

# **Funktionelle Untersuchungen zur Expression von L1 beim Ovarialkarzinom**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern

zur Verleihung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte

**Dissertation**

(D 386)

vorgelegt von

Diplombiologe

Alexander Stoeck

Betreuer: Prof. Dr. W.E. Trommer

**Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 29. August 2005**

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. S. Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W.E. Trommer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Altevogt

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die auf unterschiedlichste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. P. Altevogt danke ich dafür, dass ich in den letzten sechs Jahren in seiner Arbeitsgruppe alle Höhen und Tiefen der Forschung miterleben durfte. Aber auch für seine umfangreiche wissenschaftliche Betreuung und die entscheidenden Kurskorrekturen meines Forschungsschiffs.

Herrn Prof. Dr. W. Trommer danke ich für seine spontane Bereitschaft diese Arbeit vor der Fakultät für Chemie an der Universität Kaiserslautern zu vertreten und seine Bemühung trotz akuter Terminnot einen passenden Prüfungstermin zu ermöglichen.

Herrn Prof. Dr.-Ing. S. Ernst danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. V. Schirmmacher danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung Zelluläre Immunologie des deutschen Krebsforschungszentrums anzufertigen.

Allen Mitarbeitern des 7. Stockwerkes danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gemeinsame schöne Zeit in- und außerhalb des Labors. Insbesondere danke ich

Pauli für die feindliche Übernahme seiner Wohnung und eine tolle Zeit zusammen in Heidelberg. Sabine, dafür dass sie immer ein offenes Ohr hatte. Svenja, die sich als hervorragende Auffangstation mittelloser Tiere erwies, für die sprachlichen Glättungen meiner Arbeit. Safwan für einen unvergesslichen Nachmittag beim Frisör. Verena, die mir endgültig jegliche Lust an CS geraubt hat. Daniela für den Nachweis, dass in Magermilchpulver Milchproteine nachweisbar sind. Heidi, die mit mir die saarländische Fraktion bildete. Steffen, der tatsächlich Tennis besser als Fußball findet. Yasmin und Sascha... man ihr habt alles noch vor euch! Rave, den wir doch noch zum FCK Fan bekehren konnten.

Jens danke ich für so manch einen unvergesslichen Abend in der Altstadt und für die Fußballnachmittage. Markus, von dem einige behaupten, wir wären bei der Geburt getrennt worden, danke ich für die endlosen Nächte am Neckar und am PC zwecks Problembewältigung.

Meiner Freundin Yvonne danke ich für ihre unglaubliche Geduld und das Ertragen meiner fanatisch verfolgten Hobbys. Ein weiser Chinese sagte einmal: „wenn du alleine keinen Erfolg hast, suche dir einen Partner“... und es wirkt tatsächlich.

Schließlich danke ich meiner Familie, dafür dass sie immer für mich da ist und mich in jeglicher Notlage unterstützen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	KREBS UND KREBSENTSTEHUNG .....	1
1.1.1	<i>Das Ovarialkarzinom</i> .....	1
1.2	DAS L1 ADHÄSIONSMOLEKÜL .....	2
1.2.1	<i>Funktion und Vorkommen von L1</i> .....	2
1.2.2	<i>Die Struktur des L1- Adhäsionsmoleküls</i> .....	4
1.2.3	<i>Bindungseigenschaften von L1</i> .....	7
1.2.4	<i>Neuropilin-1 ein Bindungspartner von L1 im Nervensystem</i> .....	9
1.3	DIE METALLOPROTEINASEN-DISINTEGRINE (ADAMS) .....	11
1.3.1	<i>Aufbau und Struktur der ADAMs</i> .....	11
1.3.2	<i>Funktionen von ADAM17 und ADAM10</i> .....	13
1.4	EXOSOMEN .....	14
1.4.1	<i>Vorkommen und Funktion von Exosomen</i> .....	14
1.4.2	<i>Biogenese von Exosomen</i> .....	15
1.4.3	<i>Molekulare Zusammensetzung von Exosomen</i> .....	18
<b>2</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>21</b>
3.1	ANTIKÖRPER.....	21
3.1.1	<i>Monoklonale Erstantikörper</i> .....	21
3.1.2	<i>Polyklonale Erstantikörper</i> .....	22
3.1.3	<i>Zweitantikörper</i> .....	22
3.2	INHIBITOREN.....	22
3.3	REAGENZIEEN ZUR STIMULATION VON ZELLEN .....	23
3.4	REAGENZIEEN ZUR INDUKTION VON APOPTOSE.....	23
3.5	MOLEKULARGEWICHTSTANDARDS .....	23
3.6	OLIGODESOXYNUKLEOTIDE.....	24
3.7	ANTISENSEOLIGONUKLEOTIDE .....	24
3.8	SIRNAS .....	25
3.9	PLASMIDE .....	25
3.10	ZELLINIEN.....	25
3.11	PATIENTENMATERIAL .....	26
3.12	PUFFER UND LÖSUNGEN .....	26
3.12.1	<i>SDS-Gelelektrophorese</i> .....	26
3.12.2	<i>Western Blot</i> .....	27
3.12.3	<i>Gelatine-Zymogramme</i> .....	28
3.12.4	<i>TNF<math>\alpha</math>-Spaltassay</i> .....	29
3.12.5	<i>Saccharose-Gradient</i> .....	29
3.12.6	<i>Nicolettipuffer zur Bestimmung der Apoptoserate</i> .....	29
3.12.7	<i>Puffer und Lösungen für die Zelladhäsion</i> .....	30
3.12.8	<i>Sonstige</i> .....	30
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>32</b>
4.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN .....	32
4.1.1	<i>Isolation von RNA aus Zellen und Gewebeprobe</i> .....	32
4.1.2	<i>Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen</i> .....	32
4.1.3	<i>Auftrennung von RNA mittels Elektrophorese</i> .....	32
4.1.4	<i>cDNA-Synthese (Reverse Transkription)</i> .....	33
4.1.5	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion</i> .....	33
4.1.6	<i>Auftrennung von DNA mittels Elektrophorese</i> .....	34
4.2	ZELLBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN.....	34
4.2.1	<i>Kultivierung von Zelllinien</i> .....	34
4.2.2	<i>Kultivierung von Zellen unter Hypoxie</i> .....	35
4.2.3	<i>Bestimmung der Zellzahl</i> .....	35
4.2.4	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i> .....	35
4.2.5	<i>Transfektion von Zellen</i> .....	35



4.2.6	Durchflusszytometrie.....	37
4.2.7	Nachweis apoptotischer Zellen nach Nicoletti.....	38
4.2.8	Isolation von Zellen aus Aszites.....	38
4.2.9	Herstellung von Präparaten für die Immunfluoreszenz- Mikroskopie.....	39
4.2.10	Zelladhäsion auf gereinigtem Substrat.....	40
4.2.11	Untersuchung der Zell-Zellbindung durch Depletion.....	41
4.3	BIOCHEMISCHE METHODEN.....	41
4.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE).....	41
4.3.2	Western Blot.....	42
4.3.3	Lyse von Zellen mit TX-100- bzw. BOG-Lysispuffer.....	44
4.3.4	Lyse von Vesikeln mit BOG-Lysispuffer.....	44
4.3.5	Proteinbestimmung nach Bradford.....	44
4.3.6	Immunpräzipitation.....	45
4.3.7	Aufkonzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration.....	45
4.3.8	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure.....	45
4.3.9	Isolation von Vesikeln durch Ultrazentrifugation.....	46
4.3.10	Fraktionierung im Saccharose-Gradient.....	47
4.3.11	Methanol-Chloroform-Proteinfällung.....	48
4.3.12	Aufreinigen von löslichem L1 aus Aszites.....	49
4.3.13	ELISA.....	49
4.3.14	TNF $\alpha$ -Spaltassay.....	50
4.3.15	Zymogramm zur Bestimmung von Gelatinase-Aktivität.....	50
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>52</b>
5.1	DER EINFLUSS VON L1 AUF DIE APOPTOSE VON TUMORZELLEN.....	52
5.1.1	Behandlung L1 positiver Zellen mit Apoptose induzierenden Substanzen.....	52
5.1.2	Induktion der Apoptose durch Hypoxie.....	55
5.1.3	Apoptose von Ovarialkarzinomzellen mit unterschiedlichem L1 Expressionsprofil.....	57
5.1.4	Apoptoseinduktion mit Cisplatin.....	58
5.1.5	Selektion L1-positiver Tumorzellen mittels Cisplatin-Behandlung.....	59
5.1.6	Der Einfluss von löslichem L1 auf die Apoptose.....	61
5.1.7	Induktion von Apoptose führt zur verstärkten Bcl-2 Expression in L1-positiven Zellen.....	62
5.2	EINFLUSS DER APOPTOSE AUF DIE SPALTUNG VON L1.....	63
5.2.1	Induktion von Apoptose führt zur verstärkten Freisetzung von löslichem L1.....	64
5.2.2	Hypoxie verstärkt die Freisetzung von L1.....	66
5.2.3	Spaltung von L1 durch multiple Metalloproteinasen während der Apoptose.....	67
5.2.4	Durch Apoptose induzierte Spaltung von L1 in Vesikeln.....	69
5.2.5	Nachweis von L1 in verschiedenen vesikulären Strukturen.....	71
5.3	EXOSOMEN VON OVARIALKARZINOMZELLEN.....	74
5.3.1	Metalloproteinasen und ihre Substrate in Exosomen.....	74
5.3.2	Der Einfluss von Kalzium auf Spaltung und Exosomen-Freisetzung.....	77
5.3.3	Analyse Ionomycin- induzierter Vesikel im Saccharose-Gradienten.....	79
5.3.4	Aktivierung der L1-Spaltung durch Ionomycin.....	80
5.3.5	Nachweis der Spaltung in Exosomen.....	82
5.3.6	Mechanismus weiterer Spaltung-induzierender Substanzen.....	83
5.3.7	Die Wirkung des Calmodulin-Inhibitors TFP auf die Vesikelbildung.....	85
5.3.8	Aktivität der Metalloproteinasen in Exosomen.....	86
5.3.9	Identifikation der L1 und CD44 spaltenden Protease in Exosomen.....	88
5.4	NACHWEIS VON EXOSOMEN IN VIVO.....	91
5.4.1	Biochemische Analyse aus Aszites isolierter Vesikel.....	91
5.4.2	Enzymatische Aktivität der Aszites-Vesikel.....	94
5.4.3	Nachweis von Matrixmetalloproteinasen in Vesikeln aus Aszites.....	96
5.5	UNTERSUCHUNGEN EINER MÖGLICHEN NEUROPILIN-1-L1 INTERAKTION.....	98
5.5.1	Nachweis von NRPI in Ovarialkarzinomzellen und Tumorgewebe.....	98
5.5.2	NRPI positive Zellen im Aszites von Patientinnen.....	100
5.5.3	Charakterisierung der aus Aszites isolierten Zellpopulationen.....	101
5.5.4	L1-vermittelte Bindung von Tumorzellen an Mesothelzellen.....	103
5.5.5	L1-vermittelte Bindung an NRPI exprimierende Fibroblasten.....	106
5.5.6	Untersuchung einer NRPI-vermittelten Zelladhäsion auf L1 als Substrat.....	107
5.5.7	Nachweis einer direkten Protein-Protein Interaktion.....	109
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>111</b>

