

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Ernährungsmedizin

Untersuchungen zur molekularen Bedeutung des
Zelladhäsionsmoleküls L1CAM und seiner Spleiß-Variante in
den späten Phasen der Metastasierung
von murinen und humanen Tumorzellen

Stephanie Michaela Hauser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Daniel
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. J. Hauner
2. apl. Prof. Dr. A. Krüger

Die Dissertation wurde am 09.11.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.12.2010 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	6
2	Einleitung.....	7
2.1	Krebsentstehung und die metastatische Kaskade.....	7
2.2	Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).....	11
2.3	A Disintegrin and Metalloproteinasen (ADAMs).....	12
2.4	Die Rolle des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM in der Tumorprogression.....	14
2.4.1	Strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM.....	15
2.4.2	Funktionelle Modulation von L1CAM durch <i>shedding</i>	19
2.5	Alternatives Spleißen von mRNA in der Tumorprogression.....	21
2.6	Tiermodelle zur Untersuchung der Tumorprogression.....	22
3	Zielsetzung der Arbeit.....	24
4	Material und Methoden.....	25
4.1	Tierexperimentelle Methoden.....	25
4.1.1	Verwendete Versuchstiere.....	25
4.1.2	Experimentelle Metastasierung eines syngen T-Zell- Lymphommodells (L-CI.5s).....	25
4.1.3	Experimentelle Metastasierung von Xenograft-Modellen (SKOV3ip- und HT1080/ <i>acZ</i> -K15-Zellen).....	26
4.2	Zellbiologische Methoden.....	27
4.2.1	Verwendete Zelllinien.....	27
4.2.2	Kotransfektion und Infektion von Suspensionszellen (L-CI.5s).....	28
4.2.3	Kotransfektion und Infektion von adhären Zellen (SKOV3ip).....	29
4.2.4	<i>Limiting Dilution</i>	30
4.2.5	Inkubationsversuche mit HGF und TGF- β	30
4.2.6	Proliferationsanalysen.....	31
4.2.7	<i>Boyden-Chamber</i> -Migrationsexperimente.....	31
4.2.8	<i>Boyden-Chamber</i> -Invasionsexperimente.....	31
4.2.9	Verwendete Plasmide und cDNAs.....	32

4.2.10	Klonierungsstrategie der verwendeten Plasmide.....	32
4.2.11	RNA-Isolation aus Zellen	34
4.2.12	RNA-Isolation aus Gewebe.....	35
4.2.13	Quantitative RT-PCR	35
4.3	Biochemische Methoden.....	36
4.3.1	Proteinisolation aus Zellen.....	36
4.3.2	Western-Blot-Analysen	37
4.3.3	MMP-2- und MMP-9-Aktivitätsassays	38
4.3.4	<i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	39
4.3.5	<i>In-situ</i> -Zymographie.....	40
4.4	Patientenmaterial.....	41
4.5	Statistische Auswertung	41
5	Ergebnisse	42
5.1	Untersuchungen der Effekte von L1CAM und ADAM-10 in den späten Phasen der Metastasierung	42
5.1.1	Korrelation der L1CAM- und ADAM10-Expression mit der Progression der experimentellen Metastasierung eines T-Zell- Lymphoms (L-CI.5s)	42
5.1.2	Lokalisation von L1CAM im metastasenträgenden Lebergewebe	43
5.1.3	Charakterisierung von L-CI.5s-shmuL1CAM <i>knock down</i> Zelllinien	44
5.1.4	Reduktion des metastatischen Potentials von L-CI.5s <i>in vivo</i> durch den <i>knock down</i> von L1CAM	46
5.1.5	Suppression der Expression von ADAM-10 in L-CI.5s-Zellen.....	48
5.1.6	Reduktion der Makrometastasierung, aber Induktion der sekundären Invasion durch <i>knock down</i> von ADAM-10 in L-CI.5s- Zellen.....	50
5.1.7	Verifizierung der <i>knock down</i> Ergebnisse von L1CAM bzw. ADAM10 mit klonalen Tumorzelllinien.....	52
5.1.8	Induktion der Metastasierung durch Überexpression von murinem L1CAM in L-CI.5s-Zellen.....	54
5.2	Untersuchungen der Rolle von humanen L1CAM-Isoformen in den späten Phasen der Metastasierung	56

5.2.1	Untersuchungen zur Expression der L1CAM-Varianten in humanen Patientenproben	56
5.2.2	Verstärkte Expression von SV-L1CAM im Vergleich zu FL-L1CAM in etablierten Ovarial- und Kolonkarzinomzellen.....	59
5.2.3	Überexpression von FL-L1CAM in Ovarialkarzinomzellen (SKOV3ip)..	59
5.2.4	Überexpression des vollständigen L1CAM und nicht der Spleiß-Variante fördert die Lungenmetastasierung von Ovarialkarzinomzellen	61
5.2.5	Veränderung des Genexpressionsprofils in SKOV3ip durch Überexpression von FL-L1CAM.....	63
5.2.6	Verstärkte MMP-2-Aktivität in SKOV3ip-FL-L1CAM <i>in vitro</i>	64
5.2.7	Induktion gelatinolytischer Aktivität in Lungenmetastasen durch FL-L1CAM-Expression.....	65
5.2.8	Erhöhte gelatinolytische Aktivität durch FL-L1CAM in zwei weiteren experimentellen Metastasierungsmodellen.....	66
5.2.9	Zusammenhang zwischen metastasierungsassoziierten Signaltransduktionswegen und der Überexpression von FL-L1CAM in Tumorzelllinien.....	69
5.2.10	Modulation des Spleißens von L1CAM zu Gunsten der vollständigen Isoform durch Inkubation von Ovarial- und Kolonkarzinomzellen mit prometastatischen Faktoren.....	72
6	Diskussion	74
6.1	Einfluss der Gensuppression von L1CAM bzw. dessen Sheddase ADAM-10 in einem experimentellen Metastasierungsmodell eines T-Zell-Lymphoms.....	75
6.2	Induktion des metastatischen Potentials von Ovarialkarzinomzellen durch die vollständige Isoform von L1CAM.....	79
6.3	Untersuchungen von potentiellen molekularen Mechanismen der FL-L1CAM-induzierten Metastasierung	84
6.4	Ausblick	90
7	Literaturverzeichnis	92
8	Abkürzungsverzeichnis.....	112

9	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	114
10	Danksagung	116

1 Zusammenfassung

Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM ist mit einer schlechten Prognose verschiedener Krebserkrankungen assoziiert. Die Expression von L1CAM in Tumorzellen kann zu einer Induktion des migratorischen und invasiven Potentials der Zellen führen. Dabei ist kaum etwas über die Wirkung einer Spleißvariante von L1CAM oder auch der ADAM-10-induzierten Spaltung von L1CAM auf dessen protumorigene Eigenschaften bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, zum einem den Einfluss der Expression von jeweils L1CAM oder seiner Sheddase ADAM-10 auf die späten Phasen der Metastasierung zu untersuchen. Zum anderen sollten, aufbauend auf ersten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die metastasierungsfördernden Eigenschaften von vollständigem L1CAM (FL-L1CAM) im Vergleich zur Spleißvariante (SV-L1CAM) bestätigt werden und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen identifiziert werden.

Durch Anwendung von RNAi-Technologie konnte ein effizienter *knock down* von jeweils L1CAM oder dessen Sheddase ADAM-10 in T-Zell-Lymphomzellen (L-CI.5s) erzielt werden. Während die Reduktion der ADAM-10-Expression die Bildung grosser metastatischer Foci in der Leber unterdrückte, jedoch die sekundäre Infiltration des Lebergewebes durch einzelne Tumorzelle erhöhte, verringerte der *knock down* von L1CAM das metastatische Potential der Tumorzellen insgesamt signifikant. Umgekehrt konnte durch jeweilige Überexpression der beiden L1CAM-Isoformen, FL-L1CAM bzw. SV-L1CAM, in Ovarialkarzinomzellen eine prometastatische Wirkung von FL-L1CAM, nicht aber der Spleißvariante identifiziert werden. Mit diesen Ergebnissen geht eine nur durch die Überexpression der FL-L1CAM-Isoform induzierte gelatinolytische Aktivität sowohl in den Tumorzellen als auch im entsprechenden Metastasengewebe in drei unterschiedlichen Tumormodellen einher. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen nicht nur, dass L1CAM bedeutend für die Kolonisierung der Tumorzellen in sekundären Organen ist, sondern zeigen eine Korrelation von FL-L1CAM-induzierter Metastasierung und verstärkter Gelatinasen-Aktivität. Dies unterstreicht nicht nur die Wichtigkeit von L1CAM als therapeutisches Zielmolekül, sondern deutet auch auf einen Einfluss der FL-L1CAM-Expression auf das proteolytische Gleichgewicht im metastatischen Gewebe hin.

2 Einleitung

2.1 Krebsentstehung und die metastatische Kaskade

Krebserkrankungen sind in entwickelten Ländern nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache, wodurch es 2006 in der Europäischen Union zu mehr als 1 Millionen Todesfälle kam (Ferlay *et al.*, 2007). In 90% der Fälle führt allerdings nicht der Primärtumor zum Tod des Patienten, da dieser oft chirurgisch, strahlen- oder chemotherapeutisch entfernt werden kann (Gupta und Massague, 2006; Wedding *et al.*, 2007). Haupttodesursache ist meist die Metastasierung von Tumorzellen in entfernte Organe, wodurch es u.a. zu einem funktionellen Organversagen kommen kann (Gupta und Massague, 2006; Langley und Fidler, 2007).

Die Prozesse der Dissemination der Tumorzellen vom Primärtumor bis zur Ausbildung von Metastasen laufen in mehreren Phasen ab, die zusammengefasst als metastatische Kaskade bezeichnet werden. Dabei hängt der „Erfolg“ einer Tumorzelle, in einem Gewebe Metastasen bilden zu können, von ihren intrinsischen Eigenschaften, aber auch von exogenen Faktoren, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren und Zytokinen ab (Langley und Fidler, 2007). Die Interaktion der Tumorzelle mit der Wirtsumgebung ist somit ein entscheidender Faktor für die Ausbreitung von Tumorzellen im Organismus (Langley und Fidler, 2007).

Hanahan und Weinberg haben sechs molekulare Veränderungen der Zellphysiologie beschrieben, die sog. „*Hallmarks of cancer*“, die bösartigem Tumorwachstum zu Grunde liegen (Hanahan und Weinberg, 2000). Jede dieser Veränderungen, nämlich gesteigerte Proliferation, Unempfindlichkeit gegenüber Signalen zur Wachstumshemmung, Inhibition von Apoptosesignalen, uneingeschränktes Replikationspotential, fortwährende Angiogenese und letztendlich Invasion und Metastasierung sind essentielle Merkmale für die Progression maligner Tumore (Hanahan und Weinberg, 2000).

Zu Beginn der metastatischen Kaskade müssen die Tumorzellen sich vom Primärtumor lösen, um in die Blut- und Lymphgefäße intravadiert zu können. Ein entscheidender Faktor dabei ist die Expression und Aktivierung von Proteasen. Die

proteolytisch aktiven Enzyme sind allerdings nicht nur für den Abbau der Extrazellulären Matrix (EZM) und der Basalmembran nötig, sondern führen auch zur Freisetzung und Aktivierung von prometastatischen Faktoren, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Coussens *et al.*, 2002). Diese Prozesse unterstützen die Einleitung der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT), wodurch das migratorische und invasive Potential der Tumorzellen zusätzlich induziert wird (Kalluri und Weinberg, 2009). Die EMT beschreibt die Umwandlung von basolateral-polarisierten Epithelialzellen zu Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp, die ihren Ursprungsort verlassen können (Kalluri und Weinberg, 2009).

Von den Tumorzellen, welche in umliegende Gefäße intravadiert sind, adaptieren und überleben allerdings auf Grund von physikalischen Kräften, Anoikis (Zelltod durch Verlust von Adhäsion) oder Immunzellreaktionen (Geiger und Peeper, 2009) nur sehr wenige dieser Zellen. Einigen Tumorzellen jedoch gelingt es, den Blut- und Lymphgefäßkreislauf zu verlassen (Extravasation) und sich in einem sekundären Organ festzusetzen (Coussens *et al.*, 2002) (Abb. 1).

Dabei kann die Entstehung von Metastasen durch die Ausbildung einer prämetastatischen Nische begünstigt werden. Durch die Störung der natürlichen Gewebemöostase in der Mikroumgebung eines Organs, kann die Invasion von Tumorzellen in das Gewebe erleichtert werden (Joyce und Pollard, 2009; Krüger *et al.*, 2009).

Die prämetastatische Nische wird als das interaktive Beziehungsgefüge der Tumorzelle und der Mikroumgebung des Wirtsgewebes, in dem sich die Tumorzelle etabliert hat, definiert (Psaila und Lyden, 2009). Dafür werden nicht nur die intrinsischen Faktoren der Tumorzellen benötigt, sondern auch die Interaktionen mit der Wirtsumgebung und den Wirtszellen (Coussens und Werb, 2002; Krüger, 2009; Krüger *et al.*, 2009). Die Mikroumgebung bietet durch ihren Aufbau aus Stromazellen, einem Gefäßnetzwerk sowie der EZM eine Quelle notwendiger Ressourcen für optimale Bedingungen für die Etablierung der Tumorzellen (Psaila und Lyden, 2009). Auch die Rekrutierung verschiedener Wirtszellen, wie Fibroblasten, Immun- und Knochenmarkszellen in das Gewebe kann die Etablierung der Tumorzellen unterstützen (Johansson *et al.*, 2008).

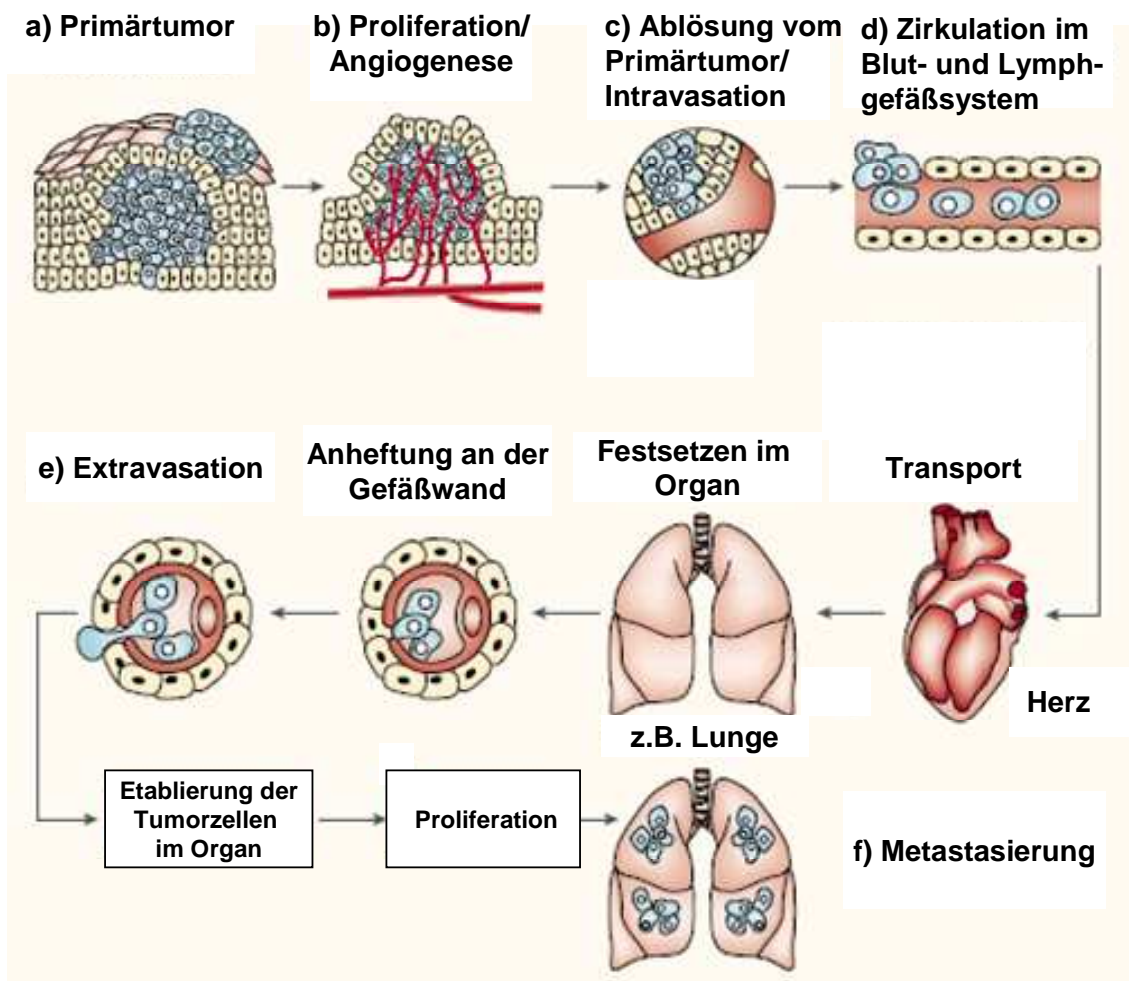


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der metastatischen Kaskade. Das Ablösen der Tumorzellen vom Primärtumor durch Abbau der EZM mit anschließender Intravasation der Tumorzellen in das Gefäßsystem ist in Schritt a-d dargestellt. Überleben die Tumorzellen in der Zirkulation und extravasieren erfolgreich in sekundäre Organe (e), können sie in der veränderten Mikroumgebung zu Metastasen auswachsen (f) (Abbildung modifiziert aus Fidler, 2003).

Ein entscheidender Regulator der interzellulären Kommunikation in der Mikroumgebung ist die Extrazelluläre Matrix (EZM), die hauptsächlich aus fibrillären Glykoproteinen, Kollagen und Proteoglykanen besteht (Skrzydowska *et al.*, 2005). Sie dient vor allem als stabilisierendes Gerüst für den Zellzusammenhalt und dem Austausch von Signalen zur Zellkommunikation, stellt aber auch einen Speicher für wichtige Wachstumsfaktoren dar (Joyce und Pollard, 2009). Die EZM kann durch proteolytische Aktivität u.a. in der Mikroumgebung abgebaut werden. Die Aktivierung EZM-degradierender Proteasen ist Teil des proteolytischen Netzwerks, dem *protease web* (Overall und Kleifeld, 2006). Es bildet sich aus der Interaktion und Querverbindung von proteolytischen Systemen und Kaskaden zu einem sich selbsterhaltenden Netzwerk (Overall und Dean, 2006; Overall und Kleifeld, 2006).

Dies bedeutet, dass der Verlust proteolytischer Aktivität einer Protease durch andere im Netzwerk aktive Proteasen kompensiert werden kann (Overall und Kleifeld, 2006). Im *protease web* werden auch die Wechselbeziehungen zwischen den Proteasen und ihren endogenen Inhibitoren einbezogen, die entscheidend zur Aufrechterhaltung der natürlichen Gewebemöostase beitragen (Joyce und Pollard, 2009). In unserem Labor konnte kürzlich gezeigt werden, dass die adenoviral-induzierte Überexpression von *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1) die Bildung einer prämetastatischen Nische in der Leber durch die Aktivierung der HGF/cMet-Signaltransduktion fördert und somit die Invasion von Tumorzellen unterstützt (Kopitz *et al.*, 2007). Dabei hängt die Ausbildung der TIMP-1 induzierten prämetastatischen Nische u.a. von der Expression des *urokinase plasminogen-activators* (uPA) im Wirtsgewebe ab (Schrözlmaier *et al.*, 2009).

Ein weiteres Kriterium für die erfolgreiche Ausbildung von Metastasen liegt der Hypothese von Stephen Paget zu Grunde. Seine 1889 aufgestellte „Seed and Soil“-These findet nun verstärkt Aufmerksamkeit in der Metastasenforschung (Fokas *et al.*, 2007; Geiger und Peeper, 2009). Diese besagt, dass Tumorzellen sich nur in einer für sie optimalen Mikroumgebung etablieren. Diese Theorie konnte von Sugarbaker und Kinsey in experimentellen Metastasierungsmodellen bestätigt werden (Kinsey, 1960; Sugarbaker, 1952). Die Tatsache, dass Tumorzellen bestimmter Krebserkrankungen bevorzugt in spezifische Organe metastasieren, hat diese Hypothese gestützt. Während das Uvea-Melanom bevorzugt in die Leber metastasiert (Triozi *et al.*, 2008) und Metastasen eines Prostatakarzinoms hauptsächlich im Knochen zu finden sind (Edlund *et al.*, 2004), metastasiert beispielsweise das Lungenkarzinom in verschiedene Organe wie Knochen, Leber und Gehirn (Hess *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2009).

Zudem kann das Auswachsen einer erfolgreich etablierten Metastase schnell durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel gehemmt werden (Geiger und Peeper, 2009). Dies zwingt die Tumorzellen entweder dazu in einen Ruhezustand überzugehen (*tumor dormancy*) oder durch die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten (Geiger und Peeper, 2009).

Die im Gewebe gestreuten Tumorzellen versucht man hauptsächlich durch Chemo- und/oder Strahlentherapie zu zerstören, nachdem der Primärtumor meist durch einen operativen Eingriff herausgenommen werden kann. Dabei ist die postoperative Chemotherapie ein Meilenstein in der Behandlung der meisten malignen Tumoren,

wobei oft nur das Leben verlängert und nicht kurativ eingegriffen werden kann (Wedding *et al.*, 2007). Für eine Chemotherapie gibt es sechs viel versprechende Zielgruppen: Ionenkanäle, Transporter, Membranrezeptoren und deren Liganden, Hormonrezeptoren, DNA und Enzyme, wie beispielsweise Matrix-Metalloproteasen (MMPs) (Overall und Kleinfeld, 2006). Verschiedene MMP-Breitspektrum-Inhibitoren wurden in klinischen Studien untersucht und führten aber in Phase III der klinischen Studien nicht zu der erwarteten, gesteigerten Überlebensrate der Patienten und hatten zudem schwere Nebenwirkungen (Coussens *et al.*, 2002; Fingleton, 2003; Overall und Kleinfeld, 2006). Eine am häufigsten aufgetretene Nebenwirkung war die Skelettmuskelkrankheit (*musculoskeletal syndrom*, MMS), die sich u.a. durch Schmerzen und Unbeweglichkeit des Schultergelenks sowie allgemeiner Arthralgie äußerte (Fingleton, 2003; Renkiewicz *et al.*, 2003).

2.2 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Im menschlichen Genom sind 23 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) kodiert, die zur Superfamilie der Metzincine gehören (Bode *et al.*, 1993). Die zinkabhängigen Endopeptidasen werden sowohl von Tumorzellen, als auch von Wirtszellen sezerniert und können zur Tumorprogression beitragen (Jodele *et al.*, 2006; Morrison *et al.*, 2009; Nagase *et al.*, 2006). Aus zahlreichen *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien ist bekannt, dass MMPs Einfluss auf Zellwachstum, Angiogenese, Invasion, Metastasierung und Apoptose nehmen können (Björklund und Koivunen, 2005). Vor allem sind MMPs am Abbau der EZM und der Freisetzung bzw. Prozessierung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Rezeptoren oder Zelladhäsionsmolekülen beteiligt (Coussens *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2004). Unter den ersten MMPs, die identifiziert und deren cDNA isoliert werden konnte, befinden sich die Gelatinasen A (MMP-2) und B (MMP-9). Kollagen Typ IV, ein Bestandteil der EZM, wird hauptsächlich durch die beiden Gelatinasen degradiert, dennoch haben sie zwar ähnliche, aber keine identische Substratspezifität (Björklund und Koivunen, 2005).

Es gibt drei grundsätzliche Mechanismen zur Steuerung der proteolytischen Aktivität von MMPs: Transkription, Proenzymaktivierung und Enzyminhibierung (Overall und Lopez-Otin, 2002). Die Transkription wird über physiologischen Stress, maligne Transformation, verschiedene Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren oder wie im Falle einzelner Matrix-Metalloproteinasen (z.B. MMP-1 und MMP-3) auch über

Polymorphismen in der Promotorregion beeinflusst (Overall und Lopez-Otin, 2002; Vihinen und Kahari, 2002). MMPs werden als Proenzyme bzw. Zymogene synthetisiert und in dieser Form auch teilweise sezerniert. Die Aktivierung des Zymogens durch Abspaltung der Propeptid-Domäne stellt einen wichtigen Schritt der Aktivierung von MMPs dar (Duffy *et al.*, 2008; Nagase *et al.*, 2006).

2.3 A Disintegrin and Metalloproteinases (ADAMs)

Eine weitere Gruppe der Superfamilie der Metzincins sind die *a Disintegrin and Metalloproteinases* (ADAMs), die aus 40 Mitgliedern bestehen, von denen jedoch im Menschen nur 21 funktionell aktiv sind (Bode *et al.*, 1993; Duffy *et al.*, 2009). Eine biologische Funktion wird den ADAMs bei der Fortpflanzung, Zelladhäsion, Migration, Signaltransduktion und Proteolyse zugeschrieben (Duffy *et al.*, 2008; Duffy *et al.*, 2009; Reiss und Saftig, 2009). Vor allem die ADAM-vermittelte Spaltung der Ektodomäne von vielen membranständigen Proteinen (*shedding*), wie beispielsweise Notch, L1CAM oder EGFR, als auch die nicht-proteolytische Bindung von verschiedenen Liganden spielen in den zuvor genannten Prozessen eine wichtige Rolle (Reiss und Saftig, 2009). ADAMs können anhand ihrer biologischen Eigenschaften oder ihrer Verteilung im Körper eingeteilt werden (Tousseyn *et al.*, 2006). Eine Gruppe besteht aus proteolytisch inaktiver ADAMs, deren Funktion hauptsächlich in der Zelladhäsion, Deadhäsion oder Zellfusion liegt (Tousseyn *et al.*, 2006). Eine weitere Gruppe besitzt eine aktive Proteasedomäne mit einer Zink-Bindestelle im aktiven Zentrum, das für die proteolytische Aktivität relevant ist (Reiss und Saftig, 2009). Hierzu gehören ADAM-8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 und 33 (Reiss und Saftig, 2009; Tousseyn *et al.*, 2006). Innerhalb der verschiedenen ADAMs ist die katalytische Domäne dabei stark konserviert und besteht aus einer Zink-Bindestelle mit drei Histidinen (HEXGHXXGXXHD) und einem konservierten Methionin-Turn in der Helix des aktiven Zentrums (Reiss und Saftig, 2009).

Die vielfältigen, funktionellen Eigenschaften der Familie der ADAMs spiegelt sich auch in ihrer konservierten Domänenstruktur wider, die sich aus einem N-terminalen Propeptid, einer Metalloproteinasen-Domäne, einer cysteinreichen Disintegrindomäne, einer EGF-ähnliche Domäne, der Transmembrandomäne und zuletzt der C-terminalen, cytoplasmatischen Domäne zusammensetzt (Abb. 2, Reiss und Saftig, 2009; Seals und Courtneidge, 2003). Die Disintegrindomäne ist an der

Zelladhäsion beteiligt, während die Cystein-reiche Region nicht nur für die Substratspezifität (Janes *et al.*, 2005) und das Entfernen der Prodomäne notwendig ist (Reiss und Saftig, 2009), sondern auch für die Regulation der katalytischen Aktivierung der ADAMs (Smith *et al.*, 2002).

Ähnlich der Regulation von MMPs, kann die Aktivierung von ADAMs über mehrere Mechanismen erfolgen, nämlich durch Genexpression, posttranslationale Regulation (intrazelluläre und perizelluläre Regulation, Zymogenaktivierung) und über inhibitorische Mechanismen (Mochizuki und Okada, 2007; Murphy, 2009). Promotoranalysen von ADAMs zeigten potentielle Bindestellen für mehrere Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise SP1, SP3, NF-kappaB oder VDR, dennoch induzieren vor allem Zytokine die Expression verschiedener ADAM-Gene (Murphy, 2009). Die posttranslationale Regulation wird durch die Abspaltung des Propeptids an der Erkennungssequenz RXR/KR durch Proproteinkonvertasen (z. B. Furin) initiiert, wodurch beispielsweise ADAM-10 und -17 aktiviert werden (Mochizuki und Okada, 2007; Murphy, 2009).



Abb. 2: Domänenstruktur von A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM). Pro, Prodomäne; MP, Metalloproteinase-Domäne; DC, zysteinreiche Disintegrin Domäne; EGF, EGF-ähnliche Domäne; TM, Transmembrandomäne; CD, cytoplasmatische Domäne (Abbildung verändert aus Mochizuki *et al.*, 2007).

Als endogene Inhibitoren der ADAMs sind hauptsächlich TIMPs identifiziert worden. Alle vier TIMPs zeigen inhibitorische Aktivität gegen verschiedene Mitglieder der ADAMs, wobei TIMP-3, ein Heparansulfat-assoziiertes TIMP, ein sehr breites Wirkspektrum gegen einige ADAM-Proteine besitzt. TIMP-3 ist auch der einzige physiologische Inhibitor von TACE (*tumor necrosis factor- α converting enzyme*)/ADAM-17, einer Sheddase mit vielfältigen Substraten (Murphy, 2009; Murphy *et al.*, 2008). ADAM-10, ein weiteres proteolytisch-aktives ADAM wird sowohl von TIMP-3 und TIMP-1, aber auch von RECK (*reversion-inducing cystein-rich protein with Kazal motifs*), einem den TIMPs funktionell ähnlichen Inhibitor, gehemmt (Muraguchi *et al.*, 2007).

ADAM-10 und -17 tragen zu vielen physiologischen (u.a. in der Embryonalentwicklung und bei Funktionen des Zentralen Nervensystems), aber auch pathophysiologischen Prozessen (z.B. bei Entzündungsreaktionen oder der

Tumorprogression) bei (Murphy, 2009; Reiss und Saftig, 2009). Sowohl ADAM-10, als auch ADAM-17 sind mit Beginn der menschlichen Entwicklung bis ins späte Erwachsenenalter in unterschiedlichen Geweben sowie in verschiedenen Zellen, z.B. Neuronen, Leukozyten und vaskulären Zellen detektierbar (Pruessmeyer und Ludwig, 2009). Für beide Moleküle wurden einige wichtige Substrate zur Spaltung auf der Zelloberfläche identifiziert (Reiss und Saftig, 2009). Das *shedding* (Spaltung) dieser Substrate führt allerdings nicht nur zur Aufrechterhaltung von Körperfunktionen und zur Unterdrückung unterschiedlicher Erkrankungen, sondern kann auch die Progression verschiedener Entzündungs- oder Tumorerkrankungen fördern (Pruessmeyer und Ludwig, 2009). So hat zum einem das *shedding* von N-Cadherin, welches entscheidende Funktionen in der Entwicklung des Zentralen Nervensystems und in der Ausbildung von Herzgefäßen hat (Radice *et al.*, 1997), einen positiven Einfluss auf die Regulation der Zelladhäsion und Signalweiterleitung über die β -Catenin Signaltransduktion (Reiss *et al.*, 2006). Allerdings begünstigt zum anderen das *shedding* von N-Cadherin durch ADAM-10 auch die Tumorprogression und fördert beispielsweise die Induktion der Tumorzellmigration in verschiedenen humanen Glioblastomzelllinien (Kohutek *et al.*, 2009). Einen induktiven Effekt auf Tumorzellmigration, -proliferation und -invasion hat auch das *shedding* des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM, vor allem durch ADAM-10 (Gutwein *et al.*, 2005; Mechttersheimer *et al.*, 2001; Novak-Hofer *et al.*, 2008).

2.4 Die Rolle des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM in der Tumorprogression

Zelladhäsionsmoleküle erfüllen in den unterschiedlichen Stadien der Metastasierung wichtige Funktionen durch ihren Beitrag an Zell-Zell-Kontakten oder Zell-Substrat-Interaktionen (Cavallaro und Christofori, 2004). Dabei können Zelladhäsionsmoleküle in die vier großen Superfamilien Catherine, Integrine, Selektine und die Immunglobulin-Superfamilie eingeteilt werden (Raveh *et al.*, 2009).

Ein Zelladhäsionsmolekül, das mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht wird, ist L1CAM, ein Membranprotein der Immunglobulin-Superfamilie (Moos *et al.*, 1988, Gavert *et al.*, 2008). Die Expression von L1CAM korreliert mit der Progression vieler verschiedener humaner Tumorerkrankungen. So ist in Patientenproben beispielsweise eine gesteigerte L1CAM-Expression mit einer induzierten

Metastasierung von Tumorzellen des Melanoms (Thies *et al.*, 2002), des Nierenzellkarzinoms (Allory *et al.*, 2005) und des Kolorektalkarzinoms (Boo *et al.*, 2007; Kaifi *et al.*, 2007) assoziiert. Beim Ovarialkarzinom korreliert die Expression des Zelladhäsionsmoleküls mit der Überlebensrate der Patientinnen (Daponte *et al.*, 2008; Fogel *et al.*, 2003) und beeinflusst die Wirkung der Chemotherapie negativ (Daponte *et al.*, 2008). Auf Grund der klinischen Relevanz von L1CAM im Ovarialkarzinom wurden einige tumorfördernden Eigenschaften des Moleküls in Ovarialkarzinomzellen identifiziert (Arlt *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2009; Knogler *et al.*, 2007; Novak-Hofer *et al.*, 2008). Wegen der beschriebenen Korrelation der L1CAM Expression mit der Tumorprogression des Melanoms, von Kolon- und Ovarialkarzinomen, wurde das Zelladhäsionsmolekül bei diesen Tumorerkrankungen als neuer prognostischer Marker vorgeschlagen (Thies *et al.*, 2002; Boo *et al.*, 2007; Fogel *et al.*, 2003).

2.4.1 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM

Ursprünglich wurde das Zelladhäsionsmolekül L1CAM in neuronalem Gewebe mehrerer Spezies entdeckt, mitunter in Maus (Rathjen und Schachner, 1984) und Mensch (Hlavin und Lemmon, 1991). Als neuronales Zelladhäsionsmolekül, wirkt L1CAM vor allem in der Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) und auch des peripheren Nervensystems (PNS) mit (Fransen *et al.*, 1997). L1CAM vermittelt u.a. die Adhäsion zwischen Neuronen, aber auch zwischen Neuronen und Schwann-Zellen (Faissner *et al.*, 1984; Persohn und Schachner, 1987; Rathjen und Schachner, 1984), die Myelinisierung von Neuriten (Wood *et al.*, 1990) oder die Migration von Neuronen im Kleinhirn (Asou *et al.*, 1992; Lindner *et al.*, 1983). Durch seine Domänenstruktur zählt L1CAM zur Immunglobulin-Superfamilie und ist ein 200-220 kDa großes Transmembrannglykoprotein vom Typ I (Brummendorf und Rathjen, 1993; Fransen *et al.*, 1997; Moos *et al.*, 1988).

Der extrazelluläre Bereich von L1CAM besteht aus sechs Immunglobulin-(Ig)-ähnlichen Domänen sowie fünf darauf folgenden Fibronectin Typ III-Domänen. Der anschließende Transmembranbereich geht in eine stark konservierte C-terminale cytoplasmatische Domäne über (Moos *et al.*, 1988; Brummendorf und Rathjen, 1993; Bateman *et al.*, 1996; Abb. 3).

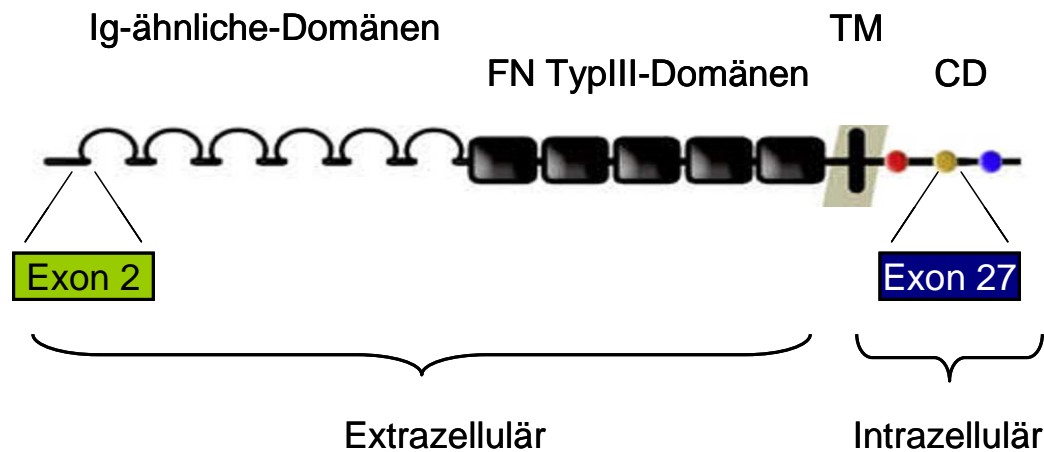


Abb. 3: Domänenstruktur von L1CAM. Der extrazelluläre Bereich von L1CAM besteht aus den Immunglobulin-(Ig)-ähnlichen- und den Fibronectin (FN) Typ III-Domänen. Diese werden durch die Transmembrandomänen (TM) vom cytoplasmatischen Bereich (CD) getrennt (Abbildung verändert aus Raveh *et al.*, 2009).

