Mechanismen. Dazu gehören die Auflösung von Zell-Zell Kontakten, der Abbau bzw. Umbau extrazellulärer Gewebematrix, sowie die aktive Bewegung von Tumorzellen in das angrenzende Gewebe (Nguyen et al., 2004). Eingeleitet wird der Prozess der Dissoziation durch die Herauslösung einzelner epithelialer Zellen aus dem Gewebeverband des Primärtumors (Böcker et al., 2004). Im Zuge der Dissoziation kommt es zu einer Änderung in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecule*; CAM). Beispielsweise wird E-Cadherin, ein CAM, welches die Tumorzell-Zell-Adhäsion vermittelt, vermindert exprimiert. N-Cadherin hingegen, welches die Zelladhäsion von Tumorzellen an das Stroma im Zuge der Invasion erleichtert, wird vermehrt exprimiert (Steege, 2006). In der Tumorigenese des Kolorektalkarzinoms kommt es schon in frühen Tumorstadien im Zuge der Entwicklung einer hochgradigen Dysplasie, zu einer verminderten Expression des im Normalgewebe exprimierten Zelladhäsionsmoleküls DCC (Johnson, 1991). In humanen Gewebeproben des Ovariakarzinoms wurde eine Assoziation zwischen der reduzierten Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin und einem niedrigem Differenzierungsgrad der Tumorzellen festgestellt (Voutilainen et al., 2006). Für adhären wachsende Zellen stellt der Verlust von Zell-Zell-Kontakten und von Zell-Matrix-Kontakten einen apoptotischen Reiz dar. Im Normalfall kommt es zu einer Sonderform der Apoptose, der sogenannten Anoikis, ein Prozess, der in metastasierenden Tumorzellen unterdrückt ist (Mehlen und Puisieux, 2006). Ein weiterer Schritt der Invasion ist der enzymatische Abbau (Degradation) von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM). Die EZM füllt als wesentlicher Bestandteil von Geweben den Raum zwischen den Zellen aus (Interzellularraum) und bietet eine Fixierungsmöglichkeit für die in ihr eingebetteten Zellen. Die EZM besteht hauptsächlich aus Hyaluronsäure, Proteoglykanen, den Glykoproteinen Fibronectin und Laminin und den Strukturproteinen Kollagen und Elastin (Welsch, 2002). Der Abbau der Bestandteile der EZM wird durch die Produktion von Proteasen, durch die Tumorzellen selbst und durch Zellen des angrenzenden Gewebes, ermöglicht. Zu den bedeutendsten Effektormolekülen der lokalen Invasion gehört die Gruppe der Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Diese werden hauptsächlich durch rekrutierte Stromazellen wie Makrophagen, Mastzellen und Fibroblasten sezerniert (Weinberg, 2007). MMPs induzieren zudem die Abspaltung löslicher Wachstumsfaktoren und fördern auf diese Weise die Invasion von Tumorzellen (Mimeault und Batra, 2007). Der Schritt der lokalen

Invasion ermöglicht es *in situ* Karzinomen die Basalmembran, eine Sonderform der EZM, welche hauptsächlich aus Kollagen Typ IV besteht, zu durchbrechen und folglich in einen malignen Zustand überzugehen. Im Zuge der lokalen Invasion spielt unter anderem die aktive Fortbewegung der Tumorzellen (Migration) über die Barriere der EZM eine bedeutende Rolle. Der Vorgang der Migration einzelner Tumorzellen kann schematisch in die Bildung von Ausstülpungen der Zelloberfläche (Pseudopodien), in die Dehnung der Zelle und in die Retraktion des hinteren Endes der Zelle untergliedert werden (Wolf und Friedl, 2006). Am führenden Ende der migrierenden Zelle kommt es zur Aggregation von extrazellulären Matrix-Rezeptoren, welche sich temporär an Komponenten des Stromas und der Basalmembran anheften können (Böcker et al., 2004). Als wichtigste Vertreter der Matrixrezeptoren sind die Gruppe der Integrine und der Hyaluronsäurerezeptor CD44 mit seinen Spleißvarianten zu nennen (Marhaba und Zöller, 2004; Wolf und Friedl, 2006). Beispielsweise bindet Integrin  $\alpha_6\beta_4$  das extrazelluläre Matrixprotein Laminin und ist zudem an der Ausbildung von onkogenen Rezeptortyrosinkinasen, darunter Met, der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR und erb2, beteiligt (Guo und Giancotti, 2004). Zusammenfassend kommt es im Zuge der Invasion zu einer Änderung der adhäsiven Eigenschaften und zu einer verstärkten migratorischen Aktivität von Tumorzellen sowie zu der Sekretion von Proteasen durch die Tumorzellen selbst und durch das Wirtsgewebe (Mc Cawley und Matrisian, 2000). Im nächsten Schritt der metastatischen Kaskade, der Intravasation, treten Tumorzellen nach der Invasion der vaskulären Basalmembran in den Blutstrom ein (Mehlen und Puisieux, 2006). Bei der Intravasation - dem Eintreten der Tumorzellen in das Blutgefäßsystem - spielen ähnliche Mechanismen wie bei der Invasion der EZM eine begünstigende Rolle (Böcker et al., 2004). Das Unterdrücken apoptotischer Mechanismen spielt im Zuge der Intravasation, dem Überleben im Blutstrom, aber auch während der Extravasation eine bedeutende Rolle (Hanahan und Weinberg, 2000). Viele Krebszellen sterben sofort nach dem Eintritt in den Blutstrom oder kurz nach der Extravasation (Fidler, 1970), überwiegend durch mechanischen Stress oder durch Angriffe des Immunsystems (Mehlen und Puisieux, 2006). Durch die Bildung von Tumorzellemboli, eine Ummantelung mehrerer Tumorzellen mit Fibrin und Thrombozyten, und durch eine verminderte Expression von HLA-Selbsterkennungsmolekülen werden die Tumorzellen, insbesondere während des Transports im Blutgefäßsystem, vor Angriffen des Immunsystems geschützt (Böcker et al., 2004; Gupta und Massague, 2006). In experimentellen Metastasierungsmodellen wurde gezeigt, dass die Zell-Zell Interaktion von Tumorzellen und Thrombozyten kausal für die Metastasierung ist, indem diese Interaktion inhibiert wurde

(Nash et al., 2002). Bei der Extravasation, dem Auswandern zirkulierender Tumorzellen aus dem Blutstrom, spielt die Adhäsion der Tumorzelle an das Endothel der Gefäßwand eine bedeutende Rolle. Eine Interaktion von Tumorzellen mit neutrophilen Granulozyten, welche unter anderem durch das Adhäsionsmolekül ICAM-1 vermittelt wird, verstärkt die Bindung von Tumorzellen an das Endothel der Gefäßwand und somit auch die Extravasation und die Invasion in das angrenzende Gewebe (Aeed et al., 1988; Slattery et al., 2004). Auch Integrine, insbesondere  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_3\beta_1$  Integrine, sind in den Prozess der Extravasation involviert, indem sie die Zell-Zell-Adhäsion zwischen zirkulierenden Tumorzellen und Endothelzellen vermitteln (Felding-Habermann et al., 2001, Wang et al., 2004). Zudem geben Tumorzellen Wachstumsfaktoren ab, welche eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße hervorrufen. Beispielsweise wird durch den VEGF (*vascular endothelial growth factor*) die Auflösung endothelialer Zellkontakte induziert, wodurch die Extravasation von Tumorzellen gefördert wird (Gupta und Massagué, 2006). Im nächsten Schritt kommt es zur Absiedelung der Tumorzellen in sekundäre Organe. Der Ort der Absiedelung ist nicht alleine durch die hämatogenen Metastasierungswege erklärbar. Aufgrund von organspezifischen Membranrezeptoren metastasieren Tumorzellen bevorzugt in bestimmte Zielorgane (Organpräferenz; Böcker et al., 2004). In experimentellen Metastasierungsmodellen wurde gezeigt, dass sich Tumorzellen mittels Rezeptoren der Zelloberfläche, beispielsweise durch eine Interaktion zwischen Integrinen und Endothelzellen, bevorzugt an Arteriolen und Kapillaren spezifischer Gewebetypen heften (Weinberg, 2007). Die nächste Hürde stellt das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen in sekundären Organen dar. Da einzeln vorliegende Tumorzellen und Mikrometastasen anfällig für die Apoptose sind (Luzzi et al., 1998), ist für das Überleben von Tumorzellen in sekundär befallenen Organen eine Interaktion zwischen Tumorzellen und angrenzendem Stroma nötig (Mehlen und Puisieux, 2006). Für das Auswachsen von Metastasen ist unter anderem die Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen ein limitierender Faktor. Ab einer Größe von 1-2 mm ist eine Metastase - in gleichem Maße wie ein Primärtumor - auf die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) zur Versorgung der Zellen mit Nährstoffen, angewiesen. Kommt es nicht zu einer Neubildung von Blutgefäßen, bleiben Tumorzellen ruhend (*dormant*), d.h. Proliferation und Apoptose stehen im Gleichgewicht (Mehlen und Puisieux, 2006). Nach dem vollständigen Ablauf der metastatischen Kaskade kann es, ausgehend von etablierten Metastasen, erneut zur Ablösung und Invasion einzelner Tumorzellen im Rahmen der sekundären Invasion kommen.

### **2.3 Identifikation von Zielmolekülen antimetastatischer Therapien**

Etwa ein Drittel aller Krebspatienten befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnose bereits im metastasierten Stadium des Tumorleidens. Die Hälfte des restlichen Patientenguts entwickelt unmittelbar nach Stellung der Diagnose oder nach chirurgischer Exzision des Primärtumors Metastasen (Steeg et al., 1992). Das ist ein Hinweis darauf, dass zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bzw. zum Zeitpunkt der chirurgischen Therapie die initialen Phasen der Tumorprogression bereits abgeschlossen sind. Daher ist es wichtig therapeutische Zielmoleküle zu identifizieren, die insbesondere in den späten Phasen der metastatischen Kaskade von Bedeutung sind. Die Identifikation von Zielmolekülen einer multifaktoriell bedingten Erkrankung wie Krebs ist nicht einfach, obwohl oder vielleicht gerade weil bereits 5.000 bis 10.000 potentielle Zielmoleküle identifiziert wurden (Overall und Kleinfeld, 2006).

Die Identifikation und die anschließende Validierung von Zielmolekülen sowie die Beurteilung, ob ein Zielgen chemisch inhibiert werden kann, sind jedoch wesentliche Schritte in der Entwicklung antimetastatischer Therapien. Es ist wichtig zwischen Zielmolekülen, Anti-Zielmolekülen und *Counter*-Zielmolekülen zu differenzieren. Zielmoleküle tragen eindeutig zu der Progression der Erkrankung bei, während Anti-Zielmoleküle physiologische Aufgaben im Normalgewebe übernehmen. Die sogenannten *Counter*-Zielmoleküle sind Moleküle mit Homologien zu einem Zielgen. Sie spielen jedoch keine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Erkrankung. Die Suppression von Zielmolekülen kann möglicherweise eine transformierte Tumorzelle zerstören, hält den Fortschritt der Erkrankung auf und stellt idealerweise die Morphologie des Ursprungsgewebes wieder her. Hingegen kann die Suppression von Anti-Zielgenen zu klinisch nicht akzeptablen Nebenwirkungen, sowie zu einer Verschlechterung der Prognose und der Überlebensrate von Tumorpatienten führen. Eine Hemmung von *Counter*-Targets führt möglicherweise zu unerwünschten Nebenwirkungen (Overall und Kleinfeld, 2006; Folini et al., 2009). Die Entwicklung neuer therapeutischer Zielmoleküle basiert auf der Identifikation von Genen, welche insbesondere bei Signaltransduktionswegen eine Rolle spielen, die in Tumorzellen vermehrt aktiviert sind. Eine essentielle Methode Zielgene anti-metastatischer Therapien zu identifizieren, ist die shRNAi Technologie. Durch die Suppression von potentiellen Zielgenen auf mRNA Ebene mittels der shRNAi Technologie kann die Bedeutung humaner Zielgene in der Tumorprogression evaluiert werden (Folini et al., 2009).

### **2.4 Die Bedeutung von Zelladhäsionsmolekülen bei der Metastasierung**

In vielen malignen Tumoren wird die Tumorprogression und Metastasierung mit einer Änderung des Expressionsmusters von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) assoziiert (Cavallaro

und Christofori, 2001). CAMs regulieren die Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten und beeinflussen dadurch die Migration und Invasion von Zellen. CAMs können Bindungen mit sich selbst (homophile Bindung) oder mit anderen Oberflächenproteinen eingehen (heterophile Bindung). Des Weiteren können sie die Zell-Zelladhäsion zwischen Zellen vom gleichen Gewebetyp (homotype Adhäsion) oder zwischen verschiedenen Zelltypen (heterotype Adhäsion) vermitteln (Nguyen, 2004). Die frühen Phasen der Metastasierung sind häufig mit einer Reduktion der Expression von CAMs assoziiert, welche unter normalen Bedingungen Zell-Zell oder Zell-Matrix Interaktionen vermitteln. Der Verlust der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion korreliert beispielsweise mit der Invasion von Melanomzellen (Zhang und Hersey, 1999) und ist für viele Tumorarten ein wichtiger Schritt für den Erwerb eines invasiven Phänotyps (Hazan et al., 2004). Der dadurch bedingte Verlust homotyper oder heterotyper Interaktionen erleichtert das Lösen von Zellen vom Primärtumorverband und von der extrazellulären Matrix. Eine de novo Expression von CAMs wird hingegen während der späteren Phasen der Metastasierung beobachtet. Die verminderte Expression von E-Cadherin ist häufig mit einer vermehrten Expression der Adhäsionsmoleküle N-Cadherin, CD44 oder L1CAM assoziiert (Reiss und Saftig, 2006). Eine erneute Ausbildung von homotypen Interaktionen zwischen Tumorzellen trägt zum Überleben der Tumorzellen im Blutstrom bei (Nash et al., 2002). Die Ausbildung von heterotypen Interaktionen spielt im Rahmen der Intravasation sowie auch im Zuge der Extravasation bei der Adhäsion von Tumorzellen am Endothel von Blutgefäßen eine bedeutende Rolle (Mimeault und Batra, 2007). CAMs beeinflussen das metastatische Potential von Tumorzellen nicht nur über die Regulation von Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen. Sie beeinflussen zudem wichtige Signaltransduktionswege und sind somit indirekt an der Regulation der Zellproliferation, Zellmigration, Zelldifferenzierung und der Apoptose beteiligt (Christofori, 2003). Zu den bei der Tumorprogression wichtigen Zelladhäsionsmolekülen gehören neben den Cadherinen, Integrinen, Selektinen und CD44-Varianten die CAMs der Immunglobulinsuperfamilie (Reiss et al., 2006). Die Gruppe der Immunglobulinsuperfamilie wird durch eine variable Anzahl extrazellulärer Immunglobulin-ähnlicher Domänen, welche über Disulfidgruppen verbunden sind, und durch eine variable Anzahl von Fibronectin-Typ III-ähnlicher Wiederholungen charakterisiert (Crossin und Krushel, 2000). Die funktionelle Bedeutung der Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie ist sehr verschieden. Die meisten Mitglieder der Gruppe gehen homophile Bindungen mit identischen CAMs auf Nachbarzellen ein und unterstützen auf diese Weise die Zell-Zell Adhäsion. Für viele CAMs wurde gezeigt, dass sie ebenfalls heterophile Bindungen mit

Proteinen eingehen, von denen nur einige der Immunglobulinsuperfamilie angehören. Auch auf der gleichen Zelloberfläche kommt es zu homophilen und heterophilen Interaktionen (cis-Interaktionen) zwischen Ig-CAMs (Crossin und Krushel, 2000). Eines der bekanntesten Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie, das bei der Krebsentstehung eine Rolle spielt, ist N-CAM. In vielen malignen Tumoren wird nicht nur ein *Isoform-Switch* von der adulten N-CAM Isoform (120kDa) zu embryonalen N-CAM Isoformen (140 kDa oder 180 kDa), sondern auch eine allgemeine Reduktion der N-CAM Expression beobachtet (Christofori, 2003). In manchen Tumoren, darunter das kleinzellige Bronchialkarzinom, das Mesotheliom und in bestimmten neuroendokrinen Tumoren, ist N-CAM im Zuge der Tumorprogression hochreguliert. Über die biologischen Funktionen von N-CAM ist bisher noch nicht viel bekannt. In einer Tumorzelllinie wurde aber bisher gezeigt, dass N-CAM mit dem FGF-R interagieren kann und dadurch die Zell-Matrix Adhäsion beeinflusst (Cavallaro und Christofori, 2004).

## **2.5 Die Bedeutung von Spleißvarianten in der Tumordiagnostik und Tumorprogression**

Zur Diagnostik von Tumoren werden verschiedene Methoden eingesetzt, wobei neben morphologischen und immunologischen Kriterien, zytogenetische und molekularbiologische Techniken zunehmend an Bedeutung gewinnen. Heute kann in kürzester Zeit mittels Mikroarraytechnologie oder quantitativer RT-PCR die Genexpressionssignatur von Tumorgewebe ermittelt werden, was wesentlich zur Einteilung in klinisch und prognostisch relevante Subgruppen von Tumoren beitragen kann. Auf Basis der Genexpressionssignatur von Primärtumoren können Vorhersagen über die Aggressivität und die Metastasierungswahrscheinlichkeit gemacht werden. Die Ermittlung von Expressionssignaturen liefert folglich eine Grundlage für individuelle Therapieentscheidungen. Ferner verbessern Genexpressionsanalysen das Verständnis für die Pathologie verschiedener Tumoren und dienen der Identifikation potentieller Angriffsziele für neue Therapien (Van't Veer et al., 2002; Hunter et al., 2003; Ramaswamy et al., 2003). Zu beachten ist jedoch, dass die Aggressivität von Tumoren durch die Expression verschiedener Varianten eines Gens moduliert werden kann (Stauder et al., 1996; Shibuya et al., 1998). In Genexpressionsstudien, die auf die Identifikation neuer Spleißvarianten in Tumorgeweben abzielten, wurden bisher hunderte alternativ gespleißte Varianten verschiedener Gene detektiert. Aber bis heute ist noch nicht viel über die unterschiedlichen biologischen Funktionen von Spleißvarianten bekannt (Skotheim et al., 2007). Um den prognostischen Wert von Genexpressionssignaturen zur Vorhersage der Aggressivität von Tumoren zu

verbessern, sollten die biologischen Unterschiede von Spleißvarianten in der Tumorprogression bestimmt werden. Diese Unterschiede sollten berücksichtigt werden, um die Diagnostik auf der Basis von Genexpressionsanalysen oder durch Verwendung von Spleißvarianten-spezifischen Antikörpern zu verbessern. Der Mechanismus des alternativen Spleißens ist in malignen Tumoren häufig fehlreguliert. Durch das alternative Spleißen können die biologischen Eigenschaften eines Genproduktes verändert werden. Unterschiedlich gespleißte Varianten eines Gens haben unterschiedliche, teilweise sogar gegensätzliche Auswirkungen auf die Tumorprogression (Srebrow et al., 2006; Pajares et al., 2007; Scotlandi et al., 2007). Eine Gruppe von Molekülen, von denen verschiedene Spleißvarianten bekannt sind und die bedeutende Auswirkungen auf die Tumorprogression und Metastasierung haben, sind die CAMs. Innerhalb der Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle wird die Bedeutung krebsspezifischer Spleißvarianten derzeit intensiv untersucht (Venables, 2004). Alternatives Spleißen von CAMs geht häufig mit einer Änderung der adhäsiven Eigenschaften von Zelladhäsionsmolekülen einher. Dadurch wird die Adhäsion zwischen benachbarten Zellen sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix verändert, wodurch wiederum das Invasionspotential von Tumorzellen beeinflusst wird (De Angelis et al., 2001; Long et al., 2001; Jacob et al., 2002; Byun et al., 2006). Das am meisten untersuchte Gen der Gruppe der alternativ gespleißten CAMs ist das CD44 Zelladhäsionsmolekül. Über 20 Isoformen des CD44 Transmembranproteins sind bekannt, wovon lediglich bestimmte Varianten mit der Tumorprogression sowie einer kurzen Überlebensdauer von Tumorpatienten assoziiert sind (Venables, 2004).

### **2.6 Die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls L1 in der Tumorprogression**

Ein weiteres Zelladhäsionsmolekül, das in der Tumorprogression eine bedeutende Rolle spielt und alternativ gespleißt werden kann, ist das Zelladhäsionsmolekül L1. Es hat eine molekulare Masse von 200-220 kDa und ist Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie. L1CAM besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (De Angelis et al., 2001). Über die extrazelluläre Domäne, die aus sechs Immunglobulin-ähnlichen Domänen und fünf Fibronectin-ähnlichen Wiederholungen besteht, kann L1CAM sowohl homophile Bindungen als auch heterophile Bindungen mit weiteren CAMs, extrazellulären Matrixmolekülen oder Signaltransduktionsmolekülen eingehen. Dadurch wird das Adhäsions-, Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen beeinflusst. Die intrazelluläre Domäne von L1CAM ist in hohem Maße konserviert und spielt eine Rolle bei der Signaltransduktion. Sie wird nicht unmittelbar für die Zelladhäsion benötigt, ist jedoch über die Signaltransduktion und über die

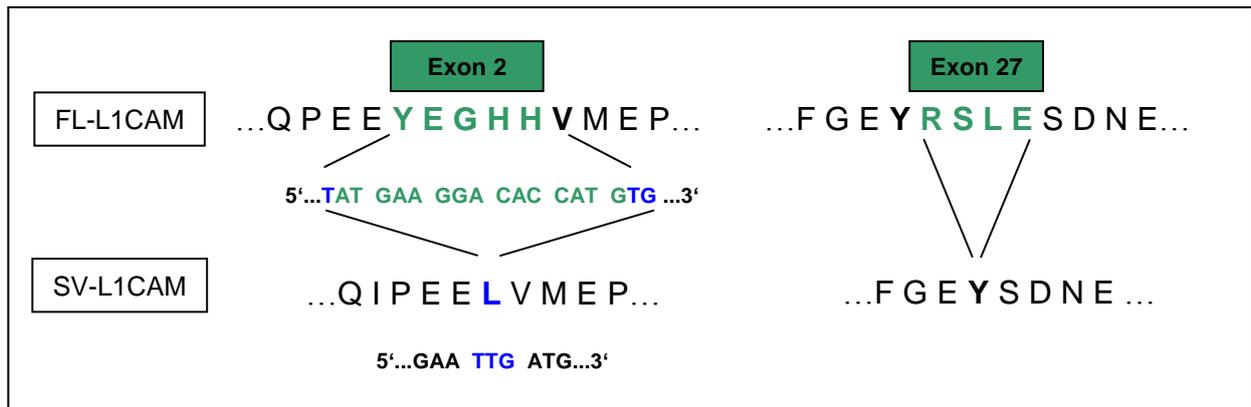
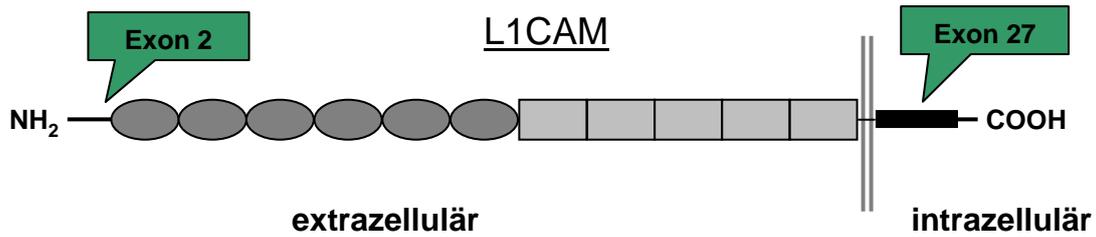
Endozytose von L1CAM an der Regulation der Zell-Adhäsion beteiligt (Schaefer et al., 1999). Über zwei Regionen der intrazellulären Domäne ist L1CAM über eine Bindung mit Ankyrin und ERM-Proteinen (Ezrin-Radixin-Moesin) mit dem Zytoskelett verbunden (Davis et al., 1994; Maness und Schachner 2007). Die Bindung an das Zytoskelett ist dynamisch und abhängig vom Bindungszustand der extrazellulären Domäne (Hortsch et al., 1998) sowie vom Phosphorylierungsgrad der zytoplasmatischen Domäne (Crossin und Krushel, 2000). Die Expression von L1CAM in Tumorgewebe korreliert mit einer schlechten Prognose von Tumorpatienten und dem Auftreten von Metastasen in späteren Tumorstadien (Thies et al., 2002; Allory et al., 2005; Boo et al., 2007; Kaifi et al., 2007). Bei Ovarialkarzinompatientinnen und Endometriumkarzinompatientinnen wird L1CAM Stadien abhängig exprimiert und stellt einen prognostischen Marker für das Überleben der Patienten dar (Fogel et al., 2003). Bei Kolorektalkarzinompatienten wird die L1CAM Expression mit der Ausbreitung von Mikrometastasen, einer schlechten Prognose sowie einer kurzen Überlebensdauer assoziiert (Boo et al., 2006; Kaifi et al., 2007). In humanem Kolorektalkarzinomgewebe und Ovarialkarzinomgewebe wurde L1CAM überwiegend an der invasiven Front lokalisiert (Euer et al., 2005; Gavert et al., 2005). L1CAM wird jedoch nicht nur aufgrund von zahlreichen klinischen Studien und der Überexpression in Tumorgewebe mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht, sondern auch aufgrund der biologischen Eigenschaften des Zelladhäsionsmoleküls. Die Überexpression von L1CAM in Tumorzellen führt zu einer verstärkten Migration und Invasion verschiedener Zelllinien *in vitro*. Beispielsweise fördert L1CAM die transendotheliale Migration von Melanomzellen (Voura et al., 2001) und eine Expression von L1CAM in 3T3 Fibroblasten führt *in vitro* zu einer verstärkten Migration auf verschiedenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix, darunter Vitronektin, denaturiertes Kollagen Typ I und Laminin-1 (Siletti et al., 2004). Darüber hinaus sind L1CAM transfizierte Kolonkarzinomzellen invasiver und bilden größere Tumoren in Nacktmäusen aus (Gavert et al., 2005). Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte L1CAM bereits als potentiell, therapeutisches Zielgen identifiziert werden: Durch den Einsatz einer gegen L1CAM gerichteten Antikörpertherapie konnte das intraperitoneale Tumorwachstum der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip, sowie die Tumorzell dissemination und die Bildung von Aszites in einem *Xenograft*-Modell der Maus dosisabhängig und signifikant reduziert werden (Arlt et al., 2006). Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass L1CAM bei der Metastasierung des Kolonkarzinoms eine bedeutende Rolle spielt. Die Expression von L1CAM in Kolonkarzinomzellen induziert in einem spontanen Metastasierungsmodell der Maus die Ausbildung von Metastasen in der Leber (Gavert et al.,

2007). Über die grundlegenden Mechanismen wie L1CAM zur Tumorprogression beiträgt ist noch nicht viel bekannt. Bisher wurde gezeigt, dass L1CAM die epitheliale-mesenchymale Transition epithelialer Zellen fördert und dadurch zu einem migratorisch aktiveren Phänotyp beiträgt (Shtutman et al., 2006). In einer Mammakarzinomzelllinie wurde gezeigt, dass L1CAM einen mesenchymalen Phänotyp hervorruft, indem es E-Cadherin aus Adhärenz-Junctions freilässt und dadurch die  $\beta$ -Catenin abhängige Signaltransduktion fördert (Shtutman et al., 2006). In nicht-epithelialen Zellen hingegen wurde gezeigt, dass die lösliche Form von L1CAM die Migration durch eine Bindung an Integrine fördert (Mechtersheimer et al., 2001). Darüber hinaus beeinflusst L1CAM direkt oder indirekt die Signaltransduktion. In Fibroblasten und einer murinen Melanomzelllinie fördert L1CAM die Migration und Invasion in Anwesenheit von Serum oder PDGF (*platelet derived growth factor*) über eine nachhaltige Aktivierung des MAPK-ERK Signaltransduktionswegs, wodurch Gene induziert werden, die mit einer erhöhten Invasivität und Motilität assoziiert sind. Dazu gehören die  $\beta_3$ -Untereinheit der Integrine, die kleinen GTPasen RhoC und Rac-1, die Cysteinproteasen Cathepsin B und L sowie das Zelladhäsionsmolekül CD44 (Siletti et al., 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine direkte Interaktion von L1CAM-ähnlichen Molekülen mit dem EGF Rezeptor möglich ist, die zu einer Induktion der Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors führt (Islam et al., 2004). Hierdurch wird  $\beta$ -Catenin phosphoryliert und in den Zellkern transloziert, wodurch die Interaktion zwischen E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin zerstört wird (Shtutman et al., 2006). Außerdem kann L1CAM direkt über eine heterophile Bindung mit dem FGF-Rezeptor interagieren. Auf diese Weise stimuliert L1CAM das Auswachsen von Axonen (Kulahin et al., 2008). Das Signaling über den FGF-Rezeptor ist zudem an der Regulation der Zellproliferation, der Migration und der Zelldifferenzierung beteiligt.

