

**Beteiligung des promigratorischen Moleküls
L1CAM an der Epithelialen Mesenchymalen
Transition des pankreatischen Gangepithels**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Claudia Ursula Geismann

Kiel
2010

Referent: Prof. Dr. Heiner Schäfer

Koreferent: Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2010

Zum Druck genehmigt: 19.07.2010

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Teile der Arbeit sind bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

Geismann, C., M. Morscheck, D. Koch, F. Bergmann, H. Ungefroren, A. Arlt, M. S. Tsao, M. G. Bachem, P. Altevogt, B. Sipos, U. R. Fölsch, H. Schäfer and S. Sebens Mürköster (2009).

Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer. *Cancer Res* 69, 4517-4526.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Das duktales Pankreasadenokarzinom	2
1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.2	Risikofaktoren	2
1.1.3	Pathologie	3
1.2	Epitheliale Mesenchymale Transition	5
1.2.1	Charakteristika von epithelialen und mesenchymalen Zellen	5
1.2.2	Charakteristika der EMT	6
1.2.3	Funktion der EMT	7
1.2.4	Rolle der EMT in der Krebsentstehung	7
1.2.5	EMT beim duktales Pankreasadenokarzinom	8
1.3	<i>Transforming Growth Factor beta</i> (TGF- β)	10
1.3.1	Der Smad abhängige TGF- β Signalweg	10
1.3.2	Der Smad unabhängige TGF- β Signalweg	12
1.3.3	Rolle von TGF- β in der Krebsentstehung	12
1.3.4	Rolle von TGF- β im duktales Pankreasadenokarzinom	13
1.4	Das Adhäsionsmolekül L1CAM	15

1.4.1	Struktur von L1CAM	15
1.4.2	Funktion von L1CAM	17
1.5	Ziel der Arbeit	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Geräte	22
2.2	Chemikalien	23
2.3	Verbrauchsmaterialien	26
2.4	Antikörper	27
2.4.1	Westernblot Antikörper	27
2.4.2	ChIP Assay Antikörper	28
2.4.3	Immunhistochemisch genutzte Antikörper	28
2.5	Primer	29
2.6	ChIP Primer	30
2.7	Oligonukleotide für EMSA	31
2.8	siRNAs	31
2.9	Zellbiologische Methoden	32
2.9.1	Zelllinien	32
2.9.2	Zellkultur	32
2.9.3	Isolierung von murinen Pankreasmyofibroblasten	33
2.9.4	Co-Kultivierung von HPDE Zellen mit Pankreasmyofibroblasten	33
2.9.5	Transfektion von Zellen	34
2.9.6	Einsatz von Inhibitoren	35
2.10	Proteinbiochemische Methoden	35

2.10.1	Herstellung von Ganzzelllysaten	35
2.10.2	Herstellung von Kernextrakten	36
2.10.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	36
2.10.4	Denaturierende Protein-Gelelektrophorese	37
2.10.5	Proteintransfer (Western-Blotting)	37
2.10.6	Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper	38
2.11	Molekularbiologische Methoden	39
2.11.1	RNA-Techniken	39
2.11.2	Herstellen von cDNA	39
2.11.3	Echt-Zeit Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR)	40
2.11.4	Konventionelle PCR	40
2.11.5	Herstellung der Luziferasekonstrukte	41
2.12	Analytische Methoden	43
2.12.1	Chromatin Immunpräzipitationsassay (ChIP Assay)	43
2.12.2	<i>Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay</i> (EMSA)	47
2.12.3	Migrationsassay	49
2.12.4	Luziferaseassay	50
2.12.5	TGF- β 1 ELISA	51
2.12.6	Caspaseassay	51
2.12.7	Annexin-V Färbung	52
2.13	Immunhistochemische und -zytochemische Untersuchungen	53
2.13.1	Immunhistochemische Färbung von humanem Pankreasgewebe	53
2.13.2	Immunzytochemische Färbung der Fibroblasten	53
2.14	Verwendete Software/ Statistik	54

3	Ergebnisse	56
3.1	Nachweis von L1CAM in chronischen Pankreatitiden	56
3.2	EMT in pankreatischen Epithelzellen	57
3.2.1	Die Co-Kultur mit Pankreasmyofibroblasten induziert L1CAM Expression in HPDE Zellen	57
3.2.2	Die Co-Kultur mit PMFs induziert EMT assoziierte Verände- rungen in HPDE Zellen	58
3.2.3	Kulturmedien weisen während der Co-Kultur von HPDE Zel- len und PMFs erhöhte TGF- β 1 Spiegel auf	60
3.2.4	Die erhöhte L1CAM Expression in co-kultivierten HPDE Zel- len ist TGF- β 1 abhängig	61
3.2.5	EMT assoziierte Veränderungen der HPDE Zellen sind TGF- β 1 vermittelt	63
3.3	Untersuchungen der Induktion der L1CAM Expression	65
3.3.1	Die L1CAM Expression in co-kultivierten und TGF- β 1 stimu- lierten HPDE Zellen ist Smad unabhängig	65
3.3.2	Die L1CAM Expression in co-kultivierten und TGF- β 1 stimu- lierten HPDE Zellen ist JNK abhängig	66
3.3.3	Die TGF- β 1 abhängige L1CAM Expression ist Slug abhängig	69
3.3.4	Slug bindet an den L1CAM Promotor und führt zu dessen Aktivierung	74
3.4	Auswirkungen der L1CAM Expression auf HPDE Zellen	80
3.4.1	Erhöhte Migrationsfähigkeit von HPDE Zellen nach Co-Kultur mit PMFs bzw. TGF- β 1 Stimulation	80
3.4.2	Die Co-Kultur mit PMFs bzw. TGF- β 1 Stimulation vermin- dert die Caspase Aktivität von HPDE Zellen	83

4	Diskussion	90
4.1	L1CAM in chronischer Pankreatitis	91
4.2	Abhängigkeit der L1CAM Expression von TGF- β 1	92
4.3	EMT in pankreatischen Epithelzellen	94
4.4	Die Induktion der L1CAM Expression in HPDE Zellen	95
4.4.1	Die TGF- β 1 vermittelte L1CAM Expression ist Smad un- abhängig	95
4.4.2	Die TGF- β 1 vermittelte L1CAM Expression ist Slug abhängig	97
4.5	Die Rolle von L1CAM in Migration und Chemoresistenz	101
5		108
5.1	Zusammenfassung	108
5.2	Summary	110
A	Anhang	112
B	Abkürzungen	114
	Abbildungsverzeichnis	117
	Literaturverzeichnis	119
	Lebenslauf	141
	Danksagung	142

Erklärung

143

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) ist in Deutschland die viert häufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern und Frauen. Mit 6300 Neuerkrankungen pro Jahr bei Männern und 6600 Neuerkrankungen bei Frauen stellt das Pankreasadenokarzinom 3,0 % aller Krebserkrankungen dar. Die Inzidenz dieses Karzinoms beträgt in Deutschland bei Frauen 8,7 und bei Männern 12,6 pro 100.000 Einwohnern und Jahr. In Großteilen der Fälle wird die Erkrankung erst spät erkannt, was mit einer ungünstigen 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 2 % einhergeht [1, 2].

1.1.2 Risikofaktoren

Die Risikofaktoren des Pankreasadenokarzinoms sind wenig verstanden. Zu den gesicherten Risikofaktoren gehört neben einem fortgeschrittenen Lebensalter und dem Rauchen von Zigaretten auch eine lipidreiche Ernährung. Im Gegensatz dazu hat sich eine obst- und gemüsereiche Ernährung als risikomindernd herausgestellt [3]. Neben den beschriebenen Umweltfaktoren kann auch die individuelle Krankengeschichte mögliche Risikofaktoren beinhalten. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit lang bestehendem Diabetes mellitus Typ II vermehrt an Pankreasadenokarzinomen erkranken [5].

Ein weiterer Risikofaktor liegt in der familiären Krankengeschichte. Personen mit familiärem Auftreten von Pankreas-, Brust oder Darmkarzinomen erkranken häufiger am duktalem Pankreasadenokarzinom [3]. Im Fall des duktalem Pankreasadenokarzinoms liegt eine familiäre Disposition jedoch nur bei ca. 5-10 % der Patienten vor. Darüber hinaus geht mit einer chronischen Pankreatitis ein erhöhtes Risiko einer Erkrankung am duktalem Pankreasadenokarzinom einher [4].

1.1.3 Pathologie

90 % der Pankreaskarzinome entstammen den exokrinen Organanteilen des Gewebes. Neben den am häufigsten vorkommenden duktalem Adenokarzinomen wird auch bei den deutlich selteneren zystischen Neoplasien der exokrine Teil des Pankreasgewebes als Ursprung der Krebserkrankung gesehen. Den verbleibenden Anteil der pankreatischen Krebserkrankungen stellen die Azinuszellenkarzinome sowie Pankreastumore endokrinen Ursprungs und Lymphome dar.

In Zellen des duktalem Pankreasadenokarzinoms können unterschiedliche genetische Veränderungen, die für eine deregulierte Zellteilung mitverantwortlich sind, nachgewiesen werden. Die mit 90-95 % am häufigsten auftretende Mutation ist die des Proto-Onkogens *k-ras*, welche bereits in Vorläuferläsionen, den sogenannten **Pankreatischen Intraepithelialen Neoplasien** (PanIN) beobachtet werden kann [6]. Das Protein des *k-ras* Gens ist für unterschiedliche zelluläre Funktionen verantwortlich, unter anderem für die Proliferation sowie das Überleben und die Mobilität der Zelle [2, 7]. Im weiteren Verlauf der Krebsentstehung wird in 90 % der Fälle eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *CDNK2a/INK4a/p16* beobachtet. Hierdurch kommt es zu einem Verlust der Zellzykluskontrolle [2, 3]. Ferner weisen 50-75 % der PDACs Mutationen des *p53* und 55-66 % Veränderungen des *MADH4/DPC4/Smad4* Gens auf [2, 3, 7]. Überdies wurde auch eine konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) in 67-90 % der Pankreasadenokarzinome beschrieben [8, 9]. Die Aktivierung von (NF- κ B) wird vor allem mit einer verminderten Apoptoseinduktion in Zusammenhang gebracht, was sowohl in der Karzinogenese als auch in der ausgeprägten Chemoresistenz der Tumore eine zentrale Rolle spielt [10, 11].

Ein Kennzeichen des pankreatischen duktales Adenokarzinoms ist eine ausgeprägte desmoplastische Stromabildung, welche sich aus Fibroblasten, Endothel- und Entzündungszellen sowie nicht zellulären Komponenten, der Extrazellulären Matrix (EZM) zusammensetzt [12, 13]. Die die Tumorzellen umgebenden Fibroblasten weisen meistens einen aktivierten, myofibroblastoiden Phänotyp auf und synthetisieren u.a. EZM-Proteine wie Kollagen Typ I und Typ III, Fibronectin und Laminin [12, 15]. Darüber hinaus sezernieren sie große Mengen an TGF- β 1. Bei unterschiedlichen Tumorentitäten, so auch dem Pankreasadenokarzinom, konnte ein Einfluss des Stromas auf Tumorproliferation, Invasion, Metastasenbildung, Angiogenese und Chemoresistenz nachgewiesen werden [15, 16, 17, 18]. In Versuchen, in denen Pankreaskarzinomzellen mit murinen Pankreasmyofibroblasten co-kultiviert wurden, konnte gezeigt werden, dass es in den Tumorzellen durch die stromale Komponente zu einer verminderten Apoptoserate bei Zytostatikagabe kommt. Auch in einem SCID-Maus-Modell wurde eine verringerte Chemosensitivität gegenüber dem Zytostatikum Etoposid in stromareichen Pankreaskarzinomen im Vergleich zu stromaarmen Tumoren beobachtet [19].

Die Tumor-Stroma Interaktionen können sowohl über Zell-Zell-Kontakte als auch mittels zellulärer Faktoren und Proteine wie Wachstumsfaktoren, EZM-Proteine, Chemokine, Lipid-Produkte oder Proteinasen und Proteinase-Inhibitoren vermittelt werden. Beispielsweise setzen pankreatische Myofibroblasten Stickstoffmonoxid (NO) frei, was zu einer erhöhten Interleukin-1 β Expression und Freisetzung in Pankreaskarzinomzellen führt. Interleukin-1 β führt seinerseits zur vermehrten Expression von iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) und NO Sekretion, wodurch es zur inhibierenden Nitrosylierung der Caspasen kommt [18, 20]. Die Interaktionen zwischen Tumorstroma und Tumorzellen tragen somit wesentlich zur Chemoresistenz-Induktion in PDAC Zellen bei.

1.2 Epitheliale Mesenchymale Transition

1.2.1 Charakteristika von epithelialen und mesenchymalen Zellen

Epitheliale Zellen sind von prismatischer Zellform und umgeben die Organe und andere Oberflächen innerhalb des Körpers. Dabei bilden sie Zell-Zell-Kontakte wie *Adherend Junctions*, *Tight Junctions*, *Gap Junctions* und Desmosomen aus, so dass ein dichter Zellverband entsteht. Sie besitzen einen polarisierten Phänotyp und sind auf einer Membran oder Basallamina verankert. Es werden unterschiedliche Proteine als epitheliale Markerproteine angesehen. Hierzu gehört unter anderem das Adhäsionsprotein E-Cadherin, das zwischen Epithelzellen frühe Zell-Zell-Kontakte vermittelt. Zell-Zell-Kontakte zwischen Epithelzellen entstehen aus adhäsiven Verbindungen, die zwischen einer oder mehreren Immunglobulin Domänen der extrazellulären Regionen des Cadherins gebildet werden. Darüber hinaus interagieren die zytoplasmatischen Regionen des E-Cadherins über Bindungspartner (α -, β -, γ -Catenin) mit dem Aktin-Zytoskelett [21, 22]. Die ausgebildeten Zell-Zell-Kontakte können sich im weiteren Verlauf zu kleinen Komplexen zusammenschließen und stabile *Adherend Junctions* bilden. Auch die Ausbildung von Desmosomen wird durch die Expression von E-Cadherin gefördert [21].

Neben E-Cadherin konnten auch Occludin und Tjp 1, beides Bestandteile der *Tight Junctions*, als typische Markerproteine von Epithelzellen identifiziert werden [23, 24].

Im Vergleich dazu haben mesenchymale Zellen eine spindelförmige Zellform und weisen eine erhöhte Migrationsfähigkeit auf. Zwischen mesenchymalen Zellen kommt es meist nur zur Ausbildung von Fokalkontakten. In seltenen Fällen kann es beim Aufeinandertreffen zweier mesenchymaler Zellen auch zur Ausbildung von *Gap Junctions* kommen [25].

Zum spezifischen Nachweis mesenchymaler Zellen wird die Expression von Vimentin, N-Cadherin, α -smooth muscle actin (α -SMA), Fibronektin und Desmin aufgezeigt [26]. Bei Vimentin handelt es sich um ein Intermediärfilament, welches in Zellen mit mesenchymalem Ursprung exprimiert wird. Neben seiner Rolle bei der Signaltransduktion von der Zelloberfläche in den Kern wird eine Funktion bei der Reorganisation des Zytoskeletts in Verbindung mit Zell-Motilität und Migration postuliert [22].

1.2.2 Charakteristika der EMT

Die Epitheliale Mesenchymale Transition (EMT) wurde erstmals 1982 von Garry Greenburg und Elisabeth Hay als eigenständiger Prozess beschrieben [27]. Hierbei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, bei dem polarisierte Epithelzellen ihren Phänotyp verlieren und einen motilen mesenchymalen Phänotyp annehmen [28, 29, 30]. Ausgelöst durch ein großes Spektrum an Signalen kommt es während der EMT zur Desintegration von *Tight-*, *Adherend-* und *Gap Junctions* und somit zum Verlust von Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakten. Die verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, welche auch als Indikator für das Einsetzen der EMT angesehen wird, bewirkt eine Reorganisation der Aktin-Moleküle im Zytoskelett der Zelle und die Ausbildung von Aktin-Stress-Fasern. Die Zelle verliert während der EMT ihre apikal-basale Polarität und nimmt eine spindelförmige, fibroblastoide Morphologie an [30, 31]. Mesenchymale Markerproteine wie N-Cadherin, Vimentin, Fibronektin oder α -SMA werden vermehrt exprimiert, was als Kennzeichen der EMT angesehen wird (siehe Abbildung 1.1) [32]. Des Weiteren kann es zur erhöhten Sekretion von extrazellulären Proteasen, EZM-Proteinen und ihrer Rezeptoren kommen. Je nach Zelltyp unterscheiden sich die zellulären Veränderungen während der EMT. Es wird vermutet, dass das genaue Spektrum der Veränderungen von der Gesamtheit der extrazellulären Signale abhängt, die auf die Zelle einwirken [29, 33].

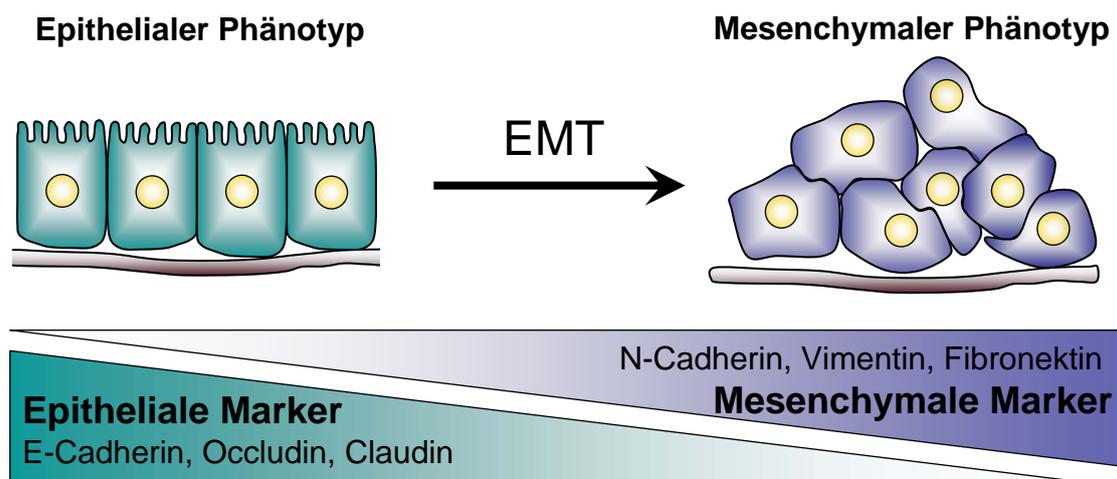


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von EMT. Im Diagramm sind schematisch die Veränderungen der Zellen abgebildet.

1.2.3 Funktion der EMT

Die Epitheliale Mesenchymale Transition tritt unter physiologischen Bedingungen in Säugetieren erstmals in der Embryonalentwicklung auf und ist während der Gastrulation für die Entstehung eines aus drei Keimblättern bestehenden Embryos verantwortlich. Im weiteren Verlauf der Entwicklung wirkt die EMT auf die Bildung von Herz, Skelettmuskulatur, den meisten kraniofazialen Strukturen sowie dem peripheren Nervensystem ein [21].

Im Gegensatz dazu tritt in adulten Geweben die EMT nur sehr selten auf, so z.B. bei der Wundheilung. Bei der Heilung von Hautverletzungen sind hauptsächlich Epithelzellen und Fibroblasten an der Ausbildung neuer Epithelgewebe sowie einer Kontraktion des Narbengewebes beteiligt. Neben der direkten Einwirkung der Fibroblasten auf das Zusammenziehen des Narbengewebes wirken sie auch indirekt auf diesen Vorgang ein, indem eine Differenzierung zu mesenchymalen Zellen stattfindet.

Es hat sich gezeigt, dass das Epithelgewebe bei einer Induktion von Stress wie Entzündung oder Verwundung in der Lage ist, sich in mesenchymale Zellen zu differenzieren [34, 35].

1.2.4 Rolle der EMT in der Krebsentstehung

Während der Prozess der EMT anfangs nur in der Embryogenese Beachtung fand, wurden bei der Untersuchung humaner Tumore sowie in experimentellen Tiermodellen die pathophysiologische Bedeutung der EMT während der Karzinogenese festgestellt [36, 37]. Besonders bei der Ausbildung von Metastasen erfolgen phänotypische Veränderungen, die die Invasion und Migration der Tumorzellen ermöglichen und mit der EMT einhergehen. Der Verlust bzw. die verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin wurde in unterschiedlichen Tumorarten nachgewiesen, so auch für das Kolorektalkarzinom, das Ösophagusadenokarzinom und das Pankreasadenokarzinom [36, 38]. In Experimenten, in denen die epitheliale E-Cadherin Expression verringert wurde, konnten morphologische Veränderungen vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp gezeigt werden. Einhergehend mit den morphologischen Veränderungen kam es zu einer erhöhten Invasivität der Zellen [23]. Durch die Reduktion der E-Cadherin Expression kommt es weiterhin zur Freisetzung von β -Catenin. Unterschiedliche Studien konnten zeigen, dass dieses zu einer vermehrten nukleären β -Catenin/TCF/Lef-1-Komplexbildung führt, was mit EMT assoziierten

Prozessen in Verbindung gebracht werden konnte [21, 37, 39].

In unterschiedlichen Tumorentitäten wurde weiterhin eine erhöhte Expression von EMT assoziierten Transkriptionsfaktoren nachgewiesen. Diese Transkriptionsfaktoren, zu denen unter anderem Snail, Slug, SIP1 und Twist gehören, sind sowohl für die Regulation epithelialer als auch mesenchymaler Gene verantwortlich. Besonders Gene, deren Proteine an der Ausbildung junctionaler Komplexe beteiligt sind, werden vermindert exprimiert. So konnte neben einer reduzierten E-Cadherin Expression auch eine verringerte Expression von Proteinen wie Claudin, Connexin oder Occludin gezeigt werden [28].

Neben der Hemmung epithelialer Gene fördern die EMT assoziierten Transkriptionsfaktoren die Induktion des mesenchymalen Phänotyps durch die Steigerung der Expression mesenchymaler Proteine. So führt der Transkriptionsfaktor Snail zur vermehrten Expression von Fibronectin und Vitronectin, während Twist unter anderem über Akt2 das Überleben der Zellen während der EMT begünstigt [28]. Zusätzlich unterdrückt Snail das Immunsystem während der EMT, was sich sowohl fördernd auf das Wachstum von Primärtumoren als auch auf die Ausbildung von Metastasen auswirkt [40].

Die EMT in der Karzinogenese wird durch äußere Signale initiiert, die sich von Gewebe zu Gewebe unterscheiden. So konnte gezeigt werden, dass neben Molekülen der EZM auch das tumorassoziierte Stroma an der Initiation der EMT beteiligt sein kann. Des Weiteren wurde für *Transforming growth factor beta* (TGF- β) und andere extrazelluläre Wachstumsfaktoren (*Bone morphogenic protein* (BMP), *Hepatocyte growth factor* (HGF), *Platelet-derived growth factor*, *Fibroblast growth factor* (FGF)) die Fähigkeit zur Induktion der EMT gezeigt [30, 36].

1.2.5 EMT beim duktalem Pankreasadenokarzinom

Die Tatsache, dass viele PDAC Patienten Metastasen aufweisen und der Prozess der EMT mit der Entstehung von Metastasen in Verbindung gebracht werden konnte, weist bereits auf das Auftreten der EMT bei dieser Tumorerkrankung hin. Unterschiedliche Studien konnten dies durch den Nachweis von EMT Markern bestätigen. So zeigte sich, dass in 42-60 % der untersuchten Karzinome eine Reduktion oder der Verlust der E-Cadherin Expression vorliegt. Weiterhin konnte die Reduktion des E-Cadherins mit der Dedifferenzierung und Entstehung von Metastasen sowie mit einer schlechten Prognose für die Patienten korreliert werden [23, 41, 42]. Neben der verringerten E-Cadherin Expression wurden beim metastasierenden PDAC wei-

terhin eine vermehrte Expression von N-Cadherin sowie der Transkriptionsfaktoren Snail, Slug und Twist gezeigt [23, 42, 43].

Parallel zu den Befunden in Karzinomen weisen zahlreiche PDAC Zelllinien, wie z.B. CFPAC-1 oder Panc1 eine erhöhte Expression von Snail und Slug sowie des mesenchymalen Markerproteins Vimentin auf, was mit einem motilen Phänotyp der Zellen einhergeht [44, 45]. In unterschiedlichen Zelllinien wurde TGF- β als Induktor der beschriebenen EMT Prozesse sowie der veränderten Zellmorphologie nachgewiesen [44]. Zhao et al. zeigten darüber hinaus, dass TGF- β auch in PDAC Zelllinien, die einen gestörten TGF- β Signalweg aufweisen, in der Lage ist, EMT zu induzieren [46]. Da TGF- β 1 eine wichtige Rolle in der Induktion der EMT in der Karzinogenese zukommt, wird im nächsten Kapitel näher auf diesen Faktor eingegangen.

1.3 Transforming Growth Factor beta (TGF- β)

Transforming Growth Factor beta (TGF- β) ist ein Wachstumsfaktor mit vielen Funktionen, die sich je nach Zellart, Konzentration und zellulärer Mikroumgebung unterscheiden [47]. Die TGF- β Familie gehört mit der Familie der BMPs, den Aktiven, dem anti-Müllerschen Hormon (AHM) und Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDFs) zur TGF- Superfamilie.

In Säugetieren sind mit TGF- β 1, - β 2 und - β 3 drei Isoformen der TGF- β Familie bekannt, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind und gewebsspezifisch sowie zeitlich verschieden exprimiert werden.

TGF- β liegt anfangs als inaktiver, homodimerer Komplex vor, der an Proteine wie das *latent TGF- β binding protein* (LTBP-1) gebunden ist. Mittels Transglutaminasen wird der Komplex an die extrazelluläre Matrix gekoppelt bis u.a. durch proteolytische Abspaltung des LTBP-1 aktives TGF- β freigesetzt wird.

TGF- β induziert die Bildung eines tetrameren Rezeptorkomplexes, bestehend aus Typ I (ALK Rezeptor) und Typ II TGF- β Rezeptoren. Bis heute sind 7 unterschiedliche Typ I Rezeptoren (ALK 1-7) sowie 4 Typ II Rezeptoren (T β RII, ActR-II, ActR-II-b und BMPR-II) bekannt, wobei jedes Mitglied der TGF- β Superfamilie an eine bestimmte Kombination der Typ I und II Rezeptoren bindet. TGF- β 1, welches das am besten charakterisierte Mitglied der TGF- β Familie ist und in dieser Arbeit untersucht und verwendet wurde, bindet hauptsächlich an die Rezeptorkombination ALK-5/T β RII [48, 49].

Durch die Bindung von TGF- β an den Rezeptorkomplex kommt es zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege, bei denen der Smad abhängige vom Smad unabhängige Signalweg unterschieden wird.

1.3.1 Der Smad abhängige TGF- β Signalweg

Nachdem TGF- β an den Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche gebunden hat, wird T β RI durch die Kinaseaktivität von T β RII phosphoryliert. Dieses führt zur Aktivierung der T β RI Rezeptorkinase und weiter zur spezifischen Phosphorylierung der Rezeptor regulierten Smad-Proteine (R-Smads), die sich je nach Rezeptortyp unterscheiden. Durch die Bindung von TGF- β 1 an den ALK-5 Rezeptor kommt es zur Aktivierung der Smad2 und Smad3 Proteine. Diese bilden im weiteren Verlauf einen funktionellen Komplex mit Smad4 (Co-Smad), der in den Kern transloziert und sich dort anreichert [50]. Daraus resultieren entweder direkte Bindungen des

Smad-Komplexes an *Smad binding elements* innerhalb der DNA oder Interaktionen mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren, die zur transkriptionellen Aktivierung oder Repression diverser Gene führen (siehe Abbildung 1.2) [51].

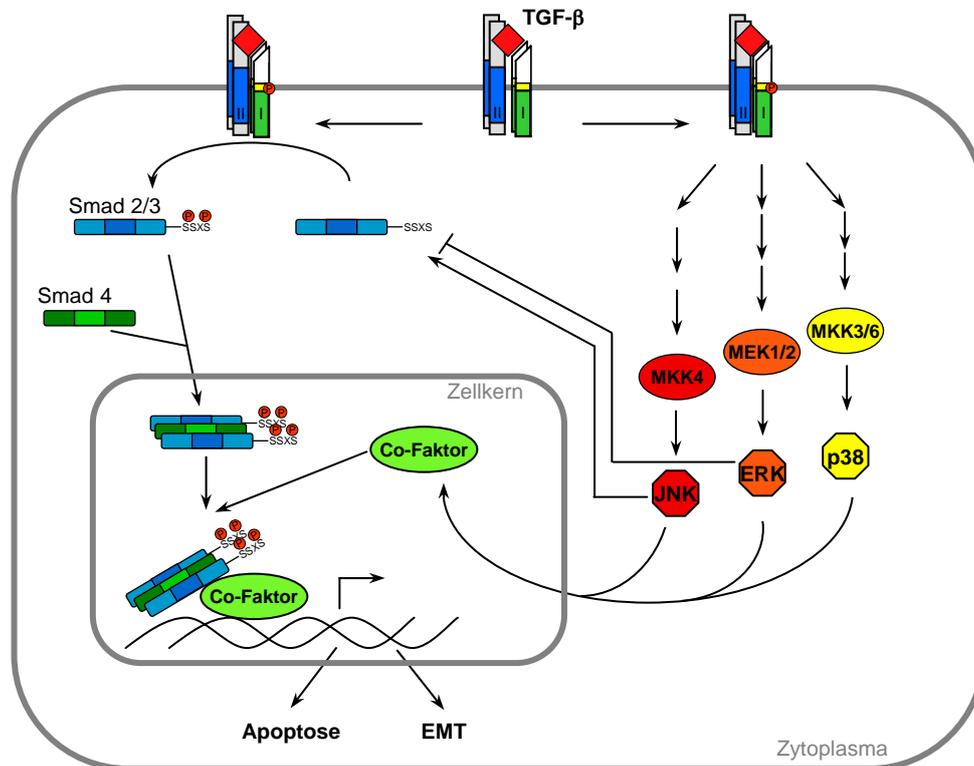


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der TGF- β Signalwege. TGF- β induziert eine Phosphorylierung der Typ I und Typ II Rezeptoren. Durch die Phosphorylierung kann einerseits der Smad abhängige Signalweg aktiviert werden, der über Smad2/3 und Smad4 die Transkription spezifischer Gene reguliert (linke Seite der Abbildung). Andererseits aktiviert der Smad unabhängige Signalweg unterschiedliche Signalkaskaden, die ihrerseits die MAP-Kinasen Erk1/2, JNK oder p38 phosphorylieren. Über Co-Faktoren kommt es zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen. Die Smad unabhängigen Signalwege können regulierend auf den Smad Signalweg einwirken. Modifiziert nach [52]

Eines der Gene, das über den beschriebenen TGF- β Signalweg induziert wird, ist das inhibitorische Smad Protein 7. Smad7 und das zweite inhibitorische Protein Smad6 können mit Typ I Rezeptoren interagieren und somit die Phosphorylierung der R-Smads unterbinden [53]. Weiterhin bindet und aktiviert Smad7 die Smurf Ubiquitinligasen, die zur Ubiquitinierung des Typ I Rezeptors führen und Endozytoseprozesse sowie den finalen lysosomalen Abbau des Rezeptor-Ligand-Komplexes einleiten [54]. Smad7 stellt somit einen TGF- β 1 induzierten negativen *feedback-loop*

dar.

Neben dem Abbau des Rezeptor-Ligand-Komplexes prozessieren nukleäre Phosphatasen den R-Smad/Co-Smad Komplex und beenden somit die Smad vermittelte transkriptionelle Aktivierung bestimmter Gene. Der Komplex zerfällt und eine Rückführung der Smad Proteine ins Zytoplasma kann stattfinden [51].

1.3.2 Der Smad unabhängige TGF- β Signalweg

In den letzten Jahren zeigten unterschiedliche Studien, dass neben dem Smad abhängigen auch Smad unabhängige TGF- β Signalwege existieren [55, 56, 57, 58]. Hierbei aktiviert TGF- β unterschiedliche intrazelluläre Reaktionswege, zu denen unter anderem die Rho ähnlichen GTPase Wege, der PI3K/Akt (Phosphatidylinositol-3 Kinase) Weg sowie die MAP-Kinase (Mitogen aktivierte Proteinkinase) Signalwege gehören [52, 59, 60].

Die TGF- β induzierten MAP-Kinase Wege führen zur Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden, die ihrerseits die Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase 1 und 2 (Erk1/2) sowie die p38-MAP-Kinase oder c-Jun N-terminale (JNK)-Proteinkinase aktivieren können (siehe Abbildung 1.2). Sowohl für JNK als auch die beiden anderen Kinasen Erk1/2 und p38-MAP konnte eine Beteiligung an EMT assoziierten Zellveränderungen nachgewiesen werden [52]. Weiterhin können alle MAP-Kinase Signalwege mit dem Smad vermittelten Signalweg interagieren, so dass davon ausgegangen wird, dass die finale zelluläre Antwort auf TGF- β Stimuli durch eine Kombination von Smad abhängigen und unabhängigen Signalwegen gesteuert wird [47, 52].

1.3.3 Rolle von TGF- β in der Krebsentstehung

In den letzten Jahren wurde ein Modell entwickelt, das TGF- β eine duale Rolle während der Tumorigenese zuspricht [61]. Während TGF- β in frühen Stadien der Tumorentstehung aufgrund seiner wachstumsinhibierenden Eigenschaften als Tumorsuppressor angesehen wird, geht von TGF- β in fortgeschrittenen Tumorstadien eher eine tumorfördernde Wirkung aus [61]. Einhergehend mit dem Verlust der Wachstumsinhibition kommt es weiterhin zu einer erhöhten Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen, was sich in einer gesteigerten Metastasenbildung auswirkt [62].

Siegel et al. waren in der Lage, diese Dualität der TGF- β Wirkung in einem transgenen Maus-Brustkrebsmodell zu bestätigen [63]. Darin konnten sie zeigen, dass eine

konstitutive Aktivierung der TGF- β Rezeptoren zu einem verringerten Auftreten von primären Brusttumoren führt, während Mäusen mit einer dominant negativen Form des TGF- β Rezeptors bereits frühzeitig Tumore ausbilden. Dies spiegelt die tumor-supprimierende Wirkung von TGF- β in den frühen Stadien der Tumorentstehung wieder.

Im gleichen Mausmodell konnten Siegel et al. einen gegensätzlichen Effekt bei der Bildung von Lungenmetastasen feststellen. So wurde in Mäusen mit aktivierten TGF- β Rezeptoren ein erhöhter Prozentsatz an Metastasen nachgewiesen, was auf einen onkogenen Effekt von TGF- β in den späten Stadien der Tumorerkrankung hinweist.

In vielen Tumoren wurden Mutationen bei unterschiedlichen Komponenten der TGF- β Signalwege festgestellt, die mit dem Verlust der TGF- β induzierten Wachstumsinhibition verbunden werden. Darunter befinden sich Mutationen in der Kinase Domäne des Typ II TGF- β Rezeptors sowie inaktivierende Mutationen im Smad4 Gen [64, 65, 66]. Auch die Aktivierung des Proto-Onkogens k-ras ist in vielen Tumoren zu finden. Bei erhöhter Ras Aktivität kommt es über den Erk1/2 Signalweg zu einer Phosphorylierung des Linker-Bereichs von Smad2 bzw. Smad3, was wiederum die Ausbildung des Komplexes mit Smad4 unterbindet [67]. Weiterhin wurde eine vermehrte Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges festgestellt, was in Krebszellen zu einer gesteigerten Expression von JNK und im weiteren Verlauf zu einer beschleunigten Smad Signal-Kaskade führt [61].

Interessanterweise konnten neben Mutationen innerhalb des TGF- β Signalweges auch eine erhöhte TGF- β Expression in unterschiedlichen Tumoren wie Brust-, Kolon-, Pankreas-, Lungen- oder Magenkarzinom nachgewiesen werden [66]. Diese Überproduktion ist oft mit Tumorinvasion und Metastasenbildung sowie einem schlechten Krankheitsverlauf gekoppelt [51].

1.3.4 Rolle von TGF- β im duktalem Pankreasadenokarzinom

Im duktalem Pankreasadenokarzinom sind unterschiedliche Mutationen innerhalb der TGF- β Signalwege nachweisbar, darunter Mutationen der TGF- β Rezeptorkinasen sowie der Smad Proteine [68].

Unter den bekannten Mutationen beim Pankreasadenokarzinom spielen Mutationen innerhalb der TGF- β Rezeptoren eine untergeordnete Rolle, wurden aber in

einem Tiermodell für das Pankreasadenokarzinom mit einer verringerten Metastasenbildung in der Leber in Verbindung gebracht [69]. In rund 50 % der PDAC ist die Expression des TGF- β II Rezeptors vermindert, wodurch die TGF- β vermittelte Wachstumsinhibition unterbunden wird. Weiterhin kommt es mit gleicher Häufigkeit zu inaktivierenden Mutationen des Tumorsuppressors Smad4 [66], die ebenfalls mit dem Verlust der TGF- β bedingten Wachstumsinhibition verbunden ist [17]. Auch eine erhöhte Expression des inhibitorischen Smad Proteins 7 wurden im PDAC gezeigt, konnte aber nicht auf eine aktivierende Mutation zurückgeführt werden [70]. Ungeachtet dessen sind erhöhte Smad7 Expression mit einem maligneren Phänotyp assoziiert, was eine Funktion innerhalb der Tumorigenese vermuten lässt [68]. Neben den Mutationen des Smad abhängigen Signalweges sind weiterhin Veränderungen des Smad unabhängigen Signalweges bekannt. In 90-95 % der Pankreasadenokarzinome wurden aktivierende Mutationen innerhalb des k-ras Proto-Onkogens nachgewiesen, die sich inhibierend auf die Rezeptor-Smads auswirken [68].

Im Pankreasadenokarzinom wurden weiterhin erhöhte TGF- β Konzentrationen detektiert, die oft mit schlechten Prognosen in Verbindung gebracht wurden [71]. Neben den direkten Effekten auf die Tumorzellen wirkt sich die vermehrte TGF- β Expression auch auf die Tumorumgebung aus und kann z.B. durch Suppression einer tumorgerichteten Immunantwort die Tumorprogression fördern [72]. Ferner vermittelt eine gesteigerte TGF- β Expression die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Myofibroblasten werden, wie bereits erwähnt, für die desmoplastische Reaktion im Pankreasgewebe verantwortlich gemacht und fördern durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und EZM-Proteinen die maligne Transformation der Epithelzellen [69].