Durch seine Ig-ähnlichen Bereiche kann L1CAM sowohl homophile, als auch heterophile Interaktionen mit anderen Molekülen eingehen. Die Immunglobulin-Domänen 1-4 bilden eine *horseshoe*-Konformation, die durch homophile Interaktionen von L1CAM das Auswachsen von Nervenzellen fördert (Gouveia *et al.*, 2008). Heterophile Interaktion kann L1CAM sowohl mit EZM-Komponenten (Montgomery *et al.*, 1996), als auch mit Neuropilin-1 (Castellani *et al.*, 2002), CD24 (Kleene *et al.*, 2001), TAG1/axonin-1 (Kuhn *et al.*, 1991), Proteoglykan Phosphokan und Neurokan (Friedlander *et al.*, 1994; Milev *et al.*, 1994) oder Integrine eingehen. Die Wechselwirkung von L1CAM mit Integrinen hängt stark von der spezifischen Aminosäuresequenz RGD (Arg-Gly-Asp) in der Immunglobulin-Domäne 6 ab (Blaess *et al.*, 1998). Während in der Maus zwei RGD Regionen vorhanden sind, wurde im menschlichen L1CAM nur eine solche Aminosäuresequenz gefunden (Blaess *et al.*, 1998). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass humanes L1CAM mit $\alpha_v\beta_3$ (Hall *et al.*, 2004; Montgomery *et al.*, 1996), $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Felding-Habermann *et al.*, 1997) und $\alpha_5\beta_1$ (Felding-Habermann *et al.*, 1997) eine Integrin-Bindung eingehen kann. Die Fibronectin Typ III-Domänen von L1CAM werden hauptsächlich mit dem Auswachsen und der Ausdehnung von Nervenzellen (Axon und Dendriten) in Verbindung gebracht (Appel *et al.*, 1995; Stallcup, 2000), hervorgerufen durch die Bindung an den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-1 (*fibroblast growth factor receptor 1*, FGFR1) (Kulahin *et al.*, 2008) und dessen Aktivierung (Kulahin *et al.*, 2009). Die cytoplasmatische Domäne von L1CAM ist stark konserviert und zeigt Homologien zu anderen Mitgliedern der Ig-Superfamilie auf, wie beispielsweise

Neurofascin, Ng-CAM, Nr-CAM oder CHL1 (Hortsch, 2000). Die funktionelle Bedeutung der cytoplasmatischen Domäne wird vor allem durch die Phosphorylierung von Serin- und Tyrosinresten geprägt (Hortsch, 2000; Schäfer *et al.*, 2002), die entweder durch extrazelluläre Ligandenbindung oder Kinaseaktivität induziert werden kann (Cheng *et al.*, 2005; Schäfer *et al.*, 2002; Whittard *et al.*, 2006). Eine Phosphorylierung des Tyrosinrests der cytoplasmatischen Ankyrin-Bindestelle FIGQY von L1CAM ist beispielsweise entscheidend für das Axonwachstum und damit für die neuronale Entwicklung (Whittard *et al.*, 2006). Die Regulation der L1CAM-assoziierten Adhäsion wird u.a. auch durch die Clathrin-abhängige Endozytose von L1CAM reguliert, allerdings muss erst der Tyrosinrest der cytoplasmatischen YRSLE Sequenz phosphoryliert werden, um eine Bindung von AP-2 und damit die Endozytose zu gewährleisten (Long *et al.*, 2001; Schäfer *et al.*, 2002). Zudem kann die 15bp-Sequenz der RSLE-Aminosäuresequenz alternativ gespleißt werden, wodurch die Endozytose von L1CAM stark verlangsamt wird (Long *et al.*, 2001). Durch das alternative Spleißen der mRNA (*splicing*) von L1CAM entstehen unterschiedliche Isoformen. Das vollständig exprimierte L1CAM (FL-L1CAM) besteht aus 28 Exons (Fransen, 1997), während eine weitere Isoform von L1CAM weder das extrazelluläre Exon 2 (YEGHHV) noch das intrazelluläre Exon 27 (RSLE) exprimiert (SV-L1CAM) (Reid und Hemperly, 1992; (Takeda *et al.*, 1996); Fransen, 1997; Shtutman *et al.*, 2006; Abb. 3). FL-L1CAM wird hauptsächlich in neuronalen Zellen detektiert, während die gespleißte Isoform in nicht-neuronalen Zellen wie Schwann-Zellen (Reid und Hemperly, 1992), Gliazellen (Takeda *et al.*, 1996) und Lymphozyten (Ebeling *et al.*, 1996) gefunden wurde. Eine physiologische oder pathologische Bedeutung von SV-L1CAM in diesen Zellen wurde bisher noch nicht untersucht. Eine dominante Expression der Spleiß-Variante konnte zudem in verschiedenen humanen Tumorzelllinien gefunden werden, beispielsweise in Nierenzellkarzinom-, in Melanomzellen, in Glioblastom-, in Lungenkarzinom-, in Kolonkarzinom- (Shtutman *et al.*, 2006) oder in Ovarialkarzinomzellen (Euer *et al.*, 2005). Über die funktionelle Bedeutung von SV-L1CAM in der Tumorprogression ist dennoch nicht viel bekannt. Shtutman und seine Mitarbeiter konnten *in vitro* zeigen, dass die Expression der Spleiß-Variante von L1CAM in Brustkrebszellen zu einem Verlust von *Adherent Junctions* führt und die Aktivität von β -Catenin und damit die Transkription induziert (Shtutman *et al.*, 2006). Die Spleiß-Variante könnte evtl. auf

Grund ihres Einflusses auf diese beiden Prozesse EMT-ähnliche Veränderung in den Tumorzellen herbeiführen (Shtutman *et al.*, 2006).

Unsere Arbeitsgruppe hat sich mit den Effekten der L1CAM-Isoformen in den späten Phasen der Metastasierung befasst. Im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit konnte in ersten Experimenten gezeigt werden, dass FL-L1CAM die Kolonisierung von Organen induziert, während durch die Überexpression der Spleiß-Variante keine verstärkte Metastasierung zu beobachten war. Diese Ergebnisse wurden in einem experimentellen murinen T-Zell-Lymphommodell (L-C1.5s) und einem humanen Fibrosarkommodell (HT1080/*acZ-K15*) gezeigt, deren Tumorzellen jeweils keine endogene Expression der beiden humanen Isoformen aufzeigen (Ergebnisse von Laura Bickel). Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit diese Effekte in einem experimentellen Metastasierungsmodell eines L1CAM-abhängigen Ovarialkarzinoms (SKOV3ip) verifiziert werden. In einem spontanen Tumormodell konnte die Tumorprogression dieser SKOV3ip-Zellen durch Antikörpertherapie gegen L1CAM signifikant gehemmt werden (Arlt *et al.*, 2006, Knogler *et al.*, 2007). Zudem exprimieren die Ovarialkarzinomzellen beide L1CAM-Varianten endogen. Die weiteren molekularen Analysen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, zur Klärung der prometastatischen Eigenschaften von FL-L1CAM sind mit Zell- bzw. Probenmaterial aller drei Metastasierungsmodelle analysiert worden.

In unterschiedlichen Studien wurden entscheidende Funktionen von L1CAM in unterschiedlichen Prozessen der Tumorentwicklung analysiert, allerdings ohne zwischen den beiden Isoformen zu unterscheiden. In dem obig erwähnten spontanen Tumormodell mit Ovarialkarzinomzellen (SKOV3ip) wurde L1CAM als potentiell therapeutisches Zielmolekül mit Hilfe von Antikörperstudien identifiziert (Arlt *et al.*, 2006; Knogler *et al.*, 2007; Novak-Hofer *et al.*, 2008). Dabei konnte *in vivo* durch eine gegen L1CAM gerichtete Antikörper-Therapie sowohl das primäre Tumorstadium reduziert, als auch die intraperitoneale Dissemination von Tumorzellen gehemmt werden (Arlt *et al.*, 2006; Knogler *et al.*, 2007). Die *In-vivo*-Daten konnten durch darauf folgende *In-vitro*-Experimente ergänzt werden. Durch die Zugabe von Genistein, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, zu den Ovarialkarzinomzellen wurde die Wirkung der L1CAM gerichteten Antikörper-Behandlung verstärkt (Novak-Hofer *et al.*, 2008).

Im Allgemeinen kann L1CAM mit Tumorstadium, der Migration oder Invasion unterschiedlicher Tumorzellen assoziiert werden (Arlt *et al.*, 2006; Gast *et al.*, 2008;

Silletti *et al.*, 2004). Dabei spielen auch die zuvor genannten homophilen und heterophilen Bindungen sowie die intrazellulären Interaktionen eine entscheidende Rolle. Die Bindung von L1CAM an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin induziert die Migration von Melanomzellen (Voura *et al.*, 2001), während die autokrine/parakrine Ligandenbindung von L1CAM an $\alpha_v\beta_5$ -Integrin das Migrationsverhalten von CHO- (*chinese hamster ovary cells*) und SKOV3-Zellen (humane Ovarialkarzinomzellen) verstärkt (Mechtersheimer *et al.*, 2001). Die cytoplasmatische Domäne von L1CAM kann ebenfalls das tumorigene Potential der Tumorzellen beeinflussen. Die L1CAM-induzierte Aktivierung des ERK-Signaltransduktionswegs (*extracellular signal-regulated kinase pathway*) ist abhängig von einem TS-Aminosäuremotif am C-terminalen Ende von L1CAM (Gast *et al.*, 2008). Dadurch wird eine ERK-abhängige Genexpression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, CD44, Osteopontin, RhoC und der beiden Cathepsine L und B induziert, was zu einer verstärkten Migration und Invasion der Tumorzellen führt (Silletti *et al.*, 2004, Gast *et al.*, 2008).

2.4.2 Funktionelle Modulation von L1CAM durch *shedding*

L1CAM wird nicht nur gespleißt, sondern kann auch posttranslational proteolytisch gespalten werden. Dadurch entsteht ein freies, extrazelluläres und ein cytoplasmatisches Fragment von L1CAM (Faissner *et al.*, 1985). Die dabei produzierten Fragmente lassen sich durch ihr Molekulargewicht von 200, 140, 85 und 40 kDa voneinander unterscheiden (Faissner *et al.*, 1985). Lösliches L1CAM kann im Überstand von murinen Zellen des Cerebellums (Sadoul *et al.*, 1988), verschiedener muriner und humaner Tumorzellen (Beer *et al.*, 1999) und im Serum von Patientinnen mit Ovarial- und Gebärmutterhalskrebs (Fogel *et al.*, 2003) detektiert werden. Auch die Inkubation von Tumorzellen mit dem *hepatocyte growth factor* (HGF) ist mit einer Induktion der L1CAM-Spaltung assoziiert, allerdings ist der zugrunde liegende molekulare Mechanismus noch nicht bekannt (Heiz *et al.*, 2004). Die Spaltung bzw. das *shedding* von L1CAM erfolgt über die proteolytische Aktivität verschiedener Proteasen. Plasmin, eine Serinprotease, spaltet das Zelladhäsionsmolekül sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der dritten Fibronektin Typ III-Domäne, wodurch ein lösliches 140 kDa und ein C-terminales 85 kDa großes Fragment entstehen (Nayeem *et al.*, 1999; Abb. 4). Darüber hinaus spalten die beiden Metalloproteinasen ADAM-10 und -17 L1CAM juxtamembranal im extrazellulären Bereich (Gutwein *et al.*, 2000; Maretzky *et al.*, 2005; Mechtersheimer

et al., 2001; Abb. 4). Physiologisch betrachtet ist die Spaltung von L1CAM durch ADAM-10 und ADAM-17 wichtig für die neuronale Entwicklung, da sie das Zellwachstum induziert (Sugawa *et al.*, 1997), die Adhäsion reduziert und die Migration von Nervenzellen fördert (Maretzky *et al.*, 2005; Pruessmeyer und Ludwig, 2009).

Durch funktionelle Genmanipulation der ADAM-10- bzw. ADAM-17-Expression sowie durch die Verwendung von Proteaseinhibitoren hat Maretzky *et al.* die Regulation von L1CAM durch die beiden Sheddasen ADAM-10 und -17 untersucht. Interessanterweise wird L1CAM konstitutiv von ADAM-10 gespalten, während ADAM-17 nur durch vorherige PMA- oder MCD-Inkubation der Zellen L1CAM prozessiert (Maretzky *et al.*, 2005). Das *shedding* durch ADAM-10 oder ADAM-17 ist notwendig, um die proteolytische Spaltung im Transmembranbereich durch die γ -Sekretase zu induzieren und somit die Aktivierung des RIP-Signalwegs (*regulated intramembrane proteolysis*) zu initiieren (Maretzky *et al.*, 2005). Die RIP-Signaltransduktion beschreibt die proteolytische Prozessierung von Transmembranmolekülen innerhalb der Membran, wodurch die Gentranskription durch die resultierenden cytoplasmatischen Fragmente im Zellkern induziert werden kann (Brown *et al.*, 2000). Auch in Tumorzellen kann die Aktivierung des RIP-Signalwegs beobachtet werden. Nach dem *Shedding* von L1CAM durch ADAM-10 wird das transmembranständige cytoplasmatische Fragment von L1CAM durch die γ -Sekretase prozessiert (Riedle *et al.*, 2009). Der anschließende Transport des intrazellulären L1CAM-Fragments in den Zellkern führte zur Induktion der L1CAM-assoziierten Genexpression von Cathepsin B oder β_3 -Integrin (Riedle *et al.*, 2009). Das Zelladhäsionsmolekül kann direkt auf der Zelloberfläche gespalten werden oder in Membranvesikeln, die sowohl L1CAM als auch ADAM-10 exprimieren (Gutwein *et al.*, 2003). Bei diesen Vesikeln handelt es sich um Exosome und apoptotische Vesikel, die im Aszites von Patienten mit Ovarialkarzinomen detektiert werden können (Gutwein *et al.*, 2005, Fogel *et al.*, 2003). Eine funktionelle Bedeutung des *Sheddings* von L1CAM konnte in verschiedenen Stadien der Tumorprogression beobachtet werden. So verstärkt das durch *shedding* entstandene lösliche L1CAM die Migration (Gutwein *et al.*, 2005) und beeinflusst das apoptotische Verhalten von Ovarialkarzinomzellen (Stöck *et al.*, 2007).

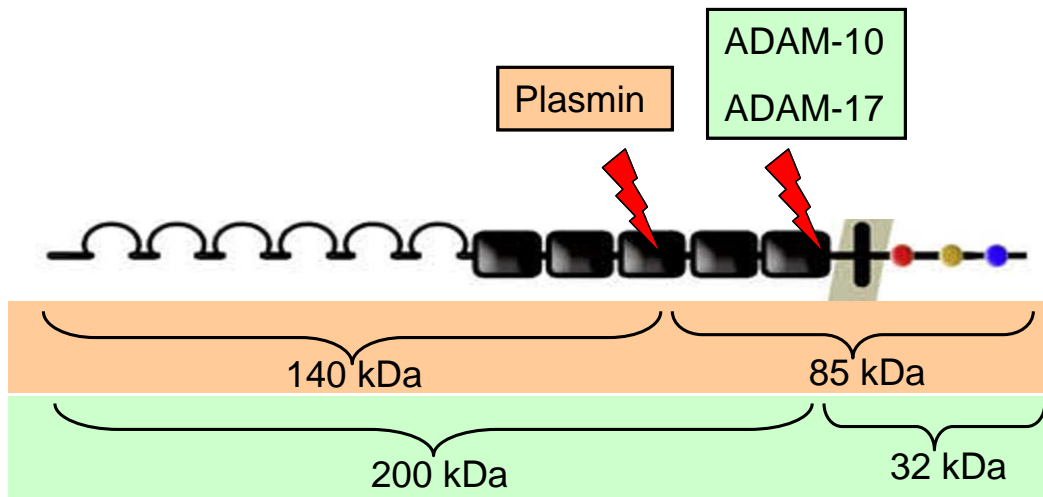


Abb. 4: Schematische Darstellung der Spaltprodukte durch die proteolytische Prozessierung von L1CAM durch Plasmin, ADAM-10 oder ADAM-17.

2.5 Alternatives Spleißen von mRNA in der Tumorprogression

Genregulation und Genfunktion können auf vielfältige Weise durch transkriptionelle und posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden. Alternatives Spleißen ist eine Möglichkeit der Genexpressionsregulation, wodurch aus einem Gen verschiedene Proteine mit zum Teil unterschiedlichen Funktionen entstehen (Ghigna *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2005). Durch Verwendung verschiedenster Techniken, wie EST-Sequenzierung (*expressed sequence tag sequencing*), cDNA-Sequenzierung oder *Microarrays* zeigt sich, dass über 70% der menschlichen Gene alternativ gespleißt werden können (Johnson *et al.*, 2003). Dadurch ist es nicht verwunderlich, dass das Spleißen von mRNA in physiologischen Prozessen, wie beispielsweise Axonentwicklung oder Zellwachstum, aber auch bei Parkinson- oder Krebserkrankungen eine entscheidende Rolle spielt (Venables, 2004). Untersuchungen von Gewebe unterschiedlicher Tumore im Vergleich mit gesundem Gewebe zeigt eine gewebespezifische Expression der verschiedenen Spleißformen eines Gens (Roy *et al.*, 2005). Dabei kann in einigen Fällen eine eindeutige Zuordnung der Spleiß-Variante zum jeweiligen Gewebe gemacht werden, z. B. dass die Variante A nur in gesundem Gewebe und die Variante B nur in Tumorgewebe detektiert werden kann (Roy *et al.*, 2003). Eine weitere Möglichkeit sind unterschiedliche Expressionslevel im Gewebe, d.h. Variante A, die in normalen Gewebe nur in geringen Mengen detektiert werden kann, wird verstärkt im

Tumorgewebe gefunden, während Variante B hauptsächlich im normalen Gewebe exprimiert wird und im Tumorgewebe stark reduziert ist (Xu und Lee, 2003).

Spleiß-Varianten können auf Grund ihrer veränderten Proteinstruktur auch unterschiedliche Funktionen haben (Srebrow und Kornblihtt, 2006). So zeigen die verschiedenen Varianten des Zelladhäsionsmoleküls CD99 gegensätzliche Effekte, so dass eine Isoform zu einer Reduktion der Resistenz gegen Anoikis, der Migration und der Metastasierung in Lymphozyten führt, während eine zweite Isoform von CD99 diese Effekte fördert (Scotlandi *et al.*, 2007). Eine Vielzahl weiterer Moleküle werden alternativ gespleißt und besitzen tumorassoziierte Spleiß-Varianten, u.a. Mitglieder der EGFR-Familie ErbB4 (Robbins *et al.*, 2008; Sawyer *et al.*, 1998), CD44 (Robbins *et al.*, 2008) oder das Matrixglycoprotein Tenascin-C (Hancox *et al.*, 2009). Alternatives Spleißen von verschiedenen Genen kann die Funktion der entstehenden Proteine verändern und dadurch die Komplexität des Proteoms um ein Vielfaches erhöhen.

2.6 Tiermodelle zur Untersuchung der Tumorprogression

Die Verwendung von Tumormodellen *in vivo* ermöglicht es, wissenschaftliche Fragestellungen in einem lebenden Wirtsorganismus unter Berücksichtigung aller biologisch ablaufenden Prozesse im Körper zu untersuchen. Um grundlegende Mechanismen der Tumorprogression zu verstehen, aber auch zur Validierung verschiedener antitumorigener und –metastatischer Therapieansätze, werden vor allem eine Vielzahl an etablierten Mausmodellen verwendet (Husemann und Klein, 2009; Talmadge *et al.*, 2007). Dabei werden zwischen syngenen Modellen, d.h. die Tumorzellen entstammen aus demselben Tierstamm wie das Versuchstier, und *Xenograft*-Modellen unterschieden. Für die Xenotransplantation werden meist humane Tumorzellen verwendet, die in immunsupprimierte Tiere inokuliert werden. Zudem gibt es zwei verschiedene Metastasierungsmodelle, womit unterschiedliche Fragestellungen geklärt werden können. Die Verwendung von spontanen Metastasierungsmodellen erlaubt die Untersuchung der frühen Abläufe der Tumorprogression, d.h. Primärtumorwachstum, Dissemination der Tumorzellen ins umliegende Gewebe und Intravasation in Blut- und Lymphgefäße. Die Bildung des Primärtumors wird entweder durch genetische Disposition des Organismus, durch die Applikation von Karzinogenen oder durch die Injektion von Tumorzellen induziert,

wodurch die davon ausgehende Dissemination der Tumorzellen analysiert werden kann. Diese ist abhängig vom Inokulationsort (z.B. subkutan oder intraperitoneal), dem Wachstum und der Aggressivität der Tumorzellen (zusammengefasst aus Krüger *et al.*, 2007).

Zur Beantwortung von Fragestellungen bezüglich der späten Phasen der Metastasierung, nämlich der Extravasation und der Festsetzung von Tumorzellen in sekundären Organen, dienen experimentelle Metastasierungsmodelle (Krüger *et al.*, 2007). Dazu werden die Tumorzellen intravenös in die Blutbahn des Wirtsorganismus inokuliert, d.h. entweder intrakardial oder in die Portal- oder Schwanzvene (Krüger *et al.*, 1998). Dabei ist die Anzahl an Metastasen proportional zur Anzahl der intravenös inokulierten Tumorzellen, wobei davon nur 0,01% der Tumorzellen in der Lage sind, Metastasen in sekundären Organen zu bilden (Fidler, 2003).

Zur Visualisierung der Metastasen im Wirtsgewebe werden z.B. Markergene stabil in das Genom der Tumorzellen integriert. Bekannte Markergene sind das *green fluorescent protein* GFP, welches es ermöglicht, die Tumorzellen im lebenden Organismus zu beobachten (Hoffman, 1999) oder das *lacZ*-Gen, welches die Anfärbung der Tumorzellen auf der Oberfläche des Organs bis auf Einzelzellebene bzw. auf histologischen Schnitten zulässt (Krüger *et al.*, 1998, Krüger *et al.*, 2007). Die *lacZ*-Expression kann in den Tumorzellen durch die Aktivität der β -D-Galaktosidase durch die Hydrolyse des Chromogens 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal) als indigoblaues Präzipitat nachgewiesen werden (Krüger *et al.* 1998). Durch die Fusion des *lacZ*-Gens mit der *nuclear leader sequence* des *nuclear SV40 T-large antigene*, einem Signalpeptid für den Rücktransport in den Nukleus, können auch Zellen gut sichtbar angefärbt werden, die einen großen Zellkern und kaum Zytoplasma aufweisen wie beispielsweise lymphoide Tumorzellen (Bonnerot *et al.*, 1987).

Die in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Metastasierungsmodelle sind entweder syngene, wie das L-Cl.5s-T-Zell-Lymphom-Modell, oder entsprechen einem Xenotransplantationsmodell. Dies trifft zum einen auf das humane Ovarialkarzinommodell mit SKOV3ip-Zellen und zum anderen auf das humane Fibrosarkommodell mit HT1080K15-*lacZ*-Zellen zu. Alle verwendeten Tumorzelllinien können durch die *lacZ*-Expression visualisiert werden.

3 Zielsetzung der Arbeit

Die Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM verstärkt das invasive Potential verschiedener Tumorzellen und konnte in unserer Arbeitsgruppe als potentiell therapeutisches Angriffsziel bei Ovarialkarzinomen durch Antikörperbehandlung identifiziert werden. Ziel dieser Arbeit war es einerseits, den Einfluss der Expression von L1CAM bzw. seiner Sheddase Adam-10 auf das metastatische Potential von Tumorzellen eines experimentellen Metastasierungsmodells zu untersuchen. Andererseits sollte, aufbauend auf ersten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die prometastatische Wirkungsweise von vollständigem L1CAM (FL-L1CAM) gegenüber der Spleißvariante (SV-L1CAM) durch molekulare Analysen geklärt werden.

Die Untersuchung der Effekte der L1CAM-Expression auf das metastatische Verhalten von Tumorzellen sollte in einem mechanistischen experimentellen Metastasierungsmodell eines T-Zell-Lymphoms erfolgen. Auf Grund des möglichen Einflusses der Sheddase ADAM-10 auf die protumorigenen Eigenschaften von L1CAM wurde auch die Rolle von ADAM-10 evaluiert. Durch shRNAs, gerichtet gegen die L1CAM- bzw. ADAM-10-Expression in den Tumorzellen, sollte die Bedeutung beider Moleküle für das metastatische Potential von L-C1.5s-Zellen analysiert werden. Um falsch-positive Ergebnisse durch heterogene Zelllinien zu vermeiden, sollten die erzielten Effekte nochmals mit klonalen Tumorzelllinien der parentalen Ausgangszellen bestätigt werden. Allerdings ist von klinischer Relevanz vor allem die Differenzierung der Effekte der humanen L1CAM-Isoformen, d.h. der vollständigen neuronalen Isoform und der Tumorzell-assoziierten Spleiß-Variante. Deshalb sollte ein Einblick in die Expressionsverhältnisse der L1CAM-Isoformen in verschiedenen Patientenproben von Ovarialkarzinomen, Netz- und Lebermetastasen, sowie Tumorzellen, die mit metastasierungsfördernden Wachstumsfaktoren inkubiert wurden, gegeben werden. Zudem sollte die metastasierungsfördernde Wirkung von FL-L1CAM in einem Ovarialkarzinommodell verifiziert werden, um dann die molekularen Mechanismen, die zu diesen Effekten führen, in diesem und zwei weiteren Tumormodellen zu untersuchen. Hierfür sollten in *In-vitro*-Genexpressionsanalysen die Induktion tumorfördernder Moleküle identifiziert, aber auch die Aktivierung potentiell beteiligter Signaltransduktionswege analysiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Tierexperimentelle Methoden

4.1.1 Verwendete Versuchstiere

Für das experimentelle Metastasierungsmodell der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s wurden 8-10 Wochen alte, pathogenfreie und immunkompetente Weibchen aus dem syngenem Mausstamm DBA/2 verwendet (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die experimentelle Metastasierung der humanen Zelllinien des Ovarialkarzinoms SKOV3ip und dem Fibrosarkoms HT1080/*lacZ*-K15 wurde mit 8-10 Wochen alten, pathogenfreien und immunsupprimierten Weibchen des Mausstammes CD1 *nu/nu* durchgeführt (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Durch den Transfer des *nude* Gens, sind diese Mäuse nicht in der Lage T-Zellen zu produzieren. Alle Tiere wurden mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn unter sterilen Standardbedingungen gehalten.

4.1.2 Experimentelle Metastasierung eines syngenem T-Zell-Lymphommodells (L-CI.5s)

In einem Modell experimenteller Metastasierung einer T-Zell-Lymphomzelllinie (L-CI.5s) wurden die Tumorzellen in Phosphat gepufferter Saline (*phosphat buffered saline*, PBS, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) aufgenommen und auf 25.000 Zellen/ml eingestellt. Die Applikation erfolgte in einem Volumen von 200µl pro Maus, so dass 5.000 Zellen intravenös (i.v.) in die Schwanzvene injiziert werden konnten. Die Mäuse wurden sieben Tage nach Tumorzellinokulation geopfert und die Leber entnommen. Der mediale Leberlappen, wurde einmal mit PBS gewaschen und in Fixierlösung (135mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,4mM K₂HPO₄, 2% (w/v) Formaldehyd, 0,2% (w/v) Glutaraldehyd) für 1,5- 2h inkubiert. Durch die genetische *lacZ*-Markierung der Tumorzellen konnten die L-CI.5s-Zellen bzw. die Metastasen auf der Leberoberfläche durch die katalytische Umsetzung von X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid) sichtbar gemacht werden. In einem Stereomikroskop (6,2 fache Vergrößerung, Olympus SZX, Tokyo, Japan) wurden zum einen die

Makrometastasen (Metastasendurchmesser $\geq 0,2\text{mm}$) auf der Oberfläche des Leberlappens ausgezählt und zum anderen die Makro- und Mikrometastasen für qualitative Untersuchungen fotografiert. Für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen wurden Leberproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Histologische Analysen wurden mit Gewebeproben durchgeführt, die entweder für Paraffinschnitte zuerst in Fixierlösung (135mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,4mM K₂HPO₄, 2% (w/v) Formaldehyd) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet wurden oder für Kryoschnitte in Tissue-Tek® (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) bei -80°C für weitere Analysen aufbewahrt wurden.

4.1.3 Experimentelle Metastasierung von Xenograft-Modellen (SKOV3ip- und HT1080/*lacZ*-K15-Zellen)

Die beiden *lacZ*-markierten humanen Tumorzellenlinien SKOV3ip (Ovarialkarzinomzellen) und HT1080/*lacZ*-K15 (Fibrosarkomzellen) bilden nach intravenöser Tumorzellinokulation in die Schwanzvene von CD1*nu/nu*-Mäusen hauptsächlich Lungenmetastasen. Als Vorbereitung der Tumorzellinokulation wurden die Zellen jeweils nach Ablösung mit Trypsin in PBS aufgenommen und gezählt. Die SKOV3ip- sowie die HT1080/*lacZ*-K15-Zellen wurden in einem Volumen von 300µl pro Maus inokuliert, wodurch jede Maus eine Tumorzellzahl von 1×10^5 SKOV3ip bzw. 1×10^6 HT1080/*lacZ*-K15 injiziert bekam. Die Tumorzellen wurden auf Grund der erhöhten adhäsiven Eigenschaften durch die Überexpression von L1CAM während des gesamten Versuchsablaufs ständig resuspendiert. Die Opferung der Mäuse erfolgte im Falle der experimentellen Metastasierung der SKOV3ip nach 26 Tagen und 21 Tage nach Tumorzellinokulation der HT1080/*lacZ*-K15-Zellen. Der linke Lungenflügel wurde in Fixierlösung (135mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,4mM K₂HPO₄, 2% (w/v) Formaldehyd, 0,2% (w/v) Glutaraldehyd) für 1,5- 2h inkubiert und anschließend mit X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid) angefärbt. Die Auswertung des gefärbten Lungenflügels wurde unter dem Stereomikroskop mit einer 12-fachen Vergrößerung durchgeführt und die Metastasen auf der Lungenoberfläche ausgezählt. Für molekularbiologische und biochemische Analysen wurden die rechten Lungenflügel in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Histologische Untersuchungen wurden mit in Tissue-Tek® (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebetteten Gewebeproben durchgeführt.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Verwendete Zelllinien

L-CI.5s-Zelllinien:

Die murine T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s ist aus einer aggressiv-metastasierenden ESb-Zelllinie generiert worden (Krüger *et al.*, 1994). Zur Visualisierung und Untersuchung der Tumorzellen bis auf Einzelzellebene wurden die Zellen mit dem bakteriellen *lacZ*-Gen transduziert (Krüger *et al.*, 1994). Die Kultivierung der Suspensionszellen erfolgte in phenolrot-haltigem RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland), versetzt mit 10% (v/v) inaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS, PAA Gold, PAA, Linz, Deutschland), 20mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100mM HEPES (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 0,55mM Asparagin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 0,27mM Arginin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,5mM β -Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

SKOV3ip-Zelllinien:

Die adhärenz humane Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip wurden von Ellen Vitetta (*University of Dallas*, Texas, USA) zur Verfügung gestellt und konnte erfolgreich in einem spontanen Metastasierungsmodell angewendet werden (Arlt *et al.*, 2006). Die Zelllinie wurde mit dem bakteriellen *lacZ*-Gen transduziert und konnten somit in Gewebeproben detektiert werden (Arlt *et al.*, 2006). Für optimale Wachstumsbedingungen wurde die Zelllinie in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Biochrom, Berlin, Deutschland), ergänzt mit 10% (v/v) inaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS, PAA, Linz, Deutschland), 20mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100mM HEPES (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 0,55mM Asparagin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,27mM Arginin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert.

HT1080/*lacZ*-K15-Zelllinien:

Die HT1080/*lacZ*-K15-Zelllinie ist aus den HT1080-Zellen, zur Verfügung gestellt durch Agnes Noel (*Université Liège*, Lüttich, Belgien), auf Grund der *lacZ*-Markierung entstanden. Die HT1080/*lacZ*-K15 wurden zuvor erfolgreich in experimentellen Metastasierungsversuchen eingesetzt (Kopitz *et al.*, 2007; Kopitz *et al.*, 2008). Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM,

Biochrom, Berlin, Deutschland), ergänzt mit 10% (v/v) inaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS, PAA, Linz, Deutschland), 20mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100mM HEPES (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 0,55mM Asparagin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,27mM Arginin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

293T:

Eine gut transfizierbare Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen (293, Graham et al., 1977) hergestellt. Diese Zelllinie wurde als Verpackungszelllinie zur Virusproduktion verwendet und mit dem *Simian virus 40 large* Antigen transduziert (Du Bridge et al., 1987). Die Zellen wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) käuflich erworben und mit *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Biochrom, Berlin, Deutschland), ergänzt mit 10% (v/v) inaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS, PAA, Linz, Deutschland), 20mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100mM HEPES (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 0,55mM Asparagin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,27mM Arginin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) kultiviert.

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank (Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator, Thermo Quest, Eggenstein, Deutschland) unter Standardbedingungen kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte dreimal wöchentlich.

4.2.2 Kotransfektion und Infektion von Suspensionszellen (L-CI.5s)

Zur Herstellung von Retroviren zur Infektion der Suspensionszellen L-CI.5s wurde die Methode der Kalzium-Phosphat-Präzipitation angewandt. Dazu wurden am Vorabend 2×10^6 293T-Zellen pro 10cm-Schale ausgesät. Zwei Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Medium der Zellen gewechselt. Für die Kotransfektion wurden von den Helferplasmiden HIT60 und HCMVG (beide Plasmide von Martin Anton zur Verfügung gestellt, TU München, Deutschland), sowie von den transgtragenden, retroviralen Plasmiden je 10µg DNA eingesetzt und auf 30µl Gesamtvolumen mit ddH₂O aufgefüllt. Danach wurde in ein 15ml-Schraubdeckel-Röhrchen 500µl HEBS-Puffer (5g/l HEPES, 8g/l NaCl, 0,37g/l KCl, 0,125g/l Na₂HPO₄·2H₂O, 1g/l Glukose, pH 7,1) vorgelegt. In das Reaktionsgefäß mit der DNA wurde 61µl 2M CaCl₂ zupipettiert und schließlich mit 409µl ddH₂O auf ein Endvolumen von 500µl aufgefüllt.

Mit einer langen Pasteurpipette wurde kontinuierlich Luft in den HEBS-Puffer geblasen und langsam das CaCl_2 -DNA-Gemisch entlang der Pasteurpipette zugegeben. Nach 20min Inkubation unter der Sterilbank wurde der Ansatz tropfenweise in das Zellmedium gegeben und die 293T-Zellen über Nacht (14-16h) im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde unter S2-Bedingungen das Medium abgesaugt und in Kokultur mit den 293T-Zellen 1×10^6 L-CI.5s-Zellen pro 10cm-Schale zugegeben. Zur Verstärkung der Infektionsrate der L-CI.5s wurde noch $8 \mu\text{g/ml}$ Polybrene® (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) ins Medium gegeben. Nach 24-36h wurden die L-CI.5s, die sich im Überstand befunden haben, abgenommen und mit entsprechendem Antibiotika selektioniert. Erfolgte die Selektion über mehrere Tage, wurden die Zellen in ihrem normalen Rhythmus in Antibiotika-haltigem Medium unter S2-Bedingungen passagiert.

4.2.3 Kotransfektion und Infektion von adhärennten Zellen (SKOV3ip)

Die Herstellung von Retroviren, welche die Transduktion des Transgens in verschiedene Zellen ermöglichen, wurde mit Hilfe des käuflich erworbenen Transfektionsreagenz Lipofectamin™ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden 27h vor Transfektion 293T-Zellen zu 5×10^6 Zellen pro 10cm-Schale ausgesät. Drei Stunden vor Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und mit frischem Medium aufgefüllt. Für die Kotransfektion wurden 1,5ml Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in ein 15ml-Schraubdeckel-Röhrchen überführt und mit $36 \mu\text{l}$ Lipofectamin™ für 5min inkubiert. Dabei wurden in einem weiteren 15ml-Schraubdeckel-Röhrchen jeweils $10 \mu\text{g}$ der retroviralen Plasmide HIT60, HCMVG (beide Plasmide zur Verfügung gestellt von Martin Anton, TU München, Deutschland) und pQCXIP-huL1a bzw. als Kontrolle pQCXIP mit 1,5ml Opti-MEM® I Reduced Serum Medium versetzt. Anschließend wurden beide Lösungen gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das Medium der 293T-Zellen wurde in der Zwischenzeit abgesaugt und mit 5ml Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, versetzt mit 10% (v/v) inaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS, PAA, Linz, Deutschland), supplementiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Lipofektamin/DNA-Lösung tropfenweise auf die 293T-Zellen gegeben und für 6h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium unter S2-Bedingungen abgesaugt und die Zellen mit frischen 293T-Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden für 24-36h

inkubiert und der virushaltige Zellüberstand schließlich durch einen 0,45µm-Filter vorsichtig filtriert und für die sofortige Infektion der Zielzellen weiterverwendet. Dafür wurden am Vortag $1,5 \times 10^5$ SKOV3ip pro 6cm-Schale ausgesät. Zur Infektion der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1ml filtriertem, virushaltigem Überstand, versetzt mit 8µg/ml Polybrene® (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), für 2h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit SKOV3ip-Medium aufgefüllt. Zur Generierung einer neuen Zelllinie, erfolgte die Antibiotikaselektion der infizierten SKOV3ip-Zellen nach 48h Inkubation mit Puromycin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Die Selektion erfolgte über mehrere Tage, so dass die Zellen in ihrem normalen Rhythmus in Antibiotika-haltigem Medium passagiert wurden.

4.2.4 Limiting Dilution

Die Methode der *Limiting Dilution* wird durchgeführt, um klonale Zelllinien herzustellen. Hierfür wurden die L-CI.5s-Zellen auf 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. In einer Verdünnungsreihe (5x 1:10) wurde letztendlich eine Konzentration der Zellen von 3×10^0 Zellen/ml hergestellt. In einer 96-well-Platte wurde in jedes well 100µl der Verdünnung pipettiert, so dass theoretisch in jedem 3.well eine Zelle heranwachsen konnte. Die Platte wurde im Brutschrank inkubiert, bis die Einzelzellen hochgewachsen waren und langsam hochgezogen werden konnten.

4.2.5 Inkubationsversuche mit HGF und TGF-β

Für die Inkubation von SKOV3ip, OVMz und HCT-116 wurden von den Tumorzellen jeweils 1×10^5 Zellen in einer 6-well-Platte ausgesät. SKOV3ip und OVMz wurden am folgenden Tag für 48h mit entweder 0ng/ml oder 5ng/ml TGF-β1 (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) inkubiert und anschließend geerntet. Die HCT-116 wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen jeden Tag mit 0ng/ml bzw. 10ng/ml HGF (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Die Zellen erhielten jeden 2. Tag frisches Medium und wurden bei Bedarf auf eine 6cm-Platte umgesetzt. Alle Zellen wurden in RNA*later* aufgenommen, verschickt und anschließend sofort aufgearbeitet (Inkubation durchgeführt von Marco Pfeifer, DKFZ, Deutschland).

4.2.6 Proliferationsanalysen

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens wurden $7,5 \times 10^5$ L-CI.5s-Zellen an Tag 0 pro 96-*well*-Platte und 1×10^5 SKOV3ip-Zellen pro 6-*well*-Platte ausgesät. Pro Zeitpunkt wurden jeweils fünf *wells* einer Gruppe unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim, Deutschland) ausgezählt. Die Auswertung der Proliferationsrate erfolgt über einen Zeitraum von 60h bzw. 72h. Tote Zellen konnten durch Zugabe von Tryphanblau (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) angefärbt werden.