6.1	L1 EXPRESSION SCHÜTZT ZELLEN VOR APOPTOSE .....	111
6.2	MECHANISMEN DER ANTI-APOPTOTISCHEN WIRKUNG VON L1 .....	115
6.3	DURCH APOPTOSE INDUZIERT SPALTUNG VON L1 .....	118
6.4	EXOSOMEN VON OVARIALKARZINOMZELLEN .....	119
6.4.1	<i>Charakterisierung der Exosomen aus Aszites</i> .....	125
6.5	NEUROPILIN-1, EIN MÖGLICHER BINDUNGSPARTNER VON L1 IM OVARIALKARZINOM .....	129
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>133</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>134</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>138</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>155</b>
10.1	PUBLIKATIONEN .....	155
10.2	LEBENS LAUF.....	156
10.3	ERKLÄRUNG .....	157

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs und Krebsentstehung

Karzinom ist ein Oberbegriff für maligne, entartete epitheliale Gewebe. Karzinome stellen die häufigste Krebserkrankung beim Menschen dar. Die Krebsentstehung verläuft dabei im Allgemeinen in mehreren Schritten und durch Kombination verschiedener Mechanismen und Faktoren (Lodish, 2000), wie z.B. genetische Prädisposition (Williams et al., 1994; Cavenee und White, 1996), Wechselwirkungen mit der Umwelt und Lebensweise der Betroffenen bzw. deren Exposition zu toxischen Noxen. Krebszellen sind definiert durch unkontrolliertes Wachstum und werden daher als neoplastisch bezeichnet. Die meisten Krebserkrankungen gehen vermutlich auf eine einzige, durch somatische Mutation veränderte Zelle zurück. Die Akkumulation weiterer Mutationen in Tochterzellen führt letztendlich zur Entstehung einer malignen, neoplastischen Population. Dieser langjährige Prozess wird als Tumorprogression bezeichnet (Vogelstein und Kinzler, 1993). Drei Gruppen von Genen spielen hierbei eine Rolle: Onkogene (Hunter, 1997), Tumorsuppressorgene (Weinberg, 1995) und Mutatorgene (Leaquer et al., 1998).

### 1.1.1 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom gehört zu den aggressivsten Tumoren und ist mit rund 8000 betroffenen Frauen jährlich in Deutschland die zweithäufigste bösartige Erkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane. Wird die Erkrankung in einem frühen lokal begrenztem Stadium (I) diagnostiziert, liegt die Fünfjahres- Überlebensrate bei 80-90%. Da keine charakteristischen Frühsymptome auftreten und bisher kein *screening* für Eierstockkrebs etabliert ist, können allerdings etwa zwei Drittel der Fälle erst in den fortgeschrittenen Stadien III und IV diagnostiziert werden. In diesen späteren Stadien haben sich meist bereits Metastasen außerhalb der Eierstöcke gebildet. Mehr als die Hälfte der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom können nicht geheilt werden. Im Jahr 1998 starben in Deutschland 6027 Frauen an einem Ovarialkarzinom. Dies ist somit die führende Todesursache unter den gynäkologischen Erkrankungen.

Die Primärtherapie des Ovarialkarzinoms besteht aus einer möglichst vollständigen Entfernung des Tumorgewebes. Je weniger Resttumor verbleibt, desto besser ist die weitere

Prognose. Im Anschluss an die Operation wird ab Stadium II eine Chemotherapie durchgeführt. Konnte der Tumor vollständig entfernt werden, so spricht man von einer „adjuvanten“ Chemotherapie, deren Ziel die Heilung ist. Bei verbleibenden Tumorresten soll die Chemotherapie die Tumormasse verkleinern und die Überlebenszeit verlängern. Kann keine Heilung erzielt werden, bezeichnet man dies als „palliative“ Chemotherapie. Die Kombination einer Platinverbindung (Cisplatin, Carboplatin) mit Paclitaxel wird derzeit als *first-line*-Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms angesehen. Zwei Drittel bis drei Viertel aller Patientinnen erleiden ein Rezidiv nach ursprünglich erfolgreicher Therapie (Platin-sensitive Patientinnen). Für Patientinnen mit Progression während der *first-line*-Therapie oder einem Rezidiv innerhalb des ersten Jahres nach Abschluss der Primärbehandlung (Platin-refraktäre Patientinnen) stehen nur noch wenige therapeutische Optionen zur Verfügung.

Das Ovarialkarzinom ist eine komplexe Erkrankung, bei der normalerweise streng regulierte Prozesse, wie Proliferation, Apoptose und Migration, fehlreguliert sind (Naora und Montell, 2005). Die Progression von lokal begrenztem Primärtumor zur Bildung von Metastasen geht mit einer Veränderung von zellulären Eigenschaften einher (Fischer, 2002). So kommt es in malignen Zellen häufig zur Re-Expression von Adhäsionsmolekülen, die eine wichtige Rolle bei verschiedenen migratorischen Prozessen während der Embryonalentwicklung spielen und im adulten Organismus nicht mehr vorhanden sind.

In Tumoren der Ovarien (Eierstöcke) und des Uterus (Gebärmutter) wird das L1 Adhäsionsmolekül überexprimiert, während gesundes Gewebe oder gutartige Veränderungen negativ für L1 sind (Fogel et al., 2003).

## **1.2 Das L1 Adhäsionsmolekül**

### **1.2.1 Funktion und Vorkommen von L1**

Das L1 Protein wurde ursprünglich als ein Adhäsionsmolekül des Nervensystems identifiziert. In der Maus kann das Molekül auf postmitotischen Neuronen und Schwannschen Zellen nachgewiesen werden (Stallcup et al., 1983; Seilheimer und Schachner, 1988). In Studien mit blockierenden Antikörpern konnten dem L1- Molekül verschiedene Funktionen zugeordnet werden, wie Beteiligung an Migration (Lindner et al., 1983) und Adhäsion

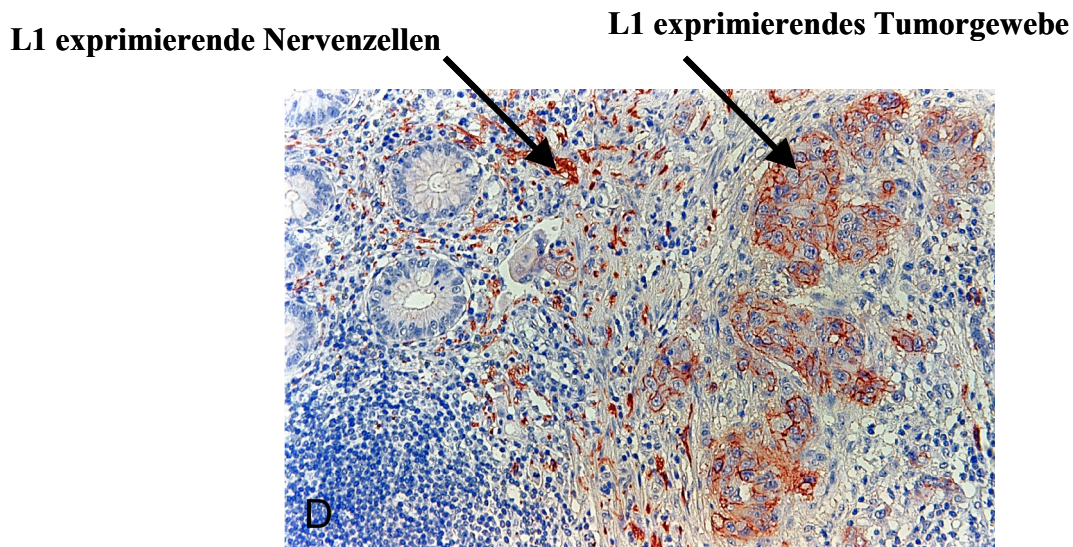
(Keilhauer et al. 1985), dem Auswachsen von Neuriten (Chang et al., 1987; Doherty et al., 1995) sowie an der Faszikulation (Bündelung) und Myelinisierung von Neuriten (Seilheimer et al., 1989; Wood et al., 1990).