1.4 Das Adhäsionsmolekül L1CAM

1.4.1 Struktur von L1CAM

Das Gen des Adhäsionsmoleküls L1CAM (CD171, L1) ist X chromosomal lokalisiert und besteht aus 29 Exons (siehe Abbildung 1.3), von denen das 125 bp große Exon 1 erst nachträglich dem Primärtranskript zugeordnet wurde. Dieses nicht translatierte Exon 1, welches auch als Exon 0 bezeichnet wird, wird durch ein ca. 10 kb großes Intron vom Startcodon (ATG) tragenden Exon 2 getrennt. Während Kallunki et al. mehrere Transkriptionsstartpunkte, in der dem Exon 1 vorgelagerten Sequenz identifizieren konnten, wurde in anderen Zellarten, wie der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B ein dem Exon 2 vorgelagerter Transkriptionsstartpunkt beschrieben [73, 74]. Mittels Sequenzanalysen des murinen L1CAM-Gens konnte sowohl für die 5' flankierende Region des Exons 1 als auch für die dem Exon 2 vorgelagerte Sequenz Promotoraktivität nachgewiesen werden [73, 75]. Bis heute ist weder für das humane noch für das in vielen Bereichen sequenzhomologe murine L1CAM bekannt, über welche Promotorsequenz die Genexpression reguliert wird.

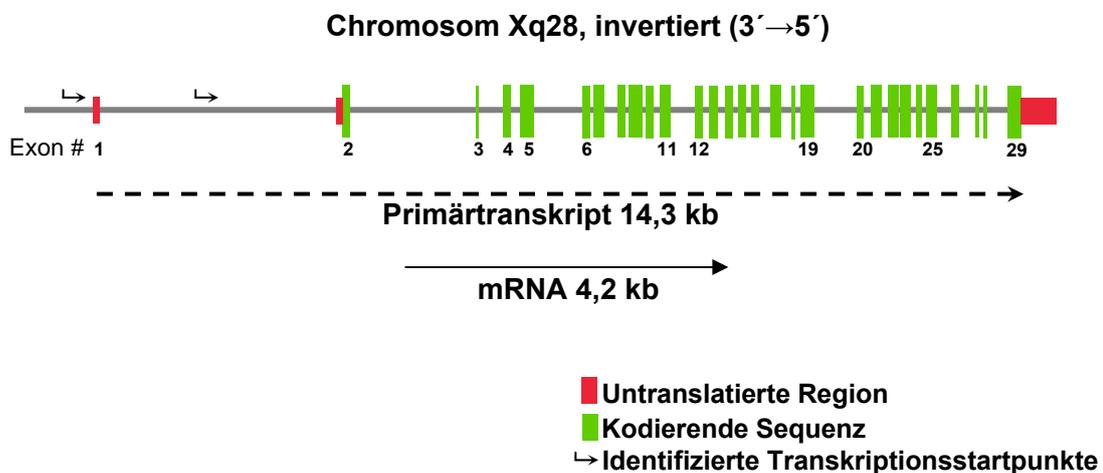


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des L1CAM Gens. Das Gen des L1CAMs besteht aus 29 Exons, aus denen ein 14,3 kb großes Primärtranskript generiert wird. Die untranslatierten Regionen sind rot, die kodierenden Sequenzen grün gekennzeichnet.

Das Gen des Adhäsionsmoleküls L1CAM kodiert für ein 200-220 kDa schweres Typ I-Membranglykoprotein, welches zur Superfamilie der Immunglobuline gehört. Es kann in drei Bereiche gegliedert werden: den extrazellulären Bereich, die Transmembrandomäne und den zytoplasmatischen Teil [76].

Im extrazellulären Bereich besteht humanes L1CAM aus sechs Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig-Domänen), von denen die sechste Ig-Domäne ein RGD-Motiv aufweist [77]. Daran schließen sich fünf Fibronektin Typ III Domänen an [78]. Eine kurze Transmembrandomäne verbindet den extrazellulären Bereich mit dem hochkonservierten zytoplasmatischen Teil (siehe Abb. 1.4) [79, 80].

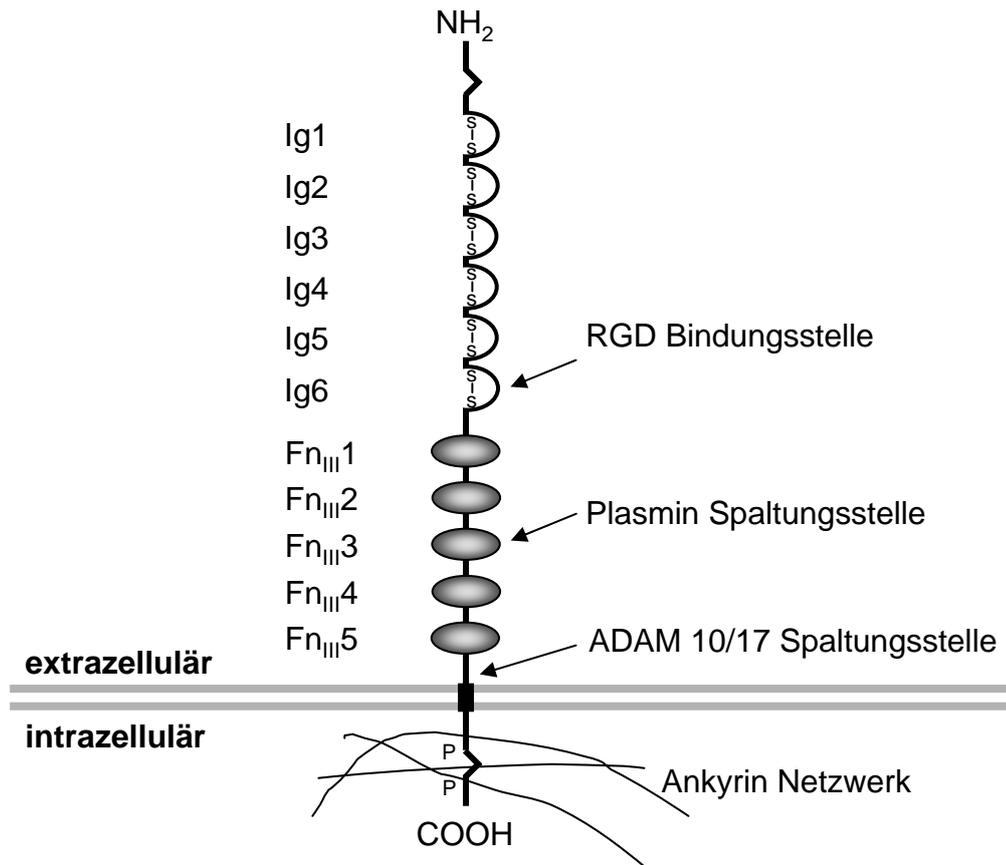


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Adhäsionsmoleküls L1CAM. L1CAM besteht aus 6 Ig-Domänen, an die sich 5 Fibronektin Typ II Domänen anschließen. Über den Transmembranbereich ist der extrazelluläre Teil des Moleküls mit der phosphorylierbaren zytoplasmatischen Domäne verbunden, die ihrerseits über Ankyrin mit dem Zytoskelett interagiert. Dargestellt sind weiterhin die proteolytischen Spaltungsstellen sowie die RGD Bindungsstelle innerhalb der 6. Ig-Domäne. Modifiziert nach [81]

Bei humanem L1CAM lässt sich auf Grund von zwei alternativ gespleißten Mini-Exons eine neuronal exprimierte von einer nicht-neuronal exprimierten Isoform unterscheiden. Im Gegensatz zu nicht-neuronal exprimiertem L1CAM enthält neuronales L1CAM im Exon 2 zusätzlich das aus fünf Aminosäuren bestehende Motiv YEGHH [82] sowie im Exon 27 das Aminosäure-Motiv RSLE [83, 84].

L1CAM kann neben der transmembranen Form auch in einer löslichen Form vorliegen. Hierbei wird die extrazelluläre Domäne des L1CAM konstitutiv durch ADAM 10 (*a disintegrin and metalloproteinase*) oder nach Stimulation durch ADAM 17 abgespalten. Es entsteht ein lösliches 200 kDa Fragment [81, 85, 86, 87, 88]. Neben den Metalloproteasen können auch die Serinproteinasen Plasmin und Trypsin L1CAM im extrazellulären Teil spalten [85, 89, 90]. Nach der Spaltung verbleibt ein 32 kDa großes c-terminales Fragment in der Membran verankert, welches durch einen Presenilin/ γ -Sekretase Komplex weiter prozessiert werden kann. Das dadurch entstehende kleine, lösliche Fragment wird ins Zytosol freigesetzt und kann an der Signaltransduktion zum bzw. im Kern beteiligt sein [85, 87].

Sowohl die lösliche Ektodomäne als auch gebundenes L1CAM können über die extrazelluläre Domäne homophile sowie heterophile Bindungen eingehen. Als heterophile Bindungspartner wurden verschiedene EZM-Proteine, Integrine und Neuropillin-1 beschrieben. In mehreren Studien wurde eine Bindung unterschiedlicher Integrine an das RGD Motiv in der sechsten Ig-Domäne oder an die dritte Fibronectin-Domäne des L1CAMs nachgewiesen [81, 91, 92, 93, 94]. Weiterhin konnte eine Bindung von Neurocan und Neuropilin-1 an die erste Ig-Domäne sowie Bindungen der EZM-Proteine Fibronectin, Vitronectin und Laminin identifiziert werden [88, 95].

1.4.2 Funktion von L1CAM

L1CAM in neuronalen Zellen

Das Adhäsionsmolekül L1CAM wurde ursprünglich in bei der Entwicklung des Nervensystems beteiligten neuronalen Zellen nachgewiesen. Neben der Regulation von Zellinteraktionen wie Neuron-Neuron-Adhäsionen wird neuronales L1CAM mit der Migration, dem Auswachsen und der Bündelung (Faszikulierung) von Neuriten sowie dem Schutz vor neuronalem Zelltod in Verbindung gebracht [79, 80, 85, 92, 96, 97]. Bis heute konnten unterschiedliche Mutationen innerhalb des L1CAM Gens mit mehr als 200, meist neurologischen Erkrankungen von unterschiedlich schwerer Ausprägung assoziiert werden [98, 99]. Dazu gehört unter anderem das CRASH Syndrom (*Corpus callosum hypoplasia, mental retardation, adducted thumbs, spastic paraplegia and hydrocephalus*) [85].

L1CAM in Tumorzellen

In den letzten Jahren wurde das Adhäsionsmolekül L1CAM in einer steigenden Zahl von Tumoren nachgewiesen, so z.B. in Glioblastomen, Melanomen, Nierenzell- und Pankreasadenokarzinomen sowie anderen Tumoren des Gastrointestinaltrakts [96, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106]. In vielen dieser Tumorentitäten kann die gesteigerte L1CAM Expression mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert werden [102, 107, 108]. Des Weiteren wird in der Literatur davon ausgegangen, dass L1CAM die Tumorprogression fördert, indem es zur Invasion sowie zur Migration der Tumorzellen auf EZM-Komponenten beiträgt. Dies wird unter anderem durch Befunde mit Kolonkarzinomzelllinien unterstützt, die zeigen, dass L1CAM transfizierte Zellen eine erhöhte Zellbeweglichkeit sowie gesteigerte Wachstumsraten aufweisen [106]. In Melanomzellen konnten Lee et al. nachweisen, dass die siRNA vermittelte Reduktion der L1CAM Expression eine Senkung der Migrationsrate hervorruft [109].

Weiterhin wurde in *in vivo* Versuchen mit ADAM 10 und L1CAM co-exprimierenden Kolonkarzinomzellen eine vermehrte Bildung von Metastasen gezeigt [110]. Auch die Analyse unterschiedlicher humaner Tumore bestätigt eine Assoziation zwischen der L1CAM Expression und der frühzeitigen Bildung von Metastasen. So detektierten Kaifi et al. in einer Studie mit Kolorektalkarzinompatienten L1CAM in Mikrometastasen der Lymphknoten und des Knochenmarks [101]. Neben den L1CAM abhängigen Veränderungen in Kolorektalkarzinomzellen induziert L1CAM auch in Ovarial- und Brustkrebszelllinien eine vermehrte transendotheliale Migration sowie eine verringerte Zell-Zell-Adhäsion [111, 112].

Ferner wird L1CAM eine Rolle beim Schutz vor Apoptose zugeschrieben. So konnte in PDAC Zellen die Chemotherapeutika-abhängige Induktion der L1CAM Expression mit Chemoresistenz und einem Schutz vor Zytostatika induzierter Apoptose assoziiert werden. Einhergehend mit der Reduktion der Apoptose wurde eine verringerte Caspaseaktivität nachgewiesen [100]. Diese Ergebnisse wurden in Ovarialkarzinom-, Melanom- und PDAC-Zellen erzielt, die nach längerer Gabe von Chemotherapeutika eine L1CAM abhängige Apoptoresistenz zeigten [100, 109, 111, 113]. In Ovarialkarzinom- und PDAC-Zellen wurde durch die Verringerung der L1CAM Expression eine Resensitivierung der Zellen erzielt, so dass eine Chemotherapeutika induzierte Apoptose wieder feststellbar war. Novak-Hofer et al. zeigten darüber hinaus in *in vitro* Versuchen, dass die beschriebene anti-apoptotische Funktion von

L1CAM durch den Einsatz von L1CAM spezifischen Antikörpern gehemmt werden kann [114].

Die Interaktionen und Mechanismen, über die L1CAM zur Tumorprogression beiträgt, sind bisher wenig verstanden. In ersten Studien konnten Neuropilin-1 und $\alpha 5$ -Integrin als heterophile Bindungs-/ Interaktionspartner identifiziert werden.

Neuropilin-1 wird in unterschiedlichen Tumorentitäten und Tumorzelllinien vermehrt exprimiert. In PDAC Zelllinien konnte die erhöhte Expression von Neuropilin-1 mit gesteigertem Zellüberleben und Chemoresistenz assoziiert werden [115]. Stoeck et al. zeigten, dass sich Bindungen zwischen Neuropilin-1 und L1CAM in Ovarialkarzinomzellen fördernd auf das Wachstum der Zellen auswirken [116].

Darüber hinaus wurden in PDAC Zellen Interaktionen zwischen $\alpha 5$ -Integrin und L1CAM nachgewiesen. Diese Interaktionen bewirken eine Reduktion der Caspaseaktivität, was zur Ausprägung eines chemoresistenten Phänotyps beiträgt [117].

L1CAM in der Genregulation

Während bereits für unterschiedliche Tumorentitäten eine Verbindung zwischen L1CAM und einer vermehrten Migration sowie Apoptoseresistenz nachgewiesen wurde, sind die genauen Mechanismen, über die L1CAM zur Tumorprogression beiträgt weitestgehend unbekannt.

In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass L1CAM einerseits durch die MAP-Kinase Erk während der Karzinogenese durch Phosphorylierung aktiviert wird, aber auch andererseits selber mit Komponenten des Erk Signalweges interagieren kann [118, 119, 120]. Erk seinerseits reguliert die Expression unterschiedlicher Gene, die mit Zellinvasion und Motilität in Verbindung gebracht werden, einschließlich der Integrine [121].

1.5 Ziel der Arbeit

Das promigratorische Adhäsionsmolekül L1CAM wurde in verschiedenen Tumorentitäten (so auch dem PDAC) nachgewiesen und seine Expression korreliert hierbei mit einer schlechten Prognose für die Patienten. Die bisherigen Untersuchungen von L1CAM beschränkten sich weitestgehend auf dessen Auswirkungen auf Tumorzellen, die jedoch bereits eine maligne Transformation durchlaufen haben. Ferner ist bisher wenig bekannt, durch welche Mechanismen es zur Überexpression von L1CAM in Tumoren kommt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob aktivierte Pankreasfibroblasten (Myofibroblasten), die einen wesentlichen Bestandteil des Stromas sowohl während einer chronischen Pankreatitis als auch in Pankreasadenokarzinomen darstellen, zur Hochregulation von L1CAM in pankreatischen Gangepithelzellen beitragen, über welche Signalwege dieses vermittelt wird und ob dieses sich in funktionellen Veränderungen der Zellen widerspiegelt.

Zunächst sollte in Geweben von chronischen Pankreatitiden, die einen epidemiologisch gesicherten Risikofaktor für die Entstehung des PDACs darstellen, die Expression von L1CAM im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe detektiert werden. Darüber hinaus sollte mit Hilfe eines Co-Kultursystems, in dem humane, duktale Pankreasepithelzellen mit Pankreasmyofibroblasten co-kultiviert wurden, der Einfluss des Stromas auf die L1CAM Expression in Epithelzellen untersucht werden. Mit Hilfe dieses Systems sollten einerseits die löslichen Faktoren, die zu einer gesteigerten L1CAM Expression in den Epithelzellen führen, und andererseits die zugrundeliegenden Signalwege identifiziert werden. Diese Untersuchungen sollten weiterhin die funktionelle Analyse des L1CAM Promotors umfassen.

Des Weiteren sollte im Rahmen der Arbeit die Beteiligung von L1CAM an Prozessen der EMT untersucht sowie die Relevanz von L1CAM für die Migrationsfähigkeit und Chemoresistenz in pankreatischen Epithelzellen analysiert werden. Durch gezielte Blockade von L1CAM oder einzelnen Komponenten des ermittelten Signalwegs sollte der Einfluss von L1CAM in der Migrationsfähigkeit und Chemoresistenz der Epithelzellen gegenüber apoptotischen Stimuli überprüft und die L1CAM Abhängigkeit bestätigt werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Geräte

Autoklav	Systec, Wettenberg
Brutschrank	Kendro, Langenselbold
ChemiDoc XRS	Bio-Rad, München
Durchflusszytometer GalaxyArgon Plus	DakoCytomation, Hamburg
Filmentwickler Curix 60	Agfa, Düsseldorf
Gelkammer Novex Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Gelkammer Multigel	Biometra, Göttingen
Kipptisch WT17	Biometra, Göttingen
Microplate Luminometer LB96V	EG&G Berthold, Pforzheim
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mikroskop Axioplan 2	Zeiss, Jena
iCycler MyiQ	Bio-Rad, München
Nano Drop Spectrophotometer 10-1000	peqLab Biotechnology, Erlangen
pH-Meter Microprocessor pH537	WTW, Weilheim
Plattenphotometer Opsys MR	Dynex Technologies, Berlin
Powersupply Biometra Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Rollenmischer roller mixer SRT6D	VWR, Darmstadt
Semi Dry Blot Kammer Whatman Fastblot	Biometra, Göttingen
Sofortbildkamera	ORMAF, Pardia, Italien
Sonicator Sonopuls	Bandelin, Berlin
Sterilwerkbank	Kendro, Langenselbold

Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer/Thermoblock 5436	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Tisch TI 1	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe	KNF Laboport, Freiburg
Vakuummzentrifuge Univapo 150H	Uniequip, Planegg
Wärmeschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad Julabo U3	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau

2.2 Chemikalien

Alle nicht angegebenen Chemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen Merck, Darmstadt oder Sigma-Aldrich, München bezogen.

gamma P32-dATP (γ ^{32}P -dATP)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Annexin-V Bindungspuffer (10x)	Becton Dickinson, Heidelberg
Annexin-V-FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München
5' Azadesoxycytidin	Sigma-Aldrich, München
BSA, Fraktion V	Biomol, Hamburg
Caspase Glo-3/7 Assay	Promega, Mannheim
DAB Peroxidase Substrat Kit	Vektor Laboratories, Burlingame (USA)
DMEM	Gibco BRL, Eggenstein
DNA from Salmon testis	Sigma Aldrich, München
DTT	Biomol, Hamburg
Dual-Glow Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Effectene TM Reagenz	Qiagen, Hilden
EGF	Invitrogen, Karlsruhe
EnVision+ System-HRP anti mouse	Dako Diagnostika, Hamburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Etoposid	Bristol Myers Squibb, München

Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Gel Shift Binding 5 x Buffer	Promega, Heidelberg
Gentamycin	PAA, Pasching, Österreich
Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
HEPES	Gibco, Karlsruhe
Human TGF- β 1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Keratinocyten Medium SFM	Gibco BRL, Eggenstein
Kollagen Typ I, <i>from calf skin</i>	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
LY294002, PI3 Kinase Inhibitor	US Biological, Swampscott, Massachusetts (USA)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
M-MLV-Reverse Transkriptase	Promega, Heidelberg
Oligo-dT-Primer	Promega, Heidelberg
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
PBS	PAA, Pasching, Österreich
PCR Auftragspuffer (5x)	Qiagen, Hilden
PD98059, ERK Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Peroxidase-konjugiertes Streptavidin	Jackson ImmunoResearch Labo- ratories, Bar Harbor (USA)
PMSF	Sigma-Aldrich, München
Polyacrylamid-Lösung	Biomol, Hamburg
Protease Inhibitor, complete Mini EDTA free	Roche, Mannheim
Protein A/G Agarose	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Proteinbestimmungsassay D_C	Bio-Rad, München
Proteinmarker PageRuler TM	Fermentas, St. Leon-Rot
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla (USA)
Restriktionsenzyme (Nhe-I, Kpn-I)	New England Biolabs, Frankfurt
Rinderhypophysenextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
RNase A	Boehringer, Mannheim
RNase Inhibitor, RNasin	Gibco BRL, Eggenstein

RNeasy Total RNA Kit	Qiagen, Hilden
RPMI Medium	Biochrom KG, Berlin
SB431542, TGF β Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
SP600125, JNK Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
IQ Sybr Green Supermix	Bio-Rad, München
T4 Polynukleotid Kinase	Promega, Heidelberg
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
TGF- β 1	R&D Systems, Wiesbaden
TOPO/TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
LY294002, PI3 Kinase Inhibitor	US Biological, Swampscott (USA)
X-Gal	Biomol, Heidelberg
100 bp Leiter	Invitrogen, Karlsruhe

2.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 18 mm	Glaswarenfabrik Hecht, Sondheim
Gradientengele 4-20%	Anamed Electrophorese, Groß-Bieberau
Hyperfilm MP	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Nick Columns	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Optical Tape	Bio-Rad, München
96 well PCR Platten	Corning, Amsterdam, Niederlande
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
15ml/50 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Roti-PVDF Membran	Roth, Karlsruhe
Thin certs-TC-Einsätze, 6 well, 0,4 μm	Greiner, Frickenhausen
Thin certs-TC-Einsätze, 24 well, 8 μm	Greiner, Frickenhausen
Whatman 3 MM, Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturpetrischalen 100x20 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsiebe (Cell strainer (100 μm))	BD Bioscience, San Jose (USA)

2.4 Antikörper

2.4.1 Westernblot Antikörper

Antikörper	Spezies	Firma
Akt (Ser473)	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
phospho-Akt	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
ATF	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
phospho-ATF	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Caspase 8 (1C12)	Maus IgG1	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Caspase 9	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Caspase 3	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Caspase 7	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
HSP90 α/β	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
JNK SAPK	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
phospho-JNK SAPK	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
L1CAM / CD171 11A	Maus IgG1	Acris, Hiddenhausen
p44/42 MAP-Kinase	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
phospho-p44/42 MAP-Kinase	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Slug (G-18X)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Smad 2/3	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
phospho Smad 2	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
phospho Smad 3 (Ser 423/425)	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Smad 4 (B-8)	Maus IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Snail 1 (E-18X)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.4.2 ChIP Assay Antikörper

Antikörper	Spezies	Firma
RNA-Polymerase II C-21	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Slug (G-18X)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Snail 1 (E-18X)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Isotypenkontrolle	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Isotypenkontrolle	Ziege	R&D Systems, Wiesbaden

2.4.3 Immunhistochemisch genutzte Antikörper

Antikörper	Spezies	Firma
anti-Maus α – SMA	Maus IgG2a	Sigma-Aldrich, München
anti-Maus Desmin	Kaninchen	Sigma-Aldrich, München
anti-Maus Vimentin	Ziege	Sigma-Aldrich, München
Biotin-SP-konjugiertes anti-Ziege IgG	Esel	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Bar Harbor, USA
Biotin-SP-konjugiertes anti-Kaninchen IgG	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Bar Harbor, USA

2.5 Primer

Die Primer wurden, falls nicht anders angegeben, von der Firma Biometra, Göttingen synthetisiert.

beta-Aktin

Vorwärtsprimer 5': ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG

Rückwärtsprimer 5': CTB CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC

Caspase 3 (Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching)

Vorwärtsprimer 5': TGC CAC AGT CCA GTT CTG TAC C

Rückwärtsprimer 5': TGG TAC AGA TGT CGA TGC AGC

Caspase 7 (Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching)

Vorwärtsprimer 5': CAT CTT TGT CTG TTC CGT TTC GAA C

Rückwärtsprimer 5': CTA CCG CCG TGG GAA CGA TG

Caspase 8 (Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching)

Vorwärtsprimer 5': TGT GAA AGT AGG CTG AGG CAT CTG

Rückwärtsprimer 5': TGA GCT GAC ATC TCA GTT CAC TGT

Caspase 9 (Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching)

Vorwärtsprimer 5': CTG GCT CGG GGT TAC TGC CAG

Rückwärtsprimer 5': GGC TGT CTA CGG CAC AGA TGG

E-Cadherin

Vorwärtsprimer 5': TCT TCC CCG CCC TGC CAA TC

Rückwärtsprimer 5': GCC TCT CTC GAG TCC CCT AG

L1CAM

Vorwärtsprimer 5': TCA CGG GCA ACA ACA GCA ACT

Rückwärtsprimer 5': CGG CTT CCT GTC AAT CAT GCT

L1CAM (e1/e2)

Vorwärtsprimer 5': AGC CCG AGC GGT GGC CGC A

Rückwärtsprimer 5': TAC CGC AGC GCC ACG ACC ATC

N-Cadherin

Vorwärtsprimer 5': GTG CAA TTA GCC AAG GGA ATT C

Rückwärtsprimer 5': CCT GTT CCA CTC ATA GGA GG

Slug

Vorwärtsprimer 5': ATA TTC GGA CCC ACA CAT TAC CT

Rückwärtsprimer 5': GCA AAT GCT CTG TTG CAG TGA

Snail

Vorwärtsprimer 5': CTG CTC CAC AAG CAC CAA GAG TC

Rückwärtsprimer 5': CCA GCT GCC CTC CCT CCA C

TATA Box Binding Protein

Vorwärtsprimer 5': GCT GGC CCA TAG TGA TCT TT

Rückwärtsprimer 5': CTT CAC ACG CCA AGA AAC AG

Vimentin

Vorwärtsprimer 5': TGG CAC GTC TTG ACC TTG AA

Rückwärtsprimer 5': GGT CAT CGT GAT GCT GAG AA

2.6 ChIP Primer

GAPDH

Vorwärtsprimer 5': AGC GCA GGC CTC AAG ACC TT

Rückwärtsprimer 5': AAG AAG ATG CGG CTG ACT GT

Primer für die 1. Slug/Snail Bindungsstelle im L1CAM Promotor (-1241bp)

Vorwärtsprimer 5': GAA GAT GCC CTG CAA GTG CCC

Rückwärtsprimer 5': TGG ACC CAT CTG TGC TCA GAG A

Primer für die 2. Slug/Snail Bindungsstelle im L1CAM Promotor (-433bp)

Vorwärtsprimer 5': ATT CGG GAG AGG TCC CGG GAG T (pos.39601-39580, GeneBank-accession U52112.2)

Rückwärtsprimer 5': AGG AAG GGG GAT GCT CCC TTA GC (pos. 39478-39500, GeneBank-accession U52112.2)

2.7 Oligonukleotide für EMSA

Slug 1. Bindungsstelle 3': CGT CTT CAC TCA GGT GCC TAG TCT TG
5': CAA GAC TAG GCA CCT GAG TGA AGA CG

Slug 2. Bindungsstelle 3': GCG TTG CGT GCA GGT GCC CAT CGC TG
5': CAG CGA TGG GCA CCT GCA CGC AAC GC

2.8 siRNAs

siRNA	Bestell-Nr.	Firma
L1CAM siRNA	10620312	Invitrogen, Karlsruhe
Snail siRNA	SI 02636424	Qiagen, Hilden
Smad 2 siRNA	SI 2757496	Qiagen, Hilden
Smad 3 siRNA	SI 03052126	Qiagen, Hilden
Smad 4 siRNA	SI 03042508	Qiagen, Hilden
Slug siRNA	SI 0047537	Qiagen, Hilden
JNK1 siRNA	SI 02758637	Qiagen, Hilden
negativ Kontroll siRNA, low	46-2002	Invitrogen, Karlsruhe
negativ Kontroll siRNA	1027280	Qiagen, Hilden

2.9 Zellbiologische Methoden

2.9.1 Zelllinien

Die humane pankreatische duktale Epithelzelllinie (HPDE) ist eine adhärenz wachsende Zelllinie, die aus normalem, humanen Pankreasgewebe isoliert und durch Transduktion mit dem E6/E7-Onkogen des humanen Papillomavirus-16 (HPV-16) immortalisiert wurde. Bis auf die Interferenz der E6/E7-Onkoproteine mit den Rb- und p53-Signalwegen weisen die Zellen einen fast normalen Phäno- und Genotyp einer pankreatischen Gangzelllinie auf (Expression von Cytokeratin-7, -8, -18 und -19 sowie Carboanhydrase II, normales k-ras, c-myc, Smad 4, p16^{INK4a} Genotyp). Durch die Inokulation in SCID-Mäuse konnte keine Tumorigenität nachgewiesen werden [122, 123].

Die Kultivierung der HPDE Zellen erfolgte in RPMI Medium und Keratinozytenmedium (1:1) supplementiert mit 0,5 % (w/v) L-Glutamin, 5 % (w/v) FCS, 5 ng/ml *Epidermal Growth Factor* (EGF) und 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt.

Die Zelllinie HeLa wurde in RPMI Medium supplementiert mit 1 % (w/v) L-Glutamin, 10 % (w/v) FCS kultiviert.

2.9.2 Zellkultur

Alle im Folgenden beschriebenen Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Sterilwerkbank mit autoklavierten Materialien und Geräten sowie sterilfiltrierten Lösungen. Zum Ausschluss von Mycoplasmen-Kontaminationen wurde die Zellkultur regelmäßig überprüft (*MycAlert Mycoplasma Detection Kit*, Lonza).

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert und entsprechend ihrer Wachstumsrate geteilt. Hierzu wurde das verbrauchte Medium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen zum Ablösen mit 5 ml 1x Trypsin/EDTA in PBS versehen. Nach einer Inkubationszeit von ca. 15 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 5 ml Medium gestoppt, die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 UpM für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in vorgewärmtem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % Feuchtigkeit kultiviert.

2.9.3 Isolierung von murinen Pankreasmyofibroblasten

Die aus den C57BL/6 Mäusen isolierten Pankreata wurden mittels Skalpell unter sterilen Bedingungen zerkleinert und in Tropfen aus 1 μ l Mausserum und 1 μ l 10 mM CaCl_2 -Lösung in eine Kulturpetrischale gegeben. Die vorgelegten Tropfen dienten neben der Befestigung der Gewebestückchen auch der Stimulation der Migration. Nach einer 30 minütigen Koagulationszeit bei 37 °C wurden 10 ml DMEM (low glucose, versetzt mit 1 % (w/v) L-Glutamin, 20 % (w/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin, 0,2 % (v/v) Gentamicin und 1 % (v/v) HEPES-Puffer) in die Kulturschalen gegeben und die Zellen zur weiteren Kultivierung in den Brutschrank gestellt. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Nach ca. 3 Wochen war eine ausreichende Migration der Fibroblasten erreicht, so dass die Zellen mit 5 ml 1x Trypsin/EDTA in PBS sowie durch Nutzung eines Zellschabers abgelöst werden konnten. Zur Trennung der Fibroblasten von den noch bestehenden Zellstücken wurde die Zellsuspension mit Hilfe eines Zellsiebs (Cell Strainer) filtriert. Die im Zellsieb verbliebenen Zellstücke wurden verworfen, während die im Medium befindlichen Fibroblasten mittels Zentrifugation vom Medium getrennt wurden. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in Medium resuspendiert und 5×10^5 Fibroblasten pro Zellkulturflasche ausgesät.

Zur Überprüfung des myofibroblastoiden Phänotyps wurden die Fibroblasten mittels immunzytochemischer Färbung auf die Mesenchymalmarker α -SMA, Vimentin und Desmin gefärbt (siehe 2.13.2).

2.9.4 Co-Kultivierung von HPDE Zellen mit Pankreasmyofibroblasten

Zur Co-Kultivierung der HPDE Zellen mit Pankreasmyofibroblasten (PMF) wurden 1×10^5 HPDE Zellen in 2 ml HPDE Medium in ein well einer 6 well Platte ausgesät. In jedes well wurden Transwell-Einsätze (0,4 μ m Porengröße) eingehängt, in die ihrerseits 2×10^5 Pankreasmyofibroblasten in 1,5 ml Fibroblastenmedium (siehe 2.9.3 mit 10 % (v/v) FCS) ausgesät wurden. 24 Stunden nach Aussäen der Zellen wurde das Medium beider Kompartimente gewechselt. Zur Aufrechterhaltung der Co-Kulturen über längere Zeit wurden einmal wöchentlich beide Zellarten mittels Trypsinierung aus ihren wells abgelöst, gezählt und in den oben beschriebenen Konzentrationen erneut ausgesät. Die parallel mitgeführten mono-kultivierten HPDE Zellen wurden während dieser Zeit in 2 ml HPDE Medium und 1,5 ml Fibroblas-

tenmedium kultiviert und wie die Co-Kultur behandelt.

Zur siRNA Behandlung der HPDE Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat die Transwell-Einsätze mit den Myofibroblasten aus den Co-Kulturen vorübergehend in einer gesonderten 6 well Platte mit 2 ml Medium/well aufbewahrt und die Transfektion der HPDE Zellen nach Anleitung durchgeführt (siehe 2.9.5). Acht Stunden nach der Transfektion wurde mittels Mediumwechsel das Transfektionsreagenz entfernt, die Transwell-Einsätze wieder in die 6 well Platten eingehängt und die Co-Kultivierung für weitere 64 Stunden aufrechterhalten.

2.9.5 Transfektion von Zellen

siRNA Transfektion

Um die Expression bestimmter Gene (L1CAM, Slug, Snail, JNK1, Smad2/3) gezielt zu unterbinden, wurden HPDE Zellen mit siRNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte in 6 well Platten. Pro well wurden 100 μl OptiMEM Medium mit 150 ng siRNA und 12 μl HiPerFect Transfektionsreagenz vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde der Ansatz tröpfchenweise auf die mit 1,5 ml frischem Medium versehenen Zellen gegeben. Bis zur weiteren Bearbeitung der Zellen im Rahmen der Fragestellung wurde die Zellkultur für mindestens 24 Stunden weitergeführt.

Plasmid Transfektion

Zur Transfektion der HPDE/HeLa Zellen mit Plasmid-DNA (Luziferase Plasmide, Slug, Snail, pcDNA3.1) wurde das Transfektionsreagenz *EffecteneTM* genutzt. 100 μl EC-Puffer wurden mit 0,4-0,8 μg Plasmid-DNA und 8 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ DNA Enhancer vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 20 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ DNA Effectene Transfektionsreagenz zugesetzt und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Vor der tröpfchenweisen Zugabe des Reaktionsansatzes zu den Zellen wurde einerseits das Medium abgesaugt und durch 1,6 ml frisches Medium ersetzt und andererseits 0,6 ml Medium zum Reaktionsansatz zugegeben. Nach 8-16 Stunden wurde das Transfektionsreagenz mittels Mediumwechsel von den Zellen entfernt und die Zellen für mindestens 24 Stunden weiter kultiviert.

2.9.6 Einsatz von Inhibitoren

Die Kinaseinhibitoren PD98059, SP600125, L294002 und SB202190 wurden jeweils in einer Konzentration von 25 $\mu\text{M}/\text{l}$ eingesetzt. In den Co-Kulturversuchen wurden die HPDE Zellen vor der Inhibitorgabe zwei Wochen mit PMFs kultiviert, während bei den TGF- β 1 stimulierten Zellen die Inhibitorgabe 30 min vor der TGF- β 1 Stimulation erfolgte. Der TGF- β Inhibitor SB431542 wurde in einer Konzentration von 10 $\mu\text{M}/\text{l}$ in 2 Wochen co-kultivierten Zellen eingesetzt. Die Inhibitorgabe erfolgte 24 Stunden vor der Aufarbeitung der Zellen. Der Methylierungsinhibitor 5'-Azadesoxycytidin wurde in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 1 nM/l eingesetzt. Die Zellen (z.T. bereits mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert) wurden 2 Tage vor der Aufarbeitung mit dem Inhibitor behandelt.

2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.10.1 Herstellung von Ganzzelllysaten

2 x Lämmli-Puffer	128 mM	Tris-Base
	4,6 % (w/v)	SDS
	10 % (v/v)	Glycerol
	pH 7,6	

Ganzzelllysate wurden in der Regel zum Proteinnachweis mittels Westernblot herangezogen. Die Zellen wurden ausgesät und kultiviert wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben. Das Medium wurde abgesaugt und die adhären wachsenden Zellen 2 x mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen in 150 μl des 2 x Lämmli-Puffers mit Hilfe eines Zellschabers gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur besseren Homogenisierung der Lysate folgte eine Ultraschallbehandlung (4 x 1 sec). Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.10.2 Herstellung von Kernextrakten

EMSA Puffer I	10 mM	HEPES (pH7,9)
	10 mM	KCl
	0,2 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Aprotinin
EMSA Puffer II	20 mM	HEPES (pH7,9)
	0,4 M	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Aprotinin

DTT, PMSF und Aprotinin wurden stets frisch zugesetzt.

Kernproteine wurden für EMSA Analysen (siehe Kapitel 2.12.2) sowie Westernblots (siehe Kapitel 2.10.5) benötigt.

Die Zellen wurden ausgesät und kultiviert wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben.

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen in 350 μl EMSA-Puffer I abgeschabt, in ein Eppendorfgefäß überführt und gekühlt 1 min bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut in 350 μl EMSA-Puffer I resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Kernpellet in 50-80 μl gekühltem EMSA-Puffer II aufgenommen, 30 min bei 4 °C geschüttelt und anschließend für 10 min bei 4 °C und 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand, in dem die Kernproteine enthalten sind, wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.10.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Ganzzelllysaten und Kernextrakten wurde mit dem Proteinassay D_C der Firma Biorad nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Photometers Opsys MR (Dyneco Technologies) sowie der Revelation QuickLink Software.

2.10.4 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese

4 x Farbpuffer	0,005 % (w/v)	Bromphenolblau
	2,5 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
	in 2x Lämmli-Puffer	
10 x Laufpuffer	25 mM	Tris-Base
	0,1 % (w/v)	SDS
	190 mM	Glycin

Zum Nachweis spezifischer Proteine in Ganzzell- und Kernlysaten wurden die Proteingemische mittels Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die zu analysierenden Proben (siehe 2.10.1 und 2.10.2) wurden mit Hilfe der Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 2.10.3) auf eine festgelegte Proteinmenge (10-20 μ g) eingestellt. Hierzu wurden das entsprechende Volumen der Probe mit 2 x Lämmli-Puffer auf ein Volumen von 15 μ l aufgefüllt und anschließend mit 5 μ l 4 x Probenpuffer versetzt. Die vorbereiteten Proben wurden weiterhin für 5 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels 4-20 % Gradientengels bei 125 V, bis die Lauffront aus dem Gel ausgetreten war.

Anschließend wurden die Proteine auf eine Membran übertragen, um mittels Antikörperdetektion einen spezifischen Nachweis durchzuführen (siehe 2.10.5).

2.10.5 Proteintransfer (Western-Blotting)

1 x TBS	20 mM	Tris-Base
	140 mM	NaCl
	pH 7,6	
TBS-Tween	100 ml	10 x TBS
	500 μ l	Tween-20
	ad 1000 ml Aqua dest.	