## **2.7 Die biologischen Funktionen der Exons 2 und 27 des L1 Zelladhäsionsmoleküls**

Es wurde bereits gezeigt, dass L1CAM bei der Tumorprogression eine wichtige Rolle spielt (Fogel et al., 2003). Bisher wurde jedoch nicht zwischen den beiden Isoformen des L1-Zelladhäsionsmoleküls unterschieden. Neben der neuronalen Isoform von L1CAM (FL-L1) wurde eine nicht-neuronale Isoform (SV-L1) des Zelladhäsionsmoleküls identifiziert, die durch alternatives Spleißen der L1CAM mRNA erzeugt wird (Reid et al., 1992). Die neuronale L1 Isoform besteht aus 28 kodierenden Exons und spielt eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems, indem sie das Auswachsen von Neuriten und Axonen, die Adhäsion von Neuronen und die Migration von Nervenzellen fördert (De Angelis et al., 2001; Jacob et al., 2002). Zellen außerhalb des Nervensystems, darunter B-Zellen, Schwann-Zellen, Astrozyten und Oligodendrozyten sowie Epithelzellen des Intestinums und der Niere,

exprimieren die nicht-neuronale Isoform von L1 (Jouet et al., 1995; Takeda et al., 1996; De Angelis et al., 2001). In verschiedenen Tumorzelllinien, isoliert aus epithelialen Tumoren, Sarkomen, Lymphomen und Tumoren neuroendokriner Abstammung, wird ebenfalls überwiegend die Spleißvariante des L1 Zelladhäsionsmoleküls exprimiert (Euer et al., 2004; Shtutmann et al., 2006). In der nicht-neuronalen Isoform von L1 fehlt das Exon 2 und das Exon 27, während die neuronale Isoform von L1CAM beide Exons beinhaltet. Das alternative Spleißen der beiden Exons 2 und 27 ist gekoppelt (De Angelis et al., 2001; Jouet et al., 2005; Shtutman et al., 2006). Das Exon 2 befindet sich in der extrazellulären Domäne vor der ersten Immunglobulindomäne. Es kodiert für eine aus fünf Aminosäuren bestehende Sequenz (YEGHH). Über die Bedeutung der beiden Exons bei der Metastasierung ist bisher nicht viel bekannt. Einige biologische Funktionen der Exons im Nervensystem konnten bereits identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass das Exon 2 für die homophile Bindung und für die optimale Bindung neuronaler Liganden benötigt wird (De Angelis et al., 2001). Das Exon 27 befindet sich in der Nähe der Mitte der zytoplasmatischen Domäne und kodiert für eine aus vier Aminosäuren bestehende Sequenz, die RSLE Sequenz. Diese Aminosäuresequenz bildet mit dem vorausgehenden Tyrosin das YRSL Motiv, welches eine bedeutende Rolle bei der clathrinabhängigen Endozytose spielt (Kamiguchi et al., 1998). Durch diesen Mechanismus kann die Verteilung von L1CAM auf der Zelloberfläche innerhalb von Minuten reguliert werden. Da der nicht-neuronalen L1CAM Variante die RSLE Sequenz und damit auch das YRSL Motiv fehlt, kann die L1CAM Spleißvariante im Vergleich zur neuronalen L1CAM Isoform weniger schnell internalisiert werden. Der Mechanismus der clathrinabhängigen Endozytose spielt bei der Verlängerung und Verzweigung von Neuriten, der Regulation der Zell-Zelladhäsion und bei der Migration eine bedeutende Rolle (Kamiguchi et al., 1998a; Kamiguchi et al., 1998b; Long et al., 2001; Cheng et al., 2005). Darüber hinaus wird die Endozytose von L1CAM für die Aktivierung des MAPK-ERK-Signaltransduktionswegs benötigt (Schaefer et al., 1999; Needham et al., 2001). Über diesen Signaltransduktionsweg wird die Migration und Invasion von Fibroblasten und murinen Melanomzellen *in vitro* gefördert (Siletti et al., 2004). Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression der SV-L1CAM Isoform in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OVM-Z-2 die Adhäsion an Laminin (Bestandteil der EZM) im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Euer et al., 2005). Der Einfluss der beiden L1CAM Isoformen auf das metastatische Potential von Tumorzellen wurde bisher jedoch noch nicht eingehend untersucht.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der neuronalen und nicht-neuronalen Isoform von L1CAM:** Das L1 Zelladhäsionsmolekül verfügt über sechs Immunglobulin-ähnliche Domänen (dunkelgrau) und fünf Fibronektin-ähnliche Wiederholungen (hellgrau), welche sich auf der extrazellulären Seite der Membran befinden. Exon 2 befindet sich vor der ersten Ig-ähnlichen Domäne. Die Aminosäuresequenz lautet YEGHH (Tyr-Glu-Gly-His-His). Exon 27 befindet sich in der Mitte der zytoplasmatischen Domäne. Die Aminosäuresequenz lautet RSLE (Arg-Ser-Leu-Glu). Zu sehen sind Ausschnitte aus der Aminosäuresequenz der neuronalen (FL-L1CAM) und der nicht-neuronalen Isoform (SV-L1CAM) von L1 (Abbildung modifiziert nach De Angelis et al., 2001).

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Bisher ist noch nicht bekannt, welche Variante des L1 Zelladhäsionsmoleküls, die L1CAM Spleißvariante (SV-L1CAM = L1( $\Delta$ 2,27)) oder die neuronale L1CAM Variante (FL-L1CAM = *full-length* L1CAM), das metastatische Potential von Tumorzellen fördert. Daher war es Ziel dieser Arbeit die Effekte der Tumorzell-assoziierten Spleißvariante und der neuronalen-L1CAM Variante, welche im Gegensatz zur Spleißvariante die Exons 2 und 27 enthält, auf das metastatische Potential von Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs getrennt zu untersuchen. Um einen Einblick in die Expressionsverhältnisse der beiden L1CAM Varianten in Metastasen ovariellen Ursprungs zu bekommen, sollten zunächst die Expressionslevel der L1CAM Varianten in Gewebeproben von Patienten mit metastasiertem Ovarialkarzinom untersucht werden. Anschließend wurde - unter Verwendung der shRNAi-Technologie - die Auswirkung einer simultanen Suppression aller L1CAM Isoformen auf das metastatische Potential von Tumorzellen analysiert. Über retroviralen Gentransfer wurde eine gegen L1CAM gerichtete shRNA in eine humane Ovarialkarzinomzelllinie eingebracht. Die Auswirkung des simultanen *knock down* der L1CAM Varianten wurde in einem experimentellen Metastasierungsmodell untersucht. Als nächstes wurde der Effekt der FL-L1CAM Variante und der SV-L1CAM Variante auf das metastatische Potential von Tumorzellen (T-Zell-Lymphomzellen und Fibrosarkomzellen) verglichen. Durch eine Überexpression der Tumorzell-assoziierten Spleißvariante bzw. eine Überexpression der neuronalen L1CAM Variante in einer humanen Fibrosarkomzelllinie und einer murinen T-Zell-Lymphomzelllinie wurde das metastatische Potential der Zelllinien in einem *Xenograft*-Modell der Maus und in einem *syngen* Metastasierungsmodell untersucht.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Versuchstiere

Für das SKOV3 und das HT1080 *Xenograft*-Metastasierungsmodell (siehe 4.2.1, 4.2.2) wurden weibliche, pathogenfreie und immunsupprimierte CD1 $nu/nu$  Nacktmäuse (Charles River, Sulzfeld) im Alter von 7-9 Wochen und einem mittleren Gewicht von 20 g verwendet. Für das L-CI.5s Metastasierungsmodell (siehe 4.2.3) wurden weibliche, pathogenfreie und immunkompetente Tiere des Mausstammes DBA/2 (Charles River, Sulzfeld) im Alter von 8 - 10 Wochen verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere jeweils eine Woche unter Standardbedingungen gehalten. Die Versuchstiere wurden mittels zervikaler Dislokation oder mit CO<sub>2</sub> getötet. Anschließend wurden sofort Leber und Lunge der Mäuse entnommen. Für RNA-Analysen wurden der rechte Lungenflügel, sowie einige Teile der Leber in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Der linke Lungenflügel und der *Lobus sinister*- und *Lobus dexter medialis hepatis* wurden mit X-Gal-Lösung inkubiert, sodass sich die Tumorzellen bzw. Metastasen auf der Lungen- bzw. Leberoberfläche unter Verwendung der X-Gal-Färbemethode (siehe 4.2.4) blau anfärbten.

### 4.2 Metastasierungsmodelle

#### 4.2.1 SKOV3 *Xenograft*-Metastasierungsmodell

In dieser Arbeit wurde für die Evaluierung des Einflusses der L1CAM Isoformen auf die hämatogene Metastasierung von Tumorzellen das SKOV3 *Xenograft*- Metastasierungsmodell der Maus verwendet. Die Anzahl der zu inokulierenden Tumorzellen sowie der optimale Zeitpunkt für das Auszählen der Metastasen in der Lunge wurden in Vorexperimenten bestimmt (unveröffentlichte Daten von Mathias Arlt und eigene unveröffentlichte Daten). Zunächst wurden SKOV3*iplacZ* Zellen (siehe 4.3.1) auf eine Zellzahl von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt, in Phosphat gepufferter Saline Lösung (*phosphate buffered saline*, PBS, ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, Biochrom KG, Berlin) gewaschen und bis zur Inokulation auf Eis gelagert. Vor der Aufnahme mit einer 1 ml-Spritze und einer Kanüle (27 GA<sub>7/8</sub>, 0,4 × 21, Rose GmbH, Trier) wurden die Zellen mehrmals in regelmäßigen Abständen resuspendiert.  $5 \times 10^5$  SKOV3*iplacZ* Zellen wurden in 200 µl PBS (pH = 7,4) aufgenommen und intravenös in die *Vena caudalis* von CD1 $nu/nu$  Nacktmäusen inokuliert. Dieses Modell führt innerhalb von 3 - 4 Wochen nach Tumorzellinokulation zur Ausbildung von gut sichtbaren Lungenmetastasen. Am Tag 26 nach Tumorzellinokulation wurden die Mäuse geopfert. Der rechte Lungenflügel wurde entnommen und für nachfolgende Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der linke Lungenflügel wurde mit X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid) gefärbt

(siehe 4.2.4). Die Metastasen wurden anschließend unter dem Olympus SZX-ILLK200 Mikroskop Lichtmikroskop (Hamburg) bei 40facher Vergrößerung ausgezählt. Die Übersichtsaufnahmen wurden mit einer Nikon 100 Digitalkamera (Tokyo, Japan), welche dem Lichtmikroskop befestigt wurde, fotografiert. Sie wurden in Form von JPG-Dateien gespeichert und anschließend in Power Point importiert.

#### **4.2.2 HT1080 Xenograft-Metastasierungsmodell**

Das HT1080 *Xenograft*-Metastasierungsmodell ist ein bereits etabliertes Metastasierungsmodell (Schweinitz et al., 2004, Kopitz et al., 2005). Etwa drei Wochen nach intravenöser Inokulation von humanen HT1080 Fibrosarkomzellen kommt es zur Ausbildung von gut zählbaren Metastasen in der Lunge sowie zur Ausbildung von Mikrometastasen in der Leber (*scattered* Phänotyp) (Schweinitz et al., 2004; Kopitz et al., 2005). In dieser Arbeit wurden  $1 \times 10^6$  HT1080*lacZ*-K15-Zellen (siehe 4.3.1), aufgenommen in 200  $\mu$ l PBS, in die *Vena caudalis* von CD1*nu/nu* Nacktmäusen inokuliert. Am Tag 21 nach der Tumorzellinokulation wurden die Mäuse geopfert. Der rechte Lungenflügel aller Versuchstiere wurde entnommen und für nachfolgende Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der linke Lungenflügel aller Versuchstiere wurde zunächst in 2 % - Formalin in 1  $\times$  PBS fixiert und anschließend zur Darstellung der Metastasen auf der Lungenoberfläche mit X-Gal-Lösung (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) gefärbt (siehe 4.2.4). Die Metastasen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Von repräsentativen Lungen der jeweiligen Gruppen wurden Übersichtsaufnahmen mit einer Nikon 100 Digitalkamera (Tokyo, Japan) angefertigt.

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

Das L-CI.5s-T-Zell Lymphom-Modell ist ein bereits etabliertes Metastasierungsmodell (Krüger et al., 1994a). Mit diesem *syngen* Metastasierungsmodell lässt sich der Einfluss von metastasierungs-assoziierten Faktoren auf die Schritte der metastatischen Kaskade - ab dem Überleben der Zellen im Blutstrom - analysieren (Banke et al., 2005; Gerg et al., 2008). Aufgrund der Aggressivität der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie (L-CI.5s) kommt es bereits sechs Tage nach der Inokulation der Tumorzellen in die *Vena caudalis* von DBA/2 Mäusen zur Ausbildung von gut sichtbaren und gut zählbaren Makrometastasen (Metastasen mit einem Durchmesser  $> 0,2$  mm) und vereinzelt auch zur Ausbildung von Mikrometastasen (Metastasen mit einem Durchmesser  $< 0,2$  mm). Ab dem siebten Tag kommt es zu einer zunehmenden Ausbildung von Mikrometastasen. Diese entstehen durch die Absiedelung einzelner Tumorzellen von den Makrometastasen im Rahmen der sekundären Invasion. Das

Zielorgan der Metastasierung ist die Leber. Folglich ist mit diesem Modell eine detailgenaue Abbildung einer aggressiven Lebermetastasierung binnen weniger Tage möglich (Krüger et al., 1994a; Banke et al., 2003). Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist eine geringe Streuung der Metastasenzahl innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. In dieser Arbeit wurden 5000 *lacZ*-markierte T-Zell-Lymphomzellen, aufgenommen in einem Volumen von 200 µl PBS, in die *Vena caudalis* von DBA/2 Mäusen injiziert. Eine Woche nach der Tumorzellinokulation wurden die Mäuse geopfert. Für die Quantifizierung der Lebermetastasierung wurden der *Lobus sinister medialis hepatis* und der *Lobus dexter medialis hepatis* X-Gal gefärbt. Die Metastasen wurden unter Verwendung des Olympus SZX-ILLK200 Mikroskops (Hamburg) ausgezählt. Die Übersichtsaufnahmen von ausgewählten Lebern, welche für die jeweiligen Gruppen repräsentativ waren, wurden ebenfalls wie oben beschrieben (siehe 4.2.2) aufgenommen.

#### 4.2.4 X-Gal Färbung von Organen

Eine geeignete Technologie für die Quantifizierung der Metastasierung *ex vivo* ist die X-Gal-Färbemethode. Durch diese bereits etablierte Methode können Tumorzellen lokalisiert werden (Krüger et al., 1994a; Krüger et al., 1998) und bis auf das Niveau einzelner Zellen beurteilt werden. Folglich erlaubt diese Methode die Beurteilung des Metastasierungsmusters. Alle verwendeten Tumorzelllinien waren zuvor schon mit dem Markergen *lacZ* transduziert. Das *lacZ* Gen, gewonnen aus *E.coli* Bakterien, kodiert spezifisch für das Enzym  $\beta$ -D-Galaktosidase, welches das chromogene Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) intrazellulär zu einem blauen Farbstoff umwandelt (Pearson et al., 1963). Zunächst wurden die Organe unmittelbar nach Entnahme in einer Waschlösung (1 × PBS) gewaschen und anschließend mit einer Fixierlösung (135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 % (w/v) Formaldehyd, 0,2 % (w/v) Glutaraldehyd) für eineinhalb Stunden inkubiert. Um die Fixierlösung vollständig zu entfernen, wurden die Organe anschließend drei Mal mit 1 × PBS gewaschen. Nach diesen Schritten erfolgte die Inkubation der Organe (Lunge und Leber) in X-Gal-Färbelösung. Die Lösung wurde für alle Tierversuche frisch zubereitet, indem die X-Gal-Stammlösung (4 % X-Gal in Di-methylfluorid (DMF)) und die X-Gal-Ausgangsfärbelösung (135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2,5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 6,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,0005 % (v/v) Na-Deoxycholat, 0,001 % (v/v) NP40, pH 7,1) im Verhältnis 1:40 gemischt wurden. Die Organe wurden in der X-Gal-Färbelösung für mehrere Stunden bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Intensität der bläulichen Färbung der Metastasen wurde während der Inkubation mehrmals kontrolliert. Anschließend wurden die Organe bei 4°C über Nacht

gelagert. Am nächsten Morgen wurden sie mindestens zwei Mal mit  $1 \times$  PBS gewaschen. Zur Langzeitlagerung wurden sie in einer Lösung  $1 \times$  PBS mit einem Anteil von 2% Formalin aufgehoben (Standard Labor).

### 4.3 Zellexperimentelle Methoden

#### 4.3.1 Verwendete Zelllinien

Alle unten genannten Zelllinien sind stabil mit dem bakteriellen *lacZ*-Reporter gen transfiziert, welches für das Enzym  $\beta$ -D-Galactosidase kodiert. Durch die enzymatische Umsetzung des Färbereagens Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) können Tumorzellen nicht nur *in vitro*, sondern auch *ex vivo* zur Darstellung von Metastasen in den Organen angefärbt werden (Krüger et al., 1999).

- a) SKOV3ip-*lacZ*: Die SKOV3ip Zelllinie ist eine humane Ovarialkarzinomzelllinie epithelialen Ursprungs, welche von Ellen Vitetta (University of Dallas, Texas, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Die SKOV3ip Zelllinie wurde bereits eingesetzt, um die Auswirkungen von L1CAM auf das intraperitoneale Tumorwachstum von *CD1nu/nu* Mäusen zu untersuchen (Arlt et al., 2006). SKOV3ip Zellen wachsen adhärent und sind in immundefizienten Mäusen tumorigen.
- b) HT1080-K15-*lacZ*: Die HT1080 Zelllinie ist eine humane Fibrosarkomzelllinie mesenchymalen Ursprungs, welche von Agnes Noel (Universität Liege, Lüttich, Belgien) zur Verfügung gestellt wurde. Die HT1080-K15-*lacZ*-Zelllinie wurde bereits mehrfach eingesetzt, unter anderem um die Auswirkungen einer Cystatin C Überexpression im Wirtsgewebe auf die experimentelle Metastasierung dieser Zelllinie in die Lunge zu untersuchen (Kopitz et al., 2005; Kopitz et al., 2007). HT1080 Zellen wachsen adhärent und sind ebenfalls in immunsupprimierten Mäusen tumorigen.
- c) L-CI.5s-*lacZ*: L-CI.5s Zellen sind murine T-Zell-Lymphomzellen lymphatischen Ursprungs. Die in dieser Arbeit verwendeten L-CI.5s Lymphomzellen sind *lacZ* markierte, aus der Leber einer weiblichen DBA/2 Maus reisolierte, maligne Tumorzellen des Methylchloanthren-induzierten T-Zelllymphoms L 1578Y/E (Eb) (Schirmacher et al., 1979; Krüger et al., 1994a; Krüger et al., 1994b).
- d) 293T: 293T-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sind humane embryonale Nierenzellen. Sie sind stabil mit dem Simian virus 40 (SV-40) T Antigen transduziert. In dieser Arbeit wurde diese Zelllinie aufgrund ihrer guten Transduzierbarkeit als

Verpackungszelllinie zur Herstellung retroviraler Partikel verwendet (Du Bridge et al., 1987; Amrutlal et al., 2006).

#### 4.3.2 Zellkulturmedien

- a) L-CI.5s-lacZ: Zur Kultivierung der Suspensionszelllinie wurde RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) verwendet, welches mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS, PAA Gold, Linz, Deutschland), 20 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100 mM Hepes (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 0,55 mM Asparagin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 0,27 mM Arginin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ergänzt wurde.
- b) HT1080-K15-lacZ, SKOV3-lacZ und 293T: Zur Kultivierung der adhären wachsenden SKOV3 und HT1080 Zellen wurde DMEM (Biochrom, Berlin, Deutschland), ergänzt mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 20 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100 mM Hepes (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 0,55 mM Asparagin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,27 mM Arginin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verwendet.

#### 4.3.3 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem Zellkulturinkubator (*Scientific CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator*, Thermo Quest, Egelsbach, Deutschland) unter folgenden Bedingungen kultiviert: 5 % CO<sub>2</sub>, 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Für die Suspensionszelllinie L-CI.5s wurden Zellkulturflaschen (TTP, Trasadingen, Schweiz, T25 oder T75) verwendet. L-CI.5s-Zellen wurden dreimal wöchentlich in einem Splitverhältnis von 1:4 bis 1:10 passagiert. Die adhären wachsenden Zelllinien SKOV3 und HT1080 wurden in 6 cm oder 10 cm großen Zellkulturschalen (TTP, Trasadingen, Schweiz) kultiviert. Vor dem Ablösen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 bzw. 1 ml Trypsin/EDTA pro 6 bzw. 10 cm Zellkulturschale abgelöst. Die Zellpassage aller adhären Zelllinien erfolgte dreimal wöchentlich in einem Splitverhältnis von 1:3 oder 1:4 bei einer Konfluenz von 70 bis 80 %.

#### 4.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Adhären wachsende Zelllinien wurden zunächst mit Trypsin/EDTA abgelöst und anschließend im Zellkulturmedium aufgenommen. Suspensionszelllinien wurden nach Resuspension sofort in ein 10 ml Falcon (TTP, Trasadingen, Schweiz) gegeben. Nach erneuter Resuspension wurden 100  $\mu$ l aus den 10 ml Falcons entnommen und mit dem

gleichen Volumen Trypanblau-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer 96-well - Platte vermischt. 100 µl wurden aus dem 96-well entnommen und in eine Neubauer Zählkammer (Assistent, Sondheim, Deutschland) überführt. Die Trypanblau-Lösung färbt tote Zellen blau an, wodurch die Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen ermöglicht wird. Je nach Zelldichte wurden zwei diagonal gegenüberliegende oder alle vier großen Kästchen der Zählkammer (Tiefe: 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm<sup>2</sup>) ausgezählt. Demzufolge betrug das Volumen annäherungsweise 0,1 µl (2 Kästchen) oder 0,2 µl (4 Kästchen). Abhängig von der Anzahl der ausgezählten Kästchen wurde die Zellzahl durch Multiplikation mit dem Faktor 10<sup>4</sup> (2 Kästchen) oder 5 × 10<sup>3</sup> (4 Kästchen) ermittelt.

#### **4.3.5 Kotransfektion von 293T-Zellen zur Herstellung retroviraler Zellkulturüberstände und Gewinnung retroviraler Zellkulturüberstände**

Für die Herstellung von Retroviren wurden am Vorabend der Kotransfektion 2 × 10<sup>6</sup> 293T-Zellen pro 10 cm Schale (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät. Am nächsten Tag wurde zwei Stunden vor Beginn der Kotransfektion das Medium gewechselt. Für die Transfektion wurden jeweils 10 µg des Transferplasmids und der Helferplasmide pHIT60 (gag und pol; Soneoka et al., 1995) und HCMV-VSVG (env; Yee et al., 1994) in einem Eppendorfgefäß vermischt. Die Plasmidlösung wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 30 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und anschließend mit 61 µl CaCl<sub>2</sub> und 409 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt. In einem 15 ml Falcon-Röhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz) wurden 500 µl 2 × HBS (0,5 % (w/v) HEPES, 0,8 % (w/v) NaCl, 0,37 % (w/v) KCl, 0,125 % (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 0,1 % Glukose, pH 7,1) vorgelegt. Die Plasmid-CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurde zu der 2 × HBS-Lösung tropfenweise in das Falcon Röhrchen zugegeben. Gleichzeitig wurde über eine Pasteurpipette Luft eingeblasen. Nach 20 Minuten Inkubation unter der Sterilbank wurde das Gemisch zu den zu transfizierenden 293T-Zellen gegeben. Acht Stunden nach der Transfektion wurde das Medium einmal gewechselt. Nach 24 stündiger Inkubation des Transfektionsansatzes wurde der Zellüberstand mit den retroviralen Partikeln, zur Vermeidung von Scherkräften, vorsichtig abgenommen und filtriert (Sterilfilter 0,45 µm Porengröße; TPP, Trasadingen, Schweiz). Entweder wurde der Zellüberstand sofort zur Retrovirusinfektion verwendet oder aliquotiert und bei -80° eingefroren (Standard Labor).

#### **4.3.6 Transduktion adhärenter Zellen**

In dieser Arbeit wurden SKOV3*lacZ* Zellen retroviral mit einer gegen humanes L1CAM gerichteten shRNA transduziert. Außerdem wurden HT1080*lacZ* Zellen und SKOV3*lacZ* Zellen retroviral mit einem für FL-L1CAM und SV-L1CAM kodierenden Retrovirus transduziert. SKOV3*lacZ* Zellen wurden zusätzlich mit einem für L1Δ27 kodierenden

Retrovirus transduziert. Hierfür wurden am Vortag  $1,5 \times 10^5$  SKOV3*lacZ* Zellen oder  $1 \times 10^6$  HT1080*lacZ* Zellen in 6 cm Zellkulturschalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät. 24 h nach Aussaat wurde das Medium der Zellen abgenommen und die Zellen wurden mit warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Virusüberstand (versetzt mit 5 µl Polybren,  $c = 8 \mu\text{g/ml}$ ) direkt auf die Zellen gegeben. Die Infektionszeit betrug zwei Stunden bei 37°C. Alle 15 Minuten wurden die Ansätze geschwenkt, um eine Austrocknung der Zellen zu vermeiden. Nach zwei Stunden wurden die Zellschalen mit einem Durchmesser von 6 cm mit 4 ml Medium aufgefüllt (Standard Labor).

#### **4.3.7 Transduktion von Suspensionszellen**

In dieser Arbeit wurden *lacZ*-markierte L-CI.5s Zellen mit einem für FL-L1CAM und SV-L1CAM kodierenden Retrovirus infiziert. Die Infektion erfolgte in Kokultur mit 293T Zellen. Acht Stunden nach der Kotransfektion (siehe 4.3.5) wurde das Medium der virusproduzierenden 293T-Verpackungszelllinie unter S2-Bedingungen gewechselt und  $1,5 \times 10^6$  L-CI.5s Zellen wurden in zellspezifischem (siehe 4.3.2) Medium, versetzt mit 8 µg/ml Polybren, auf die Zellen gegeben. 24 Stunden später wurde 1 ml der L-CI.5s Suspensionskultur abgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt, in der 4 ml zellspezifisches Medium vorgelegt war.

#### **4.3.8 Selektion nach viraler Transduktion**

Die retrovirale Transduktion der Tumorzellen erfolgte unter Verwendung von Transferplasmiden, die den Zellen eine Hygromycin Resistenz (pQCXIH) bzw. eine Puromycin Resistenz (pQCXIP) verleihen, sodass die Tumorzellen mit 10 µg/ml Puromycin oder mit 1 mg/ml Hygromycin selektioniert werden konnten. Tumorzellen, welche das erwünschte Transgen nicht stabil in ihr Genom integriert hatten, sind im Laufe der Selektion abgestorben. Als Selektionskontrolle wurden nicht-transduzierte Zellen mitgeführt. Die Selektion wurde erst beendet, wenn auf den Kontrollschalen alle Zellen abgestorben waren. Nach Beendigung der Selektion wurde das Selektionsmedium abgenommen. Die Zellen wurden mit  $1 \times$  PBS gewaschen und in zellspezifischen Zellkulturmedien (siehe 4.3.2) aufgenommen.