Das Gen für L1 ist sowohl in der Maus als auch beim Menschen auf dem X-Chromosom lokalisiert (Djabali et al., 1990). Mehr als hundert Mutationen im L1 Gen sind bekannt. Diese führen zu schweren neurologischen Missbildungen und Fehlfunktionen, die offenbar auf Störungen im Bindungsverhalten des Moleküls zurückzuführen sind (Brummendorf et al., 1998; Cheng und Lemmon, 2004). Beispiele für bereits charakterisierte Erkrankungen sind der Hydrocephalus, das MASA- Syndrom (*mental retardation, aphasia, shuffling gait and adducted thumbs*) oder die spastische Paraplegie Typ I (SPG I) (Rosenthal et al., 1992; Van Camp et al., 1993; Fransen et al., 1994; Jouet et al., 1994; De Angelis et al., 2002).

L1 tritt nicht nur im Nervensystem auf, sondern wird auch auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen, wie Knochenmarkzellen, reifen Thymozyten und der Mehrheit der peripheren B- und T-Lymphozyten in der Maus gefunden (Kowitz et al., 1992; Kowitz et al., 1993). Im humanen Immunsystem wird L1 auf CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und peripheren B-Lymphozyten schwach exprimiert (Ebeling et al., 1996; Pancook et al., 1997). Weiterhin wurde L1 auf Nierenepithelzellen nachgewiesen (Debiec et al., 1998, Allory et al., 2005). Während L1 im Nervensystem gut charakterisiert ist, ist über die funktionelle Bedeutung von L1 im Immunsystem noch wenig bekannt. Es wird berichtet, dass L1 wichtige Funktionen für die Erhaltung der Lymphknotenarchitektur besitzt (Di Sciallo et al., 1998). Auch bei der Entwicklung der Milz spielt L1 vermutlich eine wichtige Rolle. In L1 *knock-out* Mäusen kommt es zu einer selektiven Missbildung der Milz: die Randbereiche der weißen Pulpa waren unregelmäßig geformt und unterbrochen (Wang et al., 2000). Weiterhin kann L1 als kostimulatorisches Molekül bei der T-Zellaktivierung wirken. Transfektionen von murinen Myelomzellen mit humanem L1 erhöhte die Fähigkeit dieser Zellen, T-Lymphozyten zu aktivieren (Balaian et al., 2000). Außerhalb des Nerven- und Immunsystems ist L1 an der Morphogenese der Nierentubuli beteiligt (Debiec et al., 1998).

Des Weiteren wird L1 auch auf vielen Tumoren, wie z.B. Melanom, Neuroblastom, Bronchialkarzinom, Nierenzellkarzinom, Gliom und bei der monozytären Leukämie exprimiert. Verschiedene Studien zeigen, dass die Expression von L1 durch Erhöhung der Invasion und Migration von Tumorzellen deren Metastasierung begünstigt (Linnemann et al., 1989; Kowitz et al., 1993; Onishi et al., 1998; Thies et al., 2002). Die Expression von L1 in normalem und malignem Nierengewebe untersuchten Allory et al. (2005). Interessanterweise konnte dabei L1 nur auf Nierenkarzinomen nachgewiesen werden, deren Ursprungsgewebe

negativ für L1 war. Auch in dieser Studie konnte in einer Unterart des Nierenzellkarzinoms eine Korrelation zwischen der L1 Expression und einem erhöhten Risiko zur Bildung von Metastasen beobachtet werden. Beim Kolonkarzinom (Dickdarm) konnte L1 ebenfalls nachgewiesen werden (Gavert et al., 2005). Dabei war das Molekül in Tumorzellen vertreten, die die invasive Front des Tumors bilden, während die Zellen der inneren Tumormasse negativ waren. Weiterhin konnten die Autoren einen Zusammenhang zwischen einer  $\beta$ -Catenin vermittelten Genregulation und der Expression von L1 aufzeigen. Fehlerhafte  $\beta$ -Catenin vermittelte Genregulation steht im Verdacht, die Entwicklung von Kolonkarzinomen zu fördern und im Verlauf der Erkrankung die Invasivität und das Migrationsverhalten der Tumorzellen zu beeinflussen (Gavert et al., 2005). Schließlich hatten Arbeiten unserer Gruppe gezeigt, dass die Expression von L1 auf Tumoren der Ovarien und des Uterus mit dem klinischen Grad der Differenzierung und einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung assoziiert ist (Fogel et al., 2003).

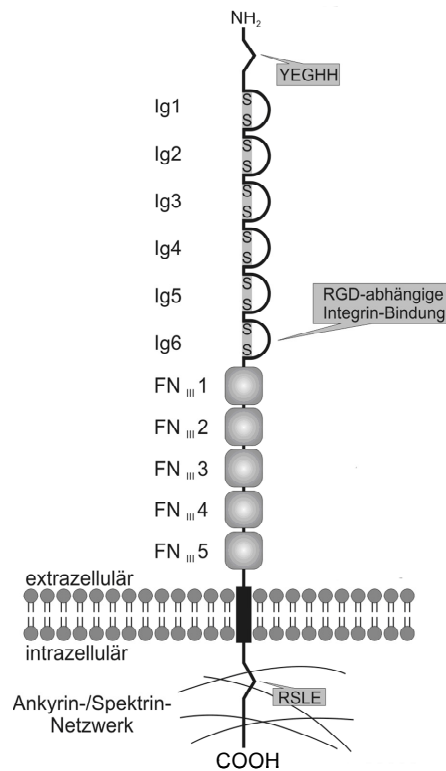


**Abb. 1: Färbung von L1 auf Ovarialkarzinomgewebe.** Die Abbildung zeigt L1 exprimierendes Tumorgewebe. In unmittelbarer Nachbarschaft L1 exprimierende Nervenzellen. L1 ist rötlich gefärbt. (M. Fogel, Rehovot Israel)

### 1.2.2 Die Struktur des L1- Adhäsionsmoleküls

L1 ist ein 220 kDa transmembranes Glykoprotein, das zur Immunglobulin (Ig) Superfamilie gehört (Moos et al., 1988). Neben der murinen und der humanen Form von L1 findet man homologe Moleküle auch in der Ratte (NILE) (Lee et al., 1981), im Huhn (NgCAM) (Grumet et al., 1984) und in *Drosophila* (Neuroglian) (Bieber et al., 1989). L1 besitzt einen extrazellulären Teil bestehend aus sechs Ig-Domänen gefolgt von fünf

Fibronektin Typ III-ähnlichen Domänen (**Abb. 2**). Die extrazellulären Domänen sind durch eine kurze transmembrane Aminosäuresequenz mit einer hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne verbunden (Moos et al., 1988; Sonderegger und Rathjen, 1992; Reid und Hemperly, 1992).



**Abb. 2: Schematische Strukturübersicht des L1 Proteins.** Die Darstellung zeigt die sechs Ig-Domänen, gefolgt von den fünf Fibronektin-III-Einheiten, dem transmembranen Bereich und der hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne. Die Lage der extrazellulären bzw. zytoplasmatisch alternativ gespleißten Mini-Exons (YEGHH und RSLE) sind gekennzeichnet. Die RGD-abhängige Integrin-Bindestelle in der sechsten Ig-Domäne ist ebenfalls hervorgehoben. Das Molekül ist über Ankyrin und Spektrin mit dem Zytoskelett verbunden.

Durch Sequenzierung konnten im Maus-L1 zwei und im Menschen ein RGD-Motiv in der sechsten Ig-Domäne identifiziert werden. Das zweite RGD-Motiv im Menschen ist durch einen Aminosäureaustausch zu LGD mutiert.

Neben mehr als 20 Glykosylierungsstellen (Moos et al., 1988) enthält das Molekül zwei alternativ gespleißte Mini-Exons. Durch alternatives Spleißen des Exons 2 enthält die extrazelluläre Domäne des neuronal exprimierten L1 ein aus fünf Aminosäuren bestehendes Motiv (YEGHH) (Jouet et al., 1995), das im nicht neuronal exprimierten L1 Protein fehlt. Arbeiten von De Angelis et al. (2002) zeigen, dass das Exon 2 für die homo- sowie heterophile Bindung an neuronale Liganden, wie Axonin-1/TAG-1/TAX-1, wichtig ist.

