Aus dem Institut für Experimentelle Medizin (Direktoriumssprecherin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens) am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression in intestinalen Epithelzellen: Untersuchungen zu beteiligten Signalwegen und zellulären Auswirkungen

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Birte Struck
aus Nordenham

Kiel
2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Sebens

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Kalthoff

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 04.12.2013
gez.: Prof. Dr. Stefan Ehlers

Teile dieser Arbeit wurden bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

Schäfer H, Struck B, Feldmann EM, Bergmann F, Grage-Griebenow E, Geismann C, Ehlers S, Altevogt P, Sebens S. (2012)

TGF-β1-dependent L1CAM expression has an essential role in macrophage-induced apoptosis resistance and cell migration of human intestinal epithelial cells.
Oncogene. doi: 10.1038/onc.2012.44. [Epub ahead of print]

Struck B, Feldmann E-M, Bergmann F, Grage-Griebenow E, Geismann C, Altevogt P, Schäfer H, Sebens S (2011)

The role of TGF-β1 induced L1CAM expression in malignant transformation of intestinal epithelial cells.
J Cancer Res Clin Oncol 138: Suppl. 1; 26 (discussed poster) (IF 2,485).

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Das kolorektale Karzinom (CRC) 1

1.1.1 Epidemiologie 1

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese 1

1.1.3 Therapie und Prognose 2

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) 3

1.2.1 Definition 3

1.2.2 Epidemiologie 3

1.2.3 Ätiologie und Pathogenese 4

1.2.4 Darmkrebs und CEDs 4

1.3 Epitheliale mesenchymale Transition (EMT) 6

1.3.1 Definition 6

1.3.2 Prozess der EMT 7

1.3.3 Induktoren und Signalwege der EMT 7

1.3.4 EMT und Krebserkrankungen 8

1.3.5 EMT und CRC 9

1.4 Der *Transforming Growth Factor β* (TGF-ß) 9

1.4.1 Allgemein 9

1.4.2 TGF-ß und Krebserkrankungen 10

1.4.3 TGF-ß und CRC 11

1.4.4 TGF-ß1 und CEDs 12

1.5 Das Adhäsionsmolekül L1CAM (CD171) 12

1.5.1 Allgemein 12

1.5.2 Die Rolle von L1CAM bei Krebserkrankungen 15

1.5.3 L1CAM und CRC 17

1.6 Ziele der Arbeit 18

2 Material und Methoden 19

2.1 Materialien 19

2.1.1 Chemikalien 19

2.1.2 Verbrauchsmaterialien....20
2.1.3 Geräte....21
2.1.4 Zelllinien....22
2.1.5 Antikörper....22
2.1.6 Oligonukleotide....24
2.1.7 siRNAs....25
2.1.8 Plasmide....25
2.2 Methoden....26
2.2.1 Zellkultur....26
2.2.2 Transfektion....26
2.2.2.1 Transfektion mit siRNA....26
2.2.2.2 Transfektion mit Plasmiden....27
2.2.3 RNA-Techniken....27
2.2.3.1 RNA-Isolation und -Quantifizierung....27
2.2.3.2 Reverse Transkription....28
2.2.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Realtime PCR)....28
2.2.5 Protein-Techniken....29
2.2.5.1 Herstellung von Ganzzelllysaten....29
2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration und Einstellung der Proben für den Westernblot....30
2.2.5.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)....30
2.2.5.4 Protein-Transfer (Westernblot)....31
2.2.5.5 Immunnachweis der Proteine....32
2.2.6 Chromatin-Immunpräzipitationsassay (ChIP-Assay)....33
2.2.7 Luziferase-Assay....37
2.2.8 Caspase-Assay....39
2.2.9 Migrationsassay....40
2.2.10 Statistik....41

3 Ergebnisse....42
3.1 TGF-ß1 induziert die Expression von L1CAM in NCM460-Zellen....42
3.2 Durch TGF-ß1 induzierte EMT-assoziierte Veränderungen in NCM460-Zellen....43

3.3 Die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression ist Smad-unabhängig.....45
3.4 Die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression ist abhängig von der Aktivierung von JNK und Slug.....47
3.5 Slug bindet an den L1CAM-Promoter 49
3.6 Slug aktiviert den L1CAM-Promoter.....52
3.7 Die Expression von L1CAM führt zu Apoptose- bzw. Chemoresistenz in NCM460-Zellen.....56
3.8 L1CAM erhöht die Migrationsfähigkeit von NCM460-Zellen 59

4 Diskussion.....61
4.1 Die Expression von L1CAM in intestinalen Epithelzellen.....62
4.2 L1CAM und EMT in NCM460-Zellen.....63
4.3 Die Rolle von Smad und JNK bei der TGF-ß1-induzierten L1CAM-Expression.....64
4.4 Die Rolle von Slug bei der TGF-ß1-induzierten L1CAM-Expression.....66
4.5 L1CAM, Apoptose und Migration.....69

5 Zusammenfassung.....75

Anhang.....77

Literaturverzeichnis.....77
Abkürzungsverzeichnis.....97
Lebenslauf.....100
Danksagung.....101
Erklärung.....102

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom (CRC)

1.1.1 Epidemiologie

Das CRC ist mit mehr als 80/100000 Neuerkrankungen pro Jahr die zweithäufigste bösartige Krebserkrankung in Deutschland. In 90% der Fälle tritt die Erkrankung nach dem 50. Lebensjahr auf, der Altersgipfel liegt um das 65. Lebensjahr (1-3). Das Risiko der deutschen Normalbevölkerung im Laufe des Lebens an einem CRC zu erkranken liegt derzeit bei 6%, das Risiko daran zu versterben bei 2,5-3%. Die 5-Jahres-Überlebensrate variiert abhängig vom Stadium zwischen 5% und 95%. Damit ist das CRC weiterhin die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland (2).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

In 90% der Fälle tritt das CRC sporadisch auf. Es wurden verschiedene Risikofaktoren hierfür identifiziert. Eine ballaststoffarme, fett- und fleischreiche Ernährung sowie Übergewicht erhöhen das Risiko für die Entstehung eines CRCs. Auch ein hoher Alkoholkonsum, langjähriges Zigarettenrauchen und höheres Lebensalter stellen Risikofaktoren dar (1).
Zu den Erkrankungen, die die Entwicklung von Darmkrebs begünstigen, zählen u.a. kolorektale Adenome und Karzinome von Mamma, Ovar und Corpus uteri (1). Auch das langjährige Vorhandensein einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung stellt einen bedeutenden Risikofaktor dar (1).
Die übrigen 10% der CRCs treten genetisch bedingt auf. Eine positive Familienanamnese erhöht das Lebenszeitrisiko auf bis zu 30%. Patienten mit hereditärem nichtpolypösen Kolonkarzinom-Syndrom oder familiärer adenomatöser Polyposis haben ein 80%- bzw. nahezu 100%-iges Risiko an Darmkrebs zu erkranken (1).
CRCs sind in 70% der Fälle Adenokarzinome und entstehen aus intraepithelialen Neoplasien (1, 4). In 90% der Fälle stellen Adenome die entsprechenden Vorläuferläsionen dar (sog. Adenom-Karzinom-Sequenz). Es konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte Abfolge

molekularbiologischer Veränderungen mit der Entwicklung eines Karzinoms einhergeht. Nach dem Tumorprogressionsmodell nach Vogelstein und Fearon treten sukzessive entweder eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. APC-GEN, p53-Gen, DCC-Gen) oder eine Aktivierung von Onkogenen (z.B. K-ras-Gen) auf, bis aus der normalen Dickdarmschleimhaut ein CRC entstanden ist (5) (Abb. 1, Seite 6).

1.1.3 Therapie und Prognose

Das CRC wird anhand der UICC-Klassifikation in die Stadien 0 bis IV eingeteilt. Liegt ein Stadium 0 vor, so handelt es sich um ein Carcinoma in situ, im Stadium IV liegt ein fortgeschrittenes Karzinom mit Fernmetastasen vor. Die Therapie richtet sich nach dem vorliegendem Stadium und nach der Lokalisation des Tumors (6).
Als wichtigste therapeutische Maßnahme gilt nach wie vor die Operation, die bei 90% der Tumore durchgeführt werden kann (4). Besondere Bedeutung kommt hierbei der kompletten Resektion des Tumors und der entsprechenden Lymphabflussgebiete zu (4). Die Chemotherapie stellt ein weiteres wichtiges Standbein der Therapie dar. Beim Rektumkarzinom wird ab UICC-Stadium II eine neoadjuvante Radio-/Chemotherapie mit dem Zytostatikum 5-Fluoruracil und eine postoperative Chemotherapie empfohlen (1). Das Kolonkarzinom hingegen wird ab UICC-Stadium III durch eine adjuvante Chemotherapie mit Oxaliplatin (oder Irinotecan), 5-Fluoruracil und Folinsäure behandelt (1). Ergänzend kann außerdem eine Therapie mit den monoklonalen Antikörpern Bevacizumab (VEGF-Antikörper) oder Cetuximab (EGFR-Antikörper) durchgeführt werden (4).
Wie bereits oben erwähnt, hängt die Prognose des CRC stark vom Stadium der Erkrankung ab. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Patienten mit einem Kolonkarzinom im UICC-Stadium I 95%, im Stadium II 85% und im Stadium III 55%. Patienten mit Stadium V haben mit 5% die schlechteste Prognose (1). Für alle Kolonkarzinome ergibt sich hieraus eine 5-Jahres-Überlebensrate von 55%. Für das Rektumkarzinom liegen ähnliche Daten vor. Hier beträgt die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate 50% (4).

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

1.2.1 Definition

Unter einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) versteht man eine immunvermittelte, chronische Entzündung des Gastrointestinaltraktes, die meist in rezidivierenden Schüben verläuft (7). Zu den Hauptvertretern der CEDs zählen die Enterocolitis regionalis Morbus Crohn (CD) und die Colitis ulcerosa (UC).

Für den CD charakteristisch ist der diskontinuierliche, segmentale Befall, der alle Wandschichten des Magen-Darm-Traktes befallen kann. Prinzipiell kann der CD in jedem Abschnitt des Gastrointestinaltraktes auftreten, wobei am häufigsten das terminale Ileum und proximale Kolon von der Krankheit befallen werden (1). In 20% der Fälle ist nur der Dickdarm von der Erkrankung betroffen (8).

Die UC dagegen befällt nur die oberflächlichen Schleimhautschichten des Dickdarms und zeichnet sich durch einen kontinuierlichen Befall aus (1). Bei der UC ist das Rektum stets mitbetroffen, wobei die Erkrankung meist im distalem Rektum beginnt und sich von dort nach proximal ausbreitet (7).

1.2.2 Epidemiologie

Die Inzidenz von CD und UC hat in den letzten Jahrzehnten zugenommen und liegt zurzeit bei 5,2-8,8/100000 bzw. 5-25/100000 Neuerkrankungen pro Jahr in Mitteleuropa (9, 10). Zurzeit hat der CD eine Prävalenz von 120-200/100000, wobei Männer und Frauen gleich häufig betroffen sind (4, 9). Prinzipiell kann die Erkrankung in jedem Lebensalter zum ersten Mal auftreten, die höchste altersspezifische Inzidenz liegt jedoch zwischen dem 15. und 34. Lebensjahr (9). Die CU hat eine Prävalenz von 210/100000 Einwohner (10). Der Häufigkeitsgipfel liegt derzeit zwischen dem 20. und 34. Lebensjahr und jenseits des 60. Lebensjahres, wobei Frauen etwas häufiger betroffen sind als Männer (4, 10).

1.2.3 Ätiologie und Pathogenese

Bei den CEDs handelt es sich um multifaktorielle Erkrankungen, deren genaue Ursache heute noch unklar ist. Sowohl bei der CU als auch beim CD gibt es jedoch eine deutliche genetische Komponente (11). Personen, deren Verwandter ersten Grades an einer CED leidet, haben ein über 10%-iges Risiko selber an einer CED zu erkranken. Leiden beide Eltern an einer CED, so erhöht sich das Erkrankungsrisiko für deren Kinder auf 36% (7). Mittlerweile konnten mehr als 30 verschiedene Gen-Loki mit dem Auftreten einer CED in Verbindung gebracht werden (12). So tragen z.B. 50% aller CD-Patienten eine Mutation im CARD15-Gen (1).
Man geht zurzeit davon aus, dass diese genetischen Veränderungen die Funktion und Regulation des Immunsystems und der Darmschleimhaut beeinträchtigen und so betroffene Individuen für die Entwicklung einer CED prädisponieren (7). So kommt es bei CED-Patienten zu einer Störung von Barrierefunktion und Toleranz der Darmschleimhaut gegenüber der bakteriellen Flora des Darms und dadurch zu einem Übergewicht einer proinflammatorischen Immunantwort (11, 12). Endogene Stimuli wie die bakterielle Flora des Darms und exogene Faktoren führen dann zu einer unangebrachten, entzündlichen Reaktion des Immunsystems des Darmes, bei der auch eine autoimmune Komponente vorhanden sein kann (7).

1.2.4 Darmkrebs und CEDs

Ein Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung und Krebsentstehung konnte für verschiedene Tumorentitäten gezeigt werden (13). Dass auch zwischen CEDs und dem Auftreten von CRCs eine Verbindung besteht, wurde zuerst im Jahre 1925 beschrieben (14). Mittlerweile konnten in verschiedenen Studien diese Zusammenhänge genauer dokumentiert werden. So fanden Eaden et al. im Jahr 2001 heraus, dass Patienten mit CU zehn Jahre nach Erkrankungsbeginn ein Risiko von 2% haben, ein CRC zu entwickeln. Nach 20 Jahren steigt das Risiko auf 8% und nach 30 Jahren sogar auf 18% (15, 16). In anderen Studien wird das Risiko mittlerweile als geringer eingeschätzt, wobei die Datenlage hier stark variiert (17). Auch für den CD wird ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines CRC angenommen, wobei auch hier die Datenlage nicht eindeutig ist. Canavan et al. fanden jedoch 2006 in einer

Metaanalyse heraus, dass zehn Jahre nach Erkrankungsbeginn 2,9% der Patienten ein CRC entwickeln, nach 20 Jahren 5,6% und nach 30 Jahren 8,3% (18).
Außerdem haben diese Studien gezeigt, dass das CRC bei CED-Patienten im Durchschnitt 15-20 Jahre früher auftritt, als bei der Normalbevölkerung, und dass häufiger multiple CRCs vorliegen (17).

Wie oben beschrieben, treten bei der Entstehung des sporadischen CRCs eine bestimmte Abfolge molekularbiologischer Veränderungen auf. Für das Kolitis-assoziierte CRC konnten ähnliche Veränderungen nachgewiesen werden. Diese treten allerdings im Vergleich zum sporadischen CRC häufiger multifokal auf. Auch die Form der Vorläuferläsionen unterscheidet sich. Während beim sporadischen CRC häufig polypöse Adenome Vorstufen darstellen, entsteht bei CED-Patienten das CRC meistens aus flachen Dysplasien der Darmschleimhaut (19).
Das sporadische CRC wird häufig durch eine genomische Instabilität (85% chromosomale Instabilität, 15% Mikrosatelliteninstabilität) ausgelöst. Dies scheint beim Kolitis-assoziierten CRC genauso zu sein, wobei sich die Zeitpunkte der Veränderungen bestimmter Gene unterscheiden können. So tritt der Verlust des Tumorsuppressors APC beim sporadischen CRC früh auf, während er beim Kolitis-assoziierten CRC weniger häufig auftritt und zu den späten genetischen Ausfällen zählt. Andersherum verhält es sich mit p53-Mutationen. Diese treten im sporadischen CRC spät auf, während sie beim Kolitis-assoziierten CRC schon früh nachgewiesen werden konnten (16, 19). Abbildung 1 zeigt weitere molekularbiologische Veränderungen im sporadischen CRC und Kolitis-assoziierten CRC und stellt sie gegenüber.

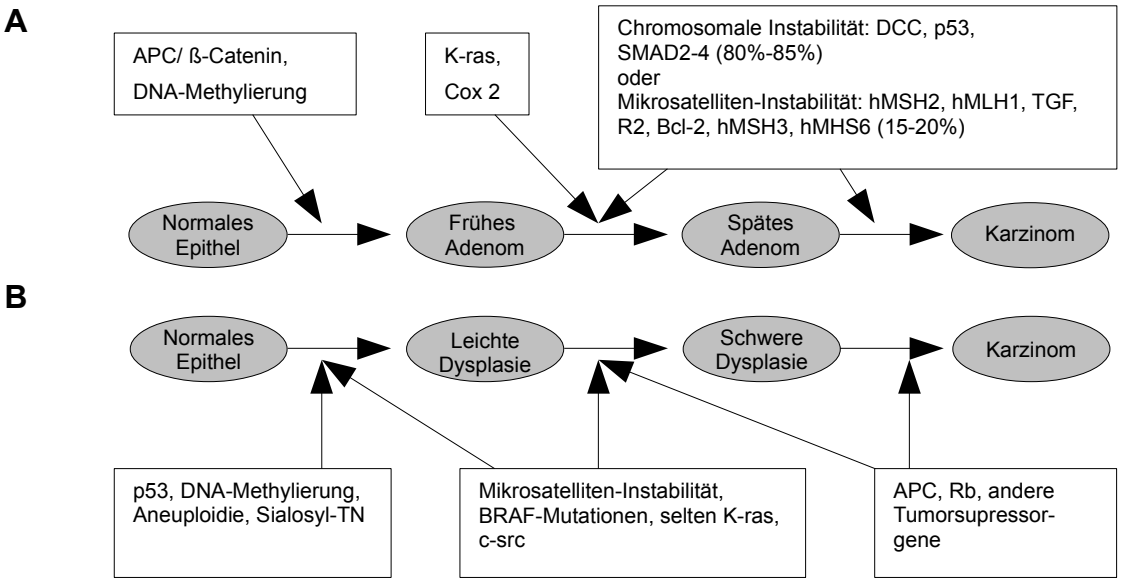

Abbildung 1. Zusammenfassung der genetischen Veränderungen beim sporadischen CRC (A) und beim Kolitis-assoziierten CRC (**B**). Modifiziert nach (17).

1.3 Epitheliale mesenchymale Transition (EMT)

1.3.1 Definition

Unter der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) versteht man den Prozess, bei dem sich polare Epithelzellen in bewegliche, mesenchymale Zellen umwandeln, denen es dadurch ermöglicht wird, bestehende Zellkontakte in einem Epithelzellverband zu lösen, diesen zu verlassen und an andere Orte zu migrieren (20, 21).

Von enormer Bedeutung ist die EMT während der Embryogenese. Unter anderem ermöglicht sie hier die Ausbildung der drei Keimblätter während der Gastrulation. Außerdem entwickeln sich Herz, muskuloskelettales System, die meisten kraniofazialen Strukturen und das periphere Nervensystem mithilfe der EMT (20). Die EMT spielt jedoch auch bei verschiedenen pathologischen Vorgängen eine Rolle. So weiß man heute, dass sie neben der Wundheilung auch Fibrosierung von entzündlichem Gewebe und Eigenschaften von Tumoren beeinflusst (22). Die Rolle der EMT in der Tumorpathologie wird in den Kapiteln 1.3.4 und 1.3.5 näher erläutert.

1.3.2 Prozess der EMT

Epithelzellen sind polare Zellen, die in organisierten Zellverbänden wachsen und die mit der Basalmembran oder anderen Epithelzellen fest verbunden sind. Das Adhäsionsprotein E-Cadherin ist ein wichtiges epitheliales Markerprotein, das Aktinfilamente via α-Catenin und β-Catenin bindet und so an der Ausbildung von *Adherens-Junctions* und Desmosomen beteiligt ist (20). Der Verlust von E-Cadherin stellt daher einen wichtigen Schritt der EMT dar (22).

Der Prozess der EMT ist durch verschiedene morphologische und zelluläre Veränderungen charakterisiert. Die sog. *Tight Junctions* verlieren ihre Funktion und die dazugehörigen epithelialen Markerproteine Zonula occludens 1, Claudin 1 und Occludin verschwinden. Es folgt der Verlust der *Adherens Junctions* (mit E-Cadherin und β-Catenin) sowie die Reorganisation der Aktinfilamente. Die Zellen haben so ihre Polarität verloren und nehmen eine spindelförmige, fibroblastenähnliche Form an. Außerdem exprimieren sie nun mesenchymale Markerproteine wie N-Cadherin, Vimentin, Fibronectin, *Smooth-muscle-α-Actin* und Fibroblasten-spezifisches Protein-1 (23).

Als Resultat der EMT zeigen die Zellen nun ein verändertes Adhäsionsverhalten und exprimieren andere Oberflächenrezeptoren. Außerdem generieren sie andere Extrazellulärmatrixproteine und sezernieren vermehrt Proteasen. Aus diesen Veränderungen erklärt sich das erhöhte Migrationsverhalten der Zellen. Außerdem verleiht die EMT den Zellen eine verlängerte Lebensdauer (23).

1.3.3 Induktoren und Signalwege der EMT

Die EMT ist ein Prozess, der durch Stimuli aus der Mikroumgebung der Zellen ausgelöst wird (22). Als solche Stimuli konnten Wachtums- und Differenzierungsfaktoren identifiziert werden, wie der *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Hepatic Growth Factor* (HGF), *Platelet derived Growth Factor* (PDGF), WNT-und Notch-Proteine und *Bone morphogenic proteins* (21, 22).

Als einer der wichtigsten Induktoren der EMT gilt der *Transforming Growth Factor β* (TGF-ß), auf den in einem eigenen Kapitel dieser Arbeit (1.4) näher eingegangen wird.

Verschiedene Gruppen von Transkriptionsfaktoren konnten mit der EMT in Verbindung gebracht werden. Zu den drei wichtigsten Gruppen gehören die SNAIL-Superfamilie, die ZEB-Superfamilie (ZEB1, ZEB 2) und die *basis-helix-loop-helix*-Faktoren (Twist, E12/E47) (24). Bei der Snail-Superfamilie handelt es sich um eine Gruppe von Zinkfinger-Proteinen, die typischerweise an E-Box-Elemente (CAGGTG) der DNA binden. Die zwei Hauptvertreter Snail und Slug spielen sowohl bei vielen Vorgängen der Embryogenese als auch in der Tumorigenese eine wichtige Rolle. Beide Transkriptionsfaktoren sind nach Stimulation mit TGF-β in der Lage, EMT in Zellen auszulösen, indem sie eine Herunterregulierung epithelialer Marker wie E-Cadherin, Claudin und Occludin sowie eine Heraufregulierung mesenchymaler Marker, wie N-Cadherin, Vimentin und Fibronektin bewirken (24).

1.3.4 EMT und Krebserkrankungen

Durch EMT wird Zellen Migration, Invasion und eine verlängerte Lebensdauer ermöglicht (24). Diese Eigenschaften sind bei der EMT während der Embryogenese unbedingt notwendig für die normale Entwicklung. In verschiedenen Tumoren konnte allerdings auch EMT nachgewiesen werden und hier führen diese Eigenschaften zu früher Metastasierung, Apoptose- sowie Chemoresistenz und sind häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert (25-32).

Der Verlust von E-Cadherin, ein wichtiger Schritt der EMT, konnte u.a. bei Pankreaskarzinomen, Bronchialkarzinomen und Ösophaguskarzinomen mit einer verschlechterten Prognose in Verbindung gebracht werden (25, 26). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Verlust von E-Cadherin zu einer frühzeitigen Metastasierung in regionale Lymphknoten und ins Knochenmark führt und außerdem Angiogenese fördert (26, 27). Auch die Überexpression von den Transkriptionsfaktoren Slug und Snail konnte in verschiedenen Untersuchungen mit einer Prognoseverschlechterung assoziiert werden (28-31). Jethwa et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von Slug zu einer Progression von Ösophaguskarzinomen führt (28). Auch bei Cholangiokarzinomen und Magenkarzinomen konnte die Überexpression von Slug mit Progression und verschlechterter Prognose assoziiert werden (29, 30). Außerdem konnte gezeigt werden, dass epitheliale Zellen durch die EMT Stammzelleigenschaften erwerben können (32).

1.3.5 EMT und CRC

Dass die EMT auch mitverantwortlich für die Progression und Aggressivität des CRC ist, konnte in mehreren Studien gezeigt werden (33-35). Der Verlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin ist auch hier ein wichtiger Schritt der EMT. Bei 38%-46% der CRCs konnte eine Reduktion von E-Cadherin festgestellt werden, die einherging mit einer deutlich verschlechterten Prognose (29). Außerdem konnte eine Erhöhung der Transkriptionsfaktoren Slug und Snail in CRCs beobachtet werden (29). Bates et al. fanden weiterhin heraus, dass TGF-ß ein wesentlicher Faktor ist, der für die Induktion von EMT in Epithel- und Karzinomzellen verantwortlich ist, so auch in Kolonkarzinomzellen (36).

1.4 Der *Transforming Growth Factor β* (TGF-ß)

1.4.1 Allgemein

Bei Säugetieren gibt es drei Arten des *Transforming Growth Factor β* (TGF-ß1-3), die während der Embryogenese und auch nach abgeschlossener Entwicklung eine Vielzahl von Funktionen ausführen. So spielt TGF-ß eine Rolle bei Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion, Migration und bei der Zusammensetzung der Mikroumgebung von Zellen (37).

Die TGF-ßs binden alle an das gleiche Rezeptorsystem. Dieses besteht aus einem Komplex aus einem Typ I- und einem Typ II-Rezeptor. Bei Säugetieren gibt es fünf verschiedene Typ II-Rezeptoren und sieben Typ I-Rezeptoren. TGF-ß1, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, bindet hauptsächlich an die Kombination aus dem Typ I-Rezeptor Alk5 und dem Typ II-Rezeptor TßRII. Bei den Typ I- und II-Rezeptoren handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen. Nach der Bindung von TGF-ß phosphoryliert der Typ II-Rezeptor zunächst den Typ I-Rezeptor. Dadurch wird die TßRI-Kinase aktiviert, die dann eine Autophosphorylierung und die Phosphorylierung nachgeschalteter Zielproteine bewirkt (38, 39).

Grundsätzlich werden zwei verschiedene TGF-ß Signalwege unterschieden, der Smad-abhängige und der Smad-unabhängige TGF-ß-Signalweg.