Blot-Puffer A	300 mM	Tris-Base
	20 % (v/v)	Methanol
	pH 11	
Blot-Puffer B	25 mM	Tris-Base
	20 % (v/v)	Methanol
	pH 10,6	
Blot-Puffer C	25 mM	Tris-Base
	20 % (v/v)	Methanol
	0,04 M	Aminocaprinsäure
	pH 10,6	

Die Proteine wurden mittels Semidry-Blotverfahren aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid Membran (PVDF) übertragen. Hierbei wurde folgender Aufbau genutzt:

- sechs in Blot-Puffer A getränkte Blätter Whatman Papier
- drei in Blot-Puffer B getränkte Blätter Whatman Papier
- die Membran, 1 min in Methanol getränkt und anschließend in Aqua dest. gewaschen
- das Gel
- sechs in Blot-Puffer C getränkte Blätter Whatman Papier

Der Transfer der negativ geladenen Proteine erfolgte für 45 min bei einer konstanten Stromstärke, die sich aus folgender Formel errechnete:

$$\text{Stromstärke in mA} = \text{Länge in cm} \times \text{Breite in cm} \times 1,25 \text{ mA/cm}^2$$

2.10.6 Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper

Die Membran wurde nach dem Übertragen der Proteine in ein Schälchen überführt und für 10 min auf einem Schüttler mit TBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 5 % (w/v) Magermilch in TBS-Tween über zwei Stunden bei

RT blockiert. Die spezifischen Erstantikörper wurden nach Herstellerangaben in 5 % (w/v) Magermilch in TBS-Tween oder 5 % (w/v) BSA in TBS-Tween verdünnt und zu der Membran in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte bei 4 °C über Nacht auf einem Kipp-/Rollmischer.

Am folgenden Tag wurde der Blot drei Mal für je 10 min mit TBS-Tween gewaschen, bevor er für eine Stunde bei RT auf dem Rollmischer mit dem Zweitantikörper inkubiert wurde. Alle Zweitantikörper wurden 1:2000 in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-Tween angesetzt und waren Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt.

An drei weitere Waschgänge mit TBS-Tween schloss sich die Entwicklung des Blots an, bei der die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase das eingesetzte Substrat umsetzte und dabei Licht emittierte. Die Lichtreaktion wurde mit Hilfe einer Chemolumineszenz-Geldokumentationsanlage in Form von Banden detektiert. Der mitgeführte Proteinstandard ermöglicht eine Größenordnung der detektierten Banden. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde in jedem Gel das *Housekeeping Gene* HSP90 detektiert.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 RNA-Techniken

Zur Isolation von mRNA wurden die Zellen wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben ausgesät und entsprechend des Versuchansatzes stimuliert und kultiviert. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Isolation der mRNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen *RNeasy Total RNA* Kits nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung ihrer Konzentration wurde die RNA photometrisch bei 260/280 nm vermessen (Nanodrop Photometer (Paqlab)). Die Lagerung der mRNA erfolgte bei -80 °C.

2.11.2 Herstellen von cDNA

Zur Herstellung von cDNA aus mRNA wurden 1,5 µg der RNA in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 11,4 µl aufgefüllt. Zur RNA wurden im nächsten Schritt 1 µg Oligo-dT-Primer gegeben, kurz gemischt und anzentrifugiert, bevor die Proben für 5 min bei 70 °C im Thermoblock erwärmt wurden. Nach der Abkühlung der Proben auf Eis wurden

11,6 μl Mastermix zugegeben. Der Ansatz wurde erneut gemischt und für 90 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Die hergestellte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Mastermix je Probe:

5 μl	5x M-MLV-First Strand Buffer
1,25 μl	dATP (10 mM)
1,25 μl	dGTP (10 mM)
1,25 μl	dTTP (10 mM)
1,25 μl	dCTP (10 mM)
0,6 μl	RNAsin RNase Inhibitor (40U/ μl)
1,0 μl	M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/ μl)

2.11.3 Echt-Zeit Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR)

Für die Realtime PCR wurden 5 μl der hergestellten cDNA mit 20 μl Aqua dest. verdünnt. Die PCR erfolgte in Doppelbestimmungen in 96 well PCR-Platten. Hierzu wurden 10 μl der verdünnten cDNA in ein well der Platte pipettiert. Zu der cDNA wurden 20 μl des Mastermixes gegeben und die fertige Platte mit einer selbstklebenden PCR Folie verschlossen. Die PCR erfolgte im iCycler MyiQ Single Color Realtime PCR Detection System (BioRad) unter Verwendung der MyiQ-Software. In den untersuchten Proben wurde des Weiteren eines der *Housekeeping Gene* β -Aktin oder TBP detektiert und zur Normierung der Ergebnisse genutzt.

Mastermix je Probe:

15 μl	SYBR Green
0,15 μl	Vorwärtsprimer
0,15 μl	Rückwärtsprimer
4,7 μl	Aqua dest.

2.11.4 Konventionelle PCR

Zur analytischen Bestimmung der Exon 1 enthaltenden L1CAM mRNA sowie zur Promotorklonierung wurden konventionelle Polymerase Kettenreaktionen eingesetzt. Dazu wurden zu 2 μl cDNA 28 μl des Mastermixes gegeben, gemischt und

anzentrifugiert. Die PCR erfolgte in Thermal Cyclern der Firma Applied Biosystems, Darmstadt. Zur Detektion der PCR-Produkte wurden 5 μ l des PCR Ansatzes mit 2 μ l Probenpuffer versetzt und in einem 8 % Acylamid PCR Gel bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die Lauffront ausgetreten war, wurde das Gel für 15 min in Ethidiumbromid-Lösung inkubiert und auf einem UV-Tisch mit Hilfe einer Sofortbild-Kamera dokumentiert.

Mastermix je Probe:

21,4 μ l	Aqua dest.
3 μ l	10 x PCR Puffer
0,3 μ l	Taq- Polymerase
0,6 μ l	dATP (10 mM)
0,6 μ l	dGTP (10 mM)
0,6 μ l	dTTP (10 mM)
0,6 μ l	dCTP (10 mM)
0,9 μ l	MgCl ₂

2.11.5 Herstellung der Luziferasekonstrukte

Primer für Promotorkonstrukt

Primer L1Pr-F 5': ACC ACA GCT CAG TGC CTC ATG G (pos. 40511-40489, GeneBank-accession U52122.2)

Primer L1R 5': GCT AGC TGC GGC AGC AGC GGC TG (pos. 39086-39109, GeneBank-accession U52112.2)

Primer TA-R 5': TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA

Primer pGL3 5': CCA TCT TCC AGC GGA TAG AAT GGC

Primer zur Mutation der 1. Slug Bindungsstelle

Vorwärtsprimer 5': GTC TTC ACT **TGG GTG** CCT AGT CTT

Rückwärtsprimer 5': AAG ACT AGG **CAC CCA** AGT GAA GAC

Primer zur Mutation der 2. Slug Bindungsstelle

Vorwärtsprimer 5': GCG TTG CGT **GGT GGT** GCC CAT CGC TGG CCG

Rückwärtsprimer 5': GCC CCA GCG ATG GGC **ACC ACC** ACG CAA CGC

LBA-Medium	10 g/l	Trypton
	10 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefe Extrakt
	75 mg/ml	Ampicillin
LBA-Agar	15 g	Agar
	ad 1 l LBA-Medium	

Zur Herstellung der Luziferasekonstrukte wurden entsprechend den Genbank Daten (GeneBank accession U52112.2) flankierende Primer für die 5'-Region des Exon 1 des L1CAM Gens hergestellt. Die Primer waren so gewählt, dass durch Amplifikation humaner genomischer DNA ein 1425 Basenpaare großes Fragment (Position 39086-40511) entstand, das an Position 39109 den beschriebenen, dem Exon 1 vorgelagerten transkriptionellen Startpunkt [73] enthielt. Am 3' Ende war in das PCR Produkt zusätzlich eine Nhe-I Schnittstelle (GCTAGC) eingebaut worden.

Das PCR Produkt wurde anschließend nach Herstellerprotokoll in den pCR2.1-TOPO/TA Vektor kloniert und in E.coli-Zellen (TOP10, Invitrogen) transformiert. Die Zellen wurden auf LBA-Platten, die mit 40 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal beschichtet worden waren, ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein *Colony screening* der weißen Kolonien, indem einzelne Kolonien gepickt und parallel in ein PCR-Reaktionsgefäß und ein Kulturröhrchen mit 4 ml LBA-Medium verbracht wurden.

Zur Verifikation des gewünschten Konstrukts und dessen richtiger Orientierung erfolgte eine PCR mit L1Pr-F und dem Primer TA-R. Positive Klone erzeugten ein 1520 bp großes Produkt. Mit den entsprechenden Kulturansätzen wurden Plasmidpräparationen durchgeführt. Fünf μg dieses Plasmids wurden anschließend mit den Enzymen Kpn-I und Nhe-I geschnitten und ein 1500 bp Fragment aus dem Agarosegel eluiert. Dieses wurde in einen ebenfalls Kpn-I und Nhe-I geschnittenen *pGL3 basic luciferase vector* (Promega) ligiert und in TOP10-Zellen transformiert. Die entstandenen Kolonien wurden mittels PCR (Primer L1Pr-F, pGL3) auf das gewünschte Konstrukt in der richtigen Orientierung überprüft. Die entsprechenden Kulturansätze der positiven Klone (1610 bp Produkt) wurden einer Plasmidpräparation zugeführt.

Um weiterhin Promotorfragmente zu erhalten, die Mutationen innerhalb der Snail/Slug Bindungsstellen aufweisen, wurden je zwei Basen des Snail/Slug Erkennungsmotivs ausgetauscht. Die Konsensussequenz CAGGTG der 1. Slug Bindungsstelle wurde zu TGGGTG mutiert, während in der 2. Slug Bindungsstelle eine Mutation zu GTGGTG vorgenommen wurde. Die Mutationen wurden mit Hilfe des *QuickChange Site-directed mutagenesis Kit* (Stratagene) entsprechend den Angaben des Herstellers eingefügt. Alle entstandenen Konstrukte wurden durch Sequenzierung (BigDye, PerkinElmer) überprüft.

2.12 Analytische Methoden

2.12.1 Chromatin Immunpräzipitationsassay (ChIP Assay)

Prinzip der Methode

Mit Hilfe von Chromatin Immunpräzipitationsassays können *in vivo* Interaktionen zwischen DNA und einem bestimmten Protein nachgewiesen werden, so z.B. die Bindung von Transkriptionsfaktoren, Transkriptionscofaktoren, DNA Replikationsfaktoren oder DNA Reparatur Proteinen.

Zur Durchführung des ChIP-Assays werden die in lebenden Zellen bestehenden DNA-Protein Interaktionen mittels Formaldehyd konserviert. Nach diesem als „Crosslinking“ bezeichneten Schritt werden die Zellen lysiert und die DNA mittels Ultraschall in 0,1 bis 1 kb große Stücke zerkleinert. Durch den Einsatz von Antikörpern wird mittels Immunpräzipitation ein spezifischer Protein-DNA Komplex angereichert. Es folgte eine Erwärmung des Protein-DNA Komplexes, so dass die Vernetzung zwischen DNA und Protein rückgängig gemacht wird und die DNA aufgereinigt werden kann. Im Anschluss wird die angereicherte DNA mittels PCR identifiziert und quantifiziert.

Durch den parallelen Einsatz von unspezifischen und spezifischen Antikörpern kann eine Aussage über eine Protein-spezifische Anreicherung der DNA Sequenz gemacht werden.

Durchführung

Glycin Lösung	1,25 M	Glycin
SDS-Lysispuffer	1 % (w/v) 10 mM 50 mM	SDS EDTA Tris HCl, pH 8,0
Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette 900 μ l	Mini Complete Protease Inhibitor Aqua dest.
Salz Puffer	0,1 % (w/v) 1 % (v/v) 2 mM 20 mM 150 mM	SDS Triton X 100 EDTA Tris HCl, pH 8,0 NaCl
Hoch Salz Puffer	0,1 % (w/v) 1 % (v/v) 2 mM 20 mM 500 mM	SDS Triton X 100 EDTA Tris HCl, pH 8,0 NaCl
1M Salz Puffer	0,1 % (w/v) 1 % (v/v) 2 mM 20 mM 1 M	SDS Triton X 100 EDTA Tris HCl, pH 8,0 NaCl
Lithium-Chlorid Puffer	0,25 mM 1 % (v/v) 1 mM 10 mM	LiCl Triton X 100 EDTA Tris HCl, pH 8,0
TE-Puffer	1 mM 10 mM	EDTA Tris HCl, pH 8,0

Dilutionspuffer	0,01 % (w/v)	SDS
	1,1 % (v/v)	Triton X 100
	1,2 mM	EDTA
	16,7 mM	Tris HCl, pH 8,0
	167 mM	NaCl
Elutionspuffer	0,1 % (w/v)	SDS
	84 mg	Natriumhydrogencarbonat
	ad 10 ml	Aqua dest.
Protein G/A Agarose	5,4 mg	Protein G/A Agarose
	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	BSA
	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Standard DNA <i>from Salmon testis</i>
	ad 2 ml	Dilutionspuffer

Zur Herstellung der ChIP Proben wurden in zwei 10 cm Kulturschalen je 1×10^6 Zellen für 48 Stunden kultiviert, bevor sie für 18 Stunden mit 5 ml OptiMEM Medium serumstarviert wurden. Nach der Serumstarvation wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 9 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert.

Um die bestehenden Protein-DNA Interaktionen zu vernetzen, wurden 270 μl einer 18,5 % (w/v) PFA Lösung ins Medium gegeben und für 10 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 500 μl Glycin (1,25 M) und anschließender Inkubation für 5 min bei RT wurde der Ansatz neutralisiert. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gespült. Zu den adhären Zellen wurden 800 μl PBS mit 0,1 ng/ml PMSF pipettiert und mit Hilfe eines Zellschabers aus der Platte gelöst. Die Zellysate beider Kulturschalen wurden an dieser Stelle in einem Eppendorfreaktionsgefäß vereinigt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13000 UpM für 2 min wurde der Überstand abgenommen und die im Pellet verbliebenen Zellen in 400 μl SDS-Lysispuffer mit 20 μl Protease Inhibitor aufgenommen. Die Fragmentierung der DNA erfolgte mittels Ultraschall für 1 min. Hieran schloss sich ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 UpM an. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen wurden in einem 15 ml Röhrchen die Zellysate mit 8 ml ChIP Dilutionspuffer und je 80 ml Proteine G bzw. A Agarose versetzt. Der Ansatz rotierte für 1 Stunde bei 4 °C, bevor die Agarose mittels Zentrifugation (5 min, 3000 UpM) sedimentiert und der Überstand abgenommen wurde. Der Überstand wurde in vier Eppendorfreaktionsgefäßen à 2 ml fraktioniert, mit 2 μg Antikörper versetzt

und über Nacht im Rotationsmischer bei 4 °C inkubiert.

Um eine spezifische Präzipitation der DNA gebundenen Proteine zu ermöglichen, wurden dem Ansatz 40 μl Protein G bzw. A Agarose zugegeben und nach 1 Stunde Rotation bei RT für 5 min bei 13000 UpM zentrifugiert. Es schlossen sich Waschschritte mit unterschiedlichen Puffern an:

2 x Salz Puffer

2 x Hoch Salz Puffer

1 x 1 M Salz Puffer

1 x Lithium-Chlorid Puffer

2 x TE-Puffer

Hierzu rotierten die Agarosekügelchen in 1 ml des jeweiligen Puffers für 5 min bei RT, bevor der Überstand nach einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt abgenommen und verworfen wurde.

Nach dem Absaugen des letzten Waschpuffers wurde das Pellet erneut zentrifugiert, um verbliebene Überstände entfernen zu können. Zur Elution wurde die Agarose in 100 μl Elutionspuffer aufgenommen, vorsichtig gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und in einem neuen Eppendorfreaktionsgefäß gesammelt. Die Elution wurde mit weiteren 100 μl Elutionspuffer wiederholt.

Zur Auflösung der Protein-DNA Vernetzung (*un-crosslinking*) wurden die Eluate mit 8 μl 5 M NaCl Lösung vermischt und über Nacht auf 65 °C erhitzt. Im Anschluss erfolgte ein RNase Verdau (1 μl RNase A; 10 mg/ml) für eine Stunde bei 37 °C im Thermoblock sowie eine Behandlung mit Proteinase K. Hierzu wurden die Proben mit 4 μl 0,5 M EDTA, 8 μl 1 M Tris HCL, pH 8,0 und 1 μl Proteinase K für 1 Stunde auf 45 °C im Thermoblock erhitzt.

Die durch Präzipitation angereicherte DNA wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen aufgereinigt und mittels Realtime PCR (siehe 2.11.3) analysiert. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurden die Realtime PCR Wert auf GAPDH PCR Werte normiert.

2.12.2 *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay* (EMSA)

Prinzip der Methode

Die Methode des EMSAs dient dem Nachweis von Interaktionen zwischen DNA und Transkriptionsfaktoren. Hierzu werden Kernproteinextrakte mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die eine potentielle Bindungsstelle für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor besitzen, inkubiert. Der Ansatz wird in nativen PAA-Gelen gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet.

Oligonukleotide, die an Proteine gebunden sind, wandern im elektrischen Feld langsamer als ungebundene Oligonukleotide, so dass auf dem Röntgenfilm DNA-Protein Komplexe als Bande/Signal zu erkennen sind. Durch die Zugabe eines Antikörpers gegen das zu untersuchende Protein kommt es zur Ausbildung eines Antikörper-Protein-DNA Komplexes, welcher während der elektrophoretischen Auftrennung noch langsamer wandert. Somit bildet sich oberhalb des Signals eine weitere Bande, der so genannte „Supershift“.

Durchführung

10 x TBE	89 mM	Tris-Base
	2 mM	EDTA
	89 mM	Borsäure
	pH 7,6	
natives PAA Gel, (5 %)	2 ml	10 TBE Puffer
	1250 μ l	Glycerol (80 %) (v/v)
	5 ml	PAA (40 %) (w/v)
	300 μ l	APS (10 %) (w/v)
	30 μ l	TEMED
	ad 40 μ l	Aqua dest.
TE-Puffer	1 mM	EDTA
	10 mM	Tris HCl, pH 8,0

Im Vorfeld des Assays wurde aus den einzelsträngig gelieferten Oligonukleotiden doppelsträngige-DNA generiert. Hierzu wurde jedes Oligonukleotid 1:50 in TE-Puffer verdünnt und für 10 min auf seine spezifische *Annealing Temperatur* (TS)

erwärmt. Nachdem die beiden Oligonukleotide 1:1 gemischt wurden, folgte eine erneut Erwärmung für 10 min auf ihre TS. Durch das darauf folgende langsame Abkühlen auf RT interagierten die komplementären Einzelstränge miteinander und es bildete sich ein doppelsträngiges Oligonukleotid aus.

Anschließend folgte die endständige Markierung der Oligonukleotide mit γ - ^{32}P .

Ansatz zur radioaktiven Markierung der Sonden

1 μl	Oligonukleotid
2 μl	10 x Kinase Puffer
15 μl	Aqua dest.
1 μl	^{32}P gelabeltes ATP
1 μl	T4-Kinase

Die einzelnen Komponenten des Kinase Ansatzes wurden am Radioaktivarbeitsplatz miteinander gemischt und für 30 min bei 37 °C im Thermoblock inkubiert. Zur Trennung der nicht markierten DNA von den γ - ^{32}P -gelabelten Oligonukleotiden wurde der Ansatz mit Hilfe von *Nick Columns* entsprechend der Herstelleranleitung aufgereinigt. Im Anschluss erfolgte die Einengung der radioaktiven Sonde auf ein Volumen von 100-80 μl in der Vakuumzentrifuge.

Zur Durchführung des EMSAs wurden die Kernextrakte (siehe 2.10.2) auf Eis aufgetaut und folgendem Bindungsansatz zugeführt:

Bindungsansatz	5 μg	Kernextrakte
	2 μl	5 x Bindungspuffer
	2 μl	radioaktiv markiertes Oligonukleotid
	ad 10 μl	Aqua dest.
in Supershift Versuchen:	+2 μl	Antikörper

Der Ansatz wurde 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf das native PAA-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte gekühlt bei 12 mA für 90 min. Im Anschluss wurde das Gel auf ein Whatman-3MM-Filterpapier übertragen und für 2 Stunden bei 80 °C vakuumgetrocknet. Auf das getrocknete Gel wurde ein Röntgenfilm gelegt und mit Hilfe des Agfa *Curix 60* nach 72 Stunden entwickelt.

2.12.3 Migrationsassay

Prinzip der Methode

Beim Migrationsassay werden unterschiedlich stimulierte oder siRNA behandelte Zellen in beschichtete Transwell-Einsätze ausgesät und kultiviert. Nach einer 24 stündigen Inkubationszeit werden die Zellen mittels Kristallviolett angefärbt, wobei in einem ersten Ansatz sowohl die migrierten als auch die unmigrierten Zellen und in einem zweiten Ansatz nur die migrierten, d.h. unterhalb des Transwells befindlichen Zellen angefärbt werden. Der Farbstoff beider Ansätze wird eluiert und photometrisch vermessen und anschließend die prozentuale Migrationsrate nach folgender Formel berechnet:

$$\text{prozentuale Migrationsrate} = \frac{\text{OD}_{500\text{nm}} \text{ der migrierten Zellen} * 100}{\text{OD}_{500\text{nm}} \text{ der gesamten Zellen}} \quad (2.1)$$

Durchführung

Beschichtungslösung	400 $\mu\text{g/ml}$	Kollagen I in Aqua dest.
Kristallviolett Lösung	300 mg	Kristallviolett, gelöst in
	6 ml	Ethanol (2 %; v/v)
	300 ml	Borat Puffer (0,1 M pH 8,5)

Zur Beschichtung der Transwell-Einsätze (Porengröße: 8 μm) wurden 50 μl einer Kollagen I-Lösung gleichmäßig auf der Netzstruktur verteilt und zum Trocknen für ca. 2 Stunden unter der Sterilwerkbank belassen.

Nachdem die Beschichtung eingetrocknet war, wurden in jedes well 500 μl Medium (1 % (v/v) FCS) pipettiert und die beschichteten Einsätze eingehängt. In die Einsätze wurden in einem Volumen von 500 μl 5 x 10⁴ Zellen der vorstimulierten bzw. siRNA behandelten oder unbehandelten Zellen gegeben. In einigen Versuchen wurden die Zellen auch während des Migrationsansatzes stimuliert, in diesem Fall wurde die Konzentration für 1 ml Gesamtvolumen berechnet.

Nach 24 Stunden wurde das Medium vorsichtig abgesaugt. Aus einem der Einsätze eines jeden Doppelansatzes wurde die im Transwell-Einsatz befindlichen Zellen mit

Hilfe eines Wattestäbchens entfernt, so dass nur die migrierten, unter dem Transwell befindlichen Zellen verblieben. Alle Transwell-Einsätze wurden in einer neuen 24 well Platte für 30 min bei RT mit 600 μl (200 μl im Transwell, 400 μl im well) Kristallviolett Lösung gefärbt. Nach der Entfernung der Kristallviolett Lösung wurden die Einsätze dreimal mit 1500 μl Aqua dest. für je 15 min gespült. Anschließend erfolgte die Entfärbung der Zellen mit Hilfe von 500 μl 10 % (v/v) Essigsäure für mindestens 1,5 Stunden bei RT.

Die Auswertung der Färbung wurde in Doppelbestimmungen am Plattenphotometer Opsys MR (Dynec Technologies) bei 550 nm vorgenommen. Die gemessenen OD-Werte wurden für die Berechnung der Migrationsrate verwendet.

2.12.4 Luziferaseassay

Der Luziferaseassay erfolgte mit Hilfe des Promega *Dual Luciferase Reporter Assay Systems*. Hierzu wurden 2×10^5 Zellen in 6 well Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 0,5 μg des spezifischen Firefly Plasmids sowie 0,1 μg des Renilla Referenzplasmids transfiziert. Bei Versuchen, in denen der Transkriptionsfaktor Slug ebenfalls in die Zellen transfiziert wurde, geschah dieses einen Tag vor der Transfektion der Luziferase Plasmide.

Zur Durchführung des Luziferaseassays wurde das Medium der Zellen 24 Stunden nach der Transfektion abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Im Weiteren wurden die Zellen in 120 μl 1 x *Passive Lysisbuffer* mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Zelllysate wurden für 1 min bei 13000 UpM zentrifugiert und je 20 μl des Überstandes in eine 96 well Platte pipettiert. Zu den Lysaten wurden 25 μl der Lösung *LAR II* pipettiert und direkt im Anschluss die Lumineszenz der Firefly Luziferase über 20 Sekunden gemessen. In einem zweiten Schritt wurden 25 μl *Stop and Glow Substrat* zugegeben und erneut über 20 sec die Lumineszenz der Renilla Luziferase gemessen.

Zur Analyse wurden die Werte der Firefly Luziferase auf die der Renilla Luziferase normiert.

2.12.5 TGF- β 1 ELISA

Um die TGF- β 1 Konzentration in den Überständen von mono- und co-kultivierten HPDE Zellen zu bestimmen, wurde ein ELISA durchgeführt. Hierzu wurden die Überstände der mono- bzw. mit PMFs co-kultivierten HPDE Zellen nach 72 Stunden abgenommen und zur Abtrennung von Zellresten zentrifugiert (10 min, 3000 UpM). Die Bestimmung der aktiven Form des humanen TGF- β 1 erfolgt mit Hilfe des *Human TGF-beta 1 Quantikine ELISA Kits* der Firma R&D Systems und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung der Farbreaktion wurde mit Hilfe des Plattenphotometers Opsys MR (Dytec Technologies) vorgenommen und die gemessenen OD-Werte auf die parallel bestimmte Zellzahl normalisiert.

2.12.6 Caspaseassay

Zur Durchführung des Caspaseassays (Promega) wurde der Mediumüberstand von den Zellen abpipettiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nachdem die Zellen mittels Trypsin-EDTA aus der Zellkulturplatte gelöst wurden, wurden sie zum zugehörigen Überstand in das Röhrchen pipettiert. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Zentrifugation (1200 UpM, 10 min) pelletiert und das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS gespült, erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 500 μ l PBS aufgenommen.

An diesem Punkt wurde die Probe wie folgt geteilt:

- a) für den Caspaseassay wurden 2 mal 25 μ l der Zellsuspension in eine 96 well Platte pipettiert und mit 25 μ l des Caspasereagenzes (Promega) versehen. Zur Vermessung der Caspaseaktivität wurde die Platte nach einer 30 minütigen Inkubationszeit im Luminometer vermessen.
- b) der verbliebene Teil der Zellsuspension wurde auf 800 μ l mit PBS aufgefüllt und die Zellzahl mit Hilfe des Durchflusszytometers Galaxy Argon Plus (Dako Cytomation) bestimmt.

Zur Auswertung wurde der Mittelwert der doppelten Caspasemessung auf die Zellzahl bezogen.

2.12.7 Annexin-V Färbung

Zur Bestimmung der Zytostatika vermittelten Apoptoserate wurden die Zellen mit FITC gekoppeltem Annexin-V angefärbt.

Hierzu wurde das Medium aus den wells entfernt und in ein 15 ml Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA aus den wells gelöst und zum zugehörigen Überstand gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Zentrifugation (1200 UpM, 10 min) pelletiert und das Medium abgesaugt. Nach dem Spülen der Zellen mit PBS wurden sie erneut zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 200 μ l 1x Annexin-V Bindungspuffer und 5 μ l Annexin-V FITC resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 20 Minuten (lichtgeschützt und bei Raumtemperatur), der sich eine Analyse mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie anschloss.

2.13 Immunhistochemische und -zytochemische Untersuchungen

2.13.1 Immunhistochemische Färbung von humanem Pankreasgewebe

Zur Untersuchung der L1CAM Expression in chronischen Pankreatitiden wurden 23 Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis sowie 20 normale Pankreasgewebe immunhistochemisch untersucht. Dazu lag die Einwilligung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Antragsnummer: 110/99) vor.

Die Färbung der humanen Pankreasgewebe erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. B. Sipos am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (jetzt Institut für Pathologie, Universität Tübingen).

2.13.2 Immunzytochemische Färbung der Fibroblasten

Die Bestimmung des myofibroblastoiden Phänotyps der isolierten Pankreasmyofibroblasten (PMFs) erfolgte durch Anfärben von α -SMA, Vimentin und Desmin. Hierzu wurden 1×10^5 PMFs auf runden Deckgläsern ausgesät. Nach 24 stündiger Inkubation wurde das Medium aus den wells abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit eiskaltem 100% Methanol für 10 min auf den Deckgläsern fixiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS für 5 min. Zur Blockierung wurden die Deckgläser für 30 min mit einer 4 % (w/v) BSA Lösung (in PBS) überschichtet und bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Inkubation der Primäranantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C und wurden wie folgt in 4 % (w/v) BSA in PBS verdünnt: α -SMA 1:500, Vimentin 1:400, Desmin 1:200. Nach der Inkubation des Erstantikörpers wurden die Zellen drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen. Als Zweitreagenz diente für die α -SMA-Färbung ein Tropfen EnVision Konjugat anti-Maus-Peroxidase, während die Vimentin- und Desmin-Färbungen mit einem Biotin-gekoppelten, 1:200 in PBS verdünnten Zweitantikörper (Vimentin: Esel-anti-Ziege Zweitantikörper, Desmin: Ziege-anti-Kaninchen Zweitantikörper) erfolgte. In allen drei Fällen wurden die Zweitreagenzien über 45 min bei RT inkubiert. Die Präparate mit Biotin-gekoppelten Antikörpern wurden nach dreimaligem Waschen in PBS für weitere 45 min mit 1:500 in PBS verdünnter Streptavidin-Peroxidase behandelt und

anschließend 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Substratreaktion für Peroxidase wurde mit dem *Peroxidase Substrat Kit DAB* nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate 10 min in Leitungswasser gewaschen, die Kerne für 1 min in Hämalaunlösung gefärbt und 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden die Deckgläser in Glyceringelatine eingedeckt. Parallel zu den spezifischen Vimentin- /Desmin-Färbungen wurden Kontrollfärbungen durchgeführt, in denen die Präparate nur mit den Zweitantikörpern inkubiert wurden. Zur Kontrolle der α -SMA-Färbung wurde die oben beschriebene Färbung mit einem Maus-IgG2 α -Kontroll-Antikörper durchgeführt. Alle Kontrollfärbungen zeigten keine Färbung.

2.14 Verwendete Software/ Statistik

Software für Suche nach Transkriptionsfaktorbindungsstellen innerhalb einer Basensequenz: www.cbil.upenn.edu/tess

Software des Durchflusszytometers: Flomax (DakoCytomation, Hamburg)

Software des Plattenphotometers: Revelation QuickLink (Dynex Technologies, USA)

Software der Realtime PCR: MyIQ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Software des Mikroskops: Axiovision (Carl Zeiss, Jena)

Die Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen und der Signifikanzen (Students T-test) erfolgte mit Microsoft Excel, $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Nachweis von L1CAM in chronischen Pankreatitiden

Da das Adhäsionsmolekül L1CAM bereits in Karzinomzellen pankreatischer Tumoren sowie in Lymphknoten und Lebermetastasen nachgewiesen werden konnte [100, 124], wird davon ausgegangen, dass L1CAM an der pankreatischen Tumorigenese beteiligt ist. Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob L1CAM bereits in pankreatischen Epithelstrukturen prämaligener Stadien auffindbar ist. Da die chronische Pankreatitis als Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreasadenokarzinoms (PDACs) gilt und ebenfalls durch eine desmoplastische Reaktion charakterisiert ist (siehe 1.1.3), wurden 23 chronische Pankreatitiden sowie 20 normale pankreatische Gewebe immunhistochemisch auf die L1CAM Expression untersucht. Während in normalen Pankreata außerhalb neuronaler Strukturen (N) keine L1CAM Expression nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.1 A), wurde in mehr als 60 % (14 von 23 Gangstrukturen bzw. 15 von 23 Gang ähnlichen Strukturen) der chronischen Pankreatitiden eine L1CAM Expression beobachtet (Abb. 3.1 B). Die Färbungen zeigen dabei sowohl eine L1CAM Expression in dukталen Strukturen (D) als auch in Gang ähnlichen Strukturen (DLS), welche von stromalem Gewebe (S) umgeben waren.

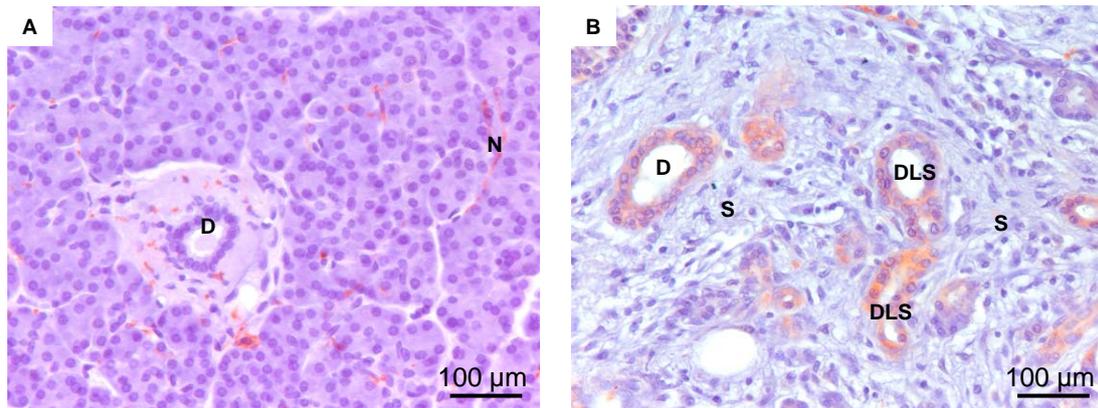


Abbildung 3.1: Immunhistochemischer Nachweis der L1CAM Expression in chronischen Pankreatitiden. Abb. A zeigt normales Pankreasgewebe, in dem nur neuronale Strukturen (N) eine L1CAM Expression aufweisen. Das in Abb. B abgebildete Gewebe einer chronischen Pankreatitis zeigt eine L1CAM spezifische Färbung der duktalem (D), Gang ähnlichen (DLS = *duct like structures*) und neuronalen Strukturen (N) umgeben von stromalem Gewebe (S).

3.2 EMT in pankreatischen Epithelzellen

3.2.1 Die Co-Kultur mit Pankreasmyofibroblasten induziert L1CAM Expression in HPDE Zellen

Die Beobachtung, dass die L1CAM Expression bereits in duktalem Strukturen im Rahmen einer chronischen Pankreatitis erhöht ist, warf die Frage auf, ob aktiviertes Stromagewebe zur Hochregulation von L1CAM in Epithelzellen beitragen kann, wodurch die erhöhte Expression in chronischen Pankreatitiden und PDAC-Geweben zu erklären wäre. Um diese Fragestellung zu überprüfen, wurde die nicht tumorigene, humane pankreatische duktalem Epithelzelllinie HPDE mit Pankreasmyofibroblasten (PMFs), die zuvor entsprechend charakterisiert worden waren (siehe 2.13.2), co-kultiviert. Hierzu wurde ein indirektes Co-Kultursystem genutzt, in dem die HPDE Zellen am Boden einer Kulturplatte und die PMFs in die Zellkultureinsätze (Transwell-Einsätze) ausgesät wurden. Durch eine Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ wurde ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen beiden Zellpopulationen unterbunden, so dass die Zellen ausschließlich durch ins Medium sezernierte, lösliche Faktoren interagieren konnten.

Nach unterschiedlich langen Co-Kultur Phasen (früh: 2 Wochen, spät: 6 Wochen) wurden sowohl mRNA Proben als auch Ganzzelllysate der HPDE Zellen hergestellt. Diese wiesen sowohl hinsichtlich der mRNA- als auch der Proteinmenge eine deut-

lich erhöhte L1CAM Expression auf (siehe Abb. 3.2 A+B). Es zeigte sich weiterhin eine Zeitabhängigkeit der Erhöhung der L1CAM Expression.

Zusammengefasst geht aus den gezeigten Ergebnissen hervor, dass bereits in nicht tumorigenen HPDE Zellen die Co-Kultivierung mit PMFs eine Induktion des Adhäsionsmoleküls L1CAM hervorruft.

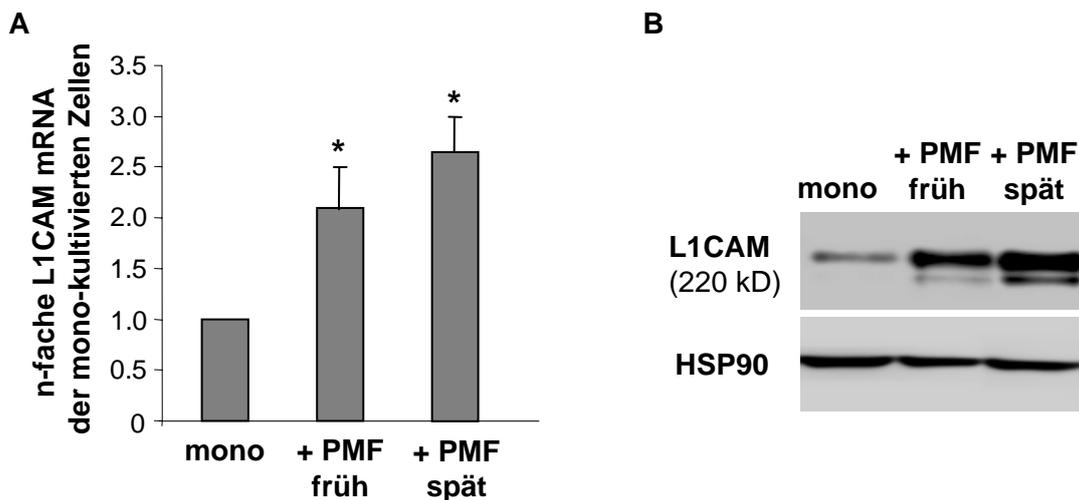


Abbildung 3.2: Co-Kultur mit PMFs induziert L1CAM Expression in HPDE Zellen. HPDE Zellen wurden ohne (mono) und mit PMFs über 2 (früh) bzw. 6 (spät) Wochen kultiviert. Im Anschluss wurden die HPDE Zellen für Realtime PCR und Westernblotanalysen aufgearbeitet. (A) zeigt die Mittelwerte \pm S.A. von 4 unabhängigen L1CAM RT-PCRs, normalisiert auf β -Aktin, * $p < 0,05$. In (B) ist ein repräsentatives Ergebnis von 3 Versuchen der L1CAM Westernblotanalyse dargestellt. HSP90 dient der Ladekontrolle.

3.2.2 Die Co-Kultur mit PMFs induziert EMT assoziierte Veränderungen in HPDE Zellen

Neben der vermehrten L1CAM Expression wurden durch die Co-Kultur mit PMFs weitere Veränderungen in den HPDE Zellen induziert, wie sie für die EMT beschrieben worden sind. Während die mono-kultivierten HPDE Zellen ihren runden, epithelialen Phänotyp beibehielten, führte die Co-Kultivierung mit PMFs in den HPDE Zellen bereits nach 2 Wochen zur Ausbildung eines spindelförmigen, fibroblastoiden Phänotyps, was nach 6 Wochen Co-Kultur deutlich ausgeprägter war (siehe Abbildung 3.3).