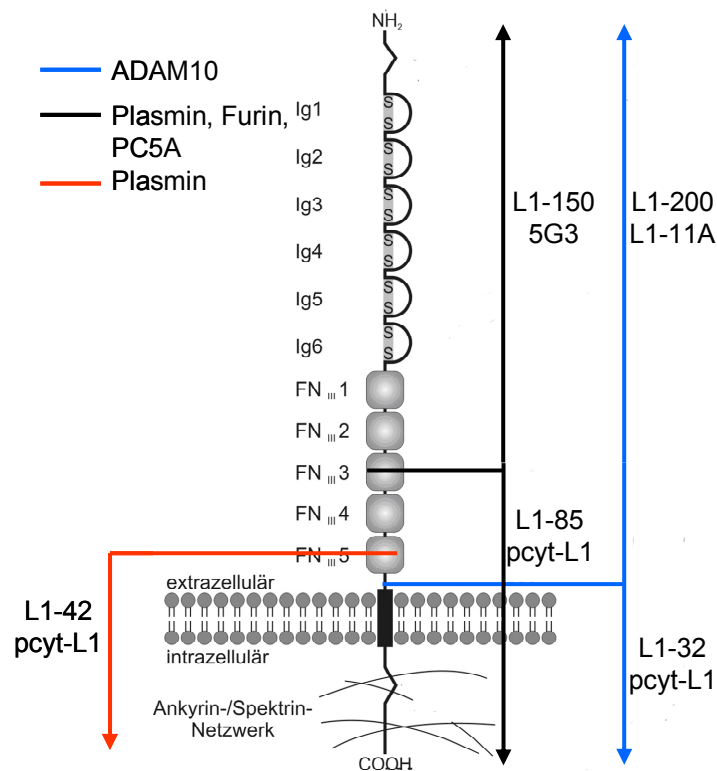
Ebenso wird im zytoplasmatischen Teil des neuronalen L1 durch alternatives Spleißen des Exons 27 ein Aminosäuremotiv eingefügt (RSLE) (Miura et al., 1991; Takeda et al., 1996).

Für diese Sequenz konnte man einen direkten Zusammenhang zwischen der Clathrin-vermittelten Endozytose von L1 und einer verminderten Zelladhäsion nachweisen (Long et al., 2000). Dieses Motiv führt zu einer verstärkten Clathrin-vermittelten Endozytose von L1 nach Dephosphorylierung eines Tyrosins unmittelbar vor dem RSLE-Motiv (Kamiguchi et al., 1998; Schaefer et al., 2002) und dadurch zu einer verminderten Zelladhäsion (Long et al., 2001).

L1 liegt nicht nur in einer transmembranen Form vor, sondern kann durch Abspaltung des extrazellulären Teils in eine funktionell aktive lösliche Form überführt werden. Melanomzellen spalten L1 von der Zelloberfläche ab und bauen es in die benachbarte extrazelluläre Matrix ein (Montgomery et al., 1996). Außerdem stimuliert lösliches L1 die Migration von Gliomzellen (Izumoto et al., 1996). In Form eines Fusionsproteins schützt L1 verschiedene Neuronen vor Apoptose (Chen et al., 1999a; Nishimune et al., 2005) und fördert nach Durchtrennung des Rückenmarks das Axonwachstum *in vivo* (Roonpraput et al., 2003). Arbeiten unserer Gruppe hatten gezeigt, dass L1 durch eine Metalloproteinase sowohl in Tumoren als auch im sich entwickelnden Maushirn gespalten wird (Gutwein et al., 2000; Mechtersheimer et al., 2001). Letztere Studie weist ebenfalls darauf hin, dass die extrazelluläre Spaltung von L1 im membranproximalen Bereich durch ADAM10 (*a disintegrin and metalloproteinase*) erfolgt. Dabei entsteht ein 32kDa Fragment (L1-32), das in der Plasmamembran zurück bleibt, sowie ein lösliches Fragment (L1-200), das in den Überstand abgegeben wird. Die biologische Funktion dieses Prozesses ist noch weitgehend unbekannt. Es konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten haptotaktischen Migration von L1-transfizierten CHO-Zellen und der Metalloproteinase-vermittelten Spaltung von L1 gezeigt werden (Mechtersheimer et al., 2001). In weiterführenden Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass die Spaltung von L1 nicht nur an der Zelloberfläche sondern auch in von Zellen freigesetzten Vesikeln stattfindet (Gutwein et al., 2003).

Des Weiteren können die Serinproteasen Plasmin (Nayeem et al., 1999) und Trypsin (Sadoul et al., 1988), sowie die Proprotein-Konvertase PC5A (Kalus et al., 2003) L1 im extrazellulären Bereich spalten. Die Schnittstelle hierfür befindet sich in der dritten FN<sub>III</sub>-Domäne und ist gekennzeichnet durch ein dibasisches Aminosäuremotiv mit der Sequenz <sup>839</sup>QRKHSKRHH<sup>848</sup> (Sadoul et al., 1988; Nayeem et al., 1998). Diese Sequenz entspricht dem Erkennungsmotiv für Proprotein-Konvertasen, nämlich (R/K) X<sub>0,2,4,6</sub>(K/R). Die Spaltstellen und die jeweils generierten Fragmente sind in **Abb. 3** schematisch dargestellt.





**Abb. 3: Schematische Darstellung der Spaltstellen in L1.** Die Darstellung zeigt die Struktur des L1 Moleküls und gibt eine Übersicht über die Spaltstellen und die daraus resultierenden Spaltfragmente. In der fünften FN<sub>III</sub>-Domäne liegt die Spaltstelle für Furin, Plasmin und PC5A. Bei der Spaltung durch eine der Proteasen entsteht ein 150kDa (L1-150) funktionelles lösliches Fragment und ein 85kDa (L1-85) transmembranes Fragment. Das L1-85 kann durch Plasmin weiter prozessiert werden, wodurch ein 42kDa (L1-42) transmembranes Fragment generiert wird. Membranproximal kann L1 durch ADAM10 gespalten werden. Es entsteht ein 200kDa (L1-200) funktionelles lösliches Fragment und ein 32kDa (L1-32) transmembranes Fragment. Eingetragen sind zu den jeweiligen Spaltfragmenten die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen L1.

### 1.2.3 Bindungseigenschaften von L1

Die weit verbreitete Expression und Verteilung und die hochkonservierte Struktur lassen vermuten, dass L1 vielfältig interagiert und dabei verschiedene Funktionen erfüllt.

L1 wurde ursprünglich als ein Molekül beschrieben, das in *trans* interagiert. Dies bedeutet, dass L1-Ig-Domänen auf der Zelloberfläche benachbarter Zellen homophil miteinander wechselwirken (Seilheimer und Schachner, 1988; Kadmon et al., 1990; Holm et al., 1995; Zhao et al., 1998). Die homophile Bindung ist Ca<sup>2+</sup>-unabhängig (Lemmon et al., 1989). Es gab Hinweise darauf, dass die homophile Bindung durch mehrere extrazelluläre Domänen des Moleküls vermittelt wird (Brümmendorf et al., 1998). Kristallstrukturdaten belegten dann, dass die Ig-Domänen 1-4 eine strukturelle Kasette ausbilden, die für die homophile Bindung absolut notwendig ist (Freigang et al., 2000).

L1 kann aber auch heterophile Bindungen eingehen. Zu den möglichen Liganden gehören dabei verschiedene Mitglieder der Ig-Superfamilie (TAG-1/Axonin-1) (Kuhn et al., 1991;

Felsenfeld et al., 1994), F3/F11 (Olive et al., 1995), die Integrine  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha IIb\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 1$  und  $\alpha v\beta 3$  (Ruppert et al., 1995; Ebeling et al., 1996; Montgomery et al., 1996; Duczmal et al., 1997; Pancook et al., 1997; Felding-Habermann et al., 1997; Blaess et al., 1998) sowie Laminin (Hall et al., 1997) und Chondroitinsulfat, Proteoglykane wie Phosphacan und Neurocan (Grumet et al., 1993; Friedlander et al., 1994; Margolis et al., 1996; Oleszewski et al., 1999, 2000). Die extrazelluläre Bindung an L1 über homophile und heterophile Bindungspartner beeinflusst verschiedene Signalwege, die unterschiedliche Prozesse, wie z.B. das Auswachsen von Neuriten oder die Zellmigration steuern (Atashi et al., 1992; Igelzi et al., 1994; Williams et al., 1994). So konnte für die homophile Bindung die Aktivierung einer Tyrosin-Signalkaskade, als direkte Folge nach lateraler Assoziation der L1-Ektodomäne mit dem FGF-Rezeptor, gezeigt werden (Doherty et al., 1995). Yip und Siu (2001) konnten homophile und heterophile Bindungseigenschaften von L1 auf PC12-Zellen nachweisen. Die L1-L1-Bindung wird nur für die homotypische Adhäsion benutzt, während die heterophile L1 Wechselwirkung mit dem  $\alpha v\beta 3$ -Integrin zum Auswachsen von Neuriten führt (Yip et al., 1998; Yip und Siu, 2001). Voura et al. (2001) beschreiben, dass die Interaktion von L1 mit dem  $\alpha v\beta 3$ -Integrin eine wichtige Rolle in der Transmigration von Melanomzellen durch Endothelzellen spielt.