#### **4.3.9 Herstellung von Zelllinien durch *limiting dilution***

Für die Herstellung der L-CI.5s Zelllinien (L-CI.5s-FL-L1, L-CI.5s-SV-L1, Kontrolle) wurde die Technik der *limiting dilution* angewandt. Die Zellen wurden zunächst auf  $3 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Zellsuspension wurde  $5 \times$  im Verhältnis 1:10 (1 ml Zellsuspension + 9 ml Medium) verdünnt, sodass die

Endkonzentration etwa 3 Zellen pro ml betrug. In die Vertiefungen einer 96-*well*-Flachbodenplatte (TPP, Trasadingen, Schweiz) wurden jeweils 100 µl dieser Zellsuspension eingefüllt. Es wurden mehrere Platten ausgesät. Das Heranwachsen der Zellklone wurde täglich unter dem Stereomikroskop kontrolliert. Anschließend wurden die Heranwachsenden Zellklone in eine 24-*well*-Flachbodenplatte (TPP, Trasadingen, Schweiz) überführt. Die FL-L1CAM mRNA Expression und SV-L1CAM mRNA Expression der jeweiligen Zellklone wurde anschließend mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Um eine möglichst homogene Zelllinie herzustellen, wurden jeweils 4-5 Zellklone mit ähnlich hoher Expression der L1CAM-Varianten in einem gleichen Verhältnis gemischt und kultiviert. Nachfolgend wurde die Expression der L1CAM Varianten nochmals mittels TaqMan-RT-PCR (siehe 4.4.18) und Western Blot analysiert (siehe 4.5.3). Die Kontrolle L-CI.5s und L-CI.5s empty wurden unter gleichen Bedingungen mitgeführt.

#### **4.3.10 Proliferationsassays**

Für die Analyse des Proliferationsverhaltens der Zelllinie SKOV3ip mit veränderter L1CAM Expression wurden  $1 \times 10^4$  SKOV3 Zellen in 6-*well*-Flachbodenplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz) in Triplets ausgesät. Die Anzahl vitaler Zellen wurde in einem Zeitraum von 72h alle 12h bestimmt. Für die Analyse des Proliferationsverhaltens der L-CI.5s-Zellen mit veränderter L1CAM Expression wurden  $2 \times 10^3$  L-CI.5s Zellen pro Gruppe in Triplets ausgesät. Die Anzahl vitaler Zellen wurde in einem Zeitraum von 48 Stunden alle 12 Stunden bestimmt. Eine Unterscheidung der abgestorbenen Zellen von den vitalen Zellen erfolgte durch eine Anfärbung mit Trypanblau (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Die Zellen wurden mit einer Neubauer Zählkammer (Assistent, Sondheim, Deutschland) ausgezählt (siehe 4.3.4).

#### **4.3.11 Boyden-Chamber-Invasionsassay**

Zur Analyse der Invasivität von SKOV3ip Zellen *in vitro* wurde ein Boyden-Chamber-Invasionsassay verwendet. Um von der oberen Kammer in die untere Kammer der Boyden-Chambers zu gelangen, müssen die Tumorzellen zunächst eine dünne Schicht aus Matrigel™ durchbrechen. Matrigel™ besteht hauptsächlich aus den extrazellulären Proteinen Kollagen Typ IV, Laminin, Heparansulfat, Proteoglykanen und Entactin und stellt somit eine künstliche Basalmembran dar. Die Membran der Boyden-Chamber-24-*well*-Zellkultureinsätze mit einer Porengröße von 8 µm (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) wurde mit einer dünnen Schicht Matrigel™ der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) unter semi-sterilen Bedingungen (neben der Flamme eines Bunsenbrenners) beschichtet. Steriles  $1 \times$  PBS wurde bei 4°C und alle weiteren Materialien (Zellkultureinsätze und Pipettenspitzen) wurden bei

minus 20°C vorgekühlt. Für das Beschichten der Membranen wurde Matrigel™ im Verhältnis 1:16 mit 1 × PBS verdünnt und durch dreißigmaliges Auf- und Abpipettieren unter Vermeidung von Luftblasenbildung vermischt. Es wurden jeweils 50 µl der Matrigelsuspension in die Transwell-Inserts pipettiert. Durch leichtes Beklopfen der 24-well-Platten wurde das Matrigel gleichmäßig auf der Membran der Transwell-Einsätze verteilt. Anschließend wurden die Inserts 3 h bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert und über Nacht unter der ausgeschalteten Sterilbank getrocknet. Am nächsten Tag wurde das verfestigte Matrigel zur Rehydrierung mit 1 ml serumfreiem Medium, versetzt mit 0,1% (w/v) BSA, für zwei Stunden inkubiert. Es wurden 1 × 10<sup>5</sup> SKOV3 Zellen in 300 µl serumfreiem Medium in der oberen Kammer der *Boyden Chambers* (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät. Als Chemoattraktant wurde in die untere Kammer 1 ml Medium, versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum, eingefüllt. Anschließend wurden alle Ansätze bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Für die Bestimmung der Anzahl invadierter Zellen der adhärent wachsenden Linien SKOV3ip*lacZ* und SKOV3ip-shL1 wurden die Inserts aus den 24-well Flachbodenplatten entnommen, das Matrigel wurde vorsichtig entfernt und die Zellen wurden an der Unterseite der Membran mit dem Diff-Quick® *Staining Kit* (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gefärbt. Die angefärbten Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

#### 4.4 Molekularbiologische Methoden

##### 4.4.1 Verwendeter Bakterienstamm

*Top10*:

Genotyp: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 galU galK Δ(ara-leu)7697 rpsL (StrR) endA1 nupG*

Der Bakterienstamm *Top10* (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ist ein *E. coli* basierter Bakterienstamm und zeichnet sich durch eine gute Transformierbarkeit aus. In dieser Arbeit wurde er für die Amplifikation von pQCXIH-L1Δ(2,27), pQCXIH-L1Δ(27), pQCXIH-L1a, pQCXIP-L1Δ(2,27) und pQCXIP-L1a verwendet.

##### 4.4.2 Verwendete cDNAs

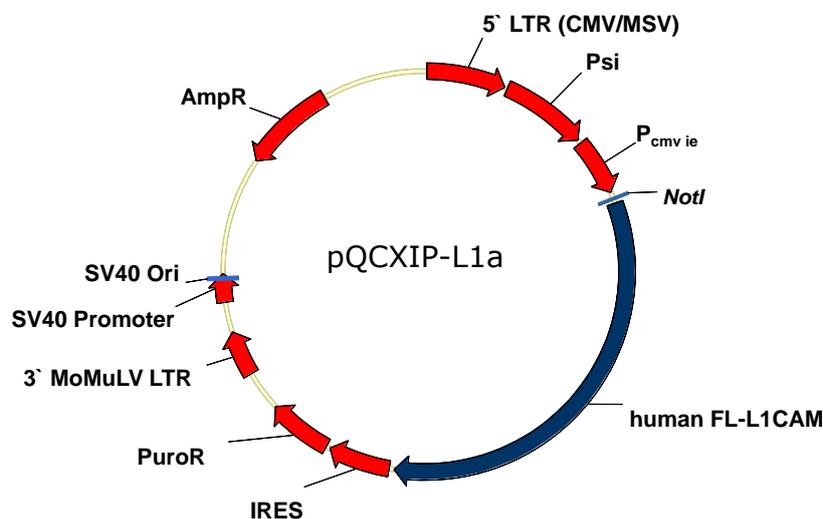
- a) SV-L1CAM (L1d(2,27)): Die cDNA von SV-L1CAM (L1d(2,27)) wurde von Prof. Peter Altevogt (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die cDNA von SV-L1CAM wurde aus dem Plasmid L1d(2,27)-pcDNA3 mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *NotI* ausgeschnitten. Die SV-L1CAM Variante

enthält nicht die Exons 2 (Aminosäuren: YEGHH) und 27 (Aminosäuren: RSLE), ist ansonsten jedoch mit der FL-L1CAM cDNA Sequenz identisch.

- b) **FL-L1CAM (L1a)**: Die cDNA von FL-L1CAM wurde von Vance Lemmon (Universität Miami) zur Verfügung gestellt. Die cDNA von FL-L1CAM (L1a) wurde aus dem Vektor L1a-pcDNA3 unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XhoI* herausgeschnitten. Die FL-L1CAM Variante enthält die Exons 2 (Aminosäuren: YEGHH) und 27 (Aminosäuren: RSLE).

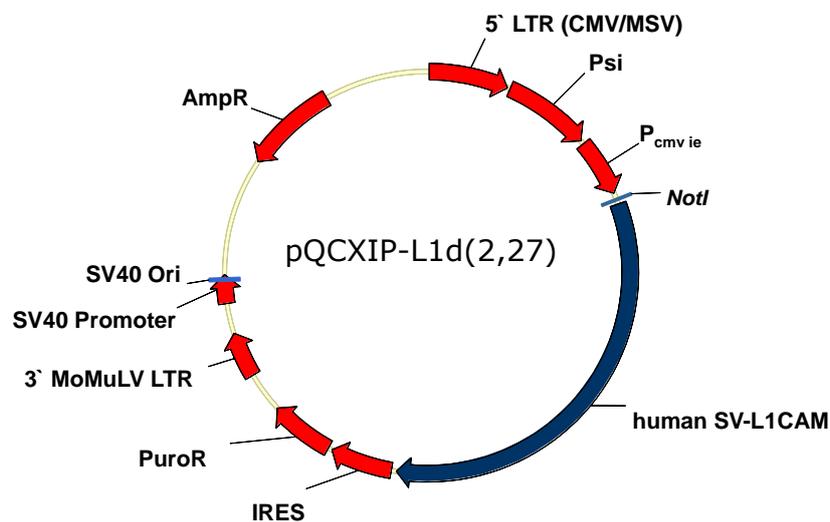
#### 4.4.3 Hergestellte und verwendete Plasmide

- a) **pQCXIP-L1a**: Die cDNA von FL-L1CAM (L1a) wurde durch eine *sticky-end* Klonierung (*HindIII/XhoI*) in die *HindIII* und *XhoI*-Schnittstelle des Shuttle-Vektor pBluescript II KS (+) eingesetzt und anschließend durch Verdau des Shuttle-Vektors mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NotI* herausgeschnitten. Der retrovirale Vektor pQCXIP (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *NotI* aufgeschnitten. Die cDNA von FL-L1CAM wurde *BamHI/blunt* und *NotI/sticky* in den retroviralen Vektor pQCXIP eingesetzt. Das Plasmid wurde von Mareike Lehnhoff und Stephanie Hauser kloniert und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.



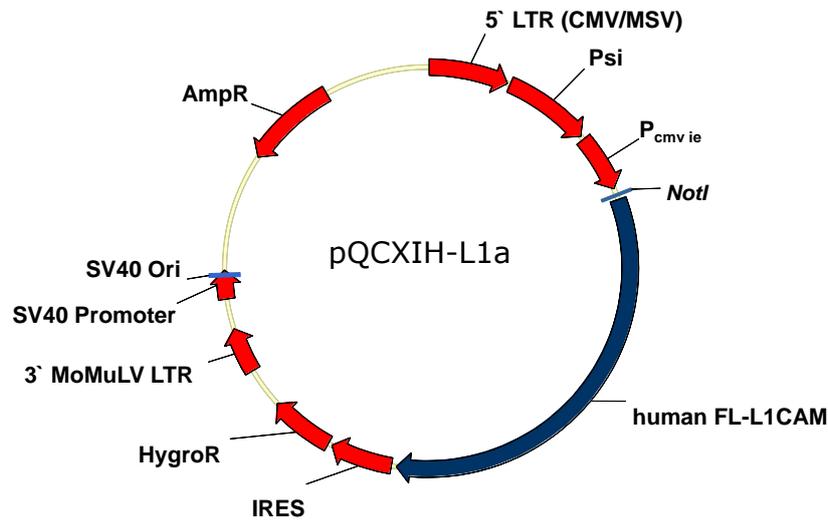
**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Plasmids pQCXIP-L1a:** Das Insert FL-L1CAM (blau) wurde in die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *BamHI* des Vektors pQCXIP *NotI/sticky* und *BamHI/blunt* einkloniert.

- b) pQCXIP-L1d(2,27): Die cDNA der Spleißvariante SV-L1CAM (L1 $\Delta$ (2,27)) wurde mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Not*I aus dem Vektor L1 $\Delta$ (2,27)-pcDNA3 (erhalten von Peter Altevogt, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland) ausgeschnitten. Der Vektor wurde zuerst *Xba*I geschnitten und die Schnittstelle wurde durch Behandlung mit dem Enzym T4-DNA-Polymerase aufgefüllt um eine *blunt-end* Klonierung zu ermöglichen (siehe 4.4.10). Der retrovirale Vektor pQCXIP wurde zuerst mit der Restriktionsendonuklease *Pac*I geschnitten und diese Schnittstelle wurde ebenfalls mit dem Enzym T4 DNA-Polymerase aufgefüllt. Die L1 $\Delta$ (2,27)-cDNA wurde *blunt* und *Not*I//*sticky* in den retroviralen Vektor pQCXIP inkloniert.



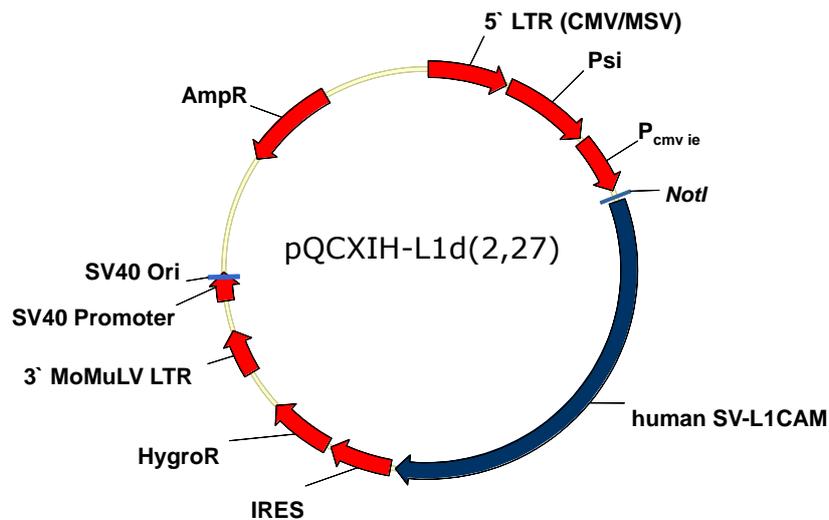
**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Plasmids pQCXIP-L1d(2,27):** Das Insert SV-L1CAM (blau) wurde in die Restriktionsschnittstellen *Not*I und *Pac*I des Vektors pQCXIP *Not*I/*sticky* und *Pac*I/*blunt* inkloniert.

- c) pQCXIH-L1a: Der retrovirale Vektor pQCXIH (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I aufgeschnitten. Die cDNA von FL-L1CAM wurde *Bam*HI/*blunt* und *Not*I/*sticky* in den retroviralen Vektor pQCXIH eingesetzt.



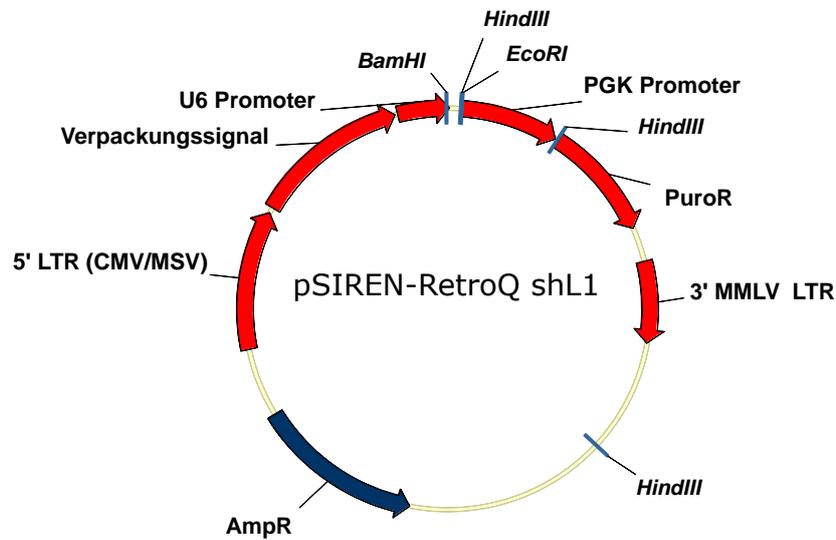
**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Plasmids pQCXIH-L1a:** Das Insert FL-L1CAM (blau) wurde in die Restriktionsschnittstellen *Not*I und *Bam*HI des Vektors pQCXIH *Not*I/*sticky* und *Bam*HI/*blunt* inkloniert.

- d) pQCXIH-L1d(2,27): Die cDNA der L1CAM Spleißvariante (pQCXIH-SV-L1CAM) wurde durch Restriktionsverdau mit *Not*I und *Xba*I aus dem Ursprungsplasmid L1Δ(2,27)-pcDNA3 (erhalten von Peter Altevogt, DKFZ, Heidelberg) ausgeschnitten. Anschließend wurde die cDNA der L1CAM Spleißvariante *Pac*I/*blunt* und *Not*I/*sticky* in pQCXIH inkloniert.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Plasmids pQCXIH-L1d(2,27):** Das Insert SV-L1CAM (blau) wurde in die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *PacI* des Vektors pQCXIH *NotI/sticky* und *PacI/blunt* einkloniert.

- e) pQCXIH-L1d(27): Das Plasmid pQCXIH-L1d(27) wurde freundlicherweise von Prof. Peter Altevogt (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die L1d(27) Isoform enthält nicht das Exon 27 (Aminosäuren: RSLE), ist ansonsten jedoch mit der FL-L1CAM cDNA Sequenz identisch.
- f) pSiren-RetroQ-shL1, pSiren-RetroQ-shscr:  
Die shRNA Oligonukleotide wurden direkt mit 5' *BamHI* und 3' *EcoRI* Schnittstellen designed und bei Eurogentec (Seraing, Belgien) bestellt. Die shRNA wurden über diese Schnittstellen direkt in den retroviralen Vektor pSiren-RetroQ (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) einkloniert.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Plasmids pSiren-RetroQ shL1:** Das Insert shL1/shscr wurde in die Restriktionsschnittstellen 5' *BamHI* und 3' *EcoRI* des Vektors pSiren-RetroQ *BamHI/sticky* und *EcoRI/sticky* einkloniert.

huL1CAM shRNA:

Zielsequenz: AACTTCGGACACACAACCTGA

Position in der L1CAM Gensequenz: 2921

GC-Gehalt: 47,6%

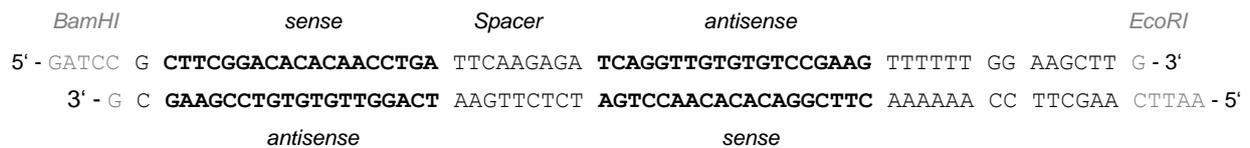
sense Strang der siRNA: CUUCGGACACACAACCUGA

antisense-Strang der siRNA: UCAGGUUGUGUGUCCGAAG

scr-shRNA

Zielsequenz: AGCAATGTCCACACTATAC

Die scrambled Variante der shRNA wurde so ausgesucht, dass sie keine Homologien zu einem bekannten Säugetiergen aufweist. Das Plasmid pSiren-RetroQ-shL1 wurde von Mathias Arlt kloniert und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 7: Schematischer Aufbau der verwendeten shRNAs am Beispiel der humanen L1CAM shRNA.** Die shRNA Oligonukleotide der L1CAM shRNA sind im hybridisierten Zustand abgebildet. Als Spacer Sequenz wurde eine Basenpaarsequenz von einer Länge von 9 Basenpaaren ausgewählt (Brummelkamp et al., 2002b). Über die *Bam*HI und die *Eco*RI Schnittstelle wurden die shRNAs sticky end in den retroviralen Vektor pSiren-RetroQ inkloniert. Vor der *Eco*RI Schnittstelle befindet sich eine *Hind*III Schnittstelle, welche als Restriktionskontrolle fungiert (modifiziert nach Gerg, 2009).

#### 4.4.4 Konstruktion von hairpin siRNAs

In dieser Arbeit wurde die shRNAi-Technologie verwendet, um einen stabilen *knock down* von L1CAM in den humanen Ovarialkarzinomzellen SKOV3ip zu erzielen. Mit dem Programm shRNA *target finder* [http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_design.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html) (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) wurden potentielle Zielsequenzen einer Länge von 19 bp für den *knock down* von L1CAM identifiziert. Es wurde darauf geachtet, dass die Zielsequenz direkt im Anschluss an ein Adenin-Dinukleotid folgt, einen prozentualen Guanin/Cytosin-Gehalt von 40 – 60 % aufweist und mindestens 200 bp nach der Startsequenz ATG der mRNA des L1-Zelladhäsionsmoleküls positioniert war. Die zu der ausgewählten Zielsequenz komplementären Oligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert und von Eurogentec mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Die *hairpin* siRNA wurde mit einem *Bam*HI 5' und einem *Eco*RI 3'- Überhang designed, um das Einklonieren in den Vektor pSIREN-RetroQ (Clontech, Takara Bio Europa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) zu erleichtern. Die zwischen der *sense*- und *antisense*-Sequenz liegende *loop*-Sequenz wurde nach Brummelkamp et al. ausgewählt (Brummelkamp et al., 2002b). Direkt nach der abgebildeten Poly-Thymidin Stopsequenz wurde eine *Hind*III-Schnittstelle eingefügt, sodass die Ligation der *hairpin* siRNA und des Expressionsvektors pSIREN-RetroQ durch einen Restriktionsverdau überprüft werden konnte (Gerg, 2009).

#### 4.4.5 Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA

Für die Transformation von *Top10* Bakterien wurden 50 µl Bakterienzellsuspension langsam auf Eis aufgetaut. 1-100 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA wurde auf 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und 50 µl der chemisch kompetenten Bakterien wurde zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert, 90 Sekunden bei 42 °C erhitzt und nachfolgend wieder 2 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in Bakterienröhrchen, gefüllt

mit 500 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum), gegeben und für 60 min bei 37 °C unter schütteln inkubiert. Anschließend wurde 100-500 µl der Suspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (100 µg Ampicillin/ml) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **4.4.6 DNA-Isolierung aus Bakterien**

##### a) DNA-Minipräparation:

Für die Isolierung von geringen Mengen an Plasmid-DNA aus den zuvor transformierten *E.coli* Bakterien des Stamms *TOP10* wurde ein Plasmid Purification Kit (Mini) der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet, welches auf dem Prinzip der alkalischen Lyse basiert. Am Vortag wurde eine Übernachtskultur in 5 ml LB Medium angeimpft. Hierfür wurden einzelnstehende Bakterienkolonien mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und unter semi-sterilen Bedingungen (neben der Flamme eines Bunsenbrenners) in jeweils 5 ml LB Medium, versetzt mit entsprechendem Selektionsantibiotikum, gegeben. Die Bakterien der Übernachtskultur wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator (*Series25 Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific Inc., New Jersey, USA) kultiviert. Am nächsten Tag wurden jeweils 2 ml der Übernachtskultur abzentrifugiert (6100g; 4°C; 10 min). Die Resuspension der Bakterienpellets erfolgte in 250 µl Puffer 1 (Qiagen, Hilden, Deutschland). In den folgenden Schritten wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die säulengebundene DNA wurde mit 30 µl EB-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) eluiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA anhand von Restriktionskontrollen analysiert. Da die restlichen 3 ml der Übernachtskultur bei 4°C gelagert waren, konnte diejenige Kolonie, die das gewünschte Plasmid enthielt, für eine Präparation größerer Plasmidmengen (Maxipräparation) verwendet werden.

##### b) DNA-Maxipräparation:

Für die Isolierung größerer Plasmidmengen wurde ebenfalls ein Kit der Firma Qiagen (Qiagen Plasmid Purification Kit (Maxi); Qiagen Hilden, Deutschland) verwendet. Am Vortag wurde eine Übernachtskultur aus der Bakterienkolonie, die das gewünschte Plasmid enthielt, und 250 ml LB-Medium, versetzt mit Selektionsantibiotikum, hergestellt. Die Präparation der Plasmid DNA aus *E. coli* Bakterienkulturen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im letzten Schritt wurden die Plasmid-DNA-Pellets in 100 – 250 µl EB-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert. Um die Plasmide auf Richtigkeit zu überprüfen wurden Restriktionskontrollen durchgeführt.

#### 4.4.7 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

##### a) Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben

Nukleinsäure-Proben wurden 1:100 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Als Referenzwert wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet. Anschließend wurde die Konzentration der Nukleinsäure in einer 100 µl Küvette am Photometer (DU® 640 Spectrophotometer, Beckman, Krefeld, Deutschland) gemessen. Die Konzentration der verdünnten Proben wurde über die Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm berechnet. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml (dsDNA), bzw. 40 µg/ml (RNA), sodass die Konzentrationen wie folgt berechnet werden konnten:

RNA-Konzentration:  $c [\mu\text{g} / \mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{l} \times 100$  (Verdünnung).

DNA-Konzentration:  $c [\mu\text{g} / \mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{l} \times 100$  (Verdünnung).

Zusätzlich wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Durch Bestimmung des Quotienten OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> konnte auf die Reinheit der DNA bzw. RNA geschlossen werden. Die angestrebten Quotienten betragen 1,7 - 1,9 für RNA und 1,9 - 2,1 für DNA (Standard Labor).

##### b) Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Hierfür wurde ein Gel aus TAE-Puffer und 1 % Agarose (v/v) verwendet. Als Referenz wurden drei verschiedene Konzentrationen eines Lambda *Hind*III Markers (NEB, Frankfurt a. M., Deutschland) in die drei mittleren Taschen des Agarosegels gefüllt. Die DNA Fragmente (jeweils 1 µl vermengt mit ddH<sub>2</sub>O) wurden seitlich aufgetragen. Das Gesamtvolumen der Markerbanden entsprach jeweils dem Gesamtvolumen der zu bestimmenden DNA-Fragmente. Die Markerbanden wurden bei einer Spannung von 70 V etwa eine Stunde elektrophoretisch aufgetrennt bis die einzelnen Markerbanden gut sichtbar waren. Der Bande des DNA-Fragments mit unbekannter Konzentration (ng/µl) wurde eine Bande des Markers von bekannter Größe (kb) und bekannter Konzentration (ng/µl) zugeordnet. Dadurch konnte die Konzentration der DNA Fragmente berechnet werden, indem die Größe der Markerbande mit ähnlicher Leuchtintensität wie das DNA-Fragment (kb) durch die Gesamtgröße der Summe der Markerbanden (kb) geteilt wurde und mit der Konzentration des aufgetragenen Markers multipliziert wurde (Kopitz, 2005).

$$C_X [\text{ng}/\mu\text{l}] = G_M [\text{bp}] / G_{\text{Lambda}} [\text{bp}] \times C_M [\text{ng}/\mu\text{l}], \text{ wobei}$$

$C_X$  = Konzentration des zu bestimmenden Fragments

$G_M$  = Größe der Markerbande mit gleicher Leuchtintensität

$G_{\text{Lambda}}$  = Gesamtgröße der Phagen DNA

$C_M$  = Konzentration des Markers

#### **4.4.8 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Für die Analyse von Plasmiden sowie für die Präparation von DNA-Fragmenten wurde die doppelsträngige DNA der Plasmide mittels Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) gespalten. Alle enzymatischen Reaktionen wurden bei einer Temperatur von 37°C in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem durchgeführt. Falls mehrere Restriktionsschritte nötig waren wurden diese nacheinander durchgeführt. Zur Aufreinigung der DNA wurde nach jeder Restriktion eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung durchgeführt. Präparative Restriktionen wurden zunächst im analytischen Maßstab etabliert.