4.2.7 *Boyden-Chamber*-Migrationsexperimente

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von L-CI.5s-Zellen wurden *Boyden Chamber* Versuche mit Transwell®-Inserts (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) mit einer Porengröße von $3 \mu\text{m}$ verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium (vgl. 4.2.1) aufgenommen. In die obere Kammer wurden 1×10^5 der jeweiligen L-CI.5s-Zellen in $300 \mu\text{l}$ serumfreiem Medium überführt. In das untere *well* wurde 1ml serumhaltiges Medium vorgelegt, um einen Serum-Gradienten als chemotaktisches Signal für die Zellen zu erzeugen. Die L-CI.5s-Zellen wurden daraufhin für 48h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die migrierten, d.h. die Zellen, die aus dem Einsatz in die untere Kammer gewandert sind, mit einer Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim, Deutschland) ausgezählt.

4.2.8 *Boyden-Chamber*-Invasionsexperimente

Das Invasionsverhalten von L-CI.5s-Zelllinien wurde ebenfalls mit der *Boyden Chamber* Methode evaluiert. Hierfür wurden die Einsätze (Transwell®-Inserts, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) mit einer Porengröße von $3 \mu\text{m}$ mit einer Schicht aus $78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Matrigel™ (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland), einer künstlichen EZM, gleichmäßig überschichtet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die L-CI.5s-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in serumfreiem Medium aufgenommen und zu 1×10^5 Zellen pro $300 \mu\text{l}$ Medium in die Einsätze überführt. In die untere Kammer wurde 1ml serumhaltiges Medium vorgelegt, um einen Serum-Gradienten zu erzeugen. Die Zellen wurden für 48h im

Brutschrank inkubiert und anschließend die Zellen in der unteren Kammer mit einer Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim, Deutschland) ausgezählt.

Molekularbiologische Methoden

4.2.9 Verwendete Plasmide und cDNAs

pYX-Asc-muL1CAM:

Die cDNA (Klon ID: IRAVp968C10117D6) des vollständigen murinen L1CAM wurde käuflich erworben bei der Firma RZPD (RZPD, Berlin, Deutschland).

L1a-pcDNA3:

Das Plasmid pcDNA3.1-L1a enthält die vollständige Sequenz des humanen Zelladhäsionsmoleküls L1CAM und wurde von Vance Lemmon zur Verfügung gestellt (*University of Miami*, Florida, USA).

pQCXIP:

Das retrovirale Plasmid pQCXIP wurde käuflich erworben bei der Firma BD Biosciences Clontech (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland).

pBluescript KS (+):

Der Transfervektor wurde bei der Firma Stratagene (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) käuflich erworben.

Retrovirale Helferplasmide:

Für die Kotransfektion wurden die beiden Helferplasmide pHIT-60 (Soneoka *et al.*, 1995) und pHCMVG (Yee *et al.*, 1994) verwendet. Die Helferplasmide wurden von Martina Anton (TU München, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

4.2.10 Klonierungsstrategie der verwendeten Plasmide

Die Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurde nach einem etablierten Standardprotokoll im Labor durchgeführt. Die Plasmide wurden mit den jeweiligen aus der Klonierungsstrategie entnehmbaren Restriktionsendonuklease in DNA-Fragmente aufgeschnitten (Tab. 1). Die Fragmente wurden über Gelelektrophorese mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Für *blunt-end* Ligationen

wurden die Überhänge der DNA-Fragmente mit T4 Polymerase (Roche, Mannheim, Deutschland) aufgefüllt. Um anschließend eine Religation des Vektorplasmids zu vermeiden, wurde durch eine alkalische Phosphatase-Behandlung (CIAP, *calf intestine alkaline phosphatase*, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) eine Dephosphorylierung des Vektorplasmids durchgeführt. Die Ligation des Vektors mit den cDNA-Fragmenten erfolgte durch die Zugabe von T4-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die Amplifikation der Vektoren erfolgte in dem Bakterienstamm DH10 α und wurde anschließend mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Alle verwendeten Enzyme stammen entweder von NEB (*New England Biolabs*, Frankfurt a. Main, Deutschland) oder Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers eingesetzt.

Tab. 1: Klonierungsstrategie der verwendeten Plasmide

Ausgangsvektor	Endonukleasen	Eingesetzt in
pYX-Asc-muL1CAM	<i>EcoRI/ NotI</i>	pBluescript KS (+) <i>sticky/sticky</i>
pBluescript-muL1CAM	<i>EcoRI/ NotI</i>	pQCXIP-muL1CAM <i>sticky/sticky</i>
L1a-pcDNA3	<i>HindIII/XhoI</i>	pBluescript KS (+) <i>sticky/blunt</i>
pBluescript-L1a	<i>XhoI/NotI</i>	pQCXIP-L1a <i>blunt/sticky</i>

Klonierungsstrategie pQCXIP-muL1CAM:

Die cDNA von murinem L1CAM wurde durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *NotI* aus dem Ursprungsplasmid pYX-Asc-L1CAM herausgeschnitten und in den Transfervektor pBluescript II KS (+), der ebenfalls mit *EcoRI* und *NotI* aufgeschnitten wurde, eingesetzt und ligiert. Mittels des Transfervektors konnte die murine cDNA von L1CAM in das retrovirale Plasmid pQCXIP einkloniert werden. Dafür wurden sowohl der pBluescript KS-muL1CAM, als auch der pQCXIP mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* aufgeschnitten und die cDNA in den retroviralen Vektor ligiert (Abb. 5A).

Klonierungsstrategie pQCXIP-L1a:

Die verwendete cDNA von FL-L1CAM wurde von Vance Lemmon (Universität Miami) in den Vektor cDNA3.1 inkloniert und zur Verfügung gestellt. Die cDNA von FL-L1CAM (L1a) wurde aus dem Vektor L1a-pcDNA3 durch die Restriktionsenzyme *Hind*III und *Xho*I herausgeschnitten und durch eine *sticky-end* Klonierung in den Shuttle-Vektor pBluescript II KS (+) eingesetzt. Aus diesem Vektor wurde die cDNA von FL-L1CAM durch *Xho*I- und *Not*I-Verdau herausgeschnitten und *Xho*I/*blunt* und *Not*I/*sticky* in den retroviralen Vektor pQCXIP eingesetzt. Dieser wurde zuvor durch Verwendung der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Not*I aufgeschnitten (Abb. 5B).

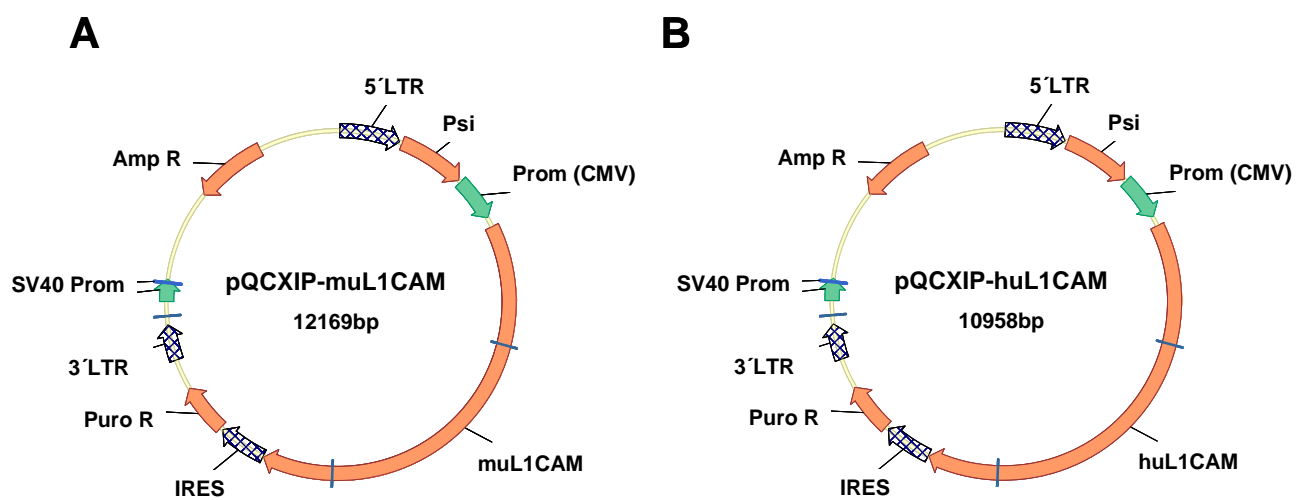


Abb. 5: Schematische Darstellung der retroviralen Vektoren mit der cDNA von murinem L1CAM bzw. humanem vollständigen L1CAM (Prom, Promotor; R, Resistenz).

4.2.11 RNA-Isolation aus Zellen

Adhärenente Zellen wurden am Vortag auf einer 10cm-Schale so ausgesät, dass die Schale am Tag der Isolation zu 80-90% konfluent war. Suspensionszellen wurden am Vortag zu 1×10^6 Zellen ausgesät. Vor der RNA-Aufarbeitung wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS (pH 7,4; Biochrom, Berlin, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1ml bzw. die Suspensionszellen in 500µl Trizol®Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen und 5min bei RT inkubiert. Danach wurde 200µl Chloroform pro ml Trizol zugegeben und 15s mit dem Minishaker (MS2 Minishaker, IKA® Works, Inc., USA) gemischt. Nach 2-3min Inkubation sind die Proben 15min mit 13000rpm und bei 4°C zentrifugiert worden (Centrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). In einem 1,5ml

Reaktionsgefäß wurden 500µl Isopropanol pro ml eingesetztem Trizol vorgelegt, um dann die abgenommene, obere, farblose Phase der Proben zu überführen. Dieser Ansatz wurde kurz mit dem Minishaker gemischt und 10min bei RT inkubiert. Nachdem 10min mit 13000rpm und bei 4°C zentrifugiert wurde, konnte der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen werden. Zum Waschen der RNA wurde 1ml 80% nukleasefreier EtOH zugegeben und wieder zentrifugiert (5min, 7600rpm und 4°C, siehe oben). Der Überstand wurde erneut verworfen und das RNA-Pellet getrocknet und in 30µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde am Photometer (DU® 640 Spectrophotometer, Beckman, Krefeld, Deutschland) gemessen. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

4.2.12 RNA-Isolation aus Gewebe

Für die Isolation der RNA aus Gewebeproben wurde das RNeasy® Midi Kit von QIAGEN (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die notwendigen Reagenzien und Materialien waren Bestandteil des Kits. Die isolierte RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

4.2.13 Quantitative *Real Time*-PCR

Direkt nach der Isolation der RNA aus Zellen bzw. Gewebe, aber auch nach dem Auftauen der RNA aus -80°C, wurden die RNA für 10 min auf 65°C erhitzt. Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde am Photometer bestimmt und auf 0,1µg/µl eingestellt. Für die reverse Transkriptionsreaktion wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet und pro Ansatz ein 1µg RNA eingesetzt.

Die quantitative *Real time*-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) bzw. TaqMan™ basiert auf Fluoreszenzspektrometrie und macht es möglich qualitativ und quantitativ mRNA bzw. cDNA nachzuweisen. Um die Genexpressionen unterschiedlicher Proben vergleichen zu können, muss jede Probe gegen 18S rRNA (*housekeeping-Gen*) abgeglichen und die Quantifizierung mit Hilfe von Standardkurven evaluiert werden. Die *Primer/Probe* Zusammensetzungen (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland, 18S ID: 4319413 E; huCXCR4 ID: Hs00607978_s1; huEGF ID: Hs01099999_m1; huEGFR ID: Hs01076092_m1; huGAPDH ID: 4352934E; huL1Exon27 ID: Hs01109766_g1; huMMP-2 ID: Hs00234422_m1; huMMP-9 ID: Hs00234579_m1), sowie der fertige Master-Mix (Sigma Aldrich, Taufkirchen,

Deutschland) wurden käuflich erworben. Die *Primer* und die *Probe* zur Detektion von *lacZ* bzw. humanem L1CAM Δ 27 wurden nach Übermittlung der *Probe*-Sequenz auf Anfrage speziell von Applied Biosystems hergestellt.

Die Messung der einzelnen Proben für den TaqMan™ wurde in 96-Opti-*well*-Platten (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Für den 18S-Standard wurden 1ng, 0,5ng, 0,25ng, 0,125ng, 0,0625ng bzw. 0,03125ng einer ausgewählten cDNA eingesetzt. Für die Werte der zu messenden Proben sind Triplets von je 1ng cDNA pro *well* pipettiert worden. Für die Standardkurve des zu messenden Gens wurden 20ng, 10ng, 5ng, 2ng, 1ng bzw. 0,5ng cDNA pro *well* aufgetragen. Die zu messende Proben-cDNA wurde in Triplikaten pipettiert und zu 5ng cDNA pro *well* eingesetzt. Zur Vervollständigung des Reaktionsansatzes wurden 12,5 μ l fertiger Master Mix (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 1,25 μ l *Primer/Probe* Zusammensetzung (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und 1,25 μ l nukleasefreies H₂O zugegeben.

Der Ansatz wurde im TaqMan™-Gerät ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gemessen und anschließend mit dem Programm SDS2.2 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) ausgewertet.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Proteinisolation aus Zellen

Zur Proteingewinnung nach Standardprotokoll wurden am Vortag $1,5 \times 10^6$ SKOV3ip-Zellen auf einer 10cm-Schale ausgesät. Für die Untersuchung von L1CAM-induzierten Signaltransduktionswegen wurden $1,3 \times 10^6$ SKOV3ip-Zellen und $1,5 \times 10^6$ HT1080/*lacZ*-K15-Zellen auf 10-cm-Schalen ausgesät, nach 24h gewaschen und für weitere 48h im serumfreiem Medium inkubiert. Die Suspensionszelllinien wurden zweimal mit PBS gewaschen, in serumfreiem Medium aufgenommen, die Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml ausgesät und für 48 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden für die Proteinisolation mit PBS gewaschen und die adhärenen Zellen in 400 μ l bzw. die Suspensionszellen in 100 μ l *Cell Lysis* Puffer (Cell Signaling, Frankfurt a. Main, Deutschland) aufgenommen. Die Proteinisolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Gesamtproteinmenge wurde mit dem BCA™ Kit (Pierce, Rockfort, IL, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Falls im

Anschluss keine weiteren Analysen durchgeführt wurden, ist das Protein aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt worden.

4.3.2 Western-Blot-Analysen

Der Nachweis von Genexpression bzw. Proteinphosphorylierung auf Proteinebene wurde durch elektrophoretische Auftrennung der jeweiligen Proteinproben auf einem 8%igen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Das Gesamtprotein (L-CI.5s: 50µg, SKOV3ip: 40µg und HT1080LacZ-K15: 60µg) wurde 5:1 mit *Loading Puffer* versetzt und für 5min bei 99°C erhitzt. Die Proteine wurden bei 90mA für 2h aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham, Braunschweig, Deutschland) für 1h bei 225mA geblottet. Das auf der Membran gebundene Protein wurde durch Ponceau S Färbung (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) nachgewiesen. Anschließend wurden die Membranen einmal mit TBST (*Tris Buffered Saline* mit 0,1% (v/v) Tween-20) gewaschen und anschließend abhängig von der Inkubationslösung des Primärantikörpers in entweder 5%iger BSA-Lösung (*bovine serum albumin*, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) oder in 5%igem Milchpulver (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) für 1h bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurden die Membranen dreimal mit TBST für jeweils 10min bei RT gewaschen und schließlich die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tab. 2) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran wieder dreimal für 10min mit TBST bei RT geschwenkt. Die Membranen wurden mit dem Sekundärantikörper des jeweiligen Primärantikörpers (Tab. 2) für 1,5h bei RT inkubiert. Zuletzt wurden die Membranen wieder viermal mit TBST gewaschen und schließlich an der Kodak Image Station ausgewertet. Dazu wurde das Chemolumineszenz-Signal des Sekundärantikörpers mit dem ECL Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) detektiert.

Tab. 2: Verwendete Antikörper in Western-Blot-Analysen

Antikörper	Verdünnung	Sek. Antikörper	Verdünnung
L1-11A (v. P. Altevogt)	unverdünnt	Anti-Maus (GE Healthcare)	1:2000 in 2,5% BSA/TBST
pERK (Cell Signaling)	1:500 in 5% BSA/TBST	Anti-Rabbit (GE Healthcare)	1:5000 in 2,5% BSA/TBST
ERK (Cell Signaling)	1:500 in 5% BSA/TBST	Anti-Rabbit (GE Healthcare)	1:5000 in 2,5% BSA/TBST
pSTAT3 (Cell Signaling)	1:2000 in 5% BSA/TBST	Anti-Rabbit (GE Healthcare)	1:5000 in 2,5% BSA/TBST
STAT3 (Cell Signaling)	1:2000 in 5% BSA/TBST	Anti-Rabbit (GE Healthcare)	1:5000 in 2,5% BSA/TBST
pEGFR (Y845) (R&D)	1:1000 in 5% Milchpulver/TBST	Anti-Rabbit (GE Healthcare)	1:5000 in 2,5% BSA/TBST
EGFR (Cell Signaling)	1:1000 in 5% BSA/TBST	Anti-Rabbit (GE Healthcare)	1:5000 in 2,5% BSA/TBST

Cell Signaling (Frankfurt a. Main, Deutschland), GE Healthcare (München, Deutschland), R&D (Minneapolis, MN, USA)

4.3.3 MMP-2- und MMP-9-Aktivitätsassays

Die Aktivität der beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 in den verschiedenen Tumorzelllinien wurde mit zwei, für MMP-2 und -9 spezifischen Aktivitätsassays (Amersham, Braunschweig, Deutschland) nachgewiesen. Dafür wurden die verschiedenen Zelllinien der SKOV3ip- und HT1080/acZ-K15-Zellen im serumhaltigen Medium auf 10cm-Schalen ausgesät (SKOV3ip: $1,3 \times 10^6$ Zellen, HT1080/acZ-K15: $1,5 \times 10^6$ Zellen). Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 3,5ml serumfreies Medium für weitere 48h inkubiert. Pro Zelllinie wurden drei Ansätze ausgesät.

Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand zur Analyse abgenommen und jeweils die Zellzahl bestimmt. Der Überstand wurde jeweils unverdünnt in Dublikaten auf die Antikörper-beschichtete 96-well-Platte des MMP-2- bzw. MMP-9-Aktivitätsassays aufgetragen. Die Aktivitätsassays wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach einer 6 stündigen Inkubation der 96-well-Platten bei 37°C wurde die Aktivität der Gelatinasen bei einer Absorption von 405nm gemessen (Wallac Victor², Perkin

Elmar, Weiterstadt, Deutschland) und in Relation zur Gesamtzellzahl der einzelnen Zelllinien gesetzt.

4.3.4 *In-situ*-Hybridisierung

Zum Nachweis der Genexpression auf Gewebeschnitten auf mRNA-Ebene wurde *In-situ*-Hybridisierung durchgeführt. Zwei Tag vor Beginn der *In-situ*-Hybridisierung wurde DEPC-H₂O hergestellt. Dafür wurden 2 ml 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) mit 2l H₂O-bidest. gut geschüttelt, über Nacht unter dem Abzug ausgedampft und autoklaviert. Sämtliche Lösungen wurden mit DEPC-H₂O hergestellt. Zudem mussten sämtliche Gefäße, Rührfische und Spatel bei 180°C für 4h erhitzt oder mit 2% Absolve-Lösung abgewischt werden. Die Objektträger für die Paraffinschnitte wurden 1h in Silanelösung (5ml 3-Aminopropyltriethoxysilane (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 250 ml Aceton) inkubiert.

Die Paraffinschnitte wurden frisch hergestellt und für 2x10min in Xylol entparaffinisiert. Die Rehydrierung der Schnitte erfolgt jeweils für 5min in 100%, 95% und 70%igem Ethanol. Vor der Prähybridisierung wurden die Schnitte 2x in DEPC-H₂O gewaschen. Jetzt folgten verschiedene Waschschr itte mit DEPC-PBS (2x5min), DEPC-PBS + 100 mM Glycin (2x5min), DEPC-PBS +0,3% Triton X-100 (15min) und wieder DEPC-PBS (2x5min). Zur Permeabilisierung wurden die Schnitte für 30min bei 37°C mit TE-Puffer + 20µg/ml RNase-freier Proteinase K (Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert und bei 4°C für 5min mit DEPC-PBS + 4% Paraformaldehyd nachfixiert. Vor dem Acetylieren wurden die Schnitte zweimal mit DEPC-PBS gewaschen und anschließend in 0,1M Triethanolamin-Puffer, pH 8,0 (TEA, Roth, Karlsruhe, Deutschland)+ 0,25% *Acetic anhydride* (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert. Die Schnitte wurden mindestens 10min bei 37°C im Prähybridisierungspuffer (4xSSC + 50% deionisiertes Formamid (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)) gelegt. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer (40% deionisiertes Formamid, 5% Dextransulfat, 1x Denhardt`s, 4x SSC (pH 4.5), 10 mM DTT, 1 mg/ml yeast t-RNA) mit 1mg/ml denaturierte *Salmon Sperm* DNA sowie jeweils 50ng/Schnitt der DIG-markierten *Sense*- bzw. *Antisense*-Sonden zusammen gemischt. Von dem denaturierten Hybridisierungsmix wurden jeweils 50µl pro Schnitt aufgetragen und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 42°C inkubiert.

Die Schnitte wurden zweimal in 2x SSC und zweimal in 1x SSC für jeweils 15min im Schüttelbad inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 30min bei 37°C in NTE-Puffer (500mM NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8)+ 20µg/ml RNase A inkubiert und mit 1x SSC + 50% Formamid zweimal für 30min bei 37°C gewaschen. Die Schnitte wurden noch mal mit 1xTBS-Puffer für 2x10min bei RT gewaschen. Blockiert wurde mit TBS-Tween + 5% *goat* Serum. Der Anti-Dig-Antikörper (Roche, Mannheim, Deutschland) wurde 1:5000 in TBST + 1% goat serum verdünnt und davon jeweils 150µl pro Schnitt eingesetzt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem die Objektträger zweimal 30min in 1x TBS-Puffer bei RT geschüttelt wurden, erfolgte eine Inkubation mit Substratpuffer (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂) für 10min bei RT. Von der Farbsubstrat-Lösung (10ml Substratpuffer + 45µl NBT (Roche, Mannheim, Deutschland) + 70µl BCIP (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) + 12µl Levamisol (SigmaAldrich, Taufkirchen, Deutschland)) wurden 150µl auf die Schnitte aufgetropft und der Ansatz in einer feuchten Kammer bei RT im Dunkeln über Nacht inkubiert. Bei eindeutigem Signal wurden die Schnitte für 5min in destilliertem Wasser inkubiert, die Kerne mit Kernechtrot angefärbt und die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

4.3.5 *In-situ*-Zymographie

Die Detektion von gelatinolytischer Aktivität auf Gewebeschnitten erfolgte durch *In-situ*-Zymographie. Vorbereitend wurde eine 1%ige Agarose-Lösung hergestellt und bei 50°C im Wasserbad aufbewahrt. Kryoschnitte des zu untersuchenden Gewebes wurden hergestellt und 10min bei RT getrocknet. Um ein intensiveres Kernsignal zu erhalten, wurden die Schnitte mit 4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorit (DAPI 1:100 verdünnt, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) für 5min im Dunkeln bei RT vorinkubiert. Anschließend musste zügig ein Mastermix (50µl/pro Schnitt), bestehend aus 20µl DQ-Gelatine (1mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1µl DAPI (1:100) und 179µl der 1%igen Agarose auf den Schnitt pipettiert werden und mit einem Deckglas vorsichtig abgedeckt werden. Die Schnitte wurden über Nacht im Dunkeln bei RT inkubiert und am nächsten Tag an einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4.4 Patientenmaterial

Es wurde von 14 Patientinnen mit Ovarialkarzinomen verschiedener Stadien zur Analyse verwendet. Die Einteilung der Gewebeproben erfolgte nach FIGO-Klassifikation I-IV (*Fédération Internationale de Gynécologie et d' Obstétrique*). Für die Analysen wurden benigne Tumore ($n = 2$) und Tumore mit FIGO I ($n = 5$) und FIGO III/IV ($n = 7$) verwendet. Die Proben wurden nach einem identischen Protokoll chirurgisch entfernt und anschließend in flüssigen Stickstoff gefroren. Die Netzmetastasen (*Omentum majus*) wurde von acht Patientinnen nach einem identischen Protokoll chirurgisch entfernt. Die Proben wurden in RNA/ater aufbewahrt. Das Gewebe der Lebermetastasen von Kolorektalkarzinomen stammte von neun verschiedenen Patienten und wurde ebenfalls nach einem identischen Protokoll chirurgisch entfernt und in flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Alle Patienten haben der Verwendung der entfernten Gewebeproben für wissenschaftliche Studien zugestimmt

4.5 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte bei normalverteilten Daten mit dem *Student's t-Test*, während die Signifikanz von nicht normalverteilten Werten mit Hilfe des Mann-Whitney Rank-Sum-Tests bestimmt wurde. Ein Ergebnis wurde mit einem $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen der Effekte von L1CAM und ADAM-10 in den späten Phasen der Metastasierung

Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM wurde in verschiedenen Studien als migrations- und invasionsförderndes Molekül identifiziert (Mechtesheimer *et al.*, 2001, Silletti *et al.*, 2004, Arlt *et al.*, 2005, Gast *et al.*, 2008). Erste Ergebnisse zeigen, dass das *shedding* von L1CAM durch ADAM-10 mit der spontanen Streuung von Tumorzellen in Verbindung gebracht werden kann (Gavert *et al.*, 2007). Allerdings wurde die Wirkung von L1CAM sowie seiner Sheddase ADAM-10 auf die späten Phasen der Metastasierung, d.h. die Kolonisierung der Tumorzellen in entfernte Organe, noch nicht untersucht und sollte in dieser Arbeit u.a. analysiert werden. In einem syngenen und gut etablierten experimentellen Lebermetastasierungsmodell eines T-Zell-Lymphoms (L-CI.5s, vgl. 4.1.2) wurden die Auswirkungen der L1CAM- und ADAM-10-Expression auf das metastatische Potential der Tumorzellen im Wirtsgewebe durch Genmanipulation der Tumorzellen untersucht.

5.1.1 Korrelation der L1CAM- und ADAM10-Expression mit der Progression der experimentellen Metastasierung eines T-Zell-Lymphoms (L-CI.5s)

Das experimentelle Lebermetastasierungsmodell mit L-CI.5s-Zellen wurde als mechanistisches Tiermodell zur Untersuchung möglicher Effekte von L1CAM sowie dessen Sheddase ADAM-10 auf die späten Phasen der Metastasierung verwendet. Um erste Aussagen über die Bedeutung von L1CAM und ADAM-10 in diesem Modell treffen zu können, wurden die Expressionslevel auf mRNA-Ebene an Tag 0 sowie sieben Tage nach Tumorzellinokulation gemessen. Dafür wurden 5000 L-CI.5s-Zellen intravenös (i.v.) in die Schwanzvene von DAB/2-Mäusen injiziert. Sieben Tage nach Tumorzellinokulation hat die Kolonisierung der Leber durch die Tumorzellen stattgefunden (Makrometastasierung) und es kann eine sekundäre Invasion von L-CI.5s (Mikrometastasierung) in das Leberparenchym beobachtet werden (Gerg *et al.*, 2008). An Tag sieben war die L1CAM Expression in Anwesenheit von

Tumorzellen um ein Vielfaches im Vergleich zum Kontrollgewebe an Tag 0 induziert (Abb. 6 A). Ein deutlicher Anstieg konnte auch für die Expression der L1CAM-Sheddase ADAM-10 sieben Tage nach Tumorzellinokulation im metastasentragenden Lebergewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe an Tag 0 detektiert werden (Abb. 6 B). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Anwesenheit von Tumorzellen im Lebergewebe ein Anstieg der Gesamt-Expression von L1CAM bzw. ADAM-10 beobachtet werden konnte. Dabei kann keine Aussage gemacht werden, ob die Induktion der Expression beider Moleküle in den Tumorzellen und/oder im Wirtsgewebe erfolgte.

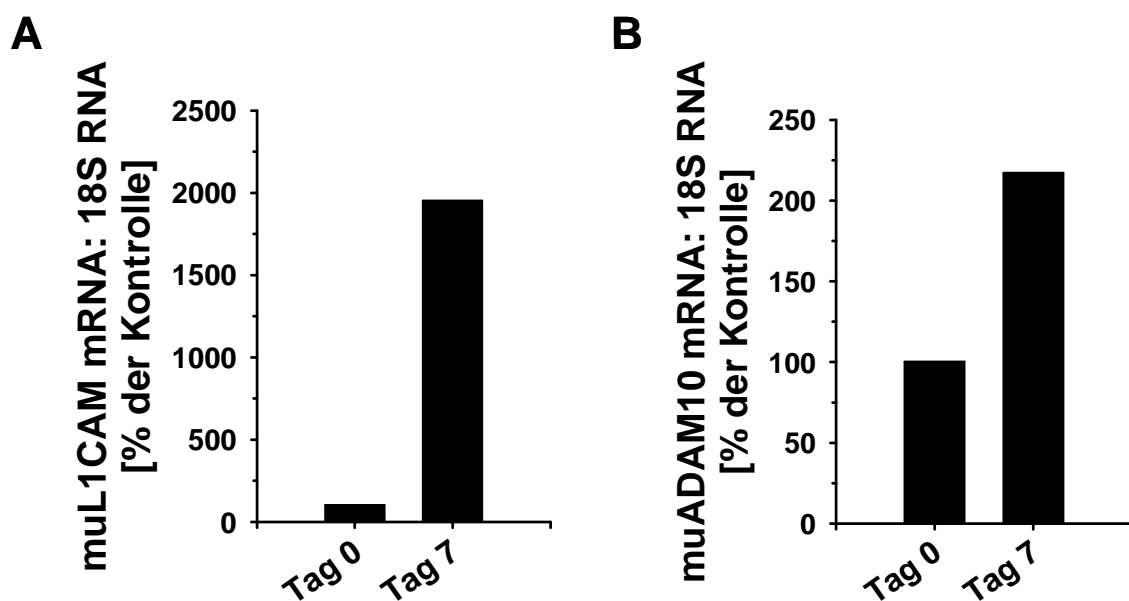


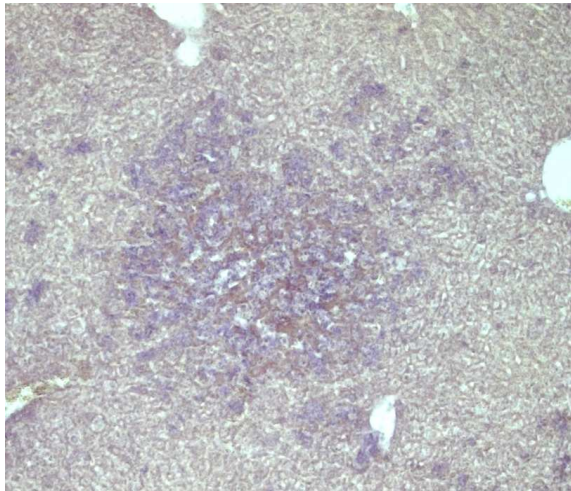
Abb. 6: Untersuchung der L1CAM- und ADAM-10-Expression im L-CI.5s Metastasierungsmodell. An Tag 0 wurden 5000 L-CI.5s-Zellen i.v. in die Schwanzvene von DBA/2 Mäuse inokuliert. Die Tiere wurden an Tag 0 bzw. Tag sieben geopfert und die Gesamt-RNA aus dem Lebergewebe isoliert. Die Expression von L1CAM und ADAM-10 war an Tag sieben um ein Vielfaches im Vergleich zum Kontrollgewebe erhöht (dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus einem Pool von drei Tieren pro Gruppe; muL1CAM Tag 0: 100%, Tag 7: 1951%, muADAM10, Tag 0: 100%, Tag 7: 217%).

5.1.2 Lokalisation von L1CAM im metastasentragenden Lebergewebe

Durch *In-situ*-Hybridisierung mit einer spezifischen homologen Sonde, gerichtet gegen L1CAM-mRNA sollte die Expression von L1CAM in Anwesenheit von L-CI.5s-Zellen an Tag sieben nach Tumorzellinokulation lokalisiert werden. Die L1CAM-mRNA konnte hauptsächlich im metastatischen Gewebe auf den Leberschnitten detektiert werden (Abb. 7). Vereinzelt, gestreute Zellen im Leberparenchym exprimierten ebenfalls L1CAM (Abb. 7). Da die L1CAM-Expression hauptsächlich

innerhalb der Lebermetastasen detektiert werden konnte, lässt sich annehmen, dass dessen Expression auf Seiten der Tumorzellen induziert ist.

Antisense



Sense



Abb. 7: Untersuchungen zur L1CAM-Expression in metastasenträgenden Lebern. Sieben Tage nach Tumorzellinokulation von 5000 L-CI.5s-Zellen wurden die Mäuse geopfert. Durch *In-situ*-Hybridisierung konnte die L1CAM-Expression im metastatischen Lebergewebe nachgewiesen werden. Die *Sense*-Kontrolle zeigte kein unspezifisches Signal auf den Leberschnitten (dargestellt sind Schnitte eines repräsentativen Tieres aus einer Gruppe von drei Mäusen, 10-fache Vergrößerung).

5.1.3 Charakterisierung von L-CI.5s-shmuL1CAM knock down Zelllinien

Die Lokalisation von L1CAM in den Metastasen wirft die Frage nach einem funktionellen Beitrag von L1CAM auf Tumorzellseite für die Metastasierung auf. Um festzustellen, inwiefern das metastatische Potential der Tumorzellen von der Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM beeinflusst wird, wurde durch RNAi-Technologie die Expression von L1CAM in den L-CI.5s-Zellen unterdrückt. Die Verwendung einer effizienten shRNA-Sequenz gegen L1CAM führte zu einer Reduktion der L1CAM-Expression um 90,4% im Vergleich zur *scrambled* Kontrolle (L-CI.5s-shscr), einer Kontrollzelllinie mit einer unspezifischen shRNA zur Aktivierung des Dicer/RISC-Komplexes (Abb. 8A).

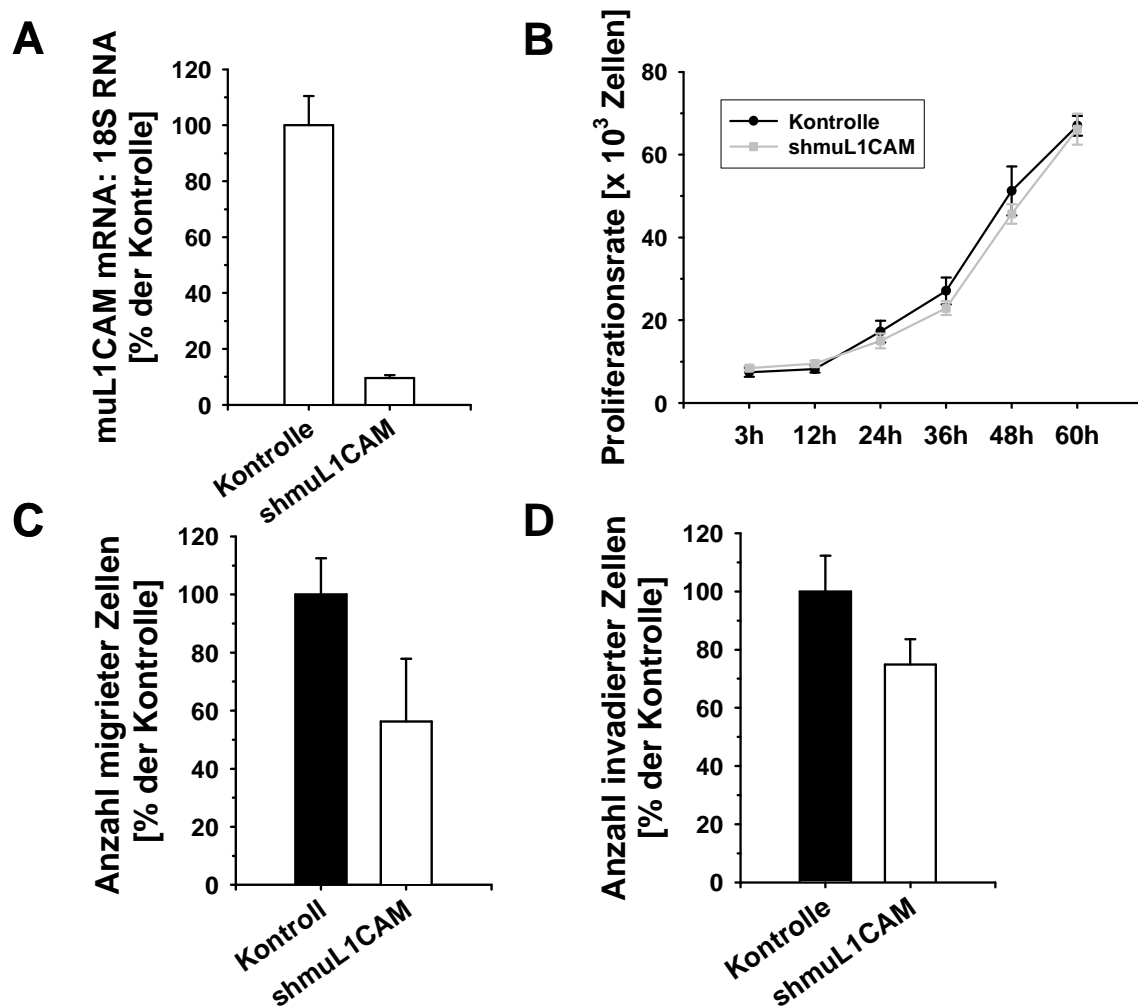


Abb. 8: Charakterisierung von L-CI.5s-Zellen mit einem *knock down* von L1CAM. A-D. Durch retrovirale Transduktion konnte eine Zelllinie (L-CI.5s) mit stabilem *knock down* von L1CAM hergestellt werden. A. Die Expression von L1CAM in den L-CI.5s konnte zu 90,4% im Vergleich zur Kontrollzelllinie reduziert werden (Kontrolle: 100% \pm 10,475%, shmuL1CAM: 9,605% \pm 1,021%, dargestellt ist der Mittelwert relativ zur 18S rRNA mit Standardfehler). B. Das Proliferationsverhalten der Tumorzellen wurde durch die Reduktion der L1CAM Expression nicht beeinflusst ($n=5$ pro Zeitpunkt, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler, Kontrolle: 67,0 \pm 2,380, shmuL1CAM: 66,167 \pm 3,719 des 60h Zeitpunkts). C. Die Suppression der L1CAM-Expression führte im Boyden-Chamber-Assay zu einer deutlichen Reduktion der Migration der Tumorzellen im Vergleich zur *scrambled* Kontrolle ($n=2-3$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler, Kontrolle: 100% \pm 21,651%, shmuL1CAM: 56,250% \pm 21,651%). D. Durch die Matrigel-Beschichtung der Filtereinsätze des *Boyden-Chamber-Assays* konnte ein reduziertes Invasionsverhalten der L-CI.5s-shmuL1CAM gegenüber den Kontrollzellen beobachtet werden (dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler, Kontrolle: 100% \pm 12,329%, $n=2$, shmuL1CAM: 74,886% \pm 8,712%, $n=3$).