Der Smad-abhängige TGF-ß-Signalweg ist der am längsten bekannte Signalweg. Hierbei

werden bei Säugetieren zunächst die Smads 2 und 3 durch den aktivierten Typ I-TGF-ß-Rezeptor phosphoryliert und formen daraufhin mit Smad 4 einen heterotrimeren Komplex, der dann in den Kern disloziert. Dort kann der Komplex mit einer Vielzahl von DNA-bindenden Proteinen interagieren und ist so in der Lage, Transkription auszulösen oder zu unterdrücken. Die Vielzahl an möglichen Interaktionspartnern des Smad-Komplexes erklärt, warum TGF-ß so viele verschiedene Effekte auf die Genexpression und damit zelluläre Konsequenzen in Zellen hervorrufen kann. Neben den aktivierenden Smads 1, 2, 3, 5 und 8 gibt es auch die inhibierenden Smads 6 und 7, die die Reaktionen der aktivierenden Smads antagonisieren (38, 40).

Der TGF-ß-Rezeptor ist auch in der Lage, verschiedene Signalwege ohne Beteiligung der Smads zu aktivieren. Dazu gehören unter anderem der *Mitogen Activated Kinase* (MAPK)/ *Extracellular Regulated Kinase (*ERK)-Signalweg und der c-Jun n-terminale Kinase (JNK)/ p38-Signalweg. Auch Rho-ähnliche GTPasen und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (P13K)/ Akt-Signalweg können durch den TGF-ß-Rezeptor aktiviert werden (38-41).

Mittlerweile ist bekannt, dass die Smad-unabhängigen und die Smad-abhängigen Signalwege sich gegenseitig regulieren und bei bestimmten zellulären Funktionen auch kooperieren. So sind an der EMT, bei der TGF-ß einen der wichtigsten Induktoren darstellt, alle bisher bekannten TGF-ß-Signalwege beteiligt (24, 39, 41).

Außerdem synergieren die TGF-ß-Signalwege mit vielen anderen zellulären Signalwegen, u.a. denen von Integrinen, Notch, Wnt, Tumor-Nektrose-Faktor-α (TNF-α), *Epithelial Growth Factor* (EGF) und Ras (23).

1.4.2 TGF-ß und Krebserkrankungen

Bei der Tumorentstehung und -progression spielt TGF-β1 eine duale Rolle, da er sowohl tumorinhibierende als auch tumorfördernde Eigenschaften haben kann (37, 40, 42). Als Tumorsuppressor scheint TGF-ß vor allem in normalen Epithelzellen oder sehr frühen Krebsstadien zu agieren. So wirkt TGF-ß hier z.B. durch die Expression von Inhibitoren von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und Repression von c-Myc wachstumshemmend und kann außerdem über verschiedene Mechanismen zur Apoptoseinduktion in Zellen führen (37). Mutationen im Typ II-TGF-ß-Rezeptor, die eine abgeschwächte TGF-ß-Signalgebung

bewirken, können die Entwicklung von verschiedenen Tumoren bewirken, was die tumorinhibierende Wirkung von TGF-ß verdeutlicht (37, 40).
Tumorfördernd scheint TGF-ß dagegen bei fortgeschrittenen Tumoren zu wirken, indem er zu Invasion, Metastasierung, Tumorwachstum und Angiogenese beiträgt (37, 40, 42). Diese Eigenschaften werden von TGF-ß u.a. durch die Veränderung der Mikroumgebung induziert. So bewirkt TGF-ß in Tumorzellen eine vermehrte Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen und Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (EZM), außerdem werden vermehrt Fibroblasten angelockt und wachstums- und angiogenesefördernde Zytokine sezerniert (40). In Metastasen von Mamma-, Prostata- und Kolonkarzinomen konnten große Mengen an TGF-ß detektiert werden, sogar größere Mengen als in den Primärtumoren, was die Rolle von TGF-ß bei der Metastasierung verdeutlicht (37). Außerdem konnte gezeigt werden, dass hohe Plasmaspiegel von TGF-ß zu einer verschlechterten Prognose führen (37). Die TGF-ß-vermittelte Induktion von EMT stellt einen weiteren wichtigen Mechanismus dar, über den TGF-ß zur Tumorentstehung und -progression beiträgt. Darüber hinaus hemmt TGF-ß die Proliferation von Immunzellen und schwächt so die Immunüberwachung über die Tumorzellen ab (37, 40). Unter den Smad-unabhängigen TGF-ß-Signalwegen sind außerdem viele wachstumsfördernde Signalwege (MAPK, Ras, JNK, AKT). Durch Überexpression von TGF-ß durch Tumorzellen werden diese Signalwege vermehrt aktiviert und tragen so wiederum zur Tumorprogression bei (43).

1.4.3 TGF-ß und CRC

Auch beim CRC spielt TGF-ß eine duale Rolle. Bei der Entstehung eines CRCs scheint TGF-ß eher tumorinhibierende Eigenschaften zu haben. Dies wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass 30% der CRCs Mutationen im TßRII-Gen aufweisen. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass diese Mutationen zur Entwicklung eines CRCs führen (43, 44). Xu et al. haben einen Polymorphismus des TßRI beschrieben, die TGFBR1*6A-Variante, die Träger zur Entwicklung eines CRC prädisponiert und für 3% der CRCs verantwortlich sein soll (43).

Dass TGF-ß andererseits auch für das CRC tumorfördernd wirken kann, wird dadurch verdeutlicht, dass hohe Spiegel von TGF-ß beim CRC mit fortgeschrittenem Stadium, schlechterer Prognose und höheren Rezidivraten einhergehen (43).

1.4.4 TGF-ß1 und CEDs

Obwohl TGF-ß eher als immunsuppressiver Botenstoff gilt, sind die Expressionsspiegel von TGF-ß in Darmmukosa und Serum von CED-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöht. Dabei scheinen u.a. Myofibroblasten und Immunzellen für die erhöhte Expression verantwortlich zu sein (45).

1.5 Das Adhäsionsmolekül L1CAM (CD171)

1.5.1 Allgemein

Das Adhäsionsmolekül L1CAM (CD171) wurde im Jahr 1984 entdeckt und gehört mit NrCAM, Neurofaszin und CHL1 zur Immunglobulin-Superfamilie der Adhäsionsrezeptoren. Physiologischerweise wird L1CAM in zentralem und peripheren Nervengewebe, in Leukozyten sowie in Epithelien des Urogenitaltraktes exprimiert (46). Große Bedeutung kommt L1CAM während der Entwicklung und Regeneration von Nervengewebe zu, da es hier zum Auswachsen von Neuriten und Axonen, Migration und Adhäsion von Nervenzellen und Synapsenbildung beiträgt. Neugeborene mit einer Mutation im L1CAM-Gen kommen mit einem sog. L1CAM- oder CRASH-Syndrom zur Welt, das sich unter anderem durch mentale Retardierung, Aphasie, Hydrocephalus, Agenesie bzw. Dysgenesie des Corpus Callosum und spastische Paraplegie äußert. In den letzten Jahren ist außerdem deutlich geworden, dass L1CAM auch in der Tumorpathologie eine große Rolle spielt (46-49) (s. Kapitel 1.5.2).

Das L1CAM-Gen befindet sich auf Chromosom Xq28 und umfasst etwa 25kb mit 29 Exons. Das Startcodon befindet sich im zweiten Exon, da das erste Exon ein nicht kodierendes Exon ist. Es konnten zwei Promoterregionen im L1CAM-Gen identifiziert werden. Die erste

befindet sich vor dem ersten Exon und enthält mehrere Transkriptionsstartpunkte. Die zweite Promoterregion liegt vor dem zweiten Exon (50-52). Wie genau die L1CAM-Gen-Expression reguliert wird, ist nur zum Teil bekannt. Geismann et al. konnten zwei Slug-Bindungsstellen (Position 433 und 1241) vor dem ersten Transkriptionsstartpunkt identifizieren. In Pankreas-epithel- und Pankreaskarzinomzellen kommt es über die Bindung von Slug an beide Bindungsstellen zur Aktivierung des ersten L1CAM-Promoters, was so zu einem L1CAM-Primärtranskript führt, welches das nicht kodierende Exon 1 enthält (52).

L1CAM ist ein 200-220 kDa großes Typ-I-Membranglykoprotein. Der große extrazelluläre Teil von L1CAM besteht aus sechs Immunglobulin-ähnlichen Domänen und fünf Fibronection-Typ-III-Wiederholungen. Diese sind über eine einzige Transmembrandomäne mit dem kurzen intrazellulären Teil verbunden (46-49, 54) (Abb. 2).

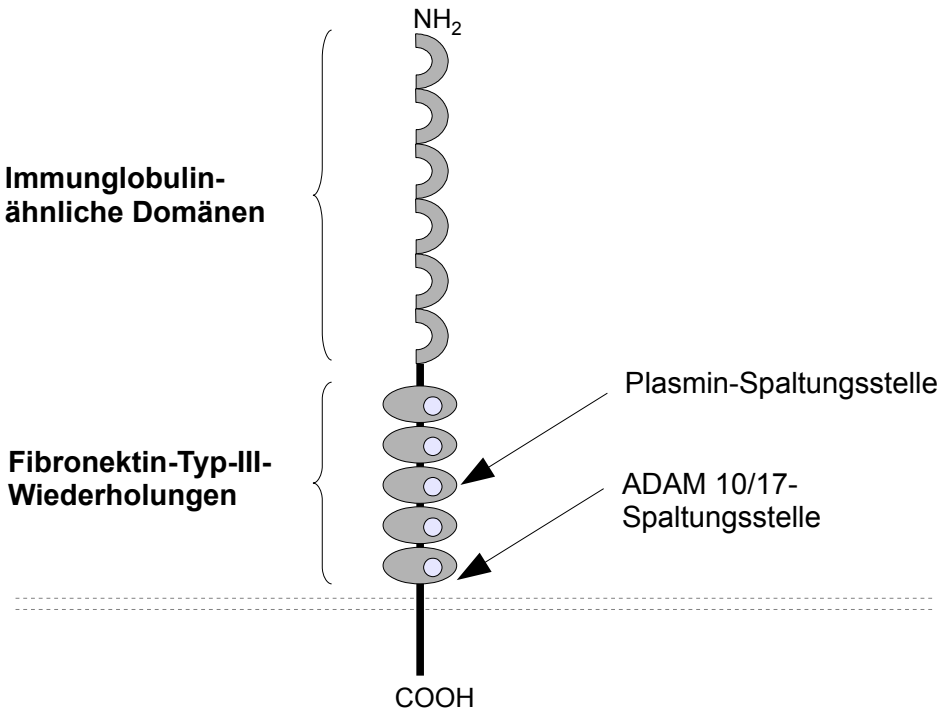

Abbildung 2. Schematische Darstellung des Adhäsionsmoleküls L1CAM. Modifiziert nach (48, 54).

L1CAM kann sowohl homophil als auch heterophil an andere Proteine binden. Unter den homophilen Bindungen versteht man die Bindung von L1CAM an die lösliche Form von L1CAM oder an L1CAM auf Oberflächen benachbarter Zellen. Heterophile Bindungen kann L1CAM mit diversen anderen Proteinen eingehen, unter anderem mit anderen neuronalen Adhäsionsmolekülen (Axonin-1, DM-GRASP, F3/F11). Außerdem bindet L1CAM an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), an verschiedene Integrine und Bestandteile der EZM wie Laminin, Fibronektin und Proteoglykane (Neurocan, Phosphocan). Diese heterophilen Bindungen dienen einerseits der Adhäsion, in Nervenzellen oder Krebszellen können sie aber auch Wachstum und Motilität fördern (46, 54, 55).
Obwohl der intrazelluläre Teil von L1CAM im Vergleich zum Rest des Proteins nur klein ist, enthält er dennoch Bindungsstellen für verschiedene intrazelluläre Proteine. So bindet er u.a. an Ankyrin und verbindet L1CAM über dieses Adaptorprotein mit dem Spektrin- und Aktin-zytoskelett. Die Bindungsstelle wird dabei durch Phosphorylierung durch die MAPK kontrolliert. Außerdem können an den zytosolischen Teil von L1CAM Mitglieder der ERM-Familie (Ezrin, Radixin, Moesin), Komponenten des Clathrin/Ap-2-Komplexes, Doublecortin und Ran-bindendes Protein M (RanBPM) binden (55, 56-58).
Der zytosolische Teil von L1CAM bindet nicht nur an statische Komponenten des Intra-zellularraumes, sondern ist auch in der Lage, verschiedene Signalwege zu aktivieren. So kann L1CAM eine Aktivierung des ERK-Signalweges bewirken, was eine erhöhte Expression von motilitäts- und invasionsfördernden Genen wie Integrinen, kleinen GTPasen, Kathepsin A/B und Rac-1, zur Folge hat. Außerdem kann L1CAM MAPK-, PI3/Akt-, und Bcl-2 Signalwege und c-Src aktivieren, was u.a. mit erhöhter Apoptoseresistenz einhergeht. Diese Signalwege können von L1CAM u.a. nach Bindung an Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie FGFR, HGFR, EGFR oder durch Bindung an Integrine, aber auch nach Bindung von intrazellulären Proteinen an den zytosolischen Teil von L1CAM, aktiviert werden (46, 59-61).

Neben der membrangebundenen Form kann L1CAM auch als lösliches Protein freigesetzt werden. Dazu wird es an der Zellmembran oder in Exosomen weiter prozessiert. Daran ist am häufigsten ADAM 10 (*a disintegrin and metalloproteinase*) beteiligt, welches L1CAM membrannah abspaltet und so ein etwa 200 kDa großes Fragment freisetzt. An der gleichen Stelle kann auch ADAM 17 L1CAM abspalten. Plasmin und Trypsin können ebenfalls L1CAM spalten, wodurch kleinere L1CAM-Fagmente (140-150 kDa) freigesetzt werden

(Abb. 2). Das lösliche L1CAM spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen. So bindet freigesetztes L1CAM an Bestandteile der EZM und kann nun autokrin oder parakrin an L1CAM und Integrine von Zellen binden und diese so zur Migration stimulieren (54, 62-66). Nach der Freisetzung der löslichen L1CAM-Ektodomäne durch ADAM 10 bleibt ein 32 kDa großes zytosolisches Fragment zurück. Auch dieses kann durch Presenelin/γ-Sektretase weiter prozessiert werden, die ein 28 kDa großes Fragment von L1CAM abspaltet und es ins Zytosol freisetzt. Mittlerweile ist bekannt, dass dieses Fragment in den Kern translozieren und dort Einfluss auf die Genregulation nehmen kann (63, 67).

1.5.2 Die Rolle von L1CAM bei Krebserkrankungen

L1CAM konnte mit einer Vielzahl von Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden. Unter anderem wird es vermehrt exprimiert in Pankreaskarzinomen, kolorektalen Karzinomen, cholangiozellulären Karzinomen, gastrointestinalen Stromatumoren, Melanomen, Gliomen, Prostatakarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Bronchialkarzinomen und fast allen gynäkologischen Tumoren. Die Expression von L1CAM geht dabei in vielen dieser Tumoren einher mit vermehrtem Tumorwachstum, früher Metastasierung, Chemo- und Apoptoseresistenz und einer insgesamt deutlich verschlechterten Prognose (68-93). Es konnten bereits einige Mechanismen aufgedeckt werden, über die L1CAM diese Eigenschaften vermittelt.

In Ovarialkarzinomzellen geht die L1CAM-Expression einher mit vermehrter Phosphorylierung von ERK, FAK und PAK sowie einer Hochregulierung von Bcl-2 und vermittelt so Chemo- und Apoptoseresistenz in diesen Zellen (68). Auch in L1CAM-exprimierenden Cholangiokarzinomzellen führte ein *Knockdown* von L1CAM zu einer verringerten Phosphorylierung von FAK und AKT. Dies hatte ein kürzeres Überleben und eine verringerte Migration der Tumorzellen zur Folge (69). In klarzelligen Nierenkarzinomen vermittelt L1CAM eine frühe Metastasierung und Chemoresistenz. Dabei scheint der Transkriptionsfaktor Pax-8, der an den L1CAM-Promoter binden kann, eine Rolle zu spielen, da eine Herunterregulierung von Pax-8 mit einer vermehrten L1CAM-Expression einhergeht (70). Auch in Melanomen ist die Expression von L1CAM assoziiert mit früher

Metastasierung. Meier et al. konnten zeigen, dass die L1CAM-Expression in Melanomen assoziiert war mit einer Aktivierung von ERK, was wiederum die Expression von motilitäts- und invasionsfördernden Genen wie Integrin avß3 zur Folge hatte (71).

Auch beim duktalen Pankreasadenokarzinom, das in 80% der Fälle L1CAM exprimiert, konnten einige Mechanismen aufgedeckt werden, über die L1CAM seine tumorfördernde Wirkung entfaltet. Sebens Mürköster et al. konnten zeigen, dass L1CAM besonders stark in chemoresistenten Pankreaskarzinomzellen exprimiert wird und dass Interleukin-1ß ein wichtiger Induktor von L1CAM ist (72). Kiefel et al. fanden weiterhin heraus, dass der Transkriptionsfaktor NF-κB L1CAM in Pankreaskarzinomzellen induzieren kann. Für die erhöhten NF-κB-Spiegel war die Expression von Interleukin-1ß notwendig, die wiederum durch Interaktionen von L1CAM und α5-Integrin hervorgerufen wurde (73). Darüber hinaus konnten Issa et al. weitere Mechanismen aufdecken, über die L1CAM zur Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen beiträgt. So konnte gezeigt werden, dass L1CAM auch auf Gefäß-endothelien in Pankreaskarzinomen exprimiert wird und dass diese Expression durch TGF-ß, TNF-α und INF-γ induziert werden kann. Pankreaskarzinomzellen zeigten eine verstärkte Adhäsion und transendotheliale Migration bei Kontakt mit diesen L1CAM-exprimierenden Endothelien im Vergleich zu normalen Endothelien aus Nabelschnurvenen oder Lungen-kapillaren (74). Patienten, die an einer chronischen Pankreatitis leiden, haben ein erhöhtes Risiko ein duktales Pankreasadenokarzinom zu entwickeln (75). Dieser Tumor entwickelt sich aus Pankreasgangepithelien und Geismann et al. konnten zeigen, dass L1CAM in chronischen Pankreatitiden bereits in normalen Pankreasgangepithelien exprimiert wird. Da die Gewebe chronischer Pankreatitiden durch eine Anreicherung von Myofibroblasten charakterisiert sind, wurde von Geismann et al. weiterhin untersucht, ob diese Myofibroblasten zur Hoch-regulation von L1CAM in Pankreasgangepithel- und Pankreaskarzinomzellen beitragen und welche Mechanismen dabei involviert sind. Die Kokultivierung von Pankreasgangepithelien mit Myofibroblasten führte zu einer erhöhten Expression von L1CAM in den Pankreas-gangepithelien. Als Botenstoff, der diese Induktion vermittelte, konnte TGF-ß1 identifiziert werden. Interessanterweise führte die erhöhte L1CAM-Expression bereits in den normalen Pankreasgangepithelzellen zu Apoptose- bzw. Chemoresistenz sowie einer erhöhten Migrationsfähigkeit der Zellen (75).

1.5.3 L1CAM und CRC

Auch Zellen des CRC exprimieren L1CAM auf ihrer Oberfläche, wobei die Angaben zur Häufigkeit bisher stark variieren. Kato et al. konnten in 43,7% der CRCs eine L1CAM-Expression feststellen, Kaifi et al. nur in 13%, Gavert et al. hingegen in 68% (83-85).
Dass L1CAM auch beim CRC die oben genannten negativen Eigenschaften vermitteln kann, wurde im Jahr 2007 durch zwei Studien belegt werden. In beiden Studien korrelierte die Expression von L1CAM in Gewebeproben kolorekataler Karzinome mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben. Außerdem ging die erhöhte tumoröse L1CAM-Expression einher mit einer vermehrten und früheren Fernmetastasierung und einer Mikrometastasierung in Lymphknoten und ins Knochenmark (84, 86).
Die Signalwege, über die L1CAM in CRC-Zellen induziert wird, und die Mechanismen, durch welche L1CAM seine tumorfördernde Wirkung in dieser Tumorentität ausübt, sind bisher nur zum Teil bekannt. Gavert et al. konnten zeigen, dass L1CAM ausschließlich an der invasiven Front der CRCs exprimiert wird und zwar zusammen mit ADAM 10 (85). Desweiteren fanden sie heraus, dass das L1CAM-Gen Ziel des ß-Catenin-TCF-Signalweges ist, der im CRC schon früh überaktiviert ist. L1CAM-exprimierende Kolonkarzinomzellen zeigten außerdem eine konstitutive Aktivierung des ERK-Signalweges (85). Im Jahr 2010 konnten Gavert et al. in einer weiteren Studie zeigen, dass L1CAM NF-κB aktivieren kann und dass diese Aktivierung für die metastatischen Eigenschaften von L1CAM beim CRC notwendig ist. Dabei schien es so zu sein, dass Ezrin an den zytosolischen Teil von L1CAM bindet und dass L1CAM nur so die Aktivierung von NF-κB bewirken kann (87).
Auch epigenetische Mechanismen scheinen bei der Expression von L1CAM im CRC eine Rolle zu spielen. So konnten Kato et al. feststellen, dass die Expression von L1CAM im CRC häufig mit einer Hypomethylierung des L1CAM-Promoters einhergeht (83).

1.6 Ziele der Arbeit

In vielen Geweben stellt die chronische Entzündung einen Risikofaktor für die Entwicklung von Krebserkrankungen dar. Auch die Entstehung eines CRC wird durch eine langjährige Kolitis, wie sie im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorkommt, begünstigt.

Das CRC gehört zu den Tumoren, bei denen die Expression von L1CAM mit früher Metastasierung und reduziertem Gesamtüberleben einhergeht. An Versuchen mit Pankreasgangepithelzellen konnte vor kurzem gezeigt werden, dass L1CAM nicht erst auf manifesten Karzinomen exprimiert wird, sondern dass es unter entzündlichen Bedingungen durch TGF-ß1 bereits in nicht malignen Pankreasgangepithelzellen induziert werden kann.

In dieser Arbeit sollte daher *in vitro* untersucht werden, ob TGF-ß1 auch in intestinalen Epithelzellen zur Induktion von L1CAM führt. Darüber hinaus sollten die Mechanismen, über die es zur Induktion der L1CAM-Expression kommt, näher aufgeklärt werden. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, ob L1CAM bereits in nicht malignen intestinalen Epithelzellen zum Erwerb von Tumorzelleigenschaften beiträgt, wodurch die Entstehung eines CRC begünstigt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Reagenzien wurden im analytischem Reinheitsgrad von den Firmen Merck, Darmstadt, oder Sigma-Aldrich, München, bezogen.

BSA, Fraktion V	Biomol, Hamburg
Caspase Glo 3/7 Assay	Promega, Mannheim
DNA from Salmon testis	Sigma-Aldrich, München
dNTP	Applied Biosystems, Darmstadt
DTT	Biomol, Hamburg
Dual Glow Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Effektene™ Reagenz	Qiagen, Hilden
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
HEPES	Gibco, Karlsruhe
Irinotecan	Pfizer, Berlin (bezogen über die Kranken-hausapotheke)
Kollagen Typ I, from calf skin	Sigma-Aldrich, München
Maxima™ Sybr Green Master Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
M3:Base™	Incell Corporation, San Antonio (USA)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
M-MLV-Reverse Transkriptase	Promega, Heidelberg
Oligo-dT-Primer	Promega, Heidelberg
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
PBS	PAA, Pasching, Österreich
PMSF	Sigma-Aldrich, München
Polyacrylamid-Lösung	Biomol, Hamburg

Proteinase Inhibitor, complete Mini EDTA free	Roche, Mannheim
Protein A/G-Agarose	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Proteinbestimmungsassay DC	Bio-Rad, München
Proteinmarker Page Ruler™	Fermentas, St. Leon-Rot
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNAse A	Boehringer, Mannheim
RNAse Inhibitor, Rnasin	Gibco BRL, Eggenstein
RNeasy Total RNA Kit	Qiagen, Hilden
RPMI-Medium	Biochrom KG, Berlin
TGF-β1	R&D Systems, Wiesbaden
Killer-TRAIL	Alexis Biochemicals, Grünberg
Trypsin/EDTA	PAA, Paschig, Österreich

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Gradientengele 4-20%	Anamed Elektrophorese, Groß Bieberau
Optical Tape	Bio-Rad, München
Pasteurpipette Glas 230mm	Assistent, Sondheim
96-Well-PCR-Platten	Corning, Amsterdam, Niederlande
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
15 ml-/ 50 ml-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Roti-PVDF Membran	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Thin certs-TC-Einsätze	Greiner, Frickenhausen
Whatman 3MM, Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht

Zellkulturpetrischalen 100x20mm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Geräte

Autoklav	Systec, Wettenberg
Brutschrank	Kendro, Langenselbold
ChemiDOC XRS	Bio-Rad, München
Durchflusszytometer Galaxy Argon Plus	Dako Cytomation, Hamburg
Gasbrenner	Integra Biosciences, Schweiz
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
iCycler MyiQ	Bio-Rad, München
Nano Drop Spectrophotometer 10-10000	peqLab Biotechnology, Erlangen
pH-Meter Mikroprocessor pH537	WTW, Weilheim
Pipet Boy	Integra Biosciences, Schweiz
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
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
Sonicator Sonoplus	Bandelin, Berlin
Sterilwerkbank	Kendro, Langenselbold
Thermomixer/Thermoblock 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge PicoFuge	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Vakuumpumpe	KNF Laboport, Freiburg
Vortexer	Neolab, Heidelberg

Wärmeschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad Julabo U3	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.4 Zelllinien

Die Versuche dieser Arbeit wurden an der Zelllinie NCM460 durchgeführt. Dabei handelt es sich um intestinale Epithelzellen, die aus der normalen Kolonschleimhaut eines 68-jährigen Mannes gewonnen und immortalisiert wurden. Die NCM460-Zellen wachsen *in vitro* sowohl adhärend als auch in Suspension, ihre Populationsverdopplungszeit beträgt 32 Stunden (94). Kultiviert wurden die NCM460-Zellen in M3:Base-Medium (Cat. No.: M300A500), dem 10% FCS zugesetzt wurden. Medium und Zellen wurden bezogen von INCELL Corporation, San Antonio (USA).

2.1.5 Antikörper

Westernblot:

Antikörper	**Spezies / Isotyp**	**Firma**
HSP 90 α/β	Kaninchen/ polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
JNK SAPK	Kaninchen/ polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt
phospho-JNK SAPK	Kaninchen/ polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt
L1CAM/ CD171	Maus/ IgG1	Acris, Hiddenhausen
Slug (G-18X)	Ziege/ polyklonal	Santa Cruz Biotechnology,

		Heidelberg
Smad 2/3	Ziege/ polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Phospho Smad 2	Kaninchen/ polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt
Phospho Smad 3	Kaninchen/ polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt
Smad 4	Maus/ IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
E-Cadherin	Kaninchen/ polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt
Vimentin	Maus/ IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

ChIP-Assay:

Antikörper	**Spezies / Isotyp**	**Firma**
RNA-Polymerase II C21	Kaninchen/ polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Slug (G-18X)	Ziege/ polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kontroll-IgG	Kaninchen/ polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden
Kontroll-IgG	Ziege/ polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.6 Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma Biometra, Göttingen, synthetisiert.