#### **4.4.9 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Zum Gießen von Agarosegelen wurde eine Lösung aus TAE-Puffer (40 mM TRIS-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,5) und Agarose hergestellt. Die Agarosekonzentration der Gele richtet sich dabei nach der Fragmentgröße der zu erwartenden Banden. Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden wurde das Gel mit 2,5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (0,05% (w/v) Ethidiumbromid) versetzt. Die zu untersuchenden Proben wurden 1:6 (v/v) mit 6 × DNA-Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) versetzt und in die Geltaschen eingefüllt. Als Standards wurden kommerziell erhältliche 1 kb oder 100 bp DNA-Leitern (GeneRuler™; Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) verwendet. Die Auftrennung der Banden erfolgte bei einer Spannung von 60 - 80V für 60 - 90 min. Durch Zugabe des Ethidiumbromids konnten die DNA-Banden mittels UV-Licht-Bestrahlung (312 nm) sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden mit einem Geldokumentationssystem (Biocapture, LTF, Wasserburg, Deutschland) fotografiert.

#### **4.4.10 Separation und Reinigung von DNA Fragmenten mittels Präparativer Gele und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zum Klonieren verwendete DNA-Fragmente wurden durch Restriktionsverdau gewonnen und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf einen Durchlicht-UV-Tisch gelegt und die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland), entsprechend den Angaben des Herstellers. Alle verwendeten Materialien waren Bestandteile des Kits. Die Elution der säulengebundenen DNA erfolgte mit 30 - 50 µl ddH<sub>2</sub>O. Die Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten DNA-Fragments erfolgte visuell mittels Agarosegelelektrophorese, da die Konzentration der DNA für eine photometrische Konzentrationsbestimmung zu gering war.

#### **4.4.11 Auffüllen von DNA-Überhängen (*blunt-end* Reaktion)**

Für eine *blunt-end* Klonierung wurden DNA-Überhänge, die durch einen Verdau mit Restriktionsendonukleasen entstanden sind, mit dem Enzym T4-Polymerase (Roche, Penzberg, Deutschland) aufgefüllt. Durch Zugabe des Enzyms T4-Polymerase zu den Ansätzen werden 5'-Überhänge der doppelsträngigen DNA aufgefüllt, 3'-Überhänge hingegen werden abgebaut. Die Ansätze wurden zunächst fünf Minuten bei einer Temperatur von 70°C erhitzt und anschließend zwei Minuten abgekühlt. Durch das Erhitzen wurden die Restriktionsenzyme inaktiviert. Da die T4-Polymerase in allen verwendeten Restriktionspuffern aktiv ist, wurden 1 µl T4-Polymerase (1 U) pro µg DNA und 2 µl dNTPs (0,5 mM, Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) direkt zu jedem Ansatz gegeben. Die Proben wurden 5-8 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die T4-Polymerase durch die PCI-Extraktion entfernt (siehe 4.3.12).

#### **4.4.12 Behandlung mit Alkalischer Phosphatase**

Die verwendeten retroviralen Vektoren wurden direkt nach der Restriktion unter Verwendung des Enzyms CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*; Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern. Dem Restriktionsansatz wurde 1 µl CIAP (1 U) zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Ethanol-Fällung wurde das DNA-Pellet in 10 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und es wurden 2 µl 10 × CIAP-Puffer, 1 µl CIAP und 7 µl ddH<sub>2</sub>O zugegeben. Die Phosphatase wurde im Anschluss durch eine PCI-Extraktion, mit nachfolgender Ethanol-Fällung entfernt (siehe 4.3.12). Falls die Dephosphorylierung im Anschluss an eine T4-Polymerasereaktion (*blunt-end* Reaktion) erfolgte, wurde die DNA zuvor PCI gereinigt (siehe 4.3.12).

#### **4.4.13 DNA-Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) und Ethanol-Fällung**

Zur Reinigung der DNA-Lösungen von Proteinen und von zuvor zugeführten Enzymen wurde Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25 : 24 : 1, PCI) verwendet. Die Ansätze wurden je nach Ausgangsvolumen mit PCI auf ein Gesamtvolumen von 100 µl - 300 µl aufgefüllt und durch Vortexen oder durch mehrmaliges Invertieren der Reaktionsgefäße gemischt. Zur Trennung der Phasen wurden die Ansätze anschließend für 5 min bei 18500g und 4°C zentrifugiert. Die oben aufliegende wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt, wodurch die DNA aufkonzentriert wurde und in ein anderes Puffersystem überführt werden konnte. Die wässrige Phase wurde mit 10 % 3 M Natriumacetat (pH 5) und 3 Volumenteilen 98 % kaltem Ethanol (-20°C) versetzt und anschließend eine Stunde bei - 80°C inkubiert. Die Mischung wurde bei 4 °C und 18500g für 30 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zum Waschen mit 100 µl 70 %igem Ethanol überschichtet. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und das Pellet wurde 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das DNA-Pellet wurde zur Resuspension in 10 - 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen (Standard Labor).

#### **4.4.14 Ligation von DNA-Fragmenten**

Für die Ligation von geschnittenen Plasmiden und DNA-Fragmenten mit komplementären Überhängen wurde das Enzym T4-Ligase (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) verwendet. Alle Ligationen wurden mit 5 µl 5 × T4-Ligasepuffer, DNA und T4-Ligase über Nacht bei einer Temperatur von 16°C und einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Anschließend wurden die Ligationen bis zur Transformation bei 4°C gelagert (Standard Labor).

#### **4.4.15 Isolierung von RNA aus Zellen**

Zur RNA Isolierung aus Zellen wurden am Vortag  $2 \times 10^6$  Zellen/5ml (Suspensionszelllinien) oder  $2 \times 10^6$  Zellen/10 cm (adhärente Zelllinien) ausgesät. Suspensionszellen wurden bei 900 U/min für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen. Nach erneutem abzentrifugieren der Zellen (900 U/min) wurden sie in 500 µl Trizol (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) aufgenommen. Adhärente Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde auf die 10 cm Zellschale 1 ml Trizol (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gegeben und die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt. Ab diesem Schritt wurden adhärente Zellen und Suspensionszellen gleich behandelt. Die Ansätze wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit 200 µl Chloroform/ml Trizol versetzt und 15 Sekunden mit einem Vortexer gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Ansätze nach 2-3 minütiger

Inkubation bei RT zentrifugiert (13000 rpm, 15 min, 4 °C). Während der Zentrifugation wurden 500 µl Isopropanol in Eppendorfggefäße vorgelegt. Nach der Zentrifugation der Proben wurde die obere farblose Phase, welche die RNA enthält, abgenommen, in die vorbereiteten 2 ml Eppendorfggefäße überführt und durch Vortexen mit dem vorgelegten Isopropanol vermischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 13000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit nukleasefreiem Ethanol (80 %) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 7600 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet wurde 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 30 µl nukleasefreiem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelagert (Standard Labor).

#### **4.4.16 Isolierung von RNA aus Gewebe**

Gewebeproben von *Omentum majus* Metastasen und Peritonealgewebe von jeweils acht Patientinnen (mittleres Alter: 58,7 ± 3,7 Jahre) mit metastasiertem Ovarialkarzinom wurde freundlicherweise von Professor Dr. Alfons Meindl und Dr. Juliane Ramser der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar zur Verfügung gestellt. Die Gewebeproben wurden mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

#### **4.4.17 Reverse Transkription**

Nach der Isolation der RNA aus Zellen oder aus Gewebe wurde die RNA für 10 min bei 70°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde die RNA auf Eis abgekühlt, um eine Neubildung der Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde am Photometer bestimmt. Die RNA wurde auf eine Konzentration von 500 ng/µl eingestellt. Nach einer erneuten photometrischen Bestimmung der RNA Konzentration wurde die RNA auf die Endkonzentration von 100 ng/µl verdünnt. Die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Bei nicht degradiertem RNA sind 2 bzw. selten 3 Banden erkennbar gewesen, die den 28S, 18S und 5S RNA Banden entsprechen. Für die reverse Transkription wurden 1 µg RNA (c = 100 ng/µl) in 200µl PCR-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 2 µl Random Hexameren (100 ng/µl; Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) wurden die Ansätze 10 min bei 70 °C in einer PCR-Maschine (Eppendorf Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in ein Salz-Eiswasserbad gestellt. Zu allen Ansätzen wurden 4 µl 5 × RT-Puffer, 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl reverse Transkriptase (SuperskriptII, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1 µl RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) und 1 µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O hinzugegeben. Die Ansätze wurden 1 h bei 42 °C inkubiert. Die cDNAs

wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die relative Quantifizierung von cDNAs wurde davon ausgegangen, dass die reverse Transkription von 1 µg mRNA 1 µg cDNA ergibt (Standard Labor).

#### **4.4.18 *Real Time*-Polymerasekettenreaktion (TaqMan™-RT-PCR)**

Für die qRT-PCR wurden jeweils 10 µl mRNA (1 µg mRNA entsprechend) in einem 20 µl Reaktionsansatz revers transkribiert. Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, dass bei der reversen Transkription von 1 µg RNA 1 µg cDNA entsteht. Die verwendete cDNA hat somit annäherungsweise eine Konzentration von 50 ng/µl. Zur quantitativen Bestimmung von mRNA Expressionswerten wurde die *Real Time*-PCR (quantitative RT-PCR) verwendet. Sie basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Durch die Polymerase-vermittelte Freisetzung von Fluoreszenzmolekülen aus den TaqMan-Proben kann über Fluoreszenz-Messungen die Menge an mRNA bzw. cDNA quantitativ nachgewiesen werden. Um die Genexpression unterschiedlicher Proben vergleichen zu können, wurde jede Probe gegen die Expression des *Housekeeping Gens* 18S abgeglichen. Bei allen angegebenen Werten handelt es sich somit um eine relative Genexpression, welche gegen die Genexpression von 18S RNA dividiert wurde. Die Messung der einzelnen Proben wurde in 96-well Platten (Optical™ Plates, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Werte der zu bestimmenden Proben und die Werte der jeweiligen 18S RNA wurden gegen eine Standardgerade abgeglichen. Für den 18S Standard wurden 1 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,125 ng, 0,0625 ng und 0,03125 ng Gesamt-cDNA eingesetzt. Für die Standardkurve des zu bestimmenden Zielgens wurden 20 ng, 10 ng, 5 ng, 2 ng, 1 ng und 0,5 ng Gesamt-cDNA pro well eingesetzt. Für die Bestimmung der 18S Werte der einzelnen Proben wurden Triplets von je 1 ng cDNA pro well eingesetzt, während für die Bestimmung der Expressionswerte des Zielgens 5 ng cDNA pro Well eingesetzt wurden. Zu den Ansätzen wurden 12,5 µl PCR-Master Mix (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 1,25 µl Primer/Probe Zusammensetzung (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und 1,25 µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O zugegeben. Die Probenmessung wurde mit dem TaqMan-Gerät 7900HT ABI Prism (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit der *Sequence Detection Software* SDS2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Zur Auswertung wurde das Programm SDS2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Primer-Probe-Zusammensetzungen (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland):

18S ID: 4319413E (18S)

humane GAPDH ID: 4352934E (GAPDH)

humanes L1Exon27 ID: Hs01109766\_g1 (L1CAM)

humanes L1CAM ID: Hs00240928\_m1 (L1CAM)

murines L1CAM ID: Mm00493049\_m1 (L1cam)

## **4.5 Proteinbiochemische Verfahren**

### **4.5.1 Isolierung von Proteinen aus Zellen**

Am Vortag der Proteinisolierung wurde eine definierte Zellzahl ausgesät:  $2 \times 10^6$  Zellen/5ml (Suspensionszelllinien) oder  $2 \times 10^6$  Zellen/10 cm (adhärente Zelllinien). Die Suspensionszellen und die adhärenen Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Bei Suspensionszellen wurde nach einem Zentrifugationsschritt (900 g, 5 min, 20°C) der Überstand verworfen und das Zellpellet in 400 µl  $10 \times$  Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) aufgenommen. Das Zelllysate wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Adhärenente Zellen wurden nach dem Waschen mit 400 µl  $1 \times$  Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) überschichtet, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber abgelöst. Ab diesem Schritt wurden Suspensionszellen und adhärenente Zellen gleich behandelt. Die Ansätze wurden zur Verminderung der Viskosität durch Zerkleinerung der genomischen DNA 5 min in ein Ultraschallbad gestellt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (6100 g; 10 min, 4°C). Die Proteinlösung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur Langzeitlagerung bei - 80°C weggefroren.

### **4.5.2 Proteinbestimmung mit BCA<sup>TM</sup> von Pierce**

Die Proteinkonzentration von Lösungen wurde mit dem Assay BCA<sup>TM</sup> von Pierce (Rockford, USA) bestimmt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:100 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Für die Standardmessungen wurden BSA-Lösungen mit einer Konzentration von 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 und 0,0625 mg/ml vorbereitet und in einer 96-well Flachbodenplatte (TPP, Trasadingen, Schweiz) vorgelegt. Es wurden jeweils 10 µl der Proben bzw. des Standards vorgelegt. Zu jedem Ansatz wurden 200 µl BCA<sup>TM</sup>-Reagenz (1 Volumenteil BCA<sup>TM</sup>-Lösung A + 49 Volumenteilen BCA<sup>TM</sup>-Lösung B) zugegeben. Nach einer Inkubation der Ansätze für 30 min bei 37°C erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lösungen mittels Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 570 nm (Wallac Victor<sup>3</sup>, Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland). Mit der SigmaPlot Version 8.0 wurden mit Hilfe der bekannten

BSA Konzentrationen Standardgeraden erstellt, wodurch die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden konnte (Standard Labor).

### 4.5.3 Western Blot Analyse

Für den Nachweis der L1CAM Genexpression der hergestellten Zelllinien auf Proteinebene wurden Western Analysen durchgeführt. Als erstes wurden ein Trenngel von 1,5 mm Dicke und ein Sammelgel gegossen, welches für mind. eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet wurde. Zusammensetzung für zwei Trenngele (8%): 17, 2 ml H<sub>2</sub>O, 6 ml Polyacrylamid (PAA; 29:1), 7,5 ml 1,5 M TRIS (pH8,6; + 0,4% SDS), 10% (w/v) APS und 12 µl TEMED. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen. Zusammensetzung für zwei Sammelgele: 6 ml H<sub>2</sub>O, 1,25 PAA (29:1), 2,5 ml, 0,5 M TRIS (pH 6,8), 0,1 ml 10% (w/v) SDS, 0,1 ml 10% (w/v) APS, 10 µl TEMED. Im nächsten Schritt wurden die Proben vorbereitet. Es wurden jeweils 30 bis 40 µg Gesamt-Protein pro Spur aufgetragen. Das Volumen der Proben wurde mit ddH<sub>2</sub>O angeglichen. Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit 4 µl 5 × Laemmli-Auftragspuffer (1 M TRIS, 40% (v/v) Glycerin, 8% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt. Das aufgetragene Gesamtvolumen war dabei nicht größer als 40 µl. Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Als Molekulargewichtsmarker wurden 10 µl *Precision Plus Protein Standard* (BioRad, München, Deutschland) in eine Tasche auf jedem Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 60 mA für 1,5 Stunden. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (G&E Healthcare, München, Deutschland) erfolgte mit Hilfe einer *Semi-Dry* Blotting Apparatur (BioRad, München, Deutschland). Bei einer konstanten Stromstärke von 250 mA wurden in einem Zeitraum von zwei Stunden die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde anschließend für 5 min in 1 × TBS/T-Puffer (2,42 g/l TRIS, 8 g/l NaCl, 0,1 % Tween, pH 7,6) gewaschen. Danach wurde das auf der Membran gebundene Protein durch Ponceau S Färbung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) nachgewiesen. Anschließend wurde die Membran in 1 × TBS/T-Puffer gewaschen. Das Blocken erfolgte durch Schwenken der Membran in 5 % (w/v) Magermilch (Applichem, Darmstadt, Deutschland) in 1 × TBS/T-Puffer für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran dreimal 10 min in 1 × TBS/T Puffer gewaschen. Zum Nachweis der Proteine wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (mAb L1-11A, gegen die zytoplasmatische Domäne von L1CAM gerichtet) verdünnt in 1 × TBS/T inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran mindestens viermal 10 min mit 1 × TBS/T-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit dem Sekundärantikörper für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach

erneut viermal für ca. 10 min mit  $1 \times$  TBS/T-Puffer gewaschen. Für die Detektion wurden je 1 ml der Lösungen 1 und 2 des Lumi-Light Kits der Firma Roche Diagnostics (Penzberg, Deutschland) gemischt und auf die Membran gegeben. Nach Inkubation der Membran für 3 min im Dunkeln wurde die emittierte Lumineszenz mit einer Kodak Imagestation 440 CF (Kodak, Stuttgart, Deutschland) nachgewiesen. Die densitometrische Auswertung erfolgte ebenfalls an der Kodak Imagestation. Hierfür wurde die L1CAM Proteinmenge der einzelnen Banden gegen die  $\alpha$ -Tubulin Konzentration normalisiert.

### **4.6 Statistische Analysen**

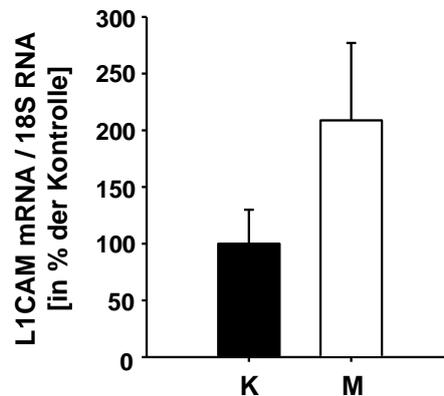
Für die statistische Analyse der Ergebnisse aus Metastasierungsexperimenten und quantitativen RT-PCR Analysen wurde der Mann-Whitney Rank-Sum-Test angewendet. Ein p-Werte  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Identifikation der neuronalen (FL-L1) und nicht-neuronalen L1CAM Variante (SV-L1) in humanen Gewebeproben von Metastasen ovariellen Ursprungs

#### 5.1.1 Induktion der L1CAM Expression in *Omentum majus* Metastasen von Ovarialkarzinompatientinnen im Vergleich zum Kontrollgewebe

Um zu untersuchen, inwiefern die Expression des L1 Zelladhäsionsmoleküls in Metastasen ovariellen Ursprungs im Vergleich zum gesunden Kontrollgewebe (Peritonealgewebe) erhöht ist, wurde quantitative RT-PCR verwendet. Die Gesamt-L1CAM Expression in humanen Gewebeproben von *Omentum majus* Metastasen ovariellen Ursprungs wurde gemessen und mit der Gesamt-L1CAM Expression des Kontrollgewebes verglichen. Als Kontrollgewebe wurde Peritonealgewebe verwendet. Das Peritonealepithel entsteht - wie auch das einschichtige Oberflächenepithel des Ovars - vom Zölomepithel. Aufgrund des identischen Ursprungs der beiden Gewebetypen eignet sich das Peritonealepithelgewebe als Kontrollgewebe für das Oberflächenepithel des Ovars (Schmalfeldt, 2007).



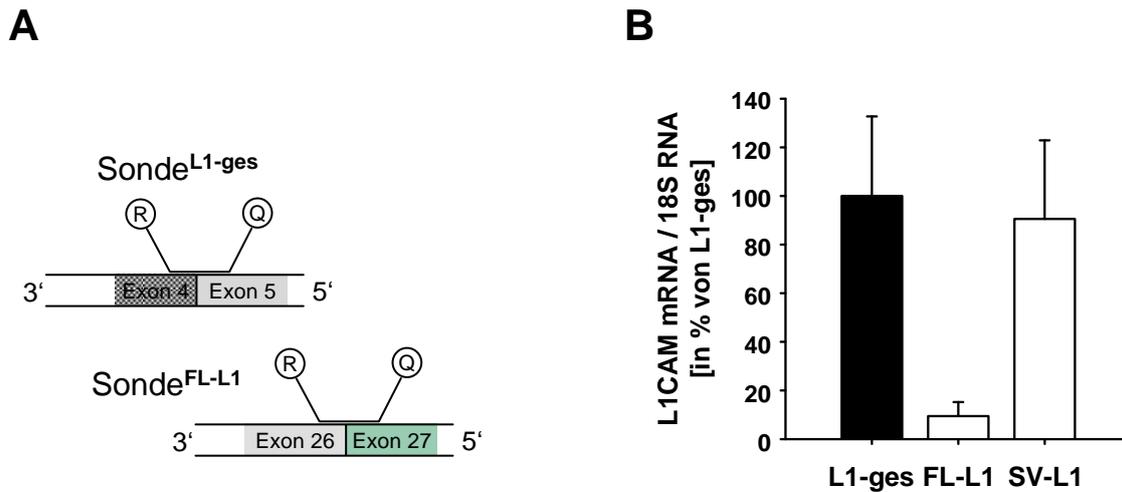
**Abbildung 8: Induktion der L1CAM Expression in Metastasen ovariellen Ursprungs im Vergleich zum Kontrollgewebe.** Die Gesamt-L1CAM Expression wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Aus humanen Gewebeproben von *Omentum majus* Metastasen des Ovarialkarzinoms (M; n = 8) und des entsprechenden Kontrollgewebes (K; n = 8) wurde die Gesamt-RNA isoliert und revers transkribiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler der L1CAM mRNA Expression normalisiert gegen 18S RNA (Kontrollgewebe: 100,0 ± 29,9 %; Netzmetastasen: 208,7 ± 68,3 %).

Zur Bestimmung des L1CAM Expressionsspiegels wurde die gesamte RNA aus jeweils acht humanen Gewebeproben der *Omentum majus* Metastasen und des Peritonealepithels isoliert und revers transkribiert. Anschließend wurden die L1CAM-Expressionsspiegel der jeweiligen Gewebeproben mittels RT-PCR bestimmt. In den *Omentum majus* Metastasen der

Ovarialkarzinompatientinnen wurde im Vergleich zum Kontrollgewebe eine zweifache Erhöhung des L1CAM Expressionsspiegel nachgewiesen (Abb. 8).

### **5.1.2 Überwiegender Anteil der L1CAM-Spleißvariante an der Gesamt-L1CAM-Expression in *Omentum majus* Metastasen des Ovarialkarzinoms**

Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM besteht aus 28 Exons und wird gewebespezifisch als FL-L1CAM Variante oder als SV-L1CAM Variante exprimiert. Bisher ist noch nicht bekannt welche der beiden Varianten überwiegend in *Omentum majus* Metastasen von Ovarialkarzinompatientinnen exprimiert wird. Von den meisten Tumorzelllinien und in Gewebe außerhalb des Zentralen Nervensystems wird überwiegend die alternativ gespleißte Variante von L1CAM exprimiert (Shtutmann et al., 2006). Um das Expressionsverhältnis der beiden L1CAM Varianten in den *Omentum majus* Metastasen der Ovarialkarzinompatientinnen zu analysieren, wurde die Gesamt-RNA aus Gewebeproben von *Omentum majus* Metastasen ovariellen Ursprungs isoliert und revers transkribiert. Anschließend wurden die jeweiligen Expressionsspiegel mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. Zur Unterscheidung der beiden L1CAM Varianten wurden spezifische TaqMan Assays verwendet. Um die Expression von FL-L1CAM zu bestimmen, welche das Exon 27 enthält, wurde ein TaqMan Assay verwendet, der spezifisch an diese Region bindet bzw. dieses Exon überspannt. Da das Spleißen der Exons 2 und 27 gekoppelt ist (Jouet et al., 1995; De Angelis et al., 2001; Shtutman et al., 2006), wird durch diesen Assay FL-L1CAM, nicht jedoch die L1CAM Spleißvariante (SV-L1CAM) erkannt. Zur Bestimmung des Gesamt-L1CAM Expressionslevels wurde eine TaqMan Sonde verwendet, die das Exon 4 und 5 des L1 Zelladhäsionsmoleküls überspannt und folglich beide L1CAM Varianten detektiert (Abb. 9, A). Durch Subtraktion des FL-L1CAM Expressionsspiegels von der Gesamt-L1CAM Expression wurde der Expressionsspiegel der L1CAM-Spleißvariante errechnet. In den *Omentum majus* Metastasen der Ovarialkarzinompatientinnen wurden beide Varianten von L1CAM nachgewiesen, wobei SV-L1CAM den überwiegenden Anteil an der L1CAM Expression in den *Omentum majus* Metastasen ausmachte. Zu einem Anteil von 90,5% wurde SV-L1CAM exprimiert, während FL-L1CAM einen Anteil von 9,5% an der Gesamt-L1CAM Expression ausmachte (Abb. 9, B).



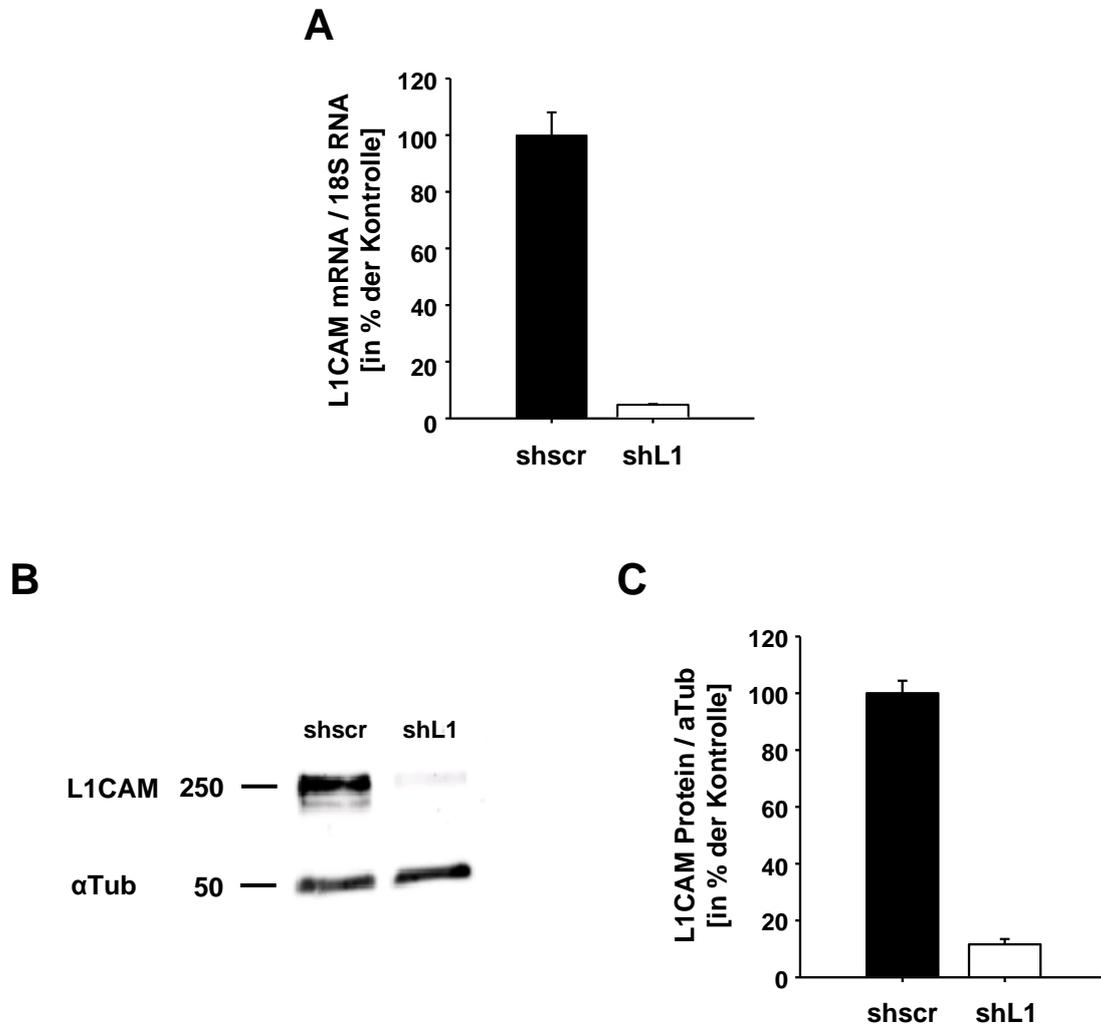
**Abbildung 9: Expression von FL-L1CAM und SV-L1CAM in *Omentum majus* Metastasen des Ovarialkarzinoms.** A, Bestimmung der L1CAM Expression mittels quantitativer RT-PCR unter Verwendung einer spezifischen Primer/Probe Zusammensetzung, die beide L1CAM Varianten erkennt (Sonde<sup>L1-ges</sup>) und einer spezifischen Primer/Probe Zusammensetzung, welche das Exon 27 überspannt, und folglich nur FL-L1CAM detektiert (Sonde<sup>FL-L1</sup>). B, in den Ovarialkarzinometastasen wurden die Varianten FL-L1CAM (FL-L1) und SV-L1CAM (SV-L1) in einem Verhältnis von 2:19 exprimiert. Mittelwerte mit Standardfehler der Expression der Gesamt-L1CAM mRNA, der FL-L1CAM mRNA sowie der SV-L1CAM mRNA in den *Omentum majus* Metastasen der Ovarialkarzinompatientinnen (n = 8) normalisiert gegen 18S RNA (L1-ges: 100,0 ± 32,7%; FL-L1: 9,5 ± 5,8%; SV-L1: 90,5 ± 32,3%).