Um auszuschließen, dass sich durch den *knock down* von L1CAM das Proliferationsverhalten der Tumorzellen verändert hat und dies evtl. Einfluss auf das Auswachsen der Metastasen *in vivo* nehmen könnte, wurde das Proliferationsverhalten der Tumorzellen über 60 h analysiert. Das Wachstum der

modifizierten Tumorzelllinie unterschied sich dabei nicht signifikant von dem der Kontrollzelllinie (Abb. 8B).

Die Auswirkungen der Reduktion der L1CAM-Expression auf das Migrations- und Invasionsverhalten der Tumorzellen wurde mit Hilfe eines *Boyden-Chamber-Assays* untersucht. Der *knock down* von L1CAM in den Tumorzellen führte zu einer verminderten Migration und Invasion im Vergleich zur Kontrollzelllinie (Abb. 8C und D). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression von L1CAM das metastatische Potential der Tumorzellen beeinflussen könnte.

5.1.4 Reduktion des metastatischen Potentials von L-CI.5s *in vivo* durch den *knock down* von L1CAM

Die *In-vitro*-Ergebnisse haben gezeigt, dass die Expression von L1CAM einen Einfluss auf das Migrations- und Invasionspotential der murinen T-Zell-Lymphomzellen hatte. Durch experimentelle Metastasierung der modifizierten T-Zell-Lymphomzelllinien L-CI.5s-shscr und L-CI.5s-shmuL1CAM sollten die Effekte einer Reduktion der L1CAM Expression in den Tumorzellen auf die späten Phasen der Metastasierung *in vivo* untersucht werden. Dafür wurden jeweils 5000 der modifizierten L-CI.5s-Zellen in die Schwanzvene von DBA/2-Mäusen inokuliert. Sieben Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Lebern entnommen und mit X-Gal gefärbt. Zur Veranschaulichung wurden Nahaufnahmen der Makrometastasen (Metastasendurchmesser $\geq 0,2\text{mm}$) und der intrahepatischen Streuung der Tumorzellen gemacht (Abb. 9A). Die Makrometastasen, welche näherungsweise die primären Extravasationsereignisse widerspiegeln, wurden auf Unter- und Oberseite des gefärbten Leberlappens ausgezählt. Durch den *knock down* von L1CAM in den Tumorzellen konnte eine Reduktion der Makrometastasenzahl um 53% im Vergleich zur Kontrollzelllinie erreicht werden (Abb. 9B). Die Gesamttumorlast, gemessen mittels quantitativer RT-PCR durch Bestimmung der *lacZ*-Expression im Gewebe, war ebenfalls um 50% reduziert (Abb. 9C).

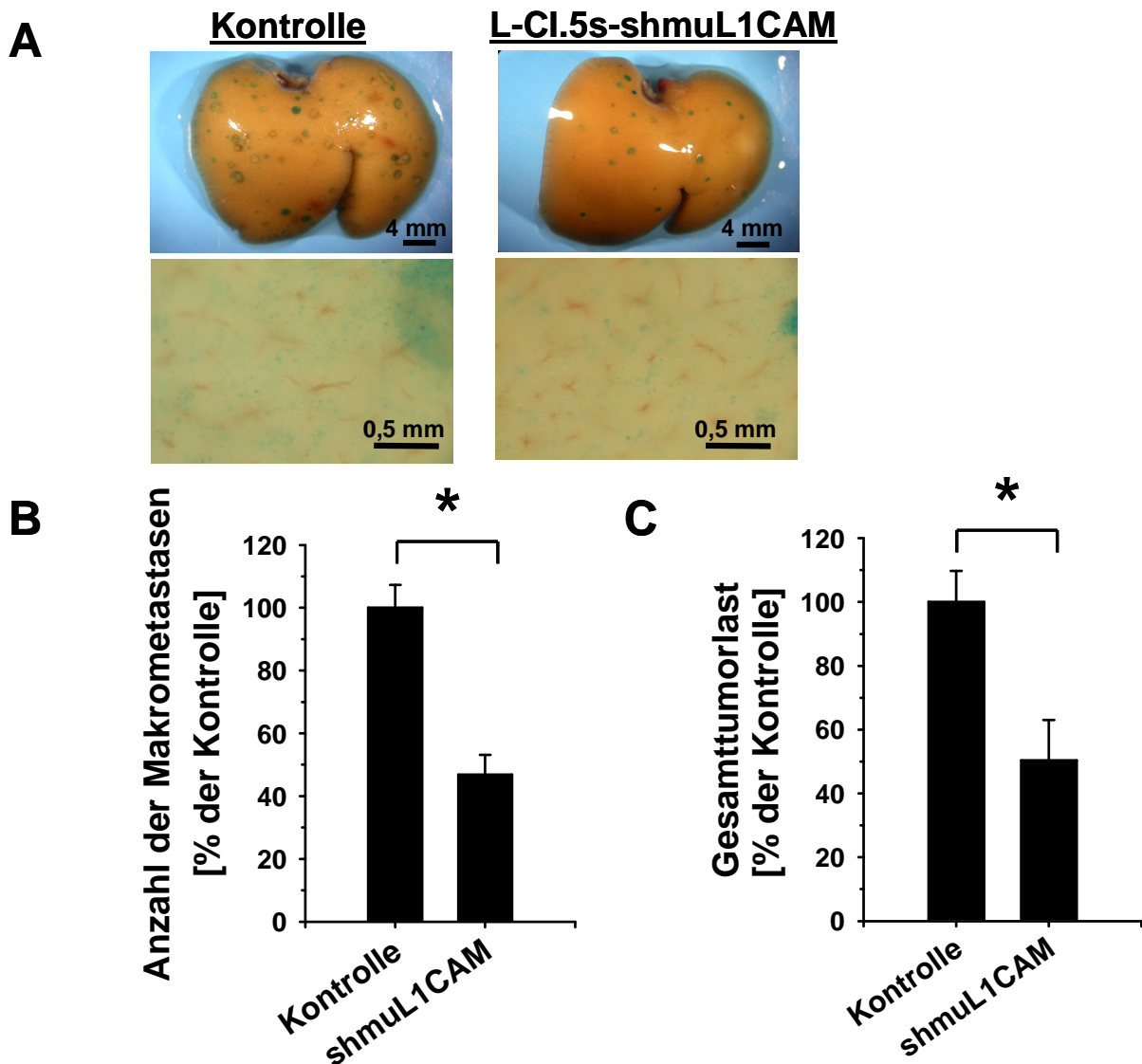


Abb. 9: Auswirkung der L1CAM-Suppression in den L-CI.5s-Zellen auf das metastatische Potential der Tumorzellen. A-C. Es wurden von jeder Zelllinie jeweils 5000 Tumorzellen in die Schwanzvene von DBA/2-Mäusen inokuliert. Die Tiere wurden sieben Tage nach Tumorzellinokulation geopfert und die Organe entnommen. A. Nahaufnahmen des X-Gal gefärbten medialen Leberlappens. Darstellung der Lebern repräsentativer Tiere mit Aufnahmen der Makrometastasen (obere Aufnahmen) und der sekundären Infiltration der Tumorzellen ins Leberparenchym (untere Aufnahmen, Balken oben: 4mm, Balken unten: 0,5mm). B. Das Auszählen der Makrometastasen ($\geq 0,2\text{mm}$) auf Ober- und Unterseite des medialen Leberlappens zeigte eine Reduktion des metastatischen Potentials der Tumorzellen durch den *knock down* von L1CAM ($*p=0,029$, $n=4$, Kontrolle: $100\% \pm 7,243\%$, shmuL1CAM: $46,8\% \pm 12,6\%$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler). C. Die Gesamtumorlast wurde anhand der Expressionslevel des Markergens *lacZ* durch quantitative RT-PCR ermittelt. Die Suppression von L1CAM in den Tumorzellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Tumorlast im Leberparenchym ($*p=0,009$, $n=3$, Kontrolle: $100\% \pm 9,733\%$, shmuL1CAM: $50,379\% \pm 12,654\%$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler).

Der Vergleich der Makrometastasierung mit der Gesamtumorlast lässt eine Aussage über die Mikrometastasierung zu. Durch die Reduktion der Makrometastasenzahl sowie eine noch stärkere Reduktion der Gesamtumorlast, lässt sich schließen, dass

auch die sekundäre Invasion der Tumorzellen in das Leberparenchym durch den *knock down* von L1CAM im Vergleich zur Kontrolle bei optisch unveränderten Metastasengröße verringert werden konnte. Dies wird auch im Vergleich der Nahaufnahmen der Mikrometastasierung von Kontrolle und shmuL1CAM deutlich (Abb. 9A, untere Aufnahmen). Die Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM ist ein wichtiger Faktor zur Regulation des metastatischen Potentials der Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*.

5.1.5 Suppression der Expression von ADAM-10 in L-CI.5s-Zellen

In verschiedenen Studien konnte die Spaltung von L1CAM durch die Metalloproteinase ADAM-10 *in vitro* nachgewiesen werden (Gutwein et al., 2000, Mehtesheimer et al., 2001, Marezky et al., 2005). Um die Rolle des *Sheddings* von L1CAM in den späten Abläufen der Metastasierung untersuchen zu können, mussten zuerst die Effekte der Sheddase selbst auf die Kolonisierung von Organen evaluiert werden. Dazu wurde eine L-CI.5s-Tumorzelllinie hergestellt, deren ADAM-10-Expression durch RNAi-Technologie stabil reduziert wurde. Die Integration der shRNA erfolgte über retroviralen Gentransfer, wodurch ein effizienter *knock down* von ADAM-10 von 89,6% in den L-CI.5s-shmuAD10 im Vergleich zur Kontrollzelllinie L-CI.5s-shscr erreicht werden konnte (Abb. 10A). Das Wachstum der modifizierten Tumorzellen mit stark verminderter Expression von ADAM-10 unterschied sich nicht signifikant zur Kontrolle (Abb. 10B), doch konnten durch die Verwendung eines *Boyden-Chamber-Assays* Beobachtungen im Migrations- und Invasionsverhalten gemacht werden. Das Migrationsverhalten der Tumorzellen wurde durch die Reduktion der Expression von ADAM-10 um 96,9% im Vergleich zur Kontrollzelllinie induziert (Abb. 10C), während sich das Invasionsverhalten nicht signifikant von der Kontrollzelllinie unterschied (Abb. 10D).

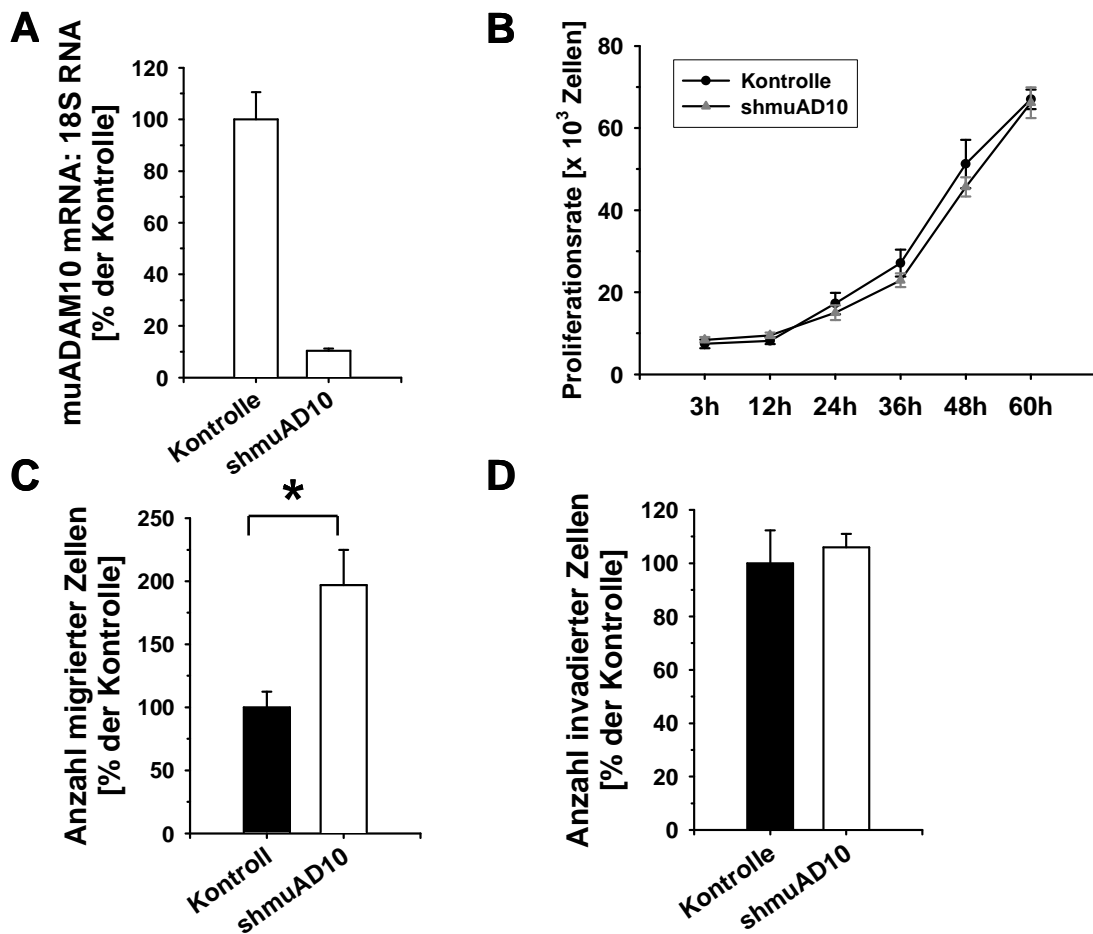


Abb. 10: Charakterisierung der L CI.5s-Zellen mit supprimierter ADAM-10-Expression. A-D. Durch retroviralen Gentransfer wurde in den L-CI.5s-Zellen ein stabiler *knock down* durch RNAi-Technologie erreicht. Als Kontrollzelllinie wurde eine *scrambled*-shRNA verwendet. A. Die effiziente Reduktion der ADAM-10-Expression von 89,6% führte zur Etablierung einer neuen Zelllinie (Kontrolle: 100% \pm 10,427%, shmuAD10:10,427% \pm 0,756%, dargestellt ist der Mittelwert relativ zu 18S rRNA mit Standardfehler). B. Das Proliferationsverhalten wurde durch die Suppression der ADAM-10-Expression in den Tumorzellen nicht beeinflusst und unterschied sich nicht von der Kontrollzelllinie ($n = 5$ pro Zeitpunkt, Kontrolle: 67,0 \pm 2,380, shmuAD10: 68,233 \pm 3,198, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler). C. Das Migrationsverhalten der L-CI.5s-shmuAD10 wurde durch den *knock down* von ADAM-10 im Vergleich zur Kontrollzelllinie signifikant induziert ($*p = 0,035$, Kontrolle: 100% \pm 12,500%, $n = 2$, shmuAD10:196,875% \pm 28,125%, $n = 3$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler). D. Die Reduktion der Expression von ADAM-10 in den L-CI.5s-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Invasivität der Tumorzellen (Kontrolle: 100% \pm 12,329%, $n = 2$, shmuAD10:105,936% \pm 5,085%, $n = 3$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler).

5.1.6 Reduktion der Makrometastasierung, aber Induktion der sekundären Invasion durch *knock down* von ADAM-10 in L-CI.5s-Zellen

Dazu wurde die in 5.1.5 charakterisierte Zelllinie L-CI.5s-shmuAD-10 und deren Kontrolle L-CI.5s-shscr zu jeweils 5000 Zellen in die Schwanzvene von syngen DBA/2 Mäusen inokuliert. Zur Veranschaulichung der Metastasierung der Tumorzellen ins Leberparenchym wurden Nahaufnahmen der Makro- bzw. der Mikrometastasen auf der Leberoberfläche gemacht (Abb. 11A). Zur Analyse der Auswirkungen des *knock down* von ADAM-10 in den Tumorzellen auf die Kolonisierung der Leber wurden die Makrometastasen auf der Unter- und Oberseite des medialen Leberlappens ausgezählt. Dies ergab eine Reduktion der Lebermetastasierung von 39% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 11B). Die Gesamttumorlast im Leberparenchym, gemessen an der *lacZ*-Expression durch TaqMan™-Analyse, war durch den *knock down* von ADAM-10 im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht vermindert (Abb. 11C). Die Anzahl der Makrometastasen in der Leber war reduziert, aber dennoch unterschied sich die Gesamttumorlast nicht von der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis zeigt, dass die intrahepatische Streuung von Tumorzellen durch die Reduktion der ADAM-10 Expression in den L-CI.5s-Zellen induziert wurde.

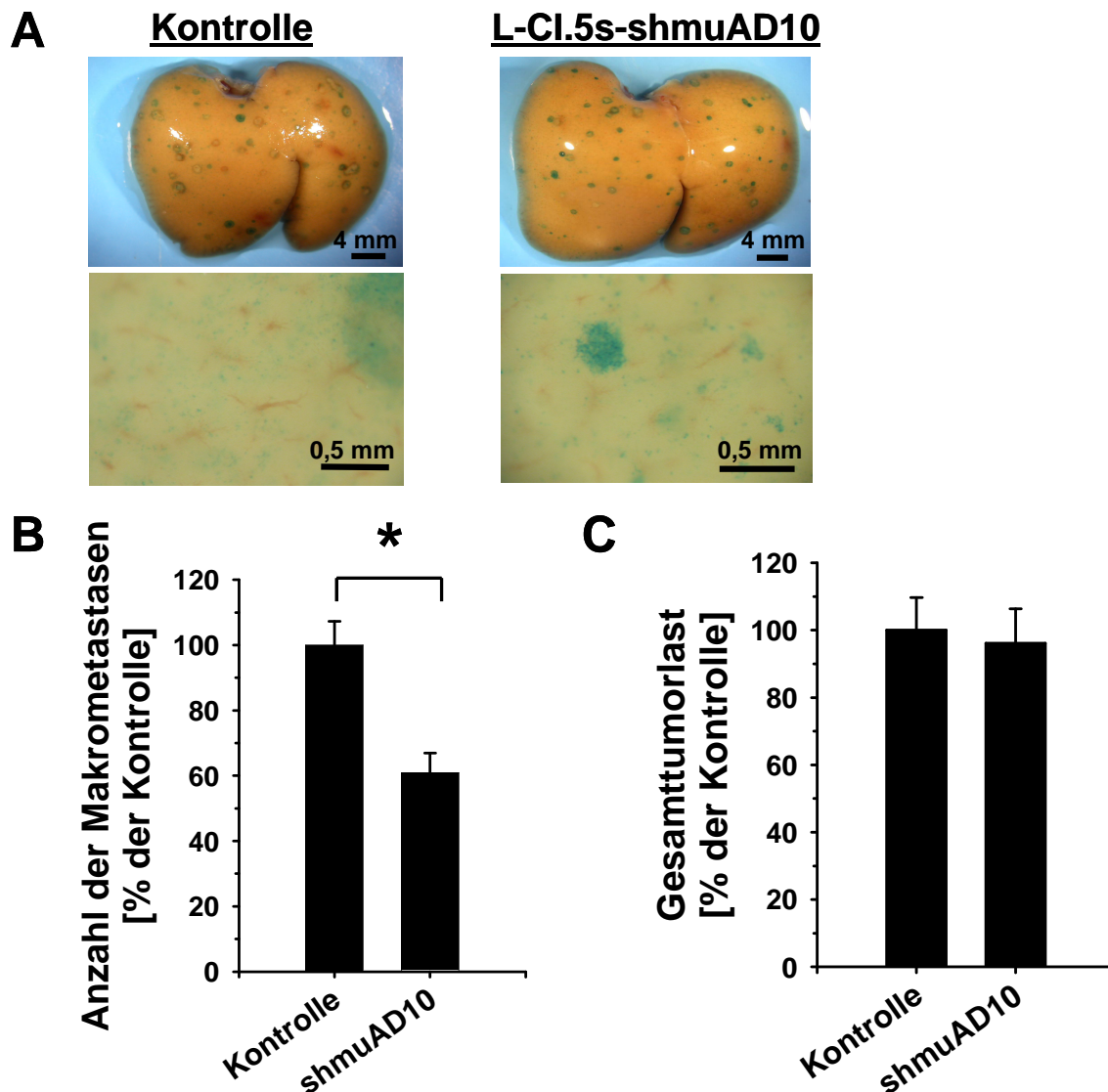


Abb. 11: Effekt des ADAM-10-*knock down* auf das metastatische Potential der L-CI.5s-Zellen. A-C. Zur Untersuchung der experimentellen Metastasierung von L-CI.5s-shmuADAM-10 und L-CI.5s-shscr wurden jeweils 5000 Zellen in die Schwanzvene von syngenem DBA/2-Mäusen inokuliert. Sieben Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Mäuse geopfert und die Organe entnommen und zur darauf folgenden Analyse aufbewahrt. A. Nahaufnahmen des X-Gal-gefärbten medialen Leberlappens. Darstellung der Lebern repräsentativer Tiere mit Aufnahmen der Makrometastasen (obere Aufnahmen) und der intrahepatischen Streuung der Tumorzellen (untere Aufnahmen, Balken oben: 4mm, Balken unten: 0,5mm). B. Durch Anfärbung der Tumorzellen auf dem medialen Leberlappen konnten die Makrometastasen (Durchmesser $\geq 0,2$ mm) auf Ober- und Unterseite ausgezählt werden. Die Suppression der ADAM-10-Expression führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Makrometastasen ($*p = 0,016$, Kontrolle: $100\% \pm 7,243\%$, $n = 5$, shmuAD-10: $60,859\% \pm 6,103\%$, $n = 4$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler). C. Die Isolation der Gesamt-RNA und anschließende Analyse der *lacZ*-Expression im Lebergewebe durch quantitative RT-PCR zur Messung der Gesamtumorlast zeigte keine signifikante Veränderung durch die Reduktion ADAM-10-Expression ($p = 0,751$, $n = 3$, Kontrolle: $100\% \pm 10,267\%$, shmuAD-10: $96,126\% \pm 10,233\%$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler).

5.1.7 Verifizierung der *knock down* Ergebnisse von L1CAM bzw. ADAM10 mit klonalen Tumorzelllinien

Die in 5.1.3 und 5.1.5 hergestellten Tumorzelllinien bilden eine heterogene Zellpopulation auf Grund der verwendeten Selektionsmethode mit Antibiotikaresistenz. Dadurch können bestimmte Effekte auch durch wenige Tumorzellen in dieser Population hervorgerufen oder unterdrückt werden. Um zu bestätigen, dass die Reduktion des metastatischen Potentials der Tumorzellen auf den *knock down* von L1CAM bzw. ADAM-10 zurückzuführen ist, wurden klonale *knock down*-Zelllinien hergestellt. Mit der Methode der *Limiting Dilution* wurden die Tumorzellen der jeweiligen Ausgangszelllinie in einer 96-*well*-Platte vereinzelt und zu einer klonalen Zelllinie herangezogen. Als Kontrollzelllinie wurde die L-CI.5s-shscr mitgeführt. Die Reduktion der Expression von entweder L1CAM oder ADAM-10 in den neu entstandenen Zelllinien wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Aus mehreren klonalen Zelllinien wurden jeweils zwei bis drei verschiedene Klone zur Untersuchung der experimentellen Metastasierung ausgewählt. Die Reduktion der L1CAM-Expression der Klone lag zwischen 78-81% im Vergleich zur L-CI.5s-shscr Kontrolle (Abb. 12A). Die ausgewählten Klone wurden jeweils zu 5000 Zellen in die Schwanzvene von syngen DBA/2-Mäusen inokuliert. Zusätzlich zur *scrambled* Kontrolle (Kontrolle) wurde die parentale L-CI.5s-shmuL1CAM nochmals mitgeführt und führte erneut zu einer signifikanten Reduktion der Makrometastasierung (Abb. 12B). Durch die klonalen Eigenschaften der drei Zelllinien Klon 1, 2 und 3 bezüglich der L1CAM-Expression wurde eine noch stärkere Inhibition der Kolonisierung der Leber im Vergleich zur L-CI.5s-shscr Kontrolle erreicht (Abb. 12B).

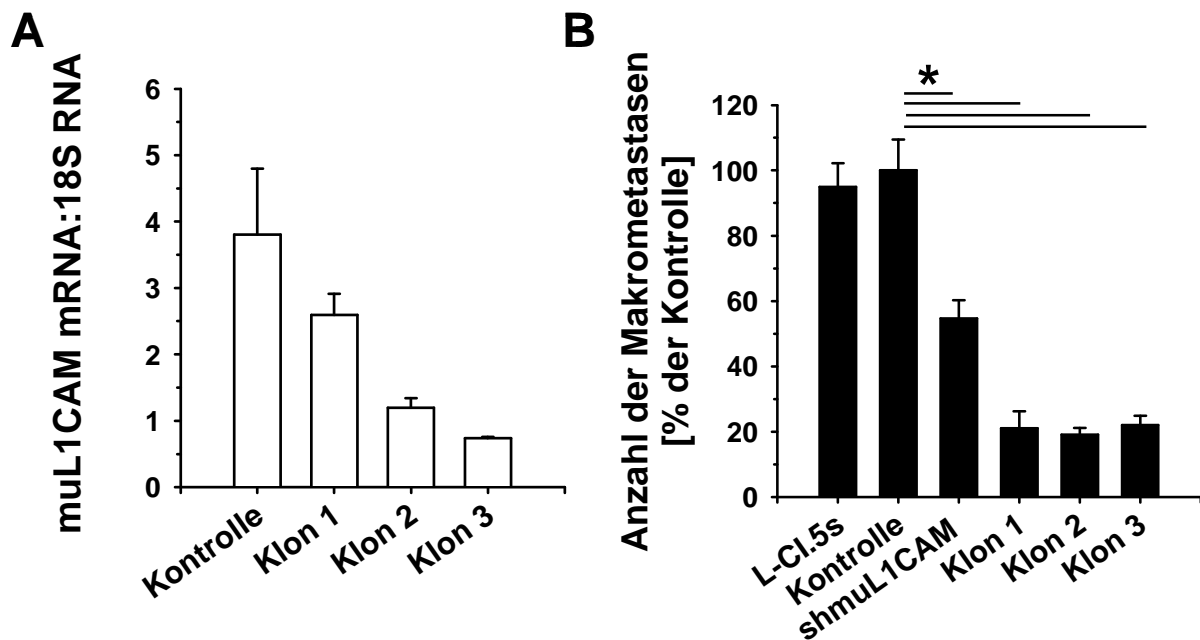


Abb. 12: Effekte klonaler Tumorzelllinien mit *knock down* von L1CAM auf die experimentelle Metastasierung der L-CI.5s-Zellen. A. Durch *Limiting Dilution* wurden verschiedene Klone der parentalen L-CI.5s-shmuL1CAM-Zellen hochgezogen und mit quantitativer RT-PCR analysiert (Kontrolle: $3,804 \pm 0,995$, Klon 1: $2,597 \pm 0,318$, Klon 2: $1,196 \pm 0,146$, Klon 3: $0,738 \pm 0,021$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler). B. Die Zelllinien wurden zu jeweils 5000 Tumorzellen i.v. in die Schwanzvenen von DBA/2-Mäusen inokuliert. Nach sieben Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Makrometastasen auf Ober- und Unterseite des medialen Leberlappens ausgezählt. Alle drei klonalen Zelllinien erzielten eine signifikante Reduktion der Metastasierung im Vergleich zur *scrambled*-Kontrolle ($n=5$, Kontrolle vs. shmuL1CAM: $p=0,016$, Kontrolle vs. Klon 1: $p=0,008$, Kontrolle vs. Klon 2: $p=0,008$, Kontrolle vs. Klon 3: $p=0,008$, Kontrolle: $100\% \pm 9,402\%$, shmuL1CAM: $54,7\% \pm 5,503\%$, Klon 1: $21,1\% \pm 5,108\%$, Klon 2: $19,1\% \pm 2,045\%$, Klon 3: $22,0\% \pm 2,854\%$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler).

Demselben Protokoll folgend, wurden auch aus den parentalen L-CI.5s-shAD-10 verschiedene klonale Zelllinien hergestellt. Die Reduktion der ADAM-10-Expression in den Tumorzellen von zwei ausgewählten Klonen war im Vergleich zu den L-CI.5s-shscr deutlich reduziert (Abb. 13A). Zur Untersuchung der experimentellen Metastasierung wurden die Klone jeweils intravenös in die Schwanzvene von syngen DBA/2-Mäusen inokuliert. Sieben Tage nach Tumorzellinokulation konnte eine reduzierte Kolonisierung der Leber durch die parentalen L-CI.5s-shAD-10, aber auch der klonalen Tumorzelllinien beobachtet werden (Abb. 13B). Die Reduktion der ADAM-10 Expression in den klonalen Zelllinien führte zu einer verminderten Kolonisierung der Leber bei Klon 1 und 2 (Abb. 13A und B).

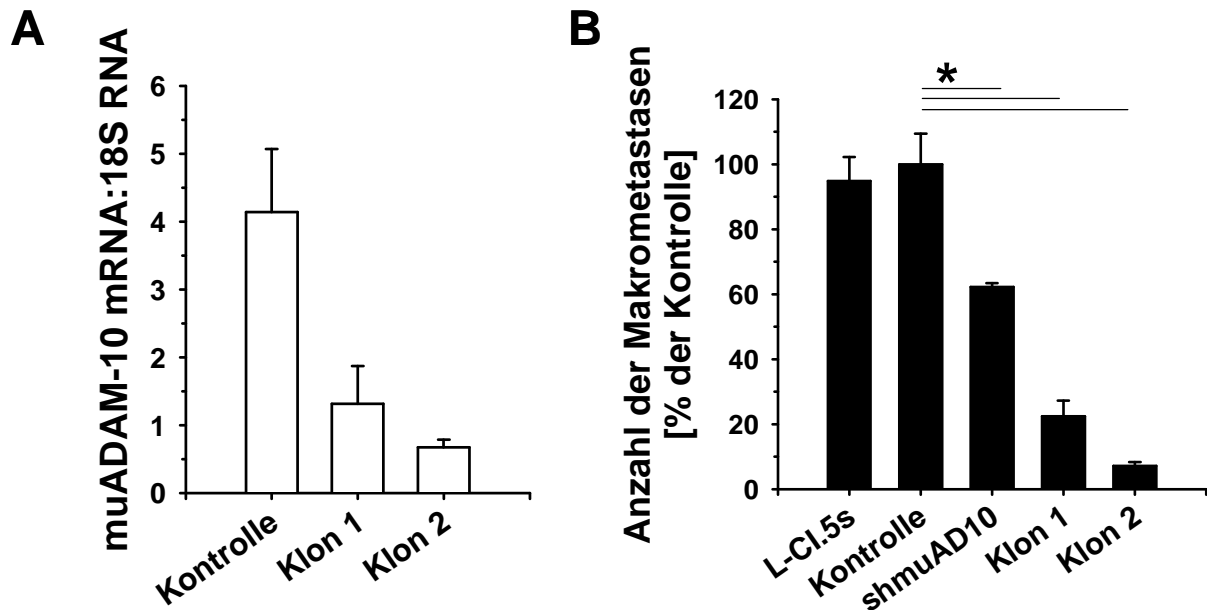


Abb. 13: Untersuchung der experimentellen Metastasierung verschiedener klonaler Tumorzelllinien mit supprimierter ADAM-10-Expression. A. Aus der Ausgangszelllinie L-CI.5s-shmuAD-10 wurden durch *Limiting Dilution* verschiedene Klone hochgezogen und durch quantitative RT-PCR analysiert (Kontrolle: $4,142 \pm 0,929$, Klon 1: $1,317 \pm 0,557$, Klon 2: $0,674 \pm 0,114$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler). B. Die Zelllinien wurden zu jeweils 5000 Tumorzellen i.v. in die Schwanzvenen von DBA/2-Mäusen inokuliert. Nach sieben Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Makrometastasen auf Ober- und Unterseite des medialen Leberlappens ausgezählt. Mit der Ausgangszelllinie sowie Klon 2 und 3 konnte eine signifikante Reduktion der Metastasierung im Vergleich zur *scrambled* Kontrolle erreicht werden ($n = 5$, Kontrolle vs. shmuAD-10: $p = 0,016$, Kontrolle vs. Klon 1: $p = 0,008$, Kontrolle vs. Klon 2: $p = 0,008$, Kontrolle: $100\% \pm 9,402\%$, shmuAD-10: $62,2\% \pm 1,156\%$, Klon 1: $22,4\% \pm 4,764\%$, Klon 2: $7,1\% \pm 1,176\%$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler).

5.1.8 Induktion der Metastasierung durch Überexpression von murinem L1CAM in L-CI.5s-Zellen

Eine Reduktion der L1CAM-Expression in den Tumorzellen führte zu einer Verringerung des metastatischen Potentials der L-CI.5s-Zellen. Deshalb galt es zu prüfen, ob die Überexpression von L1CAM das metastatische Potential von L-CI.5s-Zellen induziert. Hierzu wurden L-CI.5s-muL1CAM-Zellen hergestellt, welche murines L1CAM überexprimieren (siehe 4.2.10).

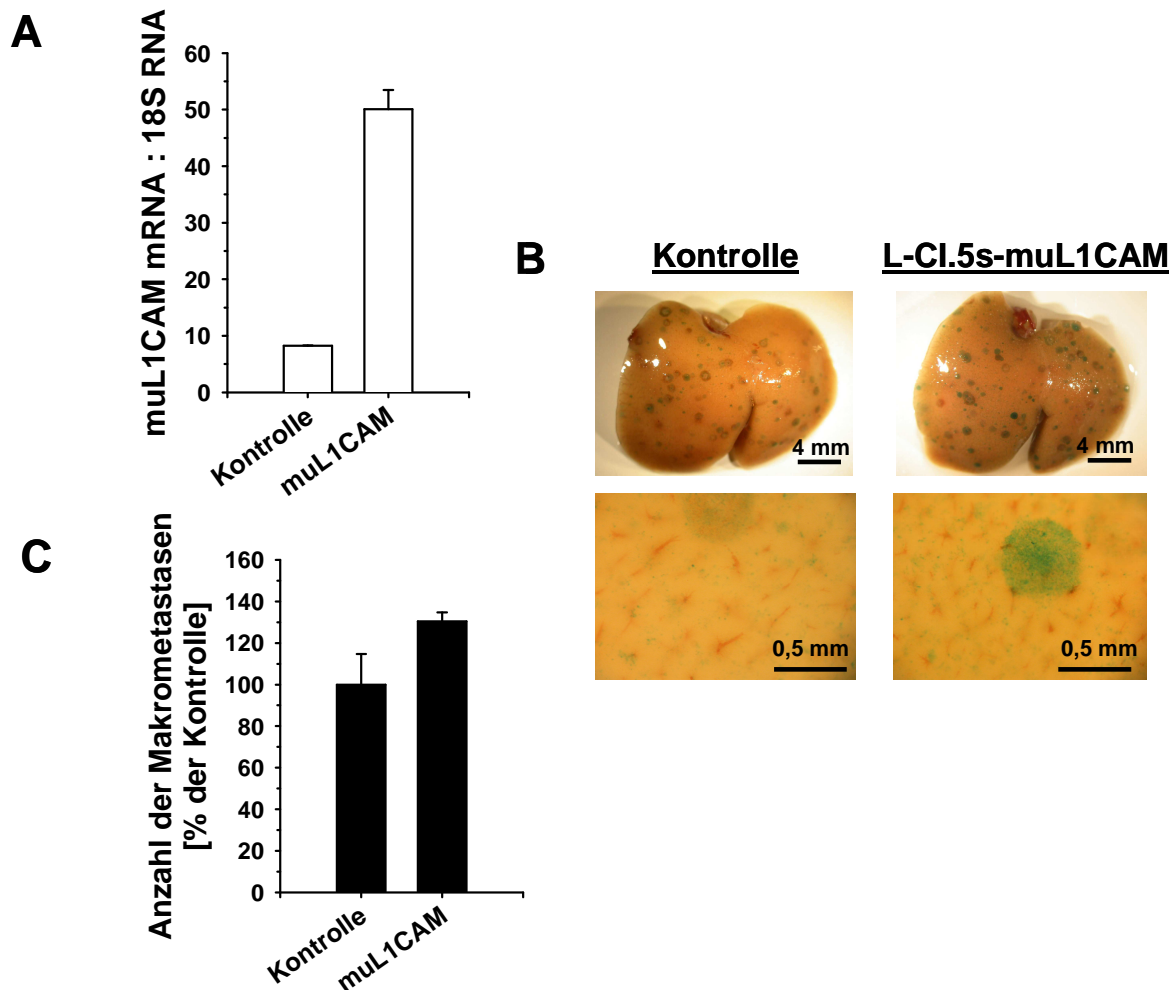


Abb. 14: Effekte der Überexpression von murinem L1CAM in L-CI.5s-Zellen auf deren metastatisches Potential. A. Durch retroviralen Gentransfer wurden die L-CI.5s-Zellen mit der cDNA von murinem L1CAM transduziert. Die Analyse mit quantitativer RT-PCR ergab eine starke Überexpression von murinem L1CAM in den Tumorzellen (Kontrolle: $8,273 \pm 0,008$, muL1CAM: $50,101 \pm 3,345$, dargestellt ist der Mittelwert relativ zur 18S rRNA mit Standardfehler). B und C. Es wurden von L-CI.5s-muL1CAM und der Kontrollzellen jeweils 5000 Tumorzellen i.v. in die Schwanzvene von DBA/2-Mäusen inokuliert. Die Tiere wurden sieben Tage nach Tumorzellinokulation geopfert und die Organe entnommen. B. Nahaufnahmen des X-Gal gefärbten medialen Leberlappens repräsentativer Tiere mit Aufnahmen der Makrometastasen (obere Aufnahmen) und der intrahepatischen Streuung der Tumorzellen (untere Aufnahmen, Balken oben: 4mm, Balken unten: 0,5mm). C. Das Auszählen der Makrometastasen ($\geq 0,2\text{mm}$) auf Ober- und Unterseite des medialen Leberlappens zeigte eine deutliche Induktion des metastatischen Potentials der Tumorzellen durch die Überexpression von L1CAM ($n = 4$, Kontrolle: $100\% \pm 14,769\%$, muL1CAM: $130,4\% \pm 4,358\%$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler).