Gleichzeitig konnte in den co-kultivierten HPDE Zellen mittels Realtime PCR eine erhöhte Expression der mesenchymalen Markerproteine Vimentin und N-Cadherin

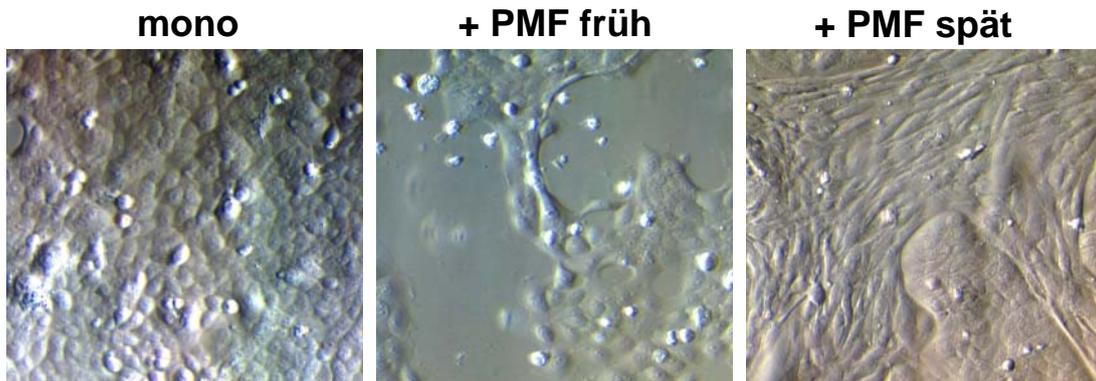


Abbildung 3.3: Co-Kultur mit PMFs verändert die Morphologie der HPDE Zellen. HPDE Zellen wurden allein (mono) oder über 2 (+ PMF früh) oder 6 (+ PMF spät) Wochen mit PMFs kultiviert. Vergrößerung: 200 fach

nachgewiesen werden, wohingegen sich für den Epithelialmarker E-Cadherin keine Unterschiede in der Expression von mono- und co-kultivierten HPDE Zellen zeigte (siehe Abb. 3.4).

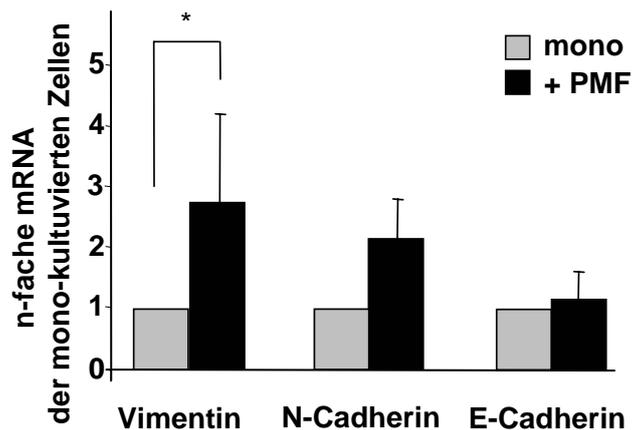


Abbildung 3.4: Die Co-Kultur mit PMFs erhöht die Expression mesenchymaler Markerproteine in HPDE Zellen. HPDE Zellen wurden allein (mono) oder über 2 Wochen mit PMFs kultiviert. Dargestellt sind RT-PCR Mittelwerte aus 9 unabhängigen Versuchen für Vimentin, N-Cadherin und E-Cadherin \pm S.A., normalisiert auf β -Aktin; * $p < 0,05$.

3.2.3 Kulturmedien weisen während der Co-Kultur von HPDE Zellen und PMFs erhöhte TGF- β 1 Spiegel auf

Da im verwendeten Zellkulturmodell ein Kontakt der beiden Zellpopulationen nicht möglich war, konnten die morphologischen Veränderungen sowie die veränderten Proteinexpressionsmuster der mit PMFs co-kultivierten HPDE Zellen ausschließlich durch sekretorische Faktoren hervorgerufen werden. In unterschiedlichen Studien konnten erhöhte TGF- β 1 Konzentrationen sowohl mit EMT ähnlichen Veränderungen der Zellen [30] als auch mit pathophysiologischen Veränderungen des Pankreas (chronische Pankreatitis, Pankreaskarzinom) in Verbindung gebracht werden [44]. Um zu überprüfen, ob TGF- β 1 ein Faktor unter Co-Kulturbedingungen ist, der für die beobachteten Veränderungen in HPDE Zellen verantwortlich ist, wurden Medienüberstände der Mono- bzw. Co-Kulturen abgenommen und auf ihre TGF- β 1 Konzentration mittels ELISA untersucht.

Wie in Abbildung 3.5 gezeigt, konnte in den Überständen der 72 Stunden co-kultivierten Zellen im Vergleich zu den mono-kultivierten HPDE Zellen mehr als die dreifache TGF- β 1 Konzentration pro 10^5 Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten in der Tat darauf hin, dass TGF- β 1 an den phänotypischen Veränderungen der Pankreasepithelzellen während der Co-Kultivierung mit PMFs beteiligt sein könnte.

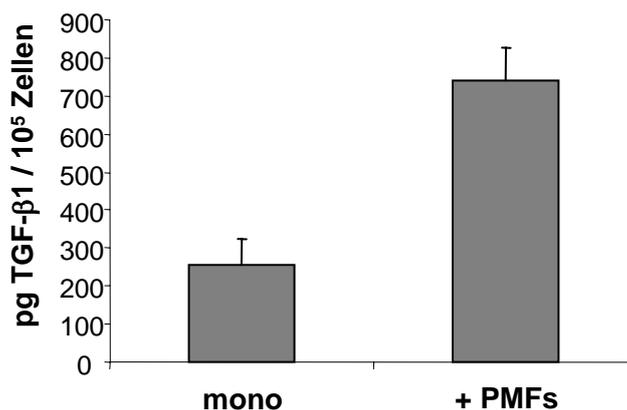


Abbildung 3.5: Die TGF- β 1 Konzentration ist in Medienüberständen von HPDE Co-Kulturen mit PMFs erhöht. Medienüberstände wurden nach 72 Stunden in unbehandelten (mono) bzw. mit PMFs co-kultivierten HPDE Zellen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen der TGF- β 1 Konzentration im Medienüberstand in pg/ 10^5 Zellen; \pm S.A..

3.2.4 Die erhöhte L1CAM Expression in co-kultivierten HPDE Zellen ist TGF- β 1 abhängig

Zur Überprüfung der Hypothese, ob TGF- β 1 zur Hochregulation der L1CAM Expression in HPDE Zellen unter Co-Kulturbedingungen führt, wurden co-kultivierte HPDE Zellen mit dem TGF- β Typ I Rezeptor-Antagonisten SB431542 inkubiert. HPDE Zellen, die über 2 Wochen mit PMFs co-kultiviert und zusätzlich für 24 Stunden mit 10 μ mol/l SB431542 behandelt wurden, zeigten eine deutliche reduzierte L1CAM Expression (siehe Abbildung 3.6).

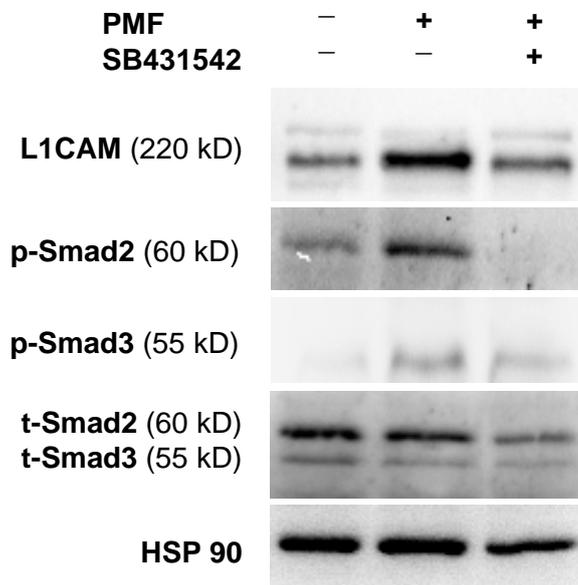


Abbildung 3.6: Inhibition des TGF- β Rezeptor Typ I vermindert L1CAM Expression in co-kultivierten HPDE Zellen. Über 2 Wochen mit PMFs co-kultivierte HPDE Zellen wurden zusätzlich mit 10 μ mol/l SB431542 inkubiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von Westernblotanalysen auf L1CAM, phospho-Smad 2 und 3, Gesamt-Smads (t-Smad) sowie HSP90 als Ladekontrolle.

Da SB431542 nicht spezifisch für den ALK 5 Rezeptor ist, über den TGF- β 1 seine Signale vermittelt, sondern auch ALK 4/7 inhibiert, wurde überprüft, ob auch die häufig von Tumorzellen produzierten, ALK 4 bindenden Aktvine in der Lage sind L1CAM in HPDE Zellen zu induzieren. Durch die exogene Zugabe von Aktivin A und Aktivin B konnte jedoch keine Induktion der L1CAM Expression hervorrufen werden, so dass eine Aktivin vermittelte Aktivierung des ALK 4 Typ I Rezeptors auszuschließen war (Daten nicht gezeigt) und die beobachtete L1CAM Induktion unter Co-Kultur somit über die TGF- β 1 Aktivierung des ALK 5 Rezeptors vermit-

telt ist.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Co-Kultivierung der HPDE Zellen mit PMFs zur Aktivierung von Smad2 und Smad3 führt, was auf die Intaktheit des TGF- β -Signalwegs hindeutet. Ähnlich der L1CAM Expression konnte die Phosphorylierung der Smad Proteine durch die Behandlung mit SB431542 inhibiert werden. Weiterhin wurde die TGF- β 1 Abhängigkeit der L1CAM Expression in HPDE Zellen durch die exogene Zugabe von TGF- β 1 bestätigt. Hierzu wurden HPDE Zellen mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert und nach unterschiedlicher Stimulationsdauer auf die L1CAM Expression analysiert. Wie in Abbildung 3.7 gezeigt, stiegen die L1CAM mRNA Konzentrationen nach TGF- β 1 Stimulation an und nach 24 Stunden konnte eine signifikante Erhöhung des mRNA Gehalts festgestellt werden (siehe Abb. 3.7 A). Parallel zu den mRNA Daten konnte in Ganzzelllysaten eine signifikante Induktion der L1CAM Expression 17 bzw. 24 Stunden nach TGF- β 1 Stimulation gezeigt werden (siehe Abb. 3.7 B). Somit spiegeln die Ergebnisse auf Proteinebene die Daten der mRNA Analysen wider.

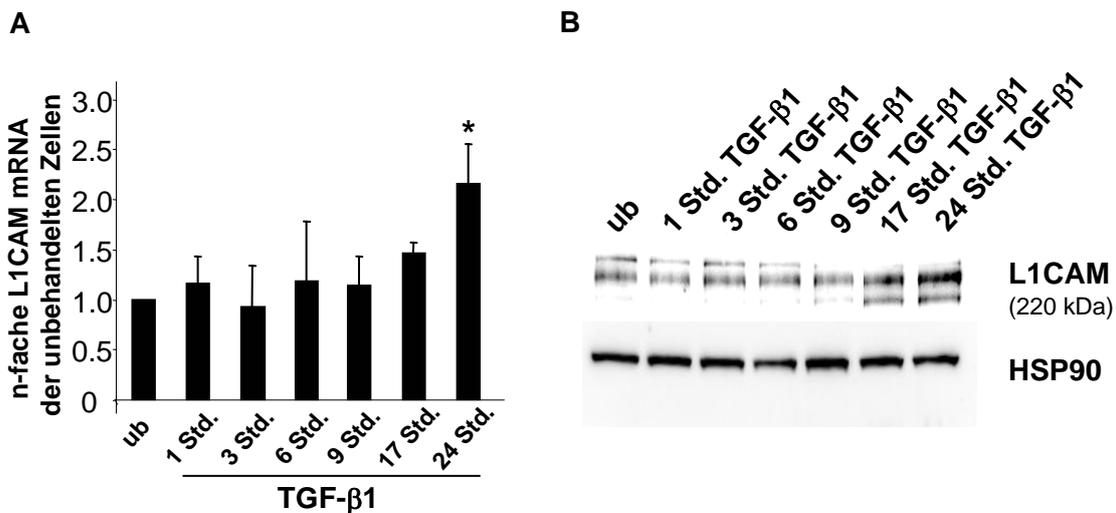


Abbildung 3.7: TGF- β 1 Stimulation induzierte Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM in HPDE Zellen. HPDE Zellen wurden über unterschiedliche Zeiträume mit TGF- β 1 stimuliert. (A) stellt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Realtime PCR Experimenten \pm S.A., normalisiert auf β -Aktin dar; * $p < 0,05$. In Abbildung (B) ist ein repräsentatives Westernblot Ergebnis der L1CAM und HSP90 Expression in HPDE Zellen gezeigt.

3.2.5 EMT assoziierte Veränderungen der HPDE Zellen sind TGF- β 1 vermittelt

In der Literatur konnte TGF- β als Induktor der EMT identifiziert werden [30]. Wie bereits gezeigt, wurden unter Co-Kulturbedingungen EMT assoziierte Veränderungen der HPDE Zellen sowie eine gesteigerte TGF- β 1 Konzentration in den Überständen beobachtet, so dass im Weiteren eine Beteiligung von TGF- β 1 an diesen Veränderungen untersucht wurde. Hierzu wurden HPDE Zellen mit TGF- β 1 stimuliert und auf ihre phänotypischen Veränderungen sowie die Expression der bereits beschriebenen Epithelial- und Mesenchymal-Marker untersucht.

Bereits nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden konnten ähnliche morphologische Veränderungen der HPDE Zellen nachgewiesen werden, wie sie nach Co-Kultivierung mit PMFs über 1-2 Wochen beobachtet wurden. Wie in Abbildung 3.8 zu sehen ist, führt die Stimulation mit TGF- β 1 über 72 Stunden zur Ausbildung von einzelnen spindelförmigen HPDE Zellen.

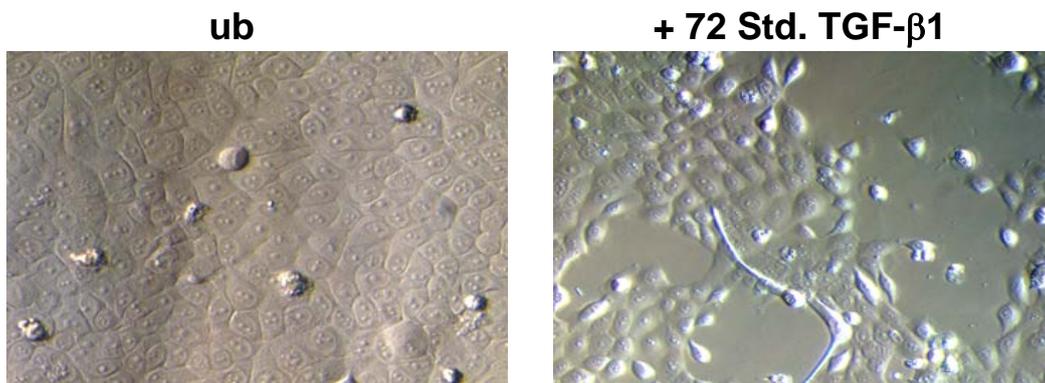


Abbildung 3.8: Die Stimulation mit TGF- β 1 führt zu morphologischen Veränderungen der HPDE Zellen. HPDE Zellen wurden unbehandelt (ub) belassen oder über 72 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 inkubiert. Vergrößerung 200 fach.

Bei der Analyse des mRNA Gehalts der unbehandelten bzw. 24 Stunden TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen wurden analog zu den co-kultivierten HPDE Zellen keine Veränderungen in der Expression des epithelialen Markers E-Cadherin nachgewiesen. Demgegenüber konnte eine signifikant erhöhte Induktion des Mesenchymalmarkers Vimentin sowie eine Erhöhung der N-Cadherin Expression beobachtet werden (siehe Abb. 3.9).

Aus den gezeigten Daten geht hervor, dass TGF- β 1 auch in HPDE Zellen EMT assoziierte Veränderungen induzieren kann.

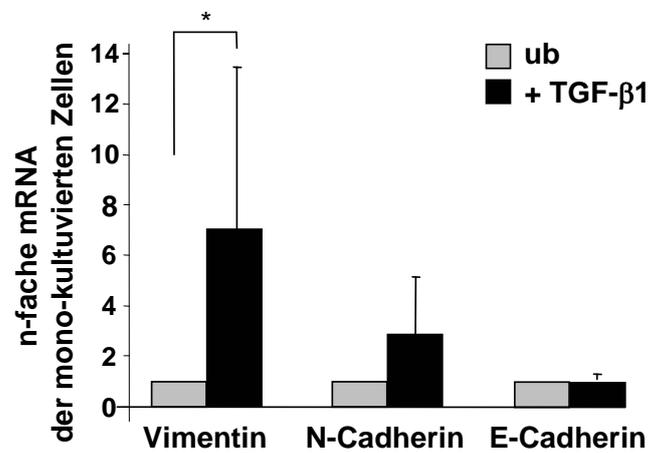


Abbildung 3.9: TGF- β 1 induziert die Expression mesenchymaler Markerproteine in HPDE Zellen. HPDE Zellen blieben unbehandelt oder wurden für 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert. Dargestellt sind Mittelwerte der Realtime PCR Messungen aus 3 unabhängigen Versuchen für Vimentin, N-Cadherin und E-Cadherin, normalisiert auf β -Aktin, \pm S.A.; * $p < 0,05$

3.3 Untersuchungen der Induktion der L1CAM Expression

3.3.1 Die L1CAM Expression in co-kultivierten und TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen ist Smad unabhängig

Bei der Induktion der EMT durch TGF- β werden in der Literatur zwei Wege unterschieden: der Smad abhängige sowie der Smad unabhängige TGF- β Signalweg. Beim Smad abhängigen Signalweg kommt es zur Phosphorylierung der Smad Proteine 2 und 3, welche einen Komplex mit Smad4 ausbilden. Der Smad-Komplex transloziert in den Kern der Zelle und es kommt zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen. Beim Smad unabhängigen Signalweg hingegen werden direkt unterschiedliche Kinasen (z.B. c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), Erk Map Kinase oder p38 Map Kinase) aktiviert, die ihrerseits unterschiedliche Transkriptionsfaktoren aktivieren und somit zur vermehrten Expression von Zielgenen beitragen.

Da die Stimulation der HPDE Zellen mit TGF- β 1 neben den EMT assoziierten Veränderungen der Zellen auch zu einer vermehrten L1CAM Expression führt und über die Induktion des Adhäsionsmoleküls L1CAM bisher wenig bekannt ist, wurden die Signalwege, über die TGF- β 1 zur L1CAM Expression führt, genauer untersucht. Hierzu wurden sowohl co-kultivierte als auch TGF- β 1 stimulierte HPDE Zellen zunächst mit Smad2, Smad3 und Smad4 siRNA transfiziert, um eine Beteiligung des Smad-abhängigen Signalwegs zu überprüfen. Neben der Reduktion der Expression einzelner Smad-Proteine wurden weiterhin der gleichzeitige *knock down* von Smad2 und Smad3 experimentell untersucht. Wie in Abbildung 3.10 zu sehen, kam es weder durch den alleinigen oder gemeinsamen *knock down* von Smad2 und Smad3 noch durch eine siRNA vermittelte reduzierte Smad4 Expression zu einer Veränderung der L1CAM Expression in co-kultivierten bzw. TGF- β 1 stimulierten Zellen. Dieses ließ darauf schließen, dass der Smad-Signalweg nicht an der TGF- β 1 vermittelten L1CAM Expression beteiligt ist.

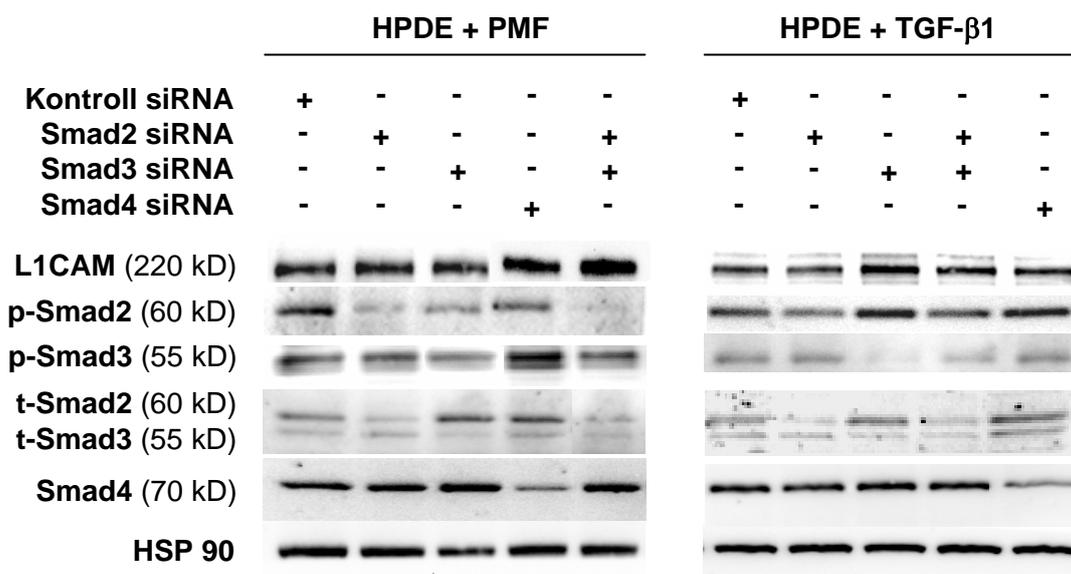


Abbildung 3.10: TGF- β 1 abhängige L1CAM Expression ist Smad unabhängig. HPDE wurden für 2 Wochen mit PMFs bzw. für 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Kontroll siRNA, Smad2 und/oder Smad3 bzw. Smad4 siRNA transfiziert. Mittels Westernblot wurde neben L1CAM die Expression von Gesamt- und Phospho-Smad2/3 sowie Smad4 und HPS90 analysiert.

3.3.2 Die L1CAM Expression in co-kultivierten und TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen ist JNK abhängig

Da die TGF- β 1 vermittelte L1CAM Expression offenbar Smad unabhängig induziert wird, wurden als nächstes sowohl co-kultivierte als auch TGF- β 1 stimulierte HPDE Zellen auf die zugrunde liegenden Signalwege weiter analysiert.

Im ersten Versuchsteil wurde hierzu die L1CAM Expression unter Inhibition verschiedener Kinasen mittels Westernblotanalyse untersucht. Hierzu wurden HPDE Zellen, die entweder über zwei Wochen mit PMFs co-kultiviert oder für 24 Stunden mit TGF- β 1 stimuliert wurden, mit je 25 μ mol/l PD98059 (Erk Inhibitor), SB202190 (p38 Inhibitor), LY294002 (PI3K Inhibitor) oder SP600125 (JNK Inhibitor) inkubiert. Im Fall der TGF- β 1 stimulierten Zellen erfolgte die Behandlung mit den Inhibitoren 30 min vor der TGF- β 1 Stimulation. Wie in Abbildung 3.11 gezeigt, konnte sowohl in co-kultivierten (A) als auch in TGF- β 1 behandelten (B) HPDE Zellen ausschließlich der JNK Inhibitor SP600125 eine Reduktion der L1CAM Expression hervorrufen. Die Funktionsfähigkeit aller Inhibitoren wurde durch die Analyse der entsprechenden Zielstrukturen bestätigt (siehe Anhang A.1).

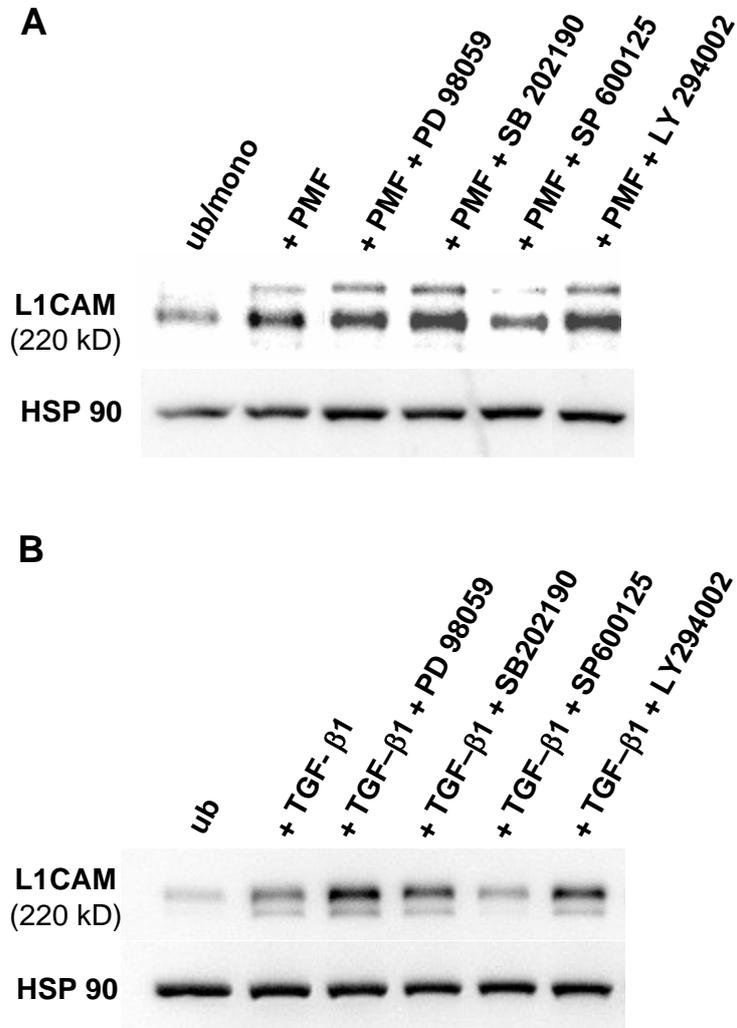


Abbildung 3.11: L1CAM Expression in co-kultivierten bzw. TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen ist JNK abhängig. Über 2 Wochen mit PMFs co-kultivierte oder 24 Stunden TGF- β 1 stimulierte HPDE Zellen wurden mit unterschiedlichen Kinase Inhibitoren über 24 Stunden behandelt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis der Westernblotanalysen der co-kultivierten (A) sowie der TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen (B) auf L1CAM und HSP90.

Zur weiteren Spezifizierung, der Abhängigkeit der TGF- β 1 vermittelten L1CAM Expression von der Aktivierung der JNKs, wurde in HPDE Zellen die JNK Expression mittels siRNA Transfektion reduziert. Hierzu wurden sowohl co-kultivierte als auch TGF- β 1 stimulierte HPDE Zellen für 24 Stunden mit Kontroll bzw. JNK siRNA behandelt. Ähnlich wie nach Einsatz des JNK Inhibitors SP600125 vermindert der spezifische JNK *knock down* die Induktion der L1CAM Expression in HPDE Zellen unter Co-Kultur Bedingungen als auch nach TGF- β 1 Stimulation (siehe Abb. 3.12). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine TGF- β 1 abhängige Aktivierung der c-Jun N-terminale Kinase (JNK) hin, welche ihrerseits die L1CAM Expression in co-kultivierten bzw. TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen induziert.

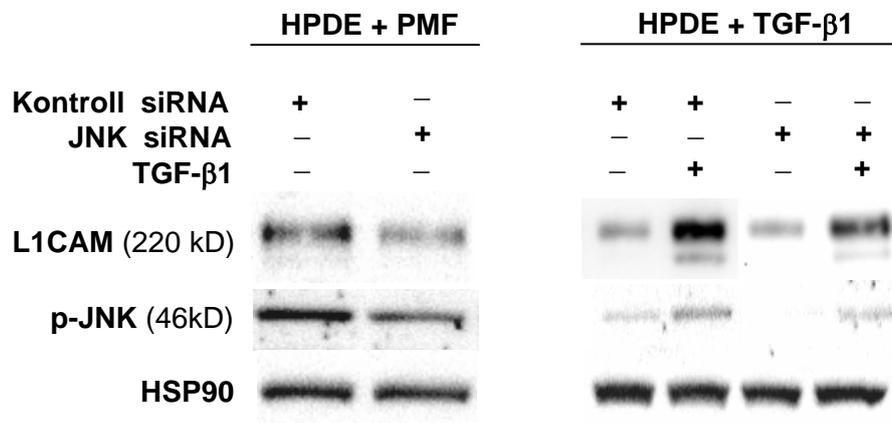


Abbildung 3.12: Die TGF- β 1 abhängige L1CAM Expression ist JNK abhängig. 2 Wochen co-kultivierte sowie 24 Stunden TGF- β 1 stimulierte HPDE Zellen wurden mit Kontroll bzw. JNK siRNA transfiziert. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis der durchgeführten Westernblotanalysen, welches die Expression von L1CAM, JNK und phospho-JNK sowie HSP90 als Ladekontrolle zeigt.

3.3.3 Die TGF- β 1 abhängige L1CAM Expression ist Slug abhängig

Um den Signalweg der TGF- β 1 induzierten Aktivierung der L1CAM Expression weiter zu untersuchen und um mögliche Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die zur Aktivierung des L1CAM Promotors führen können, wurde dieses nachfolgend analysiert.

Da beim humanen L1CAM unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte sowie zwei mögliche Promotorsequenzen identifiziert wurden [73, 74, 75], musste anfangs bestimmt werden, welcher Bereich in HPDE Zellen als Promotor fungiert. Wie bereits erwähnt wurde sowohl die dem untranslatierten Exon 1 vorgelagerte Sequenz als auch Sequenzen innerhalb des Introns 1 als mögliche Promotoren identifiziert. Mittels PCR wurde deshalb untersucht, ob HPDE Zellen ein Exon 1 enthaltendes Primärtranskript generieren und somit die 5' flankierende Region des Exons 1 als Promotor fungiert, oder ob das Exon 1 nicht transkribiert wird und somit Teilen des 10 kb großen Introns 1 die Promotoraktivität zuzuschreiben ist. Die RT-PCR Analysen zeigten, dass in HPDE Zellen ein Exon 1 enthaltendes Primärtranskript generiert wird (siehe Abbildung 3.13), dessen Expression unter TGF- β 1 Stimulation ansteigt.

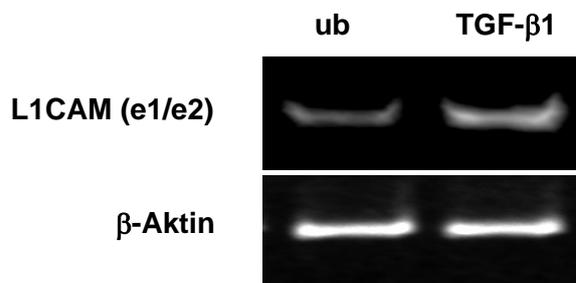


Abbildung 3.13: Das L1CAM Primärtranskript in HPDE Zellen enthält das Exon 1. Über 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimulierte HPDE Zellen wurden mittels konventioneller PCR auf die Expression des Exon 1 enthaltenden L1CAM Primärtranskripts untersucht. β -Aktin wurde als Kontrolle parallel untersucht, abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis.

Auf Grund dieses Ergebnisses wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die 5' flankierende Region des Exon 1 als für die TGF- β 1 Induktion in HPDE Zellen relevante Promotorsequenz angesehen und auf die Anwesenheit unterschiedlicher Transkriptionsfaktorbindungsstellen untersucht. Sequenzanalysen (www.cbil.upenn.edu/tess) der Region identifizierten mehrere mögliche Bindungsstellen für unterschiedliche

Transkriptionsfaktoren. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, wurden zwei SP1-, eine c-Myc-, zwei AP-1- sowie zwei Snail/Slug(E2-Box)-Bindungsstellen erkannt und im weiteren Verlauf näher untersucht.

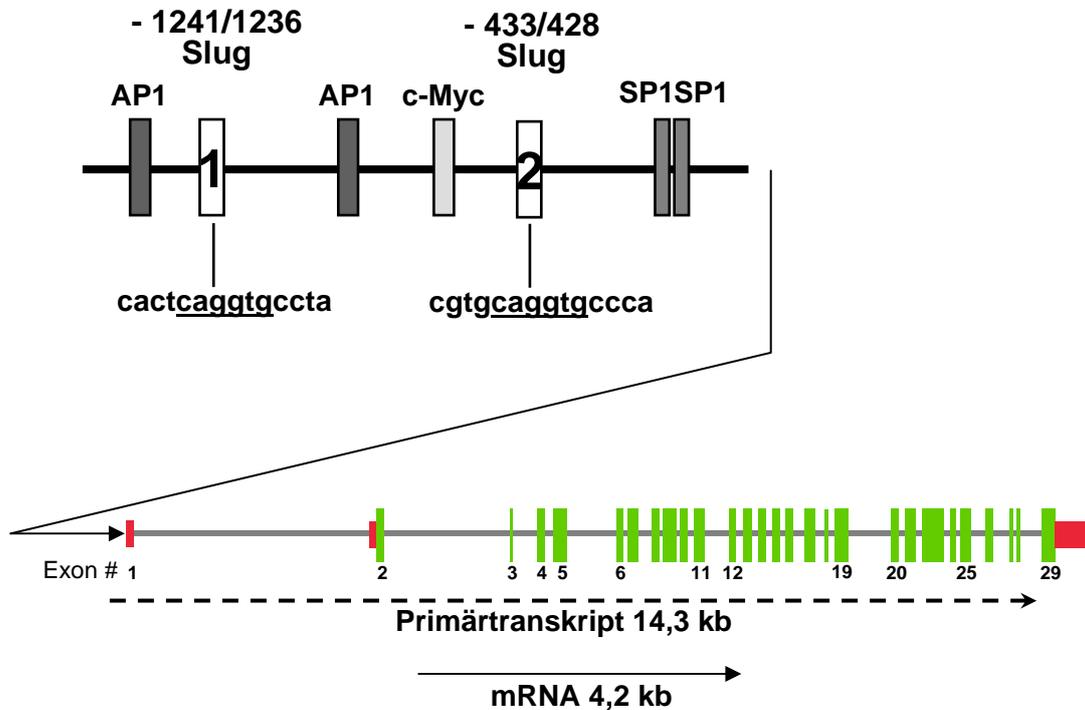


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung des L1CAM Promotors. Abgebildet sind die möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen sowie das Primärtranskript und die kodierende Sequenz (grün).

In anfängliche Analysen konnte eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 an der TGF- β 1 vermittelten L1CAM Expression ausgeschlossen werden, da EMSA Analysen nur eine schnelle, transiente Bindung des AP-1 an den Promotor zeigten (Daten nicht gezeigt), die nicht mit der Expression der L1CAM mRNA nach 24 Stunden (vergleiche 3.7) korrelierte.

In weiterführenden Untersuchungen wurden daraufhin die beiden möglichen Slug/Snail Bindungsstellen analysiert. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, weisen die Bindungsstellen die Konsensussequenz CAGGTG auf, an die Snail und Slug gleichermaßen binden können. Um eine Beteiligung von Slug und Snail in der TGF- β 1 vermittelten L1CAM Expression zu untersuchen, wurde die Expression beider Transkriptionsfaktoren in HPDE Zellen analysiert. Während durch TGF- β 1 Stimulation nur eine leichte Induktion des Transkriptionsfaktors Snail beobachtet werden konnte, führten gleiche Kulturbedingungen zu einer deutlich erhöhten Slug Expressi-

on. Dies konnte einerseits auf mRNA Ebene mit Hilfe der Realtime PCR (dargestellt in Abbildung 3.15 A) als auch auf Proteinebene mittels Westernblotanalysen von Kernlysaten nachgewiesen werden (Abbildung 3.15 B).

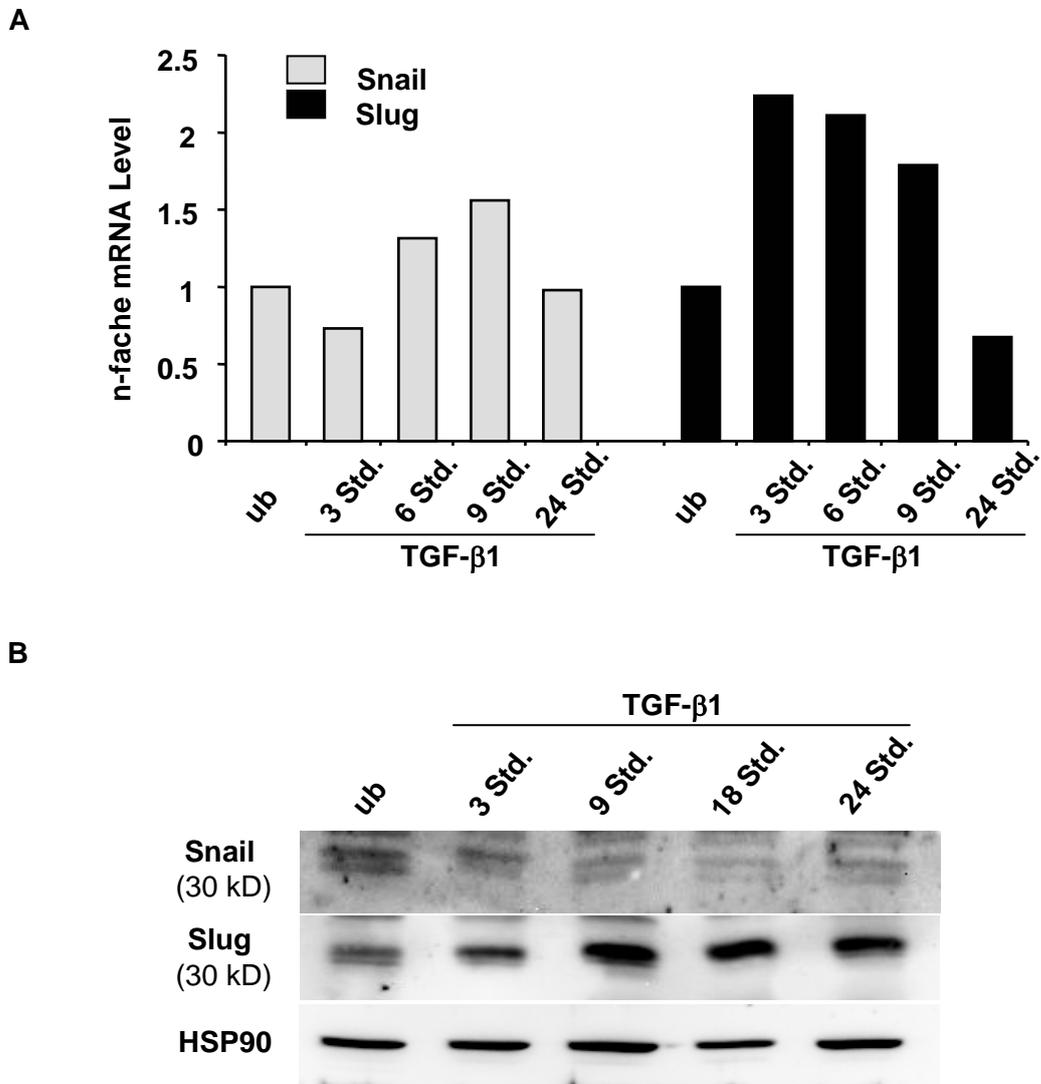


Abbildung 3.15: Slug ist in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen vermehrt exprimiert. HPDE Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert und auf die Snail und Slug Expression analysiert. (A) zeigt die Snail und Slug mRNA Expression. Dargestellt sind die auf β -Aktin normierten Werte aus einer von zwei unabhängigen Messungen. (B) Kernextrakte wurden mittels Westernblotanalysen auf die Expression von Snail, Slug und HSP90 untersucht. Es ist ein repräsentatives Ergebnis abgebildet.