L1CAM

Vorwärtsprimer 5': TCA CGG GCA ACA ACA GCA ACT

Rückwärtsprimer 5': CGG CTT CCT GTC AAT CAT GCT

Slug

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

Rückwärtsprimer 5': GCA AAT GCT CTG TTG CAG TGA

TATA Box Bindungsprotein

Vorwärtsprimer 5': GCT GGC CCA TAG TGA TCT TT

Rückwärtsprimer 5': CTT CAC ACG CCA AGA AAC AG

Primer für ChIP-Assay:

GAPDH

Vorwärtsprimer 5': AGC GCA GGC CTC AAG ACC TT

Rückwärtsprimer 5': AAG AAG ATG CGG CTG ACT GT

Primer für die erste Slug-Bindungsstelle im L1CAM-Promoter (-1241bp)

Vorwärtsprimer 5': GAA GAT GCC CTG CAA GTG CCC

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

Primer für die zweite Slug-Bindungsstelle im L1CAM-Promoter (-433bp)

Vorwärtsprimer 5': ATT CGG GAG AGG TCC CGG GAG T

Rückwärtsprimer 5': AGG AAG GGG GAT GCT CCC TTA GC

2.1.7 siRNAs

siRNA	Firma
L1CAM-siRNA	Invitrogen, Karlsruhe
Smad 2-siRNA	Qiagen, Hilden
Smad 3-siRNA	Qiagen, Hilden
Smad 4-siRNA	Qiagen, Hilden
Slug-siRNA	Qiagen, Hilden
JNK1-siRNA	Qiagen, Hilden
Negativ-Kontroll-siRNA, low	Invitrogen, Karlsruhe
Negativ-Kontroll-siRNA	Qiagen, Hilden

2.1.8 Plasmide

Plasmid	Hersteller
L1CAM	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Peter Altevogt, Heidelberg
pcDNA3.1	Invitrogen, Karlsruhe
pGL3 *basic luciferase vector*	Promega, Heidelberg
pGL3-L1CAM-Promoter-Konstrukte	Hergestellt im Labor für Molekulare Gastroenterologie & Hepatologie, Kiel
pRL-TK	Promega, Heidelberg
Slug	Hergestellt im Labor für Molekulare Gastroenterologie & Hepatologie, Kiel

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die NCM460-Zellen wurden mit FCS in 10% DMSO eingefroren in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die Inkulturnahme wurden die Zellen bei 37°C aufgetaut und mit M3:Base-Medium versetzt. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml M3:Base-Medium resuspensiert. Diese Suspension wurde in eine 75 cm² Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank bei 85% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5% CO_2 kultiviert.
Die Passagierung der Zellen erfolgte zweimal pro Woche und maximal bis zur 25. Passage. Um die Zellen zu passagieren oder für Versuche auszusäen, wurde zunächst der Überstand aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA (1x) für 5-10 Minuten abgelöst. Die Reaktion des Trypsin wurde durch Zugabe von 5 ml M3:Base gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurde das Röhrchen für 10 Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet im M3:Base-Medium resuspensiert. Die Zellen wurden dann in neue Kulturflaschen gegeben oder in Petrischalen, 6-Well- ,12-Well-, oder 24-Well-Platten für Versuche ausgesät. Die Zellzahlbestimmung erfolgte dabei mittels einer Neubauer-Zählkammer, in die 10 µl der Zellsuspension gegeben wurden.
Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen und M3:Base-Medium und Trypsin/EDTA wurden stets vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.2.2 Transfektion

2.2.2.1 Transfektion mit siRNA

Die Transfektion mit siRNA erfolgte mit HiperFect (Qiagen) und wurde durchgeführt, um die Expression bestimmter Gene gezielt zu unterbinden. Die Transfektion der NCM460-Zellen erfolgte in Petrischalen, 6-Well- oder 12-Well-Platten. Vor Beginn der Transfektion wurde das vorhandene M3:Base-Medium abgesaugt und durch frisches M3:Base-Medium ersetzt. In die

Petrischalen wurden 5 ml, in die 6-Well-Platte 2 ml und in die 12-Well-Platte 1 ml frisches Medium gegeben. Anschließend wurde der Transfektionsansatz aus OptiMEM, Transfektionsreagenz und siRNA vermischt. Die verwendeten Mengen ergaben sich dabei aus der Menge an vorgegebenem M3:Base-Medium. So wurde pro Milliliter M3:Base-Medium 100 µl OptiMEM, 6 µl Tansfektionsreagenz und 75 ng siRNA für den Transfektionsansatz verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise in die Schalen/Wells gegeben und die Zellen bis zur weiteren Verarbeitung bei 37°C inkubiert. Ein erneuter Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden.

2.2.2.2 Transfektion mit Plasmiden

Um die NCM460-Zellen mit Plasmiden zu transfizieren, wurde Effektene (Qiagen) verwendet. Die Transfektion erfolgte in 12-Well-Platten. Pro Well wurden dabei 800 µl frisches M3:Base-Medium vorgelegt. Zur Erstellung des Transfektionsansatzes wurden zunächst 75 µl EC-Puffer, 0,1-0,4 µg Plasmid und 8 µl/µg DNA-Enhancer vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden 10 µl/µg DNA-Effektene zugegeben und der Ansatz für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 µl M3:Base-Medium hinzugegeben und 550 µl des Transfektionsansatzes tröpfchenweise in jedes Well gegeben. Ein erneuter Mediumwechsel erfolgte nach 8 Stunden. Die Zellen wurden nach der Transfektion für mindestens 24 Stunden weiter kultiviert.

2.2.3 RNA-Techniken

2.2.3.1 RNA-Isolation und -Quantifizierung

Um die RNA aus den NCM460-Zellen zu gewinnen, wurden die Zellen wie unter 2.2.1 beschrieben in Platten ausgesät, stimuliert und kultiviert.
Das Medium wurde aus den Wells abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Isolation der RNA mithilfe des *RNeasy Total RNA Kits* nach Angaben des Herstellers. Zur Quantifizierung der RNA wurde ihre Konzentration photometrisch bei

260/280 nm mit dem *Nanodrop Photometer* gemessen. Die Lagerung der RNA bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80°C.

2.2.3.2 Reverse Transkription

Um cDNA aus der RNA herzustellen, wurden jeweils 1,5 µg RNA mit RNAse-freiem Wasser auf ein Volumen von 11,4 µl aufgefüllt und 1 µg Oligo-dT-Primer dazugegeben. Die Proben wurden kurz gemischt, anzentrifugiert, für 5 Minuten im Thermoblock auf 70° C erhitzt und danach sofort auf Eis überführt. Anschließend wurden 11,6 µl Mastermix zu jeder Probe gegeben. Zur Fertigstellung der cDNA wurden die Proben erneut gemischt, anzentrifugiert und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

Mastermix je Probe:

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

2.2.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Realtime PCR)

Die relative Quantifizierung der in den Versuchen gewonnenen DNA erfolgte mithilfe der Echtzeit-Polymerasekettenreaktion. Dabei wurden zunächst jeweils 5 µl DNA mit 20 µl Aqua dest. vermischt und jeweils 10 µl der verdünnten DNA in Doppelbestimmung in 96-Well-Platten pipettiert. Anschließend wurden 16 µl Mastermix pro Well hinzugegeben und die 96-Well-Platte mit selbstklebender Folie verschlossen.
Die Durchführung der Echtzeit-Polymerasekettenreaktion erfolgte im iCycler *MyiQ* von Bio-

Rad unter Verwendung der *MyiQ Software*.

Zur Normalisierung der Ziel-DNA wurden die konstitutiv exprimierten Referenzgene TBP oder GAPDH mitbestimmt. Die Normalisierung erfolgte mithilfe der folgenden Formel:

Normalisierte DNA-Menge = $\frac{2^{-(Cycleanzahl\ gesuchtes\ Gen)}}{2^{-(Cycleanzahl\ Referenzgen)}}$.

Zusammensetzung des Mastermix (Fermentas):

- 0,15 µl Vorwärtsprimer
- 0,15 µl Rückwärtsprimer
- 12,5 µl Sybr Green
- 3,2 µl Aqua dest.

2.2.5 Protein-Techniken

2.2.5.1 Herstellung von Ganzzelllysaten

Um die Expression von Proteinen in den Zellen mittels Westernblot zu analysieren, wurden zunächst Ganzzelllysate aus den Zellen hergestellt. Dazu wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 150-200 µl 2x Lämmli-Puffer in jedes Well gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Zellen mit dem Sonicator behandelt (4x1s) und auf Eis gestellt. Die Proben wurden dann entweder bei -20°C eingefroren oder sofort die Proteinkonzentration bestimmt.

Zusammensetzung des 2x Lämmli-Puffers:

- Tris-Base 128 mM
- SDS 4,6%
- Glycerol 10%
- in Aqua dest. pH 7,6

2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration und Einstellung der Proben für den Westernblot

Damit bei der Westernblot-Analyse der Ganzzelllysate gleiche Mengen an Protein je Probe aufgetragen werden konnten, wurde zunächst die Proteinkonzentration bestimmt und die Proben auf die gleiche Menge (10-20 µg) eingestellt.
Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels *Dc-Proteinassay* von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers. Die Messung der Konzentrationen erfolgte mit dem Photometer *Opsys MR* (Dynec Technologies) mithilfe der *Revelation QuickLink Software*.
Zur Einstellung der Proben wurden diese entsprechend ihrer Konzentration auf 15 µl mit 2x Lämmli-Puffer aufgefüllt. Außerdem wurden 5 µl 4x Farbpuffer hinzugegeben, die Proben für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

Zusammensetzung des 4x Farbpuffers:

- Bromphenolblau 0,005% (w/v)
- β-Mercaptoethanol 2,5% (v/v)
- in 2x Lämmli-Puffer

2.2.5.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde eine denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit den eingestellten Proben durchgeführt. Dazu wurden Fertiggele mit einem Acrylamid-Gradienten von 4-20% verwendet.
Die Gele wurden zunächst in eine Gelelektrophoresekammer eingesetzt. Diese wurde mit 1x Laufpuffer befüllt. Anschließend wurden die Taschen des Fertiggels mit den eingestellten Proben oder mit einem kommerziell erhältlichen Proteinstandard befüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 125 V und solange, bis die Lauffront den Unterrand des Gels erreicht hatte.

Zusammensetzung des 10x Laufpuffers:

- Tris-Base 25 mM
- SDS 0,1% (w/v)
- Glycin 190 mM
- in Aqua dest.

2.2.5.4 Protein-Transfer (Westernblot)

Nach der Auftrennung der Proteine erfolgte ihr Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) mittels Semidry-Blotverfahren in einer *Trans-Blot-Cell* (Bio-Rad). Die PVDF-Membran wurde zunächst für zwei Minuten in Methanol gelegt und so aktiviert. Sechs Whatman-Papiere wurden in Puffer A getränkt und auf die Anodenplatte gelegt. Darauf wurden drei in Puffer B getränkte Whatman-Papiere und die PVDF-Membran gelegt. Auf die PVDF-Membran wurde das durchgelaufende Gel aus der SDS-Page gelegt. Es folgten sechs in Puffer C getränkte Whatman-Papiere und die Kathodenplatte. Um die Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran zu transferieren, wurde für 45 Minuten Strom angelegt. Dabei errechnete sich die notwendige Stromstärke folgendermaßen: Stromstärke in mA = Länge in cm x Breite in cm x 1,25 mA/cm².
Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Membran für zehn Minuten in TBS-Tween gewaschen.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Puffer A	Tris-Base	300 mM
	Methanol	20% (v/v)
	in Aqua dest.	pH 11
Puffer B	Tris-Base	25 mM
	Methanol	20%
	in Aqua dest.	pH 10,6

Puffer C	Tris-Base	25 mM
	Methanol	20%
	Aminocapronsäure	0,04 M
	in Aqua dest.	pH 10,6

Zusammensetzung des TBS-Tween-Puffers:

Tris-Base	20 mM
NaCl	140 mM
Tween 20	0,05% (v/v)
in Aqua dest.	pH 7,6

2.2.5.5 Immunnachweis der Proteine

Um die Proteine auf der PVDF-Membran darzustellen, wurden sie zunächst mit Primärantikörpern markiert. Dazu wurde die PVDF-Membran für zwei Stunden mit 5% Milchpulver in TBS-Tween blockiert und anschließend für 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen. Die Primärantikörper wurden nach Herstellerangaben in 5% (w/v) Magermilch in TBS-Tween oder 5% (w/v) BSA in TBS-Tween verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen. Um die Antikörper-markierten Proteine sichtbar machen zu können, wurden die Primärantikörper durch einen Horseradish-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper gebunden. Dazu wurden die Sekundärantikörper 1:2000 in 5% (w/v) Milchpulver in TBS-Tween angesetzt und die Membran darin eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran wieder dreimal für 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen.
Um die Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, wurde nun für eine Minute ein Chemolumineszenz-Substrat auf die Membran gegeben, welches von der Peroxidase umgesetzt wurde und so zu einem Chemolumineszenz-Signal führte. Mittels einer Chemolumineszenz-Geldokumentationsanlage (Chemidoc XRS, Bio-Rad) konnte die Lumineszenz in Form von Banden festgehalten werden.
Als Ladungskontrolle wurde neben den Zielproteinen auch das konstitutiv exprimierte Protein HSP90 dargestellt.

2.2.6 Chromatin-Immunpräzipitationsassay (ChIP-Assay)

Prinzip der Methode

Der ChIP-Assay dient dazu, die Bindung von Proteinen an bestimmte DNA-Sequenzen *in vivo* zu detektieren, und wurde hier angewendet, um die Bindung von Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsenzymen an bestimmte Promoterabschnitte zu untersuchen. Dazu wurden in den lebenden Zellen die an die DNA gebundenen Proteine mit der DNA verlinkt. Anschließend wurde die DNA mittels Ultraschall in kleinere Fragmente (0,1-1kb) zerlegt. Mit einem spezifischen Antikörper und Agarose-Beads wurde der gesuchte Transkriptionsfaktor mitsamt seinem gebundenen DNA-Fragment isoliert.
Anschließend wurde die Verlinkung von DNA und Protein wieder gelöst, die DNA isoliert und eine Realtime PCR des zu untersuchenden Promoterabschnittes angefertigt. Ist viel DNA vorhanden, so spricht dies für eine Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promoter und führt somit zu einem stärkeren Amplifikationssignal. Um die Spezifität dieser Bindung zu überprüfen, wurde der Versuch parallel mit unspezifischen Kontrollantikörpern durchgeführt. Parallel dazu wurde außerdem eine Realtime PCR des Housekeeping-Gens GAPDH angefertigt.

Durchführung

Für den ChIP-Assay wurden pro Versuchsansatz in drei 10 cm-Kulturschalen jeweils $1x10^6$ NCM460-Zellen ausgesät und diese für 48 Stunden kultiviert. Es folgte ein Mediumwechsel auf 5 ml OptiMEM. Achtzehn Stunden später wurden die Zellen entweder für 9 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die Verlinkung von DNA und Protein. Dazu wurden 270 µl einer 18,5% PFA-Lösung ins Medium gegeben und die Zellen für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 500 µl 1,25 molarer Glycin-Lösung in die Schalen gegeben und diese für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 800 µl PBS mit 0,1 ng/µl PMSF in die Schalen pipettiert. Die Zellen wurden dann mit dem Zellschaber abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 2 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 400 µl SDS-Lysispuffer mit 20

µl Protease-Inhibitor-Cocktail resuspendiert.

Als nächster Schritt erfolgte die Fragmentierung der DNA. Dazu wurden die Proben für eine Minute mit dem Ultraschall behandelt. Anschließend wurden sie für 10 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert und die Überstände in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Als Nächstes wurde eine „Preclearance“ zur Vermeidung unspezifischer Bindungen durchgeführt. Dazu wurden 8 ml Dilutionspuffer und je 50 µl Protein G- bzw. A-Agarose mit ins Röhrchen gegeben und dieses für eine Stunde bei 4°C rotiert. Anschließend wurde das Röhrchen für 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert und jeweils 2 ml des Überstandes in je eins von vier Reaktionsgefäßen überführt. In jedes Reaktionsgefäß wurden 2 µg eines Antikörpers gegeben: Slug-Antikörper und RNA-Polymerase-II-Antikörper dienten der spezifischen Bindung, Ziegen- und Kaninchen-Kontrollantikörper wurden parallel zum Vergleich mit aufgearbeitet. Nach Zugabe der Antikörper wurden die Reaktionsgefäße über Nacht bei 4°C rotiert.

Am nächsten Tag erfolgte die spezifische Präzipitation der Antikörper-Protein-DNA-Komplexe. Dazu wurden zu den Proben mit Slug- oder Ziegen-Antikörpern 40 µl Protein G-Agarose gegeben, während zu den Proben mit RNA-Polymerase-II- oder Kaninchen-Antikörpern 40 µl Protein A-Agarose gegeben wurde. Alle Proben wurden anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur rotiert und dann für fünf Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Danach wurden die Proben mit verschiedenen Puffern für jeweils fünf Minuten in folgender Reihenfolge gewaschen:

2x mit Salz-Puffer, 2x mit Hoch-Salz-Puffer, 1x mit 1M Salz-Puffer, 1x mit Lithium-Chlorid-Puffer und 2x mit TE-Puffer. Ein „Waschgang“ bedeutete dabei, dass die Proben mit 1 ml des Puffers für fünf Minuten rotiert wurden. Nach jedem Waschen wurden die Proben für fünf Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen und der nächstfolgende Puffer dazu gegeben.

Nach dem Absaugen des letzten Waschpuffers wurde das Pellet einmal mehr für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand genau abgenommen.

Als nächster Schritt wurde die Bindung an die Agarose wieder aufgehoben. Dazu wurden 100 µl Elutionspuffer auf das Pellet gegeben, beides kurz vermischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für eine Minute bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Pellet wurden weitere 100 µl Elutionspuffer gegeben und die Elution wiederholt.

Danach wurde auch die Bindung zwischen Protein und DNA wieder aufgehoben. Dafür

wurden die Eluate mit 8 µl 5M NaCl-Lösung vermischt und über Nacht bei 65°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 µl einer 10 mg/ml RNase A-Lösung zu den Proben gegeben und diese für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden außerdem 4 µl 0,5 M EDTA, 8 µl 1M Tris HCL (pH 8) und 1 µl Proteinase K hinzugegeben und die Proben für eine Stunde auf 45°C erhitzt.

Daran schloss sich die Aufreinigung der DNA an, die mit dem *PCR Purification Kit* von Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt wurde.

Mit der aufgereinigten DNA wurden Realtime PCRs von den vermeintlichen Slug-Bindungsstellen im L1CAM-Promotor sowie vom Housekeeping-Gen GAPDH angefertigt.

Zur Auswertung wurden die Werte auf GAPDH und auf die Werte der Ziegen- bzw. Kaninchenantikörper normalisiert.

Glycin-Lösung	Glycin	1,25 M
	in Aqua dest.	
SDS-Lysispuffer	SDS	1% (w/v)
	EDTA	10 mM
	Tris HCL	50 mM, pH8
	in Aqua dest.	
Protease-Inhibitor-Cocktail	1 Tablette	*Mini Complete Protease Inhibitor*
	in Aqua dest.	900 µl
Salz-Puffer	SDS	0,1% (w/v)
	Triton X 100	1% (v/v)
	EDTA	2 mM
	Tris HCL	20 mM, pH 8
	NaCl	150 mM
	in Aqua dest.	

Hoch-Salz-Puffer	SDS	0,1% (w/v)
	Triton X 100	1% (v/v)
	EDTA	2 mM
	Tris HCL	20 mM, pH 8
	NaCl	500 mM
	in Aqua dest.	
1M-Salz-Puffer	SDS	0,1% (w/v)
	Triton X 100	1% (v/v)
	EDTA	2 mM
	Tris HCL	20 mM, pH 8
	NaCl	1 M
	in Aqua dest.	
Lithium-Chlorid-Puffer	LiCl	0,25 mM
	Triron X 100	1% (v/v)
	EDTA	1 mM
	Tris HCL	10 mM, pH 8
	in Aqua dest.	
TE-Puffer	EDTA	1 mM
	Tris HCL	10 mM, pH 8
	in Aqua dest.	
Dilutionspuffer	SDS	0,01% (w/v)
	Triton X 100	1,1% (v/v)
	EDTA	1,2 mM
	Tris HCL	16,7 mM, pH 8
	NaCl	167 mM
	in Aqua dest.	

Elutionspuffer	SDS	0,1% (w/v)
	Natriumhydrogencarbonat	84 mg
	ad 10 ml Aqua dest.	
Protein G/A -Agarose	Protein G/A-Agarose	5,4 mg
	BSA	1 µg/µl
	Standard DNA from salmon testis	1 µg/µl
	ad 2 ml Dilutionspuffer	

2.2.7 Luziferase-Assay

Prinzip der Methode

Um zu überprüfen, ob die Bindung des Transkriptionsfaktors Slug zur Aktivierung des L1CAM-Promoters führt, wurden Luziferase-Assays durchgeführt.
Das Prinzip des Luziferase-Assays beruht darauf, dass das Enzym Luziferase, natürlicherweise exprimiert in *Firefly (Photinus pyralis)* und *Renilla reniformis*, die Oxidation von Luziferin bzw. Coelenterazin katalysiert. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer Freisetzung von Licht, welche mit dem Luminometer quantifiziert werden kann. Um die Aktivierung des L1CAM-Promoters zu überprüfen, wurden die Zellen mit Plasmiden transfiziert, die den L1CAM-Promoter mit jeweils unterschiedlichen Varianten der möglichen Slug-Bindungsstellen enthielten. Hinter dem L1CAM-Promoter befand sich in den Plasmiden unter anderem das Firefly-Luziferase-Gen. Kam es zu einer Aktivierung des L1CAM-Promoters, so wurde das Firefly-Luziferase-Gen exprimiert und die daraufhin gebildete Luziferase katalysierte die Oxidation von Luziferin, woraufhin im Luminometer die Emission von Licht gemessen werden konnte. Zur Normalisierung wurden die Zellen außerdem mit Plasmiden transfiziert, die konstitutiv das Renilla-Luziferase-Gen exprimierten, und das durch die Renilla-Luziferase emitierte Licht wurde ebenfalls gemessen.
Im ersten L1CAM-Promoter gibt es zwei Slug-Bindungsstellen. Um zu überprüfen, ob die Bindung an Slug an eine oder beide Bindungsstellen zur Aktivierung des Promoters führt, wurden Luziferase-Assays mit folgenden Firefly-Luziferase-Konstrukten durchgeführt: das

erste Konstrukt enthielt keine der Slug-Bindungsstellen (Leervektor; pGL3), das zweite Konstrukt enthielt beide Slug-Bindungsstellen (Slug 1/2). Das dritte enthielt ebenfalls beide Bindungsstellen, wobei die erste Slug-Bindungsstelle eine Mutation aufwies (Slug D1/2). Das vierte Konstrukt enthielt beide Bindungsstellen, diesmal enthielt jedoch die zweite Slug-Bindungsstelle eine Mutation (Slug 1/D2). Das fünfte Konstrukt enthielt Mutationen in beiden Slug-Bindungsstellen (Slug D1/D2).

Durchführung

Zunächst wurden die NCM460-Zellen in 12-Well-Platten ausgesät ($1x10^5$ Zellen/Well) und 48 Stunden später mit 0,4 µg des spezifischen Firefly-Plasmids sowie mit 0,1 µg des Renilla-Referenzplasmids transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Effektene (s.o.). Die spezifischen Firefly-Plasmide (= Luziferase-Konstrukte) waren zuvor im Labor hergestellt worden (nachzulesen in 52). Bei einigen Versuchen wurden die Zellen auch mit 0,4 µg eines Slug-Plasmids bzw. mit dem Kontrollplasmid pcDNA3.1 transfiziert. Dies geschah bereits nach 24 Stunden und ebenfalls mit Effektene. Acht Stunden nach einer Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.
In einigen Versuchen erfolgte eine Stimulation mit 10 ng/ml TGF-ß1 32 Stunden nach der letzten Transfektion, die Aufarbeitung der Zellen erfolgte 48 Stunden nach der letzten Transfektion. Dazu wurde zunächst das Medium der Zellen abgesaugt und diese mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 150 µl *1 x Passive Lysis Buffer* in die Wells gegeben, die Zellen mit dem Zellschaber abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt.
Die Durchführung des Luziferase-Assays erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen *Dual Luciferase Reporter Assay System* von Promega im *Microplate Luminometer LB96V.* Die Lysate wurden zunächst für eine Minute bei 13000 UpM zentrifugiert und 20 µl des Überstandes jeder Probe in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 25 µl der Lösung LAR II ebenfalls in die Wells gegeben und mithilfe des Luminometers die Lumineszenz der Firefly-Luziferase gemessen. Die Lumineszens der Renilla-Luziferase wurde danach, durch Zugabe von 25 µl *Stop and Glow Substrat* und erneute Messung im Luminometer, ermittelt.
Zur Auswertung wurden die Messergebnisse der Firefly-Luziferase auf die der Renilla-Luziferase bezogen.

2.2.8 Caspase-Assay

Prinzip der Methode

Veränderungen der Apoptosesensitivität der NCM460-Zellen auf unterschiedliche Stimuli wurden mithilfe des *Caspase Glo 3/7 Assays* der Firma Promega untersucht. Bei der Apoptose von Säugetierzellen spielen die Caspasen 3 und 7 eine wichtige Rolle und mittels des *Caspase Glo 3/7 Assays* lässt sich die Aktivität dieser beiden Caspasen bestimmen. Dazu wurde zu einer zu untersuchenden Zellsuspension ein prolumineszentes Substrat (im *Caspase Glow* enthalten*)* der Caspasen 3 und 7 gegeben. Wenn die Caspasen dieses Substrat spalteten, entstand ein Produkt, welches wiederum durch im *Caspase Glow* enthaltene rekombinante Luziferase umgesetzt werden konnte. Dabei wurde Licht freigesetzt, welches im Luminometer quantitativ gemessen werden konnte.