Durch retrovirale Gentransfer konnte eine deutliche Induktion der L1CAM-Expression in den L-CI.5s-Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie erreicht werden (Abb. 14A). Zur Untersuchung der experimentellen Metastasierung wurden 5000 Zellen in die Schwanzvene von DBA/2-Mäusen inokuliert. Sieben Tage später wurden die Mäuse geopfert und die Lebern mit X-Gal gefärbt, um die Metastasierung zu analysieren. In

Abb. 14B sind Nahaufnahmen der Makrometastasen und der sekundären Infiltration der Tumorzellen auf den X-Gal gefärbten Leberoberflächen zu sehen. Durch die Überexpression von L1CAM in den Tumorzellen konnte die Kolonisierung der Leber um 30,4% induziert werden (Abb. 14C). Dieses Ergebnis zeigt, dass nicht nur eine Reduktion der L1CAM-Expression Einfluss auf die Metastasierung hat, sondern dass durch die verstärkte Expression von L1CAM das metastatische Potential der Tumorzellen induziert werden konnte.

5.2 Untersuchungen der Rolle von humanen L1CAM-Isoformen in den späten Phasen der Metastasierung

Das humane L1CAM-Gen wird gewebespezifisch als neuronale, 28 Exon-umfassende Isoform (FL-L1CAM) sowie als Spleiß-Variante (SV-L1CAM) mit einer Deletion von Exon 2 und Exon 27, welche hauptsächlich in Tumorzellen detektiert wird, exprimiert (Euer et al., 2005, Shtutman et al., 2006). Eine Differenzierung zwischen der Wirkungsweise beider Isoformen in der Tumorprogression ist noch nicht publiziert worden. In dieser Arbeit sollten die Effekte von FL-L1CAM und SV-L1CAM in den späten Abläufen der Metastasierung, d.h. der Kolonisierung von Tumorzellen in Organe, molekularbiologisch untersucht werden.

5.2.1 Untersuchungen zur Expression der L1CAM-Varianten in humanen Patientenproben

Die Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM korreliert mit der Tumorprogression verschiedener Krebserkrankungen und wurde für Ovarial- und Kolorektalkarzinome als prognostischer Marker vorgeschlagen (Fogel et al., 2003, Boo et al., 2007). Trotz der Bedeutung von L1CAM in der Tumorprogression sind noch keine Unterschiede im Expressionsverhältnis der vollständigen L1CAM-Variante (FL-L1CAM) und der Spleiß-Variante (SV-L1CAM) im Tumorgewebe von Krebspatienten untersucht worden. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde die Expression beider L1CAM-Varianten mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. Zur Identifikation des vollständigen L1CAM wurde die *Probe* über den Exon-Exon Übergang 26/27 gelegt, während die Spleiß-Variante durch die Bindung der *Probe* an den Exon-Exon Übergang 26/28 erkannt wurde (Abb. 15A). Dafür wurde die *Primer*- und *Probe*-Sequenz (Nukleotidsequenz mit Quencher- und Reporterkonstrukt) eigens

konstruiert. Eine Unterscheidung der L1CAM-Isoformen auf Proteinebene war auf Grund des Fehlens eines Isoform-spezifischen Antikörpers nicht möglich. Die Untersuchungen der Expressionsverhältnisse beider L1CAM-Varianten wurden in Patientenproben von Ovarialkarzinomen verschiedener klinischer Stadien (FIGO-Klassifikation I-IV, *Fédération Internationale de Gynécologie et d' Obstétrique*) durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass- wie schon in früheren Studien gezeigt- die Expression von Gesamt-L1CAM mit der Tumorprogression ansteigt (Fogel et al., 2003, Daponte et al., 2008), aber auch, dass die Expression beider Varianten, FL-L1CAM und SV-L1CAM, mit dem Fortschreiten des Ovarialkarzinoms korrelierte (Abb. 15B). Im Vergleich zu benignen Tumoren konnten bei metastasierenden Tumoren von FIGO III/IV ein deutlicher Anstieg von FL-L1CAM und der Spleiß-Variante festgestellt werden. Die Tatsache, dass die Spleiß-Variante im Vergleich zu FL-L1CAM überwiegend in etablierten Tumorzellen exprimiert wird (Shtutman et al., 2006), spiegelte sich auch an den Expressionswerten beider Varianten in den verschiedenen Stadien der Primärtumore wider. Die Expression der Spleiß-Variante war im Vergleich zur vollständigen L1CAM-Variante sowohl in FIGO I, als auch in den bereits metastasierenden Stadien FIGO III/IV deutlich erhöht (Abb. 15B).

Ab dem Stadium FIGO III kommt es zu einer Ausdehnung des Tumors ins *Omentum majus*, weshalb die Expressionslevel beider Varianten in solchen Netzmetastasen untersucht wurden. Dabei konnte festgestellt werden, dass nicht nur das Tumor-assoziierte SV-L1CAM nachweisbar war, sondern dass auch FL-L1CAM im Metastasengewebe detektiert werden konnte (Abb. 15C).

Da L1CAM auch als prognostischer Marker im Kolorektalkarzinom vorgeschlagen wird (Boo et al., 2007), wurde die Expression beider Varianten in Lebermetastasen eines Kolorektalkarzinoms analysiert. Im Metastasengewebe konnte eine Expression von SV-L1CAM gemessen werden, aber auch FL-L1CAM wurde in den Lebermetastasen exprimiert (Abb. 15D). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass sowohl die Spleiß-Variante, aber auch FL-L1CAM im malignen Gewebe exprimiert wurden.

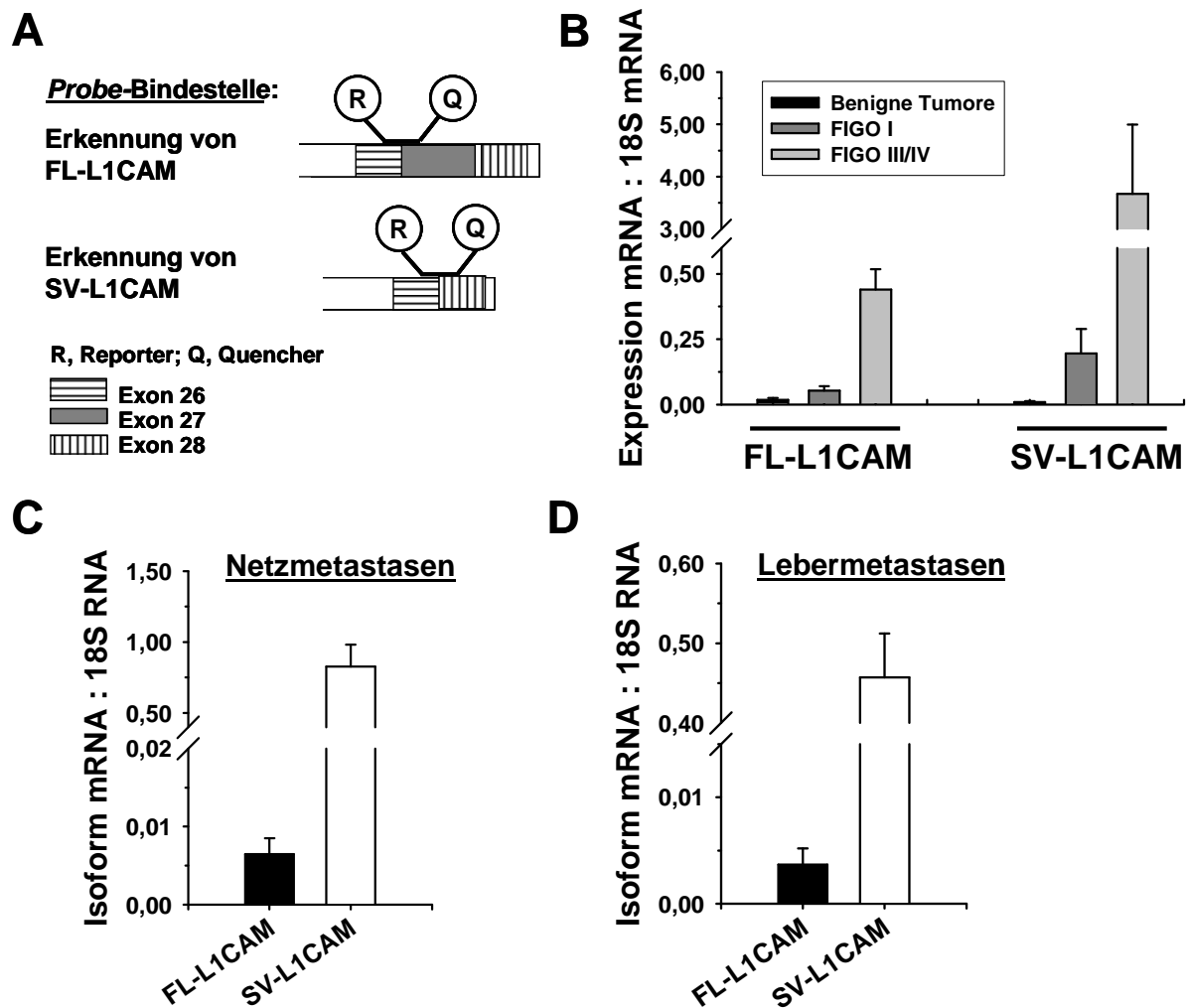


Abb. 15: Expression von vollständigem humanem L1CAM (FL-L1CAM) und der Spleiß-Variante (SV-L1CAM) in Patientenproben von Ovarialkarzinomen, Netzmetastasen und Lebermetastasen. A. Die Expression beider L1CAM-Isoformen wurde mittels quantitativer RT-PCR mit spezifischen *Primer-* und *Probe-*Sequenzen unterschieden. Eine *Probe* detektiert Exon 27 und damit die vollständige Variante von L1CAM. Die eigens konstruierte zweite *Probe* bindet an den Exon 26/27-Übergang und kann damit die Spleiß-Variante erkennen. B. Die Expression von FL-L1CAM sowie von SV-L1CAM stieg mit der Progression der Ovarialkarzinome an (FL-L1CAM: Benigne Tumore: $0,0174 \pm 0,0075$, FIGO I: $0,0534 \pm 0,016$, FIGO III/IV: $0,440 \pm 0,078$, SV-L1CAM: Benigne Tumore: $0,009 \pm 0,0046$, FIGO I: $0,195 \pm 0,094$, FIGO III/IV: $3,674 \pm 1,320$, dargestellt ist der Mittelwert relativ zur 18S rRNA mit Standardfehler). C und D. Sowohl die Spleiß-Variante, als auch die vollständige Isoform von L1CAM wurden in Netzmetastasen (*Omentum majus*) von Ovarialkarzinomen und in Lebermetastasen von Kolorektalkarzinomen exprimiert (Netzmetastasen: FL-L1CAM: $0,0065 \pm 0,002$, SV-L1CAM: $0,828 \pm 0,155$, Lebermetastasen: FL-L1CAM: $0,0037 \pm 0,0015$, SV-L1CAM: $0,457 \pm 0,055$, dargestellt ist der Mittelwert relativ zur 18S rRNA mit Standardfehler).

5.2.2 Verstärkte Expression von SV-L1CAM im Vergleich zu FL-L1CAM in etablierten Ovarial- und Kolonkarzinomzellen

Um festzustellen, in welchem Verhältnis FL-L1CAM und die Spleiß-Variante in etablierten Tumorzellen exprimiert werden, wurden die Expressionswerte beider Isoformen von L1CAM in humanen Ovarial- und Kolonkarzinomzellen untersucht. In den Ovarialkarzinomzellen SKOV3ip und OVMz konnte eine vorwiegende Expression von SV-L1CAM im Vergleich zu FL-L1CAM identifiziert werden (Abb. 16A und B). In der etablierten Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 wurde ebenfalls hauptsächlich die Spleiß-Variante von L1CAM exprimiert, während FL-L1CAM in geringen Mengen detektiert werden konnte (Abb. 16C). In allen drei untersuchten Tumorzellen wurden also beide Varianten von L1CAM exprimiert, weshalb keine Rückschlüsse auf die Rolle der jeweiligen Isoform geschlossen werden kann.

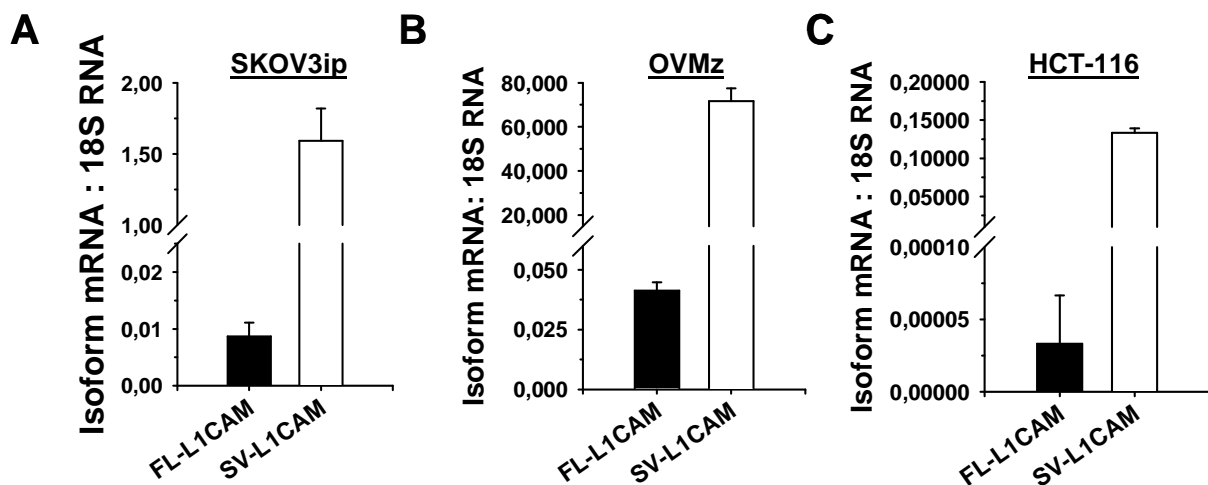


Abb. 16: Untersuchung der Expression von FL-L1CAM und SV-L1CAM in humanen Ovarial- und Kolonkarzinomzellen. A-C. Expression der Spleiß-Variante sowie von FL-L1CAM in den Tumorzellen, ermittelt durch quantitative RT-PCR (SKOV3ip: FL-L1CAM: 0,087 ± 0,002, SV-L1CAM: 1,593 ± 0,227, OVMz: FL-L1CAM: 0,0041 ± 0,0036, SV-L1CAM: 71,574 ± 5,891, HCT-116: FL-L1CAM: 0,00003 ± 0,00003, SV-L1CAM: 0,133 ± 0,006, dargestellt ist der Mittelwert relativ zur 18S rRNA mit Standardfehler).

5.2.3 Überexpression von FL-L1CAM in Ovarialkarzinomzellen (SKOV3ip)

Zur Untersuchung möglicher Effekte von FL-L1CAM und SV-L1CAM in den späten Phasen der Metastasierung wurde die cDNA des humanen vollständigen L1CAM in einen retroviralen Vektor kloniert (siehe Abb. 5). Durch retroviralen Gentransfer konnte eine stabile Expression des vollständigen L1CAM in den SKOV3ip-Zellen

erzielt werden. SV-L1CAM-überexprimierende SKOV3ip wurden in unserer Arbeitsgruppe zu einem früheren Zeitpunkt hergestellt und charakterisiert, aber für die molekularen Analysen zusätzlich mitgeführt. Als Kontrolle dienten nur mit dem Ausgangsplasmid pQCXIP transduzierte SKOV3ip-Zellen.

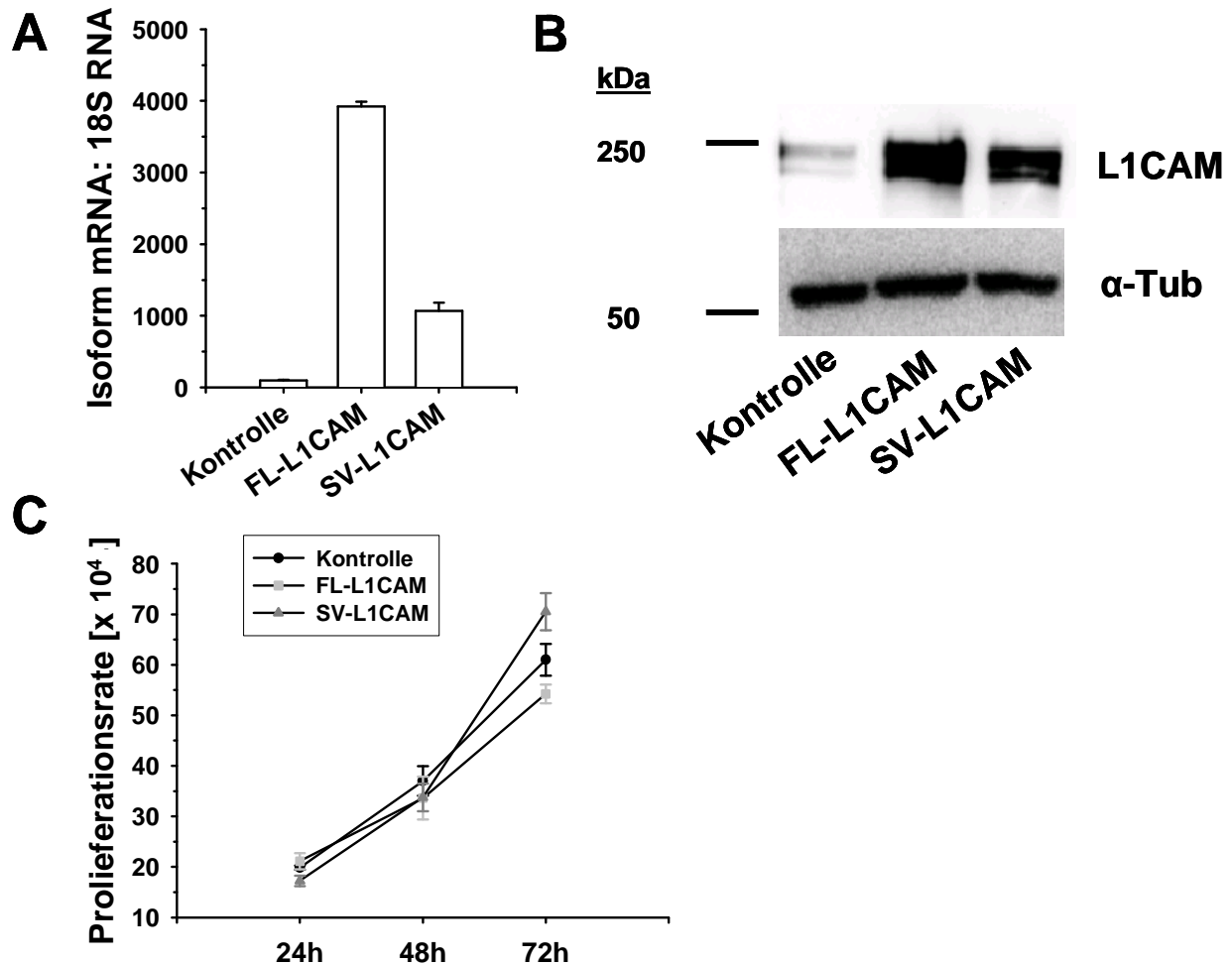


Abb. 17: Charakterisierung von SKOV3ip-Zellen mit Überexpression von FL-L1CAM bzw. SV-L1CAM. A. Durch retrovirale Transduktion konnte in SKOV3ip erfolgreich die vollständige Isoform von L1CAM im Vergleich zur Kontrollzelllinie überexprimiert werden. Dies konnte sowohl auf mRNA-Ebene mit quantitativer RT-PCR (A, Kontrolle: 100% ± 3,943%, FL-L1CAM: 3924,306% ± 66,122%, SV-L1CAM: 1066,324% ± 114,474%, dargestellt ist der Mittelwert relativ zur 18S rRNA mit Standardfehler), als auch auf Proteinebene durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden (Ladungskontrolle: α-Tubulin (α-Tub)) (B). Die Banden repräsentieren Gesamt-L1CAM, da kein spezifischer Antikörper gegen FL-L1CAM bzw. SV-L1CAM bekannt ist. C. Das Proliferationsverhalten der SKOV3ip-Zelllinien war durch die Überexpression von entweder FL-L1CAM bzw. SV-L1CAM nach 72h kaum beeinflusst ($n = 6$ pro Zeitpunkt, für den 72h-Wert: Kontrolle vs. FL-L1CAM: $p = 0,132$, Kontrolle vs. SV-L1CAM: $p = 0,093$, Kontrolle: $61,0 \pm 3,132$, FL-L1CAM: $54,25 \pm 1,854$, SV-L1CAM: $70,50 \pm 3,69$, pro Zeitpunkt ist der Mittelwert der Zellzahl mit Standardfehler dargestellt).

Nachgewiesen wurde die Überexpression von FL- bzw. SV-L1CAM durch quantitative RT-PCR auf mRNA-Ebene und durch Western-Blot-Analyse auf Protein-Ebene. Beide Varianten wurden sowohl auf RNA-, als auch auf Protein-Ebene in den SKOV3ip überexprimiert (Abb. 17A und B). Um auszuschließen, dass das metastatische Potential evtl. durch ein verändertes Proliferationsverhalten beeinflusst werden könnte, wurde ein Proliferationsassay mit den modifizierten SKOV3ip-Zelllinien durchgeführt. Es konnte nach 72h kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen SKOV3ip-Zelllinien, die entweder FL-L1CAM oder die SV-L1CAM überexprimieren, im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 17C).

5.2.4 Überexpression des vollständigen L1CAM und nicht der Spleiß-Variante fördert die Lungenmetastasierung von Ovarialkarzinomzellen

Die Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM hat einen protumorigenen Einfluss auf die Progression von Ovarialkarzinomen (Fogel *et al.*, 2003, Daponte *et al.*, 2008). Zudem konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass L1CAM einen Einfluss auf die Tumorprogression von Ovarialkarzinomzellen hat (Gutwein *et al.*, 2005, Stöck *et al.*, 2006), allerdings ohne dabei auf die beiden Varianten von L1CAM bzw. auf deren Effekt auf das metastatische Potential der Tumorzellen einzugehen.

In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich in einem murinen T-Zelllymphommodell mit L-CI.5s-Zellen und in einem humanen Fibrosarkommodell mit HT1080/*acZ*-K15-Zellen gezeigt werden, dass FL-L1CAM im Gegensatz zu SV-L1CAM das metastatische Potential der Zellen induziert (Daten von Laura Bickel). Da keine klinische Relevanz für die Expression von L1CAM in T-Zelllymphomen oder Fibrosarkomen bekannt ist, sollten in dieser Studie die Ergebnisse in einem Ovarialkarzinommodell bestätigt werden und die Rolle von FL-L1CAM und SV-L1CAM in den späten Phasen der Metastasierung untersucht werden.

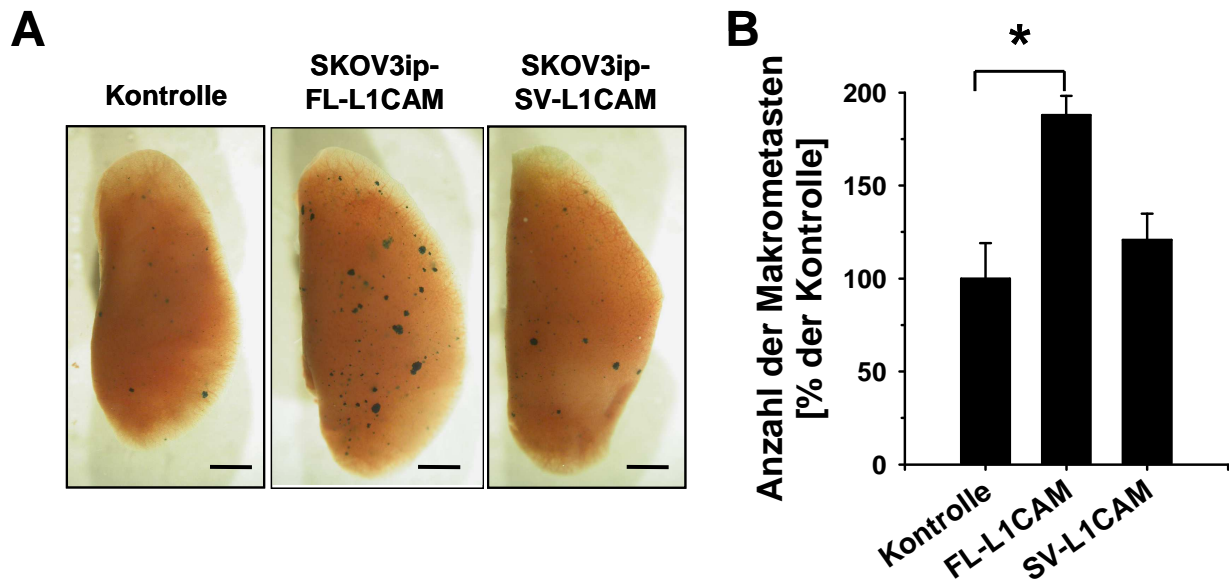


Abb. 18: FL-L1CAM induziert das metastatische Potential von humanen Ovarialkarzinomzellen (SKOV3ip). A und B. Es wurden jeweils 1×10^5 Tumorzellen intravenös in die Schwanzvene von *CD1nu/nu*-Mäusen inokuliert. Die Tiere wurden 26 Tage nach Tumorzellinokulation geopfert und die Lunge entnommen und mit X-Gal gefärbt. A. Nahaufnahmen des linken Lungenflügels von repräsentativen Tieren einer Gruppe (Balken: 2mm). B. Die angefärbten Metastasen wurden auf Ober- und Unterseite mit Hilfe eines Stereomikroskops ausgezählt. FL-L1CAM und nicht SV-L1CAM induzierte das metastatische Potential der Tumorzellen (* $p = 0,007$, $n = 4$, Kontrolle: $100\% \pm 19,062\%$, FL-L1CAM: $187,828\% \pm 10,331\%$, SV-L1CAM: $120,644\% \pm 14,180\%$, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler).

Der Effekt beider L1CAM-Isoformen wurde in einem experimentellen *Xenograft*-Modell mit humanen Ovarialkarzinomzellen SKOV3ip untersucht. SKOV3ip-Zellen sind mit dem Markergen *lacZ* stabil transduziert, um eine einfache und effektive Detektion der Tumorzellen und somit der Metastasen durch die Umsetzung von X-Gal in einen Indigofarbstoff zu gewährleisten. Die modifizierten SKOV3ip-Zellen, die entweder das vollständige L1CAM, die Spleiß-Variante oder als Kontrolle den Leervektor überexprimieren, wurden in die Schwanzvene von *CD1nu/nu*-Mäusen inokuliert. Nach 26 Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Lungenflügel für entsprechende biochemische und molekularbiologische Analysen entnommen. Die Auszählung des linken Lungenflügels nach X-Gal-Färbung ergab eine 88%ige Induktion der Lungenkolonisierung durch SKOV3ip-FL-L1CAM im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 18A und B). Eine Überexpression der Spleiß-Variante in den Ovarialkarzinomzellen zeigte keine prometastatischen Auswirkungen (Abb. 18A und B). Dieses Ergebnis impliziert, dass FL-L1CAM und nicht die Spleiß-Variante die metastasierungsfördernde Isoform von L1CAM ist.

5.2.5 Veränderung des Genexpressionsprofils in SKOV3ip durch Überexpression von FL-L1CAM

Die Überexpression von FL-L1CAM in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip erhöhte das metastatische Potential der Tumorzelllinie und somit die Anzahl an Lungenmetastasen. Um zu klären, welcher Mechanismus für die prometastatischen Effekte von L1CAM verantwortlich sein könnte, wurden die Veränderungen im Expressionsprofil von Genen untersucht, welche die Progression von Ovarialkarzinomen fördern.

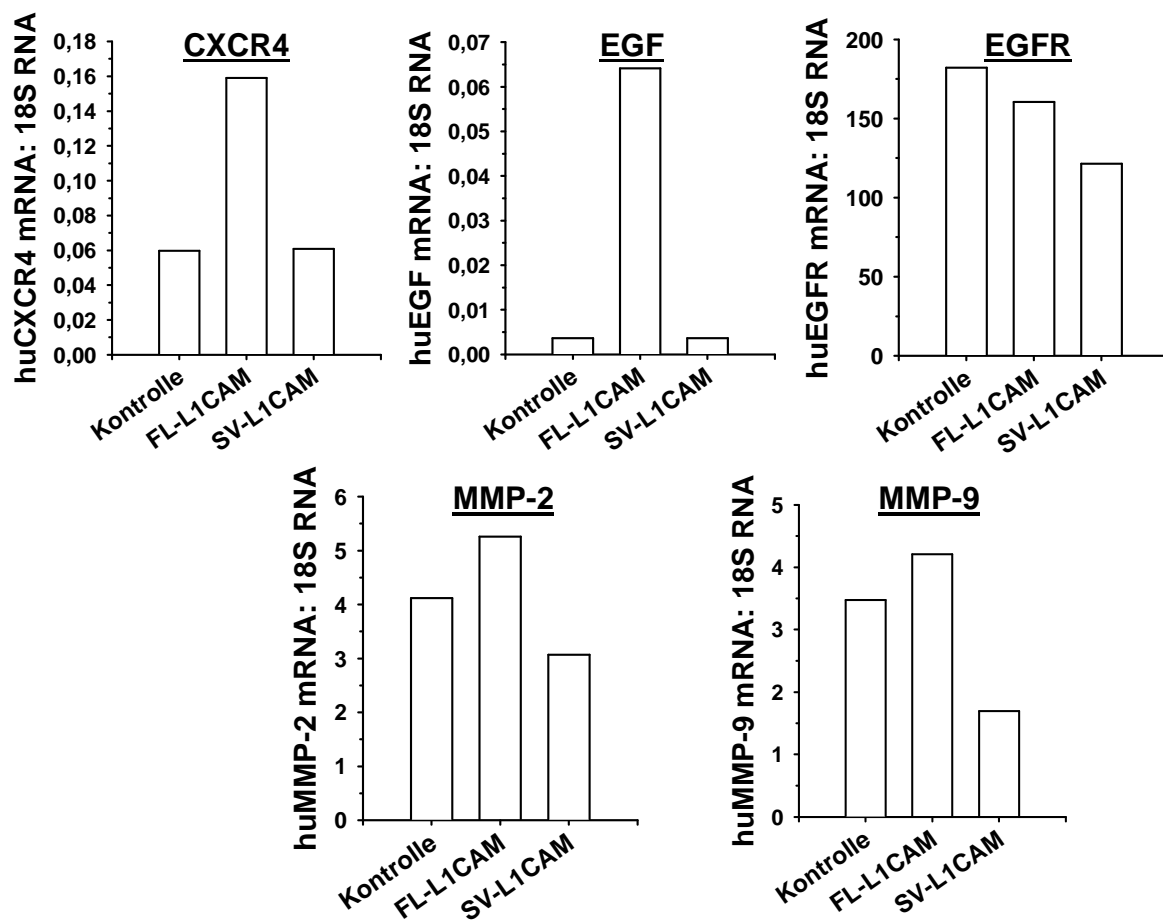


Abb. 19: FL-L1CAM induzierte die Expression von invasionsfördernden Genen in SKOV3ip-Zellen *in vitro*. Die Überexpression von FL-L1CAM in SKOV3ip führte zu einem Anstieg von tumorfördernden Genen des Ovarialkarzinoms auf mRNA-Ebene im Vergleich zur Kontrolle. SKOV3ip-SV-L1CAM zeigte keine Induktion der Genexpression der verschiedenen Moleküle (CXCR4: Kontrolle: 0,060, FL-L1CAM: 0,159, SV-L1CAM: 0,061, EGF: Kontrolle: 0,004, FL-L1CAM: 0,064, SV-L1CAM: 0,004, EGF-R: Kontrolle: 182,128, FL-L1CAM: 160,469, SV-L1CAM: 121,473, MMP-2: Kontrolle: 4,116, FL-L1CAM: 5,257, SV-L1CAM: 3,067, MMP-9: Kontrolle: 3,472, FL-L1CAM: 4,208, SV-L1CAM: 1,693, dargestellt ist der Mittelwert relativ zur 18S rRNA).

Dabei stellte sich heraus, dass die Expression von vier metastasierungsfördernden Genen durch die Überexpression von FL-L1CAM, aber nicht durch SV-L1CAM, im Vergleich zur Kontrolle beeinflusst wurde. Der Zytokinrezeptor CXCR4 und der *Epidermal Growth Factor* (EGF) wurden durch die Expression von FL-L1CAM, aber nicht durch die von SV-L1CAM in den Tumorzellen induziert (Abb. 19). Die Expression des EGF-Rezeptors war in SKOV3ip-FL-L1CAM tendenziell reduziert, allerdings führte die Überexpression von SV-L1CAM in den SKOV3ip im Vergleich zu FL-L1CAM und der Kontrolle zu einer deutlich geringeren Expression des Rezeptors (Abb. 19). Die Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und -9 waren beide durch die verstärkte Expression des vollständigen L1CAM in den SKOV3ip auf mRNA-Level induziert, während die Überexpression von SV-L1CAM in den Ovarialkarzinomzellen sogar zu einer Reduktion beider Gelatinasen führte (Abb. 19).

5.2.6 Verstärkte MMP-2-Aktivität in SKOV3ip-FL-L1CAM *in vitro*

Die Gelatinasen MMP-2 und -9 stellen wichtige Proteasen in der Degradation der EZM dar (Coussens et al., 2002, Björklund et al., 2004) und waren beide durch die Überexpression von FL-L1CAM auf mRNA-Ebene induziert. Durch spezifische Aktivitätsassays sollte die Aktivität beider Proteasen in den modifizierten SKOV3ip-Zellen analysiert werden. Dazu wurden die Zellen 24h nach Aussaat in FCS-freiem Medium für weitere 48h inkubiert. Der Überstand wurde am Ende der Inkubationszeit für die MMP-Aktivitätsanalyse abgenommen. Durch die Bindung von MMP-2 bzw. MMP-9 an die Antikörper-beschichtete 96-*well*-Platte und die Zugabe des von aktiven MMP-2 bzw. -9 umzusetzenden chromogenen Substrats konnte die Aktivität von jeweils MMP-2 oder -9 im Überstand bestimmt werden. Durch die Überexpression von FL-L1CAM in den Ovarialkarzinomzellen konnte signifikant mehr aktives MMP-2 im Überstand detektiert werden, als im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 20A). Dagegen wurde die Aktivität von MMP-9 durch FL-L1CAM nicht induziert. Die Überexpression von SV-L1CAM in den SKOV3ip führte hingegen nicht zu einer Induktion der MMP-2-Aktivität und sogar zu einer Reduktion der MMP-9-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 20B), so dass das Ergebnis der mRNA-Werte bestätigt wurde (vgl. Abb. 19). *In vitro* konnte somit die gelatinolytische Aktivität in den Tumorzellen durch die Überexpression von FL-L1CAM in den SKOV3ip induziert werden, welche für das verstärkte metastatische Potential der SKOV3ip-FL-L1CAM *in vivo* verantwortlich sein könnte.

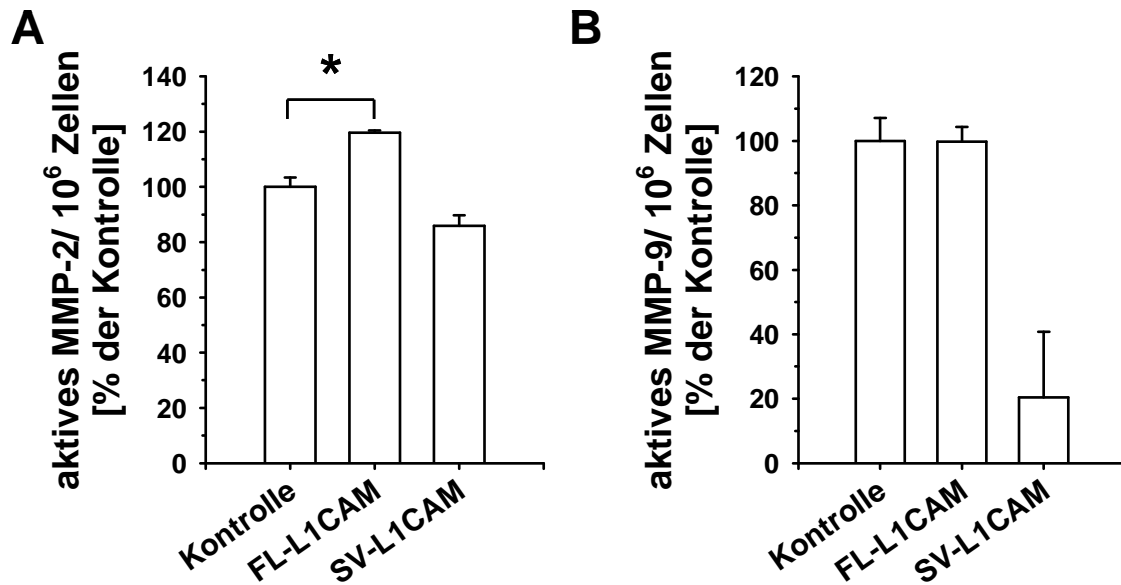


Abb. 20: Induktion der gelatinolytischen Aktivität durch FL-L1CAM in SKOV3ip-Zellen *in vitro*. A. Die Überexpression von FL-L1CAM in SKOV3ip führte zu einer signifikanten Induktion der Aktivität von MMP-2 (* $p = 0,005$, $n = 3$, n durchgeführt in Duplikaten, Kontrolle: $100\% \pm 3,443\%$, FL-L1CAM: $119,693\% \pm 0,777\%$, SV-L1CAM: $85,913\% \pm 3,841$, dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler). B. Die Aktivität von MMP-9 wurde durch FL-L1CAM nicht beeinflusst. Die Überexpression von SV-L1CAM in SKOV3ip führte zu einer Reduktion der MMP-9 Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ($n = 3$, n durchgeführt in Duplikaten, Kontrolle: $100\% \pm 7,160\%$, FL-L1CAM: $99,796\% \pm 4,545\%$, SV-L1CAM: $20,387\% \pm 20,387$, dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler).