## 5.2 Signifikante Reduktion des *in vitro* und *in vivo* Invasionspotentials der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip durch einen simultanen *knock down* der L1CAM Isoformen

### 5.2.1 Simultaner *knock down* von SV-L1CAM und FL-L1CAM in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip

Da der Expressionsspiegel des Zelladhäsionsmoleküls L1 in Metastasen des Ovarialkarzinoms im Vergleich zum gesunden Kontrollgewebe deutlich erhöht war, sollte als nächstes die Bedeutung von L1CAM bei der Invasion von Ovarialkarzinomzellen untersucht werden. Zunächst wurde das L1CAM Expressionsmuster in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie analysiert. Eine Analyse der Gesamt-L1CAM mRNA der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip ergab eine überwiegende Expression von SV-L1CAM im Vergleich zu der FL-L1CAM Expression (unveröffentlichte Daten Stephanie Hauser). Um den Einfluss von L1CAM auf das invasive Potential der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip zu untersuchen, wurde mittels RNA Interferenz die endogene Expression des L1CAM Genprodukts supprimiert. Mit der Methode des retroviralen Gentransfers wurde eine zu der Sequenz der L1CAM mRNA komplementäre shRNA in die *lacZ*-markierten SKOV3ip

Zellen eingebracht (shL1). Die verwendete shRNA war gegen das Exon 22 des L1 Zelladhäsionsmoleküls gerichtet (Zielsequenz: AACTTCGGACACACAACCTGA). Als Kontrolle wurde eine *scrambled*-shRNA in SKOV3ip Zellen eingebracht (Zielsequenz: AGCAATGTCCACACTATAC).

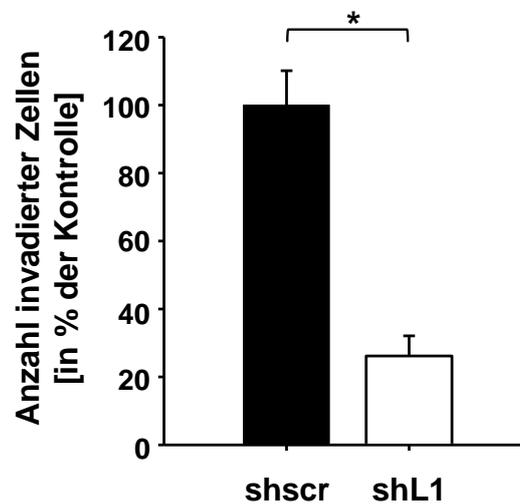


**Abbildung 10: Simultaner knock down von Gesamt-L1CAM in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip.** *A-C*, Reduktion der endogenen *L1CAM* Expression auf mRNA Ebene um 95% und auf Proteinebene um 88% (shL1) im Vergleich zur Kontrolle (shscr). Der *knock down* von L1CAM wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Zuvor wurde die Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinien (SKOV3ip-shscr und SKOV3ip-shL1) isoliert und revers transkribiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der L1CAM Expression mit Standardfehler normalisiert gegen die 18S RNA Expression (shscr: 100,0 ± 8,0 %; shL1: 4,8 ± 0,3 %). **B und C**, Reduktion der L1CAM Expression auf Proteinebene. Gesamt-Protein aus den Zelllinien SKOV3ip-shscr und SKOV3ip-shL1 wurde isoliert. **B**, die L1CAM Protein Expression wurde im Western Blot detektiert. **C**, Mittelwerte der Proteinwerte mit Standardfehler (shscr: 100,0 ± 4,4 %; shL1: 11,6 ± 1,8 %).

Die Reduktion der L1CAM Expression der retroviral transduzierten Zelllinien (SKOV3ip-shscr und SKOV3ip-shL1) wurde mittels RT-PCR auf mRNA Ebene und mittels Western Blot auf Proteinebene quantitativ analysiert. Durch den retroviralen Gentransfer der gegen L1CAM gerichteten shRNA in die humane Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip konnte die endogene L1CAM Expression auf mRNA Ebene im Vergleich zur Kontrollzelllinie um 95% signifikant reduziert werden (Abb. 10, A). Auf Proteinebene wurde ein simultaner *knock down* der L1CAM Varianten von 88% erzielt (Abb. 10, C).

### 5.2.2 Signifikante Reduktion der *in vitro* Invasion durch den *knock down* von L1CAM

Um die Auswirkung der endogenen L1CAM Expression auf die invasiven Eigenschaften der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip *in vitro* zu bestimmen, wurde ein Matrigel™ Invasionsassay verwendet. Die Membraneinsätze der *Boyden Chambers* wurden mit Matrigel beschichtet. In das obere Kompartiment wurden  $1 \times 10^5$  SKOV3ip-shL1 oder SKOV3ip-shscr Zellen in serumfreiem Zellkulturmedium ausgesät. Dem Medium im unteren Kompartiment wurde 10% Serum als Chemoattraktant zugegeben. Um die Invasionseigenschaften der Zelllinien zu vergleichen, wurde jeweils die Anzahl der Zellen, welche an der Unterseite der Membran hafteten und folglich durch die mit Matrigel beschichtete Membran hindurch invadiert sind, bestimmt.

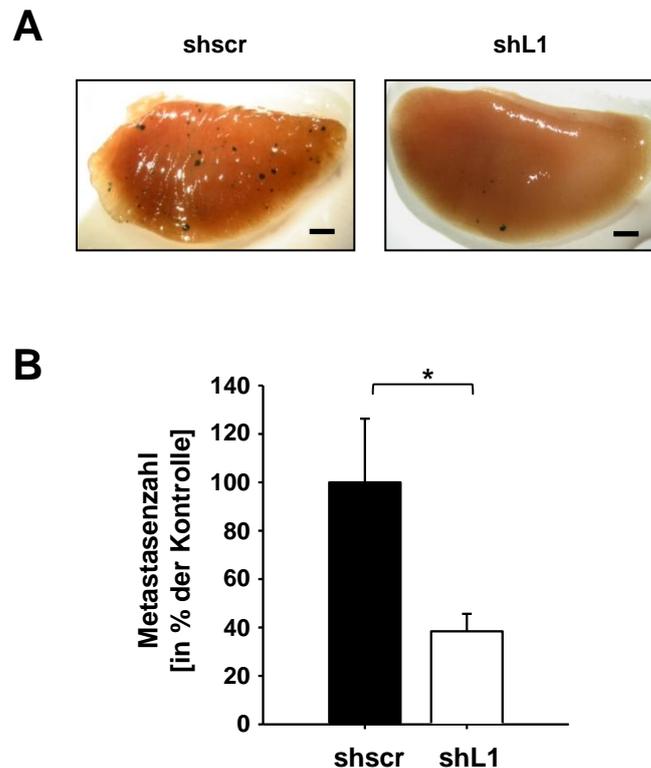


**Abbildung 11: Reduktion des *in vitro* Invasionspotentials der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip durch den simultanen *knock down* von L1CAM.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Anzahl der invadierten Zellen an der Unterseite der mit Matrigel beschichteten Membran (shscr: 100,0 ± 10,1 %; shL1: 26,2 ± 5,9 %). Die Anzahl der invadierten Zellen war durch den simultanen *knock down* der L1CAM Varianten (shL1) im Vergleich zur Kontrolle (shscr) signifikant reduziert.

Die an der Unterseite der Membran haftenden Zellen wurden fixiert, angefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Der *knock down* von L1CAM in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip führte zu einer Reduktion der Anzahl invadierter Zellen um 74% im Vergleich zur Kontrollzelllinie SKOV3ip-shscr (Abb. 11;  $p < 0,05$ ).

### 5.2.3 Reduktion der experimentellen Lungenmetastasierung *in vivo* durch den simultanen *knock down* der L1CAM Varianten

Um den Einfluss von *L1CAM* auf das metastatische Potential von Ovarialkarzinomzellen *in vivo* zu untersuchen, wurde ein experimentelles *Xenograft*-Maus-Modell etabliert. Die Kontrollzelllinie SKOV3ip-shscr und die Zelllinie SKOV3ip-shL1 mit supprimierter endogener L1CAM Expression wurden hinsichtlich ihres metastatischen Potentials verglichen.

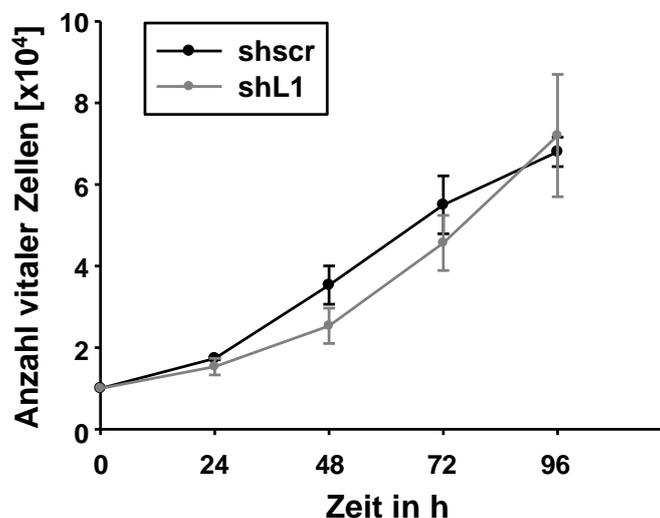


**Abbildung 12: Reduktion der Anzahl metastatischer Kolonien durch die Suppression der endogenen L1CAM Expression in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip. A und B, am 26. Tag nach der Tumorzellinokulation wurde der linken Lungenflügel mit der X-Gal Färbemethode gefärbt, wodurch sich die *lacZ*-markierten Tumorzellen auf der Lungenoberfläche anfärbten. A, Fotos von repräsentativen Lungen der beiden Versuchsgruppen (SKOV3ip-shscr (links) und SKOV3ip shL1 (rechts)). B, die Anzahl der X-Gal gefärbten Metastasen auf der Lungenoberfläche war durch den *knock down* von L1CAM (shL1) im Vergleich zur Kontrolle (shscr) signifikant um 62% reduziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler prozentual zur Kontrolle (shscr: 100,0% ± 26,3%; shL1: 38,4% ± 7,3%).**

An Tag 26 nach der Inokulation von  $5 \times 10^5$  Tumorzellen in die *Vena caudalis* von immunsupprimierten *CD1nu/nu* Mäusen wurde die Metastasenzahl der beiden Gruppen bestimmt. Durch die Inkubation des linken Lungenflügels in X-Gal-Lösung wurden die mit dem Reportergen *lacZ* markierten Ovarialkarzinomzellen angefärbt und erschienen blau auf der Lungenoberfläche (Abb. 12, A). Der *knock down* von L1CAM in der SKOV3ip Zelllinie führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Lungenmetastasen um 62% ( $p < 0,05$ ,  $n_1 = 6$ ,  $n_2 = 10$ ,  $n_{\text{ges}} = 16$ , Abb. 12, B). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine Reduktion des invasiven Potentials der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, bedingt durch die Suppression der endogenen L1CAM Expression.

#### 5.2.4 Kein signifikanter Einfluss der Reduktion der endogenen L1CAM Expression auf die *in vitro* Proliferation der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip

Um den Einfluss der endogenen exprimierten L1CAM Isoformen (FL-L1 und SV-L1) auf das Proliferationspotential der SKOV3ip Zelllinie *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Trypanblau Proliferationsassay durchgeführt. Hierfür wurden  $1 \times 10^4$  Zellen/*well* in Triplets in 6-*well* Flachbodenplatten ausgesät.



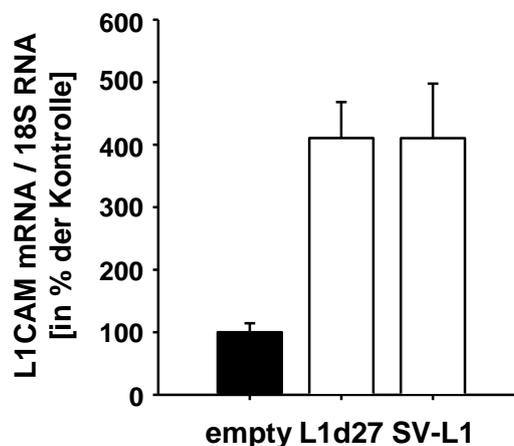
**Abbildung 13: Kein signifikanter Einfluss des simultanen L1CAM *knock down* auf das *in vitro* Proliferationspotential der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip.** Durch den *knock down* der beiden Isoformen FL-L1 und SV-L1 war die Proliferation der SKOV3ip-shL1 Zelllinie im Vergleich zu der Kontrollzelllinie SKOV3ip-shscr nicht signifikant verändert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Anzahl vitaler Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten (shscr: 0h:  $1,0 \pm 0,0$ , 24h:  $1,7 \pm 0,0$ , 48h:  $3,5 \pm 0,4$ , 72h:  $5,5 \pm 0,7$ , 96h:  $6,8 \pm 0,4$ ; shL1: 0h:  $1,0 \pm 0,0$ , 24h:  $1,5 \pm 0,2$ , 48h:  $2,5 \pm 0,4$ , 72h:  $4,6 \pm 0,7$ , 96h:  $7,2 \pm 1,5$ ).

Die Anzahl vitaler Zellen wurden in einem Zeitraum von 96 Stunden alle 24 Stunden bestimmt. Die Zellzahl der SKOV3ip Zelllinie mit supprimierter L1CAM Expression (shL1) und die Zellzahl der Kontrollzelllinie (shscr) wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass der simultane *knock down* der L1CAM Varianten keinen signifikanten Einfluss auf die *in vitro* Proliferation von SKOV3ip Zellen hat (Abb. 13).

### 5.3 Einfluss der L1CAM Spleißvariante und der L1 $\Delta$ 27 Variante auf das metastatische Potential der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip

#### 5.3.1 Überexpression der L1CAM Spleißvariante und der L1 $\Delta$ 27 Variante in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip

Durch die Suppression der endogenen L1CAM Expression in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip konnte der Beitrag der Gesamt-L1CAM Expression zur Metastasierung untersucht werden. Ziel war es den Beitrag der L1CAM Spleißvariante, welche überwiegend in den *Omentum majus* Metastasen der Ovarialkarzinompatientinnen exprimiert wurde, und der L1 $\Delta$ 27 Variante auf die Metastasierung im Ovarialkarzinom zu untersuchen.



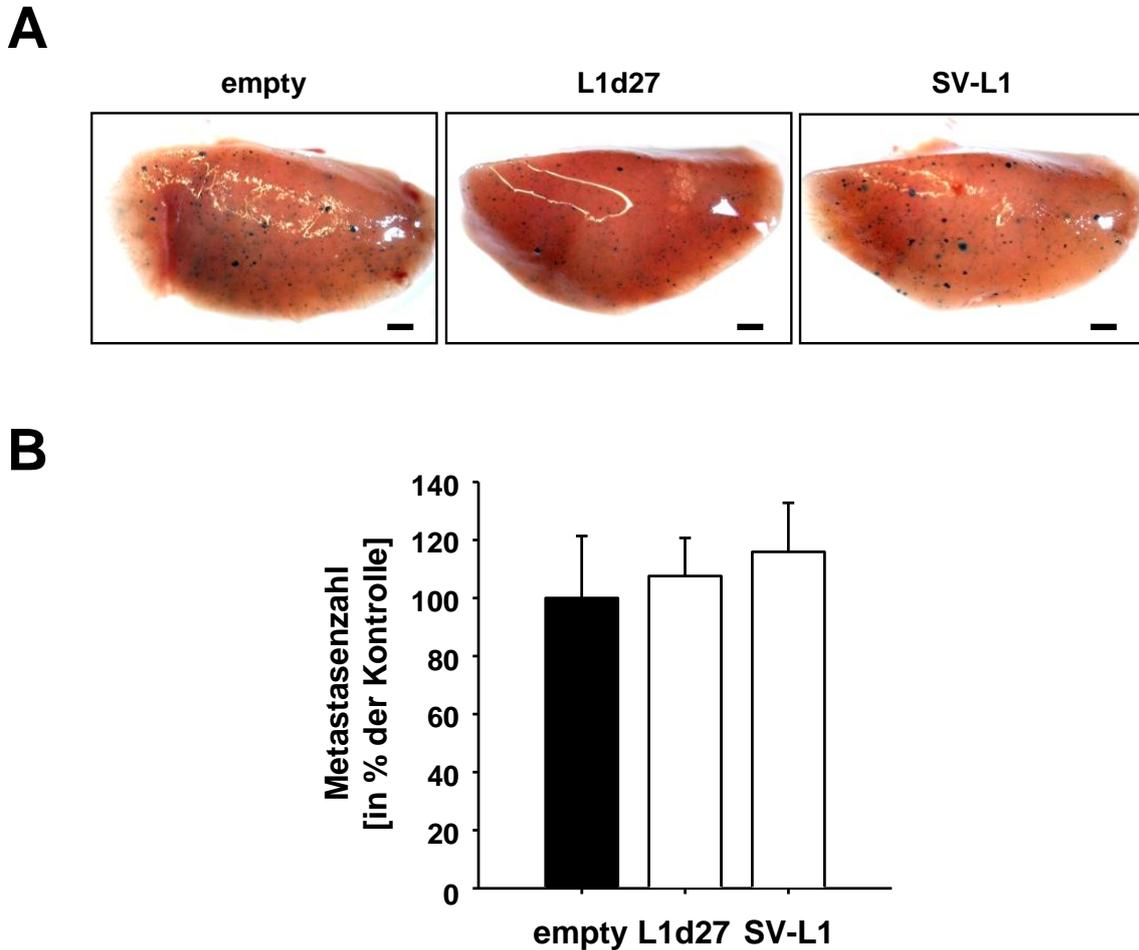
**Abbildung 14: Überexpression von L1 $\Delta$ 27 und SV-L1 in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip mittels retroviralem Gentransfers.** Die Gesamt-RNA der SKOV3ip Zelllinien wurde isoliert und revers transkribiert. Die L1CAM Expression in der Zelllinie SKOV3ip wurde mittels RT-PCR auf mRNA Ebene quantitativ analysiert. Im Vergleich zur mit Leervektor transduzierten Kontrollzelllinie war die L1CAM Expression in der L1 $\Delta$ 27 bzw. in der SV-L1CAM überexprimierenden Zelllinie 4,1-fach erhöht. Dargestellt sind die Mittelwerte der L1CAM mRNA Expression mit Standardfehler normalisiert gegen 18S RNA (empty: 100,0 ± 14,3 %; L1 $\Delta$ 27: 410,5 ± 57,6 %; 410,4 ± 87,2 %).

Hierfür wurden *lacZ* markierte SKOV3ip Zellen retroviral mit einem für die L1CAM Spleißvariante (SV-L1CAM) oder einem für L1 $\Delta$ 27 kodierenden Vektor transduziert. Die Kontrollzelllinie wurde mit einem Leervektor transduziert (empty). Die Gesamt-L1CAM Expression der beiden Zelllinien wurde mittels quantitativer RT-PCR auf mRNA Ebene bestimmt. Mit der Methode des retroviralen Gentransfers wurde eine 4,1 fache Erhöhung der SV-L1CAM Variante bzw. der L1 $\Delta$ 27 Variante im Vergleich zu der mit Leervektor transduzierten Kontrollzelllinie erzielt (Abb. 14).

### **5.3.2 Keine signifikant erhöhte Anzahl der Lungenmetastasen durch die Überexpression der Varianten SV-L1CAM und L1 $\Delta$ 27 in den Tumorzellen**

Durch den *knock down* von L1CAM wurde die Expression von SV-L1CAM sowie von FL-L1CAM unter Verwendung der shRNA Technologie supprimiert. Folglich wurde mit dieser Methode der Beitrag der Gesamt-L1CAM Expression bei der Metastasierung bestimmt. Mittels der shRNA-Technologie war es nicht möglich einen spezifischen *knock down* einer der beiden Varianten zu erzielen, da mittels *Blast Search* weder komplementär zu den Exon Übergängen 1/3 oder 26/28 für den spezifischen *knock down* der L1CAM Spleißvariante noch zu den Exons 2 oder 27 für den spezifischen *knock down* der FL-L1CAM Variante komplementäre shRNA Sequenzen gefunden werden konnten. Da in den Gewebeproben von *Omentum majus* Metastasen der Ovarialkarzinompatientinnen überwiegend die alternativ gespleißte Isoform von L1CAM exprimiert wurde, sollte zunächst der Effekt der L1CAM Spleißvariante auf die späten Phasen der hämatogenen Metastasierung untersucht werden. Um die Bedeutung des Exons 2 auf die Metastasierung zu evaluieren, wurde ebenfalls die L1 $\Delta$ 27 Variante (L1 $\Delta$ 27), welche im Gegensatz zur L1CAM Spleißvariante das Exon 2 beinhaltet, überexprimiert. Unter Verwendung der Methode des retroviralen Gentransfers wurde jeweils SV-L1CAM oder L1 $\Delta$ 27 in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip überexprimiert. Als Kontrolle wurde eine mit Leervektor transduzierte Zelllinie (empty) mitgeführt. Durch die Injektion von  $5 \times 10^5$  Zellen der Zelllinien SKOV3ip-empty, SKOV3ip-SV-L1CAM und SKOV3ip-L1 $\Delta$ 27 in die *Vena caudalis* weiblicher CD1 $nu/nu$  Mäuse wurde die experimentelle Lungenmetastasierung dieses Modells induziert. Die drei Zelllinien mit modulierter L1CAM mRNA Expression wurden an Tag 26 nach der Tumorzellinjektion hinsichtlich ihres metastatischen Potentials in die Lunge verglichen. Weder die Überexpression der L1CAM Spleißvariante noch die Überexpression der L1 $\Delta$ 27 Variante führte im Vergleich zu der mitgeführten Kontrollzelllinie zu einer signifikanten Änderung der Anzahl an Lungenmetastasen. Durch die Überexpression von SV-L1CAM ergab sich im Vergleich zur

L1 $\Delta$ 27 Variante ebenfalls keine signifikante Änderung der Anzahl der Lungenmetastasen (Abb. 15;  $p = 0,628$ ,  $p = 1$ ,  $p = 0,628$ ,  $n_1 = 7$ ,  $n_2 = 6$ ,  $n_3 = 7$ ,  $n_{\text{ges}} = 20$ ).

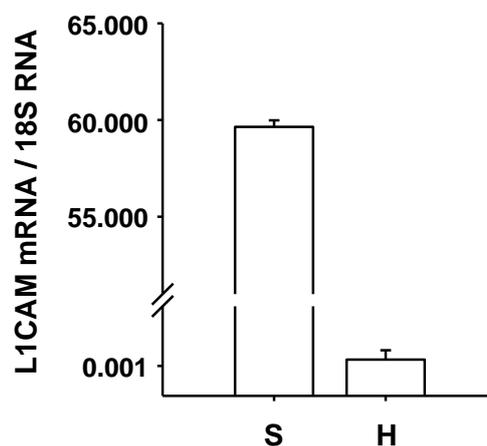


**Abbildung 15: Die Überexpression von SV-L1CAM zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Metastasierungspotential der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip.** **A**, Darstellung repräsentativer X-Gal gefärbter Lungen der jeweiligen Versuchsgruppen: kein signifikanter Unterschied der Metastasenzahl L1 $\Delta$ 27 (L1d27) und SV-L1 Gruppe im Vergleich zur Kontrolle. **B**, dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der Metastasen mit Standardfehler der jeweiligen Versuchsgruppen prozentual zur Kontrolle (empty: 100,0 ± 21,4 %; L1 $\Delta$ 27: 107,6 ± 13,1 %; SV-L1: 115,9 ± 16,9 %). Die Anzahl der X-Gal gefärbten Metastasen auf der Lungenoberfläche wurde verglichen mit der Kontrolle, weder durch die Überexpression der L1CAM Spleißvariante noch durch die Überexpression von L1 $\Delta$ 27 signifikant verändert.

## 5.4 Einfluss von neuronalem und nicht-neuronalem L1CAM auf das Metastasierungspotential der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080

### 5.4.1 Endogener L1CAM Expressionsspiegel der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip und der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 im Vergleich

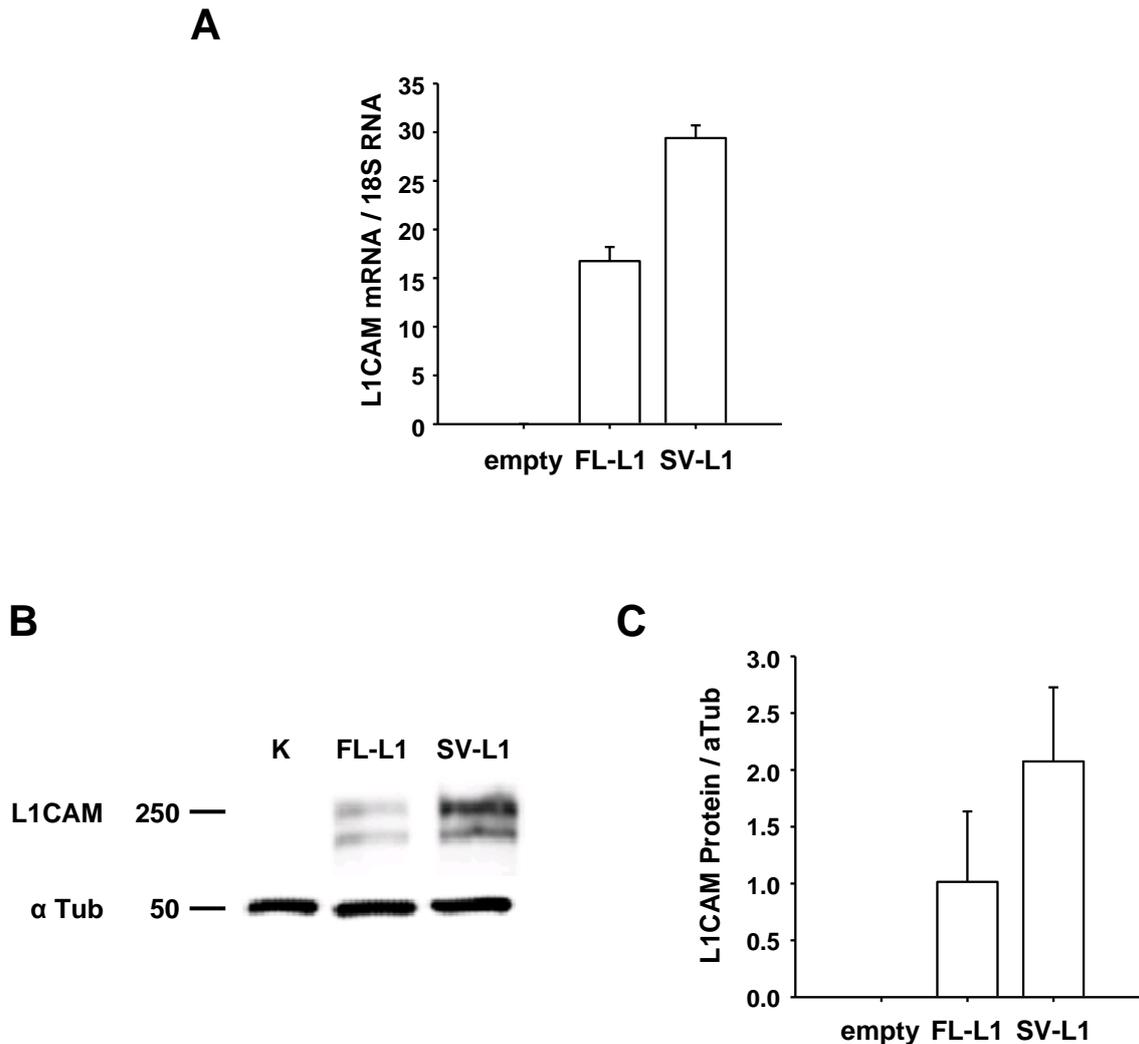
Im experimentellen SKOV3 *Xenograft*-Metastasierungsmodell (siehe 4.2.1) konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der genannten Varianten keinen signifikanten Einfluss auf das metastatische Potential der Tumorzelllinie SKOV3ip in die Lunge hat. Der simultane *knock down* aller L1CAM Varianten führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion der experimentellen Metastasierung. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Hypothese entwickelt, dass der prometastatische Effekt von L1CAM nicht auf die alternativ gespleißte Variante von L1CAM (SV-L1), sondern vielmehr auf die neuronale Variante (FL-L1) zurückzuführen ist. Diese Hypothese sollte in einem weiteren *Xenograft*-Metastasierungsmodell der Maus geprüft werden. Bei der Auswahl der Zelllinie wurde darauf geachtet eine Zelllinie mit einer niedrigen endogenen L1CAM Expression auszuwählen. Durch eine TaqMan Analyse konnte gezeigt werden, dass die humane Fibrosarkomzelllinie HT1080 im Vergleich zur humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip endogen nur sehr geringe L1CAM Expressionslevel aufweist. Die endogenen L1CAM Expressionslevel der HT1080 Zellen betragen nur 0,1 % der endogenen L1CAM Expressionslevel der SKOV3 Zellen (Abb. 16).