Durchführung

Die Zellen wurden zunächst in 6- oder 12-Well-Platten ausgesät und entsprechend dem Versuchsaufbau stimuliert. Zur Aufarbeitung wurden die Überstände aus den Wells abgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die in den Wells verbliebenen Zellen wurden mit EDTA/Trypsin abgelöst und ebenfalls ins Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1200 UpM. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert. Daraus wurden 2x 25 µl für eine Doppelbestimmung in eine weißummantelte 96-Well-Platte pipettiert und 25 µl *Caspase Glow* hinzugegeben. Nach einer Inkubation unter Lichtausschluss von 30 Minuten wurde im Luminometer die Caspase-3/7-Aktivität der Zellen gemessen. Um die Caspaseaktivität normalisieren zu können, wurden die übrigen 450 µl der Zellsuspension auf 800 µl mit PBS aufgefüllt und eine Zellzahlbestimmung mit dem Durchflusszytometer *Galaxy Argon Plus* unter Verwendung der Software *Flomax* durchgeführt.

2.2.9 Migrationsassay

Prinzip der Methode

Um die Migrationsfähigkeit der NCM460-Zellen zu bestimmen, wurde ein System aus 24-Well-Platten und Transwell-Einsätzen verwendet. Dabei hatten die Transwell-Einsätze 8 µm große Poren, die groß genug waren, um den Zellen das Migrieren auf die Unterseite des Transwell-Bodens zu ermöglichen. Die Zellen wurden in die Transwells ausgesät und nach 24 Stunden wurde die Migrationsrate photometrisch gemessen. Dazu wurden in einem Ansatz alle Zellen, also die oberhalb und unterhalb des Transwell-Bodens befindlichen Zellen, mit Kristallviolett angefärbt und die Stärke der Anfärbung photometrisch bestimmt. In einem zweiten Ansatz wurden nur die migrierten Zellen, also die sich unterhalb des Transwells befindlichen Zellen, mit Kristallviolett angefärbt und die Anfärbung ebenfalls mit dem Photometer gemessen.
Aus folgender Formel ließ sich dann die Migrationsrate der Zellen errechnen:

$$\text{Prozentuale Migrationsrate} = \frac{OD500nm\ der\ migrierten\ Zellen\ x\ 100}{OD500nm\ der\ gesamten\ Zellen}$$

Durchführung

Zunächst wurden die Transwell-Einsätze mit einer Kollagen I-Lösung beschichtet. Dazu wurden 50 µl der Lösung auf dem Transwell-Netz verteilt und für zwei Stunden unter der Sterilbank eintrocknen gelassen. Nachdem die Lösung getrocknet war, wurden die Wells mit 500 µl RPMI-Medium +1% FCS befüllt und die Transwells eingehängt. Anschließend wurden $5x10^4$ Zellen in 500 µl Medium in die Transwells ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.
Danach wurde das Medium aus den Wells und Transwells entfernt und die Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Dazu wurden die Transwell in einer neuen 24-Well-Platte für 30 Minuten mit 600 µl Kristallviolett inkubiert. Bei den Ansätzen, bei denen nur die migrierten Zellen angefärbt werden sollten, wurden vorher die nicht migrierten Zellen, die sich noch auf der Oberseite der Transwells befanden, mit einem Wattestäbchen sorgfältig entfernt.
Nach dem Färben wurden die Zellen dreimal mit 1500 µl Aqua dest. für je 15 Minuten

gespült. Anschließend erfolgte das Entfärben der Zellen. Dazu wurden die Transwells für 1,5 Stunden in 500 µl 10% Essigsäure inkubiert.
Danach erfolgte die Auswertung der Färbung im Plattenphotometer *Opys MR* bei 500 nm.

Beschichtungslösung	Kollagen I in Aqua dest.	400 µg/ml
Kristallviolett-Lösung	Kristallviolett	300 mg
	Ethanol 2% (v/v)	6 ml
	Borat-Puffer (0,1 M, pH 8,5)	300 ml

2.2.10 Statistik

Die statistischen Berechnungen dieser Arbeit wurden mit dem Programm *Microsoft Excel* durchgeführt. Es wurde der zweiseitige *Students T Test* verwendet. Als signifikant galt ein p-Wert von weniger als 0,05.

3 Ergebnisse

3.1 TGF-ß1 induziert die Expression von L1CAM in NCM460-Zellen

Viele Karzinome exprimieren L1CAM, was in den Tumorzellen offenbar in einer vermehrten Migrationsfähigkeit und einer erhöhten Chemo- bzw. Apoptoseresistenz resultiert (68-93). Dass auch schon normale Epithelzellen unter entzündlichen Bedingungen L1CAM exprimieren können, konnte an Pankreasgangepithelien gezeigt werden. Hier ließ sich L1CAM in den Zellen unter anderem durch Stimulation mit TGF-ß1 induzieren (75).
Wie das Pankreasadenokarzinom entsteht auch das CRC häufig auf dem Boden einer chronischen Entzündung (15-18). Und auch das CRC ist durch eine hohe L1CAM-Expression charakterisiert (83-85). Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob auch schon die normalen Epithelien der Darmmukosa unter entzündlichen Bedingungen L1CAM exprimieren und ob dieses einen frühen Schritt in der Karzinogenese des CRC darstellen könnte.
Um zu überprüfen, ob TGF-ß1 auch zu einer Hochregulation von L1CAM in intestinalen Epithelzellen führt, wurden Zellen der intestinalen Epithelzelllinie NCM460 mit TGF-ß1 stimuliert und die Effekte auf die L1CAM-Expression ermittelt. Dafür wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und für 24 bzw. 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen zu Ganzzelllysaten aufgearbeitet oder es wurde eine RNA-Isolation durchgeführt. Die L1CAM-Expression wurde dann mittels Westernblot auf Proteinebene und mittels RT-PCR auf RNA-Ebene ermittelt.
Es zeigte sich, dass TGF-ß1 auch in den NCM460-Zellen eine erhöhte Expression von L1CAM induzieren kann (Abb. 3). Die größte Menge an L1CAM ließ sich dabei sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nach 24-stündiger Stimulation mit TGF-ß1 feststellen.

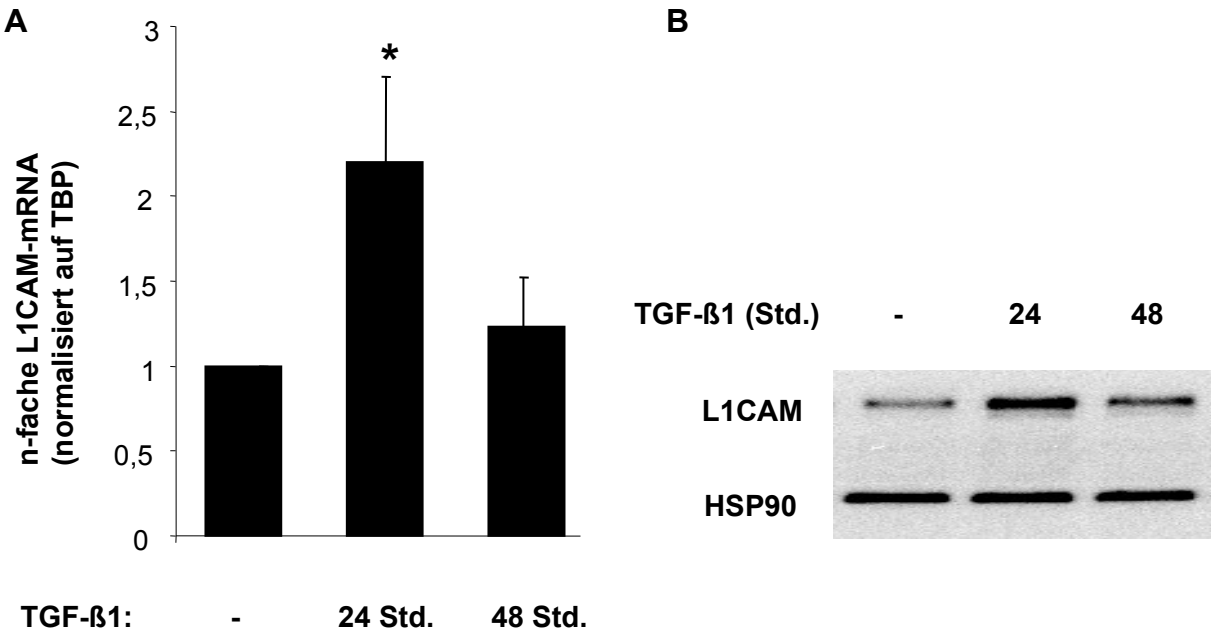

Abbildung 3. TGF-ß1 induziert die Expression von L1CAM in NCM460-Zellen.
NCM460-Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 24 bzw. 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert. **A** zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung von fünf L1CAM-RT-PCRs, *=p<0,05.
B zeigt ein repräsentatives Westernblot-Ergebnis von insgesamt drei Westernblots. HSP90 diente als Ladungskontrolle.

3.2 Durch TGF-ß1 induzierte EMT-assoziierte Veränderungen in NCM460-Zellen

Die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) ist ein Mechanismus, über den Zellen einen invasiven Phänotyp erhalten können (24-31). Durch die EMT entwickeln Zellen eine spindelförmige Morphologie und exprimieren vermehrt mesenchymale Marker wie Vimentin und N-Cadherin (23). Einen wichtigen Schritt der EMT stellt die Herunterregulation des epithelialen Markerproteins E-Cadherin dar (22). TGF-ß1 gilt als einer der Hauptinduktoren der EMT (21, 22).
Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob TGF-ß1 auch in intestinalen Epithelzellen EMT-assoziierte Veränderungen hervorruft und so eine maligne Transformation der Zellen möglicherweise begünstigt.

Dafür wurden NCM460-Zellen für 24 bzw. 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert und lichtmikroskopische Bilder angefertigt, die es erlaubten, morphologische Veränderungen der Zellen zu beurteilen.

In den lichtmikroskopischen Bildern fiel auf, dass die NCM460-Zellen durch die Stimulation mit TGF-ß1 vermehrt eine spindelförmige Morphologie annahmen und dass dieser Effekt ausgeprägter wurde, je länger die Zellen mit TGF-ß1 stimuliert wurden (Abb. 4).

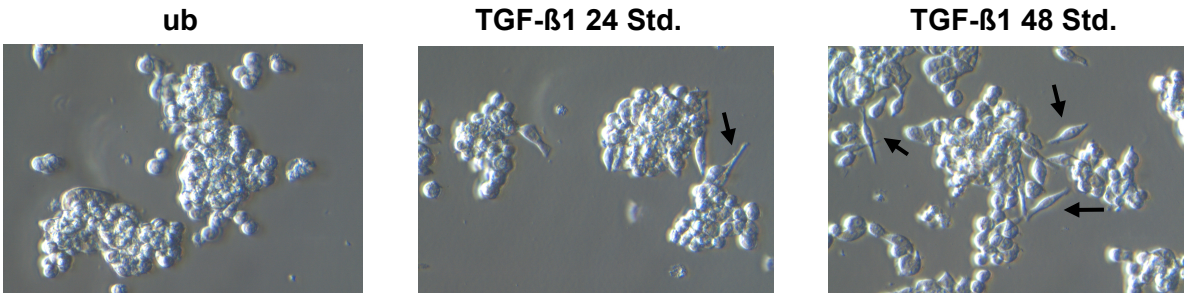

Abbildung 4. Durch TGF-ß1 induzierte morphologische Veränderungen in NCM460-Zellen. NCM460-Zellen wurden für 24 bzw. 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert. Vergrößerung 200 fach.

Außerdem wurden die Zellen zu Ganzzelllysaten verarbeitet und Westernblots der EMT-Marker E-Cadherin und Vimentin angefertigt.

In den Westernblots zeigte sich allerdings keine Veränderung der Expression des epithelialen Markers E-Cadherin sowie keine vermehrte Expression des mesenchymalen Markers Vimentin (Abb. 5). Als Kontrolle wurde auch ein Westernblot mit Zellen der Pankreas-karzinomzelllinie Panc1 angefertigt. In Panc1-Zellen, die durch einen mesenchymalen Phänotyp charackterisieriert sind (75), konnte eine deutliche Expression von Vimentin sowie das Fehlen von E-Cadherin nachgewiesen werden.

Diese Versuche zeigen daher, dass TGF-ß1 neben einer Expression von L1CAM auch morphologische Veränderungen in den NCM460-Zellen induziert. Dies hat jedoch nach 24- bzw. 48-stündiger TGF-ß1-Stimulation keinen Einfluss auf die Expression von E-Cadherin oder Vimentin.

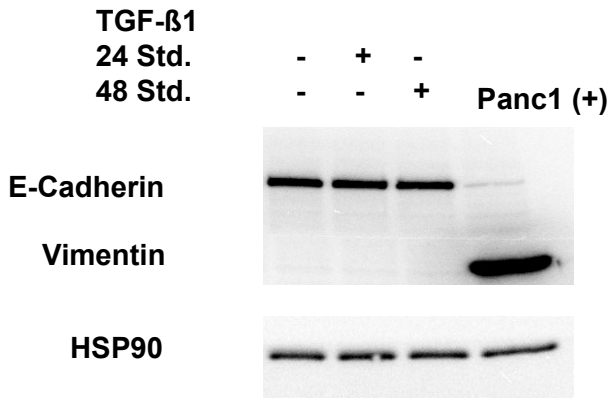

Abbildung 5. TGF-ß1 induziert keine Veränderungen der Expression von E-Cadherin und Vimentin in NCM460-Zellen. NCM460-Zellen wurden für 24 bzw. 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert und Westernblots auf Vimentin und E-Cadherin angefertigt. Zur Kontrolle wurden Westernblots von Panc1-Zellen angefertigt. Als Ladungskontrolle diente HSP90. Ein repräsentativer Westernblot von drei Westernblots ist gezeigt.

3.3 Die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression ist Smad-unabhängig

Wie in Kapitel 1 beschrieben, kann TGF-ß1 Smad-abhängige und Smad-unabhängige Signalwege in Zellen aktivieren (38-41). Über welchen Signalweg die L1CAM-Expression durch TGF-ß1 induziert wird, sollte in den folgenden Versuchen untersucht werden.

Dazu wurden NCM460-Zellen zunächst mit Kontroll-siRNA oder mit Smad 2-, 3-, oder 4-spezifischer siRNA transfiziert und nach 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert. Im Westernblot wurde dann überprüft, ob sich dadurch die durch TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression reduzierte.

Wie Abb. 6A zeigt, ließ sich trotz *Knockdown* der verschiedenen Smad-Proteine L1CAM durch TGF-ß1 ähnlich stark induzieren, wie in den Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren. Abbildung 6B zeigt, dass die Transfektion mit Smad 2-, 3-, oder 4-spezifischer siRNA in einer deutlich verminderten Expression der jeweiligen Smad-Proteine resultierte. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die L1CAM-Expression durch TGF-ß1 über einen Smad-unabhängigen Signalweg induziert werden muss.

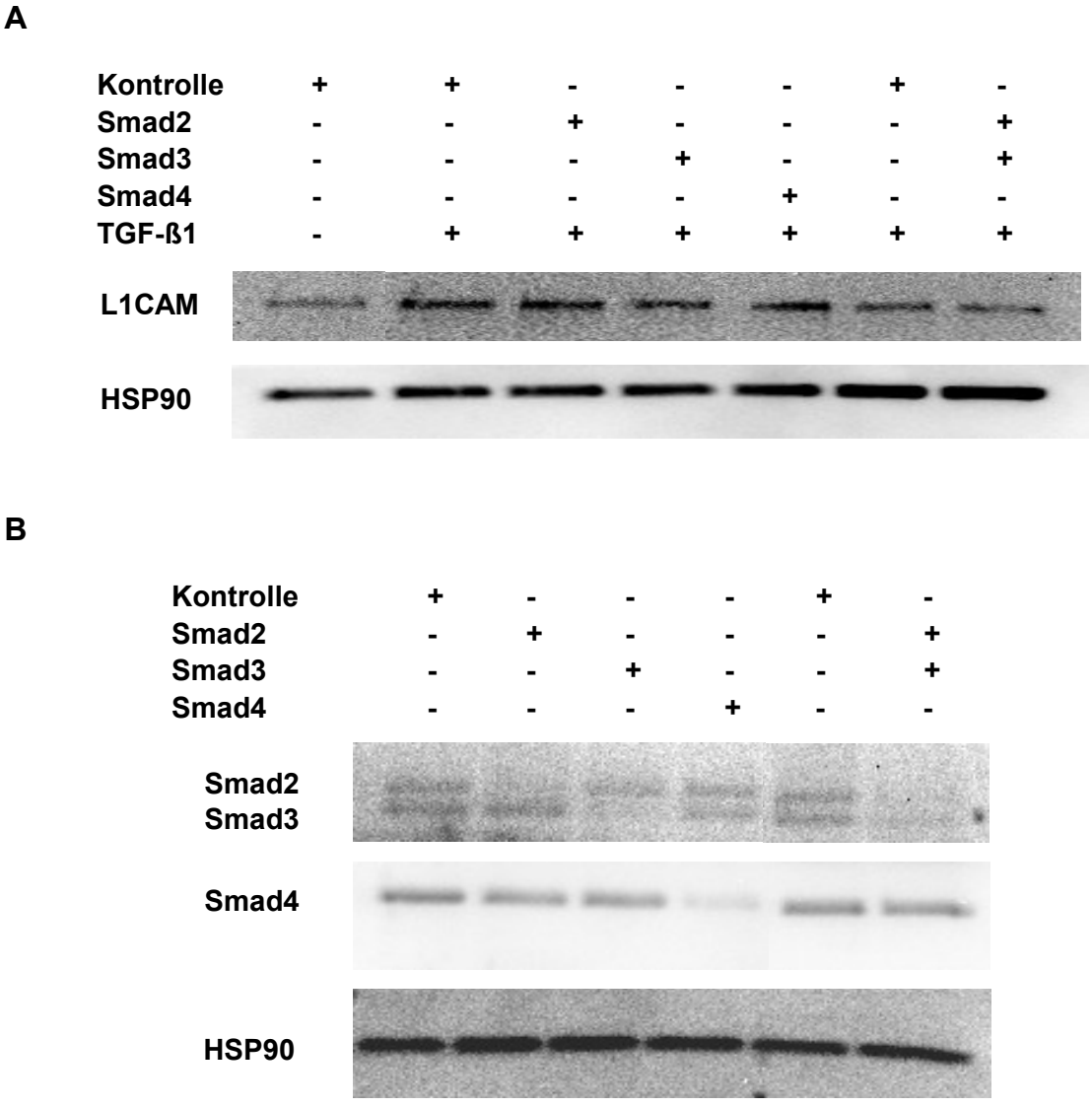

Abbildung 6. Die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression ist Smad-unabhängig.

NCM460-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder mit Smad 2-, 3-, oder 4-siRNA transfiziert. Danach wurden die Zellen mit 10 ng/ml TGF-ß1 für 24 Stunden stimuliert. **A** zeigt die Expression von L1CAM in diesen Zellen. In **B** wurden zur Kontrolle der Transfektion Westernblots von Smad 2, 3 und 4 angefertigt. HSP90 diente als Ladungskontrolle. Gezeigt ist je ein repräsentativer Westernblot von jeweils drei unabhängigen Versuchen.

3.4 Die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression ist abhängig von der Aktivierung von JNK und Slug

Im vorherigen Versuch konnte gezeigt werden, dass TGF-ß1 die L1CAM-Expression in den NCM460-Zellen Smad-unabhängig induziert. Bisher konnten verschiedene Smad-unabhängige TGF-ß-Signalwege identifiziert werden (s. Kapitel 1.4). Über welchen dieser Signalwege die L1CAM-Expression in den intestinalen Epithelzellen durch TGF-ß1 induziert wird und welche Transkriptionsfaktoren dabei eine Rolle spielen, war bisher noch nicht bekannt. In Pankreasgangepithelien konnte gezeigt werden, dass die Heraufregulation von L1CAM durch TGF-ß1 über die Aktivierung von JNK erfolgt, die wiederum zur Induktion des Transkriptionsfaktors Slug führt (75). Es sollte daher zunächst überprüft werden, ob auch in den NCM460-Zellen die TGF-ß1-induzierte Expression von L1CAM über JNK und Slug reguliert wird.

Dazu wurden NCM460-Zellen in 12-Well-Platten ausgesät und entweder mit Kontroll-siRNA, JNK-siRNA oder Slug-siRNA transfiziert. Vierundzwanzig Stunden später wurden alle Ansätze für neun Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert und die L1CAM- und Slug-RNA-Menge mittels RT-PCR bestimmt.

Dabei zeigte sich in den mit JNK- und Slug-siRNA transfizierten Ansätzen eine deutliche Reduktion der L1CAM-RNA-Menge (Abb. 7). Auch die Expression von Slug ließ sich sowohl in den mit JNK-siRNA als auch den mit Slug-siRNA behandelten Zellen reduzieren.

Dass der *Knockdown* von JNK zu einer Reduktion der Slug-RNA-Menge führte, deutet darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor Slug ein Zielgen des JNK-Signalweges ist.

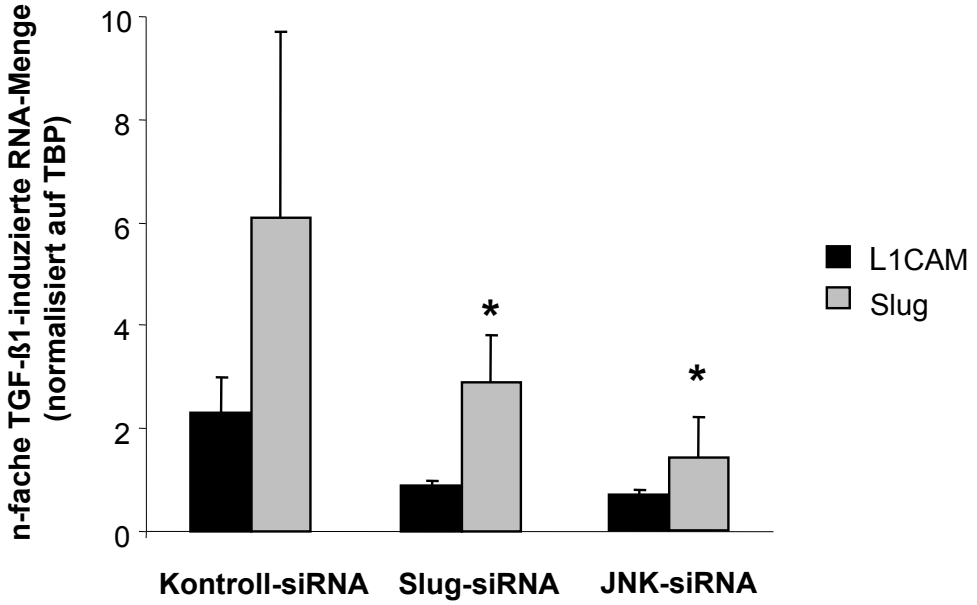

Abbildung 7. Die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression ist abhängig von JNK und Slug.
NCM460-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder spezifischer JNK- bzw. Slug-siRNA transfiziert und für 9 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 behandelt. Auswirkungen auf die L1CAM- und Slug-Expression wurden mittels RT-PCR ermittelt. Hier gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf unabhängig durchgeführten Versuchen, *=$p<0,05$.

Um zu untersuchen, ob die siRNA-vermittelte Unterdrückung von JNK und Slug auch in einer verminderten Expression von L1CAM auf Proteinebene resultiert, wurden NCM460-Zellen ebenfalls mit Kontoll-siRNA, JNK-siRNA oder Slug-siRNA transfiziert und jeweils ein Ansatz unbehandelt belassen und der zweite Ansatz mit 10 ng/ml TGF-ß1 für 24 Stunden stimuliert (Abb. 8).

Auch hier zeigte sich deutlich, dass sich die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression durch *Knockdown* von JNK oder Slug aufheben lässt. In den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen konnten nach TGF-ß1-Stimulation neben einer erhöhten Menge von L1CAM auch erhöhte Mengen an JNK und Slug beobachtet werden. Auch diese Induktion war in den JNK- bzw. Slug-siRNA behandelten Zellen aufgehoben, was die Transfektionseffizienz belegt.

Insgesamt lässt sich aus diesen Versuchen (Abb. 7 und 8) schließen, dass sowohl JNK als auch Slug für die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression notwendig sind.

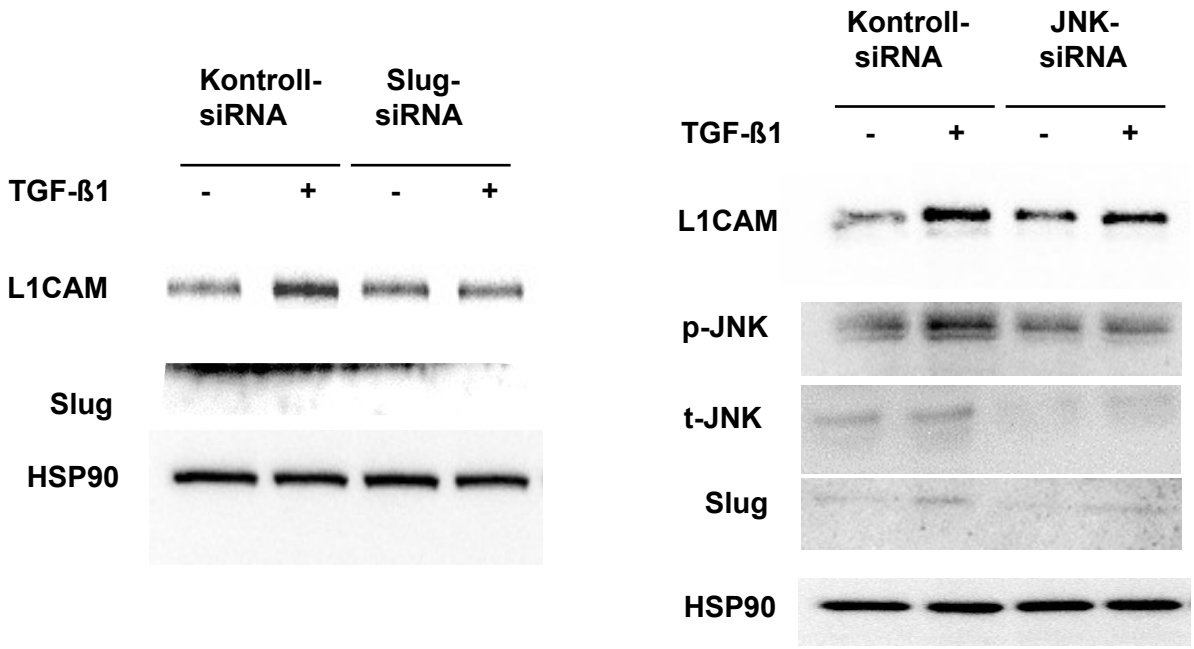

Abbildung 8. Die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression ist abhängig von JNK und Slug.
NCM460-Zellen wurden mit Kontroll-, Slug- oder JNK-siRNA transfiziert und entweder unbehandelt belassen oder für 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert. Hier gezeigt sind repräsentative Westernblots von L1CAM, Slug, phosphoryliertem JNK (p-JNK) und Gesamt-JNK (t-JNK). HSP90 diente der Ladungskontrolle.