Die temperatursensitive heterophile L1-Bindung an Integrine ist abhängig von zweiwertigen Kationen und wird über spezifische RGD-Aminosäuremotive in der sechsten Ig-Domäne des L1 Moleküls vermittelt (Ruppert et al., 1995; Montgomery et al., 1996; Oleszewski et al., 1999, Mechttersheimer et al., 2001). Diese Tripeptidyl-Einheit kann in vielen Integrin-bindenden Matrix-Proteinen, wie z.B. Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Kollagen Typ I und Vitronectin nachgewiesen werden (Pierschbacher und Ruoslahti, 1987; Ruoslahti und Pierschbacher, 1987) und stellt die Hauptbindungsstelle für Integrine in L1 dar. Die Bindung zwischen L1 und  $\alpha 5\beta 1$  vermittelt die Zellbindung von Thymozyten und Tumorzellen an immobilisiertes L1 (Ruppert et al., 1995). Auch die Interaktion zwischen L1 und dem  $\alpha v\beta 3$ -Integrin kann die Adhäsion und Migration von humanen Tumorzellen vermitteln (Ebeling et al., 1996; Montgomery et al., 1996; Duczmal et al., 1997). Die extrazelluläre Bindung von Liganden durch Integrine beeinflusst eine Reihe von zellulären Eigenschaften, wie Adhäsion, Apoptose, Migration, Proliferation und Differenzierung (Wayner et al., 1991; Cheresch, 1992; Clyman et al., 1992; Leavesley et al., 1992; Matter und Ruoslahti, 2001). Insbesondere der L1-Integrin-Bindungspartner  $\alpha v\beta 3$  ist möglicherweise an vielen fundamentalen biologischen Prozessen wie der Angiogenese, Wundheilung, Entwicklung und Neubildung von Gewebe

und der Regulation anti-apoptotischer Moleküle beteiligt (Cheresh et al., 1992; Montgomery et al., 1994; Matter und Ruoslahti, 2001).

Heterophile *cis*-Interaktionen von Molekülen auf derselben Zelle wurden für L1 mit NCAM (Feizi, 1994), CD9 (Schmidt et al., 1996) und CD24 (Kadmon et al., 1995) beschrieben. Es wird vermutet, dass *cis*-Interaktionen die Spezifität und Affinität der L1-Bindung an Liganden in *trans* erhöhen (Feizi, 1994; Kadmon et al., 1995; Schmidt et al., 1996). L1 erscheint in einer homophilen *cluster* Formation auf der Zelloberfläche. Dies lässt vermuten, dass die Funktionsfähigkeit von L1 von einer engen Assoziation auf der Zelloberfläche abhängt. Hall et al. (2000) konnten zeigen, dass eine artifizielle Oligomerisierung aus drei extrazellulären Domänen von L1 in *cis* die Bindungsaffinität von L1 an verschiedene Liganden (Laminin,  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin) in *trans* erhöht und das Auswachsen von Neuriten verstärkt.

#### 1.2.4 Neuropilin-1 ein Bindungspartner von L1 im Nervensystem

Neuropilin-1 (NRP1) ist ein 130kDa transmembranes Glykoprotein, das während der Entwicklung des Nervensystems an der Wegfindung von Neuronen und am Auswachsen von Axonen beteiligt ist (Chen et al., 2005). Dabei sind NRP1 und L1 Teil eines Rezeptorkomplexes für die Bindung von Semaphorinen (Sema3A), die zu einer Familie von sowohl transmembranen als auch sezernierten Glykoproteinen gehören, die die Richtung des axonalen Wachstums durch Attraktion oder Repulsion beeinflussen (Castellani et al., 2000). Castellani et al. (2002) konnten zeigen, dass die Bindung von L1 an NRP1 sowohl in *cis* als auch in *trans* erfolgen kann. Während die Bindung in *cis* zur Bildung des Rezeptorkomplexes für Sema3A notwendig ist und zur Repulsion von Axonen führt, kann die Bindung in *trans* durch lösliches L1 diese Repulsion umkehren. Lösliches L1 wirkt dabei als ein Antagonist von Sema3A (Castellani et al., 2002). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus NRP1 und L1, nach Bindung von Sema3A, in Abhängigkeit von L1 endozytiert wird (Castellani et al. 2004). Durch die Behandlung der Zellen mit einem L1-ähnlichen Peptid konnten sowohl die Endozytose als auch die Repulsion blockiert werden. Daraus folgerten die Autoren, dass die Bindung von L1 entweder in *cis* oder in *trans* die Sema3A vermittelten Signalwege moduliert (Castellani et al., 2004).

Die Bindung von L1 an NRP1 wird über die erste Ig-Domäne von L1 vermittelt (Castellani et al., 2002). Itoh et al. (2004) konnten diese Aussage bestätigen, indem sie zeigten, dass die

Bindung von L1 an NRP1 in transgenen Mäusen, in denen die sechste Ig-Domäne des L1 Moleküls deletiert wurde, intakt war.

NRP1 wird nicht nur im Nervensystem exprimiert, sondern kann auch auf Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Expression von NRP1 scheint eine wichtige Rolle bei der Bildung von Blutgefäßen zu spielen. Eine Studie von Kitsukawa et al. (1995) zeigte, dass NRP1 defiziente Mäuse durch schwere Fehlbildungen des Herz-Kreislauf-Systems bereits in der Embryonalphase sterben. Zu den wichtigsten Faktoren, die die Bildung neuer Blutgefäße sowohl in normalen als auch in malignen Geweben anregen, gehören die VEGFs (*vascular endothelial growth factors*). Diese sind multifunktionelle Zytokine, die von vielen verschiedenen Geweben produziert werden können. Die VEGFs wirken als chemotaktisches Agens für Endothelzellen, stimulieren deren Proliferation und vermitteln ihnen Überlebenssignale. Die Aktivität der VEGFs kann dabei durch drei verschiedene Tyrosinkinaseassoziierte VEGF-Rezeptoren vermittelt werden. Eine von fünf VEGF-Spleißvarianten (VEGF-A<sub>165</sub>) kann auch an NRP1 binden (Soker et al., 1998). Die Bindung von VEGF-A<sub>165</sub> an NRP1 alleine reicht jedoch scheinbar nicht aus um Signalwege zu aktivieren. Erst die Ko-Expression eines weiteren VEGF-Rezeptors (VEGF-R2) führte zu einer erhöhten Zellmigration. NRP1 verstärkt die Funktion des VEGF-R2 in Anwesenheit von VEGF-A<sub>165</sub> und ist somit vermutlich ein Ko-Rezeptor von VEGF-R2 auf Endothelzellen (Chen et al., 2005).

NRP1 kann darüber hinaus bei verschiedenen Krebserkrankungen, wie Mamma- (Soker et al., 1998), Prostata- (Latil et al., 2000) und Kolonkarzinom (Parikh et al., 2004) nachgewiesen werden. Über die Funktion des Moleküls in diesem Zusammenhang ist bisher wenig bekannt. Latil et al. (2000) zeigten, dass die Expression von NRP1 in einer Prostatakarzinomzelllinie zu einem aggressiveren Phänotyp und zur verstärkten Tumervaskularisierung führte. Die Überexpression von NRP1 in einer Ratten- Prostatakarzinomzelllinie führte zur verstärkten Migration und gleichzeitig zur erhöhten Bindung von VEGF-A<sub>165</sub> *in vitro*. Bachelder et al. (2001) beobachteten, dass NRP1 auf der metastasierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 exprimiert war, während es auf der nicht-metastasierenden Zelllinie MDA-MB-453 fehlte. Die Expression von NRP1 in MDA-MB-453 Zellen führte unter Hypoxie zu einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose (Bachelder et al., 2001). Interessanterweise kann NRP1 dabei einen Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K)-abhängigen Signalweg (Akt/PKB) unabhängig von VEGF-Rezeptoren aktivieren. Dies lässt vermuten, dass NRP1 in Tumorzellen auch durch andere Tyrosin-kinaseassoziierte Rezeptoren Signalwege aktivieren kann (zusammengefasst in Chen et al., 2005).

## 1.3 Die Metalloproteinasen-Disintegrine (ADAMs)

Metalloproteinasen sind an vielen biologischen Vorgängen, wie Zellproliferation, Zellmigration, Differenzierung, Umgestaltung der extrazellulären Matrix und an der Bildung von Blutgefäßen beteiligt.