**Abbildung 16: Hoher endogener Gesamt-L1CAM mRNA Expressionsspiegel der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip im Vergleich zur humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080.** Die Gesamt-RNA der humanen Zelllinie SKOV3ip-*lacZ* (S) und der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080-*lacZ* wurde isoliert und revers transkribiert. Die Gesamt-L1CAM Expressionslevel wurden mittels TaqMan Analyse bestimmt und gegen die Expression von 18S RNA normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler im Vergleich (S: 59,6 ± 0,3; H: 0,06 ± 0,05). Die L1CAM mRNA Expression der HT1080 Zelllinie beträgt nur 1 % der L1CAM Expression der SKOV3ip Zelllinie.

### 5.4.2 Überexpression von der neuronalen L1CAM Variante und der L1CAM Spleißvariante in der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080

FL-L1 und SV-L1 wurden unter Verwendung der Methode des retroviralen Gentransfers in den HT1080-K15-*lacZ* Zellen auf mRNA Ebene und auf Proteinebene überexprimiert. Die Kontrollzelllinie wurde mit Leervektor transduziert (empty). Die L1CAM mRNA Expression der jeweiligen Zelllinien wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert.

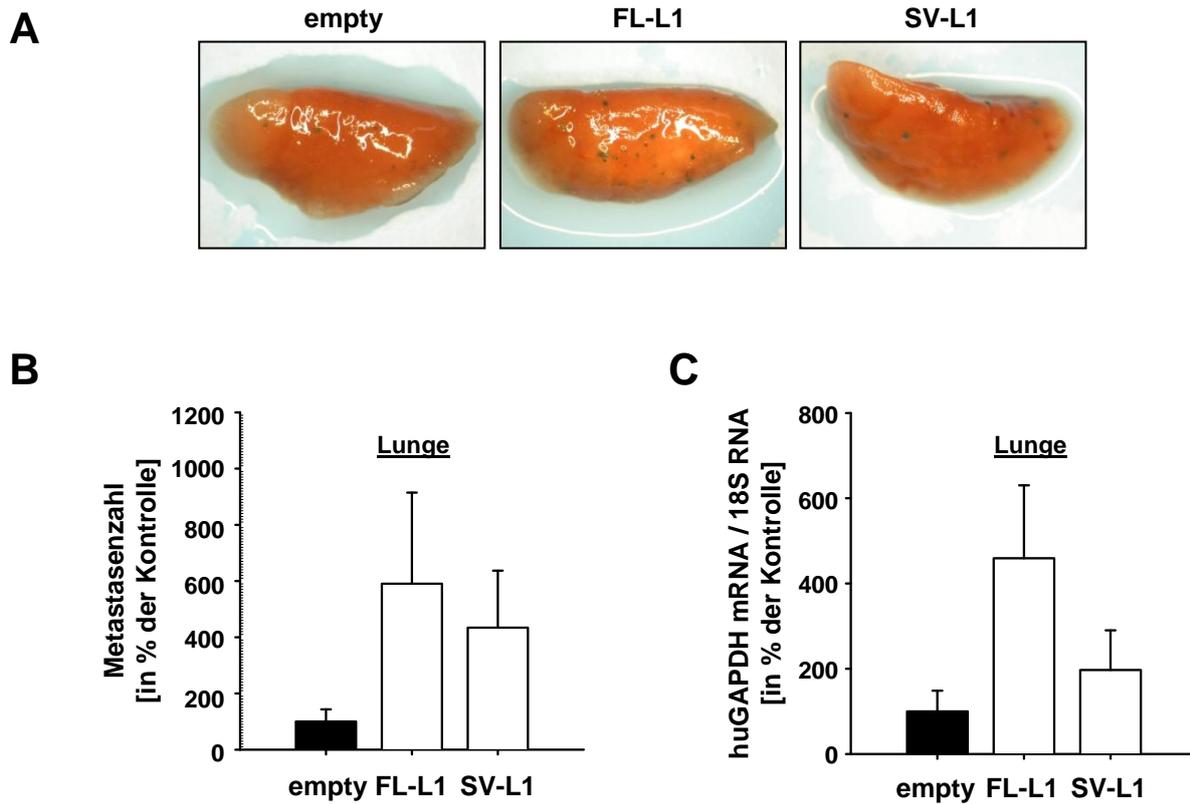


**Abbildung 17: Überexpression von FL-L1CAM und SV-L1CAM in der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 auf mRNA und Proteinebene.** **A**, Gesamt-RNA aus den jeweiligen Zelllinien wurde isoliert und revers transkribiert. Die L1CAM Expression wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Zu sehen ist eine 294-fache Induktion der humanem FL-L1 Genexpression bzw. eine 168-fache Induktion der SV-L1 Genexpression auf mRNA Ebene. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler normalisiert gegen 18S RNA (empty:  $0,1 \pm 0,1$ , FL-L1:  $29,4 \pm 1,3$ , SV-L1:  $16,8 \pm 1,5$ ). **B und C**, auf Proteinebene wurde die Expression von humanem FL-L1 bzw. SV-L1CAM im Western Blot bestätigt und densitometrisch analysiert. **C**, dargestellt sind die Mittelwerte der L1CAM Proteinmenge mit Standardfehler (empty:  $0 \pm 0$ , FL-L1:  $1,0 \pm 0,6$ ; SV-L1:  $2,1 \pm 0,7$ ) abgeglichen durch die  $\alpha$ -Tubulin Proteinmenge.

Durch die retrovirale Transduktion der HT1080-K15-*lacZ* Zellen mit einem für SV-L1 kodierendem Retrovirus, wurde eine 294-fache Induktion der Gesamt-L1CAM mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle (empty) erzielt (Abb. 17, A). Durch die retrovirale Transduktion der Zellen mit einem für FL-L1 kodierendem Retrovirus wurde die Gesamt-L1CAM Expression im Vergleich zur Kontrolle (empty) 168-fach erhöht (Abb. 17, A). Die Überexpression der jeweiligen L1CAM Isoformen wurde darüber hinaus auf Proteinebene im Western Blot bestätigt (Abb. 17, B und C).

### 5.4.3 Einfluss der L1CAM Isoformen auf das metastatische Potential der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 bei der Metastasierung der Lunge

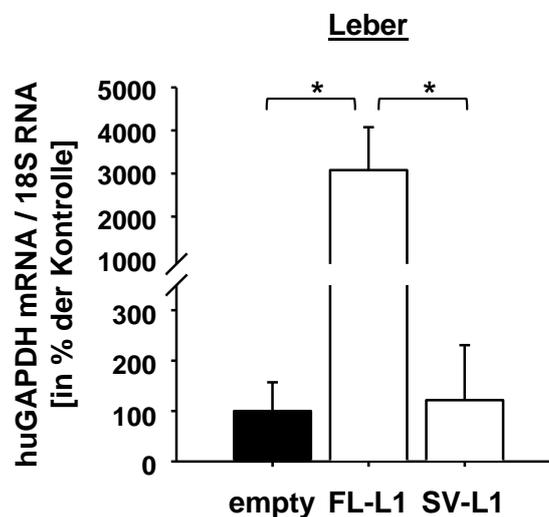
Ziel war es den Einfluss von SV-L1CAM und FL-L1CAM auf das metastatische Potential der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 zu untersuchen. Um den Einfluss der jeweiligen L1CAM Isoformen auf die Lungenmetastasierung zu analysieren wurde das HT1080 Modell, ein experimentelles *Xenograft*-Modell der Maus, verwendet. HT1080 Zellen bilden nach intravenöser Injektion Metastasen in der Lunge und Mikrometastasen in der Leber aus. Die Zelllinien HT1080 FL-L1 und HT1080 SV-L1 wurden hinsichtlich ihres metastatischen Potentials in die Lunge untereinander und mit der Kontrollzelllinie verglichen. Nach der Injektion von jeweils  $1 \times 10^6$  HT1080 Zellen in die *Vena caudalis* von weiblichen CD1nu/nu Mäusen kam es zur Ausbildung von Metastasen in der Lunge und zur Ausbildung von Mikrometastasen in der Leber. Durch die Überexpression von FL-L1CAM in der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 war die Anzahl der Lungenmetastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe (empty) deutlich (5,9-fach), jedoch nicht signifikant erhöht (Abb. 18, A und B). Die Überexpression der SV-L1 Isoform führte weder im Vergleich zur Kontrolle noch im Vergleich zur FL-L1 Gruppe zu einer signifikanten Änderung der Metastasenzahl (Abb. 18, A und B;  $p = 0,067$ ,  $p = 0,180$ ,  $p = 0,610$ ;  $n_1 = 6$ ,  $n_2 = 4$ ,  $n_3 = 6$ ,  $n_{\text{ges}} = 16$ ). Als weiterer Parameter zur Evaluierung des metastatischen Potentials wurde die humane GAPDH mRNA Expression der Gesamt-RNA des rechten Lungenflügels bestimmt. Da die humane GAPDH Variante ausschließlich von den humanen Tumorzellen exprimiert wird, nicht jedoch vom murinen Wirtsgewebe, wurde die gegen 18S normalisierte humane GAPDH Konzentration als Maß für die Tumorzelllast bzw. Metastasenlast der Lungen herangezogen. Die relative humane GAPDH mRNA Expression wurde in allen Lungen der Versuchsgruppen bestimmt ( $n_1 = 6$ ,  $n_2 = 4$ ,  $n_3 = 6$ ). Durch die Überexpression von FL-L1 in den Tumorzellen war die relative Tumorzelllast im Vergleich zur Kontrolle deutlich (4,6-fach), jedoch nicht signifikant erhöht (Abb. 18, C;  $p > 0,05$ ). Die Überexpression von SV-L1 führte zu einer 2-fachen, nicht signifikanten Erhöhung der relativen Tumorzelllast (Abb. 18, C;  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 18: Nicht signifikante Induktion der Lungenmetastasierung von HT1080 Zellen durch die Überexpression von FL-L1CAM und SV-L1CAM.** **A**, abgebildet sind repräsentative Lungen der Versuchsgruppen empty, FL-L1 und SV-L1. Die Anzahl der X-Gal gefärbten Makrometastasen auf der Lungenoberfläche war durch die Überexpression der L1CAM Isoformen (FL-L1 und SV-L1) deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht. **B**, dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der Metastasen der Versuchsgruppen mit Standardfehler (empty: 100,0 ± 43,3 %, FL-L1: 590,4 ± 324,1 %, SV-L1: 434,0 ± 202,8 %). **C**, die Gesamt-RNA des rechten Lungenflügels aller Versuchstiere wurde isoliert und revers transkribiert ( $n_1 = 6$ ,  $n_2 = 4$ ,  $n_3 = 6$ ,  $n_{\text{ges}} = 16$ ). Die humane GAPDH mRNA und 18S RNA Expression wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der humanen GAPDH mRNA Konzentration im Verhältnis zur 18S RNA Konzentration (empty: 100,0 ± 48,4 %, FL-L1: 459,1 ± 171,2 %, SV-L1: 197,1 ± 93 %).

#### 5.4.4 Einfluss der L1CAM Isoformen auf das metastatische Potential der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 bei der Metastasierung der Leber

Um den Einfluss der L1CAM Varianten auf die hämatogene Metastasierung in die Leber zu untersuchen, wurde der *Lobus sinister* und *Lobus dexter medialis hepatis* entnommen, gewaschen und nach Fixierung in X-Gal-Lösung inkubiert. Die Lebern zeigten eine stark gestreute Mikrometastasierung. Die Mikrometastasen waren aufgrund ihrer geringen Größe nicht quantifizierbar. Um die relative Gesamt-Metastasenlast zu evaluieren, wurde die relative humane GAPDH Expression (humane GAPDH mRNA dividiert durch die humane 18S RNA) in allen Lebern der Versuchsgruppen bestimmt ( $n_1 = 6$ ,  $n_2 = 4$ ,  $n_3 = 6$ ,  $n_{\text{ges}} = 16$ ). Die Mittelwerte der drei Versuchsgruppen wurden errechnet und miteinander verglichen (Abb. 19). Die Überexpression von FL-L1 in den HT1080 Zellen führte zu einer signifikanten 30,7-fachen Induktion der relativen humanen GAPDH Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (empty) und zu einer 25,3-fachen Induktion im Vergleich zur SV-L1 Gruppe (Abb. 19;  $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ). Die Überexpression der L1CAM Spleißvariante (SV-L1) führte hingegen zu keiner signifikanten Änderung der relativen Tumorzelllast in der Leber (Abb. 19;  $p > 0,05$ ). Die Ergebnisse zeigen dass die Überexpression der FL-L1 Variante, jedoch nicht der SV-L1 Variante die Lebermetastasierung dieses Modells induziert.

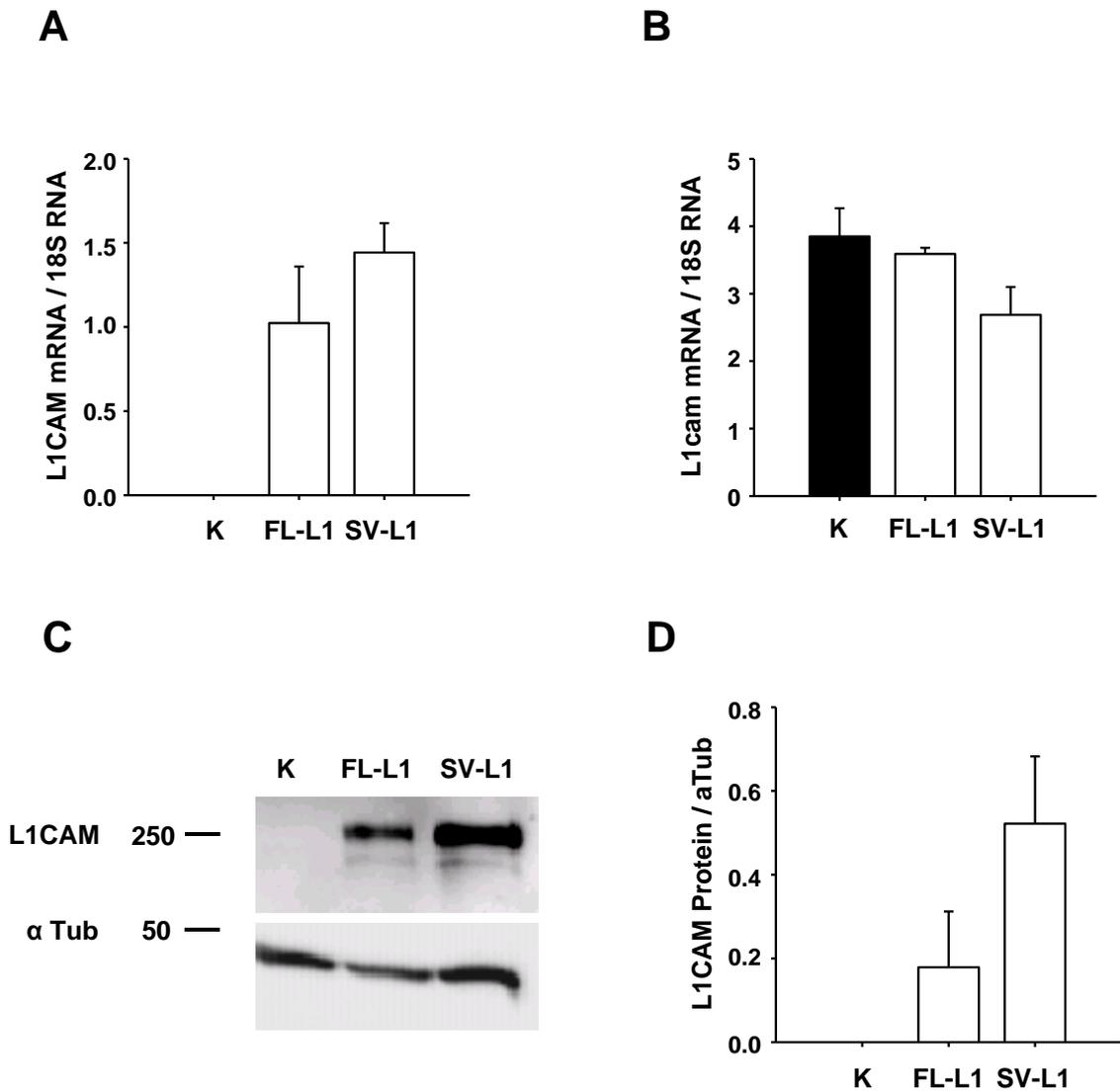


**Abbildung 19: Signifikanter Anstieg der Mikrometastasierung in der Leber durch die Expression von FL-L1CAM in HT1080 Zellen.** Gesamt-RNA aus Leberproben aller Versuchstiere wurde isoliert und revers transkribiert. Mittels quantitativer RT-PCR wurde die humane GAPDH mRNA und 18S RNA Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der humanen GAPDH mRNA normalisiert gegen die 18S RNA (empty: 100,0 ± 56,9 %, FL-L1: 3078,2 ± 999,4 %, SV-L1: 121,5 ± 109,2 %;  $n_1 = 6$ ,  $n_2 = 4$ ,  $n_3 = 6$ ;  $n_{\text{ges}} = 16$ ;  $p = 0,01$ ,  $p = 0,019$ ).

## 5.5 Einfluss von neuronalem und nicht-neuronalem L1CAM auf das metastatische Potential der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s

### 5.5.1 Überexpression der neuronalen L1CAM Variante und der L1CAM Spleißvariante in der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s

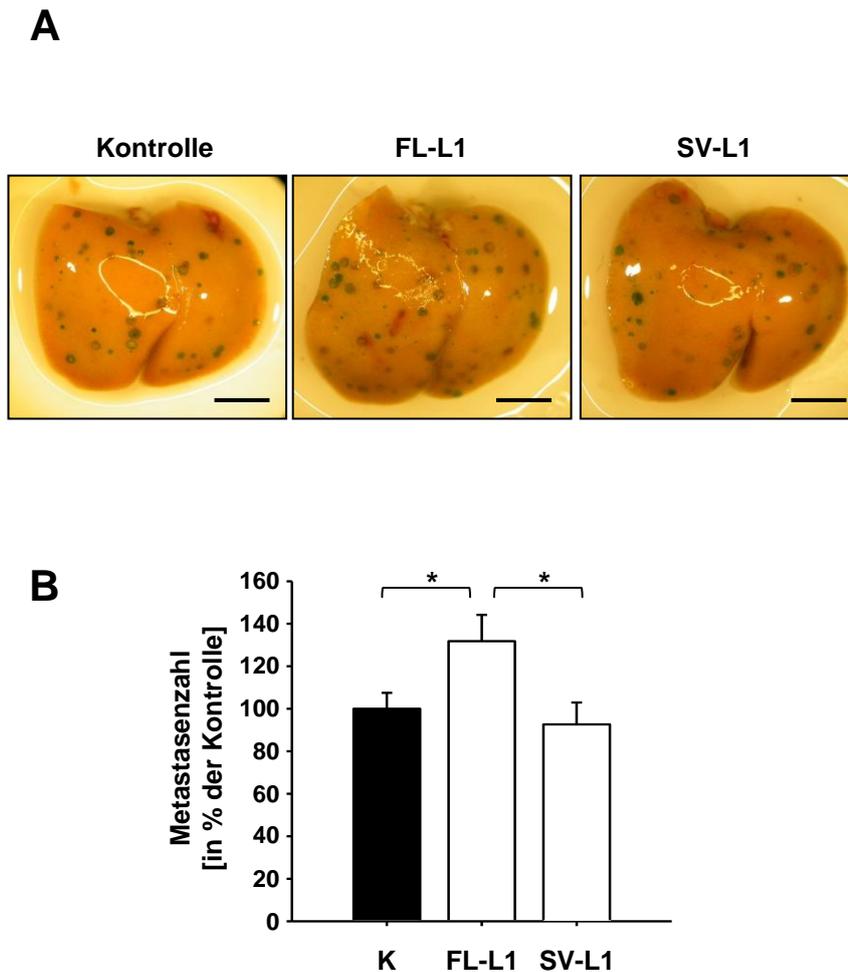
In der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 führte die Expression von FL-L1, nicht jedoch die Expression von SV-L1CAM zu einer Induktion der Lebermetastasierung. Um zu zeigen, dass es sich hierbei nicht um einen Zelllinien-spezifischen Effekt handelt, sollte der Einfluss der L1CAM Varianten auf das metastatische Potential von Tumorzellen zusätzlich in dem L-CI.5s Metastasierungsmodell (siehe 4.2.3) untersucht werden. Dieses Modell eignet sich besonders gut für die Untersuchung der Lebermetastasierung. Hierfür wurden die L1CAM Varianten (FL-L1 und SV-L1) in der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s überexprimiert. Mit Hilfe der Methode des viralen Gentransfers wurde humanes FL-L1 und humanes SV-L1 in der murinen *lacZ*-markierten T-Zell-Lymphomzelllinie überexprimiert (L-CI.5s-FL-L1, L-CI.5s-SV-L1). Als Kontrolle wurden unbehandelte L-CI.5s Zellen und mit Leervektor transduzierte L-CI.5s Zellen (empty) mitgeführt. Um möglichst homogene Zelllinien zu erhalten wurden Zellklone mit der Methode der *limiting dilution* (siehe 4.3.9) hochgezogen. Je Zelllinie wurden 4-5 Zellklone mit ähnlicher L1CAM mRNA Expression in gleichem Verhältnis zu einer Zelllinie zusammengeführt. Die humanen L1CAM Expressionslevel der retroviral transduzierten Zelllinien (L-CI.5s-empty, L-CI.5s-FL-L1, L-CI.5s-SV-L1) wurden auf mRNA Ebene mittels quantitativer RT-PCR und auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht (Abb. 20). Um einen Einfluss der humanen L1CAM Isoformen auf die endogene murine L1cam Expression auszuschließen, wurde die murine L1cam Expression der Zelllinien mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Weder die Expression von FL-L1 noch die Überexpression von SV-L1 ergab im Vergleich zur Kontrolle einen signifikanten Unterschied in der endogenen murinen L1CAM Expression (Abb. 20;  $p = 0,905$ ,  $p = 0,262$ ).



**Abbildung 20: Expression von FL-L1CAM und SV-L1CAM in der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s auf mRNA und Proteinebene.** **A**, Gesamt-RNA aus den jeweiligen Zelllinien wurde isoliert und revers transkribiert. Die L1CAM Expression in den L-CI.5s Zellen wurde auf mRNA Ebene mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Zu sehen ist eine deutliche Expression von humanem FL-L1 und von humanem SV-L1 in der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s auf mRNA Ebene. Die Kontrollzelllinie wurde mit Leervektor transduziert bzw. nicht mit Virus behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der humanen L1CAM Expression normalisiert gegen 18S RNA (empty:  $0,0 \pm 0,0$  %, FL-L1:  $1,0 \pm 0,3$  %, SV-L1:  $1,4 \pm 0,2$  %) **B**, die murine mRNA L1cam Expression in der Zelllinie L-CI.5s wurde durch die Expression der humanen L1CAM-Isoformen nicht signifikant verändert. Gesamt-RNA der Zellen wurde isoliert und revers transkribiert. Die murine L1cam Expression wurde auf mRNA Ebene mittels quantitativer RT-PCR gemessen. Mittelwerte und Standardfehler der murinen L1cam Expression normalisiert gegen die 18S RNA Expression: empty:  $3,9 \pm 0,4$ , FL-L1:  $3,6 \pm 0,1$ , SV-L1:  $2,7 \pm 0,4$ . **C**, auf Proteinebene wurde die Expression von humanem FL-L1 und SV-L1 in den L-CI.5s Zellen im Western Blot bestätigt. **D**, densitometrische Analyse der L1CAM Proteinmenge der L-CI.5s Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proteinmengen der L1CAM Isoformen abgeglichen gegen die  $\alpha$ -Tubulin Proteinmengen: K:  $0,00 \pm 0,00$  %, FL-L1:  $0,18 \pm 0,13$  %, SV-L1:  $0,52 \pm 0,16$  %.

### 5.5.2 Signifikante Erhöhung der experimentellen Metastasierung einer murinen T-Zell Lymphomzelllinie (L-CI.5s) durch die Expression von neuronalem L1CAM im Vergleich zur Kontrolle und zur L1CAM Spleißvariante

Um die Auswirkungen der L1CAM Spleißvarianten auf die experimentelle Metastasierung von murinen L-CI.5s Zellen zu untersuchen, wurde das bereits etablierte L-CI.5s Metastasierungsmodell (siehe 4.2.3) verwendet. Durch die Injektion von  $5 \times 10^3$  L-CI.5s Zellen in die *Vena caudalis* von weiblichen DBA/2 Mäusen wurde die experimentelle Lebermetastasierung dieses Modells induziert.

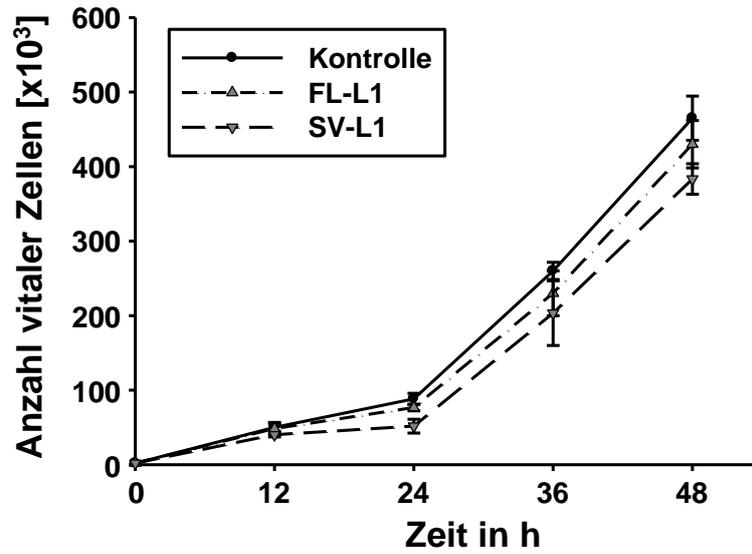


**Abbildung 21: Verstärkte Lebermetastasierung durch die Expression von humanem FL-L1CAM in der murinen Lymphomzelllinie L-CI.5s.** **A und B,**  $5 \times 10^3$  L-CI.5s Zellen der Zelllinien L-CI.5s-FL-L1, L-CI.5s-SV-L1 und der Kontrollzelllinien L-CI.5s und L-CI.5s empty wurden intravenös in DBA/2 Mäuse injiziert. Sieben Tage nach der Tumorzellinjektion wurden die Mäuse geopfert. Die Leber wurde jeweils entnommen und in X-Gal Lösung inkubiert. **A,** repräsentative Fotos der Metastasen tragenden Lebern der drei Versuchsgruppen (Balken = 4 mm). **B,** die Anzahl der Makrometastasen auf der Leberoberfläche des *Lobus sinister* und *Lobus dexter medialis hepatis* wurde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Anzahl der Lebermetastasen prozentual zur Kontrolle: K:  $100,0 \pm 7,5\%$ ; FL-L1:  $131,1 \pm 12,4\%$ ; SV-L1:  $92,6 \pm 10,3\%$ . Die Expression von SV-L1 in der L-CI.5s Zelllinie hat die Anzahl der Makrometastasen im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant beeinflusst. Die Expression von FL-L1 auf Tumorzellseite führte zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl der Makrometastasen im Vergleich zur Kontrolle und zur SV-L1 Gruppe ( $n_1 = 10$ ,  $n_2 = 4$ ,  $n_3 = 5$ ,  $n_{\text{ges}} = 19$ ,  $p = 0,034$ ;  $p = 0,032$ ).