3.5 Slug bindet an den L1CAM-Promoter

Im vorherigen Versuch konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Slug für die durch TGF-ß1 induzierte L1CAM-Expression notwendig ist. In den folgenden Versuchen sollte die Bindung an und die Aktivierung des L1CAM-Promoters durch Slug genauer untersucht werden. Wie in Kapitel 1 beschrieben, wurden bereits zwei mögliche Slug-Bindungsstellen an den Positionen -1241 und -433 im ersten L1CAM-Promoter identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass in Pankreasgangepithelien die Stimulation mit TGF-ß1 zu einer direkten Bindung von Slug an beide Bindungsstellen und zur Aktivierung des L1CAM-Promoters führt (52).
Daher sollte zunächst überprüft werden, ob Slug auch in den NCM460-Zellen nach

Stimulation mit TGF-ß1 an die oben genannten beiden Bindungsstellen bindet. Dazu wurden ChIP-Assays mit den NCM460-Zellen durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen in Petrischalen ausgesät und für neun Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation parallel mit Slug-Antikörpern und RNA-Polymerase-II-Antikörpern sowie zur Normalisierung außerdem mit unspezifischen Ziegen- und Kaninchen-Antikörpern. Die Immunpräzipitation mit RNA-Polymerase-II wurde dabei durchgeführt, um neben der Bindung von Slug auch eine damit verbundene Transkriptionsaktivität nachzuweisen. Zur Auswertung wurden Realtime PCRs mit Primern, die die erste und die zweite mögliche Slug-Bindungsstelle im L1CAM-Promoter umspannten, angefertigt. Zur Normalisierung wurde eine Realtime PCR des Housekeeping-Gens GAPDH durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass die Stimulation der Zellen mit TGF-ß1 zu einer vermehrten Bindung von Slug und RNA-Polymerase-II an beide Slug-Bindungsstellen führt (Abb. 9).

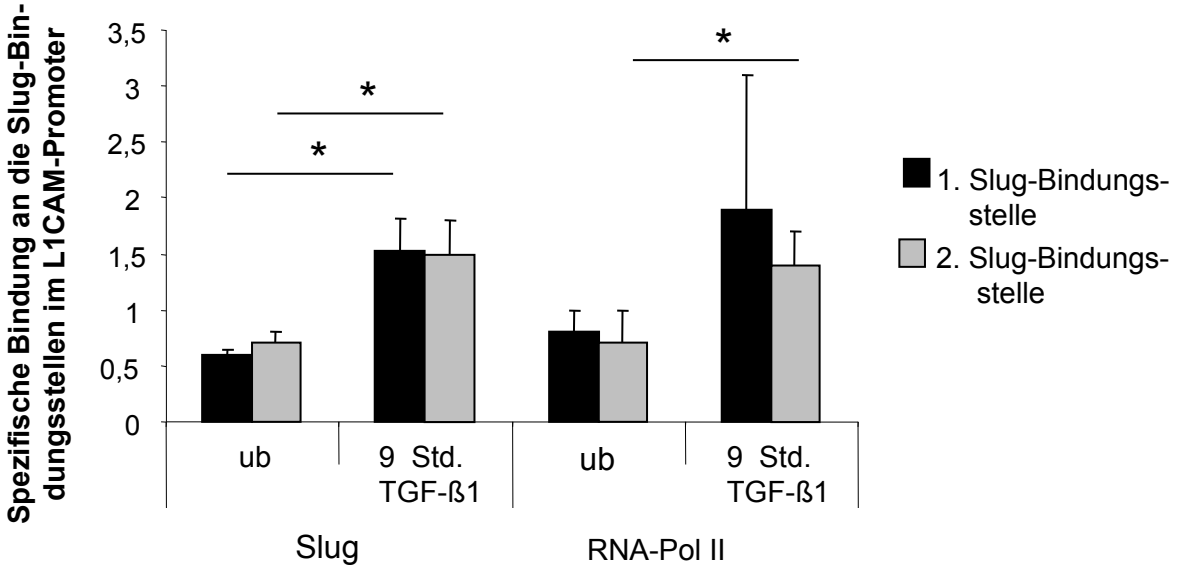

Abbildung 9. Slug bindet an den L1CAM-Promoter.

NCM460-Zellen wurden unbehandelt belassen (ub) oder für 9 Stunden mit TGF-ß1 stimuliert. Anschließend wurden ChIP-Assays mit Slug- oder RNA-Polymerase-II-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier ChIP-Assays (*=$p<0,05$), die auf GAPDH und Kontroll-IgG normalisiert wurden.

Um dieses Ergebnis weiter zu bestätigen, wurden in einem weiteren Versuch die NCM460-Zellen mit Slug-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert. Ansonsten wurde wie im vorherigen Versuch vorgegangen.

Wie in Abbildung 10 gezeigt, wiesen die mit Slug-siRNA transfizierten Zellen eine deutlich geringere Bindung von Slug und RNA-Polymerase-II an beide Slug-Bindungsstellen auf im Vergleich zu Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

Diese Versuche zeigen, dass Slug in NCM460-Zellen direkt an beide möglichen Bindungsstellen im ersten L1CAM-Promoter bindet. Dass auch die RNA-Polymerase-II an beiden Bindungsstellen nachgewiesen werden konnte, deutet auf eine Aktivierung des L1CAM-Promoters durch Slug hin, die in den folgenden Versuchen genauer untersucht werden sollte.

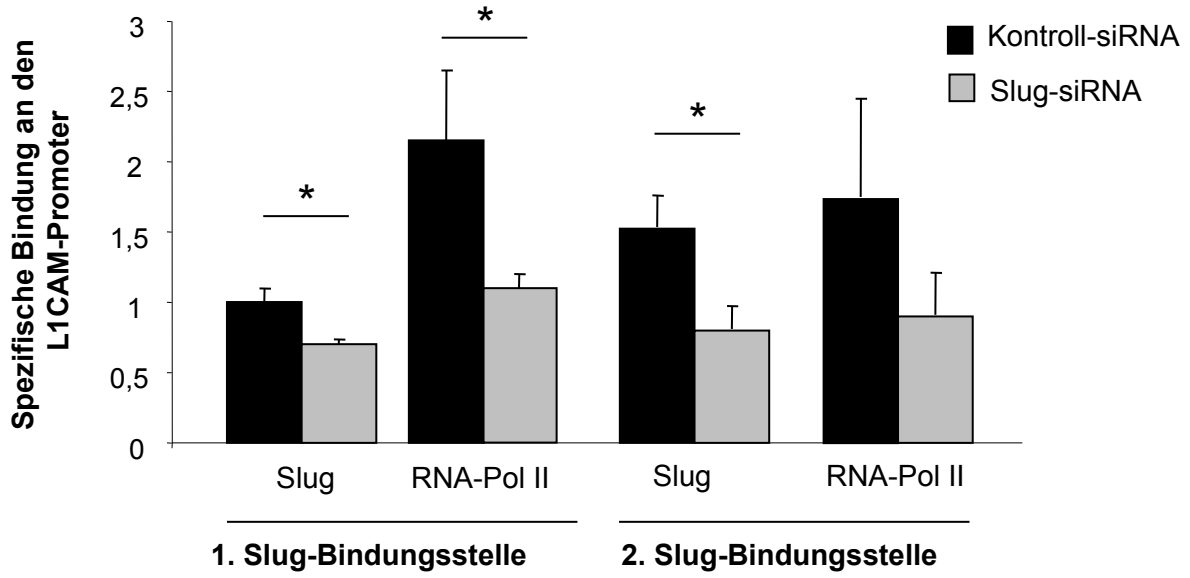

Abbildung 10. Verminderte Bindung an den L1CAM-Promoter von Slug und RNA-Polymerase II in Slug-siRNA-transfizierten Zellen. NCM460-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder Slug-siRNA transfiziert und für 9 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert. Es wurden ChIP-Assays mit Slug- und RNA-Polymerase-II-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier ChIP-Assays (*=$p<0,05$), die auf GAPDH und Kontroll-IgG normalisiert wurden.

3.6 Slug aktiviert den L1CAM-Promoter

Dass Slug in den NCM460-Zellen an beide Slug-Bindungsstellen des L1CAM-Promoters bindet, konnte in den ChIP-Assays gezeigt werden. Mithilfe von Luziferase-Assays sollte nun die Aktivierung des L1CAM-Promoters durch Slug genauer untersucht werden. Dabei wurden NCM460-Zellen mit verschiedenen Promoterkonstrukten transfiziert, die beide Slug-Bindungsstellen oder Mutationen in einer oder beiden Bindungsstellen enthielten. Da das Firefly-Luziferase-Gen auf den Plasmiden den Promoterkonstrukten nachgeschaltet war, führte die Aktivierung des L1CAM-Promoters zu einer Expression der Firefly-Luziferase.
Zunächst wurden die NCM460-Zellen entweder mit einem Kontrollplasmid oder mit einem Plasmid transfiziert, das beide der möglichen Slug-Bindungsstellen enthielt. Beide Ansätze wurden zur Normalisierung außerdem mit Renilla-Plasmiden transfiziert. Anschließend wurden die Zellen beider Ansätze für 16 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert und Luziferase-Assays durchgeführt.
Wie in Abbildung 11 gezeigt, wiesen die Zellen, die mit dem Promoterkonstrukt transfiziert worden waren, das beide Slug-Bindungsstellen enthielt, eine signifikant höhere Luziferase-Aktivität auf, als die Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert worden waren. Dies lässt darauf schließen, dass die Stimulation der Zellen mit TGF-ß1 Slug-abhängig zu einer Aktivierung des L1CAM-Promoters führt.

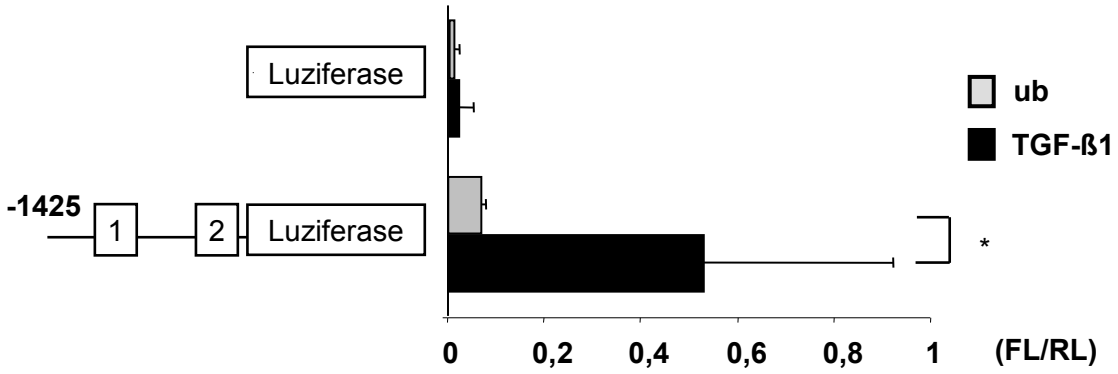

Abbildung 11. Die Stimulation von NCM460-Zellen mit TGF-ß1 aktiviert den L1CAM-Promoter. NCM460-Zellen wurden mit dem 1425bp-L1CAM-Promoterkonstrukt oder mit einem Kontrollvektor transfiziert und mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert oder unbehandelt (ub) belassen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen, es wurde jeweils die Aktivität der Firefly-Luziferase auf die Aktivität der Renilla-Luziferase normalisiert (FL/RL), *=$p<0,05$.

Um die Rolle des Transkriptionsfaktors Slug bei der Aktivierung des L1CAM-Promoters zu verdeutlichen, wurden NCM460-Zellen entweder mit einem Slug-Plasmid oder einem Kontrollplasmid (pcDNA3.1) transfiziert und nach 24 Stunden mit einem L1CAM-Promoterkonstrukt, das beide Slug-Bindungsstellen enthielt, oder einem Kontrollvektor kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden Luziferase-Assays durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass die mit rekombinantem Slug transfizierten Zellen eine signifikant höhere Luziferase-Aktivität aufwiesen, als die mit dem Kontrollplasmid (pcDNA3.1) transfizierten Zellen (Abb. 12).

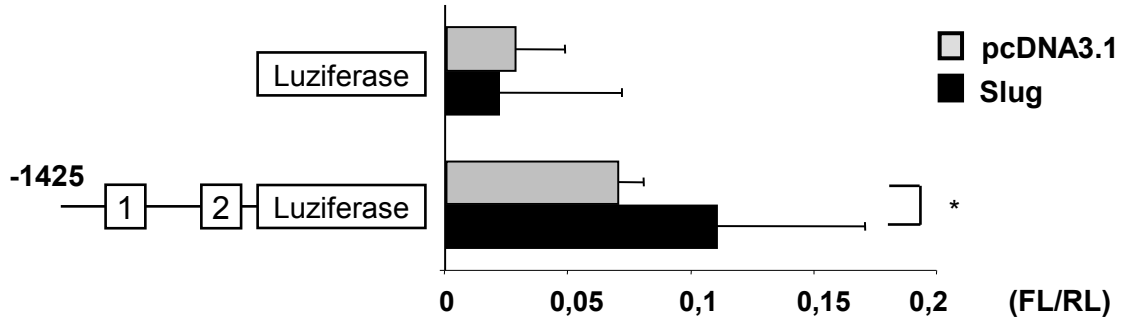

Abbildung 12. Slug aktiviert den L1CAM-Promoter.

NCM460-Zellen wurden mit einem Slug-Plasmid oder einem Kontrollplasmid (pcDNA3.1) transfiziert und mit dem 1425bp-L1CAM-Promoterkonstrukt oder einem Kontrollvektor kotransfiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Luziferase-Assays, es wurde jeweils die Aktivität der Firefly-Luziferase auf die Aktivität der Renilla-Luziferase normalisiert (FL/RL), *=$p<0,05$.

In den ChIP-Assays (Kap. 3.5) konnte gezeigt werden, dass Slug an beide Slug-Bindungsstellen im L1CAM-Promoter bindet. Es sollte nun näher untersucht werden, ob die Bindung an beide oder an eine der Bindungsstellen zu einer Aktivierung des L1CAM-Promoters führt. Dazu wurden NCM460-Zellen mit verschiedenen Promoterkonstrukten und Renilla-Referenzplasmiden transfiziert. Folgende Firefly-Luziferase-Konstrukte wurden dabei eingesetzt: das erste Konstrukt enthielt keine der beiden Slug-Bindungsstellen; das zweite enthielt beide Bindungsstellen (Slug 1/2); das dritte Konstrukt enthielt ebenfalls beide Bindungsstellen, wobei die erste Slug-Bindungsstelle mutiert worden war (Slug D1/2); das vierte enthielt beide Bindungsstellen, diesmal enthielt jedoch die zweite Slug-Bindungsstelle eine Mutation (Slug 1/D2); das fünfte Konstrukt enthielt Mutationen in beiden Slug-Bindungsstellen (Slug D1/D2).

Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 16 Stunden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert und anschließend Luziferase-Assays durchgeführt.

Wie Abbildung 13 zeigt, wiesen sowohl Zellen, die mit den Konstrukten mit zwei intakten Slug-Bindungsstellen transfiziert worden waren, als auch Zellen, die mit Konstrukten mit jeweils nur einer funktionierenden Bindungsstelle transfiziert worden waren, eine ähnlich

stark erhöhte Luziferase-Aktivität auf. Bei Zellen, die mit Konstrukten transfiziert worden waren, die keine oder zwei mutierte Bindungsstellen enthielten, konnte dagegen eine stark verminderte Luziferase-Aktivität gemessen werden.

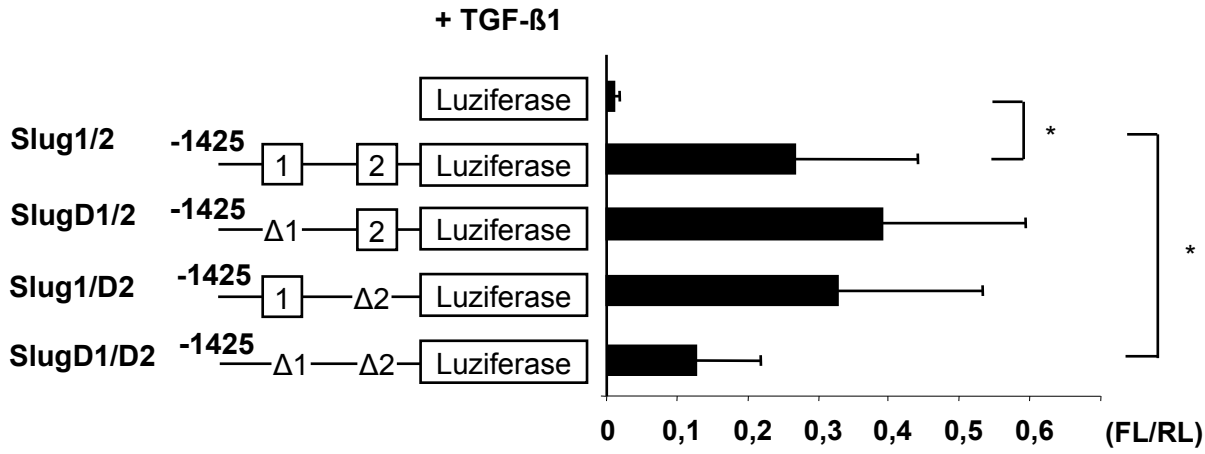

Abbildung 13. TGF-ß1 aktiviert L1CAM-Promoter mit zwei intakten Slug-Bindungsstellen und L1CAM-Promoter mit nur einer intakten Slug-Bindungsstelle. NCM460-Zellen wurden mit L1CAM-Promoterkonstrukten transfiziert, die keine Slug-Bindungstelle, beide Slug-Bindungsstellen (Slug 1/2) oder Mutationen in der ersten Slug-Bindungsstelle (Slug D1/2), in der zweiten Slug-Bindungsstelle (Slug 1/D2) oder Mutationen in beiden Slug-Bindungsstellen (Slug D1/D2) enthielten. Alle Ansätze wurden mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Luziferase-Assays, es wurde jeweils die Aktivität der Firefly-Luziferase auf die Aktivität der Renilla-Luziferase normalisiert (Fl/RL), *=$p<0,05$.

Um zu verifizieren, dass Slug den L1CAM-Promoter durch Bindung an beide Slug-Bindungsstellen aktivieren kann, wurden die Zellen 24 Stunden vor der Transfektion mit den verschiedenen Promoterkonstrukten mit Slug-Plasmiden transfiziert.

Auch hier zeigte sich, dass die Luziferase-Aktivität in Zellen, die mit dem Konstrukt transfiziert worden waren, das zwei intakte Slug-Bindungsstellen enthielt, ähnlich erhöht war, wie nach Transfektion mit Konstrukten, die nur eine funktionell intakte Bindungsstelle aufwiesen. Erst die Mutation von beiden Bindungsstellen (Slug D1/D2) vermochte die

Luziferase-Aktivität deutlich zu reduzieren (Abb. 14).

Insgesamt zeigen diese Versuche, dass Slug den L1CAM-Promoter durch Bindung an beide Slug-Bindungsstellen oder durch Bindung an eine der beiden Slug-Bindungsstellen aktivieren kann.

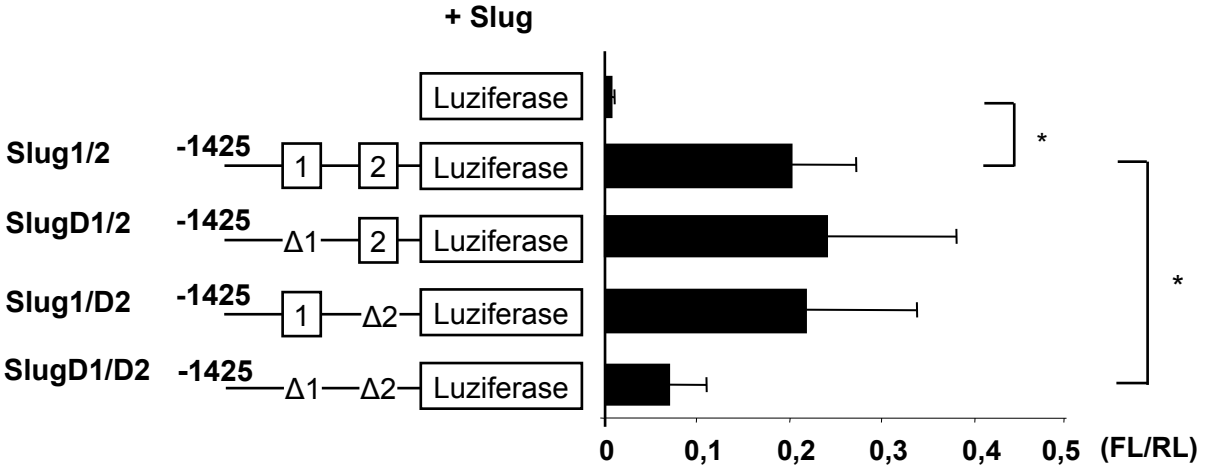

Abbildung 14. Slug kann den L1CAM-Promoter über die Bindung an eine der beiden Slug-Bindungsstellen aktivieren. NCM460-Zellen wurden mit Slug-Plasmiden transfiziert und 24 Stunden später mit Kontrollplasmiden oder mit L1CAM-Promoterkonstrukten kotransfiziert, die zwei intakte Slug-Bindungsstellen (Slug 1/2) oder Mutationen in einer (Slug D1/2, Slug 1/D2) oder beiden Slug-Bindungsstellen (Slug D1/D2) aufwiesen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Luziferase-Assays, es wurde jeweils die Aktivität der Firefly-Luziferase auf die Aktivität der Renilla-Luziferase normalisiert (FL/RL), *=$p<0,05$.

3.7 Die Expression von L1CAM führt zu Apoptose- bzw. Chemoresistenz in NCM460-Zellen

In verschiedenen Tumorzelllinien konnte nachgewiesen werden, dass L1CAM Apoptose- bzw. Chemoresistenz vermittelt (68, 69, 72, 86). Daher sollte überprüft werden, ob NCM460-Zellen durch Expression von L1CAM einen apoptose- bzw. chemoresistenten Phänotyp erwerben.

Im folgenden Versuch wurden daher NCM460-Zellen mit einem Kontrollplasmid oder einem

L1CAM-Plasmid transfiziert und anschließend mit dem Todesliganden TRAIL (*Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) (0,1 µg/ml für 6 Stunden) oder dem beim CRC u.a. verwendeten Zytostatikum Irinotecan (20 µg/ml für 24 Stunden) behandelt. Anschließend wurde ein *Caspase Glo 3/7 Assay* durchgeführt, um die Apoptoserate der Zellen zu ermitteln.

Wie Abbildung 15 zeigt, wiesen die mit L1CAM-transfizierten Zellen nach beiden Behandlungen eine deutlich geringere Caspase-Aktivität auf, als die mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass L1CAM auch schon in den noch nicht malignen intestinalen Epithelzellen Apoptose- und Chemoresistenz vermitteln kann.

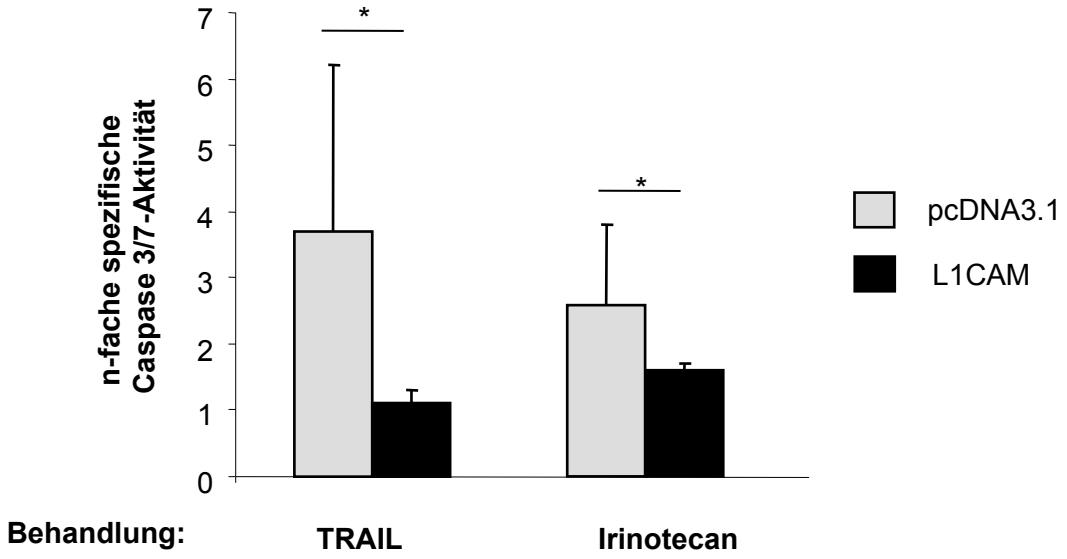

Abbildung 15. Die Expression von L1CAM führt zu Apoptoseresistenz in NCM460-Zellen.
NCM460-Zellen wurden entweder mit einem Kontrollplasmid oder einem L1CAM-Plasmid transfiziert und mit TRAIL oder Irinotecan behandelt. Anschließend wurden *Capase Glo 3/7 Assays* mit den Zellen durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei bis fünf Versuchen, *= $p<0,05$.

Um die Bedeutung von TGF-ß1 und der dadurch endogen induzierten L1CAM-Expression in den NCM460-Zellen auf das apoptotische Ansprechen gegenüber TRAIL und Irinotecan zu untersuchen, wurden NCM460-Zellen mit Kontroll-siRNA oder mit L1CAM-siRNA transfiziert. Danach wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert. Nach 24 Stunden blieben die Zellen dann wiederum entweder unbehandelt oder wurden für 6 Stunden mit TRAIL oder für 24 Stunden mit Irinotecan behandelt.

Es stellte sich heraus, dass die Stimulation mit TGF-ß1 zu einer geringeren Caspase 3/7-Aktivität in den Zellen nach Behandlung mit TRAIL oder Irinotecan führt (Abb. 16). Dass dieser Effekt durch L1CAM vermittelt wurde, zeigte sich dadurch, dass der *Knockdown* von L1CAM die durch TGF-ß1 vermittelte Apoptoseresistenz wieder aufheben konnte.

Insgesamt zeigen diese Versuche, dass die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression in den NCM460-Zellen zu Apoptose- und Chemoresistenz führt.