5.2.7 Induktion gelatinolytischer Aktivität in Lungenmetastasen durch FL-L1CAM-Expression

Die gelatinolytische Aktivität von MMP-2 in FL-L1CAM-überexprimierenden SKOV3ip-Zellen war signifikant induziert. Um festzustellen, ob auch *in vivo* in den Lungenmetastasen verstärkte gelatinolytische Aktivität nachgewiesen werden kann, wurde eine *In-situ*-Zymographie durchgeführt. Auf Kryoschnitten von metastasentragenden Lungen sollte durch gelatinolytischen Abbau von DQ-Gelatine ein fluoreszierendes Signal detektiert werden können. Die Metastasen von FL-L1CAM-überexprimierenden SKOV3ip-Zellen zeigte eine stärkere gelatinolytische Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 21).

Die Überexpression der Spleiß-Variante führte nicht zu einer Induktion des Fluoreszenz-Signals in den Metastasen und somit zu keinem verstärkten Abbau von Gelatine im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 21). Diese Ergebnisse korrelieren mit den *In-vitro*-Daten, die zeigten, dass nur durch die Überexpression von FL-L1CAM und nicht durch SV-L1CAM eine erhöhte MMP-2-Aktivität in SKOV3ip-Zellen induziert wurde (vgl. Abb. 20). Die Expression von FL-L1CAM und nicht der Spleiß-Variante

induzierte gelatinolytische Aktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und ist ein entscheidender Faktor für das metastatische Potential von Tumorzellen.

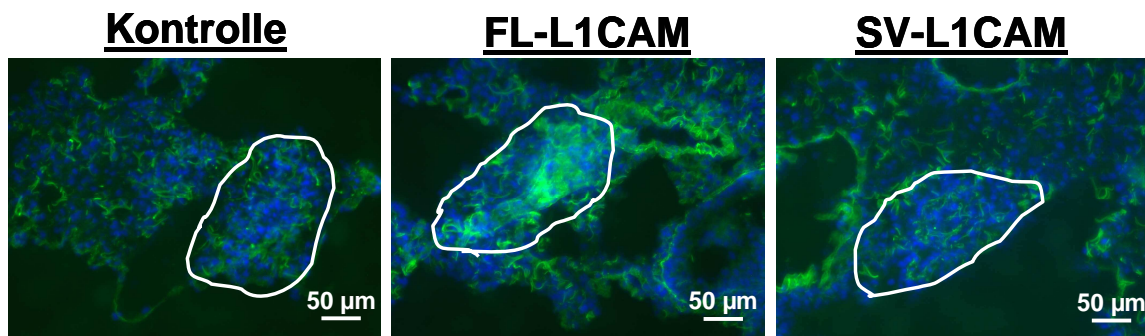


Abb. 21: Anstieg der gelatinolytischen Aktivität im metastatischen Lungengewebe durch die Überexpression von FL-L1CAM in SKOV3ip. Kryoschnitte von metastasenträgenden Lungen wurden mit DQ-Gelatine überschichtet und der Abbau in Form eines Fluoreszenz-Signals am Mikroskop analysiert. Dargestellt sind repräsentative Lungenschnitte aus jeder Gruppe (Metastasen sind weiß umrandet, blau: Kernfärbung mit DAPI, grün: Fluorescein durch Abbau der Gelatine, Balken: 50µm).

5.2.8 Erhöhte gelatinolytische Aktivität durch FL-L1CAM in zwei weiteren experimentellen Metastasierungsmodellen

Die Überexpression von FL-L1CAM und nicht die der Spleiß-Variante von L1CAM induzierte die gelatinolytische Aktivität einer humanen Ovarialkarzinomzelllinie in einem experimentellen Metastasierungsmodell. Die Überexpression von FL-L1CAM wirkt allerdings nicht nur prometastatisch auf Ovarialkarzinomzellen, sondern induziert auch in zwei weiteren experimentellen Metastasierungsmodellen unterschiedlicher Tumorentitäten die Metastasierung. Wie bereits in der Einleitung erwähnt (2.4.1) konnte Laura Bickel in zwei experimentellen Metastasierungsmodellen mit jeweils einer humanen Fibrosarkomzelllinie (HT1080/*lacZ*-K15) und des bereits in 5.1.1 vorgestellten murinen T-Zell-Lymphoms zeigen, dass die Expression von FL-L1CAM das metastatische Potential der Tumorzellen induziert, nicht jedoch die Expression von SV-L1CAM (Daten von Laura Bickel).

Um festzustellen, ob auch in diesen beiden Modellen die Aktivität von Gelatinasen durch die Expression von FL-L1CAM induziert werden kann, wurde die gelatinolytische Aktivität *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dafür wurden die Zelllinien bzw. das Metastasengewebe der beiden Metastasierungsmodelle verwendet und die gelatinolytische Aktivität analysiert. Die HT1080/*lacZ*-K15-Zelllinien exprimieren *in vitro* sowohl MMP-2 als auch MMP-9, wodurch die Gelatinase-Expression zuerst auf

mRNA-Ebene und anschließend die Aktivität in Aktivitätsassays von Zellüberständen analysiert wurde. Die quantitative RT-PCR zeigte, dass beide Proteasen durch die Überexpression von FL-L1CAM in den HT1080/acZ-K15 im Vergleich zur Kontrollzelllinie induziert waren. Die Überexpression von SV-L1CAM in den Tumorzellen führte ebenfalls zu einem leichten Anstieg der MMP-2-Expression und zu einer mit FL-L1CAM vergleichbaren Induktion von MMP-9 (Abb. 22A und B).

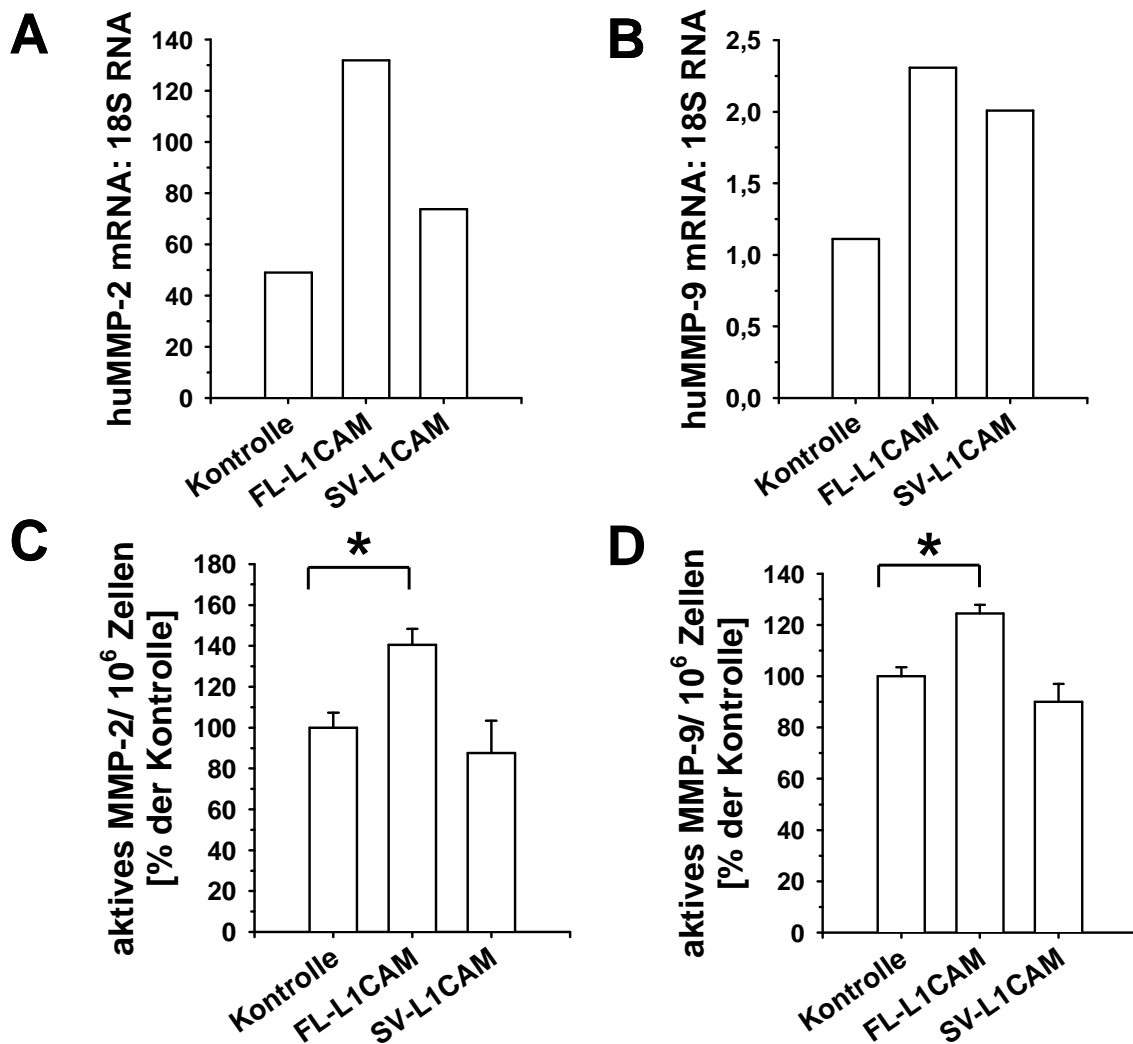


Abb. 22: Erhöhte gelatinolytische Aktivität in HT1080/acZ-K15-Zellen durch die Überexpression von FL-L1CAM. A-C. Durch retroviralen Gentransfer wurden HT1080/acZ-K15-Zellen mit entweder FL-L1CAM oder SV-L1CAM transduziert. A und B. Die Expression von endogenem MMP-2 und MMP-9 in HT1080/acZ-K15-Zellen ist durch FL-L1CAM und SV-L1CAM induziert (MMP-2: Kontrolle: 49,002, FL-L1CAM: 131,855, SV-L1CAM: 73,723; MMP-9: Kontrolle: 1,112, FL-L1CAM: 2,309, SV-L1CAM: 2,009, dargestellt ist der Mittelwert relativ zur 18S rRNA). C und D. Eine signifikante Induktion der Aktivität von MMP-2 und MMP-9 wurde durch die Überexpression von FL-L1CAM, nicht aber von SV-L1CAM in den Tumorzellen im Vergleich zur Kontrolle erzielt (MMP-2: * $p = 0,02$, Kontrolle: $100\% \pm 7,339\%$, FL-L1CAM: $140,429\% \pm 7,902\%$, SV-L1CAM: $87,489\% \pm 15,851\%$; MMP-9: * $p = 0,007$, Kontrolle: $100\% \pm 3,522\%$, FL-L1CAM: $124,451\% \pm 3,328\%$, SV-L1CAM: $89,994\% \pm 7,015\%$; Assays mit $n = 3$ jeweils in Duplikaten durchgeführt).

Die Aktivität der beiden Proteasen wurde mit Hilfe eines spezifischen Aktivitätsassays für MMP-2 bzw. MMP-9 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Aktivität beider Proteasen signifikant erhöht war, wenn FL-L1CAM in den Tumorzellen exprimiert wurde, während die Spleiß-Variante keinen Einfluss auf die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 hatte (Abb. 22C und D).

Die Untersuchung der Expression bzw. Aktivität von MMP-2 und MMP-9 im T-Zelllymphommodell war *in vitro* nicht möglich, da L-CI.5-Zellen kein endogenes MMP-2 exprimieren. Auch die MMP-9-Expression ist in den Tumorzellen kaum messbar und von den Kultivierungsbedingungen (z.B. Zelldichte, Stressfaktoren) abhängig (Gerg et al., 2008). Dennoch ist die MMP-2-Expression für das Auswachsen der Metastasen und die MMP-9-Expression für die Invasion der Tumorzellen ins Leberparenchym für das T-Zell-Lymphom-Modell von Bedeutung (Gerg et al., 2008).

Um in beiden Metastasierungsmodellen, dem HT1080/*acZ*-K15-Modell und L-CI.5s-Modell festzustellen, ob gelatinolytische Aktivität *in vivo* durch die Überexpression einer der beiden Varianten induziert werden kann, wurde eine *In-situ*-Zymographie von Kryoschnitten des jeweiligen metastasenträgenden Gewebes durchgeführt. Untersuchungen der Kryoschnitte der metastasenträgenden Lungenproben des HT1080/*acZ*-K15-Modells zeigten eine Induktion der gelatinolytischen Aktivität, wenn FL-L1CAM in den Tumorzellen exprimiert wurde (Abb. 23, oben). Die Expression von SV-L1CAM hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von Gelatinasen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 23, obere Bilderreihe).

Im T-Zell-Lymphommodell konnte ebenfalls durch die Überexpression von FL-L1CAM in den Tumorzellen die gelatinolytische Aktivität innerhalb der Metastasen im Vergleich zur Kontrolle verstärkt werden. L-CI.5s-SV-L1CAM-tragende Metastasen zeigten keinen Unterschied zur Kontrollgruppe (Abb. 23, untere Bilderreihe). Damit konnte auch für das T-Zell-Lymphom-Modell ein induktiver Effekt durch die Expression von FL-L1CAM auf die gelatinolytische Aktivität im metastatischen Gewebe gezeigt werden. Die Induktion der Aktivierung von Gelatinasen durch FL-L1CAM korrelierte mit dem Anstieg der Metastasenzahl im jeweiligen Metastasierungsmodell (Daten von Laura Bickel) und bestätigt die Ergebnisse, welche mit Ovarialkarzinomzellen erzielt wurden (Abb. 21).

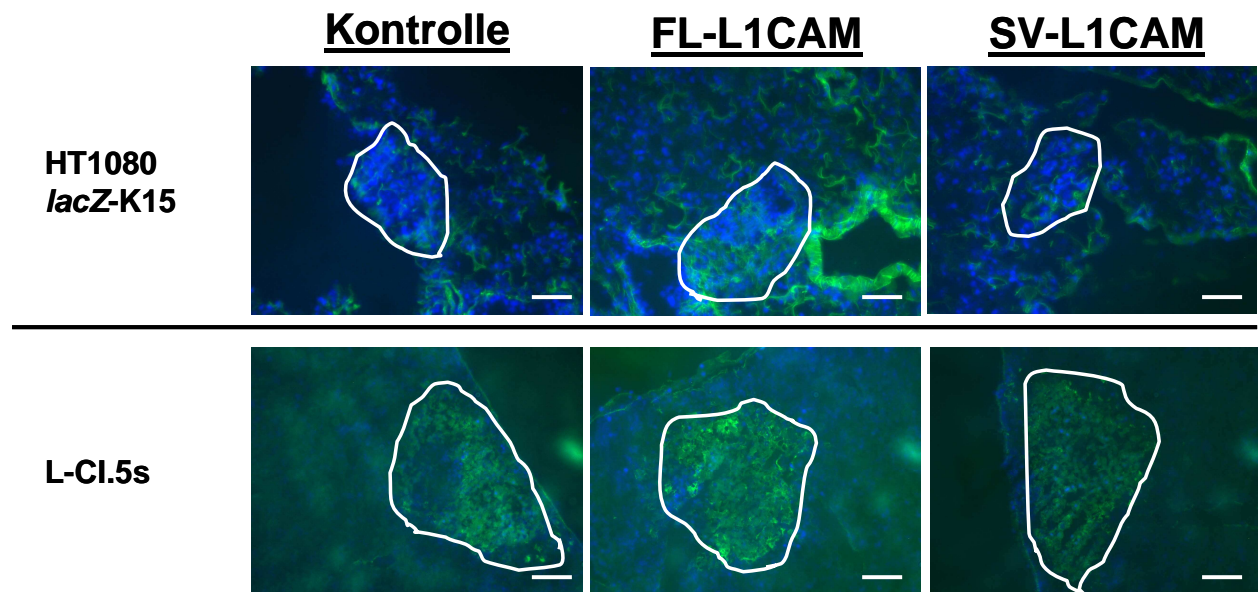


Abb. 23: Induktion gelatinolytischer Aktivität in den Metastasen durch Überexpression von FL-L1CAM in Tumorzellen. Die obere Bilderreihe zeigt den Anstieg an gelatinolytischer Aktivität in Kryoschnitten von Lungenmetastasen mit HT1080/*lacZ-K15*-Zellen, die entweder mit dem Leervektor (Kontrolle), FL-L1CAM (FL-L1CAM) oder SV-L1CAM (SV-L1CAM) transduziert worden sind. Die FL-L1CAM-Expression in den Tumorzellen führte zu einer Induktion von aktiven Gelatinasen (dargestellt sind repräsentative Kryoschnitte von jeder Gruppe, Balken: 50µm). Die untere Bilderreihe zeigt Kryoschnitte von Lebergewebe mit Metastasen von entweder Leervektor-, FL-L1CAM- oder SV-L1CAM-überexprimierenden L-CI.5s-Zellen. Die Überexpression von FL-L1CAM in den Tumorzellen führte zu einer Induktion der gelatinolytischen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Die SV-L1CAM-Expression zeigte keinen Unterschied in der Aktivität im Vergleich zu Kontrollschnitten (dargestellt sind repräsentative Kryoschnitte von jeder Gruppe, Balken: 50µm).

5.2.9 Zusammenhang zwischen metastasierungsassoziierten Signaltransduktionswegen und der Überexpression von FL-L1CAM in Tumorzelllinien

Die vollständig exprimierte Isoform von L1CAM konnte in den vorangegangenen Experimenten als die metastasierungsfördernde Variante von L1CAM identifiziert werden. Um einen potentiellen Signaltransduktionsweg, der die Effekte von FL-L1CAM vermitteln könnte, zu evaluieren, wurden zwei mögliche Signalwege in Betracht gezogen und analysiert. Einerseits wurde der ERK 1/2-Signalweg untersucht, der von Exon 27 induziert werden kann und die Expression von metastasierungsfördernden Molekülen erhöht und andererseits die Aktivierung der EGF-Rezeptor Signalübertragung. Dabei kann die Aktivierung der beiden Gelatinasen MMP-2 und -9 über EGFR-Aktivierung und anschließender STAT3 Phosphorylierung erfolgen oder aber auch unabhängig voneinander über einen der beiden Signaltransduktionswege (Xie et al., 2004, Kim et al., 2008).

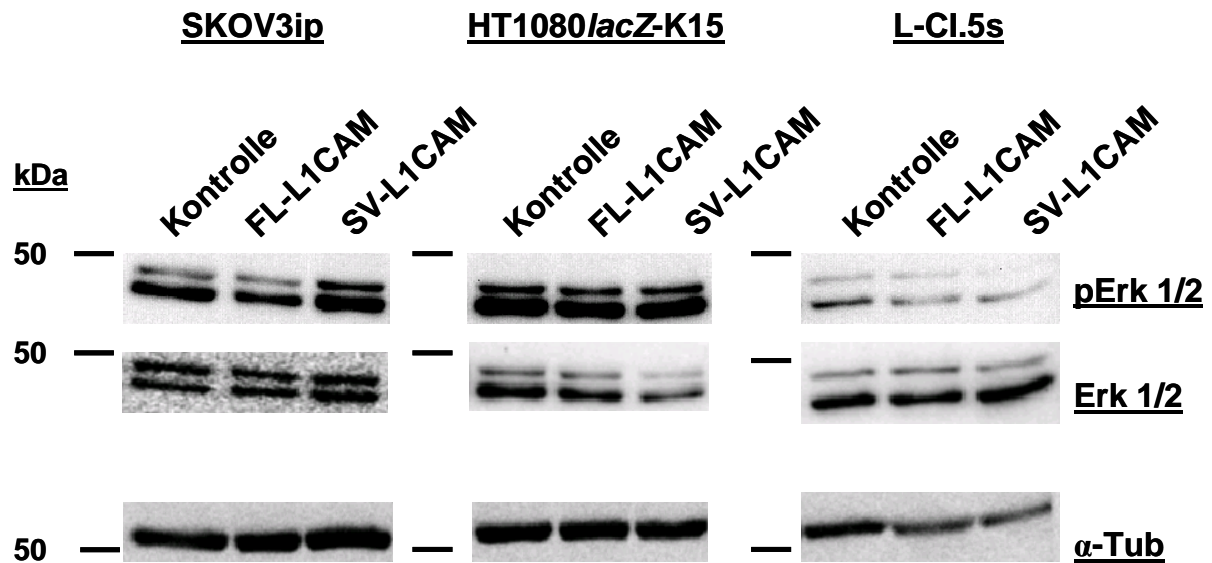


Abb. 24: Keine Induktion der ERK-Signaltransduktion durch die Überexpression von FL-L1CAM in verschiedenen Tumorzelllinien. Durch Western-Blot-Analyse sollten in SKOV3ip-, HT1080/lacZ-K15- und L-CI.5s-Zellen, die jeweils entweder FL-L1CAM, SV-L1CAM oder einen Leervektor überexprimierten, die Aktivierung von ERK 1/2 (p-ERK, phosphoryliertes ERK) analysiert werden. Als Vergleichswert für die Aktivierung von pERK 1/2 wurde ERK 1/2 mitgeführt und als Ladungskontrolle α -Tubulin (α -Tub) gezeigt (dargestellt sind repräsentative Western Blots).

Die Aktivierung beider Signaltransduktionswege wurde durch Western-Blot-Analyse in den modifizierten Tumorzelllinien SKOV3ip, HT1080/lacZ-K15 und L-CI.5s überprüft, deren metastatisches Potential durch die Überexpression von FL-L1CAM im Vergleich zur Kontrolle verstärkt werden konnte (siehe 5.2.8). Die Western-Blot-Analysen zeigten, dass die Überexpression von FL-L1CAM und damit die Expression des mit dem Erk-Signalwegs assoziiertem Exon 27 in den verschiedenen Tumorzelllinien- SKOV3ip, HT1080/lacZ-K15 und L-CI.5s- keinen Einfluss auf die Aktivierung des ERK 1/2-Signalwegs *in vitro* hatte. In den unterschiedlichen Tumorzelllinien konnte zwar aktives pERK 1/2 nachgewiesen werden, allerdings war die Phosphorylierung des Rezeptors innerhalb der jeweiligen Zelllinien vergleichbar stark und nicht wie hypothetisiert, durch die Überexpression von FL-L1CAM induziert (Abb. 24). Als Vergleichswert der Phosphorylierung wurde inaktives ERK 1/2 nachgewiesen und α -Tubulin als Ladungskontrolle mitgeführt, welche beide innerhalb jeder Gruppe gleichmäßig exprimiert wurden (Abb. 24).

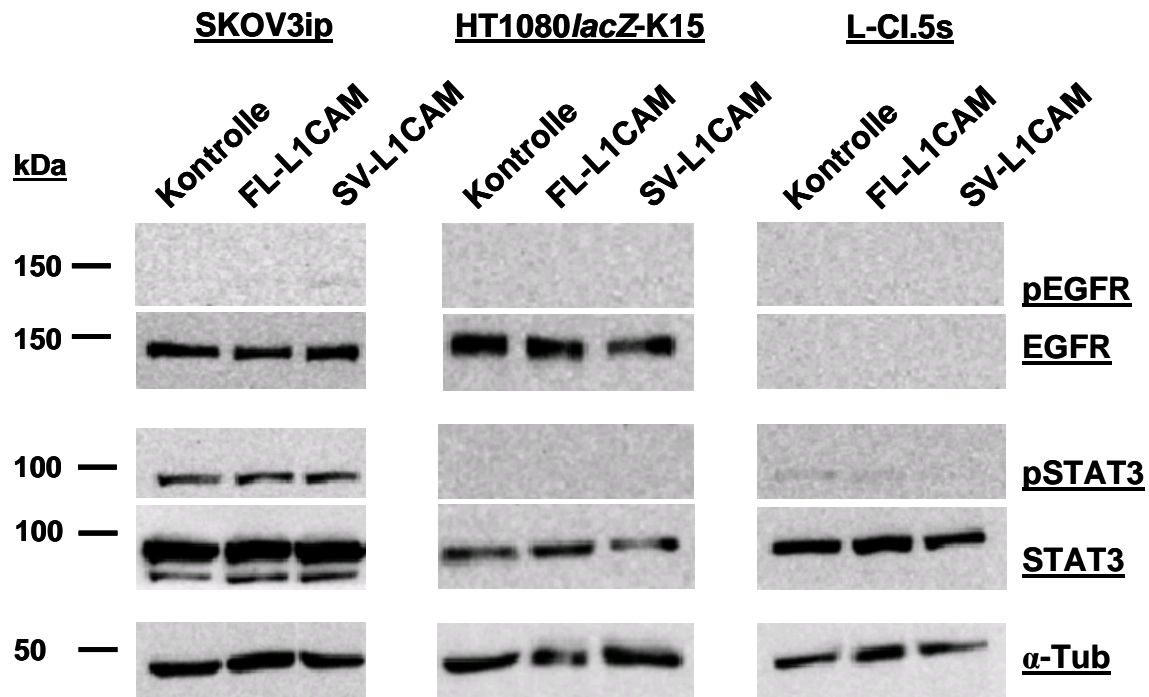


Abb. 25: Keine Aktivierung der EGFR- bzw. STAT3-Signaltransduktion durch FL-L1CAM-Überexpression in den Tumorzelllinien. Mittels Western-Blot-Analysen wurde das Zelllysat von SKOV3ip-, HT1080/acZ-K15- und L-CI.5s-Zelllinien, die jeweils entweder FL-L1CAM, SV-L1CAM oder einen Leervektor überexprimierten, auf die Aktivierung des EGFR- bzw. STAT3-Signalwegs untersucht. Es kam zu keiner Induktion der Phosphorylierung weder von EGFR noch STAT3 durch eine der beiden L1CAM-Isoformen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Ladungskontrolle: α -Tubulin, dargestellt sind repräsentative Western Blots).

Untersuchungen der Induktion von STAT3- und dem EGF-Signaltransduktionsweg ergab keine Aktivierung weder von EGFR noch von STAT3 durch die Überexpression von FL-L1CAM in den verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro*. Die Expression des nicht phosphorylierten EGF-Rezeptors zeigte keine Unterschiede in den modifizierten SKOV3ip- und HT1080/acZ-K15-Zelllinien. Eine Expression des EGF-Rezeptors in den L-CI.5s-Zelllinien konnte im Western Blot nicht nachgewiesen werden (Abb. 25). STAT3 hingegen war innerhalb der drei Gruppen auf Proteinebene nachweisbar. Eine Aktivierung und damit Phosphorylierung von STAT3 konnte nur in den SKOV3ip-Zelllinien gezeigt werden, allerdings wurde zwischen den einzelnen Zelllinien keine Unterschiede beobachtet (Abb. 25).

Eine Aktivierung der ERK-, EGF- sowie STAT3-Signaltransduktion konnte weder durch die Überexpression von FL-L1CAM noch von SV-L1CAM in keiner der jeweiligen Tumorzelllinien *in vitro* analysiert werden. Die Induktion von MMP-2 und -9 durch FL-L1CAM scheint über andere Signaltransduktionswege aktiviert zu werden.

5.2.10 Modulation des Spleißens von L1CAM zu Gunsten der vollständigen Isoform durch Inkubation von Ovarial- und Kolonkarzinomzellen mit prometastatischen Faktoren

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass das vollständig exprimierte L1CAM für die prometastatischen Eigenschaften dieses Zelladhäsionsmoleküls verantwortlich war. Dennoch wurde durch Expressionsanalysen die Spleiß-Variante als diejenige Isoform von L1CAM identifiziert, die hauptsächlich in Ovarialkarzinomen, in Netz- und Lebermetastasen sowie Tumorzellen nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 15 und Abb. 16). Mittels Inkubationsversuchen von Ovarial- und Kolonkarzinomzelllinien mit prometastatischen Faktoren sollte nun die Frage geklärt werden, ob das Spleißen von L1CAM dadurch beeinflusst werden kann. Dafür wurden die Ovarialkarzinomzelllinien SKOV3ip und OVMz mit 10ng/ml TGF- β (*transforming growth factor- β*) für 48 h und die Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 mit 10ng/ml HGF (*hepatocyte growth factor*) für 10 Tage inkubiert (vorinkubierte Zellen erhalten von Marco Pfeifer, DKFZ). Mittels quantitativer RT-PCR wurden die Expressionswerte von FL-L1CAM und SV-L1CAM auf mRNA-Ebene mit Hilfe der spezifischen *Primer/Probe*-Assays (siehe Abb. 15) ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass durch die Inkubation der Tumorzellen mit den jeweiligen prometastatischen Faktoren TGF- β bzw. HGF eine eindeutige Induktion der Expression von FL-L1CAM, aber nicht der Spleiß-Variante im Vergleich zur Kontrolle erzielt wurde (Abb. 26). Dieses Ergebnis unterstützt die vorangegangenen Daten, dass FL-L1CAM und nicht die Spleiß-Variante die prometastatische Isoform von L1CAM ist.

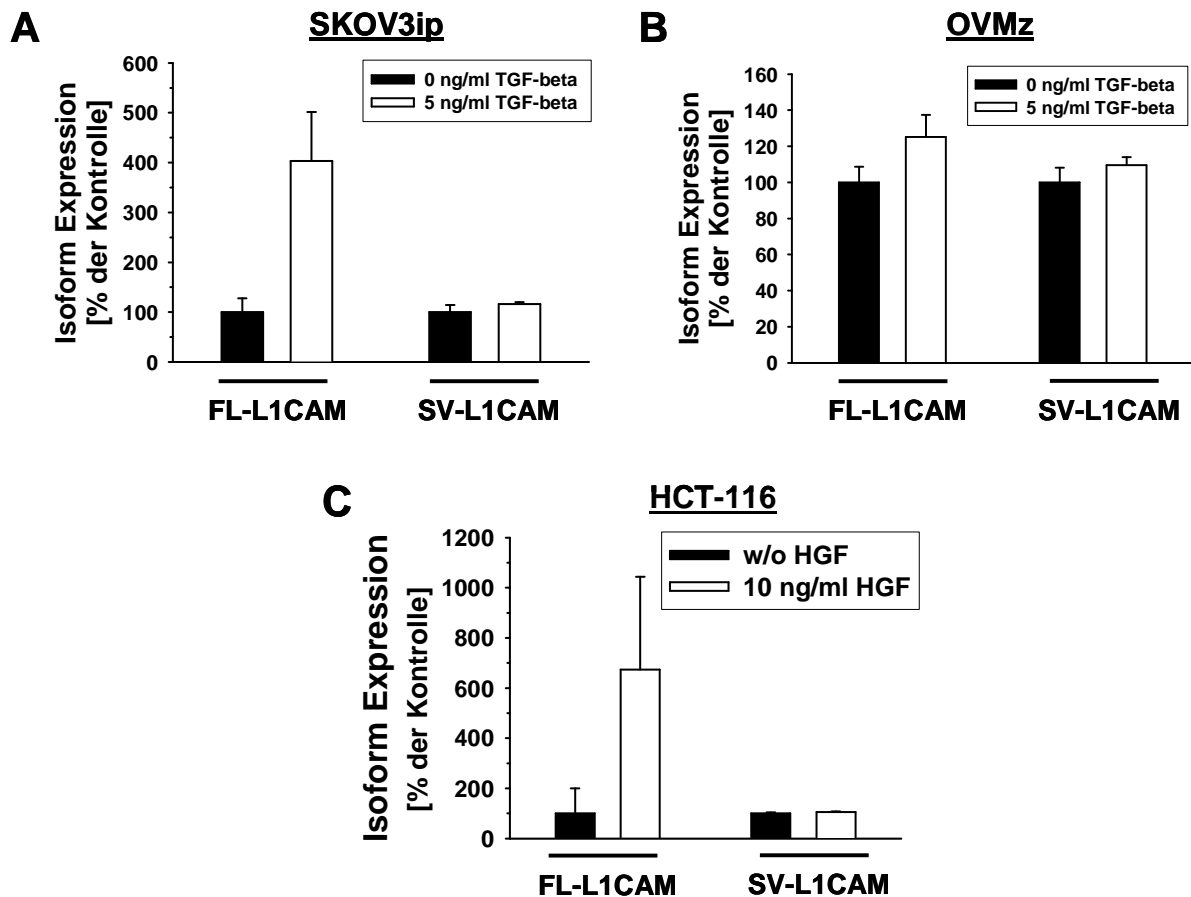


Abb. 26: Modulation des Spleißens von L1CAM durch prometastatische Faktoren zu Gunsten der FL-L1CAM-Expression. Ovarial- (SKOV3ip und OVMz) und Kolonkarzinomzellen (HCT-116) wurden mit 10ng/ml TGF- β bzw. 10ng/ml HGF inkubiert. Durch quantitative RT-PCR mit spezifischen *Primer-Probe-Assays* (vgl. Abb. 15) konnte eine Induktion der FL-L1CAM-Expression und nicht der Spleiß-Variante beobachtet werden (SKOV3ip, FL-L1CAM: Kontrolle: 100% \pm 27,625%, 5ng/ml TGF- β : 403,521% \pm 98,115%; SV-L1CAM: Kontrolle: 100% \pm 14,242%, 5ng/ml TGF- β : 116,181% \pm 4,001%; OVMz, FL-L1CAM: Kontrolle: 100% \pm 8,617%, 5ng/ml TGF- β : 125,165% \pm 12,296%; SV-L1CAM: Kontrolle: 100% \pm 8,231%, 5ng/ml TGF- β : 109,682% \pm 4,301%; HCT-116, FL-L1CAM: Kontrolle: 100% \pm 100%, 5ng/ml TGF- β : 673,855% \pm 369,679%; SV-L1CAM: Kontrolle: 100% \pm 4,567%, 5ng/ml TGF- β : 104,864% \pm 2,660%; dargestellt ist der Mittelwert relativ zur 18S rRNA mit Standardfehler).

6 Diskussion

Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM hat einen entscheidenden Einfluss auf die neuronale Entwicklung des Menschen (Fransen *et al.*, 1997), wird aber auch mit pathologischen Prozessen, u.a. der Progression verschiedener Krebserkrankungen assoziiert (Fogel *et al.*, 2003; Boo *et al.*, 2006; Kaifi *et al.*, 2007). In verschiedenen Studien konnte die Expression von L1CAM unter anderem mit der Hemmung der Apoptose (Stöck *et al.*, 2007), Induktion der Invasion von Tumorzellen (Arlt *et al.*, 2006) oder verstärkter Angiogenese (Gavert *et al.*, 2008) in Zusammenhang gebracht werden. Dennoch ist erst wenig über die zu Grunde liegenden Signaltransduktionswege bzw. die molekulare Wirkungsweise der L1CAM-vermittelten Tumorgenese bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung der Expression von L1CAM-Isoformen in verschiedenen experimentellen Metastasierungsmodellen untersucht. Zum Einem konnte durch die Suppression der L1CAM-Expression in einem murinem T-Zell-Lymphommodell die prometastatische Wirkung von L1CAM auf die späten Phasen der Metastasierung, d. h. die Kolonisierung der Leber durch die Tumorzellen evaluiert werden. Die Verwendung der RNAi-Technologie ermöglichte es, einen effizienten *knock down* von L1CAM in den Tumorzellen zu erreichen und dadurch *in vivo* das metastatische Potential der Tumorzellen um 53% zu reduzieren. Die Überexpression von L1CAM in diesem T-Zell-Lymphommodell hingegen führte zu einer deutlichen Induktion der Metastasierung in das Leberparenchym. In ersten Versuchen wurde auch die Rolle der Sheddase ADAM-10 auf das metastatische Potential der Tumorzellen untersucht, um in weiterführenden Versuchen die Rolle des *sheddings* von L1CAM durch ADAM-10 zu analysieren. Zudem sollten in dieser Arbeit die molekularen Effekte der beiden humanen L1CAM Isoformen, nämlich des 28 Exon-umfassenden L1CAM (FL-L1CAM) und der Spleiß-Variante ohne Exon 2 und 27 (SV-L1CAM), auf die Metastasierung untersucht werden. Erste Ergebnisse von Laura Bickel bestätigend, induzierte die vollständig exprimierte Isoform von L1CAM das metastatische Potential der Tumorzellen, nicht jedoch die hauptsächlich in Tumorzellen exprimierte Spleiß-Variante. Erstmals konnte auch eine Induktion von MMP-Aktivität *in vitro* und gelatinolytischer Aktivität *in vivo* mit der Expression von FL-L1CAM in Zusammenhang gebracht werden. Zudem wurde durch die Inkubation von Ovarial- und Kolonkarzinomzellen mit prometastatischen Faktoren (HGF oder

TGF- β) die posttranskriptionale Modifikation durch alternatives Spleißen von L1CAM zu Gunsten der Expression von FL-L1CAM verschoben.

Diese Arbeit trägt dazu bei, die grundlegende molekulare Wirkungsweise des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM und seiner Isoformen in den späten Phasen der Metastasierung zu verstehen. Diese Ergebnisse sind ein entscheidender Baustein in der Entwicklung einer potentiell gegen L1CAM gerichteten Therapiestrategie.

6.1 Einfluss der Gensuppression von L1CAM bzw. dessen Sheddase ADAM-10 in einem experimentellen Metastasierungsmodell eines T-Zell-Lymphoms

In publizierten Studien wird ein Zusammenhang zwischen der Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM und protumorigenen Eigenschaften von Zellen gezeigt. So konnten Effekte der L1CAM Expression u.a. auf die Tumorzellmigration (Gutwein *et al.*, 2000; Mehtesheimer *et al.*, 2001), -proliferation (Primiano *et al.*, 2003) und -invasion (Siletti *et al.*, 2004) durch *In-vitro*-Analysen identifiziert werden. Das *shedding* von L1CAM durch ADAM-10 fördert dabei die Tumorzellmigration (Gutwein *et al.*, 2000, Mehtesheimer *et al.*, 2001) und die L1CAM-abhängige Aktivierung der ERK-Signaltransduktion durch lösliches L1CAM in Exosomen (Gutwein *et al.*, 2005). In einer Studie mit Kolorektalkarzinomzellen wird ein erster Zusammenhang zwischen dem ADAM-10-induziertem *shedding* von L1CAM und spontaner Metastasierung beobachtet (Gavert *et al.*, 2007). Außer der Spaltung von L1CAM durch ADAM-10 ist auch ADAM-17 als eine L1CAM Sheddase identifiziert (Maretzky *et al.*, 2005; Gutwein *et al.*, 2005). Allerdings ist bis heute nur bekannt, dass die proteolytische Prozessierung von L1CAM durch ADAM-17 nur durch veränderte Bedingungen induziert wird, wie Zugabe von Aktivatoren (Maretzky *et al.*, 2005) oder auch durch apoptotische Zustände (Gutwein *et al.*, 2005). Eine konstitutive Spaltung von L1CAM durch ADAM-10 wird hingegen in mehreren Veröffentlichungen bestätigt (Maretzky *et al.*, 2005; Gavert *et al.*, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von L1CAM und der L1CAM-Sheddase ADAM-10 in den späten Phasen der Metastasierung untersucht. Der Beitrag beider Moleküle wurde in einem sehr aggressiven Tiermodell eines murinen T-Zell-Lymphoms mit L-CI.5s-Zellen durchgeführt und analysiert (Krüger *et al.*, 1994). Die Progression der Metastasierung in diesem Modell korrelierte mit einer verstärkten

Expression sowohl von L1CAM, als auch seiner Sheddase ADAM-10. Eine Beteiligung von L1CAM und ADAM-10 an der Progression des T-Zell-Lymphoms überrascht nicht. Die Expression von ADAM-10 kann sowohl in primären T-Zellen (Matthies *et al.*, 2006), als auch in verschiedenen Lymphom-Zellen (Wu *et al.*, 1997) nachgewiesen werden. Auch eine Expression von L1CAM konnte in einer T-Zell-Lymphomzelllinie, den Esb-MP-Zellen, nachgewiesen werden (Kowitz *et al.*, 1992). Diese Zelllinie ist eine adhärente Variante der Esb-Zellen, aus denen die in dieser Arbeit verwendete Suspensions-Zelllinie L-CI.5s hervorgegangen ist (Krüger *et al.*, 1994).