In weiter führenden Versuchen wurde in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen die L1CAM Expression nach Snail, Slug bzw. Kontroll siRNA Transfektion untersucht. Obwohl die Behandlung sowohl mit der Snail als auch der Slug siRNA spezifisch die Expression des jeweiligen Transkriptionsfaktors zu unterdrücken vermochte, führte nur die Verminderung der Slug Expression zu einer Reduktion der L1CAM Expression. Dieses war sowohl auf mRNA Ebene (siehe Abb. 3.16 A) als auch auf Proteinebene (siehe Abb. 3.16 B) nachweisbar.

Aus den gezeigten Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass die TGF- β 1 vermittelten L1CAM Expression von Slug, aber nicht von Snail abhängig ist.

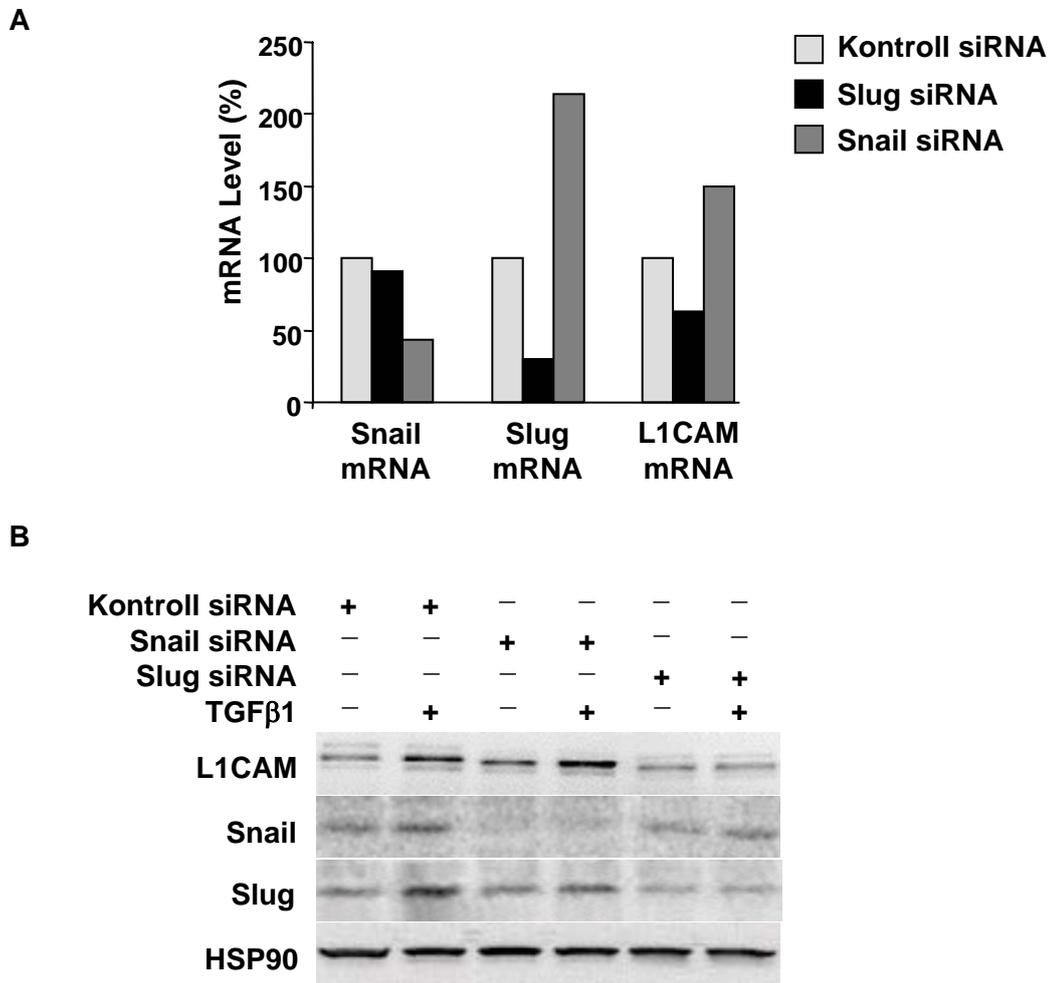


Abbildung 3.16: Slug siRNA Transfektion verhindert die L1CAM Expression in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen. HPDE Zellen wurden mit 10 ng/ml TGF- β 1 über 24 Stunden stimuliert. Weiterhin wurden die Zellen mit Kontroll, Snail bzw. Slug siRNA transfiziert. (A) zeigt die Ergebnisse der Realtime PCR auf Snail, Slug und L1CAM nach Normierung auf TBP. (B) bildet ein repräsentatives Ergebnis der Westernblotanalysen von L1CAM, Snail, Slug und HSP90 ab.

Der Befund, dass in HPDE Zellen die TGF- β 1 vermittelte L1CAM Expression vom Transkriptionsfaktor Slug abhängig ist sollte in weiteren Untersuchungen spezifiziert werden. Dazu wurden zunächst HPDE Zellen entweder mit dem Kontrollvektor pcDNA3.1 oder mit rekombinantem Slug transfiziert. Sowohl mRNA Daten (3.17 A) als auch Westernblotanalysen (3.17 B) zeigen eine deutlich erhöhte L1CAM Expression nach Transfektion mit rekombinantem Slug im Vergleich zu den pcDNA3.1-transfizierten HPDE Zellen.

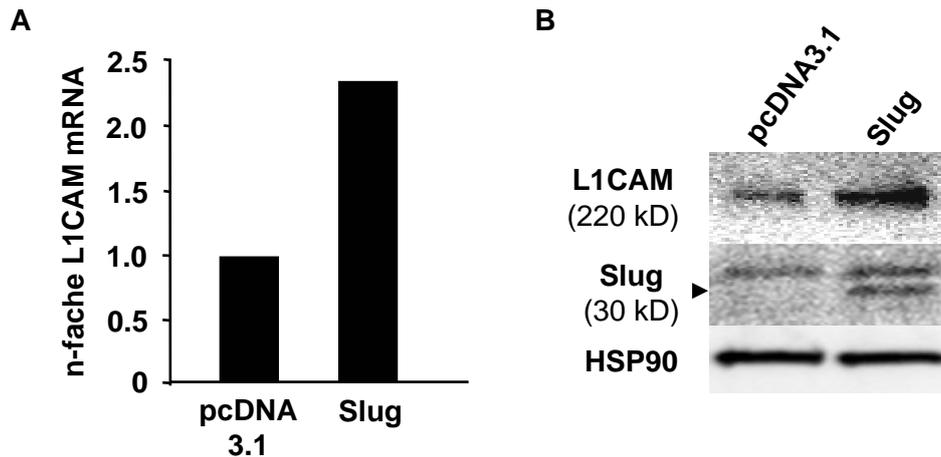


Abbildung 3.17: Transfektion mit rekombinantem Slug erhöht die L1CAM Expression. HPDE Zellen wurden mit 0,5 μ g pcDNA3.1 oder Slug-Plasmid transfiziert. Dargestellt ist die L1CAM mRNA Expression normiert auf TBP (A) sowie die Westernblot Ergebnisse der L1CAM, Slug und HSP90 Expression (B). Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis.

Nachdem die vorangegangenen Experimente eine Verknüpfung des Transkriptionsfaktors Slug mit der gesteigerten L1CAM Expression nachweisen konnten, wurde im Folgenden näher untersucht, ob die gesteigerte Slug Expression neben TGF- β 1 auch von JNK abhängig ist.

Hierzu wurde die Slug Expression in Zellextrakten von HPDE Zellen, die mit JNK siRNA transfiziert wurden, untersucht. In Abbildung 3.18 ist die Slug Expression nach siRNA vermittelter JNK Reduktion dargestellt. Sowohl in co-kultivierten als auch TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen konnte eine verminderte Slug Expression nach JNK siRNA Transfektion im Vergleich zur Kontroll siRNA Behandlung festgestellt werden. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die Co-Kultivierung mit PMFs sowie die Stimulation mit TGF- β 1 in HPDE Zellen zu einer erhöhten Slug Expression führt, die abhängig von der Aktivierung von JNK ist.

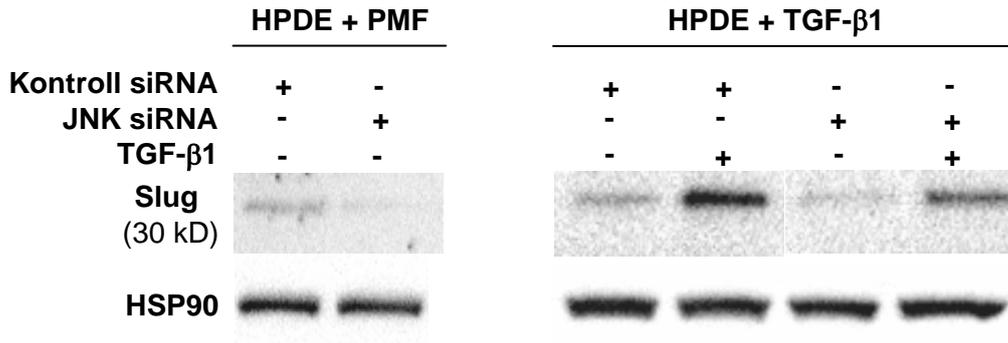


Abbildung 3.18: Die Induktion der Slug Expression in co-kultivierten bzw. TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen ist JNK abhängig. HPDE Zellen wurden 2 Wochen mit PMFs bzw. für 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 kultiviert und weiterhin mit Kontroll bzw. Slug siRNA transfiziert. Mittels Westernblotanalyse wurden Zellysaten auf die Expression von Slug und HSP90 untersucht. Es ist ein repräsentatives Ergebnis abgebildet.

3.3.4 Slug bindet an den L1CAM Promotor und führt zu dessen Aktivierung

Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, enthält die Sequenz des L1CAM Promotors zwei mögliche Slug Bindungsstellen. Da aus den bereits gezeigten Daten nicht hervorging, ob nur eine oder beide Bindungsstellen an der erhöhten TGF- β 1 abhängigen L1CAM Expression beteiligt sind und ob Slug direkt an den L1CAM Promotor bindet, wurden nachfolgend detaillierte Promotorbindungsstudien durchgeführt.

Nachweis der Slug Bindung an den L1CAM Promotor mittels EMSA

Um zunächst die Bindung von Slug an die identifizierten Promotorsequenzen zu überprüfen, wurden HeLa Zellen über 24 Stunden mit 0,5 μ g Slug-Plasmid transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Westernblot in den hergestellten Kernextrakten überprüft (siehe Anhang 3.19 A). Anschließend wurden die Kernextrakte der transfizierten HeLa Zellen mittels EMSA analysiert. In der Autoradiographie des EMSA Gels zeigten die Slug transfizierten Proben eine Bindung an die spezifische Oligonukleotide der ersten als auch der zweiten Slug Bindungsstelle des L1CAM Promotors, während bei den Kontroll transfizierten Proben keine Bindung nachweisbar war (siehe Abb. 3.19 B). Die Bestätigung der Spezifität des gebildeten Slug-Oligonukleotid-Komplexes erfolgte mittels Supershift Ansätzen. In diesen Proben, die vor dem Auftragen auf das Gel mit einem spezifischen Slug Antikörper versetzt wurden, ist die Bildung eines Slug-Oligonukleotid-Antikörper Komplexes,

der oberhalb des Slug-Oligonukleotid-Komplexes im Gel als „Supershift“ zu erkennen.

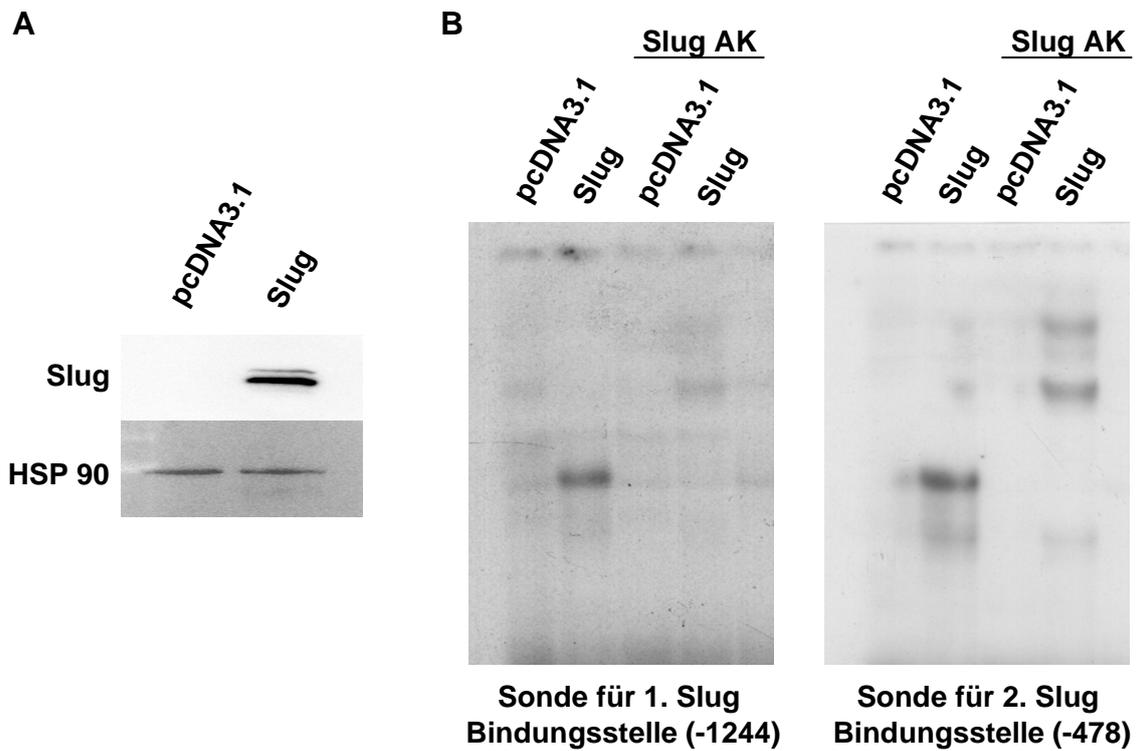


Abbildung 3.19: Slug bindet an den L1CAM Promotor. HeLa Zellen wurden mit 0,5 μ g rekombinatem pcDNA3.1 bzw. Slug transfiziert und zu Kernlysaten verarbeitet. (A) zeigt die Westernblotanalysen von Slug und HSP90, (B) bildet die EMSA Analysen mit spezifischen γ 32 P-gelabelten Oligonukleotiden ab. Zur Spezifitätskontrolle wurden mit Hilfe von Slug Antikörpern *Supershift* Experimente durchgeführt. Es ist jeweils 1 repräsentatives Ergebnis gezeigt.

Nachweis der Slug Bindung an den L1CAM Promotor mittels ChIP Assay

In weiteren Versuchen sollte die direkte Bindung von Slug an den L1CAM Promotor in nativen HPDE Zellen gezeigt werden. Anhand unbehandelter oder TGF- β 1 stimulierter HPDE Zellen wurden hierzu ChIP Assays mit spezifischen Antikörpern gegen Slug und Snail durchgeführt. Der Einsatz des Snail Antikörpers diente einerseits zur Bestätigung der Unabhängigkeit der Induktion der L1CAM Expression von Snail als auch der Spezifitätskontrolle. Ebenfalls zur Kontrolle wurden parallel Präzipitationen mit entsprechenden Kontroll-IgG Antikörpern durchgeführt. Die Auswertung mittels Realtime PCR zeigte nach 9 Stunden TGF- β 1 Stimulation eine signifikant erhöhte Bindung des Transkriptionsfaktors Slug an beide Bindungsstellen innerhalb des L1CAM Promotors in HPDE Zellen (siehe Abb. 3.20). In ChIP Assay Proben, deren Immunpräzipitation mit einem Snail spezifischen Antikörper durchgeführt wurde, konnte hingegen keine gesteigerte Bindung an den Promotor von L1CAM nachgewiesen werden (Abb. 3.20).

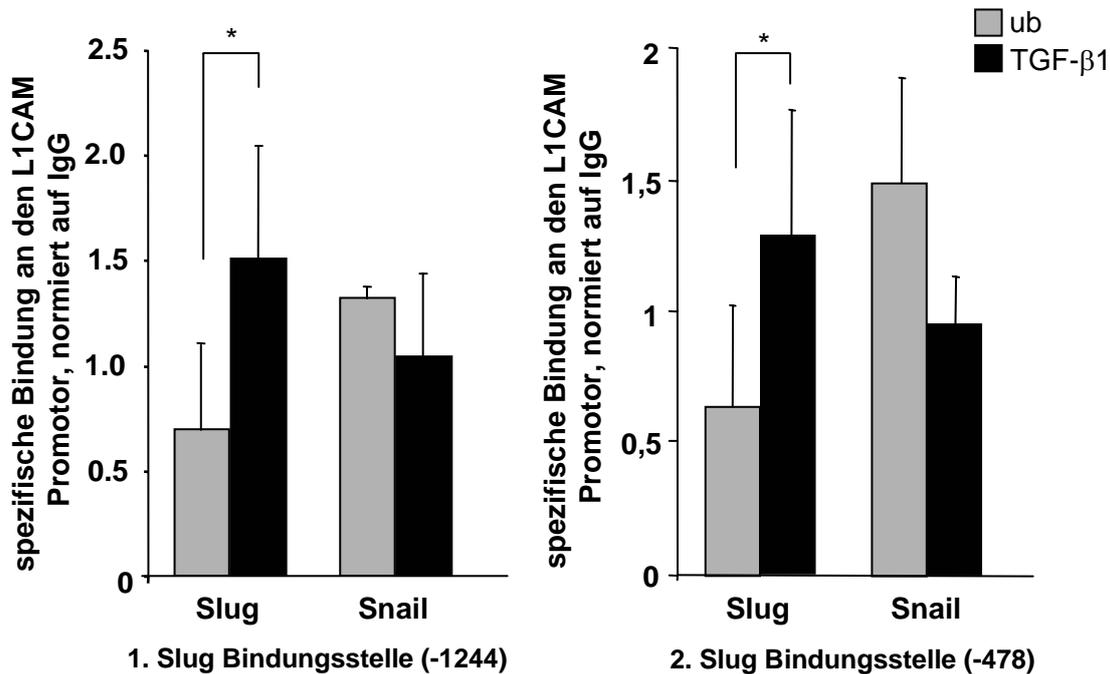


Abbildung 3.20: Slug bindet an den L1CAM Promotor in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen. ChIP Assays von unbehandelten oder 9 Stunden TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen wurden mit Antikörpern gegen Slug, Snail und Kontroll-IgG Antikörpern durchgeführt. Mittels Realtime PCR wurde die Bindung an beide Slug Bindungsstellen innerhalb des L1CAM Promotors untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen \pm S.A., die auf die IgG Kontrolle normiert wurden; *p<0,05

Um den Befund, dass Slug direkt über beide Bindungsstellen an den Promotor von TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen bindet, weiter zu untermauern, wurden ChIP Experimente durchgeführt, in denen die HPDE Zellen 24 Stunden vor TGF- β 1 Stimulation mit Slug bzw. Kontroll siRNA transfiziert wurden. Während in Kontroll siRNA behandelten Zellen eine Bindung von Slug an den L1CAM Promotor nachweisbar war, zeigten Proben, in denen die Expression des Transkriptionsfaktors Slug mit Hilfe von siRNA vermindert wurde, im Vergleich dazu eine signifikante Reduktion der Bindung des Transkriptionsfaktors an den L1CAM Promotor (siehe Abb. 3.21). In einem weiteren Schritt wurden die ChIP Extrakte mit einem spezifischen Antikörper gegen RNA-Polymerase II behandelt, da RNA-Polymerase II als Indikator für eine transkriptionell aktive genomische Region gilt. Die Daten der Kontroll siRNA behandelten Proben, dargestellt in Abbildung 3.21, zeigen eine signifikant erhöhte Bindung der RNA-Polymerase II an beide untersuchten Segmente des L1CAM Promotors. Ferner wurde diese Bindung, ähnlich wie die von Slug, durch den Einsatz von Slug spezifischer siRNA unterbunden.

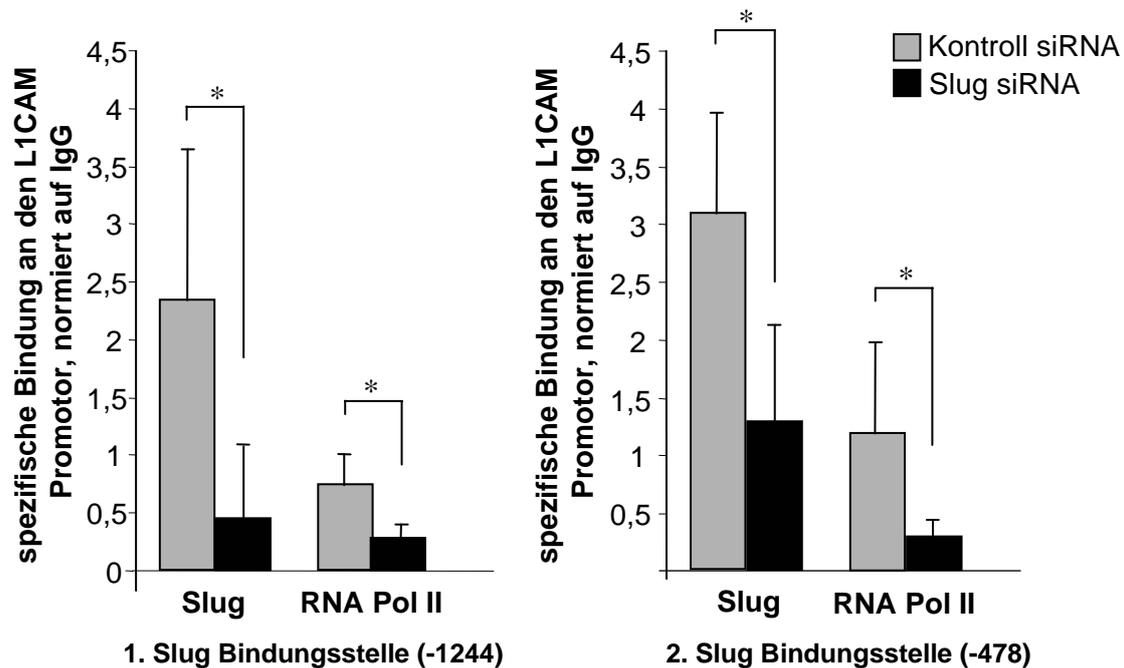


Abbildung 3.21: Slug bindet an den L1CAM Promotor. ChIP Assays von unbehandelten oder 9 Stunden TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen wurden zusätzlich mit Kontroll bzw. Slug siRNA transfiziert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit Antikörpern gegen Slug, RNA-Polymerase II und Kontroll-IgG Antikörpern. Mittels Realtime PCR wurde die Bindung an beide Slug Bindungsstellen innerhalb des L1CAM Promotors untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen \pm S.A., die auf die IgG Kontrolle normiert wurden; * $p < 0,05$

Nachweis der Slug abhängigen Aktivierung des L1CAM Promotors mittels Luziferaseassay

Zur weiteren Bestätigung einer Aktivierung des L1CAM Promotors durch Slug wurden Luziferaseassays durchgeführt. Mittels PCR wurde die dem 1. Exon vorgelagerte Promotor Region aus humaner, genomischer DNA anhand spezifischer Primer amplifiziert und anschließend in den Luziferase-Vektor pGL3 kloniert. Zusätzlich wurden Konstrukte erstellt, in denen jeweils ein oder beide Slug-Erkennungsmotive mittels *Site-directed mutagenesis* mutiert worden waren. Dieses Vorgehen ermöglicht einen Beleg der Abhängigkeit der Promotoraktivität von der Integrität der Slug Bindungsstellen.

Zur Durchführung des Luziferaseassays wurden HPDE Zellen für 24 Stunden mit Slug transfiziert, bevor sie in einem zweiten Schritt mit den unterschiedlichen Luziferase Konstrukten sowie dem Renilla Referenz-Plasmid transfiziert wurden.

Die Daten des Luziferaseassays der Slug transfizierten HPDE Zellen zeigen zunächst einen signifikanten Anstieg der Luziferase Aktivität verglichen mit Kontroll-Plasmid transfizierten Proben (siehe Abb. 3.22 oben).

In allen weiteren Luziferase Experimenten wurden HPDE Zellen, die mit rekombinantem Slug transfiziert wurden, eingesetzt. Wie aus dem unteren Teil der Abbildung 3.22 ersichtlich ist, kam es durch die Mutationen der Slug Bindungsstelle zu einem Abfall der Luziferase Expression. Luziferase Experimente mit Promotor-Plasmiden, in denen jeweils eine Slug Bindungsstelle mutiert war (Slug Δ 1/2 oder Slug1/ Δ 2), zeigten eine Reduktion der Luziferase Expression um ca. 35 %. Diese konnte durch die gleichzeitige Mutation beider Slug Bindungsstellen nahezu vollständig aufgehoben werden (Slug Δ 1/ Δ 2).

Zusammenfassend zeigen EMSA, CHIP- und Luziferaseassays eine direkte Bindung des Transkriptionsfaktors Slug an beide Bindungsstellen des L1CAM Promotors, die sich aktivierend auf die Expression von L1CAM auswirken.

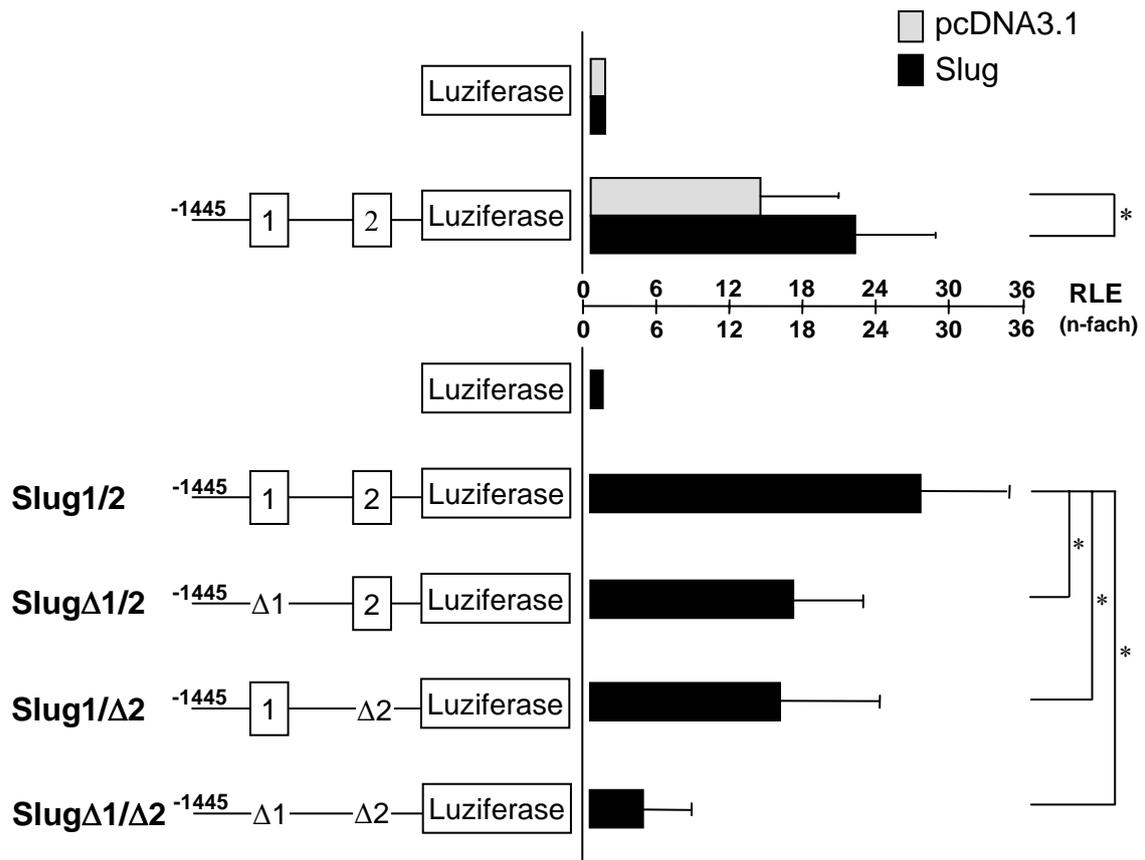


Abbildung 3.22: Der L1CAM Promotor wird durch Slug aktiviert. Für die Herstellung von Luziferase Extrakten wurden HPDE Zellen mit 0,6 μg Kontroll- oder Slug-Plasmid transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 0,5 μg Luziferase und 0,1 μg Referenz-Plasmid transfiziert. Dargestellt sind Mittelwerte der aus 3 unabhängigen Messungen \pm S.A., dabei wurde die Firefly Luziferase auf die Renilla Luziferase sowie auf pGL3 normiert; * $p < 0,05$

3.4 Auswirkungen der L1CAM Expression auf HPDE Zellen

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die gesteigerte L1CAM Expression in HPDE Zellen mit funktionellen Veränderungen assoziiert werden kann.

3.4.1 Erhöhte Migrationsfähigkeit von HPDE Zellen nach Co-Kultur mit PMFs bzw. TGF- β 1 Stimulation

Das Adhäsionsmolekül L1CAM konnte bereits in unterschiedlichen Tumorzellen (*in vitro* und *in vivo*) mit einer erhöhten Migrationsfähigkeit der Zellen assoziiert werden [106, 109, 110], so dass im folgenden untersucht werden sollte, ob die erhöhte L1CAM Expression in co-kultivierten bzw. TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen ebenfalls zu einem gesteigerten Migrationspotential beiträgt.

Dazu wurden HPDE Zellen, die über zwei Wochen mit PMFs co-kultiviert oder für 24 Stunden mit TGF- β 1 stimuliert wurden, in Migrationsassays analysiert. Die HPDE Zellen wurden dafür in Kollagen I beschichteten Transwell-Einsätzen mit einer Porengröße von 8 μ m ausgesät und ihre Migration nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden durch Anfärben mit Kristallviolett überprüft.

Es konnte zunächst festgestellt werden, dass sowohl die mit PMFs co-kultivierten als auch die TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen ein vermehrtes Migrationspotential aufwiesen (siehe Abb. 3.23, Kontroll siRNA behandelte Zellen). Um eine Abhängigkeit zwischen der gesteigerten L1CAM Expression und der erhöhten Migrationsfähigkeit co-kultivierter als auch TGF- β 1 stimulierter HPDE Zellen nachzuweisen, wurde die L1CAM Expression mittels siRNA Transfektion unterdrückt. Wie in Abbildung 3.23 dargestellt, migrierten HPDE Zellen aus Co-Kulturen bzw. nach TGF- β 1 Stimulation bei gleichzeitiger Reduktion der L1CAM Expression ähnlich den unbehandelten, mono-kultivierten Zellen.

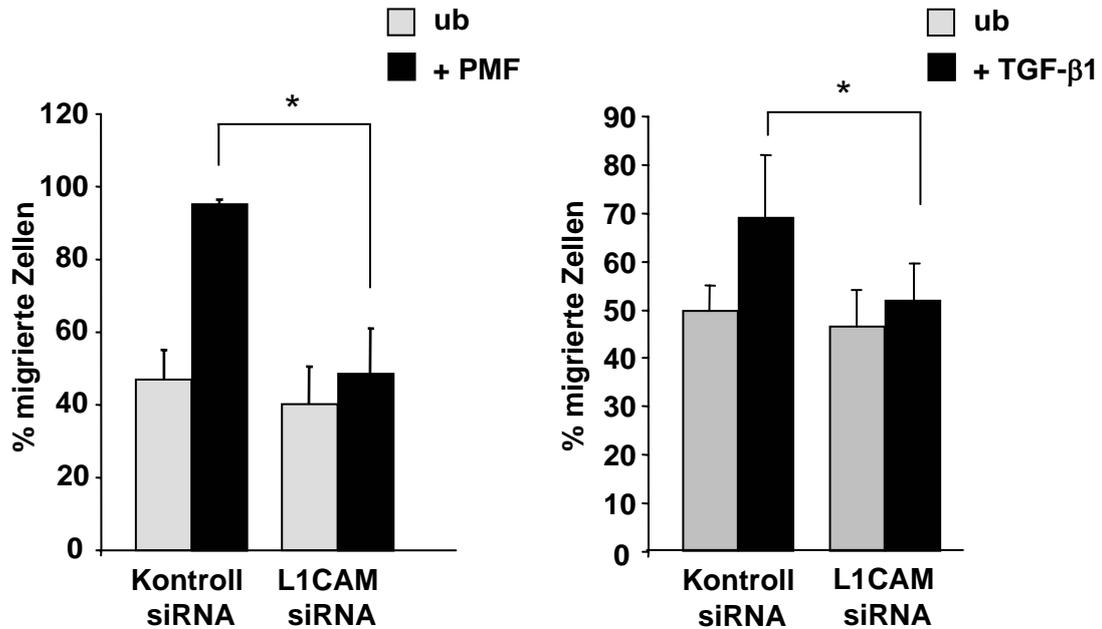


Abbildung 3.23: L1CAM erhöht die Migrationsfähigkeit von HPDE Zellen in Co-Kultur mit PMFs sowie nach TGF- β 1 Stimulation. HPDE Zellen wurden für 2 Wochen mit und ohne PMFs co-kultiviert oder über 24 Stunden mit 10ng/ml TGF- β 1 stimuliert. Weiterhin wurden die Zellen mit Kontroll oder L1CAM siRNA transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Migrationsexperimenten \pm S.A.; * $p < 0,05$

Darüber hinaus konnte durch den Einsatz von Slug siRNA eine ähnliche Verminderung der Migration der co-kultivierten als auch TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen erzielt werden. Abbildung 3.24 zeigt deutlich, dass auch die Slug siRNA transfizierten HPDE Zellen eine signifikant reduzierte Migrationsfähigkeit verglichen mit den Kontroll siRNA behandelten Zellen aufwiesen.

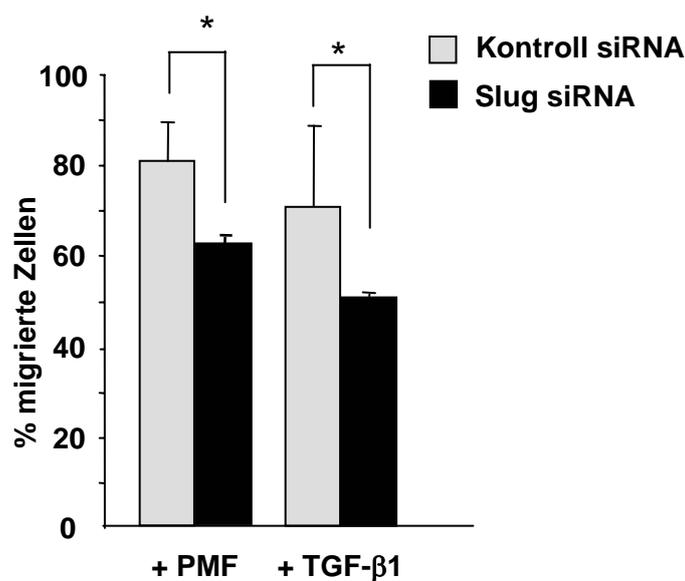


Abbildung 3.24: Slug erhöht die Migrationsfähigkeit der HPDE Zellen in Co-Kultur mit PMFs sowie nach TGF- β 1 Stimulation. HPDE Zellen wurden für 2 Wochen mit PMFs co-kultiviert oder über 24 Stunden mit 10ng/ml TGF- β 1 stimuliert. Weiterhin wurden die Zellen mit Kontroll oder Slug siRNA transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Migrationsexperimenten \pm S.A.; * $p < 0,05$

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass das Adhäsionsmolekül L1CAM sowie der Transkriptionsfaktor Slug zu der gesteigerten Migrationsfähigkeit von co-kultivierten sowie TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen wesentlich beiträgt.

3.4.2 Die Co-Kultur mit PMFs bzw. TGF- β 1 Stimulation vermindert die Caspase Aktivität von HPDE Zellen

Da die Expression von L1CAM bereits in pankreatischen Karzinomzellen mit einer verminderten Chemosensitivität in Verbindung gebracht werden konnte [100], wurde im Weiteren überprüft, ob L1CAM ähnliche Effekte bereits in pankreatischen Epithelzellen hervorruft. Hierzu wurden analog zu den vorangegangenen Versuchen HPDE Zellen verwendet, die über 2 Wochen mit PMFs co-kultiviert oder über 24 Stunden mit TGF- β 1 stimuliert wurden. Vierundzwanzig Stunden vor der Messung der Apoptose mittels Bestimmung der Caspase-3/-7 Aktivität oder der Anzahl der Annexin-V positiven Zellen wurden die Ansätze mit 20 μ g/ml des Zytostatikums Etoposid behandelt. Die Daten in Abbildung 3.25 A zeigen, dass co-kultivierte bzw. TGF- β 1 stimulierte HPDE Zellen nach Gabe von Etoposid eine um 35 bzw. 50 % reduzierte Caspase-3/-7 Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen aufwiesen. Einhergehend mit diesen Ergebnissen wurde eine verringerte Anzahl Annexin-V positiver Zellen in Etoposid behandelten co-kultivierten sowie TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen nachgewiesen (Abb. 3.25 B).