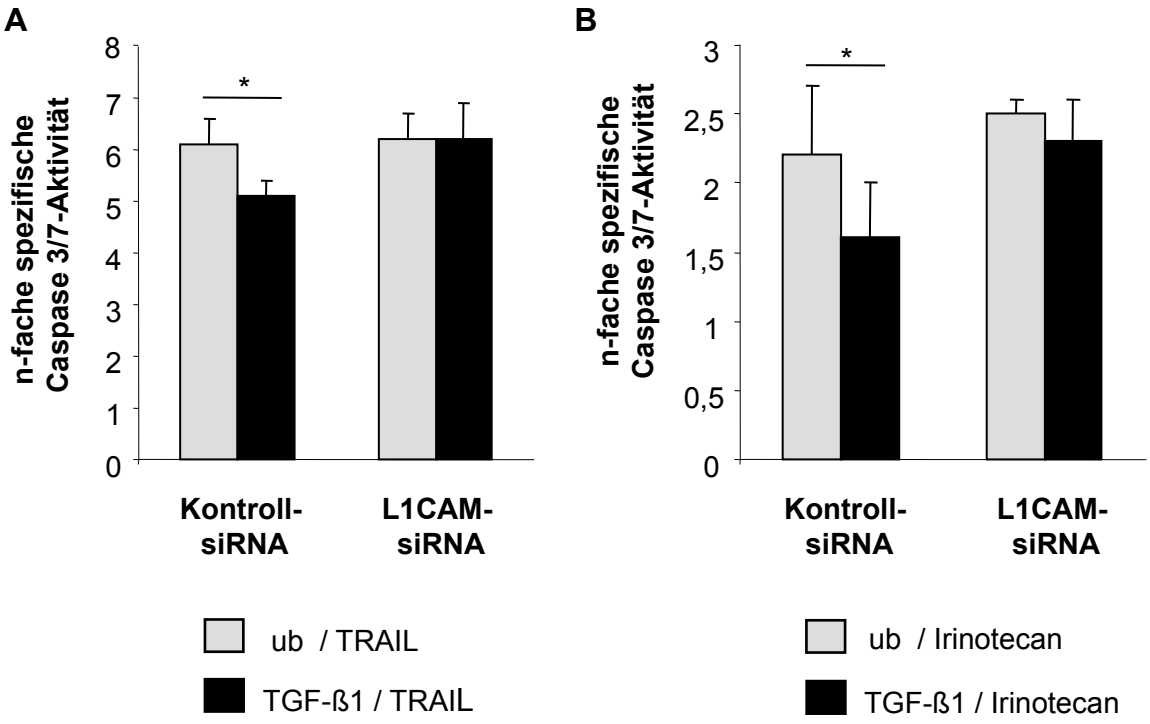

Abbildung 16. Die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression vermittelt Apoptoseresistenz in NCM460-Zellen. NCM460-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder L1CAM-siRNA transfiziert und dann unbehandelt belassen (ub) oder mit 10 ng/ml TGF-ß1 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit TRAIL (**A**) oder Irinotecan (**B**) behandelt und Caspase 3/7-Assays durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei bis fünf unabhängigen Versuchen, *=$p<0,05$.

3.8 L1CAM erhöht die Migrationsfähigkeit von NCM460-Zellen

Eine weitere Eigenschaft, die L1CAM in Krebszellen herbeiführen kann, ist eine erhöhte Migrationsfähigkeit der Zellen, die oft einhergeht mit invasivem Wachstum und Metastasierung der entsprechenden Tumore (74, 80, 82, 85). So finden sich bei L1CAM-positiven CRCs selbst mit kleiner Tumormasse bei Diagnosestellung signifikant häufiger Mikrometastasen in Lymphknoten oder Knochenmark als bei L1CAM-negativen (84). Dies lässt darauf schließen, dass L1CAM schon in frühen Tumorstadien eine erhöhte Migrationsfähigkeit in den Tumorzellen vermittelt, die dann eine frühe Metastasierung nach sich zieht. Inwieweit L1CAM auch schon in intestinalen Epithelzellen zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit beiträgt, sollte im Folgenden untersucht werden.

Zunächst wurden die NCM460-Zellen entweder mit einem Kontrollplasmid oder einem L1CAM-Plasmid transfiziert und 24 Stunden später das Migrationsverhalten der Zellen in Migrationsassays überprüft.

Dabei zeigte sich, dass die L1CAM-transfizierten Zellen eine signifikant höhere Migration aufwiesen, als die mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen (Abb. 17).

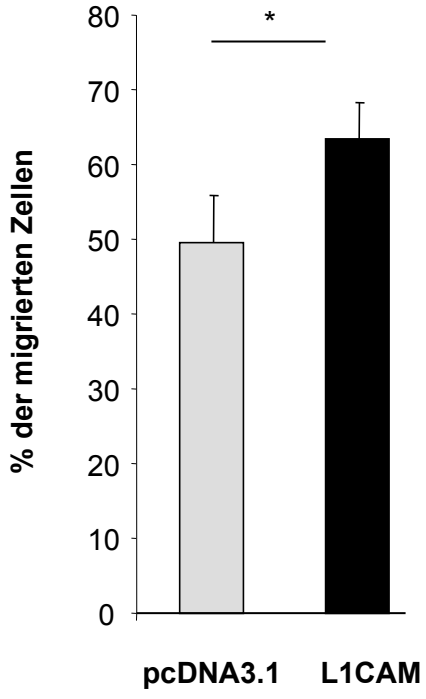

Abbildung 17. L1CAM erhöht die Migrationsfähigkeit der NCM460-Zellen. NCM460-Zellen wurden mit einem Kontroll-Plasmid (pcDNA3.1) oder mit einem L1CAM-Plasmid transfiziert und Migrationsassays durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen, *=$p<0,05$.

Um zu überprüfen, ob TGF-ß1 die Migrationsfähigkeit von NCM460-Zellen erhöhen kann und ob dabei L1CAM involviert ist, wurden NCM460-Zellen mit Kontroll-siRNA oder L1CAM-siRNA transfiziert und danach entweder unbehandelt belassen oder mit TGF-ß1 stimuliert. Nach 24 Stunden wurden Migrationsassays durchgeführt

Dabei zeigte sich, dass die mit TGF-ß1 stimulierten Zellen eine deutlich erhöhte Migrationsrate gegenüber den unstimulierten Zellen aufwiesen (Abb. 18). Bei den mit L1CAM-siRNA transfizierten Zellen ließ sich die durch TGF-ß1 induzierte vermehrte Migration auf das Niveau von unbehandelten Zellen reduzieren.

Insgesamt lässt sich aus diesen Versuchen folgern, dass TGF-ß1 zu einem erhöhten Migrationsvermögen in NCM460-Zellen führt und dass dieser Effekt auf der TGF-ß1-induzierten Expression von L1CAM beruht.

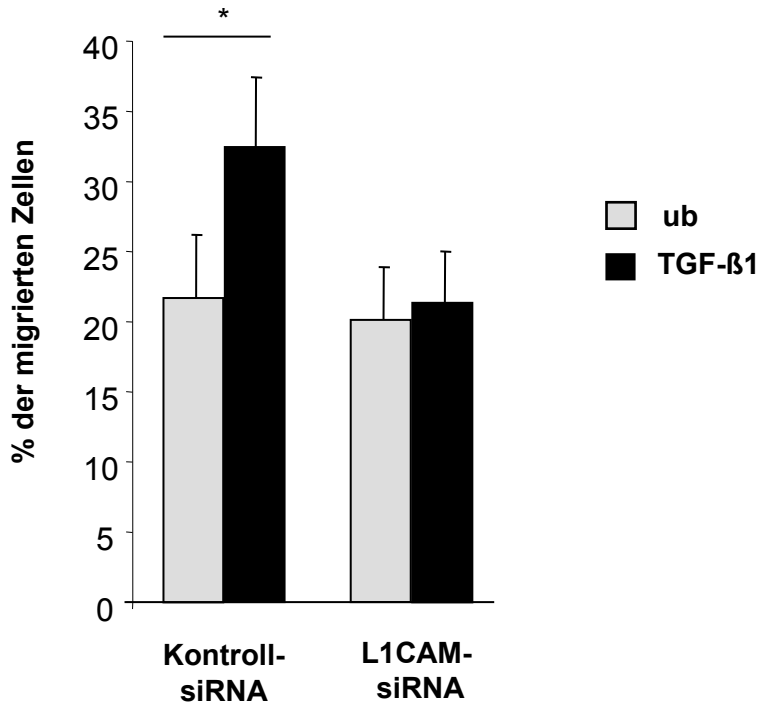

Abbildung 18. Die TGF-ß1-induzierte Expression von L1CAM erhöht die Migrationsfähigkeit von NCM460-Zellen. NCM460-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder L1CAM-siRNA transfiziert und anschließend mit TGF-ß1 stimuliert oder unbehandelt (ub) belassen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Migrationsassays, *=$p<0,05$.

4 Diskussion

In den letzten Jahren wird die Rolle des Adhäsionsmoleküls L1CAM bei Tumorerkrankungen zunehmend besser verstanden. So wurde L1CAM in immer mehr Tumorentitäten entdeckt und auch die zellulären Mechanismen, über die L1CAM seine tumorfördernden Effekte vermittelt, konnten mehr und mehr aufgeklärt werden (68-93).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass L1CAM seine tumorfördernde Wirkung nicht nur in Tumorzellen manifester Karzinome vermittelt. So fanden Geismann et al. heraus, dass L1CAM auch schon auf Pankreasgangepithelien in Gewebeproben chronischer Pankreatitiden exprimiert wird. Die chronische Pankreatitis stellt einen Risikofaktor für die Entstehung eines duktalen Pankreasadenokarzinoms dar und Geismann et al. konnten zeigen, dass L1CAM schon in nicht malignen Pankreasgangepithelzellen tumorfördernde Eigenschaften wie EMT-assoziierte Veränderungen, erhöhte Zellmigration und Apoptoseresistenz vermittelt (75). Vor kurzem konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Tumorigenität von Pankreasgang-epithelzellen durch Überexpression von L1CAM erhöht wird (95).

Das CRC ist nach wie vor die zweithäufigste Krebserkrankung in Deutschland. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass auch das CRC zu den L1CAM-exprimierenden Tumoren gehört, und dass L1CAM bei dieser Tumorentität zu früher Metastasierung und Prognose-verschlechterung führt (83-87). Wie bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen stellt auch beim CRC die chronische Entzündung einen bedeutenden Risikofaktor dar. So lassen sich 10-15% der Todesfälle der CED-Patienten auf ein CRC zurückführen (17). Ähnlich wie bei einer chronischen Pankreatitis lassen sich im Darmgewebe von CED-Patienten hohe Mengen an TGF-ß1 detektieren (45).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob TGF-ß1 in intestinalen Epithelzellen zu einer Heraufregulation der L1CAM-Expression führen kann und ob diese auch hier tumorfördernde Veränderungen in den Zellen hervorruft und so möglicherweise zur inflammations-assoziierten Karzinogenese des CRC beiträgt.

4.1 Die Expression von L1CAM in intestinalen Epithelzellen

Wie oben erwähnt, gibt es Parallelen zwischen der inflammations-assoziierten Karzinogenese des CRC und des duktalen Pankreasadenokarzinoms. Das Gewebe einer chronischen Pankreatitis zeichnet sich durch Stromavermehrung und vermehrtes Vorkommen von Myofibroblasten aus. In Kokulturversuchen mit Pankreasmyofibroblasten ließ sich in Pankreasgangepithelzellen eine TGF-ß1-vermittelte L1CAM-Expression induzieren (75).
Auch in Gewebeproben der Darmmukosa von CED-Patienten konnten erhöhte Spiegel von TGF-ß1 nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten der Lamina propria große Mengen an TGF-ß1 exprimierten und daher eine Quelle der erhöhten TGF-ß1-Spiegel darstellten (45). Dies deutet darauf hin, dass auch bei CEDs das entzündliche Stroma der Darmmukosa die Darmepithelien beeinflusst und an der Karzinogenese beteiligt ist.

Ob L1CAM dabei eine Rolle zukommen kann, wurde hier anhand von *in vitro*-Versuchen mit der intestinalen Epithelzelllinie NCM460 untersucht. Zunächst wurde überprüft, ob TGF-ß1 auch in intestinalen Epithelzellen zur Induktion der L1CAM-Expression führen kann.
Dafür wurden die NCM460-Zellen mit TGF-ß1 stimuliert und die L1CAM-Expression mittels Westernblot und RT-PCR analysiert. Es zeigte sich, dass die Stimulation mit TGF-ß1 auch in NCM460-Zellen auf mRNA- und auf Protein-Ebene zu einer vermehrten Expression von L1CAM führt.
Im Widerspruch hierzu scheinen von Gavert et al. veröffentliche Daten zu stehen. Bei Untersuchungen an CRCs fanden sie heraus, dass L1CAM ausschließlich auf Tumorzellen der invasiven Front der Tumore exprimiert wird, wogegen die differenzierteren Zellen im Inneren des Tumors kein L1CAM exprimierten (85). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ließ sich die L1CAM-Expression jedoch durch TGF-ß1-Stimulation in voll differenzierten, nicht malignen intestinalen Epithelzellen auslösen. Eine mögliche Erklärung für diese abweichenden Beobachtungen könnte sein, dass Gavert et al. hauptsächlich sporadisch aufgetretene CRCs, nicht aber Darmgewebe von chronisch entzündlichen Darmgeweben oder andere Vorläuferläsionen untersucht haben. Wie in Kapitel 1.2 besprochen, gibt es Unterschiede in der Pathogenese des sporadischen und Kolitis-assoziierten CRC und die in dieser Arbeit durchgeführte TGF-ß1-Stimulation soll eher die

Bedingungen beim Kolitis-assoziierten CRC simulieren. Es könnte daher sein, dass sich das sporadische und das Kolitis-assoziierte CRC in der L1CAM-Expression grundsätzlich unterscheiden.

Neben TGF-ß1 konnten mittlerweile weitere Substanzen identifiziert werden, die in intestinalen Epithelzellen zur Hochregulation der L1CAM-Expression führen. So konnte gezeigt werden, dass auch die Stimulation mit LPS, Stickstoffmonoxid oder TNF-α zur Induktion von L1CAM in NCM460-Zellen führt (unveröffentlichte Daten). TNF-α gilt als Hauptmediator der chronischen Entzündung bei CED-Patienten, was sich unter anderem dadurch zeigt, dass die Therapie mit TNF-α-Antikörpern auch bei schweren Verläufen der Erkrankung häufig zu einer Besserung führt (11). Dass TNF-α ebenfalls die L1CAM-Expression in intestinalen Epithelzellen induzieren kann, verdeutlicht die Rolle von entzündlichen Prozessen in der Induktion von L1CAM.

4.2 L1CAM und EMT in NCM460-Zellen

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, ist die EMT ein Mechanismus, der es Zellen erlaubt, sich vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp zu wandeln. Bei vielen Krebserkrankungen konnte die EMT mit früher Metastasierung, Chemoresistenz und verschlechterter Prognose in Verbindung gebracht werden. Und auch das CRC gehört zu den Karzinomen, bei denen die EMT mit aggressivem Wachstum und Progression der Erkrankung einhergeht (33, 34, 35).

Interessanterweise konnte das Adhäsionsmolekül L1CAM ebenfalls mit frühzeitiger Metastasierung, Chemoresistenz und Prognoseverschlechterung assoziiert werden (72, 84, 89, 92, 93, 96). Außerdem lassen sich sowohl EMT als auch die L1CAM-Expression durch TGF-ß1 induzieren und involvieren den Transkriptionsfaktor Slug (23, 24, 75). Wegen dieser Parallelen liegt der Gedanke nahe, dass zwischen L1CAM-Expression und EMT von Tumorzellen eine Verbindung besteht.

Shutman et al. konnten zeigen, dass L1CAM in einer Mammakarzinom-Zelllinie eine Herunterregulierung von E-Cadherin und die Auflösung von *Adherens-Junctions* bewirken kann, was einem wesentlichen Schritt der EMT entspricht (97). Geismann et al. konnten außerdem beobachten, dass die Induktion der L1CAM-Expression in Pankreasgangepithel-zellen mit EMT-assoziierten Veränderungen einhergeht. So entwickelten L1CAM-

exprimierende Zellen eine spindelförmige Morphologie und exprimierten vermehrt die mesenchymalen Marker Vimentin und N-Cadherin. Eine Herunteregulation von E-Cadherin konnte jedoch nicht beobachtet werden (75).

In den hier untersuchten NCM460-Zellen führte die Stimulation mit TGF-ß1 über 24 bis 48 Stunden zu einer spindelförmigen Morphologie. Westenblots der EMT-Marker E-Cadherin und Vimentin zeigten jedoch keine Veränderungen nach Stimulation mit TGF-ß1.

Auf der einen Seite könnte es so sein, dass die 24- bzw. 48-stündige Stimulation der Zellen mit TGF-ß1, die für die L1CAM-Expression und die morphologischen Veränderungen ausreichte, zu kurz war, um eine vollständige EMT auszulösen. Der Teil der Zellen, die morphologische Veränderungen aufwiesen, wären dann die, bei denen die EMT schon angefangen hätte. Es wären aber zu wenige Zellen, um im Westernblot bereits Veränderungen hinsichtlich der EMT-Marker zu detektieren. Dazu passend konnten Geismann et al. in Pankreaskarzinomzellen zeigen, dass die L1CAM-Expression dem Verlust von E-Cadherin vorausgeht und daher einem frühen Schritt während der EMT entspricht (52).

Auf der anderen Seite ist es möglich, dass die Heraufregulation von L1CAM und die EMT zwei unabhängig voneinander ablaufende Phänomene in intestinalen Epithelzellen sind. Gavert et al. konnten zeigen, dass die L1CAM-vermittelte Metastasierung von CRCs keine Veränderungen von E-Cadherin und anderen EMT Markern benötigte (98). Es könnte daher sein, dass sich Mammakarzinomzellen, bei denen Shutman et al. L1CAM-induzierte EMT nachweisen konnten, und CRC-Zellen hier grundsätzlich unterscheiden und L1CAM beim CRC seine tumorfördernden Eigenschaften ohne Beteiligung von EMT vermittelt.

Beim Kolitis-assoziierten CRC konnte jedoch in 57% der Fälle eine Herunterregulierung von E-Cadherin beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die EMT auch beim Kolitis-assoziierten CRC eine Rolle spielt (99). Wie früh der Verlust von E-Cadherin dabei während der Tumorigenese auftritt und über welche zellulären Mechanismen der Verlust genau vermittelt wird, ist bisher kaum untersucht.

4.3 Die Rolle von Smad und JNK bei der TGF-ß1-induzierten L1CAM-Expression

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass TGF-ß1 die Expression von L1CAM in den NCM460-Zellen induzieren kann, sollte weiterhin untersucht werden, über welche Signalwege TGF-ß1 diesen Effekt vermittelt. Wie in Kapitel 1.4 erläutert, gibt es Smad-abhängige und Smad-unabhängige TGF-ß-Signalwege (39). Der Smad-abhängige ist der am ausführlichsten untersuchte TGF-ß-Signalweg und wurde daher als Erstes im vorliegenden Zellsystem überprüft. Dafür wurde die Expression von Smad 2,3 oder 4 durch Transfektion mit siRNAs unterdrückt und mittels Westernblots Veränderungen in der TGF-ß1-induzierten L1CAM-Expression überprüft. Dabei konnte nach *Knockdown* der verschiedenen Smads jedoch keine Verminderung der L1CAM-Expression beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass der Smad-Signalweg nicht an der TGF-ß1-induzierten L1CAM-Expression beteiligt ist. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den von Geismann et al. veröffentlichten Ergebnissen, die zeigen, dass die L1CAM-Expression in Pankreasgangepithelzellen ebenfalls unabhängig von Smad-Proteinen durch TGF-ß1 ausgelöst wird (75).

Als Nächstes sollten die Smad-unabhängigen Signalwege untersucht werden. Zu den bekanntesten Smad-unabhängigen TGF-ß-Signalwegen gehören der MAPK/ERK-Signalweg, der JNK- sowie der PI3K/AKT-Signalweg (41). Geismann et al. konnten in Pankreasgang-epithelzellen zeigen, dass die TGF-ß1-vermittelte L1CAM-Expression abhängig von der Aktivierung des JNK-Signalweges ist. Dagegen konnte die Beteiligung des ERK1/2- , p38- und PI3K-Signalweges in diesem Szenario ausgeschlossen werden (75). Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die Zusammenhänge zwischen dem JNK-Signalweg und L1CAM näher untersucht. Dafür wurden die NCM460-Zellen mit JNK-siRNA transfiziert und Veränderungen der L1CAM-Expression mittels Westernblot und RT-PCR ermittelt. Es zeigte sich, dass JNK in den NCM460-Zellen, wie in Pankreasgangepithel- und Pankreaskarzinom-zellen, für die TGF-ß1-vermittelte Induktion von L1CAM notwendig ist.
JNK spielt eine Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Vorgängen. Unter anderem ist JNK beteiligt bei Zellproliferation, Inflammation, Apoptose und DNA-Reparatur (100). In Zusammenhang mit Krebserkrankungen scheint JNK gegensätzliche Rollen zu spielen. Auf der einen Seite bewirkt es DNA-Reparatur und Apoptose. Auf der anderen Seite führt die

Aktivierung von JNK zu Zellproliferation und fördert so das Wachstum von Tumoren. So entwickeln Mäuse, die kein JNK exprimieren, vermehrt hepatozelluläre Karzinome (101). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die TGF-ß1-vermittlelte JNK-Expression in Tumorzellen und nichtmaligen Zellen zu einer Zytoskelettreorganisation, einhergehend mit verstärkter Zellmotilität, führt (75).
Wie oben beschrieben, werden durch L1CAM diverse Prozesse der Tumorigenese beeinflusst. Die von JNK induzierte L1CAM-Expression ist daher ein weiterer Mechanismus, über den JNK als Tumorpromoter wirken kann.

4.4 Die Rolle von Slug bei der TGF-ß1-induzierten L1CAM-Expression

Wie im Vorherigen beschrieben, konnte JNK als Induktor der L1CAM-Expression in den NCM460-Zellen identifiziert werden. Aus Versuchen an Pankreasgangepithelzellen und Endometriumkarzinomzellen ist außerdem bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Slug bei der TGF-ß1-induzierten L1CAM-Expression involviert ist (50, 75, 102). Daher wurden die NCM460-Zellen mit Kontoll-siRNA, JNK-siRNA oder Slug-siRNA transfiziert, um den Einfluss auf die L1CAM- und Slug-Expression nach Stimulation mit TGF-ß1 mittels RT-PCR und Westernblot zu ermitteln. Dabei zeigte, dass der *Knockdown* von Slug sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu einer verminderten L1CAM-Expression führte. Dies lässt darauf schließen, dass Slug an der TGF-ß1-vermittlelten L1CAM-Expression beteiligt ist. Darüber hinaus führte der *Knockdown* von JNK zu einer verringerten Expression von Slug und L1CAM. Dies deutet darauf hin, dass JNK die L1CAM-Expression möglicherweise durch die Induktion von Slug vermittelt.
Ein direktes Ziel von JNK ist c-Jun, welches ein Teil des AP-1-Transkriptionsfaktor-Komplexes ist (100). Interessanterweise gibt es auch AP-1-Bindungsstellen im L1CAM-Promoter. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass JNK die L1CAM-Expression nicht durch eine Bindung von AP-1 an den L1CAM-Promoter hervorruft, sondern dass die Bindung von Slug dafür verantwortlich ist (50, 75). Dies lässt zusammen mit den hier gezeigten Ergebnissen darauf schließen, dass JNK durch eine vermehrte Expression von Slug zu einer erhöhten L1CAM-Produktion in den Zellen führt. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch in Linsenepithelzellen gefunden werden. Hier bewirkte die Stimulation mit TGF-ß1 eine

JNK-vermittelte Induktion der Slug-Expression (103). Wie genau JNK die Aktivierung von Slug bewirkt, muss jedoch weiter untersucht werden. Chen et al. konnten an Brustkrebszelllinien eine AP-1-vermittelte Steigerung der Slug-Expression beobachten, die mit einer vermehrten Migrationsfähigkeit der Zellen einherging (104). Möglicherweise führt JNK daher über die Aktivierung von AP-1 und darauf folgender Expression von Slug zur L1CAM-Genexpression. Dazu passend konnten Geismann et al. in Pankreasgangepithelzellen 1-3 Stunden nach Stimulation mit TGF-ß1 einen Anstieg der AP-1-Konzentration im Zellkern feststellen (75). Dieser Anstieg erscheint zu frühzeitig, um direkt die Expression von L1CAM, die nach 24 Stunden am größten ist, zu induzieren. Es erscheint wahrscheinlicher, dass AP-1 zunächst zur Genexpression von Slug und dieses dann wiederum zur Induktion der L1CAM-Expression führt.

Wie oben beschrieben, gibt es zwei mögliche Slug-Bindungsstellen im humanen L1CAM-Promoter (52). Es wurden daher ChIP- und Luziferase-Assays durchgeführt, um die Bindung von Slug an die möglichen Bindungsstellen und eine daraus folgende Aktivierung des L1CAM-Promoters in NCM460-Zellen zu überprüfen. Es zeigte sich, dass Slug an beide Bindungsstellen bindet, wobei die Bindung von Slug an eine der beiden oder an beide Slug-Bindungsstellen zu einer Aktivierung des L1CAM- Promoters führt. Die Bindung von Slug an den L1CAM-Promoter war nach 9 Stunden größer als nach 6 oder 24 Stunden (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass die Slug-Genexpression zunächst durch TGF-ß1 induziert werden muss (z.B. durch Aktivierung von JNK) und es erst dann zur Translokation von Slug in den Kern und zur Bindung an den L1CAM-Promoter kommt.
In Übereinstimmung dazu konnte auch in nicht malignen sowie in maligne transformierten Pankreasgangepithelzellen eine direkte Aktivierung des L1CAM-Promoters durch Slug nach Stimulation mit TGF-ß1 nachgewiesen werden (52). Und auch bei Endometriumkarzinomzellen vermittelt die Stimulation mit TGF-ß1 eine Slug-abhängige L1CAM-Expression, bei der Slug ebenfalls direkt an den L1CAM-Promoter bindet (102).
Darüber hinaus konnten Gavert et al. in Kolonkarzinomzellen vier TCF-Bindungsstellen im ersten L1CAM-Promoter identifizieren und mittels *Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)* zeigen, dass Transkriptionskomplexe aus ß-Catenin und TCF an alle vier Bindungsstellen binden. Daraus folgerten sie, dass die L1CAM-Expression in den Kolonkarzinomzellen Ziel des ß-Catenin/WNT/TCF-Signalweges ist (85).