Der starke Anstieg der L1CAM-Expression sieben Tage nach Inokulation von L-CI.5s-Zellen im Vergleich zum metastasenfremden Lebergewebe an Tag 0 im T-Zell-Lymphom-Modell, kann aus der hohen Tumorzelllast am 7. Tag resultieren. Damit könnte die L1CAM-Expression vor allem auf Seiten der Tumorzellen ein entscheidender Faktor für deren metastatisches Potential sein. Zudem spricht für diese Hypothese, dass unter physiologischen Bedingungen kaum eine L1CAM Expression im Lebergewebe nachgewiesen werden kann (unveröffentlichte Daten der AG Krüger, Gavert *et al.*, 2008). *In-situ*-Hybridisierung auf murinen metastasentragenden Leberschnitten zeigte L1CAM-Expression ebenfalls hauptsächlich in den Metastasen. Im Patientenmaterial von Kolorektalkarzinomen wird die Expression von L1CAM im invasiven Gewebe und somit ebenfalls im Tumorgewebe lokalisiert (Gavert *et al.*, 2005). Interessanterweise wird die Sheddase ADAM-10 auch in der invasiven Front des Tumors exprimiert und kolokalisiert somit mit L1CAM (Gavert *et al.*, 2005). In dieser Arbeit kam es ebenfalls zu einer Koexpression von ADAM-10 und L1CAM in den L-CI.5s T-Zell-Lymphom-Zellen.

Um den prometastatischen Effekt von L1CAM und ADAM-10 auf Tumorzellseite zu untersuchen, wurde die Expression beider Moleküle durch Anwendung von RNAi-Technologie reduziert. Die Suppression der L1CAM-Expression führte *in vitro* zu einer Reduktion der promigratorischen und proinvasiven Eigenschaften der Tumorzellen und unterstreicht die bekannte migratorische und invasive Wirkung von L1CAM auf Tumorzellseite (Silletti *et al.*, 2004; Gavert *et al.*, 2005; Gavert *et al.*, 2007). Auch in anderen Tumormodellen konnte durch Einsatz von siRNA- bzw. shRNA-Konstrukten gegen L1CAM einerseits die Migrationsfähigkeit verschiedener Kolorektalkarzinomzellen reduziert werden (Gavert *et al.*, 2005) und andererseits das

Wachstum sowie die Überlebensrate von CD133-positiven Gliomzellen deutlich verringert werden (Bao *et al.*, 2008).

Im T-Zell-Lymphom-Modell konnte durch die molekulare Modulation der L1CAM-Expression das metastatische Potential der Tumorzellen *in vivo* beeinflusst werden. So führte nicht nur die Suppression von L1CAM zu einer Reduktion der Gesamttumorlast in der Leber, sondern auch der deutliche Anstieg der Makrometastasierung durch die Überexpression von L1CAM in den T-Zell-Lymphom-Zellen spiegelt die Rolle von L1CAM in den späten Phasen der Metastasierung wider. Die prometastatische Wirkung von L1CAM konnte in unserem Labor durch die effiziente Suppression der L1CAM-Expression in einem zweiten experimentellen Metastasierungsmodell mit humanen Ovarialkarzinomzellen (SKOV3ip) bestätigt werden. Das metastatische Potential dieser Tumorzellen wurde reduziert und somit die Kolonisierung der Lunge durch Tumorzellen signifikant verringert (Daten von Laura Bickel). Diese Ergebnisse korrelieren ebenfalls mit präklinischen Studien, durchgeführt mit einem spontanem Metastasierungsmodell der Ovarialkarzinomzellen SKOV3ip (Arlt *et al.*, 2006; Knogler *et al.*, 2007). Durch Verwendung eines monoklonalen Antikörpers, gerichtet gegen L1CAM, wird das intraperitoneale Tumorwachstum sowie die lokale Dissemination von Ovarialkarzinomzellen *in vivo* verhindert (Arlt *et al.*, 2006; Knogler *et al.*, 2007). Diese Beobachtungen können zumindest *in vitro* durch die Zugabe des Tyrosinkinaseinhibitors Genistein verstärkt werden (Novak-Hofer *et al.*, 2008).

Damit scheint L1CAM ein viel versprechendes therapeutisches Angriffsziel in der Hemmung des Tumorwachstums, aber auch für die späten Phasen der Metastasierung zu sein. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit gilt festzuhalten, dass die Modulation der L1CAM-Expression auf Tumorzellseite das metastatische Potential der Zellen verändert und Einfluss auf die späten Phasen der Metastasierung hat.

Weiterführend gilt noch zu klären, inwieweit ein Zusammenhang zwischen diesen prometastatischen Effekten von L1CAM und dem ADAM-10-induzierten *shedding* von L1CAM besteht. Diese Fragestellung konnte in dieser Arbeit noch nicht untersucht werden. Allerdings konnte in ersten Versuchen die Rolle von ADAM-10 in den späten Phasen der Metastasierung analysiert werden. Der *knock down* von ADAM-10 führte zwar zu einer Reduktion der Makrometastasierung, aber zu einer Induktion der sekundären Streuung der Tumorzellen. Ob diese Effekte durch eine unterdrückte Spaltung von L1CAM, hervorgerufen durch die Suppression von

ADAM-10 in den Tumorzellen, entstanden ist, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Eine interessante Beobachtung konnte jedoch durch das gleich bleibende Invasionsverhalten sowie die verstärkte Migration der Tumorzellen nach Suppression der ADAM-10-Expression in den Tumorzellen *in vitro* gemacht werden. Diese Effekte und die Induktion der intrahepatischen Streuung durch die Reduktion der ADAM-10-Expression scheinen eher ein Kompensationseffekt durch andere Proteasen (*protease web*), als eine durch die Inhibition von L1CAM-*shedding* verursachte Wirkung zu sein. Das *shedding* von L1CAM durch ADAM-10 wird in der Literatur mit einer Induktion der Migration sowohl von neuronalen Zellen (Maretzky *et al.*, 2005) als auch von Tumorzellen (Mehtesheimer *et al.*, 2001; Gutwein *et al.*, 2003) assoziiert. In einem spontanen Metastasierungsmodell führt ebenfalls die ADAM-10-induzierte Spaltung von L1CAM zu einer verstärkten Streuung von Kolonkarzinomzellen (Gavert *et al.*, 2007). Dafür sind humane Kolorektalkarzinomzelllinien mit ADAM-10 transduziert worden, wodurch verstärktes *shedding* von L1CAM im Überstand der Tumorzellen nachweisbar war. Dabei ist L1CAM in den Tumorzellen entweder endogen exprimiert (HT116) oder exogen überexprimiert (Ls174T) worden. Durch die Injektion jeweils beider Tumorzelllinien in die Milz von Mäusen kann die Streuung der Tumorzellen und damit die Metastasierung in die Leber induziert werden (Gavert *et al.*, 2007). Allerdings wird in dieser Studie der Effekt der verstärkten proteolytischen Aktivität von ADAM-10, hervorgerufen durch die exogene Expression von ADAM-10 in den Tumorzellen, nicht berücksichtigt. Als proteolytisch aktive Metalloprotease besitzt ADAM-10 verschiedene Oberflächenmoleküle als *Shedding*-Substrate und ist mit protumorigenen Eigenschaften assoziiert. So spaltet ADAM-10 nicht nur die Tyrosinkinase cMet auf der Zelloberfläche und verhindert die HGF/cMet-Signaltransduktion (Kopitz *et al.*, 2007; Schelter *et al.*, 2010), sondern kann durch Spaltung von N-Cadherin auch die Migration verschiedener menschlicher Glioblastomzelllinien induzieren (Kohutek *et al.*, 2009). Hinzu kommt, dass ADAM-10 nicht nur protumorigen auf der Zelloberfläche agieren kann (Kohutek *et al.*, 2009) sondern zumindest in Androgenrezeptor-abhängigen Prostatakarzinomzellen zurück in den Nukleus transportiert wird (Arima *et al.*, 2007). Durch Zugabe der Wachstumsfaktoren 5 α -Dihydrotestosteron und *Insulin-like growth factor-1* (IGF-I) wird ADAM-10 im Nukleus verstärkt aktiviert und trägt so zur Tumorprogression des

Prostatakarzinoms bei (Arima *et al.*, 2007; McCulloch *et al.*, 2004). Somit wird durch die Modulation der Protease ADAM-10 in verschiedenen Regulationsmechanismen, aber evtl. auch in Kompensationsmechanismen eingegriffen (*protease web*), weshalb es notwendig ist, dies in der Untersuchung der Effekte der ADAM-10 abhängigen Spaltung von L1CAM in zukünftigen Experimenten zu berücksichtigen.

6.2 Induktion des metastatischen Potentials von Ovarialkarzinomzellen durch die vollständige Isoform von L1CAM

Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM existiert sowohl als 28 Exon-umfassende sog. neuronale Form (FL-L1CAM) (Moos *et al.*, 1988), aber auch als eine tumorassoziierte Spleiß-Variante (SV-L1CAM), deren Exon 2 und 27 deletiert sind (Reid und Hemperly, 1992). Dabei ist L1CAM nicht das einzige Molekül in der Immunglobulin-Superfamilie, welches in verschiedenen Isoformen exprimiert wird. NCAM, ebenfalls essentiell für die neuronale Entwicklung, wird differenziell gespleißt und kann somit in zwei funktionell verschiedenen Varianten exprimiert werden (Schor *et al.*, 2009).

Das Spleißen von Genen erhält immer mehr Aufmerksamkeit in der Forschung, da mehr als 70% aller menschlichen Gene gespleißt werden können und dadurch die funktionelle Diversität der von einem Gen kodierten Proteine erhöht werden kann (Johnson *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2005; Ghina *et al.*, 2008). Deshalb ist es nachvollziehbar, dass auf Grund der entstehenden potentiellen Vielfalt an Proteinfunktionen, das Spleißen auch in pathologischen Prozessen, wie der Tumorprogression, eine entscheidende Rolle zukommt. Untersuchungen von normalem Gewebe und Tumorgewebe zeigten bei mehreren Genen verschiedene Spleiß-Varianten in unterschiedlichen Gewebelokalisationen. Dies ist u.a. *BCAS1* (*breast carcinoma amplified sequence-1*), dessen bekannte Spleiß-Variante in Tumorgewebe von Brust und Gehirn gefunden wird, während die neue Isoform in gesundem Gewebe des Gehirns detektiert werden kann (Roy *et al.*, 2005).

Auf Grund der gezeigten metastasierungsfördernden Wirkung von FL-L1CAM, aber der dominanten Expression von SV-L1CAM in Tumorzellen, wurde der Einfluss von prometastatischen Faktoren auf den Spleißprozess untersucht. Ein verändertes Spleiß-Muster kann in Tumorzellen zu einer unterschiedlichen Induktion von pro- oder antitumorigenen Signaltransduktionswegen führen (Ghigna *et al.*, 2008). Durch

die Inkubation verschiedener Tumorzellen mit prometastatischen Faktoren (TGF- β und HGF) konnte ein selektiver Anstieg der vollständigen Isoform von L1CAM erzielt werden, während keine Veränderung der Expression der Spleiß-Variante zu beobachten war. Sowohl TGF- β als auch HGF sind bekannte prometastatische Faktoren, welche die Invasivität von Ovarial- bzw. Kolorektalkarzinomzellen induzieren können (Stein *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2001). Obwohl die Expression der Spleiß-Variante insgesamt höher ist, wird durch den veränderten Spleiß-Prozess die FL-L1CAM-Expression induziert. Somit scheint die niedrig-exprimierte Isoform für die Induktion des metastatischen Potentials der Tumorzellen relevant zu sein. Dies wurde für ein anderes Zelladhäsionsmolekül beobachtet, welches in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich gespleißt werden kann. CD99 existiert in Brustkarzinomzellen sowohl in einer niedrig-exprimierten Isoform, als auch in einer stark exprimierten Variante (Byun *et al.*, 2006). Die Invasivität der Tumorzellen wird durch die weniger exprimierte Isoform induziert (Byun *et al.*, 2006). Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit, da FL-L1CAM ebenfalls die niedrig-exprimierte Variante in Tumorzellen ist, aber dessen Expression notwendig ist, um das metastatische Potential zu induzieren.

Durch Expressionsanalysen konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal eine Aussage über die Expression von FL-L1CAM und SV-L1CAM im malignen Patientenmaterial von Ovarial- und Kolonkarzinomen gemacht werden. Sowohl die FL-L1CAM- als auch die SV-L1CAM-Expression stieg mit der Progression der Krebserkrankung an und auch im Metastasengewebe von Ovarialkarzinom- und Kolorektalkarzinompatienten konnte die Expression von SV-L1CAM, aber auch von FL-L1CAM nachgewiesen werden. Der Expressionsanstieg beider L1CAM-Varianten mit der zunehmenden Tumorprogression geht konform mit anderen Studien, die zeigen, dass die gesamte L1CAM-Expression mit der Malignität von Ovarialkarzinomen korreliert (Fogel *et al.*, 2003; Daponte *et al.*, 2008). Ähnlich zu den Expressionsverhältnissen in verschiedenen Tumorzellen (Euer *et al.*, 2005; Meli *et al.*, 1999; Shtutman *et al.*, 2006) wird sowohl im malignen Primärtumorgewebe, als auch in den *Omentum majus* und Lebermetastasen die Spleiß-Variante verstärkt exprimiert. Dennoch ist es wichtig festzuhalten, dass FL-L1CAM in den verschiedenen Geweben ebenfalls induziert bzw. in den Tumorzellen exprimiert wird. Trotz der dominanten Expression von SV-L1CAM im Tumorgewebe ist über seine funktionelle Wirkungsweise nur sehr wenig bekannt. Die Arbeitsgruppe um Shtutman

zeigte in der Brustkrebszelllinie MCF7 durch Überexpression und Suppression der Spleiß-Variante von L1CAM, dass eine positive Rückkopplung zwischen E-Catherin, β -Catenin und SV-L1CAM besteht, der die Migration der Tumorzellen beeinflusst (Shtutman *et al.*, 2006). SV-L1CAM reduziert die Expression von E-Catherin, aktiviert damit die β -Catenin-abhängige Transkription und induziert die Migration der Tumorzellen (Shtutman *et al.*, 2006). Eine ähnliche Wirkungsweise des sog. neuronalen L1CAM, also des vollständigen L1CAM, wurde in Kolorektalkarzinomzellen (SW707, HCT116) gezeigt (Gavert *et al.*, 2005). In dieser Studie konnte ebenfalls durch Überexpression und Suppression von FL-L1CAM belegt werden, dass über L1CAM zum einem die β -Catenin-abhängige Transkription reguliert wird und zum anderen, dass die migratorischen Eigenschaften der SW707- und HCT-116-Zellen positiv beeinflusst werden (Gavert *et al.*, 2005). Promigratorische Effekte von L1CAM wurden auch schon früher beschrieben und wurden ebenfalls mit der vollständigen Expression von L1CAM assoziiert (Mehtesheimer *et al.*, 2001). Dies bedeutet, dass sowohl SV-L1CAM, als auch FL-L1CAM denselben Effekt auslösen können und legt die Hypothese nahe, dass weder Exon 2 noch Exon 27 an den promigratorischen Effekten von L1CAM beteiligt sind. Shtutman *et al.* weist in seiner Publikation auch darauf hin, dass dies keine Spleiß-Varianten-spezifische Wirkungsweise von L1CAM zu sein scheint (Shtutman *et al.*, 2006). Entscheidender für die migratorische Wirkung von L1CAM ist die Spaltung des Zelladhäsionsmoleküls und die entstandene lösliche Form von L1CAM, welche die Migration induziert (Mehtesheimer *et al.*, 2001; Shtutman *et al.*, 2006). Die Überexpression nur der extrazellulären Domäne von SV-L1CAM hatte keinen Effekt auf die Migration der Brustkarzinomzellen. Die Expression des kompletten SV-L1CAM war notwendig, so dass *shedding* von SV-L1CAM möglich war. Für die L1CAM-induzierte Migration scheint somit der tatsächliche Ablauf die Spaltung von L1CAM ein notwendiger Prozess zu sein (Shtutman *et al.*, 2006).

Eine unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Varianten von L1CAM in den späten Phasen der Metastasierung konnte erstmals in unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden. Dabei konnte FL-L1CAM als die Isoform von L1CAM identifiziert werden, die die Kolonisierung von Tumorzellen fördert und nicht die Tumorzell-assoziierten Spleißvariante (Daten von Laura Bickel). Die Ergebnisse konnten durch zwei Modelle der experimentellen Metastasierung, nämlich einem murinen T-Zell-Lymphommodell und einem humanen Fibrosarkommodell, beobachtet werden

(Daten von Laura Bickel). Die Überexpression von FL-1CAM in den murinen T-Zell-Lymphomzellen führte zu einer Induktion der Metastasierung in die Leber. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt und ergänzt werden. Die Bedeutung von L1CAM für die späten Phasen der experimentellen Metastasierung in diesem syngenem Tiermodell wurde durch die Suppression der endogenen Expression von L1CAM bzw. der Überexpression von murinem vollständigen L1CAM gezeigt. Somit führte sowohl die Überexpression von humanen FL-L1CAM, als auch der murinen vollständigen Isoform zu einer Induktion des metastatischen Potentials der Tumorzellen. Die prometastatische Wirkung von L1CAM scheint somit nicht auf eine strikte Spezies, Organ oder Tumorentitäten beschränkt zu sein.

Die murine Form von L1CAM kann ebenfalls in verschiedenen Isoformen exprimiert werden (Reid und Hamperly, 1992), allerdings steht in dieser Arbeit die Wirkungsweise der humanen Isoformen auf Grund der klinischen Relevanz im Vordergrund.

Auch das metastatische Potential einer humanen Fibrosarkomzelllinie, die keine endogene Expression von L1CAM aufweist, konnte durch die Überexpression von FL-L1CAM induziert werden. Allerdings ist eine klinische Relevanz der L1CAM-Expression in T-Zelllymphomen und Fibrosarkomen nicht bekannt, weshalb in dieser Arbeit die Ergebnisse in einem Ovarialkarzinommodell verifiziert werden. Die Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM ist nicht nur mit einer schlechten Prognose für Ovarialkarzinompatientinnen assoziiert (Fogel *et al.*, 2003, Daponte *et al.*, 2008), sondern wird auch als Prognostischer Marker bei Ovarialkarzinomerkkrankungen vorgeschlagen (Fogel *et al.*, 2003).

Verschiedene Studien haben ebenfalls gezeigt, dass L1CAM ein entscheidendes Molekül in der Progression von Ovarialkarzinomzellen darstellt (Arlt *et al.*, 2006; Knogler *et al.*, 2007; Riedle *et al.*, 2009) und beide Varianten in Ovarialkarzinomzellen exprimiert werden (Euer *et al.*, 2005). Zur Untersuchung des funktionellen Effekts beider Isoformen wurden diese in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip, die ebenfalls höhere endogene Expressionslevel der Spleiß-Variante aufweist, überexprimiert. Diese Modifikation der Tumorzellen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate. Die Überexpression jeweils beider Isoformen in L-CI.5s- und HT1080/acZ-K15-Zellen führte ebenfalls nicht zu einer Beeinflussung des Proliferationsverhaltens der Zellen (unveröffentlichte Daten der AG Krüger). Diese Beobachtung, dass durch die Überexpression von L1CAM das

Wachstum verschiedener Zelllinien nicht beeinflusst wird, wurde auch in einer weiteren Studie gemacht (Gast *et al.*, 2005).

Interessanterweise führte nicht die Überexpression der Spleiß-Variante zu einer Induktion des metastatischen Potentials der Ovarialkarzinomzellen, sondern die Überexpression des vollständigen L1CAM. Vergleicht man das metastatische Potential der SV-L1CAM-überexprimierenden Tumorzellen mit dem der Kontrollzellen konnte keine induzierte Lungenmetastasierung festgestellt werden, d.h. die Überexpression von SV-L1CAM hatte keinen Effekt auf die Metastasierung. Dies entkräftet zum Teil das Argument, dass die verstärkte Lungenmetastasierung, hervorgerufen durch FL-L1CAM, durch die ungleiche Expression im Vergleich zu SV-L1CAM entstanden sein könnte. Zudem wird das Ergebnis, dass FL-L1CAM das metastatische Potential der Ovarialkarzinomzellen induziert, in zwei weiteren Metastasierungsmodellen (L-CI.5s und HT1080/*acZ*-K15) bestätigt, obwohl bei beiden Modellen die Spleiß-Variante stärker in den Tumorzellen exprimiert wurde als FL-L1CAM (Daten von Laura Bickel). Dennoch konnte durch FL-L1CAM das metastatische Potential des murinen T-Zell-Lymphoms (L-CI.5s) und des humanen Fibrosarkoms (HT1080/*acZ*-K15) signifikant induziert werden, während SV-L1CAM keinen Einfluss auf die experimentelle Metastasierung der Tumorzellen hatte (Daten von Laura Bickel). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass das vollständig exprimierte L1CAM tumorförderndes Potential besitzt (Gavert *et al.*, 2007). Dafür werden humanes FL-L1CAM überexprimierende Kolorektalkarzinomzellen in die Milz appliziert. Im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte eine verstärkte Dissemination der Tumorzellen in die Leber beobachtet werden (Gavert *et al.*, 2007). Dieses spontane Metastasierungsmodell zeigt zwar nur die Wirkung von L1CAM auf die spontane Dissemination von Tumorzellen und vergleicht nicht direkt die Effekte von FL-L1CAM und SV-L1CAM, aber gibt einen ersten Hinweis, dass FL-L1CAM an Prozessen der Metastasierung beteiligt ist.

Dass die minderexprimierte Isoform eines Gens metastasierungsfördernde Eigenschaften besitzt, konnte auch für das Transmembranprotein CD99 beobachtet werden. CD99 wird in Brustkrebszellen in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert, wobei die Expressionslevel beider Isoformen sich unterscheiden (Hahn *et al.*, 1997). Ähnlich zur Expression der L1CAM-Varianten, gibt es eine schwach exprimierte Isoform und eine dominant exprimierte Variante. Im Gegensatz zur stark exprimierten Isoform führt die minderexprimierte Variante von CD99 zur Induktion der Migration,

MMP9-Expression und Invasion verschiedener Brustkrebszelllinien (Byun *et al.*, 2006), ähnlich der Effekte der L1CAM Isoformen.

6.3 Untersuchungen von potentiellen molekularen Mechanismen der FL-L1CAM-induzierten Metastasierung

Eine wichtige Grundlage zur Identifikation von effizienten Prognosemarkern für die Diagnose von Tumorerkrankungen oder für den Einsatz von therapeutischen Substanzen, wie beispielsweise Antikörpern, Inhibitoren oder Antagonisten, ist das Verständnis der molekularen Mechanismen zur Entstehung von malignen Tumoren. Insbesondere Tumorerkrankungen mit einer für lange Zeit symptomfreien Entstehung und Progression wie beispielsweise das Ovarialkarzinom, könnten in Vorsorgeuntersuchungen früher diagnostiziert werden. In verschiedenen Studien korreliert die L1CAM-Expression mit der Prognose von Ovarialkarzinomen (Fogel *et al.*, 2003; Daponte *et al.*, 2008), weshalb das Zelladhäsionsmolekül auch als potentielles therapeutisches Zielprotein identifiziert werden konnte (Fogel *et al.*, 2003). Die Überexpression von FL-L1CAM führte in Ovarialkarzinomzellen zu einer Induktion des metastatischen Potentials gegenüber den Kontrollzellen. Mit Hilfe von quantitativer RT-PCR wurde die Induktion verschiedener tumorassoziierter Gene in den modifizierten Ovarialkarzinomzellen gemessen. Die Überexpression von FL-L1CAM induzierte im Vergleich zu SV-L1CAM die Expression verschiedener Gene, die mit der Progression von Ovarialkarzinomen assoziiert sind. So steigt beispielsweise der Chemokin-Rezeptor CXCR4 durch die Überexpression von FL-L1CAM in den Tumorzellen an. CXCR4-Expression ist mit einer schlechten Überlebenswahrscheinlichkeit von Ovarialkarzinompatientinnen verbunden und führt in Tiermodellen zu einer induzierten Dissemination von Ovarialkarzinomzellen (Kajiyama *et al.*, 2008). Zudem kann CXCR4 durch die heterodimere Bindung an Rezeptoren der *epidermal growth factor receptor* Familie (EGFR) den EGFR-Signaltransduktionsweg induzieren (Porcile *et al.*, 2005). Die aus vier Transmembranrezeptoren bestehende Proto-Onkogen-Familie ist mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert, darunter auch Ovarialkarzinomen (Salomon *et al.*, 1995). Die Expression des Rezeptors auf mRNA-Ebene wurde durch die Überexpression von FL-L1CAM in den Tumorzellen kaum beeinflusst, dennoch führte die Expression der Spleiß-Variante zu einer deutlichen Reduktion der mRNA-

Expression von EGFR. Die mRNA-Daten konnten im Western Blot nicht bestätigt werden, welcher eine gleich starke Expression des Rezeptors in allen drei Gruppen zeigte. Die mRNA-Expression des EGFR-Liganden, des *epidermal growth factors* (EGF), konnte durch die Überexpression von FL-L1CAM in den Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu SV-L1CAM und der Kontrolle verstärkt werden. EGF ist in der Lage, den EGF-Rezeptor durch autokrine bzw. parakrine Ligandenbindung und die darauf folgende Dimerisierung mit anderen Mitgliedern der EGFR-Familie oder eben heterogenen Bindungspartnern wie beispielsweise CXCR4 zu aktivieren (Kajiyama *et al.*, 2008; Poon *et al.*, 2009). Dadurch werden Effektormoleküle des EGFR-Signalwegs induziert, u.a. *gonadotropin releasing hormone-II* (GnRH-II) (Poon *et al.*, 2009) oder Interleukin-6 (IL-6) sowie die *activator Janus kinase (JAK)2/signal transducer and activator (STAT)3*-Signaltransduktion (Colomiere *et al.*, 2009), wodurch Migration und Invasion der Ovarialkarzinomzellen aktiviert wird (Poon *et al.*, 2009; Colomiere *et al.*, 2009).

Zudem wurde durch die Überexpression von FL-L1CAM, nicht jedoch der Tumorzell-assoziierten Spleiß-Variante die Expression der beiden gelatinolytisch aktiven Matrixmetalloproteinase MMP-2 und MMP-9 in den Ovarialkarzinomzellen verstärkt. Die Expression beider Gelatinasen korreliert mit dem malignen Phänotyp von Ovarialkarzinomen und trägt zum malignen Potential dieser Tumore bei (Schmalfeldt *et al.*, 2001). Durch die Fähigkeit, die EZM und Kollagen IV, einen Bestandteil der Basalmembran, zu degradieren, gelten MMP-2 und -9 als metastasierungsfördernde Proteasen (Björklund *et al.*, 2005). Veränderungen in ihrem Expressionslevel können die Invasivität und damit die Fähigkeit zu metastasieren von Tumorzellen beeinflussen (Coussens *et al.*, 2002). Vor allem die Aktivität von MMP-2 konnte in humanem Patientenmaterial von malignen Ovarialkarzinomen sowie in *Omentum majus*-Metastasen detektiert werden (Schmalfeldt *et al.*, 2001). MMP-2 scheint ein wichtiger Mediator der Tumorprogression von Ovarialkarzinomen zu sein, da MMP-2 auch die Extravasation von Ovarialkarzinomzellen ermöglicht und die frühzeitige Bildung von Metastasen induziert (Kenny *et al.*, 2008; Kenny und Lengyel, 2009). Die Aktivität von gelatinolytischen Proteasen war in der vorliegenden Arbeit auch in den Lungenmetastasen von SKOV3ip zu erkennen. Allerdings führte die Überexpression von FL-L1CAM in den SKOV3ip in den daraus entstandenen Metastasen zu einem stärkeren Abbau der Gelatine in der *In-situ*-Zymographie im Vergleich zu SKOV3ip-SV-L1CAM tragenden Metastasen und der Kontrolle. Damit konnte zum ersten Mal

ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung gelatinolytischer Proteasen und der Expression von L1CAM bzw. des vollständigen L1CAM (FL-L1CAM) gezeigt werden. Da FL-L1CAM nicht nur das metastatische Potential von Ovarialkarzinomzellen induzierte, sondern auch die Metastasierung eines T-Zell-Lymphoms und eines Fibrosarkoms verstärkte, wurde die gelatinolytische Aktivität auch in diesen Modellen im Vergleich zur Überexpression von SV-L1CAM und der jeweiligen Kontrollzelllinie untersucht. Die humane Fibrosarkomzelllinie HT1080/*lacZ*-K15 eignet sich auf Grund ihrer fehlenden endogenen Expression von L1CAM dazu, denn durch FL-L1CAM bzw. SV-L1CAM ausgelösten molekularen Mechanismus zu untersuchen. In diesem Modell konnte die Lungenmetastasierung durch die Expression von FL-L1CAM induziert werden. In der Tat konnte auch durch die Überexpression von FL-L1CAM eine gesteigerte mRNA-Expression von MMP-2 und -9 sowie eine verstärkte Aktivität der beiden Gelatinasen *in vitro* gezeigt werden. Auf mRNA-Ebene wird die Expression von MMP-2 und -9 sowohl durch die Überexpression von FL-L1CAM, aber auch von SV-L1CAM induziert. Auf die Aktivität der beiden Gelatinasen hat die Überexpression von SV-L1CAM allerdings keinen Effekt. Auch *in vivo* wird eine verstärkte gelatinolytische Aktivität in FL-L1CAM-exprimierenden HT1080/*lacZ*-K15 tragenden Metastasen deutlich und es kann keine induzierte Aktivität durch die Überexpression von SV-L1CAM beobachtet werden. Es konnte schon in früheren Studien gezeigt werden, dass die Invasivität der HT1080 Zellen, der parentalen Zelllinie des hier verwendeten *lacZ*-markierten Klons HT1080/*lacZ*-K15, von der Expression von MMP-2 und -9 beeinflusst wird (Li *et al.*, 2009; Subarsky und Hill, 2008).

Zum ersten Mal wird die Expression von FL-L1CAM mit der Regulation der Expression und Aktivität von Gelatinasen in Verbindung gebracht. Die Induktion von gelatinolytischer Aktivität konnte auch mit einer weiteren Tumorzelllinie, der murinen T-Zell-Lymphomzelllinie L-CI.5s, bestätigt werden. Die experimentelle Metastasierung konnte in diesem Modell durch die Überexpression des humanen FL-L1CAM induziert werden, während die exogene Expression von SV-L1CAM keinen Einfluss auf die Metastasenbildung im Vergleich zu den Kontrollzelllinien hatte (Daten von Laura Bickel). In Übereinstimmung mit den zuvor gemachten Beobachtungen mit Ovarialkarzinom- und Fibrosarkomzellen kann durch die Überexpression von FL-L1CAM in den L-CI.5s-Zellen eine Induktion der gelatinolytischen Aktivität in den Lebermetastasen im Vergleich zur Kontrolle gezeigt

werden. Die Überexpression der Spleiß-Variante führte zu keinen verstärkten Effekten im Vergleich zur Kontrolle. Obwohl MMP-2 und MMP-9 *in vitro* in den T-Zell-Lymphomzellen nicht bzw. kaum exprimiert werden, hängt die Aggressivität des verwendeten T-Zell-Lymphommodells *in vivo* von der Expression von MMP-2 und -9 ab (Gerg *et al.*, 2008). So konnte gezeigt werden, dass durch Anwendung von RNAi-Technologie gegen jeweils MMP-2 oder -9 in den L-CI.5s-Zellen, das Auswachsen der Metastasen im Lebergewebe durch MMP-2 und die sekundäre Invasion der Tumorzellen durch MMP-9 beeinflusst wird (Gerg *et al.*, 2008).

In drei verschiedenen Tumorzellmodellen konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von FL-L1CAM und einer Regulation bzw. Aktivierung der Expression von MMP-2 und -9, aber auch einer verstärkten gelatinolytischen Aktivität *in vivo* beobachtet werden. Ein möglicher Signaltransduktionsweg der zur verstärkten Expression von MMP-2 und MMP-9 führen könnte, ist der EGFR-Signalweg. L1CAM kann direkt mit dem EGF-Rezeptor eine autokrine Ligandenbindung eingehen, die zur Phosphorylierung des Rezeptors führt (Islam *et al.*, 2004). Zudem konnte *in vitro* durch die verstärkte Expression von FL-L1CAM, nicht jedoch der Spleiß-Variante eine Induktion der beiden Aktivatoren von EGFR, nämlich CXCR4 und EGF (Kajiyama *et al.*, 2008; Poon *et al.*, 2009), in den Ovarialkarzinomzellen auf mRNA-Ebene analysiert werden. Durch die Phosphorylierung des Rezeptors werden Effektormoleküle wie der *signal transducer and activator-3* (STAT-3), *downstream* von EGFR phosphoryliert und hierdurch aktiviert (Colomiere *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2003). Dies wiederum führt zur Transkription von Zielmolekülen, u.a. von MMP-2 (Xie *et al.*, 2004), einer durch FL-L1CAM induzierte Protease. Der EGFR kann auch in den Nukleus transportiert werden und eine direkte Bindung mit dem Transkriptionsfaktor STAT3 eingehen und zur Transkription von Zielmolekülen führen (Lo *et al.*, 2005). Die Translokation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) zur direkten Aktivierung von Signaltransduktionswegen ist kein unbekannter Mechanismus. So kann auch der *transforming growth factor- β type 1 receptor* (TGF- β R1) in den Nukleus transportiert werden, um dort durch die Bindung an die Transkriptionsfaktoren SMADs, die Expression von Zielmolekülen zu aktivieren (Reguly und Wrana, 2003; Zwaagstra *et al.*, 2000).

Die Aktivierung des EGFR-Signalwegs konnte allerdings in der Western-Blot-Analyse des Zelllysats der modifizierten Tumorzelllinien *in vitro* nicht bestätigt werden. Wobei über die Aktivierung des Signalwegs durch Translokation von EGFR in den Nukleus

keine Aussagen gemacht werden können. In keiner der drei verwendeten Zelllinien (SKOV3ip, HT1080 und L-CI.5s) konnte durch Überexpression von entweder FL-L1CAM oder SV-L1CAM die Expression bzw. die Aktivität von EGFR und STAT3 im Vergleich zur Kontrolle beeinflusst werden. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass eine Aktivierung dieses Signaltransduktionswegs *in vivo* stattfindet und zu der FL-L1CAM-induzierten Metastasierung beiträgt. Allerdings kann dieser Signaltransduktionsweg nicht für die *in vitro* beobachtete Aktivierung von MMP-2 und -9 verantwortlich gemacht werden.

Weitere L1CAM-induzierte Signaltransduktionswege können die Invasion verschiedener Tumorzellen einleiten. In Ovarialkarzinomzellen führt die Interaktion von L1CAM und dem *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) nicht nur zu einer Induktion der Proliferation, sondern auch zu einer verstärkten Invasion der Zellen *in vitro* (Zecchini *et al.*, 2008). Die Invasivität von Kolorektalkarzinomzellen kann durch die verstärkte Expression von L1CAM und die damit einhergehende Aktivierung des β -Catenin/*T-cell factor* (TCF)-Signalwegs induziert werden. Die mögliche Relevanz dieser beiden Signaltransduktionswege bei der FL-L1CAM-induzierten Aktivierung von gelatinolytisch-aktiven Proteasen bleibt aber zu evaluieren.

Intensiver untersucht ist hingegen die Aktivierung des metastasierungsassoziierten *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-Signalwegs durch die Expression von L1CAM in verschiedenen Tumorzelllinien (Welch *et al.*, 2000; Silletti *et al.*, 2004; Zecchini *et al.*, 2008; Novak-Hofer *et al.*, 2008; Gast *et al.*, 2008). Die Phosphorylierung von ERK ist von der Expression des Zelladhäsionsmoleküls abhängig und führt zu einem invasiveren Phänotyp der Tumorzellen (Siletti *et al.*, 2004; Gast *et al.*, 2008). In Mausfibroblasten führt die Interaktion von L1CAM mit ERK 2 sowohl zu einer Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von L1CAM bei Ser¹²⁰⁴ und Ser¹²⁴⁸, aber auch zur Aktivierung von ERK 2 (Schäfer *et al.*, 1999). Entscheidend für die Aktivierung von ERK 2 ist die Internalisierung von L1CAM, welche notwendig ist für die Wechselbeziehung von ERK und L1CAM (Schäfer *et al.*, 1999). Für die Clathrin-abhängige Endozytose von L1CAM-tragenden Vesikeln ist allerdings die cytoplasmatische RSLE-Sequenz bedeutsam, welche für das Exon 27 von L1CAM kodiert (Long *et al.*, 2001). Durch die Expression von Exon 27 kann L1CAM zwei- bis dreimal schneller internalisiert werden als eine mutierte Form von L1CAM, deren RSLE-Sequenz fehlt (Long *et al.*, 2001). Somit könnte FL-L1CAM die Aktivierung von ERK im Gegensatz zur Spleiß-Variante induzieren.