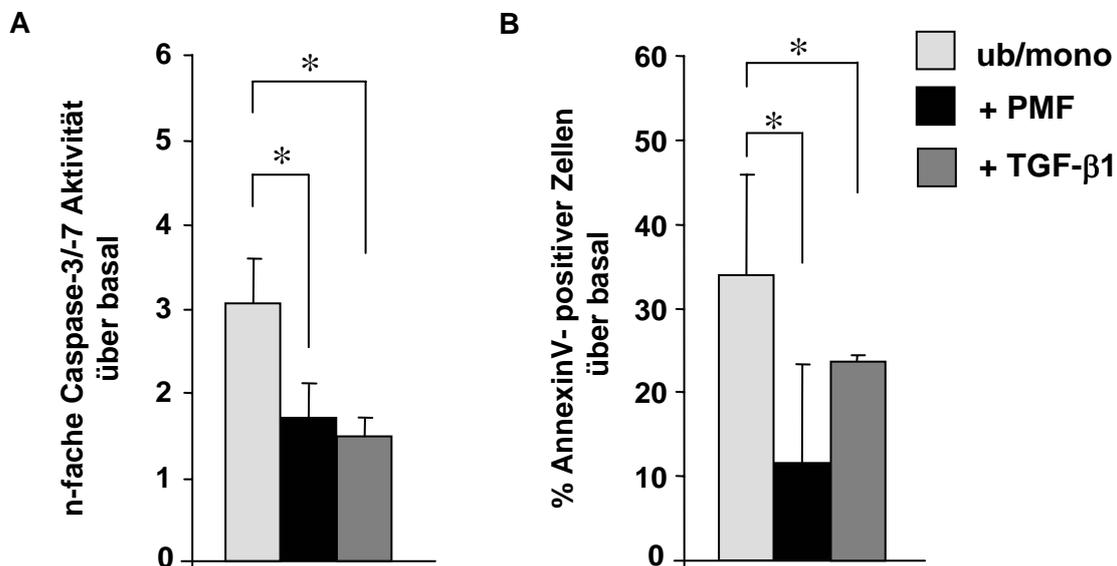


Abbildung 3.25: Co-Kultivierung mit PMFs oder TGF- β 1 Stimulation führen zu einer verminderten Chemosensitivität in HPDE Zellen. HPDE Zellen wurden unbehandelt (ub/mono), über 2 Wochen mit PMFs co-kultiviert (+PMF) oder für 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert. Die Ansätze wurden mit 20 μ g/ml Etoposid behandelt oder unbehandelt belassen. (A) zeigt die Caspase-3/-7 Aktivität, (B) den Anteil Annexin-V positiver Zellen jeweils nach Etoposid Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. 3 unabhängige Versuchen \pm S.A.; * $p < 0,05$

Mittels der Analyse der Caspase-3/-7 Aktivität in L1CAM siRNA transfizierten HPDE Zellen sollten in einem weiteren Schritt die Abhängigkeit der Chemoresistenz vom Adhäsionsmolekül L1CAM untersucht werden. Der Einsatz von L1CAM siRNA führte zu einer signifikanten Sensitivierung der co-kultivierten und TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen gegenüber einer Behandlung mit Etoposid im Vergleich zu Kontroll siRNA behandelten Zellen (siehe Abb. 3.26 A).

Ähnliche Ergebnisse wurden in Slug siRNA transfizierten Zellen beobachtet. Sowohl in co-kultivierten als in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen kam es durch die siRNA vermittelte Reduktion der Slug Expression zu einer verminderten Chemoresistenz (vergleiche Abb. 3.26 B). Verglichen mit den Kontroll siRNA behandelten Zellen stieg die Caspase-3/-7 Aktivität nach Slug siRNA Transfektion um 1/3 in co-kultivierten bzw. um 1/4 in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen an.

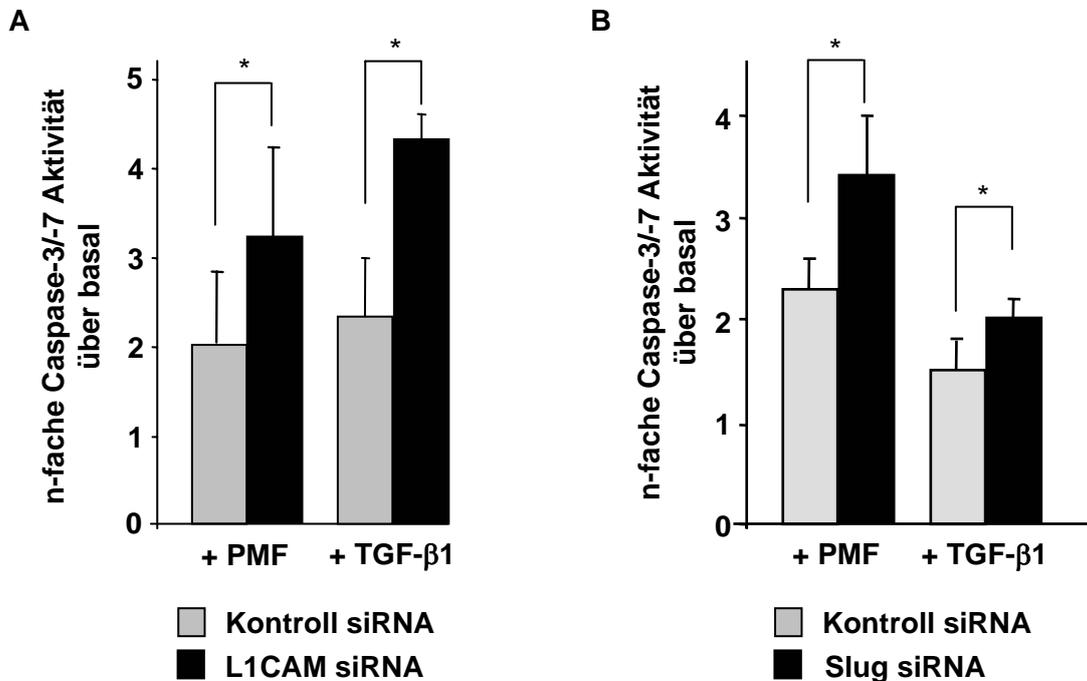


Abbildung 3.26: Co-Kultivierung mit PMFs oder TGF- β 1 Stimulation führen zu einer L1CAM bzw. Slug abhängigen Chemoresistenz in HPDE Zellen. HPDE Zellen wurden über 2 Wochen mit PMFs co-kultiviert (+PMF) oder für 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert und über 24h mit der angegebenen siRNA transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen weiterhin mit 20 μ g/ml Etoposid behandelt. Alle Ergebnisse sind auf nicht Etoposid behandelte Zellen normiert. (A) zeigt die Caspase-3/-7 Aktivität in Kontroll bzw. L1CAM siRNA transfizierten Zellen. (B) zeigt die Caspase-3/-7 Aktivität in Kontroll bzw. Slug siRNA behandelten Zellen; dargestellt sind die Mittelwerte aus mind. 3 unabhängigen Versuchen \pm S.A.; * $p < 0,05$

Eine Reduktion der Caspaseaktivität kann in Karzinomzellen einen Mechanismus darstellen, über den eine Apoptoseresistenz vermittelt werden kann. Die beobachteten Reduktion der Caspase-3/-7 Aktivität kann unterschiedlichen Mechanismen zugrunde liegen. Neben Mutationen innerhalb apoptotischer Gene wurden u.a. epigenetische Modifikationen, alternatives Splicing oder posttranslationale Veränderungen der Caspasen mit einer verringerten Apoptoseaktivität in Verbindung gebracht [126, 125, 127]. Hiervon sind vor allem die Initiatorcaspasen-8 und -9 betroffen, so dass im weiteren Verlauf der Arbeit die Effektorcaspasen nicht untersucht werden. In Versuchen, in denen HPDE Zellen mit PMFs co-kultiviert wurden, zeigte sich eine reduzierte Expression der Initiatorcaspasen-8 und -9, welche auf Hypermethylierungen von CpG Inseln innerhalb der Caspasegene zurückzuführen waren [128]. In weiterführenden Versuchen sollte deshalb untersucht werden, ob die verminderte Caspaseaktivität in HPDE Zellen das Resultat einer verminderten Expression der Initiatorprocaspasen ist und ob diese mit einer erhöhten L1CAM Expression in Verbindung gebracht werden kann. Hierzu wurden HPDE Zellen über Zeiträume von bis zu 14 Tagen mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert und auf die Expression der Initiatorcaspasen-8 und -9 analysiert. Wie in Abbildung 3.27 dargestellt, konnte bereits nach einer fünf tägigen TGF- β 1 Stimulation sowohl auf mRNA Ebene (A) als auch auf Proteinebene (B) eine verringerte Expression der Procaspasen-8 und -9 nachgewiesen werden.

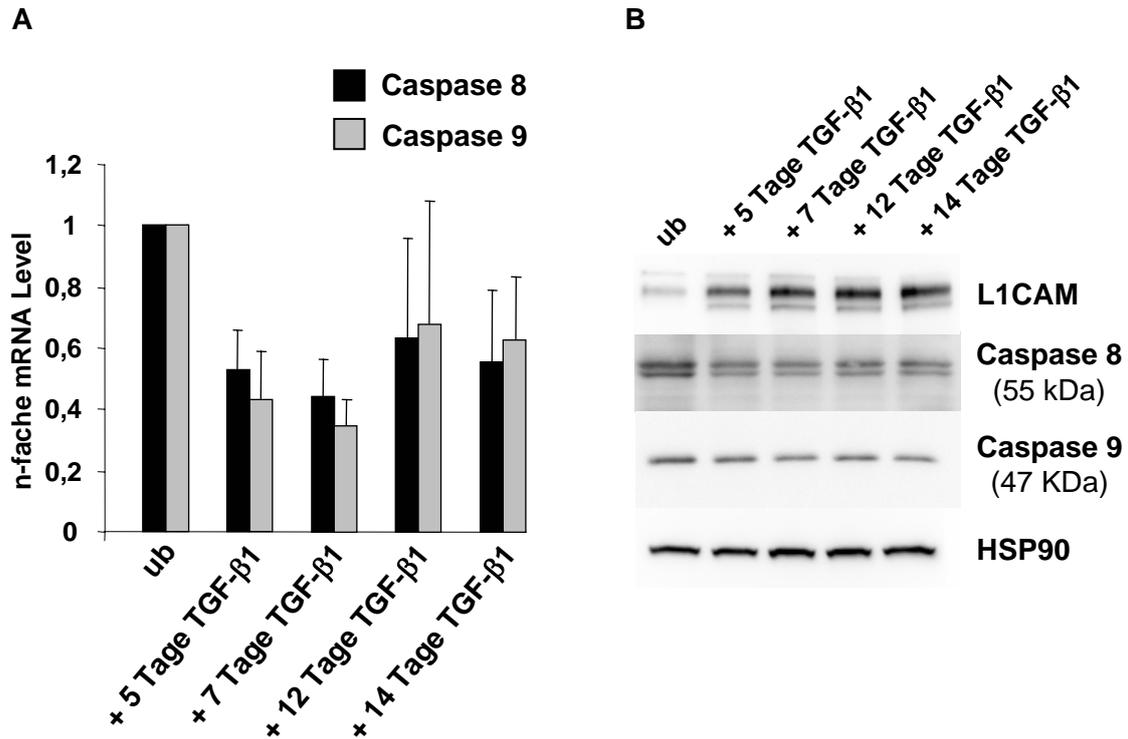


Abbildung 3.27: TGF- β 1 Stimulation reduziert die Expression der Procaspasen in HPDE Zellen. HPDE Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert. (A) zeigt die Caspase-8/-9 mRNA Expression. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen, auf TBP normierten Messungen \pm S.A. In Abbildung (B) ist ein repräsentatives Ergebnis der Westernblotanalysen von L1CAM, den Procaspasen-8, -9 und HSP90 abgebildet.

Zum Nachweis einer Abhängigkeit der reduzierten Procaspaseexpression von der gesteigerten L1CAM Expression in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen wurde die L1CAM Expression mittels siRNA Transfektion unterdrückt. Erste Versuche zeigten nach 7 tägiger TGF- β 1 Stimulation und gleichzeitiger Reduktion der L1CAM Expression sowohl auf mRNA Ebene mittels Realtime PCR (A) als auch auf Proteinebene mittels Westernblotanalysen (B) eine gesteigerte Expression der Procaspasen-8 und -9 im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (3.28).

In co-kultivierten PDAC Zelllinien sowie in co-kultivierten HPDE Zellen wurde beobachtet, dass es über einen hypermethylierungsabhängigen Mechanismus zur Herunterregulation der Caspasen kommt [128]. Auf Grund dieser Befunde wurde überprüft, ob auch die TGF- β 1 induzierte Reduktion der Procaspasen-8/-9 in HPDE Zellen auf diese epigenetischen Modifikationen zurückzuführen ist. Hierzu wurden 7 Tage TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen zusätzlich mit dem DNA-

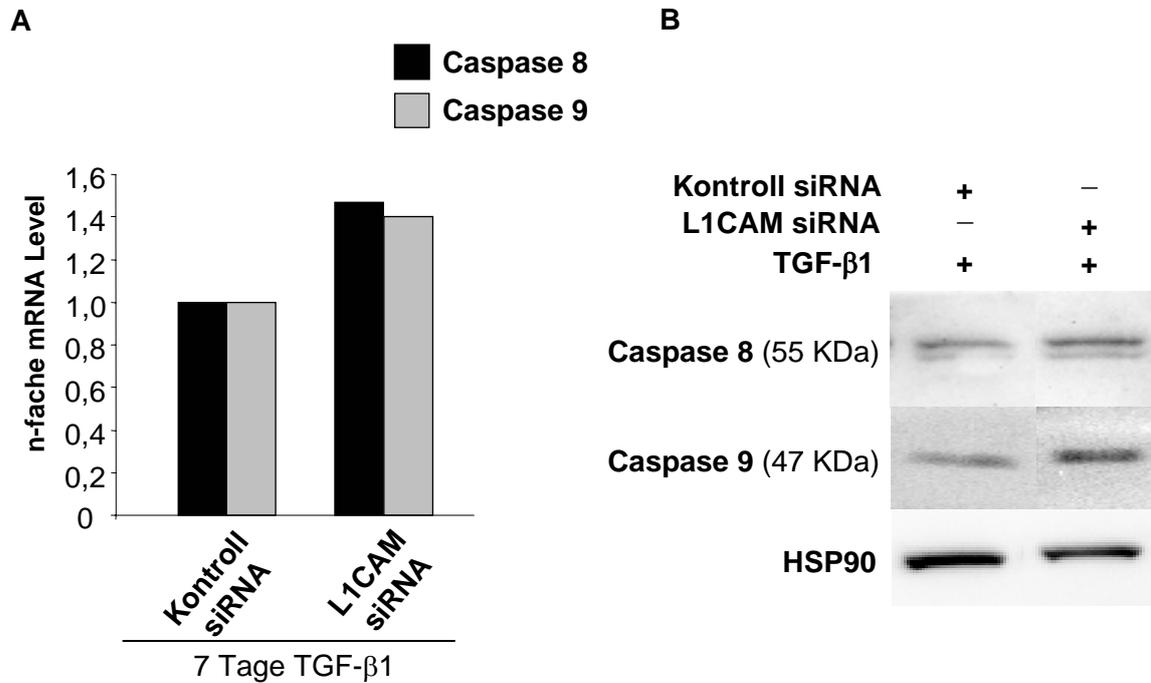


Abbildung 3.28: TGF- β 1 Stimulation führt zu einer L1CAM abhängigen Expression der Procaspasen-8/ -9 in HPDE Zellen. HPDE Zellen, die über 7 Tage mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert wurden, wurden zusätzlich für 48 h mit Kontroll bzw. L1CAM siRNA transfiziert. (A) zeigt ein Realtime PCR Ergebnis auf Caspase 8 und 9 nach Normierung auf TBP. (B) bildet ein Ergebnis der Westernblotanalysen von Procaspase-8, -9, und HSP90 ab.

Methylierungsinhibitor 5-Azadesoxycytidin behandelt. Erste Proteinanalysen zeigen, dass das erniedrigte Expressionsniveau der Procaspasen-8 und -9 in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen durch die Behandlung mit 5-Azadesoxycytidin wieder angehoben werden kann (siehe 3.29).

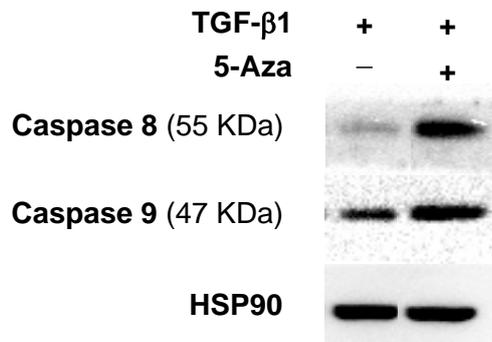


Abbildung 3.29: Die Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azadesoxycytidin erhöht die Expression der Initiatorcaspasen in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen. HPDE Zellen, die über 7 Tage mit 10 ng/ml TGF- β 1 stimuliert wurden, wurden zusätzlich für 48 h mit 1 μ M 5-Azadesoxycytidin behandelt. Dargestellt ist mittels Westernblot-analyse die Expression der Procaspasen-8 und -9 sowie HSP90.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Co-Kultivierung mit PMFs sowie die Stimulation mit TGF- β 1 zum Erwerb eines chemoresistenten Phänotyps in HPDE Zellen führt. Die verringerte Expression der Initiatorprocaspase-8/-9 scheint in diesem Zusammenhang für die Entstehung dieser Resistenz mitverantwortlich zu sein. Darüber hinaus deuten erste Ergebnisse darauf hin, dass die verringerte Expression der Initiatorcaspase-8 und -9 in den HPDE Zellen unter TGF- β 1 Stimulation mit der erhöhten L1CAM Expression assoziiert werden kann. Des Weiteren scheinen Methylierungen innerhalb der Initiatorcaspasen oder innerhalb Caspase-regulierender Gene für die verringerte Caspaseexpression verantwortlich zu sein. Die Bestätigung dieser ersten Ergebnisse ist Gegenstand aktueller Forschung.

Kapitel 4

Diskussion

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) wird auf Grund des Fehlens spezifischer Symptome bei vielen Patienten erst spät erkannt. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist die Tumorerkrankung meist weit fortgeschritten, so dass neben einem inoperablen Primärtumor bereits Metastasen vorliegen [129]. Darüber hinaus stellt die profunde Resistenz des PDACs gegenüber konventionellen Chemo- und Bestrahlungstherapien eine weitere Problematik bei der Behandlung der Patienten dar. Die genannten Faktoren bedingen entsprechend nur sehr kurze Überlebensraten der betroffenen Patienten, so dass eine frühzeitige Erkennung dieser Tumorerkrankung sowie die Entwicklung verbesserter Therapien dringend nötig sind.

Ein weiteres Charakteristikum des PDACs ist eine ausgeprägte desmoplastische Stromabildung. Diese besteht beim duktalem Pankreasadenokarzinom aus einer zellulären Komponente wie Fibroblasten, Endothel- und Entzündungszellen sowie aus extrazellulären Matrixproteinen (EZM-Proteine) [12, 13]. Tumorzellen und Stroma können sowohl über Zell-Zell-Kontakte als auch über lösliche, sezernierte Faktoren miteinander interagieren [130]. Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass beide Interaktionsformen Einfluss auf die Tumorprogression haben. So zeigten sowohl direkte Kontakte zwischen Tumor- und Stromakomponenten als auch lösliche Faktoren wie TGF- β , HGF, FGF, EGF, IL1 β oder NO Auswirkungen auf die Proliferation, Migration oder Chemoresistenz der Tumorzellen [15, 18, 131].

In den letzten Jahren wurde in unterschiedlichen Tumorentitäten das Adhäsionsmolekül L1CAM nachgewiesen [96, 100, 101, 102, 103, 106, 124]. Die Expression von L1CAM konnte dabei mit unterschiedlichen Tumor-assoziierten Prozessen wie Migration, Proliferation und Apoptoseresistenz der Zellen in Verbindung gebracht werden [106, 109, 111, 112].

Mit Hilfe der Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sollten *in vitro* der Einfluss von Stromazellen auf prä-maligne Pankreasepithelzellen näher untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf TGF- β 1 vermittelten Veränderungen der Epithelzellen und der Fragestellung, ob L1CAM bei diesen Veränderungen eine Rolle einnimmt.

4.1 L1CAM in chronischer Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis gilt als ein epidemiologisch gesicherter Risikofaktor für die Entstehung eines PDACs und weist ähnlich wie dieser Tumor bereits eine ausgeprägte desmoplastische Stromabildung auf [132]. Da bisher die Mechanismen, über die es zur Hochregulation von L1CAM in tumorösem Gewebe kommt, wenig verstanden sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Fragestellung untersucht, ob die Aktivierung von Pankreasfibroblasten während einer chronischen Pankreatitis bereits zur Erhöhung der L1CAM Expression in duktalem Epithelzellen führt. Hierzu wurden immunhistochemische Analysen von 23 chronischen Pankreatitiden sowie 20 normalen Pankreasgeweben durchgeführt. Diese zeigten eine erhöhte Expression von L1CAM in duktalem Epithelgewebe chronischer Pankreatitiden, jedoch nicht in normalem, duktalem Pankreasgewebe (siehe Abbildung 3.1).

Der Nachweis von L1CAM in chronischen Pankreatitiden deutet darauf hin, dass es möglicherweise bereits vor dem Auftreten der für das PDAC typischen genetischen Mutationen (z.B. Mutationen im k-ras, p53, p16 oder Smad4 Gen) zu ersten Veränderungen der duktalem Epithelzellen kommen kann, die mit der Progression des PDACs in Verbindung gebracht werden können. Weiterhin konnte eine erhöhte L1CAM Expression in PDAC Vorläuferläsionen, den so genannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) nachgewiesen werden. Bergmann et al. konnten zeigen, dass L1CAM vor allem in den höher-gradigen PanINs (Grad 2 und 3) eine signifikant erhöhte L1CAM Expression im Vergleich zu PanINs 1A/B und Normalgewebe aufweisen [124]. Zusammen deuten die Daten darauf hin, dass die Hochregulation von L1CAM in Entzündungs- und Stroma-exponierten Epithelzellen des Pankreas ein frühes Ereignis in der Tumorigenese des PDACs darstellt.

4.2 Abhängigkeit der L1CAM Expression von TGF- β 1

Um die Mechanismen zu identifizieren, über die es in pankreatischen Gangepithelzellen durch den Einfluss des Stromas zur Hochregulation von L1CAM kommt, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit Co-Kulturversuche durchgeführt. Hierzu wurde mit der humanen pankreatischen duktaalen Epithelzelllinie HPDE gearbeitet, die einen fast normalen Geno- und Phänotyp pankreatischer Gangzellen exprimieren und noch keine der Pankreaskarzinom typischen Mutationen (k-ras, p53, p16, Smad4) aufweisen [123]. Dieses Vorgehen ermöglicht die Untersuchung initialer Veränderungen pankreatischer Gangzellen, die vor dem Erwerb von genetischen Mutationen bereits zu EMT, Metastasierung und Apoptoseresistenz führen können.

Um den Einfluss des Stromas auf HPDE Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen bis zu 6 Wochen mit Pankreasmyofibroblasten (PMFs) co-kultiviert. Der Aufbau des Co-Kultursystems war dabei so gewählt, dass ein direkter Zell-Zell Kontakt vermieden wurde und somit ausschließlich der Einfluss löslicher Faktoren auf die Zellen untersucht werden konnte. Die doppelte Anzahl der im Co-Kultursystem eingesetzten PMFs gegenüber HPDE Zellen sollte der Tatsache Rechnung tragen, dass sowohl chronische Pankreatitiden als auch PDACs durch einen hohen Stromaanteil charakterisiert sind. In Abbildung 3.5 sind die TGF- β 1 Konzentrationen im Überstand von co-kultivierten bzw. mono-kultivierten HPDE Zellen abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Co-Kultivierung der HPDE Zellen mit PMFs mehr als eine Verdreifachung der TGF- β 1 Konzentration hervorruft. Da mit diesem ELISA nur humanes TGF- β 1 gemessen wird, kann davon ausgegangen werden, dass die erhöhte TGF- β 1 Sekretion von den HPDE Zellen ausgeht. Myofibroblasten selbst sind jedoch auch durch eine erhöhte Freisetzung dieses Wachstumsfaktors charakterisiert, so dass zu vermuten ist, dass die TGF- β 1 Konzentrationen unter Co-Kulturbedingungen sogar noch höher sind. Ähnlich den erhöhten TGF- β 1 Konzentration im Zellkulturmodell ist auch in chronischen Pankreatitiden und im PDAC eine vermehrte TGF- β 1 Expression nachweisbar [66, 133]. In letzterem korreliert die erhöhte TGF- β 1 Menge mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, Metastasenbildung und einer schlechten Prognose für die Patienten [134]. Es konnte gezeigt werden, dass diese erhöhten TGF- β Konzentrationen hauptsächlich den stromalen Fibroblasten entstammen [135], was den Einfluss des Tumorstromas auf die Tumorigenese unterstreicht. Es wurde aber auch in vielen Tumorzellen (z.B. Panc1) eine

erhöhte TGF- β 1 Sekretion nachgewiesen. Gaspar et al. konnten durch Hemmung des TGF- β Rezeptors Typ I die Beweglichkeit von Panc1 Zellen im Zellkulturmodell verringern und darüber hinaus sowohl Tumorwachstum als auch Invasivität der Zellen im Tiermodell reduzieren [136]. Ähnliche Ergebnisse wurden in Brustkrebs-Mausmodellen erzielt. Hier wurde durch die Inhibition der TGF- β Signalkaskade das Überleben der Tumorzellen gehemmt und eine Unterdrückung der Metastasenbildung erzielt [137].

Einhergehend mit der erhöhten TGF- β 1 Konzentration wurde eine vermehrte Expression von L1CAM in co-kultivierten HPDE Zellen nachgewiesen (siehe Abbildung 3.2). Zur Bestätigung der TGF- β 1 Abhängigkeit der L1CAM Expression wurde einerseits eine erhöhte L1CAM Expression nach Stimulation mit exogenem TGF- β 1 in HPDE Zellen induziert (siehe Abb. 3.7) und andererseits die L1CAM Expression in Co-Kulturen durch Hemmung des TGF- β -Rezeptors Typ I mit dem Inhibitor SB431542 unterdrückt (siehe Abb. 3.6).

Auch in den zwei PDAC Zelllinien Panc1 und Colo357, die endogen TGF- β 1 freisetzen und noch einen intakten TGF- β 1 Signalweg aufweisen [138], konnte eine Abhängigkeit der L1CAM Induktion von TGF- β 1 beobachtet werden. Die Behandlung beider Zelllinien mit dem TGF- β -Rezeptor Typ I Inhibitor rief ebenfalls eine Reduktion der L1CAM Expression hervor [139]. Die Tatsache, dass unter Co-Kultur die L1CAM Expression durch SB431542 nicht vollständig vermindert werden konnte, lässt darauf schließen, dass unter Co-Kulturbedingungen neben TGF- β 1 noch weitere Faktoren zur Hochregulation von L1CAM beitragen können.

So wurden mittlerweile weitere lösliche Faktoren identifiziert, die eine vermehrte Expression von L1CAM hervorrufen. So konnten Issa et al. außer TGF- β 1 auch TNF- α und IFN- γ als Induktoren einer L1CAM Expression in pankreatischen Endothelzellen nachweisen [140]. In Endometriumkarzinomzellen konnte L1CAM ebenfalls deutlich durch die exogene Zugabe von TGF- β 1 stimuliert werden, während HGF sich nur leicht auf die L1CAM Expression auswirkte [96]. Ovarialkarzinomzellen zeigten im Gegensatz dazu eine HGF vermittelte L1CAM Expression auf [114]. Untersuchungen an intestinalen Epithelzellen konnten mittlerweile neben TGF- β 1 auch NO, TNF- α und IL-8 als L1CAM Induktoren identifizieren (unveröffentlichte Daten, S. Sebens).

In nicht malignen Zellen wurde bisher eine Induktion der L1CAM Expression ausschließlich für neuronale Zellen durch *bone morphogenic proteins* (BMPs) sowie für myelomonozytäre und lymphoide Zellen durch Lipopolysaccharid, TNF- α oder Phy-

tohaemagglutinin beschrieben [141, 142].

Zusammengefasst geht aus den Daten hervor, dass es über erhöhte TGF- β 1 Konzentrationen zu einer Induktion der L1CAM Expression in pankreatischen duktalem Epithelzellen kommt, was hinsichtlich früher Veränderungen im Rahmen der Tumorerkrankung des PDAC von Bedeutung sein könnte.

4.3 EMT in pankreatischen Epithelzellen

Die Expression von TGF- β 1 wurde in unterschiedlichen Tumoren mit der Initiierung EMT assoziierter Prozesse in Verbindung gebracht [30, 36]. So wurde auch für die Tumorigenese des PDACs eine Induktion der EMT durch TGF- β 1 gezeigt [44]. In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus die Induktion der EMT bereits in nicht tumorigenen, pankreatischen duktalem Epithelzellen nachgewiesen. Wie in Abbildung 3.3 und 3.8 dargestellt, verändert sich die Morphologie der HPDE Zellen durch Co-Kultivierung mit PMFs oder TGF- β 1 Stimulation von einem runden, epithelialen Phänotyp zu einem fibroblastoiden, mesenchymalen Phänotyp. Darüber hinaus weisen mit PMFs co-kultivierte bzw. TGF- β 1 stimulierte HPDE Zellen eine erhöhte Expression der mesenchymalen Markerproteine Vimentin und N-Cadherin auf (siehe Abbildung 3.9, 3.4).

Ähnlich zu den gezeigten Ergebnissen konnten auch in murinen Linsenepithelzellen, sowie humanen prämaligen Keratinozyten und der Brustepithelzelllinie MCF10A EMT Prozesse durch TGF- β induziert werden [143, 144, 145]. Des Weiteren wurde für die Pankreaskarzinomzelllinien Panc1 und HPAFII eine Induktion der EMT durch Stimulation mit TGF- β gezeigt [44, 146].

Während in TGF- β 1 bzw. co-kultivierten HPDE Zellen sowohl eine vermehrte Expression von L1CAM als auch der mesenchymalen Markerproteine nachgewiesen wurden, konnte keine Veränderungen in der Expression des epithelialen Markerproteins E-Cadherin beobachtet werden. Dieses steht im Widerspruch zu den von Shutman et al. veröffentlichten Ergebnissen, laut derer in MCF-7 Brustkarzinomzellen eine verringerte E-Cadherin Expression innerhalb der Zellverbindungen in Abhängigkeit von L1CAM steht [112]. Da auch für PDAC-Gewebe ein Verlust der E-Cadherin Expression beschrieben wurde [41, 42], weisen die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die Induktion von L1CAM in pankreatischen Epithelzellen unabhängig von der Verringerung der E-Cadherin Expression stattfindet. Dennoch

erfolgt eine Verringerung der E-Cadherin Expression im späteren Verlauf der Tumorigenese. Dieses könnte einerseits durch den notwendigen Erwerb von genetischen Alterationen, oder andererseits durch die Vermutung, dass es sich hierbei um ein pankreasspezifisches Phänomen handelt zu erklären zu sein.

Zusammengefasst untermauern die Ergebnisse die Hypothese, dass das Tumorstroma nicht nur eine passive Komponente während der Tumorigenese darstellt, sondern eine wichtige Rolle in der Entwicklung epithelialer Tumore einnimmt. Darüber hinaus scheinen bereits vor dem Auftreten erster genetischer Mutationen (Aktivierung des Proto-Onkogens k-ras) im PDAC tumorogene Veränderungen der Epithelzellen unter Einfluss des Stromas stattzufinden.

4.4 Die Induktion der L1CAM Expression in HPDE Zellen

Das Adhäsionsmolekül L1CAM wurde, ähnlich der EMT, mit erhöhter Migration in Verbindung gebracht [81, 114]. Im Gegensatz zu Signalwegen der EMT ist der Mechanismus, der zu einer vermehrten L1CAM Expression in Tumorzellen führt, bisher kaum untersucht worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Signalweg, dem die Induktion der L1CAM Expression in humanen pankreatischen Epithelzellen und somit in frühen Stadien der Tumorigenese des PDACs unterliegt, näher untersucht.

4.4.1 Die TGF- β 1 vermittelte L1CAM Expression ist Smad unabhängig

Wie bereits erläutert, stellt TGF- β 1 einen wesentlichen Mediator der L1CAM Expression in HPDE Zellen unter Co-Kulturbedingungen dar, so dass sich die weiteren Analysen auf die TGF- β 1 vermittelten Signalwege fokussierten. Da die Induktion der EMT durch TGF- β 1 sowohl über den Smad abhängigen [36] als auch über den Smad unabhängigen Signalweg [47, 147, 148] erfolgen kann, wurde überprüft, ob dieses auch für die Induktion der L1CAM Expression durch TGF- β 1 gilt.

Da mit Hilfe einer siRNA vermittelten Reduktion der Smad Proteine (Smad2,

Smad3, Smad4) keine Veränderungen der L1CAM Expression in co-kultivierten bzw. TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen erzielt werden konnten, lässt sich schlussfolgern, dass der Smad abhängige Signalweg nicht an der Induktion der L1CAM Expression durch TGF- β 1 beteiligt ist (gezeigt in Abbildung 3.10). Zur Untersuchung einer Beteiligung von Smad unabhängigen Signalwegen, wurden co-kultivierte bzw. TGF- β 1 stimulierte HPDE Zellen mit verschiedenen Kinase Inhibitoren behandelt. Nur die Blockade der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) wirkte sich hemmend auf die L1CAM Expression aus, während der Einsatz anderer Inhibitoren (PD98059 (Erk1/2), SB202190 (p38 MAP-Kinase), LY294002 (AKT)) keinen Effekt zeigte (siehe Abbildung 3.11). Die Abhängigkeit der L1CAM Expression von JNK konnte durch die Transfektion der Zellen mit einer JNK spezifischen siRNA bestätigt werden.

Ähnliche Befunde wurden in den bereits transformierten, L1CAM exprimierenden PDAC Zelllinien Panc1 und Colo357 durchgeführt. In beiden Zelllinien zeigte sich, dass sowohl der Einsatz des JNK Inhibitors SP600125 als auch die Transfektion der Zellen mit JNK siRNA eine Verringerung der L1CAM Expression bewirkt [139]. In Analogie mit der Smad Unabhängigkeit und JNK Abhängigkeit der TGF- β 1 induzierten L1CAM Expression wurde in unterschiedlichen Zellen gezeigt, dass TGF- β 1 eine Reorganisation des Zytoskeletts in Abhängigkeit von JNK, jedoch ohne Einwirkung der Smad Proteine bewirken kann. Dabei kommt es zur Förderung der Migrationsfähigkeit sowohl von Tumorzellen als auch von nicht-transformierten Zellen [47, 147, 149, 148]. So zeigte Santibanez, dass TGF- β 1 EMT und Migration in Keratinozyten durch die Aktivierung von JNK, aber unabhängig von Smad Proteinen induziert [150], während Imamichi et al. für Brustkarzinomzelllinien neben einer Smad unabhängigen JNK Aktivierung auch eine Aktivierung des Erk Signalweges nachweisen konnten. Die spezifische Hemmung sowohl von JNK als auch von Erk verringerte in diesen Zellen TGF- β 1 vermittelte Migrationseffekte [148]. In Pankreaskarzinomzellen wurde ebenfalls durch die Inhibition des Erk, JNK oder p38 Signalweges eine Verminderung der TGF- β 1 vermittelten EMT Prozesse sowie eine Verringerung des Migrations- und Invasionspotentials der Zellen gezeigt [44, 47]. Darüber hinaus sollte beachtet werden, dass es zu Interaktionen zwischen dem Smad unabhängigen und dem Smad abhängigen Signalweg kommen kann [49, 55]. Es wird davon ausgegangen, dass die Kombination von Smad abhängigen und nicht Smad abhängigen Signalwegen für die Komplexität der zellulären Antwort auf die Stimulation mit TGF- β 1 verantwortlich sind.

4.4.2 Die TGF- β 1 vermittelte L1CAM Expression ist Slug abhängig

Um den Signalweg der TGF- β 1 abhängigen L1CAM Expression weiter zu verfolgen, wurde der L1CAM Promotor auf mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen untersucht. Die untersuchte Promotorregion ist dem distalen Transkriptionsstartpunkt vorgelagert [73] und führt zur Bildung eines Transkripts, das Exon1 (108 bp) enthält [151]. Die untersuchte Sequenz hat hohe Ähnlichkeit mit dem murinen Mauspromotor, der von Kallunki et al. beschrieben wurde [73]. An Hand der Transkriptionsfaktor typischen Erkennungsmotiven wurden in der untersuchten Sequenz sieben mögliche Bindungsstellen gefunden, darunter 2 AP1- und 2 Snail/Slug Bindungsstellen, wobei letztere nur im humanen Promotor auffindbar sind.

Da AP1 als Zielstruktur der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) bekannt ist [152, 153], wurde anfangs eine Beteiligung von AP1 in der TGF- β 1 vermittelten L1CAM Expression vermutet. In EMSA Versuchen konnte AP-1 jedoch als Induktor der L1CAM Expression ausgeschlossen werden, da eine Bindung des Transkriptionsfaktors an die untersuchte Promotorsequenz zeitlich nicht mit der Expression des L1CAM korreliert.

Da in unterschiedlichen Zellarten eine Induktion der Transkriptionsfaktorfamilie Snail/Slug durch TGF- β 1 und JNK beschrieben wurde [154, 155] und diese Transkriptionsfaktoren mit EMT Prozessen in der Karzinogenese assoziiert werden [156, 157], wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Snail/Slug Bindungsstellen näher untersucht. So zeigten unterschiedliche Studien, dass eine Überexpression von Snail oder Slug in einer Repression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin resultiert [158, 159]. Die Funktion der Transkriptionsfaktoren in der Regulation der EMT wird darüber hinaus durch eine verstärkte Expression in verschiedenen Tumorentitäten unterstrichen [159, 160, 161]. Ähnlich der vermehrten Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM in PDAC Geweben wurde auch für Snail/Slug eine erhöhte Expression im PDAC, aber nicht in gesundem Pankreasgewebe festgestellt [161]. Genauere Untersuchungen ergaben eine unterschiedliche Verteilung beider Transkriptionsfaktoren. Während Snail in den dukталen Strukturen im Zentrum des Tumors exprimiert wurde, konnte Slug hauptsächlich an der invasiven Front nachgewiesen werden [38], was mit der erhöhten Migrationsfähigkeit in Einklang steht.

Da Slug und Snail an das gleiche Erkennungsmotiv CAGGTG/CACCTG binden [162], wurde sowohl eine mögliche Beteiligung von Snail als auch von Slug überprüft. In HPDE Zellen, die mit PMFs co-kultiviert oder mit TGF- β stimuliert wurden, war nur eine geringe Induktion der Snail Expression festzustellen. Des Weiteren konnte weder durch einen siRNA vermittelten Snail *knock down* eine Veränderung in der L1CAM Expression bewirkt werden noch im ChIP Assay eine Snail Bindung an die untersuchte Promotorsequenz gezeigt werden. Dies ließ darauf schließen, dass keine Beteiligung von Snail an der TGF- β 1 vermittelten L1CAM Expression in HPDE Zellen vorliegt. Diese Vermutung wird durch Versuche in Endometriumkarzinomzellen unterstützt, in denen Snail co-transfizierte Zellen keine Induktion der Luziferaseexpression aufwiesen [74].

Im Gegensatz dazu wurde in HPDE Zellen nach Co-Kultivierung mit PMFs oder TGF- β 1 Stimulation eine deutlich vermehrte Slug Expression festgestellt (siehe Abbildung 3.15). Es zeigte sich weiterhin, dass diese JNK abhängig ist und sich entsprechend auf die L1CAM Expression auswirkt (vergleiche Abbildung 3.18, 3.17). Ein ähnlicher Signalweg konnte auch in EMT-Prozessen von Linsenepithelzellen identifiziert werden. Choi et al. zeigten in diesen Zellen, dass die TGF- β 1 vermittelte Slug Induktion unabhängig von Smad Proteine, aber abhängig von den MAP-Kinasen JNK und Erk stattfindet [154].