Um das metastatische Potential der beiden L1CAM Varianten (FL-L1 und SV-L1) in die Leber zu vergleichen wurden die Zelllinien L-CI.5s-FL-L1 und L-CI.5s SV-L1 mit erhöhter Expression der jeweiligen Varianten sowie die beiden Kontrollzelllinien L-CI.5s und L-CI.5s-empty mitgeführt. Am 7. Tag nach der Tumorzellinokulation wurde der *Lobus sinister* und *Lobus dexter medialis hepatis* entnommen, gewaschen, fixiert und anschließend in X-Gal-Färbelösung inkubiert. Als Parameter für das metastatische Potential der Tumorzellen wurde die Anzahl der Makrometastasen mit einem Durchmesser  $> 0,2$  mm bestimmt. Durch die Expression von SV-L1 wurde die Anzahl der Lebermetastasen im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert. Durch die Expression von FL-L1 hingegen erhöhte sich die Anzahl der Lebermetastasen signifikant um 32 % im Vergleich zur Kontrolle und um 42 % im Vergleich zur SV-L1 Gruppe (Abb. 21;  $n_1 = 10$ ,  $n_2 = 4$ ,  $n_3 = 5$ ,  $n_{\text{ges}} = 19$ ,  $p = 0,806$ ,  $p = 0,034$ ,  $p = 0,032$ ).

### **5.5.3 Keine signifikante Veränderung der *in vitro* Proliferation der T-Zell Lymphomzelllinie L-CI.5s durch die Expression von neuronalem und nicht-neuronalem L1CAM *in vitro***

Um den Einfluss der L1CAM Varianten auf die Proliferation der L-CI.5s Zellen *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Trypanblau Proliferationsassay durchgeführt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden  $2 \times 10^3$  L-CI.5s Zellen pro Gruppe in Triplets ausgesät. Die Anzahl vitaler Zellen wurde in einem Zeitraum von 48 Stunden alle 12 Stunden bestimmt. Zur Vitalitätsbeurteilung der Zellen wurden diese mit Trypanblau versetzt wodurch sich ausschließlich die abgestorbenen Zellen, mit für den Farbstoff durchlässiger Zellmembran, bläulich anfärbten. Die Zelllinien L-CI.5s-FL-L1CAM (FL-L1) und L-CI.5s-SV-L1CAM (SV-L1) zeigten im Vergleich zur Kontrollzelllinie zu keinem der Zeitpunkte signifikante Unterschiede in der Zellzahl. Folglich zeigt die Expression der humanen L1CAM Isoformen (FL-L1 und SV-L1) keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der L-CI.5s Zellen *in vitro* (Abb. 22).



**Abbildung 22: Kein Einfluss der humanen L1CAM Varianten auf das *in vitro* Proliferationspotential der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s.** Durch die Expression von humanem FL-L1CAM und SV-L1CAM ergab sich im Vergleich zu der Kontrollzelllinie keine signifikante Veränderung des Proliferationspotentials der L-CI.5s Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Anzahl vitaler Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten (Kontrolle: 0h:  $2,0 \pm 0,0$ , 12h:  $50,0 \pm 5,0$ , 24h:  $83,3 \pm 7,5$ , 36h:  $260,0 \pm 11,5$ , 48h:  $465,0 \pm 29,7$ ; FL-L1: 0h:  $2,0 \pm 0,0$ , 12h:  $48,3 \pm 8,3$ , 24h:  $76,7 \pm 4,4$ , 36h:  $230,0 \pm 30,1$ , 48h:  $430,0 \pm 31,8$ ; SV-L1: 0h:  $2,0 \pm 0,0$ , 12h:  $40,0 \pm 2,9$ , 24h:  $51,7 \pm 9,3$ , 36h:  $203,3 \pm 43,4$ , 48h:  $383,3 \pm 20,5$ ).

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden das metastatische Potential der *full-length* Isoform von L1CAM und deren Spleißvariante (SV-L1CAM) das erste Mal in experimentellen Metastasierungsmodellen untersucht und direkt miteinander verglichen. Die Überexpression der *full-length* Isoform von L1CAM in Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs erhöhte deren metastatisches Potential signifikant, während die Überexpression der alternativ gespleißten Isoform von L1CAM keinen signifikanten Einfluss auf die hier untersuchten Schritte der hämatogenen Metastasierung hatte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das metastatische Potential einer Ovarialkarzinomzelllinie durch einen shRNA vermittelten *knock down* beider Isoformen des L1 Zelladhäsionsmoleküls reduziert werden kann.

### 6.1 Erhöhte Gesamt-L1CAM Expression in Ovarialkarzinometastasen des *Omentum majus* im Vergleich zum Kontrollgewebe

In dieser Arbeit wurde in *Omentum majus* Metastasen von Ovarialkarzinompatientinnen eine im Vergleich zum Kontrollgewebe erhöhte L1CAM-Expression festgestellt. Die in dieser Arbeit mittels TaqMan-Analyse gemessenen erhöhten Expressionsspiegel in den *Omentum majus* Metastasen weisen darauf hin, dass L1CAM bei der Ausbildung metastatischer Kolonien von Bedeutung ist. Dies steht im Einklang mit bisherigen klinischen und experimentellen Arbeiten (Fogel et al., 2003; Boo et al., 2007). In diesen klinischen und pathologischen Studien wurde die Expression von L1CAM in Primärtumoren unterschiedlichen Ursprungs mit einer schlechten Prognose von Tumorpatienten korreliert (Fogel et al., 2003; Boo et al., 2007). In einer retrospektiven klinischen Studie wurde eine positive Assoziation zwischen der Expression von L1CAM im Primärtumorgewebe eines malignen Melanoms und dem Auftreten von Metastasen festgestellt (Thies et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass L1CAM und die Sheddase ADAM10, welche L1CAM im extrazellulären Bereich schneidet, an der invasiven Front von Kolorektalkarzinomgewebe koexprimiert sind. Zudem wurden beide Gene in Kolorektalkarzinomzellen als Zielgene des  $\beta$ -Catenin *signaling* identifiziert (Gavert et al., 2005). Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte zudem nachgewiesen werden, dass L1CAM in Kolorektalkarzinometastasen im Vergleich zum angrenzenden nicht Tumorzell-durchsetzten Normalgewebe deutlich erhöht ist (unveröffentlichte Daten Stephanie Hauser). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass L1CAM bei der Ausbildung von Metastasen nicht nur in den frühen Phasen sondern auch in den späten Phasen der Metastasierung, dem Auswachsen von Metastasen, von Bedeutung ist. In vorliegender Arbeit wurde im Rahmen einer Orientierungsanalyse nur ein kleines Probenkollektiv von humanem Ovarialkarzinomgewebe untersucht. Auf eine weiterführende

Korrelation der L1CAM Expressionsspiegel mit unterschiedlichen Tumorstadien wurde verzichtet. Als Kontrolle wurde Peritonealgewebe von gesunden Patientinnen untersucht. Idealerweise sollte Tumorzell-freies Ovarialepithelgewebe als Kontrolle verwendet werden. Zusammenfassend können die erhöhten Expressionsspiegel von L1CAM als Hinweis auf einen möglicherweise bestehenden Zusammenhang zwischen der L1CAM Expression und der Ausbildung metastatischer Kolonien gewertet werden. Dieses Ergebnis sollte allerdings im Rahmen einer größer angelegten klinischen Studie verifiziert werden.

## **6.2 Überwiegender Anteil der Tumorzell-assoziierten alternativ gespleißten Isoform des Zelladhäsionsmoleküls L1 an der Gesamt-L1CAM Expression in Ovarialkarzinommetastasen**

Zudem wurden die Expressionsverhältnisse der *full-length* L1CAM Variante und der L1CAM Spleißvariante analysiert. Unter Verwendung von quantitativer RT-PCR wurde sowohl FL-L1CAM als auch SV-L1CAM in den *Omentum majus* Metastasen mittels TaqMan Analyse gemessen. In dieser Arbeit wurde eine TaqMan Sonde verwendet, die die Sequenz des Exonübergangs 26/27 des L1 Zelladhäsionsmoleküls überspannt. In mehreren wissenschaftlichen Arbeiten wurde beschrieben, dass das alternative Spleißen des Exons 2 mit dem des Exons 27 gekoppelt ist (Reid et al., 1992; Shtutman et al., 2006), sodass durch die Messung von Exon 27 nur FL-L1CAM, welches Exon 2 und 27 enthält, und nicht die alternativ gespleißte Variante bestimmt wird. Durch Subtraktion der FL-L1CAM Expression von der Gesamt-L1CAM Expression konnte die Menge an SV-L1CAM errechnet werden. Mit dieser Methode wurde sowohl FL-L1CAM als auch SV-L1CAM in den *Omentum majus* Metastasen von Ovarialkarzinompatientinnen gemessen. Hierbei wurde gezeigt, dass die SV-L1CAM Isoform den überwiegenden Anteil an der L1CAM Expression ausmachte. Durch Positionierung der Probe über den Exon-Exon Übergang 26/27 (zur Identifikation der *full-length* L1CAM Variante) und durch Positionierung einer Probe über den Exon-Exon Übergang 26/28 (zur Identifikation von SV-L1CAM) wurden die Expressionsverhältnisse getrennt bestimmt. Unter Verwendung dieser eigens konstruierten Primer und Probe Sequenzen wurde ebenfalls ein überwiegender Anteil der Spleißvariante in Ovarialkarzinommetastasen festgestellt (unveröffentlichte Daten Stephanie Hauser). Die Expression von FL-L1CAM und SV-L1CAM wurde auch von anderen Gruppen in mehreren Tumorzelllinien analysiert. In einer humanen Neuroblastomzelllinie wurden mittels RT-PCR Analyse beide Varianten detektiert, während in einer humanen Nierenkarzinomzelllinie lediglich die Spleißvariante gemessen wurde (Meli et al., 1999). In einer bereits durchgeführten Analyse der Expressionsverhältnisse der L1CAM Varianten in

Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs wurde ebenfalls überwiegend die L1CAM Spleißvariante detektiert. Eine überwiegende Expression von SV-L1CAM *in vitro* wurde auch in den Ovarialkarzinomzelllinien DW und GG nachgewiesen (Euer et al., 2005; Shtutman et al., 2006). Eine Ausnahme stellt die kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie NCI-H69 dar, welche beide Isoformen in etwa gleichen Mengen exprimiert (Shtutman et al., 2006). Folglich stehen die erhobenen Daten überwiegend im Einklang mit den bisher durchgeführten L1CAM-Isoform Expressionsstudien.

### **6.3 Die endogene L1CAM Expression in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip fördert die Metastasierung**

Die Expression der SV-L1CAM und FL-L1CAM Varianten wurden ebenfalls in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip detektiert, wobei SV-L1CAM den überwiegenden Anteil an der Gesamt-L1CAM Expression ausmachte (unveröffentlichte Daten Stephanie Hauser). Durch den simultanen *knock down* beider L1CAM Varianten in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip wurde die Anzahl metastatischer Kolonien in der Lunge signifikant reduziert. Folglich fördert die endogene L1CAM Expression dieser Zelllinie das metastatische Potential der Tumorzellen bei der Metastasierung der Lunge. Der Effekt einer gegen L1CAM gerichteten Antikörpertherapie auf die Metastasierung *per continuitatem* bzw. über das Lymphgefäßsystem wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits unter Verwendung eines Maus-Xenotransplantations-Modells analysiert (Arlt et al., 2006). Die Antikörpertherapie führte zu einer dosisabhängigen Reduktion des intraperitonealen Tumorwachstums sowie zu einer Reduktion der Tumorzell dissemination. Außerdem führte die Antikörpertherapie zu einer verminderten Migration der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip *in vitro* (Arlt et al., 2006). Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Behandlung mit einem <L1CAM>Antikörper zu einer reduzierten Proliferation der SKOV3ip Zelllinie führt. Der *knock down* von L1CAM unter Verwendung der shRNAi-Technologie hat hingegen keine Änderung des Proliferationspotentials der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip zur Folge. Die Suppression der L1CAM Expression induzierte eine Verminderung des Invasionspotentials *in vitro* und *in vivo*. Dahingegen konnte durch die Überexpression der Tumorzell-assoziierten L1CAM Spleißvariante und der L1 $\Delta$ 27 Variante keine verstärkte Metastasierung der SKOV3ip Zelllinie in die Lunge nachgewiesen werden. Da die humane Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip im Vergleich zu anderen Tumorzelllinien eine hohe endogene L1CAM mRNA Expression aufwies kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtung auf einen Sättigungseffekt, bedingt durch die hohe endogene Expression der beiden L1CAM Isoformen, zurückzuführen ist. Zusammenfassend weisen die erhobenen

Daten darauf hin, dass die Hemmung beider L1CAM Isoformen (FL-L1CAM und SV-L1CAM) die hämatogene Metastasierung von Ovarialkarzinomzellen inhibieren kann.

#### **6.4 Das Vorhandensein der Exons 2 und 27 in der FL-L1CAM Isoform erhöht das metastatische Potential von Tumorzellen**

Fortschritte in der Analyse von Genexpressionssignaturen machten es möglich Tumorgene zu identifizieren, welche mit einer schlechten Prognose des Patienten korrelieren. Die Expression von L1CAM wurde in Primärtumorgewebe unterschiedlichen Ursprungs mit dem Auftreten von Metastasen und einer schlechten Überlebensrate von Tumorpatienten korreliert (Thies et al., 2002; Fogel et al., 2003; Boo et al., 2007). Im Zuge dieses technischen Fortschritts wird es zunehmend wichtiger die Bedeutung der unterschiedlichen Isoformen eines Gens im Hinblick auf die Tumorprogression und Metastasierung zu untersuchen, um diese Genexpressionssignaturen richtig interpretieren zu können (Van't Veer et al., 2002; Hunter et al., 2003; Ramaswamy et al., 2003). Die alleinige Analyse der Gesamt-Expressionsspiegel eines Gens kann zu einer Fehlinterpretation führen, solange unklar ist welche Isoform eines Gens hochreguliert ist und solange die Funktionen der Isoformen eines Gens im Hinblick auf die Pathogenese der Erkrankung ungeklärt bleiben. Beispielsweise spielen Isoformen des CD99 Transmembran Glykoproteins gegensätzliche Rollen in der Tumorprogression und nur bestimmte Varianten des CD44 Zelladhäsionsmoleküls korrelieren mit einer schlechten Prognose von Tumorpatienten (Stauder et al., 1996; Shibuya et al., 1998; Scotlandi et al., 2007). Daher lag der Fokus dieser Arbeit insbesondere auf der Differenzierung des Einflusses der Isoformen FL-L1CAM und SV-L1CAM auf das metastatische Potential von Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs. Es wurde bereits in einem spontanem Metastasierungsmodell gezeigt, dass das L1 Zelladhäsionsmolekül in seiner vollen Länge, und nicht das durch ADAM10 entstehende lösliche Produkt, die Metastasierung von Kolorektalkarzinomzellen fördert (Gavert et al., 2007). In dieser Studie wurden erstmals die beiden in Tumorzellen exprimierten und die in dieser Arbeit in Gewebeproben von Ovarialkarzinommetastasen identifizierten Varianten, im Hinblick auf das metastatische Potential bei der Metastasierung der Lunge und der Leber, getrennt untersucht. Die *full-length* Isoform und nicht die zu überwiegendem Anteil in Tumorzelllinien detektierbare Spleißvariante SV-L1CAM erhöhte das metastatische Potential von Tumorzellen in die Leber. Diese Beobachtung weist auf eine wichtige Rolle der Exons 2 und 27 bei der Ausbildung metastatischer Kolonien in der Leber hin. Auch in anderen Studien wurden Spleißvarianten eines Gens im Hinblick auf ihre unterschiedlichen metastatischen Eigenschaften untersucht (Herrlich et al., 2000). Diese Unterscheidung ist von Bedeutung, da alternativ gespleißte Varianten eines Gens

unterschiedliche oder sogar gegensätzliche Funktionen in der metastatischen Kaskade einnehmen können (Scotlandi et al., 2007). Derartige Untersuchungen wurden für das L1 Zelladhäsionsmolekül bisher noch nicht durchgeführt. Um den Einfluss der beiden Varianten (SV-L1CAM und FL-L1CAM) auf die hämatogene Metastasierung zu untersuchen, wurden Tumorzelllinien ausgewählt, die sich durch eine effiziente Lebermetastasierung auszeichnen (L-CI.5s; Krüger et al., 1994b) bzw. zur Ausbildung von disseminierten Mikrometastasen in der Leber führen (HT1080). Letztere bilden auch Metastasen in der Lunge aus (Kopitz et al., 2005). Der Fokus dieser Arbeit lag bei der Untersuchung des Einflusses der L1CAM Varianten auf das metastatische Potential von Tumorzellen bei der Metastasierung der Leber. Das murine L-CI.5s Modell ist ein effizientes und zuverlässiges Modell zur Untersuchung der Lebermetastasierung (Gerg et al., 2008). Der Nachteil der verwendeten murinen L-CI.5s Zelllinie ist die endogene murine Expression von L1cam, welche sich durch die Überexpression der beiden humanen L1CAM Varianten jedoch nicht signifikant verändert hat. Folglich konnten wir ausschließen, dass der metastasierungs-fördernde Effekt durch eine Änderung der murinen L1cam Expressionsspiegel hervorgerufen wurde. Im Gegensatz zum L-CI.5s Modell kommt es im SKOV3ip Modell hauptsächlich zur Ausbildung von Metastasen in der Lunge. Für dieses Organ konnte durch die Überexpression der L1CAM Spleißvariante in den Tumorzellen keinen Effekt auf die hämatogene Lungenmetastasierung nachgewiesen werden. Hierdurch erhielten wir einen ersten Hinweis, dass das metastatische Potential der SKOV3ip Ovariakarzinomzelllinie nicht durch die Expression der alternativ gespleißten Isoform (SV-L1CAM) verändert wird. Der Nachteil dieses Modells war eine hohe endogene Expression von SV-L1CAM, sodass ein Sättigungseffekt nicht auszuschließen war, d.h., dass diese Zellen möglicherweise bereits ausreichende Mengen dieser Variante exprimierten und eine weitere Erhöhung der SV-L1CAM Expression keinen zusätzlichen Effekt zeigen konnte. Ein weiterer Nachteil dieses Modells war eine breite Streuung der Anzahl metastatischer Kolonien innerhalb der Gruppen. Deshalb wurden die L1CAM Varianten zusätzlich in der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 exprimiert, welche im Vergleich zu den SKOV3ip Zellen nur in sehr geringen Mengen L1CAM mRNA exprimierten und welche auch effizient in die Lunge metastasieren (Kopitz et al., 2005). Zudem wurden sie in der murinen L-CI.5s Zelllinie exprimiert, da diese Zelllinie nach intravenöser Inokulation zur Ausbildung von Metastasen in der Leber führt und da dieses bereits etablierte Modell in der Regel eine geringe Streuung der Metastasenzahl aufweist (Krüger et al., 1994b, Gerg et al., 2008). Die *full-length* Isoform verstärkte im murinen T-Zell-Lymphom Modell sowie im HT1080 *Xenograft*-Metastasierungsmodell die Ausbildung metastatischer Kolonien bzw. die Ausbildung

disseminierter Mikrometastasen in der Leber. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression der L1CAM-Spleißvariante in keinem der verwendeten Modelle zu einer signifikanten Änderung des metastatischen Potentials. Die Tatsache, dass die *full-length* Isoform und nicht die zu überwiegenden Anteilen in Tumoren detektierbare Spleißvariante das metastatische Potential von Tumorzellen erhöhte, weist auf eine wichtige Bedeutung der Exons 2 und 27 bei der Ausbildung metastatischer Kolonien in der Leber hin. Diese Exons stellen eine bedeutende Bindungsstelle für die mit L1CAM interagierenden Proteine dar und haben einen Einfluss auf bedeutende Signaltransduktionswege (Jacob et al., 2002; Silletti et al., 2004). Es wurde bereits gezeigt, dass L1CAM die Aktivierung des ERK (*extracellular related kinase*) - Signaltransduktionswegs von NIH3T3 Zellen induziert und durch die Induktion von Invasions-assoziierten Genen, darunter die Cysteinproteasen Cathepsin L und B, einen invasiven Phänotyp hervorruft (Islam et al., 2004; Silletti et al., 2004). Das Vorhandensein des Exons 27 ist für die Aktivierung dieses Signaltransduktionswegs eine Voraussetzung, da die Aktivierung abhängig von der Clathrin vermittelten Endozytose ist, welche wiederum an das Vorhandensein des Exons 27 gebunden ist (Schaefer et al., 1999; De Angelis et al., 2001; Long et al., 2001). Die biologische Funktion des Exons 2 wurde bisher bereits im Nervensystem untersucht und ist bei der Ausbildung der homophilen L1-L1 Bindung *in vitro*, sowie bei der optimalen Bindung an heterophile Liganden von Bedeutung (De Angelis et al., 2001; Jacob et al., 2002). Neuronales L1CAM fördert während der Entwicklung des Nervensystems die Migration und die Proliferation von Nervenzellen direkt über die heterophile Bindung neuronaler Liganden und indirekt über die L1CAM vermittelte Signaltransduktion. Über dieselben molekularen Mechanismen könnte L1CAM möglicherweise die Migration, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen fördern (Siesser und Maness 2009). Das alternative Spleißen der L1CAM mRNA ist ein feinregulierter Prozess und marginale Verschiebungen des Gleichgewichts zwischen der *full-length* L1CAM Variante und der L1CAM Spleißvariante sind möglicherweise ausreichend um Krankheitsverläufe auszulösen oder zu verstärken (Tazi et al., 2009). Die Überexpression von L1CAM wird in mehreren Tumorentitäten gemessen und es ist bereits bekannt, dass dadurch Tumorwachstum und Metastasierung gefördert werden (Gavert et al., 2007; Siesser und Maness, 2009). Diese metastasierungs-fördernde Wirkung von L1CAM konnte durch diese Arbeit bestätigt werden: zum einen durch die Reduktion der Anzahl an Lungenmetastasen durch die Suppression von L1CAM in der SKOV3ip Zelllinie, zum anderen durch die Überexpression der *full-length* L1CAM Variante in den L-CI.5s und HT1080 Zelllinien, welche zu einem signifikanten Anstieg der Metastasierung der Leber

führte. Durch die Überexpression der beiden Varianten wurden die metastatischen Eigenschaften von FL-L1CAM und der alternativ gespleißten Variante (SV-L1CAM) zum ersten Mal getrennt betrachtet. Entgegen der ursprünglichen Erwartung zeigten erhöhte Expressionsspiegel von FL-L1CAM und nicht von SV-L1CAM einen Metastasierungsfördernden Effekt. Dieses Ergebnis steht nicht im Einklang mit dem Resultat, dass die alternativ-gespleißte Variante von L1CAM E-Cadherin aus den *adherens junctions* freilässt, dadurch die  $\beta$ -Catenin-abhängige Signaltransduktion fördert und einen *scattered phenotype* epithelialer Mammakarzinomzellen *in vitro* hervorruft (Shtutman et al., 2006). Bei dieser Analyse wurde jedoch die neuronale L1CAM Isoform nicht mitgeführt. Die in vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien SKOV3ip, HT1080 und L-CI.5s exprimieren E-Cadherin jedoch möglicherweise überhaupt nicht oder nur in geringen Mengen (Kajiyama et al., 2003; Shtutman et al., 2006), sodass hier die epitheliale mesenchymale Transition möglicherweise schon induziert wurde. Dies weist darauf hin, dass L1CAM die hämatogene Metastasierung auch über weitere bisher nicht eindeutig geklärte Mechanismen beeinflusst. Mit dem *knock down* Experiment konnte die Wichtigkeit von L1CAM bei der hämatogenen Metastasierung im Ovarialkarzinom gezeigt werden. Zellen dieser Tumorentität wurden aufgrund der bekannten Korrelation zwischen dem L1CAM Expressionsspiegel und einer schlechten Prognose für Ovarialkarzinompatientinnen ausgewählt. Da der *knock down* beider Varianten zu einer Reduktion des metastatischen Potentials im Ovarialkarzinom führte, konnte unter Berücksichtigung aller Ergebnisse dieser Arbeit festgestellt werden, dass *full-length* L1CAM ein therapeutisches Zielmolekül sein könnte. In einem therapeutischen Konzept muss jedoch möglicherweise keine spezifische Hemmung dieser Variante angestrebt werden, da ein therapeutischer Effekt auch durch eine simultane Hemmung beider Isoformen deutlich zu sehen war. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit FL-L1CAM und nicht die Tumorzell-assoziierte Spleißvariante als metastasierungsförderndes Gen identifiziert.

## 7 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch eine spezifische Hemmung von L1CAM in Ovarialkarzinomzellen eine signifikante anti-metastatische Wirkung erzielt wurde. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die *full-length* Variante von L1CAM und nicht die SV-L1CAM Spleißvariante für den metastasierungsfördernden Effekt des Zelladhäsionsmoleküls von Bedeutung ist. Dieser Unterschied könnte zukünftig diagnostisch ausgenutzt werden, wenn es gelänge die Ergebnisse dieser Arbeit in größeren Studien mit klinischen Tumorproben zu validieren. Die Bestimmung der *Ratio* von *full-length* L1CAM zur gespleißten Isoform könnte es ermöglichen die Aggressivität einer Tumorerkrankung besser einzuschätzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zudem, dass die *full-length* Variante von L1CAM ein geeignetes Molekül für eine therapeutische Behandlung maligner Erkrankungen sein könnte. Hierbei ist von besonderer Bedeutung, dass eine Expression von *full-length* L1CAM bislang nur während der Entwicklung neuronaler Zellen und, im Gegensatz zur Spleißvariante, nicht oder nur in geringen Mengen in adulten Geweben nachgewiesen ist. Durch die Entwicklung eines für die *full-length* Isoform spezifischen monoklonalen Antikörpers könnte eine äußerst selektive Inhibition von Tumorzellen erreicht werden. Diese therapeutische Vorgehensweise könnte die Grundlage für eine effektive Therapie mit geringem Potential für unerwünschte Nebenwirkungen sein. Auch eine gleichzeitige Inhibition beider L1CAM Isoformen könnte zukünftig von therapeutischem Wert sein, da die spezifische Hemmung des L1 Zelladhäsionsmolekül zu einer signifikanten Reduktion der hämatogenen Metastasierung führte. Da bekannt ist, dass SV-L1CAM in adulten Geweben exprimiert wird muss noch abgeklärt werden, inwiefern die Inhibition dieses Moleküls zu Nebenwirkungen führt.