Es existieren zwei nahe verwandte Metalloproteinasen-Familien: die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und die Metalloproteinasen-Disintegrine (ADAMs). Die ADAMs sind die erste bekannte Proteinfamilie, die sowohl adhäsive als auch proteolytische Funktionen in ihrer extrazellulären Domäne vereinigt. Verschiedene Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine Metalloproteinasen der ADAM Familie die Spaltung von L1 vermittelt. Lösliches L1 kann im Serum und Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen nachgewiesen werden, zudem konnte eine Korrelation zwischen der Menge an löslichem L1 und der Expression von ADAM10 beim Ovarialkarzinom beobachtet werden (Fogel et al., 2003). Untersuchungen von Gavert et al. (2005) zeigten eine Ko-Expression von L1 und ADAM10 im Kolonkarzinom. Die Regulation und die biologische Funktion der ADAM-vermittelten Spaltung von L1 sind bisher weitestgehend ungeklärt. Auf die ADAM Familie soll im Folgenden näher eingegangen werden.

### 1.3.1 Aufbau und Struktur der ADAMs

Die ADAMs sind Transmembranproteine, die eine Disintegrin- und eine Metalloproteinasen-Domäne beinhalten. Die Pro-Domäne der ADAMs besitzt eine dem „*cystein switch*“-Motiv der MMPs ähnliche Sequenz, welche die Metalloproteinasen in einem inaktiven Zustand hält. Die Aktivierung erfolgt durch Abspaltung der Pro-Domäne. Dieser Prozess findet wahrscheinlich im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) statt und wird durch Pro-Protein-Konvertasen, wie Furin und PC7, vermittelt (Lun et al., 1998; Roghani et al., 1999; Kang et al., 2002). Ein Hinweis für die Furin-abhängige Spaltung ist die Konsensussequenz (RXR/KR) für die Spaltung durch Furin-ähnliche Pro-Protein-Konvertasen zwischen der Pro- und der katalytischen Domäne (Hurskainen et al., 1999; Moss et al., 1997; Black et al., 1998; Srour et al., 2003). Allerdings wurde auch eine autokatalytische Aktivierung im TGN bereits in der Literatur beschrieben (Roghani et al., 1999; Schlomann et al., 2002).

Die Metalloproteinasen-Domäne beinhaltet die Konsensussequenz HEXXHXXGXXH, in der drei Histidinreste und ein Wassermolekül das katalytische Zinkatom koordinieren (Jiang und Blond, 1992). Es wurde gezeigt, dass ADAMs, die das HEXXH-Motiv besitzen auch

katalytisch aktiv sind. Besitzen ADAMs jedoch eine Sequenzvariation, in der das HEXXH-Motiv in ihrer Metalloproteinase-Domäne fehlt, so ist auch keine proteolytische Aktivität vorhanden.

Die Disintegrin-Domäne hat ihren Namen von der starken Sequenzhomologie zu Schlangenserum Disintegrinen (Niewiarowski et al. 1994). Diese kurzen löslichen Proteine, von denen viele die Sequenz RGD besitzen, binden an das Blutplättchen-Integrin gpIIb/IIIa und wirken als kompetitive Inhibitoren für die Blutplättchenaggregation (Blobel & White, 1996). Nur wenige ADAMs besitzen das RGD-Motiv. Bei ADAM15 ist dieses an der Interaktion mit dem Integrin  $\alpha\beta_3$  beteiligt (Krätzschmar et al., 1996, Zhang et al., 1998). Gleichzeitig konnte auch eine RGD-unabhängige Bindung von ADAM12 an das  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin nachgewiesen werden (Chen et al., 1999b). In Verbindung mit der cysteinreichen Region, spielt die Disintegrin-Domäne von ADAM13 eine Rolle bei der Regulation der Enzymaktivität und der Reifung (Smith et al., 2002).

Die zytoplasmatische Domäne besitzt zahlreiche Motive, die für die Signalweiterleitung verantwortlich sind, wie zum Beispiel Phosphorylierungsstellen und prolinreiche Regionen, die Src-homology-3 (SH3)-Domänen binden können (Weskamp et al., 1996).

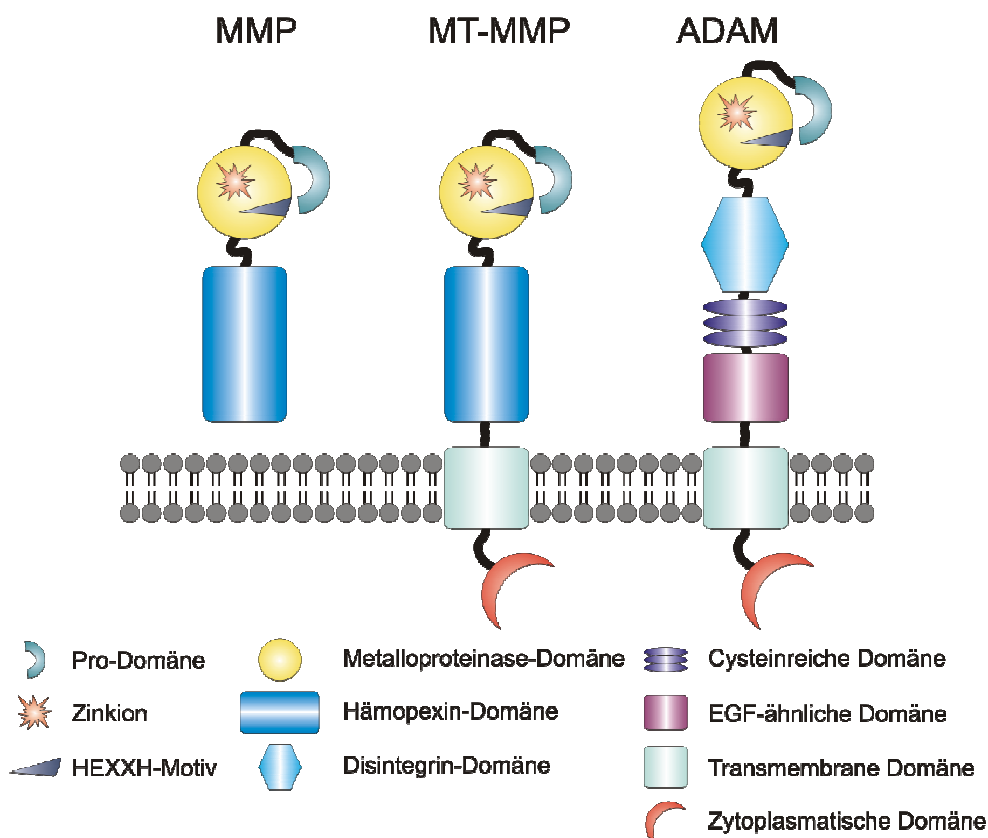


Abb. 4: Schematische Darstellung der Metalloproteinasen MMPs, MT-MMPs und ADAMs.

### 1.3.2 Funktionen von ADAM17 und ADAM10

ADAM17 wurde als erste Protease der ADAM Familie identifiziert, die die Spaltung eines Oberflächenmoleküls vermittelte. Bei diesem Molekül handelte es sich um den *Tumor-necrosis-factor- $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) (Black et al., 2003). TNF $\alpha$  ist ein 26kDa großes membrangebundenes Zytokin, das durch ADAM17 in eine lösliche 17kDa große Form überführt werden kann (Moos et al., 1997). Seitdem stellte sich heraus, dass ADAM17 eine essentielle Rolle bei der Entwicklung von Säugetieren spielt. Aus dem breiten Spektrum seiner möglichen Substrate, die bisher identifiziert wurden, konnte man jedoch schließen, dass ADAM17 auch im adulten Organismus von großer Bedeutung ist (Huovila et al., 2005).

Das Spektrum der durch ADAM17 gespaltenen Substrate umfasst neben den Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$  (Black et al., 2003; Massague und Pandiella, 1993) auch die Spaltung von Zytokinrezeptoren, wie die TNF-Rezeptoren (Vecchi et al., 1996) und Vorläufer einiger Wachstumsfaktoren, wie HB-EGF (Izumi et al., 1998; Gechtman et al., 1999). Daneben werden Zelladhäsionsmoleküle, wie L-Selektin (Feehan et al., 1996), VCAM-1 und CD44, membranproximal durch die Protease gespalten (Huovila et al., 2005).

Ein weiteres Mitglied der ADAM-Familie ist ADAM10. Das ADAM10-Homolog Kuzbanian reguliert durch seine proteolytische Aktivität NOTCH- abhängige Signalwege in *Drosophila* und spielt dadurch eine wichtige Rolle bei der frühen neuronalen Entwicklung. Durch die Charakterisierung von ADAM10 *knock-out* Mäusen konnte eine ähnliche Funktion für ADAM10 auch in Säugetieren identifiziert werden. ADAM10 defiziente Mäuse sterben bereits in der Embryonalphase durch Fehlbildungen des Herzens und des Zentralnervensystems. Diese sind unter anderem auf fehlerhafte NOTCH- vermittelte Signalwege zurückzuführen (zusammengefasst in Huovila et al., 2005). Neben seiner Bedeutung bei der Entwicklung des Nervensystems scheint ADAM10 auch in eine Reihe von physiologischen Prozessen im adulten Gehirn involviert zu sein. So gibt es starke Hinweise für eine Beteiligung von ADAM10 in die nicht amyloide Prozessierung des *Alzheimer-Precursor-Proteins* (APP) (Postina et al., 2004). *In vitro* Studien hatten gezeigt, dass APP ein Substrat für ADAM10 und ADAM17 darstellt.