Der Nachweis einer Bindung von Slug an beide Bindungsstellen des L1CAM Promotors wurde einerseits in Slug transfizierten HeLa Zellen mittels EMSA erbracht und andererseits mittels ChIP Assay in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen gezeigt (vergleiche 3.19, 3.20). Da eine Bindung von Slug an den L1CAM Promotor erst 9 Stunden nach TGF- β 1 Stimulation nachweisbar war, wurde davon ausgegangen, dass die Erhöhung der L1CAM Expression einer Induktion durch Slug bedarf. Diese Vermutung konnte durch die Ergebnisse weiterer ChIP Assays gestützt werden, die zeigen, dass eine siRNA vermittelte Reduktion des Slug Proteins in einer verminderten Bindung an den L1CAM Promotor resultiert (siehe Abbildung 3.21). Darüber hinaus zeigten die ChIP Assays eine Slug abhängige Bindung der RNA Polymerase II an beide Bindungsstellen, was einen Indikator der transkriptionellen Aktivierung des humanen L1CAM Promotors durch Slug darstellt.

In Luziferaseassays wurde die Bindung von Slug an den L1CAM Promotor ebenfalls bestätigt. So zeigten HPDE Zellen eine deutliche erhöhte Luziferaseexpression, wenn sie mit rekombinantem Slug co-transfiziert wurden (siehe 3.22). Beide Bindungsstellen scheinen dabei kooperativ zu wirken, da im Luziferaseassay die Mutation einer einzelnen Slug Bindungsstelle zwar eine Verminderung der Aktivität des humanen L1CAM Promotors hervorruft, aber nur die gleichzeitige Mutation beider Bindungs-

stellen die Slug vermittelte Induktion vollständig aufhebt (vergleiche 3.22).

Ähnlich den Ergebnissen in HPDE Zellen wurde eine Reduktion der L1CAM Expression in Slug siRNA transfizierten Panc1 und Colo357 gezeigt. In den Pankreaskarzinomzelllinien konnte darüber hinaus mit Hilfe von ChIP Assays eine Slug Bindung an den Promotor gezeigt werden [139], die mit einer gesteigerten RNA Polymerase II Bindung einher geht (unveröffentlichte Daten). Parallel zu den vorgestellten Ergebnissen wird auch in Panc1 Zellen ein vollständiger Verlust der Promotor-Aktivität nur durch die Mutation beider Bindungsstellen erzielt (unveröffentlichte Daten).

Neben den Ergebnissen aus pankreatischen Epithel- und Karzinomzellen konnte auch in den Endometriumkarzinomzelllinien ECC-1 und HEC-1A eine Abhängigkeit der TGF- β 1 vermittelten L1CAM Expression von Slug gezeigt werden [96]. Weiterhin identifizierten Kurrey et al. L1CAM in der epithelialen, ovarialen Karzinomzelllinie A4 als eine transkriptionelle Zielstruktur von Slug, aber nicht von Snail [163].

Wie bereits erwähnt, kommt es in HPDE Zellen zu EMT assoziierten Prozessen, obwohl keine Reduktion der E-Cadherin Expression nachgewiesen werden konnte, wie es für viele Tumorzelllinien beschrieben wurde [164]. Die Reduktion der E-Cadherin Expression wurde häufig auf die vermehrte Expression von Mitgliedern der Snail Superfamilie zurückgeführt [165, 166, 167]. Weiterhin konnte einhergehend mit der Slug/Snail induzierten Reduktion der E-Cadherin Expression eine Freisetzung von β -Catenin nachgewiesen werden, die ihrerseits zu einer Aktivierung des β -Catenin/TCF/Lef-1 Signalweges führte [37].

Gavert et al. identifizierten L1CAM in Kolonkarzinomzellen als Zielstruktur des transkriptionsfördernden β -Catenin/TCF/Lef-1 Komplexes [106]. Darüber hinaus gilt neben L1CAM auch Slug als direkte Zielstruktur des β -Catenin/TCF/Lef-1 Signalweges [168, 169], so dass sich erhöhte β -Catenin Aktivität auch indirekt auf die L1CAM Expressionen auswirken könnten.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Promotoranalyse wurde jedoch keine β -Catenin Bindungsstelle identifiziert. Weiterhin konnte in pankreatischen Epithel- und Karzinomzellen sowie in Endometriumkarzinomzellen weder eine gesteigerte β -Catenin Expression noch eine β -Catenin vermittelte L1CAM Expression beobachtet werden [74, 139]. Diese Unterschiede weisen auf verschiedene Regulationswege innerhalb einzelner Tumorentitäten hin: während L1CAM im Laufe der EMT in einigen Tumorentitäten (z.B. Kolon-, Brustkarzinom) durch den Snail (Slug)/E-Cadherin/ β -Catenin-TCF/Lef-1 Signalweg und damit indirekt von Snail und Slug

induziert zu werden scheint, könnte die L1CAM Expression in anderen Tumorentitäten, wie dem Pankreas- und Endometriumkarzinom, direkt von der Induktion des Transkriptionsfaktors Slug abhängen (siehe 4.1).

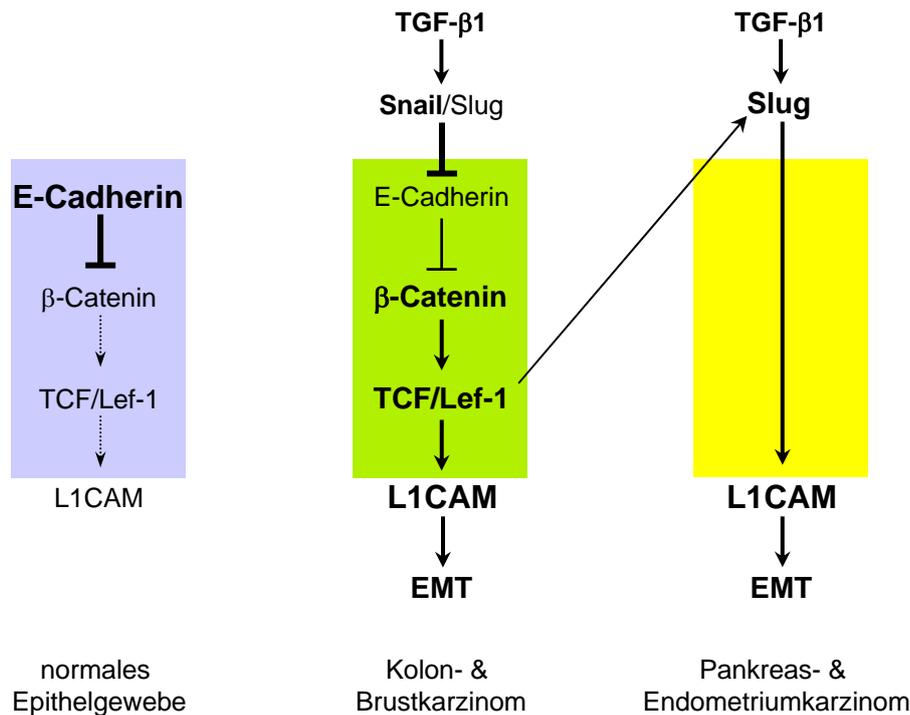


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Induktionswege von L1CAM in Karzinomzellen. In der normalen Epithelzelle wird die Induktion der L1CAM Expression durch die Bindung von β -Catenin an E-Cadherin weitestgehend unterdrückt (blau hinterlegt). Im Gegensatz dazu induziert TGF- β 1 während der EMT die Expression von L1CAM. Während dieses in Kolon- und Brustkarzinomzellen indirekt über die Reduktion der E-Cadherin Expression mit einhergehender Aktivierung des β -Catenin/TCF/Lef-1 Signalweges stattfindet (grün hinterlegt), wird die L1CAM Expression in PDAC und Endometriumkarzinomen direkt durch Slug induziert (gelb hinterlegt).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die L1CAM Expression in HPDE Zellen durch TGF- β 1 induziert werden kann. Die Bindung von TGF- β 1 an seinen Rezeptor führt zu einer Aktivierung von JNK, die ihrerseits den Transkriptionsfaktor Slug hoch reguliert. Daraufhin bindet Slug an den L1CAM Promotor, was zu einer Steigerung der Transkription von L1CAM und damit zu dessen vermehrter Expression führt.

4.5 Die Rolle von L1CAM in Migration und Chemoresistenz

Die Aktivierung von EMT Prozessen wird in vielen Studien als kritischer Mechanismus für das Einsetzen maligner Eigenschaften in epithelialen Krebszellen gesehen. Die dabei entstehenden Zellen mesenchymalen Phänotyps werden oft an der invasiven Front der Primärtumore gefunden. Es wird davon ausgegangen, dass diese Zellen in der Lage sind, Metastasen auszubilden und die Therapierbarkeit zu beeinflussen [36, 170].

In Kolonkarzinomschnitten wurde beobachtet, dass L1CAM ebenfalls überwiegend an der invasiven Front des Tumors zu detektieren ist [106, 103]. Dies führte zu der Vermutung, dass L1CAM an Migrations- und Invasionsprozessen des Tumors beteiligt ist. Weiterführende *in vitro* Experimente mit L1CAM transfizierten Zellen zeigten, dass die Expression des Adhäsionsmoleküls zu einer verstärkten Motilität der Zellen auf EZM-Proteinen führt und die Zellen eine erhöhte Invasivität in Matrigel-Invasionsassays aufweisen [106, 112, 171]. Durch den Einsatz von inhibitorischen Antikörpern konnte im Mausmodell L1CAM blockiert und dadurch das Wachstum und die Ausbreitung der Tumorzellen reduziert werden [14, 120]. Ähnlich den blockierenden Antikörpern wirkte sich die Mutation zweier Aminosäuren im zytoplasmatischen Bereich von L1CAM aus: die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen verringerten sich auf ein ähnliches Niveau, wie es L1CAM negative Zellen aufwiesen.

Während die bisherigen Daten mit Karzinomzellen erhoben wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass bereits in humanen pankreatischen Epithelzellen L1CAM induziert werden kann und diese Induktion mit einer vermehrten Migrationsfähigkeit und Chemoresistenz der Zellen in Zusammenhang steht. Hierzu waren HPDE Zellen nach 2 wöchiger Co-Kultur oder 24 stündiger TGF- β 1 Stimulation entweder für Migrationsassays in Kollagen I beschichteten Transwells oder für Apoptoseassays unter Etoposid Behandlung verwendet worden.

In den Migrationsansätzen wurde eine vermehrte Migrationsfähigkeit der Zellen im Vergleich zu mono-kultivierten bzw. unstimulierten Zellen gezeigt (vergleiche 3.23). Auch in *in vivo* Experimenten wirkten sich die Interaktionen zwischen PMFs und HPDE Zellen bzw. die Expression von L1CAM fördernd auf die Tumorigenität und Migrationsfähigkeit der HPDE Zellen aus. Während es bei SCID Mäusen, die nur mit HPDE Zellen inokuliert wurden, in 2 von 8 Tieren zur Ausbildung von kleinen Primärtumoren kam, zeigten Tiere, die mit HPDE Zellen und Myofibroblasten in-

okuliert wurden, in 7 von 8 Tieren Primärtumore. Letztere waren deutlich größer als diejenigen der Tiere, die nur mit HPDE Zellen inokuliert worden waren. Des Weiteren wiesen 75 % der mit HPDE und PMFs inokulierten Tiere Lebermetastasen und 50 % Bauchhautmetastasen auf, die nicht in den Tieren zu detektieren waren, die nur mit HPDE Zellen inokuliert wurden. In Versuchen, in denen L1CAM transfizierte HPDE Zellen intrapankreatisch injiziert worden waren, wiesen 5 von 7 Tiere Primärtumore auf. Im Gegensatz dazu wiesen Tiere, die mit einem Kontroll-Plasmid transfizierten HPDE Zellen inokuliert worden waren, nur 1 von 7 Mäusen einen Primärtumor auf (unveröffentlichte Daten von S. Sebens).

In den Apoptoseassays zeigte sich, dass co-kultivierte bzw. TGF- β 1 stimulierte Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber Zytostatika induzierter Apoptose aufwiesen. Beide Prozesse scheinen in diesen Zellen von L1CAM abhängig zu sein, da mittels L1CAM spezifischer siRNA Transfektion sowohl die Migrationsfähigkeit als auch die Chemoresistenz der Zellen reduziert werden konnte. Darüber hinaus führte auch die Reduktion der Slug Expression zu einer verminderten Migration und Apoptoseresistenz der HPDE Zellen.

Ähnlich den erläuterten Ergebnissen wird auch in Pankreaskarzinomzellen der Prozess der Migration sowie der Chemoresistenz durch die Expression von L1CAM gefördert [139]. Darüber hinaus resultierte der Einsatz des TGF- β Inhibitors SB431542 oder des JNK Inhibitors SP600125 in den Pankreaskarzinomzelllinien Panc1 und Colo357 in einer ähnlich verminderten Migrationsrate, wodurch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse weiter unterstrichen werden [139]. Neben den Ergebnissen, die mit pankreatischen Zellen erzielt wurden, konnten Huszar et al. zeigen, dass TGF- β 1 auch in Endometriumkarzinomzellen eine erhöhte Invasivität der Zellen hervorruft [96].

Ebenso wurde in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 sowie in Ovarialkarzinomzellen durch die Behandlung der Zellen mit L1CAM siRNA eine erhöhte Chemosensitivität gegenüber einer Zytostatika induzierten Apoptose detektiert [113, 172]. In der PDAC Zelllinie PT45-P1res, die durch eine Langzeitbehandlung mit Etoposid einen chemoresistenten Phänotyp erworben hat, sowie in den PDAC Zelllinien Panc1 und Colo357 konnte die Chemoresistenz durch Blockade von L1CAM oder nach L1CAM siRNA Behandlung deutlich vermindert werden [100]. Diese Beobachtung konnte in neusten Versuchen in einem SCID-Maus-Modell untermauert werden. Colo357-tumortragende Tiere zeigten ein signifikant vermindertes Tumorwachstum, wenn sie mit einer Kombination aus Zytostatikum und L1CAM blockierendem Antikörper

behandelt wurden im Vergleich zu Tieren, die einer Behandlung mit Chemotherapie und einem Kontrollantikörper unterzogen wurden (unveröffentlichte Daten S. Sebens).

Die Resistenz gegenüber Zytostatika wurde in unterschiedlichen Karzinomen mit der Dysregulation apoptotischer Signalwege in Verbindung gebracht. In diesem Zusammenhang wurde in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen eine verminderte Expression der Initiatorcaspasen-8 und -9 beobachtet. In ersten Versuchen konnte darüber hinaus eine Verbindung zwischen der erhöhten L1CAM Expression in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen und der reduzierten Procaspaseexpression gezeigt werden, da die siRNA vermittelte Reduktion der L1CAM Expression zu einer Erhöhung der Procaspaseexpression führte (siehe 3.28).

Während Loers et al. eine L1CAM vermittelte Neuroprotektion mit einer direkten Inhibition der Caspase-9 Aktivität über den PI3K-Akt Signalweg assoziieren konnte [173], scheint dies in HPDE Zellen auf Hypermethylierungen des Caspase-8 bzw. -9 Gens und/ oder von Caspase-regulierenden Genen zurückzuführen zu sein. So war zu beobachten, dass der Einsatz des Methylierungsinhibitors 5'-Azadesoxycytidin in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen zu einer Reexpression der Procaspasen führt. Ähnlich den gezeigten Ergebnissen wurden u.a. beim Mammakarzinom, Glioblastom und Leberzellkarzinom eine hypermethylierungsbedingte Reduktion der Caspase-8 Expression nachgewiesen [174, 175, 176].

In Mammakarzinomzellen konnte die verringerte Caspase-8 Expression auf die Methylierung von CpG Inseln innerhalb des Caspase-8 Promotors und Gens zurückgeführt werden. Weiterhin konnte der Methylierungsstatus des Caspase-8 Gens durch den Einsatz von 5'-Azadesoxycytidin umgekehrt werden [174]. Auch in anderen Tumorentitäten wie Neuroblastome, Medulloblastome oder Lungenkarzinome wurde durch die Gabe von 5'-Azadesoxycytidin eine Demethylierung der regulatorischen Sequenz des Caspase-8 Gens erzielt [125, 177].

Die Methylierungen der DNA werden durch DNA Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert, deren signifikant erhöhte Expression in unterschiedlichen Tumoren, wie Endometrium-, Brust-, Kolon- oder Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden konnte [128, 178]. In Co-Kulturen von PMFs mit HPDE Zellen oder T3M4 PDAC-Zellen wurden, ähnlich zu den gezeigten Ergebnissen, reduzierte Expressionen der Initiatorcaspasen-8 und -9 beobachtet. Dies konnte mit einer erhöhten DNMT1 Expression in Verbindung gebracht werden. Weiterführende Versuche zeigten, dass eine reduzierte Caspaseexpression nicht nur aus der direkten Hypermethylierung des

Caspasegens resultiert, sondern auch auf eine epigenetisch vermittelte Reduktion der STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription Protein 1*) Expression zurückgeführt werden können [128]. In Analysen des Caspase-8 Promotors wurde eine STAT1 Bindungsstelle identifiziert [177, 179], so dass sich hypermethylierungsbedingte Reduktionen der STAT1 Expression auch auf die Expression der Caspase-8 auswirken könnten.

Die Untersuchung der genauen molekularen Mechanismen hinsichtlich der verringerten Expression der Initiatorcaspasen-8 und -9 in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen stellt ein aktuelles Forschungsziel dar. Dabei sollen potentielle Mechanismen untersucht werden, in denen L1CAM zur verringerten Chemosensitivität der Zellen beiträgt. Es soll weiterhin analysiert werden, ob L1CAM möglicherweise mit den beobachteten methylierungsbedingten Veränderungen der Caspasen assoziiert werden kann. Beispielsweise könnte L1CAM die Expression von DNMT1 beeinflussen, wodurch einerseits die Caspaseexpression direkt durch Hypermethylierung des Caspasegens reduziert werden könnte. Andererseits könnte eine hypermethylierungsbedingte Reduktion der STAT1 Expression zur verringerten Caspaseexpression beitragen.

Des Weiteren wurden Interaktionen zwischen L1CAM und unterschiedlichen Liganden, wie z.B. zwischen L1CAM und Neuropilin-1 oder L1CAM und α 5-Integrin identifiziert [116, 117], die für die methylierungsbedingte Chemoresistenz notwendig sein könnten. So konnte in PDAC Zellen eine gesteigerte Expression von Neuropilin-1 mit einer verminderten Chemosensitivität in Verbindung gebracht werden [115]. Ebenso wurde die Bindung von L1CAM an α 5-Integrin mit einer erhöhten Chemoresistenz assoziiert [117]. Die Ergebnisse beider Studien deuten darauf hin, dass die L1CAM vermittelte Chemoresistenz der Bindung an einen Liganden wie Neuropilin-1 oder α 5-Integrin bedarf. Es bleibt zu klären ob die Signalkaskade, die zur Induktion der Chemoresistenz führt von L1CAM, den Liganden oder beiden ausgeht.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass pankreatische Epithelzellen bereits vor dem Auftreten erster genetischer Veränderungen durch das umgebende Stroma, wie es z.B. in chronischen Pankreatitiden vorliegt, dahingehend beeinflusst werden, dass sie Veränderungen, die mit der EMT assoziiert werden können, durchlaufen. Durch die Epithel-Stroma-Interaktionen kommt es zur zunehmenden Freisetzung von TGF- β 1, was sich fördernd auf die Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM in den Epithelzellen auswirkt. Untersuchungen des vorliegenden Signalweges zeigten eine Beteiligung von JNK und dem Transkriptionsfaktor Slug an der TGF- β 1 abhängigen L1CAM Expression in HPDE Zellen.

In dieser Arbeit konnte weiterhin im Rahmen von *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass L1CAM für eine vermehrte Migrationsfähigkeit sowie für eine verringerte Chemosensitivität dieser Vorläuferzellen verantwortlich ist und bietet somit eine Erklärung für die frühe Progression dieser Tumorerkrankung.

In Grafik 4.2 werden die gezeigten Ergebnisse noch einmal in einer schematischen Darstellung zusammengefasst.

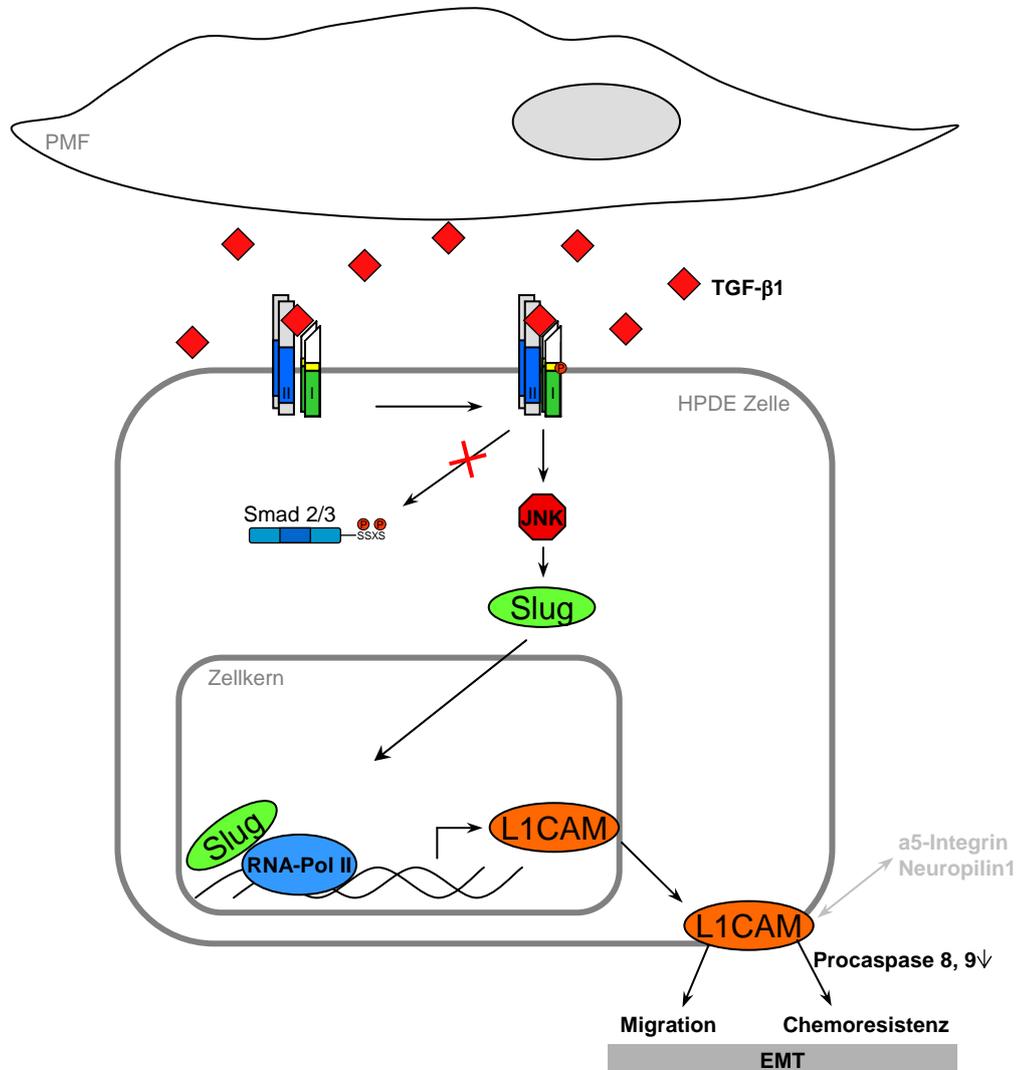


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Signalwegs der TGF- β vermittelten L1CAM Induktion und dessen zelluläre Auswirkungen in HPDE Zellen. Von PMFs und HPDE Zellen freigesetztes TGF- β 1 bindet an TGF- β Rezeptoren auf den HPDE Zellen. Es kommt zur Aktivierung von JNK, was sich fördernd auf die Expression des Transkriptionsfaktors Slug auswirkt. Mit Slug wird auch die RNA Polymerase II an den L1CAM Promotor rekrutiert, so dass es zur Transkription des Adhäsionsmoleküls L1CAM kommt. Die vermehrte L1CAM Expression an der Zelloberfläche führt zu EMT assoziierten Prozessen, wie einem erhöhten Migrationspotential und erhöhter Chemoresistenz.

Kapitel 5

5.1 Zusammenfassung

Das Pankreasadenokarzinom (PDAC) stellt mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 2 % noch immer einen schlecht therapierbaren Tumor dar. Ursächlich sind hierfür sowohl eine Diagnosestellung im fortgeschrittenen Krankheitsstadium mit einhergehender Metastasierung als auch eine ausgeprägte Chemoresistenz zu nennen. Das pankreatische Gangepithel wird als Ursprung für die Tumorigenese gesehen, welche durch Interaktionen mit dem aus vornehmlich Myofibroblasten (PMF) bestehenden Tumorstroma entscheidend gefördert wird. Einer der epidemiologisch gesicherten Risikofaktoren für die Entstehung eines PDACs stellt die chronische Pankreatitis dar, welche wie das PDAC durch eine ausgeprägte Desmoplasie charakterisiert ist.

Das Adhäsionsmolekül L1CAM wurde in verschiedenen Tumorentitäten, so auch im PDAC detektiert. Seine vermehrte Expression konnte in unterschiedlichen Studien mit einem chemoresistenten Phänotyp der Tumorzellen assoziiert werden.

Da die Mechanismen, über die es zur Hochregulation von L1CAM in tumorösem Gewebe kommt, wenig verstanden sind, war es Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob PMFs bereits in pankreatischen Gangzellen zu einer erhöhten Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM führen und ob diese die maligne Transformation der Epithelzellen fördert.

Während mittels immunhistochemischer Färbungen in normalem Pankreasgewebe L1CAM nur in neuronalen Strukturen nachgewiesen werden konnte, konnte in chronischen Pankreatitiden L1CAM auch in Gangstrukturen detektiert werden.

In einem *in vitro* Co-Kulturmodell wurden immortalisierte humane pankreatische Gangepithelzellen (HPDE) mit PMFs über mehrere Wochen co-kultiviert. Dabei wurde eine erhöhte, TGF- β 1 abhängige L1CAM Expression in den Epithelzellen nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse wurden durch TGF- β 1 Stimulation der monokultivierten HPDE Zellen erzielt. Sowohl die TGF- β 1 abhängige als auch die durch PMF induzierte L1CAM Expression war unabhängig von der Aktivierung von Smad-Proteinen, jedoch abhängig von der Aktivierung der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) c-Jun N-terminalen Kinase (JNK). Über die Aktivierung von JNK kam es zur Induktion des Transkriptionsfaktors Slug, der seinerseits über die Bindung an zwei Bindungsstellen an den L1CAM Promotor zur Induktion der L1CAM Expression führte.

Funktionell konnte die erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM in co-kultivierten und TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen mit einer erhöhten Chemo-resistenz und Migrationsfähigkeit der Zellen assoziiert werden. Einhergehend mit den funktionellen Veränderungen der co-kultivierten bzw. TGF- β 1 stimulierten Zellen wurden erhöhte Expressionen mesenchymaler Markerproteine (Vimentin, N-Cadherin) sowie ein fibroblastoider Phänotyp festgestellt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Präsenz der PMFs bzw. die Stimulation mit TGF- β 1 in HPDE Zellen zur Epithelialen Mesenchymalen Transition (EMT) führt, was mit einer Hochregulation von L1CAM verbunden ist.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit untermauern die Theorie, dass PMFs sowie TGF- β 1 bereits in duktalem Epithelzellen zur malignen Transformation entscheidend beitragen. Sie bieten darüber hinaus einen molekularen Mechanismus, in dem L1CAM eine wesentliche Rolle in der frühen und schnellen Tumorprogression des PDACs einnimmt.

5.2 Summary

The highly malignant pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is characterised by an early metastasis and a pronounced chemoresistance. Tumorigenesis of PDAC is supposed to originate from ductal epithelial cells and is crucially driven by pancreatic myofibroblasts (PMFs), the main compartment of fibrosis in chronic pancreatitis and the tumoral stroma in PDAC.

In previous studies it was shown that PMFs essentially contribute to chemoresistance in PDAC cells and that the adhesion molecule L1CAM (CD171), which is highly expressed in PDAC, contributes to the chemoresistant phenotype of PDAC cells. Based on these findings the present thesis aimed to investigate the influence of PMFs on malignant transformation of pancreatic ductal epithelial cells as well as the role of L1CAM in this process.

In order to elucidate whether L1CAM expression is already induced in ductal epithelium in premalignant stages, immunohistochemical stainings of L1CAM were performed with tissues of chronic pancreatitis. Whereas in ductal structures of normal pancreatic tissues no L1CAM expression could be detected, ductal structures surrounded by dense fibrotic tissue in chronic pancreatitis exhibited distinct L1CAM expression.

In line with these findings co-culture with PMFs led to a TGF- β 1 dependent upregulation of L1CAM expression in the immortalised human pancreatic ductal epithelial cell line HPDE being accompanied by an increased expression of mesenchymal marker proteins such as vimentin and N-cadherin, a spindle-like cell morphology as well as a migratory and chemoresistant phenotype. Accordingly, these alterations which are hallmarks of the epithelial-mesenchymal-transition (EMT) could be observed in HPDE cells after stimulation with exogenous TGF β 1. Induction of L1CAM expression by PMFs or TGF- β 1 was independent of Smad proteins but dependent on the activation of JNK and the JNK-dependent induction of the transcription factor Slug. Thus, knock down of either L1CAM or Slug abrogated the migratory and chemoresistant phenotype of HPDE cells cultured in the presence of PMFs or TGF- β 1. Furthermore, it could be shown that slug induces L1CAM expression by direct binding to the L1CAM promoter thereby activating L1CAM expression.

In summary, these data provide new evidence how an activated microenvironment promote the malignant transformation of ductal epithelial cells and offer a mechani-

stic explanation for the development and rapid tumor progression of PDAC in which the adhesion molecule L1CAM seems to play an essential role.

Anhang A

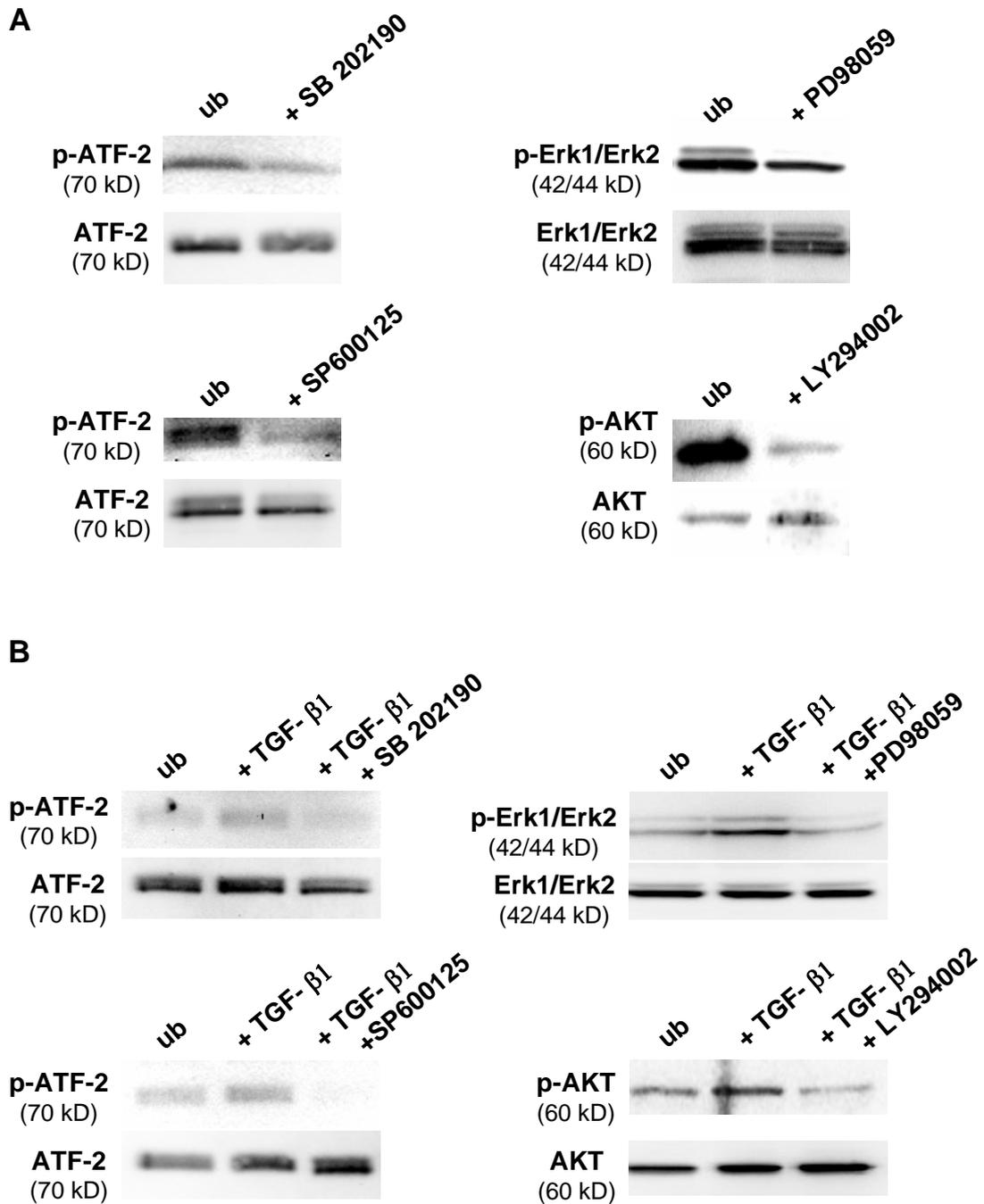


Abbildung A.1: Nachweis der Funktionsfähigkeit der Kinase-Inhibitoren. HPDE Zellen, die für 2 Wochen in Gegenwart von PMFs co-kultiviert (A) oder über 30 min mit 10 ng/ml TGF- β 1 (B) stimuliert worden waren, wurden mit den Inhibitoren PD98059, SP600125, SB202190, LY294002 in einer Konzentration von je 25 μ mol/l inkubiert. Im Fall der co-kultivierten Zellen erfolgte die Gabe der Inhibitoren 24 Stunden vor der Aufarbeitung, während die TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen 30 min vor der TGF- β 1 Stimulation mit den Inhibitoren behandelt wurden. Dargestellt sind die Westernblotanalysen gegen die phosphorylierte- sowie Gesamt-Form von ATF, Erk1/2, Akt, wobei die Gesamt-Formen als Ladekontrolle verwendet wurden.

Anhang B

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
Akt	Proteinkinase B
ALK	<i>Activin Receptor Like Kinase</i>
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
5-Aza	5-Azadesoxycytidin
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
ChIP Assay	Chromatin-Immunpräzipitationsassay
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTP	Cytidintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNMT	DNA Methyltransferasen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
EMT	Epitheliale Mesenchymale Transition

ERK	Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
Fn	Fibronektin
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HGF	Hämatopoetische Wachstumsfaktoren (<i>Hepatocyte Growth Factor</i>)
HPDE	Humane pankreatische duktales Epithelzelllinie
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
Ig-Domäne	Immunglobulin-ähnliche Domäne
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
JNK	c-Jun N-terminale Proteinkinase
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KDa	Kilodalton
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
min	Minute
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
mA	Milliampere
ml	Milliliter
M	Mol
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD _{500nm}	optische Dichte bei 500 nm

PAA	Polyacrylamid
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasien
PDAC	duktales Pankreasadenokarzinom
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PMF	Pankreasmyofibroblast
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuklease
RPMI	Medium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S.A.	Standartabweichung
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
α -SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription Protein 1</i>
Std.	Stunde
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBP	<i>TATA-Box Binding Protein</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β 1	<i>Transforming Growth Factor β1</i>
TTP	Thymidintriphosphat
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der EMT	6
1.2	Schematische Darstellung der TGF- β Signalwege	11
1.3	Schematische Darstellung des L1CAM Gens.	15
1.4	Schematische Darstellung des Adhäsionsmoleküls L1CAM.	16
3.1	Immunhistochemischer Nachweis der L1CAM Expression in chronischen Pankreatitiden.	57
3.2	Co-Kultur mit PMFs induziert L1CAM Expression in HPDE Zellen.	58
3.3	Co-Kultur mit PMFs verändert die Morphologie der HPDE Zellen.	59
3.4	Die Co-Kultur mit PMFs erhöht die Expression mesenchymaler Markerproteine in HPDE Zellen.	59
3.5	Die TGF- β 1 Konzentration ist in Medienüberständen von HPDE Co-Kulturen mit PMFs erhöht.	60
3.6	Inhibition des TGF- β Rezeptor Typ I vermindert L1CAM Expression in co-kultivierten HPDE Zellen.	61
3.7	TGF- β 1 Stimulation induzierte Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM in HPDE Zellen.	62
3.8	Die Stimulation mit TGF- β 1 führt zu morphologischen Veränderungen der HPDE Zellen.	63
3.9	TGF- β 1 induziert die Expression mesenchymaler Markerproteine in HPDE Zellen.	64

3.10	TGF- β 1 abhängige L1CAM Expression ist Smad unabhängig.	66
3.11	L1CAM Expression in co-kultivierten bzw. TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen ist JNK abhängig	67
3.12	Die TGF- β 1 abhängige L1CAM Expression ist JNK abhängig.	68
3.13	Das L1CAM Primärtranskript in HPDE Zellen enthält das Exon 1.	69
3.14	Schematische Darstellung des L1CAM Promotors	70
3.15	Slug ist in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen vermehrt exprimiert.	71
3.16	Slug siRNA Transfektion verhindert die L1CAM Expression in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen.	72
3.17	Transfektion mit rekombinantem Slug erhöht die L1CAM Expression.	73
3.18	Die Induktion der Slug Expression in co-kultivierten bzw. TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen ist JNK abhängig.	74
3.19	Slug bindet an den L1CAM Promotor.	75
3.20	Slug bindet an den L1CAM Promotor in TGF- β 1 stimulierten HPDE Zellen.	76
3.21	Slug bindet an den L1CAM Promotor.	77
3.22	Der L1CAM Promotor wird durch Slug aktiviert.	79
3.23	L1CAM erhöht die Migrationsfähigkeit von HPDE Zellen in Co-Kultur mit PMFs sowie nach TGF- β 1 Stimulation.	81
3.24	Slug erhöht die Migrationsfähigkeit der HPDE Zellen in Co-Kultur mit PMFs sowie nach TGF- β 1 Stimulation.	82
3.25	Co-Kultivierung mit PMFs oder TGF- β 1 Stimulation führen zu einer verminderten Chemosensitivität in HPDE Zellen.	83
3.26	Co-Kultivierung mit PMFs oder TGF- β 1 Stimulation führen zu einer L1CAM bzw. Slug abhängigen Chemoresistenz in HPDE Zellen.	84
3.27	TGF- β 1 Stimulation reduziert die Expression der Procaspasen in HPDE Zellen.	86

3.28 TGF- β 1 Stimulation führt zu einer L1CAM abhängigen Expression
der Procaspasen-8/ -9 in HPDE Zellen. 87

3.29 Die Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azadesoxycytidin
erhöht die Expression der Initiatorcaspasen in TGF- β 1 stimulierten
HPDE Zellen. 88

4.1 Schematische Darstellung der Induktionswege von L1CAM in Karzi-
nomzellen. 100

4.2 Schematische Darstellung des Signalwegs der TGF- β vermittelten
L1CAM Induktion und dessen zelluläre Auswirkungen in HPDE Zellen. 106

A.1 Nachweis der Funktionsfähigkeit der Kinase-Inhibitoren. 113

Literaturverzeichnis

- [1] Husmann, G., P. Kaatsch, A. Katalinic, J. Bertz, J. Haberland, K. Kraywinkel und U. Wolf (2010).
Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends; 7. Ausgabe.
Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin.
- [2] Maitra, A. and R. H. Hruban (2008).
Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 3, 157-188.
- [3] Li, D., K. Xie, R. Wolff and J. L. Abbruzzese (2004).
Pancreatic cancer. *Lancet* 363, 1049-1057.
- [4] Farrow, B. and B.M. Evers (2002).
Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 10, 153-169.
- [5] Everhart, J. and D. Wright (1995).
Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* 273, 1605-1609.
- [6] Lüttges J. and G. Klöppel (2001).
Update on the pathology and genetics of exocrine pancreatic tumors with ductal phenotype: precursor lesions and new tumor entities. *Dig Dis.* 19, 15-23.
- [7] Schneider, G. and R. M. Schmid (2003).
Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2, 15.
- [8] Wang, W., J. L. Abbruzzese, D. B. Evans, L. Larry, K. R. Cleary and P. J. Chiao (1999).
The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 5, 119-127.