## 8 Literaturverzeichnis

**Aeed, P.A., Nakajima, M., Welch, D.R.** The role of polymorphonuclear leukocytes (PMN) on the growth and metastatic potential of 13762nf mammary adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer* 42 (1988) 748-759

**Allory, Y., Matsuoka, Y., Bazille, C., Christensen, E.I., Ronco, P., Debiec, H.** The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 1190-1197

**Amrutlal, K., Tikoo, P.K., Tikoo, S.K.** 293T cells expressing simian virus 40 T antigen are semi-permissive to bovine adenovirus type 3 infection. *J. Gen. Virol.* 87 (2006) 817-821

**Arlt, M.J., Novak-Hofer, I., Gast, D., Gschwend, V., Moldenhauer, G., Grünberg, J., Honer, M., Schubiger, P.A., Altevogt, P., Krüger, 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 (2006) 936-943

**Arlt, M.J., Kopitz, C., Pennington, C., Watson, K.L., Krell, H.W., Bode, W., Gänsbacher, B., Khokha, R., Edwards, D.R., Krüger, A.** Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res.* 62 (2002) 5543-5550

**Bateman, A., Jouet, M., MacFarlane, J., Du, J.S., Kenwrick, S., Chothia, C.** Outline structure of the human L1 cell adhesion molecule and the sites where mutations cause neurological disorders. *EMBO. J.* 15 (1996) 6050-6059

**Böcker, W., Kleihues, P., Höfler, H.K., Lax, S., Poremba, C., Moll, R.** Allgemeine Tumorpathologie, Definition des Tumorbegriffs. In: "Pathologie", Böcker W., Denk H., Heitz U. (Hrsg.), Urban und Fischer, München-Jena, 2004, 3. Auflage, 169-174

**Boo, Y.J., Park, J.M., Kim, J., Chae, Y.S., Min, B.W., Um, J.W., Moon, H.Y.** L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 14 (2007) 1703-1711

**Brummelkamp, T. R., Bernards, R., und Agami, R.** Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2 (2002) a 243-247

**Brummelkamp, T. R., Bernards, R., und Agami, R.** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296 (2002) b 550-553

**Brummendorf, T., Rathjen, F.G.** Axonal glycoproteins with immunoglobulin - and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J. Neurochem.* 61 (1993) 1207-1219

**Byun, H.J., Hong, I.K., Kim, E., Jin, Y.J., Jeoung, D.I., Hahn, J.H., Kim, Y.M., Park, S.H., Lee, H.** A splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 34833-34847

**Cavallaro, U., Christofori, G.** Multitasking in Tumor Progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014 (2004) 58-66

**Cavallaro, U., Christofori, G.** Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochimica et Biophysica Acta* 1552 (2001) 39-45

**Cheng, L., Itoh, K., Lemmon, V.** L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. *J. Neurosci.* 25 (2005) 395-403

**Christofori, G.** New signals from the invasive front. *Nature.* 441 (2006) 4440-4450

**Christofori, G.** Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *EMBO J.* 22 (2003) 2318-2323

**Crossin, K.L., Krushel, L.A.** Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev. Dyn.* 218 (2000) 260-279

**Davis, J.Q., Bennett, V.** Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 27163-27166

**De Angelis, E., Brummendorf, T., Cheng, L., Lemmon, V., Kenwrick, S.** Alternative use of a mini exon of the L1 gene affects L1 binding to neural ligands. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32738-32742

**Drews, J.** Drug discovery: a historical perspective. *Science* 287 (2000) 1960-1964

**DuBridg, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H., Calos, M.P.** Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 379-387

**Euer, N.I., Kaul, S., Deissler, H., Mobus, V.J., Zeillinger, R., Weidle, U.H.** Identification of L1CAM, Jagged2 and Neuromedin U as ovarian cancer-associated antigens. *Oncol. Rep.* 13 (2005) 375-387

**Felding-Habermann, B., O'Toole, T.E., Smith, J.W., Fransvea, E., Ruggeri, Z.M., Ginsberg, M.H., Hughes, P.E., Pampori, N., Shattil, S.J., Saven, A., Mueller, B.M.** Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 1853-1858

**Fidler, I.J.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 453-458

**Fidler, I.J.** Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.* 45 (1970) 773-82

**Fogel, M., Gutwein, P., Mechtersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Smirnov, A., Edler, L., Ben-Arie, A., Huszar, M., Altevogt P.** L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362 (2003) 869-875

- Folini, M., Pennati, M., Zaffaroni, N.** RNA interference-mediated validation of genes involved in telomere maintenance and evasion of apoptosis as cancer therapeutic targets. *Methods Mol. Biol.* 487 (2009) 303-330
- Gast, D., Riedle, S., Schabath, H., Schlich, S., Schneider, A., Issa, Y., Stoeck, A., Fogel, M., Joumaa, S., Wenger, T., Herr, I., Gutwein, P., Altevogt, P.** L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int. J. Cancer* 115 (2005) 658-665
- Gavert, N., Sheffer, M., Raveh, S., Spaderna, S., Shtutman, M., Brabletz, T., Barany, F., Paty, P., Notterman, D., Domany, E., Ben-Ze'ev, A.** Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res.* 67 (2007) 7703-7712
- Gavert, N., Conacci-Sorrell, M., Gast, D., Schneider, A., Altevogt, P., Brabletz, T., Ben-Ze'ev, 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 (2005) 633-642
- Geissler, A., Giersiefen, H., Zeslawska, E., Jacob, U., Krüger, A. und Stürzebecher, J.** Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 33613-33622
- Gerg, M., Kopitz, C., Schaten, S., Tschukes, A., Kahlert, C., Stangl, M., von Weyhern, C.W., Brücher, B.L., Edwards, D.R., Brand, K., Krüger, A.** Distinct functionality of tumor cell-derived gelatinases during formation of liver metastases. *Mol. Cancer Res.* 6 (2008) 341-351
- Gerg, M.** Bestimmung der unterschiedlichen Beiträge von Wirtszell- und Tumorzell-MMP-9 zur Metastasierung der Leber. (2009) Dissertation, Technische Universität München
- Guo, W., Giancotti, F.G.** Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5 (2004) 816-826
- Gupta, G.P., Massagué J.** Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127 (2006) 679-695
- Hanahan D., Weinberg R.A.** The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100 (2000) 57-70
- Hazan, R.B., Qiao, R., Keren, R., Badano, I., Suyama, K.** Cadherin switch in tumor progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014 (2004) 155-1563
- Herrlich, P., Morrison, H., Sleeman, J., Orian-Rousseau, V., König, H., Weg-Remers, S., Ponta, H.** CD44 acts both as a growth - and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 910 (2000) 106-118
- Hortsch, M.** The L1 Family of Neural Cell Adhesion Molecules: Old Proteins Performing New Tricks. *Neuron.* 17 (1996) 587-593
- Huang, J., Qi, R., Quackenbush, J., Dauway, E., Lazaridis, E., Yeatman, T.** Effects of ischemia on gene expression. *J. Surg. Res.* 99 (2001) 222-227

**Hunter, K., Welch, D.R., Liu, E.T.** Genetic background is an important determinant of metastatic potential. *Nat. Genet.* 34 (2003) 23-24

**Islam, R., Kristiansen, L.V., Romani, S., Garcia-Alonso, L., Hortsch, M.** Activation of EGF receptor kinase by L1-mediated homophilic cell interactions. *Mol. Biol. Cell.* 15 (2004) 2003-2012

**Itoh, K., Sakurai, Y., Asou, H., Umeda, M.** Differential expression of alternatively spliced neural cell adhesion molecule L1 isoforms during oligodendrocyte maturation. *J. Neurosci. Res.* 60 (2000) 579-586

**Jacob, J., Haspel, J., Kane-Goldsmith, N., Grumet, M.** L1 mediated homophilic binding and neurite outgrowth are modulated by alternative splicing of exon 2. *J. Neurobiol.* 51 (2002) 177-189

**Johnson J.P.** Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* 10 (1991) 11-22

**Jouet, M., Rosenthal, A., Kenwrick, S.** Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells. *Brain. Res.* 30 (1995) 378-380

**Kaifi, J.T., Reichelt, U., Quaas, A., Schurr, P.G., Wachowiak, R., Yekebas, E.F., Strate, T., Schneider, C., Pantel, K., Schachner, M., Sauter, G., Izbicki, J.R.** L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer. *Mod. Pathol.* 20 (2007) 1183-1190

**Kajiyama, H., Kikkawa, F., Khin, E., Shibata, K., Ino, K., Mizutani, S.** Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 63 (2003) 2278-2283

**Kamiguchi, H., Lemmon, V.** A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. *J. Neurosci.* 18 (1998) a 3749-3756

**Kamiguchi, H., Long, K.E., Pendergast, M., Schaefer, A.W., Rapoport, I., Kirchhausen, T., Lemmon, V.** The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J. Neurosci.* 18 (1998) b 5311-5321

**Kopitz, C., Anton, M., Gänsbacher, B. und Krüger, A.** Reduction of experimental human fibrosarcoma lung metastasis in mice by adenovirus-mediated cystatin C overexpression in the host. *Cancer Res.* 65 (2005) 8608-8612

**Kopitz, C.** Modulation der experimentellen Metastasierung einer humanen Fibrosarkomzelllinie durch adenoviralen Gentransfer natürlicher Protease Inhibitoren in das Maus-Wirtsgewebe. (2005) Dissertation, Technische Universität München

**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 (1999) 285-294.

**Krüger, A., Schirmacher, V. und 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 (1994) a 275-284

**Krüger, A., Umansky, V., Rocha, M., Hacker, H.J., Schirmacher, V. und von Hoegen P.** Pattern and load of spontaneous liver metastasis dependent on host immune status studied with a *lacZ* transduced lymphoma. *Blood* 84 (1994) b 3166-3174

**Kulahin, N., Li, S., Hinsby, A., Kiselyovm V., Berezin, V., Bockm 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.* (2008) 528-536

**Long, K.E., Asou, H., Snider, M.D., Lemmon, V.** The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 1285-1290

**Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F., Groom, A.C.** Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* 153 (1998) 865-873

**Maness, P.F., Schachner, M.** Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 10 (2007) 19-26

**Marhaba, R., Zöller, M.** CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J. Mol. Histol.* 35 (2004) 211-231

**Mc Cawley, L.J., Matrisian, L.M.** Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol. Med. Today.* 6 (2000) 149-156

**Mechtersheimer, S., Gutwein, P., Agmon-Levin, N., Stoeck, A., Oleszewski, M., Riedle, S., Postina, R., Fahrenholz, F., Fogel, M., Lemmon, V., Altevogt, P.** Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell. Biol.* 155 (2001) 661-673

**Mehlen P., Puisieux A.** Metastasis: a question of life or death. *Nat. Rev. Cancer.* 6 (2006) 449-458

**Meier, F., Busch, S., Gast, D., Göppert, A., Altevogt, P., Maczey, E., Riedle, S., Garbe, C., Schitteck, B.** The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression. *Int. J. Cancer* 119 (2006) 549-555

**Meli, M.L., Carrel, F., Waibel, R., Amstutz, H., Crompton, N., Jaussi, R., Moch, H., Schubiger, P.A., Novak-Hofer, I.** Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 83 (1999) 401-408

**Mimeault, M., Batra, S.K.** Functions of tumorigenic and migrating cancer progenitor cells in cancer progression and metastasis and their therapeutic implications. *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 203-214

- Moos, M., Tacke, R., Scherer, H., Teplow, D., Fruh, K., Schachner, M.** Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334 (1988) 701-703
- Nash, G.F., Turner, L.F., Scully, M.F., Kakkar, A.K.** Platelets and cancer. *Lancet Oncol.* 3 (2002) 425-430
- Needham, L.K., Thelen, K., Maness, P.F.** Cytoplasmic domain mutations of the L1 cell adhesion molecule reduce L1-ankyrin interactions. *J. Neurosci.* 21 (2001) 1490-1500
- Nguyen, T. H.** Mechanisms of Metastasis. *Clinics in Dermatology* 22 (2004) 209-216
- Pajares, M.J., Ezponda, T., Catena, R., Calvo, A., Pio, R., Montuenga, L.M.** Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol.* 8 (2007) 349-357
- Pearson, B., Wolf, P.L., Vazquez, J.** A comparative study of a series of new indolyl compounds to localize beta-galactosidase in tissues. *Lab. Invest.* 12 (1963) 1249-1259
- Ramaswamy, S., Ross, K.N., Lander, E.S., Golub, T.R.** A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* 33 (2003) 49-54
- Reid, R.A., Hemperly, J.J.** Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of RNA. *J. Mol. Neurosci.* 3 (1992) 127-135
- 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 (2006) 985-1006
- Schaefer, A.W., Kamiguchi, H., Wong, E.V., Beach, C.M., Landreth, G., Lemmon, V.** Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 37965-37973
- Schirmacher, V., Bosslet, K.** Tumour metastases and cell-mediated immunity in a model system in DBA/2 mice. X. Immunoselection of tumor variants differing in tumor antigen expression and metastatic capacity. *Int. J. Cancer* 25 (1980) 781-788
- Schmalfeldt, B.** Veränderungen und Tumoren des Ovars. In: "Gynäkologie und Geburtshilfe", Kiechle, M. (Hrsg.), Urban und Fischer, München, 2007, 1. Auflage, 535-550
- Schmid, R.S., Pruitt, W.M., Maness, P.F.** A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J. Neurosci.* 20 (2000) 4177-4188
- Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Banke, I.J., Arlt, M.J., Sturzebecher, A., Schuster, O., Geissler A, Giersiefen H, Zeslawska E, Jacob U, Krüger A, Stürzebecher J.** Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 33613-33622

**Scotlandi, K., Zuntini, M., Manara, M.C., Sciandra, M., Rocchi, A., Benini, S., Nicoletti, G., Bernard, G., Nanni, P., Lollini P.L., Bernard, A., Picci, P.** CD99 isoforms dictate opposite functions in tumour malignancy and metastases by activating or repressing c-Src kinase activity. *Oncogene* 26 (2007) 6604-6618

**Shibuya, Y., Okabayashi, T., Oda, K., Tanaka, N.** Ratio of CD44 epithelial variant to CD44 hematopoietic variant is a useful prognostic indicator in gastric and colorectal carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 28 (1998) 609-614

**Shtutman, M., Levina, E., Ohouo, P., Baig, M., Roninson, I.B.** Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 66 (2006) 11370-11380

**Siesser, P.F., Maness, P.F.** L1 cell adhesion molecules as regulators of tumor cell invasiveness. *Cell. Adh. Migr.* 3 (2009) 275-277

**Silletti, S., Yebra, M., Perez, B., Cirulli, V., McMahon, M., Montgomery, A.M.** Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. *J. Biol. Chem.* (2004) 28880-28888

**Skotheim, R.I., Nees, M.** Alternative splicing in cancer: noise, functional, or systematic? *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39 (2007) 1432-1449

**Slattery, M.J., Liang, S., Dong, C.** Distinct role of hydrodynamic shear in leukocyte-facilitated tumor cell extravasation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288 (2005) 831-839

**Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ramsdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J.** A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 628-633

**Srebrow, A., Kornblihtt, A.R.** The connection between splicing and cancer. *J. Cell. Sci.* 119 (2006) 2635-2641

**Stauder, R., Van Driel, M., Schwarzler, C., Thaler, J., Lokhorst, H.M., Kreuser, E.D., Bloem, A.C., Günthert, U., Eisterer, W.** Different CD44 splicing patterns define prognostic subgroups in multiple myeloma. *Blood* 88 (1996) 3101-3108

**Stegg, P.S.** Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat. Med.* 12 (2006) 895-904

**Stegg, P.S.** Invasion and metastasis. *Current Opinion in Oncology* 4 (1992) 134-141

**Takeda, Y., Asou, H., Murakami, Y., Miura, M., Kobayashi, M., Uyemura, K.** A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. *J. Neurochem.* 66 (1996) 2338-2349

**Tazi, J., Bakkour, N., Stamm, S.** Alternative splicing and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1792 (2009) 14-26

**Thies, A., Schachner, M., Moll, I., Berger, J., Schulze, H.J., Brunner, G., Schumacher, U.** Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* 38 (2002) 1708-1716

**Turner, N., Grose, R.** Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10 (2010) 116-129

**Van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart AA., Mao M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R., Friend, S.H.** Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415 (2002) 484-485

**Venables, J.P.** Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res.* 64 (2004) 7647-7654

**Voura, E.B., Ramjeesingh, R.A., Montgomery, A.M., Siu, C.H.** Involvement of integrin alpha(v)beta(3) and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol. Cell* 12 (2001) 2699-2710

**Voutilainen, K.A., Anttila, M.A., Sillanpää, S.M., Ropponen, K.M., Saarikoski, S.V., Juhola, M.T., Kosma, V.M.** Prognostic significance of E-cadherin-catenin complex in epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Pathol.* 59 (2006) 460-467

**Wang, H., Fu, W., Im, J.H., Zhou, Z., Santoro, S.A., Iyer, V., DiPersio, C.M., Yu, Q.C., Quaranta, V., Al-Mehdi, A., Muschel, R.J.** Tumor cell alpha3beta1 integrin and vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest and metastasis. *J. Cell. Biol.* 164 (2004) 935-941

**Weigelt, B., Peterse, J.L., van't Veer, L.J.** Breast Cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 591-602

**Weinberg, R.A.** In: "the biology of cancer", Garland Science, Cambridge-Massachusetts, 2007, 587-655

**Welsch, U.** In: "Lehrbuch Histologie", Urban und Fischer, München-Jena, 2003, 1. Auflage, 106-112

**Wolf, K., Friedl, P.** Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br. J. Dermatol.* 154 (2006) 11-15

**Yee, J.K., Miyanojara, A., LaPorte, P., Bouic, K., Burns, J.C., Friedmann, T.** A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 9564-9568

**Yonekura, S., Ting, C.Y., Neves, G., Hung, K., Hsu, S.N., Chiba, A., Chess, A., Lee, C.H.** The variable transmembrane domain of *Drosophila* N-cadherin regulates adhesive activity. *Mol. Cell Biol.* 26 (2006) 6598-6608

**Zhang, X.D., Hersey, P.** Expression of catenins and p120cas in melanocytic nevi and cutaneous melanoma: deficient alpha-catenin expression is associated with melanoma progression. *Pathology* 31 (1999) 239-246

## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Schematische Darstellung der neuronalen und nicht-neuronalen Isoform von L1CAM	14
<b>Abbildung 2</b>	Schematische Darstellung des Plasmids pQCXIP-L1a	25
<b>Abbildung 3</b>	Schematische Darstellung des Plasmids pQCXIP-L1d(2,27)	26
<b>Abbildung 4</b>	Schematische Darstellung des Plasmids pQCXIH-L1a	27
<b>Abbildung 5</b>	Schematische Darstellung des Plasmids pQCXIH-L1d(2,27)	28
<b>Abbildung 6</b>	Schematische Darstellung des Plasmids pSiren-RetroQ shL1	29
<b>Abbildung 7</b>	Schematischer Aufbau der verwendeten shRNAs am Beispiel der humanen L1CAM shRNA	30
<b>Abbildung 8</b>	Induktion der L1CAM Expression in Metastasen ovariellen Ursprungs im Vergleich zum Kontrollgewebe	41
<b>Abbildung 9</b>	Expression von FL-L1CAM und SV-L1CAM in Omentum majus Metastasen des Ovarialkarzinoms	43
<b>Abbildung 10</b>	Simultaner <i>knock down</i> von Gesamt-L1CAM in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip	44
<b>Abbildung 11</b>	Reduktion des <i>in vitro</i> Invasionspotentials der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip durch den simultanen <i>knock down</i> von L1CAM	45
<b>Abbildung 12</b>	Reduktion der Anzahl metastatischer Kolonien, bedingt durch die Suppression der endogenen L1CAM Expression in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip	46
<b>Abbildung 13</b>	Kein signifikanter Einfluss des simultanen L1CAM <i>knock down</i> auf das <i>in vitro</i> Proliferationspotential der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip	47

<b>Abbildung 14</b>	Überexpression von L1 $\Delta$ 27 und SV-L1 in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip mittels retroviralem Gentransfer	48
<b>Abbildung 15</b>	Die Überexpression von SV-L1CAM zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Metastasierungspotential der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3	50
<b>Abbildung 16</b>	Hoher endogener Gesamt-L1CAM mRNA Expressionsspiegel der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip im Vergleich zur humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080	51
<b>Abbildung 17</b>	Überexpression von FL-L1CAM und SV-L1CAM in der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 auf mRNA und Proteinebene	52
<b>Abbildung 18</b>	Nicht signifikante Induktion der Lungenmetastasierung von HT1080 Zellen durch die Überexpression von FL-L1CAM und SV-L1CAM	54
<b>Abbildung 19</b>	Signifikanter Anstieg der Mikrometastasierung in der Leber durch die Expression von FL-L1CAM in HT1080 Zellen	55
<b>Abbildung 20</b>	Expression von FL-L1CAM und SV-L1CAM in der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s auf mRNA und Proteinebene	57
<b>Abbildung 21</b>	Verstärkte Lebermetastasierung durch die Expression von humanem FL-L1CAM in der murinen Lymphomzelllinie L-CI.5s	58
<b>Abbildung 22</b>	Kein Einfluss der humanen L1CAM Varianten auf das <i>in vitro</i> Proliferationspotential der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s	60

## 10 Abkürzungsverzeichnis

Arg	Arginin
Asp	Asparagin
BCA	Bizinkoniniksäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
CAM	Zelladhäsionsmolekül
CD	<i>Caesarean derived</i> (CD1nu/nu)
cDNA	codogene DNA
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagles Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E.coli</i>	<i>Escheria coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
EtOH	Ethanol
env	<i>envelope</i> Proteine
EZM	extrazelluläre Matrix
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FKS	fetales Kälberserum
FL-L1CAM	<i>full-length</i> L1 Zelladhäsionsmolekül
gag	gruppenspezifisches Antigen
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer)
hu	human
i.v.	intravenös
L1CAM	L1 Zelladhäsionsmolekül
mg	milligramm
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> RNA
mAb	<i>monoclonal Antibody</i>
mu	murin
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PAA	Polyakrylamid
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCI	Phenolchloroformisoamylalkohol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pol	Polymerase
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodiumdodecylsulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
shRNAi	<i>small hairpin RNA interference</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Achim Krüger*, meinem Doktorvater, für die Vergabe des interessanten Themas der Dissertation und für die engagierte Betreuung. Insbesondere möchte ich mich außerordentlich bei ihm für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten sowie an das Erstellen und Präsentieren von wissenschaftlichen Vorträgen bei ihm bedanken. Seine engagierte Unterstützung und die Möglichkeit mich bei Fragen jederzeit an ihn wenden zu können, trugen maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn *Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher*, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München, für die Ermöglichung dieser wissenschaftlichen Arbeit sowie für die wertvolle Unterstützung und hilfreichen Gespräche, insbesondere in der Endphase dieser Arbeit.

Meiner Betreuerin Frau *Dipl. Biol. Stephanie Hauser* möchte ich mich herzlich für die Einarbeitung in die Zellkultur sowie für die Einarbeitung in die zellexperimentellen und molekularbiologischen Methoden bedanken. Außerdem hat sie mich bei der Durchführung und Planung von Tierversuchen tatkräftig unterstützt. Zudem war sie als Ansprechpartner jederzeit für mich da und trug durch fachliche Ratschläge zu dieser Arbeit bei.

Bei Frau *Dr. rer. nat. Charlotte Kopitz* und Herrn *Dr. rer. nat. Michael Gerg* möchte ich mich für die durchwegs konstruktiven Ratschläge und Diskussionsbeiträge im Rahmen von Laborbesprechungen sowie für die intravenöse Applikation der Tumorzellen bedanken. Bei Herrn *Dr. rer. nat. Michael Gerg* bedanke ich mich zudem für die Einarbeitung in die TaqMan™ Analyse und in die Einführung in die Proteinbiochemischen Verfahren, sowie für die Unterstützung beim Planen und Durchführen von zell- und tierexperimentellen Verfahren durch durchwegs kompetente Ratschläge. Außerdem möchte ich mich bei ihm für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Frau *Katja Honert*, Frau *Stephanie Hahn* und Frau *Mareike Lehnhoff* danke ich sehr herzlich für die tatkräftige technische Unterstützung. Bei Frau *Katja Honert* bedanke ich mich zudem für die Einarbeitung in die Zellkultur, für ihre vielfältige Unterstützung und auch für ihre hilfreichen Ratschläge in Bezug auf die Durchführung zell- und molekularbiologischer Methoden.

Herrn *Prof. Dr. rer. nat. Alfons Meindl*, Leiter der Abteilung für gynäkologische Tumorgenetik, Frau *Dr. phil. nat. Juliane Ramser* und Frau *Juliane Volkmann*, wissenschaftliche Mitarbeiterinnen in der Abteilung für gynäkologische Tumorgenetik der

Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar, danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung von Gewebeproben von Ovarialkarzinommetastasen und Peritonealgewebe zur Bestimmung des Expressionsmusters der L1CAM Isoformen.

Bei Herrn *Prof. Peter Altevogt*, Leiter der Gruppe Zelladhäsion des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg, bedanke ich mich für die Bereitstellung des Plasmids L1d(2,27)-pcDNA3, für die Bereitstellung des mAb L1-11A (UJ 127.11) sowie für eine stete konstruktive Kooperationsbereitschaft.

Herrn *Vance Lemmon (Ph.D.)*, Leiter des Labors für Axon Growth and Guidance der University of Miami, bedanke ich mich für die Bereitstellung der neuronalen L1CAM cDNA.

Zusätzlich möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere bei Frau *Dipl. Ing. (FH) Mehrije Ferizi*, bei Herrn *Dipl. Ing. Florian Schelter*, bei Herrn *Dipl. Biochem. Dirk Weinspach* sowie bei Frau *Dipl. Biol. Christin Flechsig* für eine kollegiale Zusammenarbeit, für konstruktive Kritik, kompetente Ratschläge und für die Unterstützung bei Tierversuchen bedanken.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung möchte ich danken, welche durch ihre Ratschläge und Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich mich hier bei Frau *Dr. Martina Anton* und bei Herrn *Dipl. Biol. Klaus Mantwill* bedanken.

Für Serviceleistungen möchte ich mich ganz besonders bei Herrn *Josef Straßmair*, stellvertretend für die Organisation der Zellkultur bei Frau *Gerlinde Stejskal* und stellvertretend für alle Mitarbeiter des Tierstalls bei Frau *Rosi Bergmeyer* bedanken.

Zuletzt danke ich ganz besonders meinen Eltern, Geschwistern und Freunden, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## 12 Anhang

### Lebenslauf

#### Persönliche Angaben

---

**Name:** Laura Bickel  
**Geburtsdatum:** 19. Juni 1983  
**Geburtsort:** München  
**Familienstand:** ledig

#### Akademische Ausbildung

---

11/2009 **Staatsexamen im Fach Humanmedizin an der Technischen Universität München, Note „gut“ (2,5)**

04/2005 – 11/2009 **Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München (klinischer Studienabschnitt)**

03/2005 **Ärztliche Vorprüfung an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Note „befriedigend“ (2,66)**

04/2003 – 03/2005 **Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (vorklinischer Studienabschnitt)**

10/2002 – 02/2003 **Studium des Maschinenbaus an der Technischen Universität München**

#### Schulbildung

---

06/2002 **Allgemeine Hochschulreife, Note „gut“ (1,6)**

09/2000 – 06/2002 **Besuch des Gymnasium Oberhaching, Bayern**

09/1999 – 06/2000 **Besuch der La Salle High School, Oregon**

09/1993 – 07/1999 **Besuch des Gymnasium Oberhaching, Bayern**

#### Wissenschaftliche Arbeit

---

seit 01/2006 **Doktorandin am Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung**

03/2007 **Vorträge: Identification of aL1CAM splice variant as a metastasis-relevant molecule. 24th Winter School on Proteinases and their Inhibitors, Recent Developments, Feb28<sup>th</sup> -Mar4<sup>th</sup>, 2007, Tiers, Italien**  
Laura Bickel<sup>1</sup>, Stephanie Hauser<sup>1</sup>, Michael Gerg<sup>1</sup>, Peter Altevogt<sup>4</sup>, Manfred Stangl<sup>2</sup>, Claus W. Hann von Weyhern<sup>3</sup>, Björn L.D.M. Brücher<sup>2</sup>, Charlotte Kopitz<sup>1</sup>, and Achim Krüger<sup>1</sup>

09/2010 **Publikationen: Manuskript in Bearbeitung**