Für die ERK-Aktivierung selber ist dann eine Peptidsequenz (TSPINP) in der cytoplasmatischen Domäne von L1CAM notwendig, die von Exon 27 unabhängig ist (Gast *et al.*, 2008). Obwohl diese Studien zum Teil in SKOV3ip durchgeführt wurden (Gast *et al.*, 2008), konnte in dieser Arbeit keine Induktion des ERK-Signalwegs beobachtet werden. Weder die Überexpression von FL-L1CAM, das für Exon 27 kodiert, noch die der Spleiß-Variante zeigte eine Induktion bzw. Reduktion der Phosphorylierung von ERK im Vergleich zur Kontrollzelllinie in den Western-Blot-Analysen. Dasselbe Bild ergab sich auch für die beiden anderen Tumorzellmodelle, d.h. auch hier konnte kein Unterschied der Phosphorylierung von ERK im Vergleich der jeweiligen Kontrolle zur Überexpression von FL-L1CAM bzw. SV-L1CAM beobachtet werden. Durch die unterschiedlichen Fragestellungen der Studien wurde der Versuchsaufbau der Fragestellung in dieser Arbeit angepasst, wodurch Inkubationszeit, Zelldichte und Serumbedingungen im Medium sich von dem Versuchsaufbau der anderen Studien unterscheiden. Bei der Fragestellung dieser Arbeit hatte der ERK-Signalweg keinen Einfluss auf die MMP-2- und -9-Aktivität der modifizierten Zelllinien, zumindest nicht *in vitro*.

Der molekulare Unterschied zwischen FL-L1CAM und der Tumorzell-assoziierten Spleiß-Variante liegt in der Expression von Exon 2 und Exon 27. Die Induktion des metastatischen Potentials von verschiedenen Tumorzellen durch die Überexpression von FL-L1CAM und nicht seiner sog. Tumorzell-assoziierten Spleiß-Variante lässt auch auf eine potentiell wichtige Rolle von Exon 2 schließen. So werden homophile Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen über L1CAM durch Exon 2 initiiert (De Angelis *et al.*, 2001; Gouveia *et al.*, 2008), aber auch Wechselbeziehungen mit heterophilen Bindungspartnern wie dem Zelladhäsionsmolekül Axonin-1 werden hierüber vermittelt (De Angelis *et al.*, 2001). Somit ist die Translation von Exon 2 vor allem mit den Adhäsionseigenschaften von L1CAM assoziiert und könnte damit für den Prozess der Extravasation der Tumorzellen aus dem Blutgefäß bzw. Lymphgefäß in das Organ notwendig sein und sollte über die in dieser Arbeit untersuchten molekularen Effekten hinaus evaluiert werden.

Die Hypothese, dass die Expression beider Exons für die prometastatischen Eigenschaften der Tumorzellen verantwortlich ist, wird durch eine weitere Studie von Gavert *et al.* unterstützt (Gavert *et al.*, 2007). Dabei wurde die spontane Dissemination von humanen Kolorektalkarzinomzellen in die Leber nach Injektion der Tumorzellen in die Milz analysiert. Durch die Überexpression der cytoplasmatischen

Domäne mit Exon 27 bzw. der extrazellulären Domäne mit Exon 2 in den Tumorzellen konnte keine Induktion der Dissemination der Kolorektalkarzinomzellen in die Leber beobachtet werden (Gavert *et al.*, 2008). Es konnte in diesem Versuchsansatz das metastatische Potential der Tumorzellen nicht durch die Expression entweder von Exon 2 oder Exon 27 verstärkt werden. Deshalb könnte hypothetisiert werden, dass das metastatische Potential der Tumorzellen nur durch eine gleichzeitige Expression der beiden Exons induziert werden kann.

6.4 Ausblick

Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM ist mit der Progression vieler verschiedener Tumorerkrankungen assoziiert und wird in präklinischen Studien als potentielles therapeutisches Angriffsziel untersucht (Arlt *et al.*, 2006; Knogler *et al.*, 2007; Novak-Hofer *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde die funktionelle Wirkungsweise von L1CAM auf die späten Phasen der Metastasierung, d.h. die Extravasation und Invasion der Tumorzellen ins Wirtsgewebe analysiert. Dabei wurde der Fokus insbesondere auf die molekulare Wirkungsweise des vollständig exprimierten humanen L1CAM und seiner Spleiß-Variante, deren Exon 2 und Exon 27 deletiert sind, gelegt. Hierbei wurde FL-L1CAM als die prometastatische Variante von L1CAM identifiziert und nicht die sog. Tumorzell-assoziierte Spleiß-Variante. In weiteren Untersuchungen kann nun die Bedeutung von entweder Exon 2 oder Exon 27 bzw. die simultane Expression beider Exons durch Herstellung von Exondeletions-Mutanten evaluiert werden. Zudem kann durch weitere Signaltransduktionsanalysen *in vitro* und *in vivo* die molekulare Funktionsweise von FL-L1CAM und SV-L1CAM analysiert werden und unter Zu-Hilfe-Nahme der Deletionsmutanten die Rolle der beiden Exons untersucht werden. Dabei sollte auch auf die adhäsionsfördernde Wirkung von Exon 2 eingegangen werden und mit Adhäsionsassays ein eventueller Zusammenhang zwischen der Expression von Exon 2 und der prometastatischen Wirkung von FL-L1CAM untersucht werden. Die molekulare Wirkungsweise der Spleiß-Variante von L1CAM konnte bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht evaluiert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SV-L1CAM keinen Einfluss auf die späten Phasen der Metastasierung hat und in einer weiteren Studie wurde belegt, dass speziell die Spleiß-Variante auch in den frühen Phasen der Metastasierung (EMT) keine explizite Rolle zu spielen scheint (Shtutman *et al.*, 2006). Auf Grund der hohen

Expressionslevel von SV-L1CAM in den Tumorzellen und den Patientenproben des Ovarialkarzinoms könnte eine Bedeutung dieser Isoform in der Tumorentstehung bzw. dem Auswachsen des Tumors zu finden sein. Die Ergebnisse der Korrelation der Expression beider Isoformen mit der Progression von humanen Ovarialkarzinomen wurde aus wenigen Patientenproben hergestellt, so dass durch die Durchführung einer größeren präklinischen Studie die Signifikanz der gefundenen Ergebnisse in der Klinik untermauert werden könnte.

Eine weitere Fragestellung ergibt sich zudem durch die tumorfördernde Wirkung des *sheddings* von L1CAM durch ADAM-10. Ungeklärt ist vor allem die Wirkung der entstehenden *Shedding*-Produkte von L1CAM (cytoplasmatischer und extrazellulärer Rest) im Hinblick auf die prometastatischen Effekte des Zelladhäsionsmoleküls. Dabei sollten die Tumormikroumgebung sowie die Faktoren der Wirtsumgebung nicht vernachlässigt werden. Erste Versuche zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden im Labor schon unternommen, im Speziellen die Rolle von L1CAM und seiner Sheddasen bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung.

7 Literaturverzeichnis

Allory Y, Matsuoka Y, Bazille C, Christensen EI, Ronco P, Debiec H (2005). The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res* **11**: 1190-7.

Appel F, Holm J, Conscience JF, von Bohlen und Halbach F, Faissner A, James P *et al* (1995). Identification of the border between fibronectin type III homologous repeats 2 and 3 of the neural cell adhesion molecule L1 as a neurite outgrowth promoting and signal transducing domain. *J Neurobiol* **28**: 297-312.

Arima T, Enokida H, Kubo H, Kagara I, Matsuda R, Toki K *et al* (2007). Nuclear translocation of ADAM-10 contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer. *Cancer Sci* **98**: 1720-6.

Arlt MJ, Novak-Hofer I, Gast D, Gschwend V, Moldenhauer G, Grunberg J *et al* (2006). Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment. *Cancer Res* **66**: 936-43.

Asou H, Miura M, Kobayashi M, Uyemura K (1992). The cell adhesion molecule L1 has a specific role in neural cell migration. *Neuroreport* **3**: 481-4.

Bao S, Wu Q, Li Z, Sathornsumetee S, Wang H, McLendon RE *et al* (2008). Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res* **68**: 6043-8.

Bateman A, Jouet M, MacFarlane J, Du JS, Kenwrick S, Chothia C (1996). Outline structure of the human L1 cell adhesion molecule and the sites where mutations cause neurological disorders. *Embo J* **15**: 6050-9.

Beer S, Oleszewski M, Gutwein P, Geiger C, Altevogt P (1999). Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J Cell Sci* **112 (Pt 16)**: 2667-75.

Björklund M, Koivunen E (2005). Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1755**: 37-69.

Blaess S, Kammerer RA, Hall H (1998). Structural analysis of the sixth immunoglobulin-like domain of mouse neural cell adhesion molecule L1 and its interactions with alpha(v)beta3, alpha(IIb)beta3, and alpha5beta1 integrins. *J Neurochem* **71**: 2615-25.

Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W (1993). Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* **331**: 134-40.

Bonnerot C, Rocancourt D, Briand P, Grimber G, Nicolas JF (1987). A beta-galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6795-9.

Boo YJ, Park JM, Kim J, Chae YS, Min BW, Um JW *et al* (2007). L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* **14**: 1703-11.

Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**: 391-8.

Brummendorf T, Rathjen FG (1993). Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem* **61**: 1207-19.

Byun HJ, Hong IK, Kim E, Jin YJ, Jeoung DI, Hahn JH *et al* (2006). 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**: 34833-47.

Castellani V, De Angelis E, Kenwrick S, Rougon G (2002). Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *Embo J* **21**: 6348-57.

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

Cheng L, Itoh K, Lemmon V (2005). 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**: 395-403.

Colomiere M, Ward AC, Riley C, Trenerry MK, Cameron-Smith D, Findlay J *et al* (2009). Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. *Br J Cancer* **100**: 134-44.

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* **295**: 2387-92.

Coussens LM, Werb Z (2002). Inflammation and cancer. *Nature* **420**: 860-7.

Daponte A, Kostopoulou E, Kollia P, Papamichali R, Vanakara P, Hadjichristodoulou C *et al* (2008). L1 (CAM) (CD171) in ovarian serous neoplasms. *Eur J Gynaecol Oncol* **29**: 26-30.

De Angelis E, Brummendorf T, Cheng L, Lemmon V, Kenwrick S (2001). Alternative use of a mini exon of the L1 gene affects L1 binding to neural ligands. *J Biol Chem* **276**: 32738-42.

Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM (2008). Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* **214**: 283-93.

Duffy MJ, McKiernan E, O'Donovan N, McGowan PM (2009). The role of ADAMs in disease pathophysiology. *Clin Chim Acta* **403**: 31-6.

Ebeling O, Duczmal A, Aigner S, Geiger C, Schollhammer S, Kemshead JT *et al* (1996). L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur J Immunol* **26**: 2508-16.

Edlund M, Sung SY, Chung LW (2004). Modulation of prostate cancer growth in bone microenvironments. *J Cell Biochem* **91**: 686-705.

Euer NI, Kaul S, Deissler H, Mobus VJ, Zeillinger R, Weidle UH (2005). Identification of L1CAM, Jagged2 and Neuromedin U as ovarian cancer-associated antigens. *Oncol Rep* **13**: 375-87.

Faissner A, Kruse J, Nieke J, Schachner M (1984). Expression of neural cell adhesion molecule L1 during development, in neurological mutants and in the peripheral nervous system. *Brain Res* **317**: 69-82.

Faissner A, Teplow D, Kubler D, Keilhauer G, Kinzel V, Schachner M (1985). Biosynthesis and membrane topography of the neuronal cell adhesion molecule L1. *EMBO J* **4**: 3105-13

Felding-Habermann B, Silletti S, Mei F, Siu CH, Yip PM, Brooks PC *et al* (1997). A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *J Cell Biol* **139**: 1567-81.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* **18**: 581-92.

Fidler IJ (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**: 453-8.

Fingleton B (2003). Matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy: the current situation and future prospects. *Expert Opin Ther Targets* **7**: 385-97.

Fogel M, Gutwein P, Mechttersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A *et al* (2003). L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* **362**: 869-75.

Fokas E, Engenhardt-Cabillic R, Daniilidis K, Rose F, An HX (2007). Metastasis: the seed and soil theory gains identity. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 705-15.

Fransen E, Van Camp G, Vits L, Willems PJ (1997). L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Hum Mol Genet* **6**: 1625-32.

Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol* **125**: 669-80.

Gast D, Riedle S, Issa Y, Pfeifer M, Beckhove P, Sanderson MP *et al* (2008). The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies. *Oncogene* **27**: 1281-9.

Gast D, Riedle S, Schabath H, Schlich S, Schneider A, Issa Y *et al* (2005). L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* **115**: 658-665.

Gavert N, Ben-Shmuel A, Raveh S, Ben-Ze'ev A (2008). L1-CAM in cancerous tissues. *Expert Opin Biol Ther* **8**: 1749-57.

Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T *et al* (2005). L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* **168**: 633-42.

Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T *et al* (2007). Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res* **67**: 7703-12.

Geiger TR, Peeper DS (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1796**: 293-308.

Gerg M, Kopitz C, Schaten S, Tschukes A, Kahlert C, Stangl M *et al* (2008). Distinct Functionality of Tumor Cell-Derived Gelatinases during Formation of Liver Metastases. *Mol Cancer Res* **6**: 341-51.

Ghigna C, Valacca C, Biamonti G (2008). Alternative splicing and tumor progression. *Curr Genomics* **9**: 556-70.

Gouveia RM, Gomes CM, Sousa M, Alves PM, Costa J (2008). Kinetic analysis of L1 homophilic interaction: role of the first four immunoglobulin domains and implications on binding mechanism. *J Biol Chem* **283**: 28038-47.

Gupta GP, Massague J (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **127**: 679-95.

Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Gast D, Joumaa S *et al* (2003). ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *Faseb J* **17**: 292-4.

Gutwein P, Oleszewski M, Mechtersheimer S, Agmon-Levin N, Krauss K, Altevogt P (2000). Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J Biol Chem* **275**: 15490-7.

Gutwein P, Stoeck A, Riedle S, Gast D, Runz S, Condon TP *et al* (2005). Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **11**: 2492-501.

Hall H, Djonov V, Ehrbar M, Hoechli M, Hubbell JA (2004). Heterophilic interactions between cell adhesion molecule L1 and alphavbeta3-integrin induce HUVEC process extension in vitro and angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* **7**: 213-23.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Hancox RA, Allen MD, Holliday DL, Edwards DR, Pennington CJ, Guttery DS *et al* (2009). Tumour-associated tenascin-C isoforms promote breast cancer cell invasion and growth by matrix metalloproteinase-dependent and independent mechanisms. *Breast Cancer Res* **11**: R24.

Heiz M, Grunberg J, Schubiger PA, Novak-Hofer I (2004). Hepatocyte growth factor-induced ectodomain shedding of cell adhesion molecule L1: role of the L1 cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **279**: 31149-56.

Hess KR, Varadhachary GR, Taylor SH, Wei W, Raber MN, Lenzi R *et al* (2006). Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer* **106**: 1624-33.

Hlavin ML, Lemmon V (1991). Molecular structure and functional testing of human L1CAM: an interspecies comparison. *Genomics* **11**: 416-23.

Hoffman RM (1999). Green fluorescent protein to visualize cancer progression and metastasis. *Methods Enzymol* **302**: 20-31.

Hortsch M (2000). Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci* **15**: 1-10.

Husemann Y, Klein CA (2009). The analysis of metastasis in transgenic mouse models. *Transgenic Res* **18**: 1-5.

Islam R, Kristiansen LV, Romani S, Garcia-Alonso L, Hortsch M (2004). Activation of EGF receptor kinase by L1-mediated homophilic cell interactions. *Mol Biol Cell* **15**: 2003-12.

Janes PW, Saha N, Barton WA, Kolev MV, Wimmer-Kleikamp SH, Nievergall E *et al* (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* **123**: 291-304.

Jodele S, Blavier L, Yoon JM, DeClerck YA (2006). Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* **25**: 35-43.

Johansson M, Denardo DG, Coussens LM (2008). Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol Rev* **222**: 145-54.

Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD *et al* (2003). Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* **302**: 2141-4.

Joyce JA, Pollard JW (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* **9**: 239-52.

Kaifi JT, Reichelt U, Quaas A, Schurr PG, Wachowiak R, Yekebas EF *et al* (2007). L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer. *Mod Pathol* **20**: 1183-90.

Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F (2008). Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer* **122**: 91-9.

Kalluri R, Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**: 1420-8.

Keller S, König AK, Marme F, Runz S, Wolterink S, Koensgen D *et al* (2009). Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett* **278**: 73-81.

Kenny HA, Kaur S, Coussens LM, Lengyel E (2008). The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest* **118**: 1367-79.

Kenny HA, Lengyel E (2009). MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis. *Cell Cycle* **8**: 683-8.

Kinsey DL (1960). An experimental study of preferential metastasis. *Cancer* **13**: 674-6.

Kleene R, Yang H, Kutsche M, Schachner M (2001). The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J Biol Chem* **276**: 21656-63.

Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, de Bont ES (2004). The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**: 87-100.

Knogler K, Grunberg J, Zimmermann K, Cohrs S, Honer M, Ametamey S *et al* (2007). Copper-67 radioimmunotherapy and growth inhibition by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibodies in a therapy model of ovarian cancer metastasis. *Clin Cancer Res* **13**: 603-11.

Kohutek ZA, diPierro CG, Redpath GT, Hussaini IM (2009). ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J Neurosci* **29**: 4605-15.

Kopitz C, Gerg M, Bandapalli OR, Ister D, Pennington CJ, Hauser S *et al* (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res* **67**: 8615-23.

Kopitz C, Gerg M, Gansbacher B, Krüger A (2008). Plasminogen activator inhibitor-2, but not cystatin C, inhibits the prometastatic activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the liver. *Hum Gene Ther* **19**: 1039-49.

Kowitz A, Kadmon G, Eckert M, Schirmmacher V, Schachner M, Altevogt P (1992). Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur J Immunol* **22**: 1199-205.

Krüger A (2009 b). Functional genetic mouse models: promising tools for investigation of the proteolytic internet. *Biol Chem* **390**: 91-7.

Krüger A, Kates RE, Edwards DR (2009). Avoiding spam in the proteolytic internet: Future strategies for anti-metastatic MMP inhibition. *Biochim Biophys Acta*.

Krüger A, Krebs T, Banke IJ (2007). [Anti-metastatic effects of serine protease inhibitors: animal models for analysis]. *Hamostaseologie* **27**: 64-70.

Krüger A, Schirmmacher V, Khokha R (1998). The bacterial lacZ gene: an important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev* **17**: 285-94.

Krüger A, Schirmmacher V, von Hoegen P (1994). Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of lacZ-labeled metastasized lymphoma cells. *Int J Cancer* **58**: 275-84.

Kuhn TB, Stoeckli ET, Condrau MA, Rathjen FG, Sonderegger P (1991). Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol* **115**: 1113-26.

Kulahin N, Li S, Hinsby A, Kiselyov V, Berezin V, Bock E (2008). Fibronectin type III (FN3) modules of the neuronal cell adhesion molecule L1 interact directly with the fibroblast growth factor (FGF) receptor. *Mol Cell Neurosci* **37**: 528-36.

Kulahin N, Li S, Kiselyov V, Bock E, Berezin V (2009). Identification of neural cell adhesion molecule L1-derived neuritogenic ligands of the fibroblast growth factor receptor. *J Neurosci Res* **87**: 1806-12.

Langley RR, Fidler IJ (2007). Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev* **28**: 297-321.

Li LH, Baek IK, Kim JH, Kang KH, Koh YS, Jung YD *et al* (2009). Methanol extract of *Elaeagnus glabra*, a Korean medicinal plant, inhibits HT1080 tumor cell invasion. *Oncol Rep* **21**: 559-63.

Lin S, Lee M, Ke F, Lee P, Huang C, Ip M (2001). TGF β 1 stimulates the secretion of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and the invasive behavior in human ovarian cancer cells, which is suppressed by MMP inhibitor BB3103. *Clin Exp Metastasis* **18**:493-499.

Lindner J, Rathjen FG, Schachner M (1983). L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* **305**: 427-30.

Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y *et al* (2005). Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* **7**: 575-89.

Long KE, Asou H, Snider MD, Lemmon V (2001). The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J Biol Chem* **276**: 1285-90.

Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D *et al* (2005). L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol* **25**: 9040-53.

Matthies KM, Newman JL, Hodzic A, Wingett DG (2006). Differential regulation of soluble and membrane CD40L proteins in T cells. *Cell Immunol* **241**: 47-58.

McCulloch DR, Akl P, Samaratunga H, Herington AC, Odorico DM (2004). Expression of the disintegrin metalloprotease, ADAM-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP. *Clin Cancer Res* **10**: 314-23.

Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S *et al* (2001). Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* **155**: 661-73.

Meli ML, Carrel F, Waibel R, Amstutz H, Crompton N, Jaussi R *et al* (1999). Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer* **83**: 401-8.

Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK *et al* (1994). Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* **127**: 1703-15.

Mochizuki S, Okada Y (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci* **98**: 621-8.

Montgomery AM, Becker JC, Siu CH, Lemmon VP, Cheresch DA, Pancook JD *et al* (1996). Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol* **132**: 475-85.

Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Fruh K, Schachner M (1988). Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* **334**: 701-3.

Morrison CJ, Butler GS, Rodriguez D, Overall CM (2009). Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 645-53.

Muraguchi T, Takegami Y, Ohtsuka T, Kitajima S, Chandana EP, Omura A *et al* (2007). RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat Neurosci* **10**: 838-45.

Murphy G (2009). Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the 'Sheddases'. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 138-45.

Murphy G, Murthy A, Khokha R (2008). Clipping, shedding and RIPPing keep immunity on cue. *Trends Immunol* **29**: 75-82.

Nagase H, Visse R, Murphy G (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* **69**: 562-73.

Nayeem N, Silletti S, Yang X, Lemmon VP, Reisfeld RA, Stallcup WB *et al* (1999). A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J Cell Sci* **112 (Pt 24)**: 4739-49.

Nguyen DX, Bos PD, Massague J (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* **9**: 274-84.

Novak-Hofer I, Cohrs S, Grunberg J, Friedli A, Schlatter MC, Pfeifer M *et al* (2008). Antibodies directed against L1-CAM synergize with Genistein in inhibiting growth and survival pathways in SKOV3ip human ovarian cancer cells. *Cancer Lett* **261**: 193-204.

Overall CM, Dean RA (2006). Degradomics: Systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **25**: 69-75.

Overall CM, Kleinfeld O (2006). Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6**: 227-39.

Overall CM, Lopez-Otin C (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* **2**: 657-72.

Persohn E, Schachner M (1987). Immunoelectron microscopic localization of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM during postnatal development of the mouse cerebellum. *J Cell Biol* **105**: 569-76.

Poon SL, Hammond GT, Leung PC (2009). Epidermal growth factor-induced GnRH-II synthesis contributes to ovarian cancer cell invasion. *Mol Endocrinol* **23**: 1646-56.

Porcile C, Bajetto A, Barbieri F, Barbero S, Bonavia R, Biglieri M *et al* (2005). Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation. *Exp Cell Res* **308**: 241-53.

Primiano T, Baig M, Maliyekkel A, Chang BD, Fellars S, Sadhu J *et al* (2003). Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements. *Cancer Cell* **4**: 41-53.

Pruessmeyer J, Ludwig A (2009). The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 164-74.

Psaila B, Lyden D (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* **9**: 285-93.

Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO (1997). Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* **181**: 64-78.

Rathjen FG, Schachner M (1984). Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *Embo J* **3**: 1-10.

Raveh S, Gavert N, Ben-Ze'ev A (2009). L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors. *Cancer Lett* **282**: 137-45.

Reguly T, Wrana JL (2003). In or out? The dynamics of Smad nucleocytoplasmic shuttling. *Trends Cell Biol* **13**: 216-20.

Reiss K, Ludwig A, Saftig P (2006). Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacol Ther* **111**: 985-1006.

Reiss K, Saftig P (2009). The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 126-37.

Renkiewicz R, Qiu L, Lesch C, Sun X, Devalaraja R, Cody T *et al* (2003). Broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor marimastat-induced musculoskeletal side effects in rats. *Arthritis Rheum* **48**: 1742-9.

Riedle S, Kiefel H, Gast D, Bondong S, Wolterink S, Gutwein P *et al* (2009). Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *Biochem J* **420**: 391-402.

Robbins EW, Travanty EA, Yang K, Iczkowski KA (2008). MAP kinase pathways and calcitonin influence CD44 alternate isoform expression in prostate cancer cells. *BMC Cancer* **8**: 260.

Roy M, Xu Q, Lee C (2005). Evidence that public database records for many cancer-associated genes reflect a splice form found in tumors and lack normal splice forms. *Nucleic Acids Res* **33**: 5026-33.

Sadoul K, Sadoul R, Faissner A, Schachner M (1988). Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* **50**: 510-21.

Salomon D, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* **19**:183-232.

Sato K, Nagao T, Iwasaki T, Nishihira Y, Fukami Y (2003). Src-dependent phosphorylation of the EGF receptor Tyr-845 mediates Stat-p21waf1 pathway in A431 cells. *Genes Cells* **8**: 995-1003.

Sawyer C, Hiles I, Page M, Crompton M, Dean C (1998). Two erbB-4 transcripts are expressed in normal breast and in most breast cancers. *Oncogene* **17**: 919-24.

Schäfer AW, Kamei Y, Kamiguchi H, Wong EV, Rapoport I, Kirchhausen T *et al* (2002). L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J Cell Biol* **157**: 1223-32.

Schäfer AW, Kamiguchi H, Wong EV, Beach CM, Landreth G, Lemmon V (1999). Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J Biol Chem* **274**: 37965-73.

Schelter F, Kobuch J, Moss ML, Becherer JD, Comoglio PM, Boccaccio C, Krüger A (2010). A Disintegrin and Metalloproteinase-10 (ADAM-10) Mediates DN30 Antibody-induced Shedding of the Met Surface Receptor. *J Biol Chem* **285**: 26335-40.

Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, Spathe K, Rutke S, Konik E *et al* (2001). Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **7**: 2396-404.

Schor IE, Rascovan N, Pelisch F, Allo M, Kornbliht AR (2009). Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4325-30.

Schrötmair F, Kopitz C, Halbgewachs B, Lu F, Algul H, Brunner N *et al* (2009). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by host-derived urokinase-type plasminogen activator. *J Cell Mol Med*.

Scotlandi K, Zuntini M, Manara MC, Sciandra M, Rocchi A, Benini S *et al* (2007). CD99 isoforms dictate opposite functions in tumour malignancy and metastases by activating or repressing c-Src kinase activity. *Oncogene* **26**: 6604-18.

Seals DF, Courtneidge SA (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* **17**: 7-30.

Shtutman M, Levina E, Ohouo P, Baig M, Roninson IB (2006). Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res* **66**: 11370-80.

Silletti S, Yebra M, Perez B, Cirulli V, McMahon M, Montgomery AM (2004). Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. *J Biol Chem* **279**: 28880-8.

Skrzydłewska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S (2005). Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* **11**: 1251-66.

Smith K, Gaultier A, Cousin H, Alfandari D, White J, DeSimone D, The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function *in vivo*. *J Cell Biol* **159**: 893-902

Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM *et al* (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* **23**: 628-33.

Srebrow A, Kornblihtt AR (2006). The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci* **119**: 2635-41.

Stallcup WB (2000). The third fibronectin type III repeat is required for L1 to serve as an optimal substratum for neurite extension. *J Neurosci Res* **61**: 33-43.

Stein U, Walther W, Arlt F, Schwabe H, Smith J, Fichtner I *et al* (2009). MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat Med* **15**: 59-67.

Stoeck A, Gast D, Sanderson MP, Issa Y, Gutwein P, Altevogt P (2007). L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* **104**: 461-9.

Subarsky P, Hill RP (2008). Graded hypoxia modulates the invasive potential of HT1080 fibrosarcoma and MDA MB231 carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* **25**: 253-64.

Sugarbaker ED (1952). The organ selectivity of experimentally induced metastases in rats. *Cancer* **5**: 606-12.

Sugawa M, Ono K, Yasui Y, Kishi T, Tsumori T, Enhancement of neurite outgrowth by the soluble form of L1 (neural cell adhesion molecule) (1997). *Neuro Report* **8**: 3157-3162

Takeda Y, Asou H, Murakami Y, Miura M, Kobayashi M, Uyemura K (1996). A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. *J Neurochem* **66**: 2338-49.

Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A (2007). Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol* **170**: 793-804.

Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G *et al* (2002). Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* **38**: 1708-16.

Tousseyn T, Jorissen E, Reiss K, Hartmann D (2006). (Make) stick and cut loose--disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* **78**: 24-46.

Triozzi PL, Eng C, Singh AD (2008). Targeted therapy for uveal melanoma. *Cancer Treat Rev* **34**: 247-58.

Venables JP (2004). Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res* **64**: 7647-54.

Vihinen P, Kahari VM (2002). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* **99**: 157-66.

Voura EB, Ramjeesingh RA, Montgomery AM, Siu CH (2001). Involvement of integrin alpha(v)beta(3) and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell* **12**: 2699-710.

Wedding U, Honecker F, Bokemeyer C, Pientka L, Hoffken K (2007). Tolerance to chemotherapy in elderly patients with cancer. *Cancer Control* **14**: 44-56.

Welch DR, Sakamaki T, Pioquinto R, Leonard TO, Goldberg SF, Hon Q *et al* (2000). Transfection of constitutively active mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase confers tumorigenic and metastatic potentials to NIH3T3 cells. *Cancer Res* **60**: 1552-6.

Whittard JD, Sakurai T, Cassella MR, Gazdoui M, Felsenfeld DP (2006). MAP kinase pathway-dependent phosphorylation of the L1-CAM ankyrin binding site regulates neuronal growth. *Mol Biol Cell* **17**: 2696-706.

Wood PM, Schachner M, Bunge RP (1990). Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J Neurosci* **10**: 3635-45.

Wu E, Croucher PI, McKie N (1997). Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 437-42.

Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, Sawaya R *et al* (2004). Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* **23**: 3550-60.

Xu Q, Lee C (2003). Discovery of novel splice forms and functional analysis of cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences. *Nucleic Acids Res* **31**: 5635-43.

Yee JK, Miyanohara A, LaPorte P, Bouic K, Burns JC, Friedmann T (1994). A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 9564-8.

Zecchini S, Bianchi M, Colombo N, Fasani R, Goisis G, Casadio C *et al* (2008). The differential role of L1 in ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelium. *Cancer Res* **68**: 1110-8.

Zwaagstra JC, Guimond A, O'Connor-McCourt MD (2000). Predominant intracellular localization of the type I transforming growth factor-beta receptor and increased nuclear accumulation after growth arrest. *Exp Cell Res* **258**: 121-34.

8 Abkürzungsverzeichnis

α -Tub	α -Tubulin
ADAM	<i>a Disintegrin and Metalloproteinase</i>
BCAS-1	<i>breast carcinoma amplified sequence-1</i>
bp	Basenpaar
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i>
CD	cytoplasmatische Domäne
DC	cysteinreiche Disintegrin Domäne
EGF(R)	<i>epidermal growth factor (receptor)</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
FKS	fötales Kälberserum
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FL-L1CAM	vollständig exprimiertes L1CAM
GnRH-II	<i>gonadotropin releasing hormone-II</i>
HGF	Hepatozytenwachstumsfaktor
Ig	Immunglobulin
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor-I</i>
i.v.	intravenös
JAK2	<i>activator Janus kinase 2</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMS	<i>Musculoskeletal Syndrom</i>
MP	Metalloproteinase-Domäne
<i>nu</i>	<i>nude</i>
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PNS	peripheres Nervensystem
Pro	Prodomäne
Prom	Promotor

RECK	<i>reversion-inducing cystein-rich protein with Kazal motifs</i>
RIP	<i>regulated intramembrane proteolysis</i>
RNAi	<i>RNA-interference</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real Time-Polymerasekettenreaktion</i>
STAT-3	<i>signal transducer and activator-3</i>
SV-L1CAM	L1CAM Spleißvariante
TACE	<i>tumor necrosis factor-α converting enzyme</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TGF- β R1	<i>transforming growth factor-β type 1 receptor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TM	Transmembrandomäne
uPA	urokinase Plasminogen-Aktivator
VEGFR-1	<i>vascular endothelial growth factor receptor-1</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem

9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der metastatischen Kaskade.
- Abb. 2: Domänenstruktur von *a Disintegrin and Metalloproteinase* ADAM.
- Abb. 3: Domänenstruktur von L1CAM.
- Abb. 4: Schematische Darstellung der Spaltprodukte durch die proteolytische Prozessierung von L1CAM durch Plasmin, ADAM-10 oder ADAM-17.
- Abb. 5: Schematische Darstellung der retroviralen Vektoren mit der cDNA von murinem L1CAM bzw. humanem vollständigen L1CAM
- Abb. 6: Untersuchung der L1CAM- und ADAM-10-Expression im L-CI.5s Metastasierungsmodell.
- Abb. 7: Untersuchungen zur L1CAM-Expression in metastasenträgenden Lebern.
- Abb. 8: Charakterisierung von L-CI.5s-Zellen mit einem *knock down* von L1CAM.
- Abb. 9: Auswirkung der L1CAM-Suppression in den L-CI.5s-Zellen auf das metastatische Potential der Tumorzellen.
- Abb. 10: Charakterisierung der L CI.5s-Zellen mit supprimierter ADAM-10-Expression.
- Abb. 11: Effekt des ADAM-10-*knock downs* auf das metastatische Potential der L-CI.5s-Zellen.
- Abb. 12: Effekte klonaler Tumorzelllinien mit *knock down* von L1CAM auf die experimentelle Metastasierung der L-CI.5s-Zellen.
- Abb. 13: Untersuchung der experimentellen Metastasierung verschiedener klonaler Tumorzelllinien mit supprimierter ADAM-10-Expression.
- Abb. 14: Effekte der Überexpression von murinem L1CAM in L-CI.5s-Zellen auf deren metastatisches Potential.
- Abb. 15: Expression von vollständigem humanem L1CAM (FL-L1CAM) und der Spleiß-Variante (SV-L1CAM) in Patientenproben von Ovarialkarzinomen, Netzmetastasen und Lebermetastasen.
- Abb. 16: Untersuchung der Expression von FL-L1CAM und SV-L1CAM in humanen Ovarial- und Kolonkarzinomzellen.

-
- Abb. 17: Charakterisierung von SKOV3ip-Zellen mit Überexpression von FL-L1CAM bzw. SV-L1CAM.
- Abb. 18: FL-L1CAM induziert das metastatische Potential von humanen Ovarialkazinomzellen (SKOV3ip).
- Abb. 19: FL-L1CAM induzierte die Expression von invasionsfördernden Genen in SKOV3ip-Zellen *in vitro*.
- Abb. 20: Induktion der gelatinolytischen Aktivität durch FL-L1CAM in SKOV3ip-Zellen *in vitro*.
- Abb. 21: Anstieg der gelatinolytischen Aktivität im metastatischen Lungengewebe durch die Überexpression von FL-L1CAM in SKOV3ip.
- Abb. 22: Erhöhte gelatinolytische Aktivität in HT1080/*acZ*-K15-Zellen durch die Überexpression von FL-L1CAM.
- Abb. 23: Induktion gelatinolytischer Aktivität in den Metastasen durch Überexpression von FL-L1CAM in Tumorzellen.
- Abb. 24: Keine Induktion der ERK-Signaltransduktion durch die Überexpression von FL-L1CAM in verschiedenen Tumorzelllinien.
- Abb. 25: Keine Aktivierung der EGFR- bzw. STAT3-Signaltransduktion durch FL-L1CAM-Überexpression in den Tumorzelllinien.
- Abb. 26: Modulation des Spleißens von L1CAM durch prometastatische Faktoren zu Gunsten der FL-L1CAM-Expression.
- Tab. 1: Klonierungsstrategie der verwendeten Plasmide
- Tab. 2: Verwendete Antikörper in Western-Blot-Analysen

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. rer. nat. Achim Krüger für die Überlassung der hoch interessanten Fragestellung sowie seiner unerschöpflichen Diskussionsbereitschaft und seinen kritischen Ratschlägen. Zudem möchte ich mich bei ihm für die Einarbeitung in die tierexperimentelle Methodik und die Durchführung der Tumorzellinokulationen bedanken.

Mein Dank geht ebenfalls an Prof. Dr. Hans Hauner für die Bereitschaft der Mitbetreuung der vorliegenden Arbeit und deren Begutachtung.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Hannelore Daniel für die Bereitschaft, den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen, bedanken.

Bei Prof. Dr. Bernd Gänsbacher möchte ich mich für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung durchzuführen, bedanken.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Hans-Peter Altevogt und Marco Pfeifer danke ich für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft sowie die Zusendung der vorinkubierten Tumorzellen.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Manfred Schmitt und Prof. Dr. Alfons Meindl der Frauenklinik am Klinikum rechts der Isar der TU München für die Bereitstellung des Patientenmaterials der Ovarialkarzinome und der Netzmetastasen bedanken. Bei Dr. Claus Hann von Weyhern und PD Dr. Björn L.D.M. Brücher möchte ich mich für die Bereitstellung der Gewebeproben der Lebermetastasen bedanken.

Laura Bickel möchte ich danken, dass ich Ergebnisse ihrer noch nicht veröffentlichten medizinischen Doktorarbeit in die Einleitung und den Ergebnisteil aufnehmen konnte. Durch ihre Befunde, dass im L-C1.5s- und HT1080-Tiermodell FL-L1CAM und nicht die Spleißvariante von L1CAM die Bildung von metastatischen Foci in sekundären Organen induziert, bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit.

Zudem konnte ich durch ihre Vorarbeit auch in diesen Tumormodellen die molekularen Mechanismen untersuchen.

Bei Dr. Birgit Halbgewachs möchte ich mich für ihre Diskussionsbereitschaft, ihr offenes Ohr für jegliche Probleme und ihre kompromisslose Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei Dr. Susanne Schaten, Katja Honert und Mareike Lehnhoff möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken. Vor allem bei Dr. Susanne Schaten und Katja Honert für die Einarbeitung in die biochemischen, histologischen und zellbiologischen Protokolle.

Außerdem möchte ich allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Krüger für ihre technische Unterstützung und kritische Diskussionsbereitschaft danken.

Dr. Martina Anton bedanke ich mich für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und ihr allzeit offenes Ohr.

Für das Korrekturlesen der Arbeit möchte ich mich bei Dr. Birgit Halbgewachs, Florian Schrözlmaier und Barbara Gruber herzlichst bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen am Institut bedanken die mich in der Zeit meiner Doktorarbeit stets unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Familie und Adam Campbell, auf deren Hilfe ich mich immer voll und ganz verlassen konnte und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.