- [9] Mürköster, S., A. Arlt, B. Sipos, M. Witt, M. Grossmann, G. Kloppel, H. Kalthoff, U. R. Fölsch and H. Schäfer (2005).
Increased expression of the E3-ubiquitin ligase receptor subunit betaTRCP1 relates to constitutive nuclear factor-kappaB activation and chemoresistance in pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 65, 1316-1324.
- [10] Arlt, A., J. Vorndamm, M. Breitenbroich, U. R. Fölsch, H. Kalthoff, W. E. Schmidt and H. Schäfer (2001).
Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* 20, 859-868.
- [11] Schneider, G., J. T. Siveke, F. Eckel and R. M. Schmid (2005).
Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* 128, 1606-1625.
- [12] Seymour, A. B., R. H. Hruban, M. Redston, C. Caldas, S. M. Powell, K. W. Kinzler, C. J. Yeo and S. E. Kern (1994).
Allelotype of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 54, 2761-2764.
- [13] Ryu, B., J. Jones, M. A. Hollingsworth, R. H. Hruban and S. E. Kern (2001).
Invasionspecific genes in malignancy: serial analysis of gene expression comparisons of primary and passaged cancers. *Cancer Res* 61, 1833-8.
- [14] Arlt, M. J., I. Novak-Hofer, D. Gast, V. Gschwend, G. Moldenhauer, J. Grunberg, M. Honer, P. A. Schubiger, P. Altevogt and A. Kruger (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, 936-943.
- [15] Miyamoto, H., T. Murakami, K. Tsuchida, H. Sugino, H. Miyake and S. Tashiro (2004).
Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas* 28, 38-44.
- [16] Hwang, R. F., T. Moore, T. Arumugam, V. Ramachandran, K. D. Amos, A. Rivera, B. Ji, D. B. Evans and C. D. Logsdon (2008).
Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 68, 918-926.
- [17] Hartel, M., F. F. Di Mola, A. Gardini, A. Zimmermann, P. Di Sebastiano, A. Guweidhi, P. Innocenti, T. Giese, N. Giese, M. W. Buchler and H. Friess (2004).

- Desmoplastic reaction influences pancreatic cancer growth behavior. *World J Surg* 28, 818-825.
- [18] Mürköster, S., K. Wegehenkel, A. Arlt, M. Witt, B. Sipos, M. L. Kruse, T. Sebens, G. Kloppel, H. Kalthoff, U. R. Fölsch and H. Schäfer (2004).
Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res* 64, 1331-1337.
- [19] Sebens, S., A. Arlt and H. Schäfer (2008).
NF-kappaB as a molecular target in the therapy of pancreatic carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 177, 151-164.
- [20] Sebens Mürköster, S., J. Lust, A. Arlt, R. Hasler, M. Witt, T. Sebens, S. Schreiber, U. R. Fölsch and H. Schäfer (2006).
Acquired chemoresistance in pancreatic carcinoma cells: induced secretion of IL-1beta and NO lead to inactivation of caspases. *Oncogene* 25, 3973-3981.
- [21] Thiery, J. P. (2002).
Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.
- [22] Bindels, S., M. Mestdagt, C. Vandewalle, N. Jacobs, L. Volders, A. Noel, F. Van Roy, G. Berx, J. M. Foidart and C. Gilles (2006).
Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* 25, 4975-4985.
- [23] Natalwala, A., R. Spychal and C. Tselepis (2008).
Epithelial-mesenchymal transition mediated tumourigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 14, 3792-3797.
- [24] Peinado, H., F. Portillo and A. Cano (2004).
Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48, 365-375.
- [25] Nawshad, A., D. Lagamba, A. Polad and E. D. Hay (2005).
Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs* 179, 11-23.

- [26] Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006).
Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142.
- [27] Greenburg, G. and E. D. Hay (1982).
Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95, 333-339.
- [28] Moustakas, A. and C. H. Heldin (2007).
Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 98, 1512-1520.
- [29] Thiery, J. P. (2003).
Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15, 740-746.
- [30] Miyazono, K. (2009).
Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 314-323.
- [31] Arumugam, T., V. Ramachandran, K. F. Fournier, H. Wang, L. Marquis, J. L. Abbruzzese, G. E. Gallick, C. D. Logsdon, D. J. Mcconkey and W. Choi (2009).
Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* 69, 5820-5828.
- [32] Savagner, P. (2001).
Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23, 912-923.
- [33] Shintani, Y., Y. Fukumoto, N. Chaika, R. Svoboda, M. J. Wheelock and K. R. Johnson (2008).
Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *J Cell Biol* 180, 1277-1289.
- [34] Iwano, M., D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada and E. G. Neilson (2002).
Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110, 341-350.
- [35] Farahani, R. M. (2006).
Epithelial-mesenchymal transition: a potential therapeutic goal for prevention of wound fibrosis? *J Burns Wounds* 5, e9.

- [36] Polyak, K. and R. A. Weinberg (2009).
Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9, 265-273.
- [37] Huber, M. A., N. Kraut and H. Beug (2005).
Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17, 548-558.
- [38] Hotz, B., M. Arndt, S. Dullat, S. Bhargava, H. J. Buhr and H. G. Hotz (2007).
Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 13, 4769-4776.
- [39] Kim, K., Z. Lu and E. Hay (2002).
Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int* 26, 463-476.
- [40] Kudo-Saito, C., H. Shirako, T. Takeuchi and Y. Kawakami (2009).
Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 15, 195-206.
- [41] Joo, Y. E., J. S. Rew, C. S. Park and S. J. Kim (2002).
Expression of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 2, 129-137.
- [42] Burstin von, J., S. Eser, M. C. Paul, B. Seidler, M. Brandl, M. Messer, A. Von Werder, A. Schmidt, J. Mages, P. Pagel, A. Schnieke, R. M. Schmid, G. Schneider and D. Saur (2009).
E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology* 137, 361-371, 371 e361-365.
- [43] Schaeffer, D. F., K. Assi, K. Chan, A. K. Buczkowski, S. W. Chung, C. H. Scudamore, A. Weiss, B. Salh and D. A. Owen (2010).
Tumor expression of integrin-linked kinase (ILK) correlates with the expression of the E-cadherin repressor snail: an immunohistochemical study in ductal pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch* 456, 261-268.
- [44] Ellenrieder, V., S. F. Hendler, W. Boeck, T. Seufferlein, A. Menke, C. Ruhland, G. Adler and T. M. Gress (2001).
Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal

- transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 61, 4222-4228.
- [45] Song, Y., M. K. Washington and H. C. Crawford (2010).
Loss of FOXA1/2 is essential for the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Cancer Res* 70, 2115-2125.
- [46] Zhao, S., K. Venkatasubbarao, J. W. Lazor, J. Sperry, C. Jin, L. Cao and J. W. Freeman (2008).
Inhibition of STAT3 Tyr705 phosphorylation by Smad4 suppresses transforming growth factor beta-mediated invasion and metastasis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 68, 4221-4228.
- [47] Giehl, K., Y. Imamichi and A. Menke (2007).
Smad4-independent TGF-beta signaling in tumor cell migration. *Cells Tissues Organs* 185, 123-130.
- [48] Shi, Y. and J. Massague (2003).
Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- [49] Sanchez-Capelo, A. (2005).
Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 15-34.
- [50] Schmierer, B. and C. S. Hill (2005).
Kinetic analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling reveals a mechanism for transforming growth factor beta-dependent nuclear accumulation of Smads. *Mol Cell Biol* 25, 9845-9858.
- [51] Pardali, K. and A. Moustakas (2007).
Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1775, 21-62.
- [52] Zhang, Y. E. (2009).
Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 19, 128-139.
- [53] Derynck, R., R. J. Akhurst and A. Balmain (2001).
TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29, 117-129.

- [54] Le Roy, C. and J. L. Wrana (2005).
Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 112-126.
- [55] Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003).
Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584.
- [56] Mulder, K. M. (2000).
Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 23-35.
- [57] Yamaguchi, K., K. Shirakabe, H. Shibuya, K. Irie, I. Oishi, N. Ueno, T. Taniguchi, E. Nishida and K. Matsumoto (1995).
Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270, 2008-2011.
- [58] Hocevar, B. A., T. L. Brown and P. H. Howe (1999).
TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 18, 1345-1356.
- [59] Moustakas, A. and C. H. Heldin (2005).
Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118, 3573-3584.
- [60] Pardali, K., M. Kowanz, C. H. Heldin and A. Moustakas (2005).
Smad pathway-specific transcriptional regulation of the cell cycle inhibitor p21(WAF1/Cip1). *J Cell Physiol* 204, 260-272.
- [61] Buck, A., V. Ellenrieder (2006).
Recent advances in TGF-b regulated transcription during carcinogenesis. *Signal Transduction* 6, 345-354.
- [62] Seoane, J. (2006).
Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 27, 2148-2156.
- [63] Siegel, P. M., W. Shu, R. D. Cardiff, W. J. Muller and J. Massague (2003).
Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8430-8435.

- [64] Vincent, F., M. Nagashima, S. Takenoshita, M. A. Khan, A. Gemma, K. Hagiwara and W. P. Bennett (1997).
Mutation analysis of the transforming growth factor-beta type II receptor in human cell lines resistant to growth inhibition by transforming growth factor-beta. *Oncogene* 15, 117-122.
- [65] Lucke, C. D., A. Philpott, J. C. Metcalfe, A. M. Thompson, L. Hughes-Davies, P. R. Kemp and R. Hesketh (2001).
Inhibiting mutations in the transforming growth factor beta type 2 receptor in recurrent human breast cancer. *Cancer Res* 61, 482-485.
- [66] Levy, L. and C. S. Hill (2006).
Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 41-58.
- [67] Kretzschmar, M., J. Doody, I. Timokhina and J. Massague (1999).
A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13, 804-816.
- [68] Ellenrieder, V., M. E. Fernandez Zapico and R. Urrutia (2001).
TGFbeta-mediated signaling and transcriptional regulation in pancreatic development and cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 17, 434-440.
- [69] Melisi, D., S. Ishiyama, G. M. Scabas, J. B. Fleming, Q. Xia, G. Tortora, J. L. Abbruzzese and P. J. Chiao (2008).
LY2109761, a novel transforming growth factor beta receptor type I and type II dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer Ther* 7, 829-840.
- [70] Kleeff, J., T. Ishiwata, H. Maruyama, H. Friess, P. Truong, M. W. Büchler, D. Falb and M. Korc (1999).
The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene* 18, 5363-5372.
- [71] Friess, H., Y. Yamanaka, M. Büchler, M. Ebert, H. G. Beger, L. I. Gold and M. Korc (1993).
Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 105, 1846-1856.
- [72] Bellone, G., A. Carbone, C. Smirne, T. Scirelli, A. Buffolino, A. Novarino, A. Stacchini, O. Bertetto, G. Palestro, C. Sorio, A. Scarpa, G. Emanuelli and U.

- Rodeck (2006).
Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *J Immunol* 177, 3448-3460.
- [73] Kallunki, P., G. M. Edelman and F. S. Jones (1997).
Tissue-specific expression of the L1 cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element. *J Cell Biol* 138, 1343-1354.
- [74] Pfeifer, M., U. Schirmer, C. Geismann, H. Schäfer, S. Sebens Muerköster and P. Altevogt (2010).
L1CAM expression in endometrial carcinomas is regulated by usage of two different promoter regions. submitted
- [75] Kohl, A., K. P. Giese, M. H. Mohajeri, D. Montag, M. Moos and M. Schachner (1992).
Analysis of promoter activity and 5' genomic structure of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurosci Res* 32, 167-177.
- [76] Moos, M., R. Tacke, H. Scherer, D. Teplow, K. Früh and M. Schachner (1988).
Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334, 701-703.
- [77] Weidle, U. H., D. Eggle and S. Klostermann (2009).
L1-CAM as a target for treatment of cancer with monoclonal antibodies. *Anti-cancer Res* 29, 4919-4931.
- [78] Hortsch, M. (1996).
The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 17, 587-593.
- [79] Schachner, M. (1997).
Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 9, 627-634.
- [80] Brummendorf, T., S. Kenwrick and F. G. Rathjen (1998).
Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr Opin Neurobiol* 8, 87-97.
- [81] Mechtersheimer, S., P. Gutwein, N. Agmon-Levin, A. Stoeck, M. Oleszewski, S. Riedle, R. Postina, F. Fahrenholz, M. Fogel, V. Lemmon and P. Altevogt (2001).

- Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 155, 661-673.
- [82] Jouet, M., A. Rosenthal and S. Kenwrick (1995).
Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells. *Brain Res Mol Brain Res* 30, 378-380.
- [83] Miura, M., M. Kobayashi, H. Asou and K. Uyemura (1991).
Molecular cloning of cDNA encoding the rat neural cell adhesion molecule L1. Two L1 isoforms in the cytoplasmic region are produced by differential splicing. *FEBS Lett* 289, 91-95.
- [84] Takeda, Y., H. Asou, Y. Murakami, M. Miura, M. Kobayashi and K. Uyemura (1996).
A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. *J Neurochem* 66, 2338-2349.
- [85] Raveh, S., N. Gavert and A. Ben-Ze'ev (2009).
L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors. *Cancer Lett* 282, 137-145.
- [86] Gutwein, P., S. Mechttersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, D. Gast, S. Joumaa, H. Zentgraf, M. Fogel and D. P. Altevogt (2003).
ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J* 17, 292-294.
- [87] Maretzky, T., M. Schulte, A. Ludwig, S. Rose-John, C. Blobel, D. Hartmann, P. Altevogt, P. Saftig and K. Reiss (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, 9040-9053.
- [88] Stoeck, A., S. Keller, S. Riedle, M. P. Sanderson, S. Runz, F. Le Naour, P. Gutwein, A. Ludwig, E. Rubinstein and P. Altevogt (2006).
A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 393, 609-618.
- [89] Nayeem, N., S. Silletti, X. Yang, V. P. Lemmon, R. A. Reisfeld, W. B. Stallcup and A. M. Montgomery (1999).
A potential role for the plasminogen system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J Cell Sci* 112, 4739-4749.

- [90] Sadoul, K., R. Sadoul, A. Faissner and M. Schachner (1988).
Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 50, 510-521.
- [91] Thelen, K., V. Kedar, A. K. Panicker, R. S. Schmid, B. R. Midkiff and P. F. Maness (2002).
The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J Neurosci* 22, 4918-4931.
- [92] Hall, H., V. Djonov, M. Ehrbar, M. Hoehli and J. A. Hubbell (2004).
Heterophilic interactions between cell adhesion molecule L1 and α v β 3-integrin induce HUVEC process extension in vitro and angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 7, 213-223.
- [93] Hall, H. and J. A. Hubbell (2004).
Matrix-bound sixth Ig-like domain of cell adhesion molecule L1 acts as an angiogenic factor by ligating α v β 3-integrin and activating VEGF-R2. *Microvasc Res* 68, 169-178.
- [94] Silletti, S., F. Mei, D. Sheppard and A. M. Montgomery (2000).
Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J Cell Biol* 149, 1485-1502.
- [95] Oleszewski, M., P. Gutwein, W. von der Lieth, U. Rauch and P. Altevogt (2000).
Characterization of the L1-neurocan-binding site. Implications for L1-L1 homophilic binding. *J Biol Chem* 275, 34478-34485.
- [96] Huszar, M., M. Pfeifer, U. Schirmer, H. Kiefel, G. E. Konecny, A. Ben-Arie, L. Edler, M. Munch, E. Müller-Holzner, S. Jerabek-Klestil, S. Abdel-Azim, C. Marth, A. G. Zeimet, P. Altevogt and M. Fogel (2010).
Up-regulation of L1CAM is linked to loss of hormone receptors and E-cadherin in aggressive subtypes of endometrial carcinomas. *J Pathol* 220, 551-561.
- [97] Maness, P. F. and M. Schachner (2007).
Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 10, 19-26.
- [98] Kenwrick, S., A. Watkins and E. De Angelis (2000).
Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet* 9, 879-886.

- [99] Vos, Y. J. and R. M. Hofstra (2010)
An updated and upgraded L1CAM mutation database. *Hum Mutat* 31, E1102-1109.
- [100] Sebens Mürköster, S., V. Werbing, B. Sipos, M. A. Debus, M. Witt, M. Grossmann, D. Leisner, J. Kötteritzsch, H. Kappes, G. Kloppel, P. Altevogt, U. R. Fölsch and H. Schäfer (2007).
Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Oncogene* 26, 2759-2768.
- [101] Kaifi, J. T., U. Reichelt, A. Quaas, P. G. Schurr, R. Wachowiak, E. F. Yekebas, T. Strate, C. Schneider, K. Pantel, M., G. Sauter and J. R. Izbicki (2007).
L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer. *Mod Pathol* 20, 1183-1190.
- [102] Fogel, M., P. Gutwein, S. Mechtersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, A. Smirnov, L. Edler, A. Ben-Arie, M. Huszar and P. Altevogt (2003).
L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362, 869-875.
- [103] Fogel, M., S. Mechtersheimer, M. Huszar, A. Smirnov, A. Abu-Dahi, W. Tilgen, J. Reichrath, T. Georg, P. Altevogt and P. Gutwein (2003).
L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett* 189, 237-247.
- [104] Thies, A., M. Schachner, I. Moll, J. Berger, H. J. Schulze, G. Brunner and U. Schumacher (2002).
Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* 38, 1708-1716.
- [105] Meli, M. L., F. Carrel, R. Waibel, H. Amstutz, N. Crompton, R. Jaussi, H. Moch, P. A. Schubiger and I. Novak-Hofer (1999).
Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer* 83, 401-408.
- [106] Gavert, N., M. Conacci-Sorrell, D. Gast, A. Schneider, P. Altevogt, T. Brabletz and A. Ben-Ze'ev (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, 633-642.

- [107] Boo, Y. J., J. M. Park, J. Kim, Y. S. Chae, B. W. Min, J. W. Um and H. Y. Moon (2007).
L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 14, 1703-1711.
- [108] Allory Y, Y. Matsuoka, C. Bazille, E. Christensen, P. Ronco and H. Debiec (2005).
The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 11, 1190-1197.
- [109] Lee, S. B., A. Schramme, K. Doberstein, R. Dummer, M. S. Abdel-Bakky, S. Keller, P. Altevogt, S. T. Oh, J. Reichrath, D. Oxmann, J. Pfeilschifter, D. Mihic-Probst and P. Gutwein (2010).
ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma. *J Invest Dermatol* 130, 763-773.
- [110] Gavert, N., M. Sheffer, S. Raveh, S. Spaderna, M. Shtutman, T. Brabletz, F. Barany, P. Paty, D. Notterman, E. Domany and A. Ben-Ze'ev (2007).
Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res* 67, 7703-7712.
- [111] Zecchini, S., M. Bianchi, N. Colombo, R. Fasani, G. Goisis, C. Casadio, G. Viale, J. Liu, M. Herlyn, A. K. Godwin, P. G. Nuciforo and U. Cavallaro (2008).
The differential role of L1 in ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelium. *Cancer Res* 68, 1110-1118.
- [112] Shtutman, M., E. Levina, P. Ohouo, M. Baig and I. B. Roninson (2006).
Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res* 66, 11370-11380.
- [113] Stoeck, A., D. Gast, M. P. Sanderson, Y. Issa, P. Gutwein and P. Altevogt (2007).
L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 104, 461-469.
- [114] Novak-Hofer, I., S. Cohrs, J. Grunberg, A. Friedli, M. C. Schlatter, M. Pfeifer, P. Altevogt and P. A. Schubiger (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.

- [115] Wey, J. S., M. J. Gray, F. Fan, A. Belcheva, M. F. Mccarty, O. Stoeltzing, R. Somcio, W. Liu, D. B. Evans, M. Klagsbrun, G. E. Gallick and L. M. Ellis (2005).
Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* 93, 233-241.
- [116] Stoeck, A., S. Schlich, Y. Issa, V. Gschwend, T. Wenger, I. Herr, A. Marme, S. Bourbie, P. Altevogt and P. Gutwein (2006).
L1 on ovarian carcinoma cells is a binding partner for Neuropilin-1 on mesothelial cells. *Cancer Lett* 239, 212-226.
- [117] Sebens Mürköster, S., J. Kötteritzsch, C. Geismann, D. Gast, M. L. Kruse, P. Altevogt, U. R. Fölsch and H. Schäfer (2009).
alpha5-integrin is crucial for L1CAM-mediated chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Oncol* 34, 243-253.
- [118] Schaefer, A. W., H. Kamiguchi, E. V. Wong, C. M. Beach, G. Landreth and V. Lemmon (1999).
Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J Biol Chem* 274, 37965-37973.
- [119] Silletti, S., M. Yebra, B. Perez, V. Cirulli, M. McMahon and A. M. Montgomery (2004).
Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. *J Biol Chem* 279, 28880-28888.
- [120] Gast, D., S. Riedle, Y. Issa, M. Pfeifer, P. Beckhove, M. P. Sanderson, M. Arlt, G. Moldenhauer, M. Fogel, A. Kruger and P. Altevogt (2008).
The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies. *Oncogene* 27, 1281-1289.
- [121] Herron, L. R., M. Hill, F. Davey and F. J. Gunn-Moore (2009).
The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules. *Biochem J* 419, 519-531.
- [122] Furukawa, T., W. P. Duguid, L. Rosenberg, J. Viallet, D. A. Galloway and M. S. Tsao (1996).
Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16. *Am J Pathol* 148, 1763-1770.

- [123] Ouyang, H., L. Mou, C. Luk, N. Liu, J. Karaskova, J. Squire and M. S. Tsao (2000).
Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. *Am J Pathol* 157, 1623-1631.
- [124] Bergmann, F., F. Wandschneider, B. Sipos, G. Moldenhauer, B. Schniewind, T. Welsch, P. Schirmacher, G. Klöppel, P. Altevogt, H. Schäfer and S. Sebens Mürköster (2010)
Elevated L1CAM Expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma. submitted
- [125] Fulda, S., M. U. Kufer, E. Meyer, F. Van Valen, B. Dockhorn-Dworniczak and K. M. Debatin (2001). Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20, 5865-5877.
- [126] Soung, Y. H., J. W. Lee, S. Y. Kim, J. Jang, Y. G. Park, W. S. Park, S. W. Nam, J. Y. Lee, N. J. Yoo and S. H. Lee (2005).
CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res* 65, 815-821.
- [127] Cursi, S., A. Rufini, V. Stagni, I. Condo, V. Matafora, A. Bachi, A. P. Bonifazi, L. Coppola, G. Superti-Furga, R. Testi and D. Barila (2006).
Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *EMBO J* 25, 1895-1905.
- [128] Sebens Mürköster, S., V. Werbing, D. Koch, B. Sipos, O. Ammerpohl, H. Kalthoff, M. S. Tsao, U. R. Fölsch and H. Schäfer (2008).
Role of myofibroblasts in innate chemoresistance of pancreatic carcinoma—epigenetic downregulation of caspases. *Int J Cancer* 123, 1751-1760.
- [129] Ranganathan P., H.C. Harsha and A. Pandey (2009).
Molecular alterations in exocrine neoplasms of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med* 133, 405-412.
- [130] Löhr, M., C. Schmidt, J. Ringel, M. Kluth, P. Müller, H. Nize and R. Jesnowski (2001).
Transforming growth factor- β 1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 61, 550-555.

- [131] Mahadevan, D. and D.D. von Hoff (2007)
Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 6, 1186-1197.
- [132] Apte M., R. Pirola and J. Wilson (2009).
New insights into alcoholic pancreatitis and pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 24, S51-S56.
- [133] Gress, T.M., A. Menke, M. Bachem, F. Müller-Pillasch, V. Ellenrieder, H. Weidenbach, M. Wagner and G. Adler (1998).
Role of extracellular matrix in pancreatic diseases. *Digestion* 59, 625-637.
- [134] Friess, H., Y. Yamanaka, M. Buchler, H. G. Berger, M. S. Kobrin, R. L. Baldwin and M. Korc (1993).
Enhanced expression of the type II transforming growth factor beta receptor in human pancreatic cancer cells without alteration of type III receptor expression. *Cancer Res* 53, 2704-2707.
- [135] Satoh, K., T. Shimosegawa, M. Hirota, M. Koizumi and T. Toyota (1998).
Expression of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) and its receptors in pancreatic duct cell carcinoma and in chronic pancreatitis. *Pancreas* 16, 468-474.
- [136] Gaspar, N. J., L. Li, A. M. Kapoun, S. Medicherla, M. Reddy, G. Li, G. O'young, D. Quon, M. Henson, D. L. Damm, G. T. Muiru, A. Murphy, L. S. Higgins, S. Chakravarty and D. H. Wong (2007).
Inhibition of transforming growth factor beta signaling reduces pancreatic adenocarcinoma growth and invasiveness. *Mol Pharmacol* 72, 152-161.
- [137] Yingling, J. M., K. L. Blanchard and J. S. Sawyer (2004).
Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 3, 1011-1022.
- [138] Chen, W. B., W. Lenschow, K. Tiede, J. W. Fischer, H. Kalthoff and H. Ungefroren (2002).
Smad4/DPC4-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells. *J Biol Chem* 277, 36118-36128.
- [139] Geismann, C., M. Morscheck, D. Koch, F. Bergmann, H. Ungefroren, A. Arlt, M. S. Tsao, M. G. Bachem, P. Altevogt, B. Sipos, U. R. Fölsch, H. Schäfer and

- S. Sebens Mürköster (2009).
Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer. *Cancer Res* 69, 4517-4526.
- [140] Issa, Y., D. Nummer, T. Seibel, S. Sebens Mürköster, M. Koch, F. H. Schmitz-Winnenthal, L. Galindo, J. Weitz, P. Beckhove and P. Altevogt (2009).
Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration. *J Mol Med* 87, 99-112.
- [141] Perides, G., R. M. Safran, L. A. Downing and M. E. Charness (1994).
Regulation of neural cell adhesion molecule and L1 by the transforming growth factor-beta superfamily. Selective effects of the bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 269, 765-770.
- [142] Pancook, J. D., R. A. Reisfeld, N. Varki, A. Vitiello, R. I. Fox and A. M. Montgomery (1997).
Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J Immunol* 158, 4413-4421.
- [143] Maeda, M., Y. Shintani, M. J. Wheelock and K. R. Johnson (2006).
Src activation is not necessary for transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial to mesenchymal transitions (EMT) in mammary epithelial cells. PP1 directly inhibits TGF-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 281, 59-68.
- [144] Saika, S., K. Ikeda, O. Yamanaka, M. Sato, Y. Muragaki, Y. Ohnishi, A. Ooshima, Y. Nakajima, K. Namikawa, H. Kiyama, K. C. Flanders and A. B. Roberts (2004).
Transient adenoviral gene transfer of Smad7 prevents injury-induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium in mice. *Lab Invest* 84, 1259-1270.
- [145] Wilkins-Port, C. E. and P. J. Higgins (2007).
Regulation of extracellular matrix remodeling following transforming growth factor-beta1/epidermal growth factor-stimulated epithelial-mesenchymal transition in human premalignant keratinocytes. *Cells Tissues Organs* 185, 116-122.
- [146] Horiguchi, K., T. Shirakihara, A. Nakano, T. Imamura, K. Miyazono and M. Saitoh (2009).
Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 284, 245-253.

- [147] Bhowmick, N. A., M. Ghiassi, A. Bakin, M. Aakre, C. A. Lundquist, M. E. Engel, C. L. Arteaga and H. L. Moses (2001).
Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12, 27-36.
- [148] Imamichi, Y., O. Waidmann, R. Hein, P. Eleftheriou, K. Giehl and A. Menke (2005).
TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4. *Biol Chem* 386, 225-236.
- [149] Huang, C., Z. Rajfur, C. Borchers, M. D. Schaller and K. Jacobson (2003).
JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* 424, 219-223.
- [150] Santibanez, J. F. (2006).
JNK mediates TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes. *FEBS Lett* 580, 5385-5391.
- [151] Kimura, K., A. Wakamatsu, Y. Suzuki, T. Ota, T. Nishikawa, R. Yamashita, J. Yamamoto, M. Sekine, K. Tsuritani, H. Wakaguri, S. Ishii, T. Sugiyama, K. Saito, Y. Isono, R. Irie, N. Kushida, T. Yoneyama, R. Otsuka, K. Kanda, T. Yokoi, H. Kondo, M. Wagatsuma, K. Murakawa, S. Ishida, T. Ishibashi, A. Takahashi-Fujii, T. Tanase, K. Nagai, H. Kikuchi, K. Nakai, T. Isogai and S. Sugano (2006).
Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res* 16, 55-65.
- [152] Das, M., F. Jiang, H. K. Sluss, C. Zhang, K. M. Shokat, R. A. Flavell and R. J. Davis (2007).
Suppression of p53-dependent senescence by the JNK signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15759-15764.
- [153] Davis, R. J. (2000).
Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- [154] Choi, J., S. Y. Park and C. K. Joo (2007).
Transforming growth factor-beta1 represses E-cadherin production via slug expression in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 2708-2718.

- [155] Zheng, G., J. G. Lyons, T. K. Tan, Y. Wang, T. T. Hsu, D. Min, L. Succar, G. K. Rangan, M. Hu, B. R. Henderson, S. I. Alexander and D. C. Harris (2009). Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells. *Am J Pathol* 175, 580-591.
- [156] Medici, D., E. D. Hay and D. A. Goodenough (2006). Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 17, 1871-1879.
- [157] Peinado, H., M. Quintanilla and A. Cano (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278, 21113-21123.
- [158] Batlle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida and A. Garcia De Herreros (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89.
- [159] Jethwa, P., M. Naqvi, R. G. Hardy, N. A. Hotchin, S. Roberts, R. Spychal and C. Tselepis (2008). Overexpression of Slug is associated with malignant progression of esophageal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 14, 1044-1052.
- [160] Becker, K. F., E. Rosivatz, K. Blechschmidt, E. Kremmer, M. Sarbia and H. Höfler (2007). Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers. *Cells Tissues Organs* 185, 204-212.
- [161] Castro Alves C., F. Carneiro, H. Höfler and K. F. Becker (2009). Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. *Front Biosci* 14, 3035-3050.
- [162] Hemavathy, K., S. I. Ashraf and Y. T. Ip (2000). Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257, 1-12.
- [163] Kurrey, N. K., S. P. Jalgaonkar, A. V. Joglekar, A. D. Ghanate, P. D. Chaskar, R. Y. Doiphode and S. A. Bapat (2009). Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing

- p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells* 27, 2059-2068.
- [164] Nakajima, S., R. Doi, E. Toyoda, S. Tsuji, M. Wada, M. Koizumi, S. S. Tulachan, D. Ito, K. Kami, T. Mori, Y. Kawaguchi, K. Fujimoto, R. Hosotani and M. Imamura (2004).
N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 4125-4133.
- [165] Medici, D., E. D. Hay and B. R. Olsen (2008).
Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through β -catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol Biol Cell* 19, 4875-4887.
- [166] Castro Alves, C., E. Rosivatz, C. Schott, R. Hollweck, I. Becker, M. Sarbia, F. Carneiro and K. F. Becker (2007).
Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin. *J Pathol* 211, 507-515.
- [167] Shioiri, M., T. Shida, K. Koda, K. Oda, K. Seike, M. Nishimura, S. Takano and M. Miyazaki (2006).
Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 94, 1816-1822.
- [168] Vallin, J., R. Thuret, E. Giacomello, M.M. Faraldo, J.P. Thiery and F. Broders (2001).
Cloning and characterization of three *Xenopus* slug promoters reveal direct regulation by Lef/ β -catenin signaling. *J Biol Chem* 276, 30350-30358.
- [169] Conacci-Sorrell M., I. Simcha, T. Ben-Yedidia, J. Blechman, P. Savagner and A. Ben-Ze'ev (2003).
Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of β -catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 163, 847-57.
- [170] Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009).
The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428.
- [171] Gast, D., S. Riedle, H. Schabath, S. Schlich, A. Schneider, Y. Issa, A. Stoeck, M. Fogel, S. Joumaa, T. Wenger, I. Herr, P. Gutwein and P. Altevogt (2005).
L1 augments cell migration and tumor growth but not β 3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 115, 658-665.

- [172] Gelman, M. S., X. K. Ye, R. Stull, D. Suhy, L. Jin, D. Ng, B. Than, M. Ji, A. Pan, P. Perez, Y. Sun, P. Yeung, L. M. Garcia, R. Harte, Y. Lu, E. Lamar, R. Tavassoli, S. Kennedy, S. Osborn, D. J. Chin, K. Meshaw, T. A. Holzmayer, S. A. Axenovich and A. Abo (2004).
Identification of cell surface and secreted proteins essential for tumor cell survival using a genetic suppressor element screen. *Oncogene* 23, 8158-8170.
- [173] Loers, G., S. Chen, M. Grumet and M. Schachner (2005).
Signal transduction pathways implicated in neural recognition molecule L1 triggered neuroprotection and neuritogenesis. *J Neurochem* 92, 1463-1476.
- [174] Wu, Y., M. Alvarez, D. J. Slamon, P. Koeffler and J. V. Vadgama (2010).
Caspase 8 and maspin are downregulated in breast cancer cells due to CpG site promoter methylation. *BMC Cancer* 10, 32.
- [175] Yu, J., M. Ni, J. Xu, H. Zhang, B. Gao, J. Gu, J. Chen, L. Zhang, M. Wu, S. Zhen and J. Zhu (2002).
Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *BMC Cancer* 2, 29.
- [176] Philchenkov, A., M. Zavelevich, T. J. Krocak and M. Los (2004).
Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp Oncol* 26, 82-97.
- [177] Fulda, S. (2009).
Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett* 281, 128-133.
- [178] Luczak, M. W. and P. P. Jagodzinski (2006).
The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* 44, 143-154.
- [179] Muscat, A., C. Hawkins and D. M. Ashley (2006).
Caspase-8 levels correlate with the expression of signal transducer and activator of transcription 1 in high-grade but not lower grade neuroblastoma. *Cancer* 107, 824-831.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Claudia Ursula Geismann
 Geburtsdatum/-ort 21.01.1980 in Münster
 Nationalität deutsch

Ausbildung

04/2007 - 06/2010 Promotion an der CAU Kiel im Labor für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie, Klinik für Innere Medizin I, UKSH Campus Kiel
Beteiligung des promigratorischen Moleküls L1CAM an der Epithelialen Mesenchymalen Transition des pankreatischen Gangepithels

03/2006 - 11/2006 Masterarbeit am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, Arbeitsgruppe Zelldifferenzierung & Zelltechnologie (Lübeck)
Untersuchungen zur Isolierung, Identifizierung und Differenzierung adulter pankreatischer Stammzellen

10/2004 - 11/2006 Universität zu Lübeck
 Studiengang Molecular Life Science
 Abschluss: Master of Science

12/2003 - 06/2004 Bachelorarbeit am Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck
Klonierung, Expression und Coexpression von IscS und IscA aus Cyanobakterium Synechocystis PCC 6803

10/2001 - 07/2004 Universität zu Lübeck
 Studiengang Molekulare Biotechnologie
 Abschluss: Bachelor of Science

08/1999 - 06/2001 Berufskolleg der Stadt Köln, Kartäuserwall
 Ausbildung zur Biologisch-Technischen-Assistentin

08/1991 - 06/1999 Gymnasium Wolbeck; Abschluss: Abitur

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heiner Schäfer für die Bereitstellung des Themas sowie für sein Engagement, seine stete Diskussionsbereitschaft und die vielen Ratschläge. Prof. Dr. Susanne Sebens danke ich für die Unterstützung in Theorie- und Praxisfragen und die Anregungen, die zur Entstehung und zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben. Euch beiden vielen Dank für die hervorragende Betreuung.

Darüber hinaus danke ich Prof. Dr. Thomas Kunze für die Übernahme des Koreferats.

Prof. Dr. Bence Sipos danke ich für die Zusammenarbeit beim Färben und Auswerten der chronischen Pankreatitiden.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Alexander Arlt für seine uneigennützig Unterstützung. Danke Alex!

Tausend Dank auch an alle anderen Mitglieder des Labors für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie, die mir mit vielen hilfreichen Tipps und Ratschlägen zur Seite standen und den Laboralltag sehr angenehm gestaltet haben: Iris Bauer für ihre Hilfe bei allen „Bakterienfragen“, Frauke Grohmann für ihre Unterstützung bei den ChIP-Assays, Maike Großmann für schnelle Hilfe in allen Laborfragen, Dagmar Leisner für ihren Einsatz in Sachen Co-Kultur, Maike Witt für die Einführung in die Welt der Migrationsassays, Eike Jürgen für drei schöne Jahre in unserer „Mittelinsel“ und Dr. Marie-Luise Kruse für ihre Hilfe und Geduld am LSM.

Bei Lars-Fabian Blume und Momme Denker möchte ich mich für die vielen Diskussionen und Unterhaltungen, die Unterstützung im Laboralltag und die Motivation (besonders im letzten Jahr der Arbeit) bedanken.

Vielen Dank auch an die medizinischen Doktoranden, die die Arbeitsgruppe bereichert haben: Chantal Dieckmann, Jörn Kötteritzsch, Mascha Morscheck, Birte Struck, Frauke Wandschneider und Gabriele Wirts.

Stefan, danke für deine Unterstützung, Geduld und Motivation, die abendliche Laborbegleitung und deinen unerschütterlichen Optimismus.

Meiner Familie danke ich für jede Art der Unterstützung. Ohne euch geht es nicht!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema „Beteiligung des promigratorischen Moleküls L1CAM an der Epithelialen Mesenchymalen Transition des pankreatischen Gangepithels“ eigenständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln bzw. mit der wissenschaftlichen Beratung meiner Betreuer im Labor für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie, UKSH Campus Kiel angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- und Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch wurde sie zur Veröffentlichung eingereicht. Weiterhin bestätige ich, dass ich zuvor noch keinen Promotionsversuch unternommen habe und die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Kiel, 19.07.2010

Unterschrift