Des Weiteren regulieren ADAM10 und ADAM17 EGFR vermittelte Signalwege. ADAM10 ist vermutlich die wichtigste Protease für die Spaltung von EGF und Betacellulin (Sahin et al., 2004). Weitere Studien zeigten eine Beteiligung von ADAM10 an der G-Protein-gekoppelte-Rezeptor- (GPCR) induzierten Transaktivierung des EGFR (Blobel, 2005).

## 1.4 Exosomen

### 1.4.1 Vorkommen und Funktion von Exosomen

Während der Reifung von Retikulozyten, den Vorläufer-Zellen der Erythrozyten, konnte erstmals die Freisetzung von Exosomen beobachtet werden (Fevrier und Raposo, 2004). Auf der Plasmamembran von Retikulozyten befindet sich der Transferrin-Rezeptor. Normalerweise wird dieser durch Clathrin-vermittelte Endozytose ständig recycelt. Ab einem bestimmten Reifegrad der Retikulozyten verschwindet der Rezeptor von der Plasmembran. Dieser Prozess wird als Transferrin-Rezeptor „*shedding*“ bezeichnet. Allerdings wird der Rezeptor nach der Endozytose nicht in den Lysosomen degradiert oder von der Oberfläche gespalten, sondern über Exosomen ausgeschleust (Johnstone et al., 1987). Die Freisetzung dieser Exosomen wurde somit als ein Vorgang betrachtet, überschüssige oder nicht mehr benötigte Proteine zu entfernen.

In den vergangenen Jahren wurden jedoch auch Exosomen von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie B-Lymphozyten und dendritischen Zellen, identifiziert. Im Gegensatz zu den Exosomen der Retikulozyten scheinen die der APCs funktionell relevant zu sein. So konnten isolierte Exosomen sowohl die T-Zellproliferation *in vitro* stimulieren als auch einen anti-Tumor-Effekt *in vivo* hervorrufen. Seit dieser Entdeckung konnten Exosomen von einer Vielzahl weiterer hämatopoetischer und nicht hämatopoetischer Zellen isoliert werden, so z.B. von T-Lymphozyten, Mastzellen, Blutplättchen, Epithelzellen und von verschiedenen Tumorzellen (zusammengefasst in Fevrier und Raposo, 2004).

Über die Funktion von Exosomen ist bisher wenig bekannt. Die meisten Beobachtungen basieren auf *in vitro* Studien. Die verschiedenen Proteine, die bisher in Exosomen identifiziert werden konnten und die Tatsache, dass Exosomen in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden konnten, lassen jedoch einen Einfluss auf wichtige biologische Prozesse vermuten. So konnten Clayton et al. (2004) eine Integrin-vermittelte Bindung der Exosomen von B-Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix und an Fibroblasten *in vitro* nachweisen. Diese Bindung könnte Integrin-vermittelte Signalwege in Fibroblasten aktivieren (Clayton et al., 2004).

Weiterhin wird ein Nutzen von Exosomen bei der Therapie von Tumorpatienten diskutiert. Dabei werden dendritische Zellen mit Tumorantigenen beladen. Die Exosomen dieser dendritischen Zellen können dann genutzt werden, um T-Zellen *ex vivo* zu aktivieren und



nach einer adoptiven T-Zell-Immuntherapie einen anti-Tumor Effekt im Patienten hervorzurufen (Chaput et al., 2003).

Exosomen von Tumorzellen scheinen dagegen wiederum in manchen Fällen an einer Immunsuppression beteiligt zu sein, indem sie Rezeptoren exprimieren, die *in vitro* Apoptose von aktivierten T-Zellen induzieren können (Kim et al., 2005).

Neuerdings wird auch eine Beteiligung von Exosomen an der Verbreitung von Pathogenen, wie verschiedene Retroviren, im Organismus diskutiert (Fevrier und Raposo, 2004). Eine Vielzahl weiterer Funktionen sind denkbar, die jedoch noch eingehender untersucht werden müssen.

### 1.4.2 Biogenese von Exosomen

Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Endozytose und der Biogenese von Exosomen. Endozytotische Vesikel können auf verschiedenen Wegen entstehen: durch die Clathrin-vermittelte (klassische) Endozytose oder die Clathrin-unabhängige (nicht klassische) Endozytose. Die klassische Endozytose wurde bisher am besten charakterisiert. Sie führt überwiegend zur Aufnahme von Nährstoffen, Pathogenen, Antigenen, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren. Eines der bekanntesten Beispiele ist die Aufnahme des Transferrin-Rezeptors (TfR). Entscheidend für diese Form der Internalisierung sind vermutlich bestimmte Aminosäuremotive in der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren, die über Adaptor-Proteine (z.B. AP-2) den Kontakt zu Clathrin herstellen. Wie bereits erwähnt, wird auch die neuronale Form von L1 durch die Bindung an AP-2 Clathrin-vermittelt endozytiert (zusammengefasst in Le Roy und Wrana, 2005).

Weniger gut charakterisiert ist der nicht klassische Weg der Endozytose. Es wird vermutet, dass Rafts, Cholesterol- und Glykosphingolipid- reiche Mikrodomänen der Plasmamembran, die Clathrin-unabhängige Internalisierung von raftassoziierten Proteinen vermitteln. Eine besondere Rolle scheint dabei das Caveolin-1 zu spielen, das die Formierung von Caveolae an der Plasmamembran einleitet und zur Bildung von Caveolin-positiven endozytotischen Vesikeln führt (zusammengefasst in Le Roy und Wrana, 2005).

Unabhängig von der Form der Endozytose wandern die endozytotischen Vesikel zu den frühen Endosomen. Diese dienen dann als aktive Sortierstationen, die ihren Inhalt an verschiedene Zielorte (z.B. apikale und basolaterale Plasmamembran, TGN) verteilen können. Manche Oberflächenmoleküle gelangen direkt von den frühen Endosomen zurück zur Plasmamembran (Rezeptor-Recycling). Die Verteilung geschieht durch Transportvesikel, die

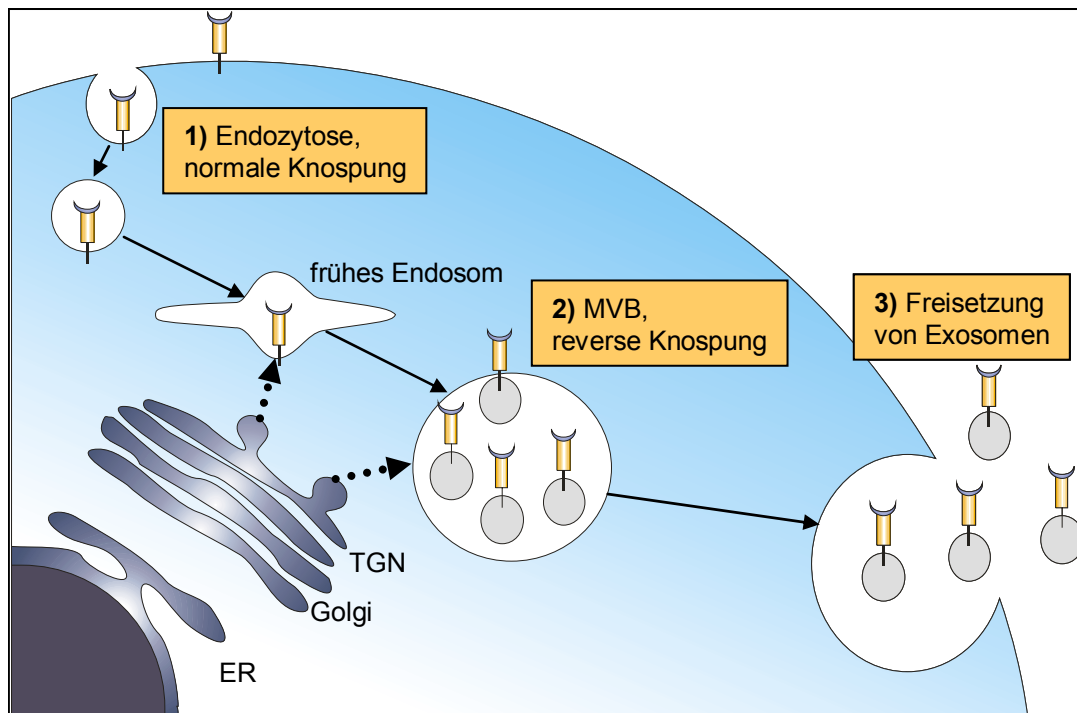
sich von endosomalen Membrantubuli abschnüren, zum Bestimmungsort wandern und mit der Zielmembran fusionieren. Membranproteine, die nicht direkt zurück zur Plasmamembran sortiert werden, verbleiben in den frühen Endosomen und gelangen in die späten Endosomen. Diese entstehen durch einen Reifungsprozess aus den frühen Endosomen, wobei sich zum einen deren Inhalt und zum anderen die Fusionsbereitschaft mit Vesikeln verändert, die von der Plasmamembran, bzw. dem Trans-Golgi-Netzwerk abstammen (Stoorvogel et al., 1991).