In bislang unveröffentlichten Versuchen des Labors konnte gezeigt werden, dass der ß-Catenin-Signalweg auch eine Rolle bei der TGF-ß1-vermittelten L1CAM-Expression in intestinalen Epithelzellen spielt. So führte der siRNA-vermittelte *Knockdown* von ß-Catenin in NCM460-Zellen zu einer Reduktion der Expression von L1CAM. Neben der direkten Bindung von Slug an den L1CAM-Promoter scheint TGF-ß1 also auch über ß-Catenin zur Induktion von L1CAM in NCM460-Zellen zu führen, was Gegenstand von aktuellen Untersuchungen des Labors ist.
Inwieweit die Bindung von Slug an den L1CAM-Promoter auch in Kolonkarzinomzellen eine Rolle spielt, ist bisher nicht bekannt. Shiori et al konnten in 37% der CRCs eine Erhöhung von Slug feststellen, wobei diese Erhöhung assoziiert war mit fortgeschrittenem Tumorstadium, Fernmetastasen und schlechter Prognose (29). Dies und die Tatsache, dass Slug bei mehreren anderen Tumorentitäten als direkter Induktor von L1CAM identifiziert werden konnte, lässt allerdings vermuten, dass Slug auch in den Tumorzellen von CRCs direkt an den L1CAM-Promoter bindet und diesen so aktiviert.

Neben Slug gehört auch Snail zur Snail-Superfamilie der Transkriptionsfaktoren und auch Snail bindet an E-Box-Elemente, wie sie im humanen L1CAM-Promoter identifiziert werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die Bindung von Slug an den L1CAM-Promoter untersucht. Dies hängt mit Vorergebnissen von Geismann et al. zusammen, die zeigen, dass Snail in Pankreasgangepithel- und -karzinomzellen im Gegensatz zu Slug keine Aktivierung des L1CAM-Promoters bewirkt (52). Nichtsdestotrotz lässt sich eine Beteiligung von Snail an der TGF-ß1-vermittelten L1CAM-Expression in NCM460-Zellen nicht ganz ausschließen und wird im Moment in der Arbeitsgruppe untersucht.

In CRCs konnten auch epigenetische Mechanismen aufgedeckt werden, über die es zu einer vermehrten L1CAM-Expression in Tumorzellen kommt. So konnten Kato et al. zeigen, dass in L1CAM-exprimierenden CRCs häufig eine Hypomethylierung des L1CAM-Promoters die Ursache der erhöhten L1CAM-Expression darstellt (83). Ob dies auch in intestinalen Epithelzellen der Fall ist, wurde im Labor der Arbeitsgruppe bereits untersucht (unveröffentlichte Daten). Dazu wurden NCM460-Zellen mit dem DNA-Methylierungs-inhibitor 5' Aza-2'-deoxycytidin über mehrere Tage behandelt. Dies führte allerdings nicht zu einem Anstieg der L1CAM-Expression in den NCM460-Zellen. Es scheint daher eher so zu

sein, dass die Expression von L1CAM in NCM460-Zellen durch Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren (wie Slug) und L1CAM-Promoter induziert wird als durch epigenetische Mechanismen.

4.5 L1CAM, Apoptose und Migration

Wie in Kapitel 1 beschrieben, wird L1CAM physiologisch hauptsächlich auf Zellen des Nervensystems exprimiert. Während der Entwicklung des Nervensystems spielt es eine wichtige Rolle bei Migration von Nervenzellen und dem Auswachsen von Neuriten. Außerdem trägt L1CAM auch zur Neuroprotektion von entwickeltem Nervengewebe bei. So kann es zum Beispiel den Untergang von verletzten Nervenfasern verhindern und deren Regeneration fördern (46-48).
Mittlerweile ist bekannt, dass L1CAM in verschiedenen Tumorentitäten exprimiert wird und dass es auch in Tumorzellen promigratorische und antiapoptotische Effekte vermittelt. Während diese Effekte jedoch bei Nervengewebe für die physiologische Funktion notwendig sind, tragen sie in Tumoren zu frühzeitiger Metastasierung, Chemoresistenz und vermehrtem Tumorwachstum bei (68-93).
Da gezeigt werden konnte, dass L1CAM auch in nicht tumorigenen pankreatischen Epithelzellen zu einer vermehrten Migration und Apoptose- bzw. Chemoresistenz führt (75), sollte in den NCM460-Zellen überprüft werden, ob L1CAM auch in intestinalen Epithelzellen zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit und Apoptoseresistenz führt.
Um die Apoptoserate der NCM460-Zellen zu überprüfen, wurden *Caspase Glo 3/7 Assays* durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die L1CAM-exprimierenden Zellen deutlich resistenter waren gegenüber einer Stimulation mit dem Todesliganden TRAIL oder dem Zytostatikum Irinotecan. Auch in den intestinalen Epithelzellen führt die L1CAM-Expression also zu Apoptose- und Chemoresistenz und bietet so eine mögliche Erklärung, wie L1CAM zur malignen Entartung von intestinalen Epithelzellen beitragen könnte.
So wird durch die Expression von L1CAM die Überlebensdauer der Zellen verlängert. Je länger die Zellen leben, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu genetischen Veränderungen in den Zellen kommt, die zur Karzinomentstehung beitragen. Und auch nach Eintritt genetischer Veränderungen behält L1CAM seine antiapoptotische Wirkung, wie in

verschiedenen Karzinomzellen gezeigt werden konnte (68, 70, 72). L1CAM könnte den Zellen durch seine antiapoptotischen Effekte also den Weg der malignen Transformation ebnen.

Über welche zellulären Mechanismen L1CAM genau seine apoptosehemmende Wirkung ausübt, ist bisher nur zum Teil bekannt. Erste Arbeiten des Labors zeigen, dass L1CAM in Pankreas- und Ovarialkarzinomzellen zu einer verminderten Expression der Initiatorcaspasen 8 und 9 führen kann (unveröffentlichte Daten). In Ovarialkarzinomzellen wurde darüber hinaus beobachtet, dass die L1CAM-Expression mit einer Hochregulierung von Bcl-2 einhergeht und so zur Apoptoseresistenz führt (68). In chemoresistenten Pankreaskarzinom-zellen konnte ferner beobachtet werden, dass L1CAM durch die Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und eine daraus folgende vermehrte NO-Freisetzung zu Chemoresistenz führt (72). So kommt es offenbar durch die erhöhten NO-Spiegel zur Nitrosylierung der Caspasen 3, 7, 8 und 9 und damit zur Inaktivierung dieser Caspasen (105). Viele der von L1CAM aktivierten Signalwege sind außerdem eher proliferationsfördernd als apoptosefördernd. So kann L1CAM u.a. den ERK-Signalweg, den p38/MAPK-Signalweg und den PI3/AKT/Survivin-Signalweg aktivieren (46, 59-61).

Es gibt verschiedene Mechanismen, über die in Zellen eine Resistenz gegen das hier verwendete Zytostatikum Irinotecan oder gegen den körpereigenen Apoptosinitiator TRAIL ausgelöst werden kann (106-109). Ob die Expression von L1CAM den Zellen verhilft, einen dieser Resistenzmechanismen gegen die Behandlung mit Irinotecan bzw. TRAIL zu entwickeln, ist bislang nicht bekannt. Wie oben beschrieben, ist L1CAM ein Aktivator des p38/MAPK-Signalweges und bei Irinotecan-resistenten CRC-Zellen konnte eine Überexpression von p38 als Ursache für die Resistenz identifiziert werden (108). Die Aktivierung von NF-κB und die dadurch ausgelöste Apoptosehemmung ist ein weiterer Mechanismus, über den Zellen eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit Irinotecan erwerben können (106). In Pankreaskarzinomzellen konnte bereits gezeigt werden, dass es über L1CAM zu einer vermehrten Aktivierung von NF-κB kommt (73).

Weitere Mechanismen, über die Tumorzellen eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit Irinotecan erwerben können, sind die vermehrte Expression von ABC-Transportern und DNA-Reparaturenzymen sowie eine veränderte Expression der Topoisomerase I (106, 107).

Eine Resistenz gegenüber TRAIL konnte für CRC-Zellen bereits beschrieben werden (109).
In den TRAIL-resistenten CRC-Zellen konnten deutlich geringere Mengen von Caspase 8 nachgewiesen werden, die wahrscheinlich die Ursache der TRAIL-Resistenz dieser Zellen darstellten (109). Wie bereits oben erwähnt, zeigen noch unveröffentlichten Daten des Labors, dass auch die Expression von L1CAM zu einer verringerten Expression der Caspasen 8 und 9 führt. Die hier beobachtete TRAIL-Resistenz in den NCM460-Zellen könnte von L1CAM also über eine Herunterregulation der Expression oder über einen vermehrten proteosomalen Abbau der Caspase 8 vermittelt werden.

Neben dem Einfluss von L1CAM auf die Apoptosefähigkeit der NCM460-Zellen wurde auch der Einfluss der TGF-ß1-induzierten L1CAM-Expression auf die Migrationsfähigkeit der NCM460-Zellen untersucht. In den dazu durchgeführten Migrationsassays zeigte sich, dass NCM460-Zellen, in denen L1CAM entweder durch die Stimulation mit TGF-ß1 oder durch Transfektion zur Expression gebracht worden ist, eine deutlich erhöhte Migrationsfähigkeit aufwiesen.
In verschiedenen Tumorzellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Expression von L1CAM die Motilität der Zellen erhöht (60, 69, 74). Diese Beobachtungen stehen in Einklang damit, dass L1CAM in Tumoren zu einer frühen und vermehrten Metastasierung beiträgt (80, 81, 84, 85, 96). Und auch in nicht malignen Pankreasgangepithelzellen vermittelte L1CAM eine erhöhte Migrationsfähigkeit (75).
Inwieweit diese vermehrte Migrationsfähigkeit der Zellen zur Tumorigenese des CRC beiträgt, ist bislang nicht klar. Kaifi et al. konnten zeigen, dass L1CAM-positive CRCs frühzeitiger metastasieren als L1CAM-negative (84). Bislang ist außerdem nicht bekannt, wann L1CAM in intestinalen Epithelzellen während der malignen Transformation induziert wird. In den hier durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass L1CAM bereits in nicht malignen intestinalen Epithelzellen durch TGF-ß1 induziert werden kann. Vor kurzem veröffentlichte Arbeiten des Labors zeigen, dass es durch die Kokultivierung von NCM460-Zellen mit Makrophagen TGF-ß1-abhängig zu einer Induktion der L1CAM-Expression kommt. In immunhistochemischen Anfärbungen von Dickdarmgeweben von CED-Patienten ließen sich in der Nähe von Makrophagen eine erhöhte Anzahl L1CAM-exprimierender Darmepithelien feststellen (110). Dies deutet zusammen mit den hier durchgeführten Versuchen darauf hin, dass es in intestinalen Epithelzellen bereits im Rahmen von

entzündlichen Bedingungen zur Hochregulation von L1CAM kommen kann. Die Tatsache, dass L1CAM bereits in nicht tumorigenen intestinalen Epithelzellen zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit und Apoptoseresistenz beiträgt, könnte ein früher Schritt in der malignen Transformation dieser Zellen und damit der Ausbildung eines CRCs sein. Es bleibt zu überprüfen, ob eine erhöhte L1CAM-Expression in diesen Zellen wie in Pankreasgangepithelzellen (95) zu einer Erhöhung der Tumorigenität führt, was die Bedeutung von L1CAM in der malignen Transformation von intestinalen Epithelzellen weiter untermauern würde.

In Kapitel 1 wurde die duale Rolle von TGF-ß1 bei Krebserkrankungen beschrieben. So kann TGF-ß1 bei unveränderten, nicht malignen Zellen über die Inhibition von Zellwachstum als Tumorsuppressor wirken, während es bei fortgeschrittenen Tumoren als Tumorförderer fungiert. Und auch beim CRC konnte diese duale Rolle von TGF-ß1 gezeigt werden (35, 43, 44).
Bei den hier durchgeführten Versuchen führte TGF-ß1 über die Aktivierung von JNK und Slug zur Induktion von L1CAM in NCM460-Zellen und vermittelte so Chemoresistenz und eine erhöhte Migrationsfähigkeit. Obwohl es sich bei den NCM460-Zellen um nicht maligne Zellen handelt, passen diese durch die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression vermittelten Eigenschaften eher zu der Rolle von TGF-ß als Tumorförderer.
In Einklang damit fanden Sheng et al. heraus, dass intestinale Epithelzellen nach mehrwöchiger Stimulation mit TGF-ß1 eine maligne Transformation durchliefen. So entwickelten diese Zellen eine Apoptoseresistenz und die Fähigkeit invasiv zu wachsen. Auch im Mausmodell konnte die Tumorgenität der Zellen bestätigt werden. Bei den transformierten Zellen ließ sich außerdem eine stark erhöhte Expression der Cyclooxigenase 2 nachweisen. TGF-ß1 wirkte also bei nicht transformierten Epithelzellen tumorfördernd (111). Die TGF-ß-induzierte L1CAM-Expression könnte ein weiterer Mechanismus sein, über den TGF-ß1 in nicht malignen Zellen die Tumorentstehung begünstigt.

Mittlerweile konnte also gezeigt werden, dass L1CAM in verschiedenen Tumorzellen zu Chemoresistenz, Zellmigration und Metastasierung führt und die Überlebenswahrscheinlichkeit von Tumorpatienten deutlich gesenkt wird (70, 80, 81, 84, 86, 89, 92, 93, 96). Es stellt sich daher die Frage, ob L1CAM auch als therapeutische Zielstruktur bei

Tumorerkrankungen in Frage kommt.

Sowohl aus *in vitro*-Versuchen als auch aus Versuchen in Mausmodellen gibt es Hinweise, dass L1CAM als therapeutisches Ziel genutzt werden könnte. So konnten Bao et el. in Gliomzellen und in Gliom tragenden Mäusen zeigen, dass die Behandlung der Zellen mit L1CAM-shRNA das Wachstum und Überleben der Zellen verringert. Im Mausmodell konnte außerdem ein verlängertes Überleben der Tiere nach Behandlung mit L1CAM-shRNA beobachtet werden (76). Und auch bei Ovarialkarzinomen scheint L1CAM als therapeutisches Ziel in Frage zu kommen. Arlt et al. konnten *in vitro* und im Mausmodell zeigen, dass die Behandlung mit monoklonalen anti-L1CAM-Antikörpern die Proliferation der Ovarialkarzinomzellen hemmt. In den Mäusen reduzierte die Behandlung außerdem das Tumorwachstum, die Aszitesbildung und die Dissemination der Tumorzellen (80). Seit kurzer Zeit gibt es ferner Hinweise darauf, dass L1CAM auch bei der Behandlung von Pankreaskarzinomen eine Rolle spielen könnte. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die Tumoren der Pankreaskarzinomzelllinie Colo357 trugen, besser auf eine Therapie mit L1CAM-Antikörpern und Chemotherapie ansprachen als auf eine alleinige Chemotherapie (112). Neben Wachstums- und Proliferationshemmung könnte eine L1CAM-Antikörper-Therapie also auch zu einer Chemosensibilisierung der Tumorzellen führen. Auch für das CRC gibt es Hinweise, dass L1CAM eine mögliche therapeutische Zielstruktur für die Behandlung dieses Tumors darstellen könnte. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass Mäuse, die mit L1CAM-positiven Kolonkarzinomzellen injiziert worden waren, signifikant häufiger Lebermetastasen entwickelten, als Mäuse, die mit L1CAM-negativen Kolonkarzinomzellen inokuliert worden waren (96). Dies deutet darauf hin, dass eine therapeutische Blockade der L1CAM-Wirkung der Metastasierung von CRCs entgegenwirken könnte.

Insgesamt scheint L1CAM also eine vielversprechende Zielstruktur in der Therapie von Krebserkrankungen zu sein. In den Versuchen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass erhöhte TGF-ß1-Spiegel zur Induktion von L1CAM in intestinalen Epithelzellen führen können. Es stellt sich daher die Frage, ob L1CAM auch schon in nicht malignen Zellen als diagnostisches oder therapeutisches Ziel genutzt werden könnte. Patienten mit langjähriger Kolitis haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines CRCs. Die Karzinome entstehen außerdem früher als bei der Normalbevölkerung und häufiger liegen multiple CRCs vor (15-19). In den Leitlinien wird den Patienten mit seit mehr als acht Jahren bestehender Pankolitis daher empfohlen, jährlich eine Kontrollkoloskopie mit Entnahme von Stufenbiopsien

durchführen zu lassen (113). In der entzündeten Darmschleimhaut ist es dabei häufig schwierig dysplastische Areale von entzündlichen Arealen zu unterscheiden (19). Dennoch lassen sich bei Entnahme von 33 Stufenbiopsien bei der Kontrollkoloskopie 90% aller intraepithelialen Neoplasien aufdecken (113). Ob ein vermehrtes Vorkommen von L1CAM in entzündeten Schleimhautarealen zukünftig als weiteres diagnostisches Mittel eingesetzt werden könnte, ist bislang fraglich. Wie oben beschrieben, scheint L1CAM als therapeutische Zielstruktur bei der Behandlung von Krebserkrankungen in Frage zu kommen. In zukünftigen Untersuchungen sollte daher überprüft werden, ob L1CAM auch als Zielstruktur bei der Prävention der Entstehung eines CRC bei CED-Patienten genutzt werden kann.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es durch TGF-ß1 zu einer erhöhten L1CAM-Expression in nicht malignen intestinalen Epithelzellen kommt. Diese TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression wird dabei durch Aktivierung von JNK und durch Slug vermittelt, wobei Slug direkt an den L1CAM-Promoter bindet und zu dessen Aktivierung führt. Bedingt durch die erhöhte L1CAM-Expression erwerben die intestinalen Epithelzellen einen apoptoseresistenten und migratorischen Phänotyp, wodurch die Zellen einen Überlebensvorteil erlangen. Diese Mechanismen könnten zur inflammations-assoziierten Karzinogenese des CRC beitragen.

5 Zusammenfassung

In vielen Geweben stellt die chronische Entzündung einen Risikofaktor für die Entwicklung von Krebserkrankungen dar. Und auch die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms (CRC) wird durch eine langjährige Kolitis, wie sie im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorkommt, begünstigt.
Das Adhäsionsmolekül L1CAM (CD171) konnte in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden und vermittelt in diesen Tumoren u.a. Chemoresistenz und eine erhöhte Migrationsfähigkeit der Tumorzellen. Auch in CRCs konnte eine erhöhte L1CAM-Expression nachgewiesen werden, wobei diese einherging mit frühzeitiger Metastasierung und einem deutlich verschlechterten Gesamtüberleben der Patienten. Aus Untersuchungen an chronischen Pankreatitiden ist bekannt, dass L1CAM bereits unter entzündlichen Bedingungen in nicht malignen Epithelzellen exprimiert werden kann.
Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob L1CAM auch in intestinalen Epithelzellen induziert werden kann und über welche zellulären Mechanismen die L1CAM-Expression dabei vermittelt wird. Außerdem sollte untersucht werden, ob L1CAM in den nicht malignen intestinalen Epithelzellen Eigenschaften vermittelt, die die maligne Entartung dieser Zellen begünstigen könnten.

Die Versuche dieser Arbeit wurden *in vitro* mit der nicht tumorigenen intestinalen Epithelzellline NCM460 durchgeführt. Da sich die Darmschleimhaut von Patienten, die an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden, unter anderem durch erhöhte Spiegel von *Transforming Growth Factor ß1* (TGF-ß1) auszeichnet, wurde zunächst untersucht, ob die Stimulation der NCM460-Zellen mit TGF-ß1 zur Hochregulation von L1CAM in den Zellen führt. Nachdem dies bestätigt werden konnte, wurde weiterhin gezeigt, dass TGF-ß1 neben der Induktion der L1CAM-Expression bereits nach 24 Stunden zu morphologischen Veränderungen in den NCM460-Zellen führt, wie sie im Rahmen der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) beobachtet werden. Eine vermehrte Expression von Vimentin oder eine verminderte Expression von E-Cadherin, zwei weitere EMT-assoziierte Veränderungen, ließen sich nach 24- bzw. 48-stündiger Stimulation mit TGF-ß1 nicht nachweisen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der durch TGF-ß1 aktivierte Smad-Signalweg nicht an der L1CAM-Expression in NCM460-Zellen beteiligt ist. Dagegen konnte

eine Beteiligung des ebenfalls durch TGF-ß1 aktivierten JNK-Signalweges (c-Jun n-terminale Kinase) an der L1CAM-Expression nachgewiesen werden. Infolge der Aktivierung von JNK kam es zur Induktion des Transkriptionsfaktors Slug und zu dessen Bindung an zwei mögliche Slug-Bindungsstellen im L1CAM-Promoter. Darüber hinaus konnte mit Luziferase-Assays gezeigt werden, dass die Bindung von Slug an beide oder nur an eine der beiden Bindungsstellen notwendig ist, damit es zur Aktivierung des L1CAM-Promoters kommt.
Es konnte ferner gezeigt werden, dass L1CAM zur Apoptoseresistenz in den NCM460-Zellen gegenüber der Stimulation mit dem Todesliganden TRAIL (*Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand)* und dem Zytostatikum Irinotecan beiträgt. Darüber hinaus erhöhte die Expression von L1CAM deutlich die Migrationsfähigkeit von NCM460-Zellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass L1CAM nicht nur in manifesten CRC, sondern nach Stimulation mit TGF-ß1 bereits in nicht malignen intestinalen Epithelzellen exprimiert wird. Durch die L1CAM-Expression erlangen die intestinalen Epithelzellen einen apoptoseresistenten und promigratorischen Phänotyp und damit einen Überlebensvorteil, der die Entstehung eines CRC aus diesen Zellen begünstigen könnte.
Die TGF-ß1-induzierte L1CAM-Expression könnte daher ein Mechanismus sein, über den es im Rahmen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zur Entstehung eines Karzinoms kommt.

Anhang

Literaturverzeichnis

(1) Herold G, und Mitarbeiter.
Innere Medizin 2010.
Herold,G., (Hrsg.), 2010.

(2) Schmoll H, Höffken K, Possingen K.
Kompendium Internistische Onkologie, 4. Auflage.
Springer Verlag. 2005.

(3) Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf, U.
Krebs in Deutschland 2005/2006 – Häufigkeiten und Trends, 7. Ausgabe.
Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV., Berlin. 2010.

(4) Müller, M, und Mitarbeiter
Chirurgie für Studium und Praxis, 2010/2011, 10.Auflage.
Medizinische Verlags-und Informationsdienste, Breisach, 2010.

(5) Fearon ER, Vogelstein B.
A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell.1990 Jun 1;61(5):759-67. Review.

(6) Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Arnold D, Fleig W, Fölsch UR, Frühmorgen P, Graeven U, Heinemann V, Hohenberger W, Holstege A, Junginger T, Kopp I, Kühlbacher T, Porschen R, Propping P, Riemann JF, Rödel C, Sauer R, Sauerbruch T, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Zeitz M, Selbmann HK; Federal Committee of Physicians and Health Insurers.
S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII).
Z Gastroenterol. 2010 Jan;48(1):65-136. Epub 2010 Jan 13.

(7) Friedman, S, Blumberg R.
Inflammatory Bowel Disease.
In:Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson,J, Dietel M, Dudenhausen J, Suttorp N.
Harrison's – Principles of Internal Medicine, 17th edition.
Mc-Graw Hill Companies, 2008.

(8) Berchthold R.
Chirurgie, 6.Auflage.
Bruch HP, Trentz O (Hrsg.) unter Mitarbeit von Keller R, Wanner GA.
Urban und Fischer Verlag, 2008.

(9) Hoffmann JC, Preiß JC, Autschbach F, Buhr HJ, Huser W, Herrlinger K, Höhne W, Koletzko S, Krieglstein CF, Kruis W, Matthes H, Moser G, Reinshagen M, Rogler G, Schreiber S, Schreyer AG, SidoB, Siegmund B, Stallmach A, Bokemeyer B, Stange EF, Zeitz M.
S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“
Ergebnisse einer Evidenz-basierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zusammen mit dem Kompetenznetz Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.
Z Gastroenterol 2008; 46:1094–1146.

(10) Hoffmann JC, Zeitz M, Bischoff SC, Brambs HJ, Bruch HP, Buhr HJ, Dignass A, Fischer I, Fleig W, Fölsch UR, Herrlinger K, Höhne W, Jantschek G, Kaltz B, Keller KM, Knebel U, Kroesen AJ, Kruis W, Matthes H, Moser G, Mundt S, Pox C, Reinshagen M, Reissmann A, Riemann J, Rogler G, Schmiegel W, Schölmerich J, Schreiber S, Schwandner O, Selbmann HK, Stange EF, Utzig M, Wittekind C. [Diagnosis and therapy of ulcerative colitis: results of an evidence based consensus conference by the German society of Digestive and Metabolic Diseases and the competence network on inflammatory bowel disease].
Z Gastroenterol. 2004 Sep;42(9):979-83. Review.

(11) Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M.
Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease.
Nat Rev Genet. 2005 May;6(5):376-88. Review.

(12) Rosenstiel P, Sina C, Franke A, Schreiber S.
Towards a molecular risk map-recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease.
Semin Immunol. 2009 Dec;21(6):334-45. Epub 2009 Nov 17. Review.

(13) Coussens LM, Werb Z.
Inflammation and cancer.
Nature. 2002 Dec19-26;420(6917):860-7. Review.

(14) Kraus S, Arber N.
Inflammation and colorectal cancer.
Curr Opin Pharmacol. 2009 Aug;9(4):405-10. Epub 2009 Jul 7. Review.

(15) Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF.
The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis.
Gut. 2001 Apr;48(4):526-35.

(16) Feagins LA, Souza RF, Spechler SJ.
Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer.
Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2009 May;6(5):297-305. Review.

(17) Lakatos PL, Lakatos L.
Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies.
World J Gastroenterol. 2008 Jul 7;14(25):3937-47. Review.

(18) Canavan C, Abrams KR, Mayberry J.
Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease.
Aliment Pharmacol Ther. 2006 Apr 15;23(8):1097-104.

(19) Xie J, Itzkowitz SH.
Cancer in inflammatory bowel disease.
World J Gastroenterol. 2008 Jan 21;14(3):378-89. Review.

(20) Thiery JP.
Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.
Nat Rev Cancer. 2002 Jun;2(6):442-54. Review.

(21) Nieto MA.
The snail superfamily of zinc-finger transcription factors.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Mar;3(3):155-66. Review.

(22) Wu Y, Zhou BP.
New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis.
Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2008 Jul;40(7):643-50. Review.

(23) Miyazono K.
Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer.
Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2009;85(8):314-23. Review.

(24) Xu J, Lamouille S, Derynck R.
TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition.
Cell Res. 2009 Feb;19(2):156-72. Review.

(25) Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, Gallick GE, Logsdon CD, McConkey DJ, Choi W.
Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer.
Cancer Res. 2009 Jul 15;69(14):5820-8. Epub 2009 Jul 7.

(26) Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, Setoyama T, Matsumoto M, Ishigami S, Aikou T.
Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma.
Clin Cancer Res. 2005 Feb1;11(3):1174-80.

(27) Gavert N, Ben-Ze'ev A.
Coordinating changes in cell adhesion and phenotype during EMT-like processes in cancer.
F1000 Biol Rep. 2010 Dec 8;2:86.

(28) Jethwa P, Naqvi M, Hardy RG, Hotchin NA, Roberts S, Spychal R, Tselepis C.
Overexpression of Slug is associated with malignant progression of esophageal adenocarcinoma.
World J Gastroenterol. 2008 Feb 21;14(7):1044-52.

(29) Shioiri M, Shida T, Koda K, Oda K, Seike K, Nishimura M, Takano S, Miyazaki M.
Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients.
Br J Cancer. 2006 Jun 19;94(12):1816-22.

(30) Zhang KJ, Wang DS, Zhang SY, Jiao XL, Li CW, Wang XS, Yu QC, Cui HN.
The E-cadherin repressor slug and progression of human extrahepatic hilar cholangiocarcinoma.
J Exp Clin Cancer Res. 2010 Jul 1;29:88.

(31) Natalwala A, Spychal R, Tselepis C.
Epithelial-mesenchymal transition mediated tumourigenesis in the gastrointestinal tract.
World J Gastroenterol. 2008 Jun 28;14(24):3792-7. Review.

(32) Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA.
The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.
Cell. 2008 May 16;133(4):704-15.

(33) Barker N, Clevers H.
Tumor environment: a potent driving force in colorectal cancer?
Trends Mol Med. 2001 Dec;7(12):535-7.

(34) Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T.
Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin.
Cells Tissues Organs. 2005;179(1-2):56-65. Review.

(35) Loboda A, Nebozhyn MV, Watters JW, Buser CA, Shaw PM, Huang PS, Van't Veer L, Tollenaar RA, Jackson DB, Agrawal D, Dai H, Yeatman TJ.
EMT is the dominant program in human colon cancer.
BMC Med Genomics. 2011 Jan 20;4:9.

(36) Bates RC, Mercurio AM.
The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. Cancer Biol Ther. 2005 Apr;4(4):365-70. Epub 2005 Apr 4. Review.

(37) Meulmeester E, Ten Dijke P.
The dynamic roles of TGF-β in cancer.
J Pathol. 2011 Jan;223(2):205-18. doi: 10.1002/path.2785. Epub 2010 Oct 18. Review.

(38) Attisano L, Wrana JL.
Signal transduction by the TGF-beta superfamily.
Science. 2002 May 31;296(5573):1646-7. Review.

(39) Derynck R, Zhang YE.
Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature. 2003 Oct 9;425(6958):577-84. Review.

(40) Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A.
TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression.
Nat Genet. 2001 Oct;29(2):117-29. Review. Erratum in: Nat Genet 2001Nov ; 29(3):351.

(41) Zhang YE.
Non-Smad pathways in TGF-beta signaling.
Cell Res. 2009 Jan;19(1):128-39. Review.

(42) Bierie B, Moses HL.
Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer.
Cytokine Growth Factor Rev. 2010 Feb;21(1):49-59. Epub 2009 Dec 16. Review.

(43) Xu Y, Pasche B.
TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer.
Hum Mol Genet. 2007 Apr 15;16 Spec No 1:R14-20. Review.

(44) Biswas S, Chytil A, Washington K, Romero-Gallo J, Gorska AE, Wirth PS, Gautam S, Moses HL, Grady WM.
Transforming growth factor beta receptor type II inactivation promotes the establishment and progression of colon cancer.
Cancer Res. 2004 Jul 15;64(14):4687-92.

(45) Stadnicki A, Machnik G, Klimacka-Nawrot E, Wolanska-Karut A, Labuzek K.
Transforming growth factor-beta1 and its receptors in patients with ulcerative colitis.
Int Immunopharmacol. 2009 Jun;9(6):761-6. Epub 2009 Mar 12.

(46) Gavert N, Ben-Shmuel A, Raveh S, Ben-Ze'ev A.
L1-CAM in cancerous tissues.
Expert Opin Biol Ther. 2008 Nov;8(11):1749-57. Review.

(47) Schäfer MK, Altevogt P.
L1CAM malfunction in the nervous system and humancarcinomas.
Cell Mol Life Sci. 2010 Jul;67(14):2425-37. Epub 2010 Mar 17. Review.

(48) Herron LR, Hill M, Davey F, Gunn-Moore FJ.
The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules.
Biochem J. 2009 May 1;419(3):519-31. Review.

(49) Siesser PF, Maness PF.
L1 cell adhesion molecules as regulators of tumor cell invasiveness.
Cell Adh Migr. 2009 Jul-Sep;3(3):275-7. Epub 2009 Jul 7. Review.
Erratum in: Cell Adh Migr. 2010 Oct-Dec;4(4):635.

(50) Pfeifer M, Schirmer U, Geismann C, Schäfer H, Sebens S, Altevogt P.
L1CAM expression in endometrial carcinomas is regulated by usage of two different promoter regions.
BMC Mol Biol. 2010 Aug 27;11:64.

(51) Kallunki P, Edelman GM, Jones FS.
Tissue-specific expression of the L1 cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element.
J Cell Biol. 1997 Sep 22;138(6):1343-54.

(52) Geismann C, Arlt A, Bauer I, Pfeifer M, Schirmer U, Altevogt P, Müerköster SS, Schäfer H.
Binding of the transcription factor Slug to the L1CAM promoter is essential for transforming growth factor-β1 (TGF-β)-induced L1CAM expression in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells.
Int J Oncol. 2011 Jan;38(1):257-66.

(53) Heubner M, Wimberger P, Kasimir-Bauer S, Otterbach F, Kimmig R, Siffert W.
The AA genotype of a L1C G842A polymorphism is associated with an increased risk for ovarian cancer.
Anticancer Res. 2009 Aug;29(8):3449-52.

(54) Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S, Postina R, Fahrenholz F, Fogel M, Lemmon V, Altevogt P.
Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins.
J Cell Biol. 2001 Nov 12;155(4):661-73. Epub 2001 Nov 12. Erratum in: J Cell Biol 2001 Dec 24;155(7):1359.

(55) Kenwrick S, Watkins A, De Angelis E.
Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations.
Hum Mol Genet. 2000 Apr 12;9(6):879-86. Review.

(56) Gil OD, Sakurai T, Bradley AE, Fink MY, Cassella MR, Kuo JA, Felsenfeld DP.
Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of thecytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface.
J Cell Biol. 2003 Aug 18;162(4):719-30.

(57) Hortsch M, Nagaraj K, Godenschwege TA.
The interaction between L1-type proteins and ankyrins--a master switch for L1-type CAM function.
Cell Mol BiolLett. 2009;14(1):57-69. Epub 2008 Oct 6. Review.

(58) Whittard JD, Sakurai T, Cassella MR, Gazdoiu M, Felsenfeld DP.
MAP kinase pathway-dependent phosphorylation of the L1-CAM ankyrin binding site regulates neuronal growth.
Mol Biol Cell. 2006 Jun;17(6):2696-706. Epub 2006 Apr 5.

(59) Zecchini S, Bianchi M, Colombo N, Fasani R, Goisis G, Casadio C, Viale G, Liu J, Herlyn M, Godwin AK, Nuciforo PG, Cavallaro U.
The differential role of L1 in ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelium.
Cancer Res. 2008 Feb15;68(4):1110-8.

(60) Silletti S, Yebra M, Perez B, Cirulli V, McMahon M, Montgomery AM.
Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion.
J Biol Chem. 2004 Jul 9;279(28):28880-8. Epub 2004 May 5.

(61) Loers G, Chen S, Grumet M, Schachner M.
Signal transduction pathways implicated in neural recognition molecule L1 triggered neuroprotection and neuritogenesis.
J Neurochem. 2005 Mar;92(6):1463-76.

(62) Gutwein P, Stoeck A, Riedle S, Gast D, Runz S, Condon TP, Marmé A, Phong MC, Linderkamp O, Skorokhod A, Altevogt P.
Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells.
Clin Cancer Res. 2005 Apr 1;11(7):2492-501.

(63) Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, Altevogt P, Saftig P, Reiss K.
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. 2005 Oct;25(20):9040-53.

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

(65) Thelen K, Kedar V, Panicker AK, Schmid RS, Midkiff BR, Maness PF.
The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins.
J Neurosci. 2002 Jun 15;22(12):4918-31.

(66) Stoeck A, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F, Gutwein P, Ludwig A, Rubinstein E, Altevogt P.
A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44.
Biochem J. 2006 Feb 1;393(Pt 3):609-18.

(67) Riedle S, Kiefel H, Gast D, Bondong S, Wolterink S, Gutwein P, Altevogt P.
Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity.
Biochem J. 2009 May 27;420(3):391-402.

(68) Stoeck A, Gast D, Sanderson MP, Issa Y, Gutwein P, Altevogt P.
L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells.
Gynecol Oncol. 2007 Feb;104(2):461-9. Epub 2006 Oct 9.

(69) Min JK, Kim JM, Li S, Lee JW, Yoon H, Ryu CJ, Jeon SH, Lee JH, Kim JY, Yoon HK, Lee YK, Kim BH, Son YS, Choi HS, Lim NK, Kim DG, Hong HJ.
L1 cell adhesion molecule is a novel therapeutic target in intrahepatic cholangiocarcinoma.
Clin Cancer Res. 2010 Jul 15;16(14):3571-80. Epub 2010 May 25.

(70) Doberstein K, Wieland A, Lee SB, Blaheta RA, Wedel S, Moch H, Schraml P, Pfeilschifter J, Kristiansen G, Gutwein P.
L1-CAM expression in ccRCC correlates with shorter patients survival times and confers chemoresistance in renal cell carcinoma cells.
Carcinogenesis. 2011 Mar;32(3):262-70. Epub 2010 Nov 19.

(71) Meier F, Busch S, Gast D, Göppert A, Altevogt P, Maczey E, Riedle S, Garbe C, Schittek B.
The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression.
Int J Cancer. 2006 Aug 1;119(3):549-55.

(72) Sebens Müerköster S, Werbing V, Sipos B, Debus MA, Witt M, Grossmann M, Leisner D, Kötteritzsch J, Kappes H, Klöppel G, Altevogt P, Fölsch UR, Schäfer H.
Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells.
Oncogene. 2007 Apr 26;26(19):2759-68. Epub 2006 Nov 6.

(73) Kiefel H, Bondong S, Erbe-Hoffmann N, Hazin J, Riedle S, Wolf J, Pfeifer M, Arlt A, Schäfer H, Müerköster SS, Altevogt P.
L1CAM-integrin interaction induces constitutive NF-kappaB activation in pancreatic adenocarcinoma cells by enhancing IL-1beta expression.
Oncogene. 2010 Aug 26;29(34):4766-78. Epub 2010 Jun 14.

(74) Issa Y, Nummer D, Seibel T, Müerköster SS, Koch M, Schmitz-Winnenthal FH, Galindo L, Weitz J, Beckhove P, Altevogt P.
Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration.
J Mol Med (Berl). 2009 Jan;87(1):99-112. Epub 2008 Oct 18.

(75) Geismann C, Morscheck M, Koch D, Bergmann F, Ungefroren H, Arlt A, Tsao MS, Bachem MG, Altevogt P, Sipos B, Fölsch UR, Schäfer H, Müerköster SS.
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. 2009 May 15;69(10):4517-26. Epub 2009 May 12.

(76) Bao S, Wu Q, Li Z, Sathornsumetee S, Wang H, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN.
Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth.
Cancer Res. 2008 Aug 1;68(15):6043-8.

(77) Schröder C, Schumacher U, Fogel M, Feuerhake F, Müller V, Wirtz RM, Altevogt P, Krenkel S, Jänicke F, Milde-Langosch K.
Expression and prognostic value of L1-CAM in breast cancer.
Oncol Rep. 2009 Nov;22(5):1109-17.

(78) Li Y, Galileo DS.
Soluble L1CAM promotes breast cancer cell adhesion and migration in vitro, but not invasion.
Cancer Cell Int. 2010 Sep 15;10:34.

(79) Fogel M, Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, Edler L, Ben-Arie A, Huszar M, Altevogt P.
L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas.
Lancet. 2003 Sep 13;362(9387):869-75.

(80) Arlt MJ, Novak-Hofer I, Gast D, Gschwend V, Moldenhauer G, Grünberg J, Honer M, Schubiger PA, Altevogt P, Krüger A.
Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment.
Cancer Res. 2006 Jan 15;66(2):936-43.

(81) Bergmann F, Wandschneider F, Sipos B, Moldenhauer G, Schniewind B, Welsch T, Schirrmacher P, Klöppel G, Altevogt P, Schäfer H, Sebens Müerköster S.
Elevated L1CAM expression in precursor lesions and primary and metastastic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma.
Oncol Rep. 2010 Oct;24(4):909-15.

(82) Ben QW, Wang JC, Liu J, Zhu Y, Yuan F, Yao WY, Yuan YZ.
Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma.
Ann Surg Oncol. 2010 Aug;17(8):2213-21. Epub 2010 Feb 17.

(83) Kato K, Maesawa C, Itabashi T, Fujisawa K, Otsuka K, Kanno S, Tada H, Tatemichi Y, Kotani K, Oikawa H, Sugai T, Wakabayashi G, Masuda T.
DNA hypomethylation at the CpG island is involved in aberrant expression of the L1 cell adhesion molecule gene in colorectal cancer.
Int J Oncol. 2009 Sep;35(3):467-76.

(84) Kaifi JT, Reichelt U, Quaas A, Schurr PG, Wachowiak R, Yekebas EF, Strate T, Schneider C, Pantel K, Schachner M, Sauter G, Izbicki JR.
L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer.
Mod Pathol. 2007 Nov;20(11):1183-90. Epub 2007 Sep 14.

(85) Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, Ben-Ze'ev A.
L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers.
J Cell Biol. 2005 Feb 14;168(4):633-42.

(86) Boo YJ, Park JM, Kim J, Chae YS, Min BW, Um JW, Moon HY.
L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer.
Ann Surg Oncol. 2007 May;14(5):1703-11. Epub 2007 Jan 9.

(87) Gavert N, Ben-Shmuel A, Lemmon V, Brabletz T, Ben-Ze'ev A.
Nuclear factor-kappaB signaling and ezrin are essential for L1-mediated metastasis of colon cancer cells.
J Cell Sci. 2010 Jun 15;123(Pt 12):2135-43. Epub 2010 May 25.

(88) Weidle UH, Eggle D, Klostermann S.
L1-CAM as a target for treatment of cancer with monoclonal antibodies.
Anticancer Res. 2009 Dec;29(12):4919-31. Review.

(89) Held-Feindt J, Schmelz S, Hattermann K, Mentlein R, Mehdorn HM, Sebens S.
The neural adhesion molecule L1CAM confers chemoresistance in human glioblastomas.
Neurochem Int. 2012 Aug 28. doi:pii: S0197-0186(12)00278-1.
10.1016/j.neuint.2012.08.011.

(90) Kim KS, Min JK, Liang ZL, Lee K, Lee JU, Bae KH, Lee MH, Lee SE, Ryu MJ, Kim SJ, Kim YK, Choi MJ, Jo YS, Kim JM, Shong M.
Aberrant l1 cell adhesion molecule affects tumor behavior and chemosensitivity in anaplastic thyroid carcinoma.
Clin Cancer Res. 2012 Jun 1;18(11):3071-8. Epub 2012 Apr 3.

(91) Yoon H, Min JK, Lee DG, Kim DG, Koh SS, Hong HJ.
L1 cell adhesion molecule and epidermal growth factor receptor activation confer cisplatin resistance in intrahepatic cholangiocarcinoma cells.
Cancer Lett. 2012 Mar;316(1):70-6. Epub 2011 Oct 25.

(92) Tischler V, Pfeifer M, Hausladen S, Schirmer U, Bonde AK, Kristiansen G, Sos ML, Weder W, Moch H, Altevogt P, Soltermann A.
L1CAM protein expression is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer.
Mol Cancer. 2011 Oct 10;10:127.

(93) Guo X, Xiong L, Zou L, Sun T, Zhang J, Li H, Peng R, Zhao J.
L1 cell adhesion molecule overexpression in hepatocellular carcinoma associates with advanced tumor progression and poor patient survival.
Diagn Pathol. 2012 Aug 13;7:96. doi: 10.1186/1746-1596-7-96.

(94) Moyer MP, Manzano LA, Merriman RL, Stauffer JS, Tanzer LR.
NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line.
In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1996 Jun;32(6):315-7.

(95) Schäfer H, Geismann C, Heneweer C, Egberts JH, Korniienko O, Kiefel H, Moldenhauer G, Bachem MG, Kalthoff H, Altevogt P, Sebens S.
Myofibroblast-induced tumorigenicity of pancreatic ductal epithelial cells is L1CAM dependent.
Carcinogenesis. 2012 Jan;33(1):84-93. Epub 2011 Nov 17.

(96) Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T, Barany F, Paty P, Notterman D, Domany E, Ben-Ze'ev A.
Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis.
Cancer Res. 2007 Aug 15;67(16):7703-12.

(97) Shutman M, Levina E, Ohouo P, Baig M, Roninson IB.
Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells.
Cancer Res. 2006 Dec 1;66(23):11370-80.

(98) Gavert N, Vivanti A, Hazin J, Brabletz T, Ben-Ze'ev A.
L1-mediated colon cancer cell metastasis does not require changes in EMT and cancer stem cell markers.
Mol Cancer Res. 2011 Jan;9(1):14-24. Epub 2010 Dec 1.

(99) Wheeler JM, Kim HC, Efstathiou JA, Ilyas M, Mortensen NJ, Bodmer WF.
Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer.
Gut. 2001 Mar;48(3):367-71.

(100) Karin M, Gallagher E.
From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance.
IUBMB Life. 2005 Apr-May;57(4-5):283-95. Review.

(101) Johnson GL, Nakamura K.
The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease.
Biochim Biophys Acta. 2007 Aug;1773(8):1341-8. Epub 2007 Jan 4. Review.

(102) M. Huszar, M. Pfeifer, U. Schirmer, H. Kiefel, G.E. Konecny, A. Ben-Arie, L. Edler, M. Munch, E. Muller-Holzner, S. Jerabek-Klestil, S. Abdel-Azim, C. Marth, A.G. Zeimet, P. Altevogt, M. Fogel.
Up-regulation of L1CAM is linked to loss of hormone receptors and E-cadherin in aggressive subtypes of endometrial carcinomas,
J Pathol 220 (2010) 551-561.

(103) Choi J, Park SY, Joo CK.
Transforming growth factor-beta1 represses E-cadherin production via slug expression in lens epithelial cells.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Jun;48(6):2708-18.

(104) Chen H, Zhu G, Li Y, Padia RN, Dong Z, Pan ZK, Liu K, Huang S.
Extracellular signal-regulated kinase signaling pathway regulates breast cancer cell migration by maintaining slug expression.
Cancer Res. 2009 Dec 15;69(24):9228-35.

(105) Müerköster SS, Lust J, Arlt A, Häsler R, Witt M, Sebens T, Schreiber S, Fölsch UR, Schäfer H.
Acquired chemoresistance in pancreatic carcinoma cells: induced secretion of IL-1beta and NO lead to inactivation of caspases.
Oncogene. 2006 Jun 29;25(28):3973-81. Epub 2006 Feb 13. Erratum in: Oncogene. 2006 Aug 3;25(33):4628.

(106) Xu Y, Villalona-Calero MA.
Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity.
Ann Oncol. 2002 Dec;13(12):1841-51. Review.

(107) Candeil L, Gourdier I, Peyron D, Vezzio N, Copois V, Bibeau F, Orsetti B, Scheffer GL, Ychou M, Khan QA, Pommier Y, Pau B, Martineau P, Del Rio M.
ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases.
Int J Cancer. 2004 May 10;109(6):848-54.

(108) Paillas S, Boissière F, Bibeau F, Denouel A, Mollevi C, Causse A, Denis V, Vezzio-Vié N, Marzi L, Cortijo C, Ait-Arsa I, Askari N, Pourquier P, Martineau P, Del Rio M, Gongora C.
Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma.
Cancer Res. 2011 Feb 1;71(3):1041-9. Epub 2010 Dec 15.

(109) van Geelen CM, Pennarun B, Le PT, de Vries EG, de Jong S.
Modulation of TRAIL resistance in colon carcinoma cells: different contributions of DR4 and DR5.
BMC Cancer. 2011 Jan 27;11:39.

(110) Schäfer H, Struck B, Feldmann EM, Bergmann F, Grage-Griebenow E, Geismann C, Ehlers S, Altevogt P, Sebens S.
TGF-β1-dependent L1CAM expression has an essential role in macrophage-induced apoptosis resistance and cell migration of human intestinal epithelial cells.
Oncogene. 2012 Feb 20. doi: 10.1038/onc.2012.44.

(111) Sheng H, Shao J, O'Mahony CA, Lamps L, Albo D, Isakson PC, Berger DH, DuBois RN, Beauchamp RD.
Transformation of intestinal epithelial cells by chronic TGF-beta1 treatment results in downregulation of the type II TGF-beta receptor and induction of cyclooxygenase-2.
Oncogene. 1999 Jan 28;18(4):855-67.

(112) Schäfer H, Dieckmann C, Korniienko O, Moldenhauer G, Kiefel H, Salnikov A, Krüger A, Altevogt P, Sebens S.
Combined treatment of L1CAM antibodies and cytostatic drugs improve the therapeutic response of pancreatic and ovarian carcinoma.
Cancer Lett. 2012 Jun 1;319(1):66-82. Epub 2011 Dec 27.

(113) Schmiegel W, Pox C, Kroesen A.
Ulcerative colitis. Cancer prevention.
Z Gastroenterol. 2004 Sep;42(9):1014-8.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	*ATP binding cassette*
ADAM	a *desintegrin and metalloproteinase*
AKT	Proteinkinase B
ALK	a*ctivin receptor like kinase*
APC	*adenomatous polyposis coli protein*
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	b*one morphogenic protein*
bp	Basenpaare
BSA	*Bovine serum albumin*
CD	Morbus Crohn
CDK	c*yclin dependent kinase*
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
ChIP-Assay	Chromatin-Immunpräzipitationsassay
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CRC	kolorektales Karzinom
CTP	Cytidintriphosphat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethysulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EGFR	EGF-Rezeptor
EMSA	*electrophoretic mobility shift assay*
EMT	Epidermale mesenchymale Transition
ERK	*extracellular regulated kinase*
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	*fluorescense activated cell sorter*
FAC	*focal adhesion kinase*

FGF	*Fibroblast Growth Factor*
FGFR	FGF-Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	*Hepatocyte Growth Factor*
HGFR	HGF-Rezeptor
HSP	*heat shock protein*
IgG	Immunglobulin G
Il	Interleukin
INF-γ	Interferon-gamma
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IZR	Intrazellulärraum
JNK	c-Jun n-terminale Kinase
kb	Kilobasen
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
MAPK	*mitogen activated kinase*
min	Minute
MRP	*multidrug resistance associated protein*
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
mA	Milliampere
ml	Milliliter
M	Mol
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD_{500nm}	Optische Dichte bei 500nm

PAK	*p21 activated protein kinase*
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	*small interfering RNA*
sog.	sogenannt
STAT1	*Signal transducer and activator of transcription protein 1*
Std.	Stunde
Tabl.	Tablette
TBP	*TATA box binding Protein*
TßRI	TGF-ß-Rezeptor Typ I
TßRII	TGF-ß-Rezeptor Typ II
TGF-ß1	*Transforming Growth Factor-ß*
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TRAIL	t*umor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*
TTP	Thymidintriphosphat
UC	Colitis ulcerosa
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Birte Struck
geboren am 05.02.1986 in Nordenham

Ausbildung

10/2006 – 10/2012	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU)
10/2012	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit 06/2009	Doktorandin an der I. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Kiel, Labor für Molekulare Gastroenterologie & Hepatologie, ab 04/2010 am Institut für Experimentelle Medizin, AG Inflammatorische Karzinogenese der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2008	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/1998 – 06/2005	Jade-Gymnasium, Jaderberg/Niedersachsen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Veröffentlichungen

Schäfer H, Struck B, Feldmann EM, Bergmann F, Grage-Griebenow E, Geismann C, Ehlers S, Altevogt P, Sebens S. (2012)

TGF-β1-dependent L1CAM expression has an essential role in macrophage-induced apoptosis resistance and cell migration of human intestinal epithelial cells.
Oncogene. doi: 10.1038/onc.2012.44. [Epub ahead of print]

Struck B, Feldmann E-M, Bergmann F, Grage-Griebenow E, Geismann C, Altevogt P, Schäfer H, Sebens S (2011)

The role of TGF-β1 induced L1CAM expression in malignant transformation of intestinal epithelial cells.
J Cancer Res Clin Oncol 138: Suppl. 1; 26 (discussed poster) (IF 2,485)

Danksagung

Viele Personen haben mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und an dieser Stelle möchte ich mich bei ihnen bedanken.

Ich danke Professor Susanne Sebens für die Bereitstellung eines sehr gut durchdachten, spannenden Promotionsthemas sowie für die sehr gute Betreuung. Stets bin ich bei ihr mit allen Fragen auf offene Ohren gestoßen und sie konnte mich bei Problemen immer wieder motivieren und für die Forschung begeistern. Eine bessere Betreuung für meine Doktorarbeit hätte ich nicht finden können!

Auch bei Professor Heiner Schäfer möchte ich mich für seine große Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dagmar Leisner, Maike Witt-Ramdohr sowie Dr. Claudia Geismann, die mir bei der Einarbeitung in die meisten Methoden geholfen haben. Stets sind sie mir mit sehr viel Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft begegnet, sodass ich nicht nur viel gelernt habe, sondern auch immer sehr viel Freude an der Arbeit im Labor hatte.

Außerdem danke ich Maike Großmann, Frauke Grohmann, Iris Bauer und Eike Jürgen und allen anderen Mitgliedern des Labors für Molekulare Gastroenterologie & Hepatologie für die vielen guten Tipps und Ratschläge und die uneigennützige Unterstützung.

Zuletzt möchte ich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich in allen Lebenslagen unterstützen. Ich bin sehr froh, dass es sie gibt!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Kiel, den 04.12.2013
gez. Birte Struck