Eine weitere Form der Reifung besteht in der kontinuierlichen Anhäufung von internen Vesikeln. Für frühe Endosomen ist es typisch, dass sie keine oder nur wenige Vesikel im Lumen besitzen; späte Endosomen hingegen besitzen zahlreiche interne Vesikel. Aus diesem Grund werden die späten Endosomen auch *multivesicular bodies* (MVBs) genannt. Die internen kleineren Vesikel bezeichnet man als intraluminale Vesikel (ILV) (Sotelo et al., 1959; Novikoff et al., 1964; Fevrier und Raposo, 2004). Die ILV, die während der Reifung im Inneren der MVBs akkumulieren, können auf verschiedene Arten weiterverarbeitet werden. Im ersten Weg werden die mit den Vesikeln assoziierten Proteine und Lipide zu den Lysosomen geleitet und dort abgebaut. Dieser Prozess ermöglicht der Zelle sowohl nicht mehr benötigte Membranproteine als auch die Membran der intraluminalen Vesikel abzubauen (Futter et al., 1996; Mullock et al., 1998). Viele Wachstumsrezeptoren werden nach der Liganden-induzierten Endozytose in die ILV der MVBs sortiert und danach zum Lysosom gebracht, um dort degradiert zu werden. Die Internalisierung durch Vesikel ins Zytosol ist bei manchen Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie dem EGF-Rezeptor, nicht ausreichend, da die aktivierte Tyrosin-Kinase in der zytoplasmatischen Domäne des EGF-Rezeptors weiterhin unkontrolliert mit verschiedenen Signalmolekülen im Zytosol interagieren kann. Mutationen in Mäusen, die das Sortieren des EGFR in die MVBs beeinflussen, tragen unter anderem zur Entstehung von Tumoren bei (Ceresa und Schmid, 2000; Di Fiore und Gill, 1999).

Wenn die MVBs nicht mit den Lysosomen fusionieren, können diese als temporäre Speicherkompartimente dienen. In unreifen dendritischen Zellen werden die Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II-Moleküle (MHC II) in den luminalen Vesikel eines MVB-ähnlichen Kompartiments gespeichert (Kleijmeer et al., 2001). Nehmen dendritische Zellen Antigene auf, so kommt es zur Fusion der luminalen Vesikel mit der limitierenden Membran des MHC II-Kompartiments (MIIC) und gleichzeitig werden die MHC-Moleküle mit dem Antigen beladen. Anschließend erfolgt der Transport der MHC II-Peptid-Komplexe zur Plasmamembran, wo sie naiven T-Zellen präsentiert werden können.

Als weitere Möglichkeit kann die limitierende Membran des MVB mit der Plasmamembran fusionieren. Dabei werden die ILV in den extrazellulären Raum freigesetzt, wo sie nun als

Exosomen bezeichnet werden (Denzler et al., 2000; Fevrier und Raposo, 2004). In **Abb. 5** ist die Biogenese der Exosomen schematisch dargestellt. Exosomen haben einen Durchmesser von 40-100nm und werden von einer Vielzahl von Zellen in den extrazellulären Raum abgegeben. Sie enthalten Zytosol und zytosomale Proteine im Innern und die extrazelluläre Domäne von Transmembranproteinen zeigt nach außen (Raposo et al., 1996; They et al. 1999).



**Abb. 5: Biogenese von Exosomen.** 1) Durch Endozytose (normale Knospung) entstehen Vesikel, die zu den frühen Endosomen transportiert werden. 2) Die frühen Endosomen akkumulieren in einem Reifungsprozess durch reverse Knospung intraluminal Vesikel an, es entstehen die MVBs. 3) Durch Fusion der limitierenden Membran der MVBs mit der Plasmamembran werden die ILV freigesetzt, die jetzt als Exosomen bezeichnet werden. Vom Trans-Golgi-Netzwerk findet ein gerichteter Vesikeltransport sowohl in die frühen Endosomen als auch in die MVBs statt. TGN=Trans-Golgi-Netzwerk, ER=endoplasmatisches Retikulum.

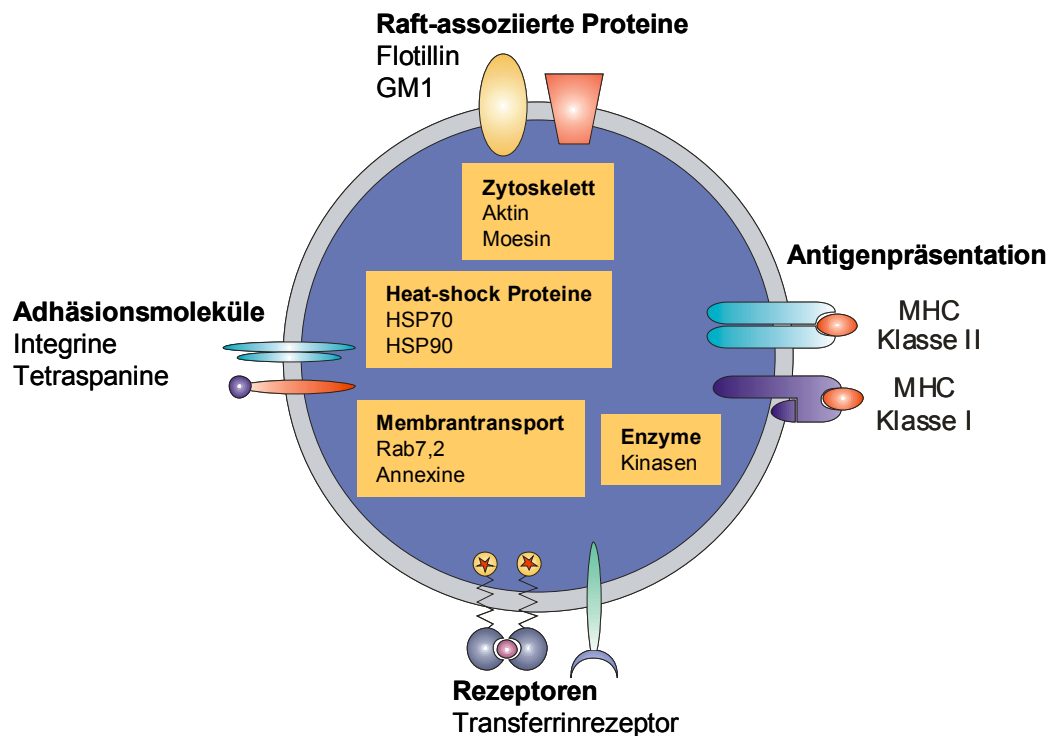
Im Gegensatz dazu weisen Transportvesikel, die Proteine zwischen den einzelnen intrazellulären Kompartimenten, wie z.B. dem Golgi-Apparat und dem Trans-Golgi-Netzwerk transportieren, eine umgekehrte Orientierung auf. Im inneren befinden sich Proteine aus dem Lumen des Donorkompartimentes, die zytoplasmatischen Domänen von Transmembranproteinen sind nach außen gerichtet. Das Abschnüren von Vesikeln für den intrazellulären Transport bezeichnet man daher als normale Knospung, die Entstehung der Exosomen als reverse Knospung. Ein weiteres Ereignis, das zur reversen Knospung führt ist die Apoptose. Dabei werden Membranvesikel (apoptotische Membranbläschen) in verschiedenen Größen abgespalten (Aupeix et al., 1997). Direkte Vergleiche der Proteinverteilung auf Exosomen und der Plasmamembran konnten bestätigen, dass Exosomen

nicht von der Plasmamembran stammen. Zudem konnten in Exosomen Proteine identifiziert werden, die an der Biogenese von MVBs beteiligt sind (Fevrier und Raposo, 2004). So wurden beispielsweise in den Exosomen von dendritischen Zellen die Proteine Tsg101 und Alix nachgewiesen. Tsg101 ist am Aufbau des „*endosomal sorting complex required for transport*“ (ESCRT) beteiligt. Alix gehört zu den Proteinen, die zwei solcher Komplexe (ESCRT II und III) miteinander verbindet (Katzmann et al., 2001; von Schwedler et al., 2003). Es wird vermutet, dass diese Proteine oder Proteinkomplexe für die Knospung der ILV von der Membran der MVB benötigt werden. Zwar zerfällt dieser Komplex durch die Aktivität einer ATPase nach der Generierung eines ILV, jedoch verbleiben Proteinkomponenten (Tsg101 und Alix) durch den Knospungsvorgang im Zytosol der intraluminalen Vesikel (Katzmann et al., 2002). Kürzlich durchgeführte Studien mit Exosomen von Retikulozyten konnten zeigen, dass Alix direkt mit dem TfR interagiert. Es wird vermutet, dass diese Assoziation den TfR mit dem ESCRT Komplex verbindet und dieser Vorgang für die Sortierung des Rezeptors in die intraluminalen Vesikel verantwortlich ist (Geminard et al., 2004).

### 1.4.3 Molekulare Zusammensetzung von Exosomen

Exosomen können aufgrund morphologischer Eigenschaften sowie biochemisch durch die Anwesenheit bestimmter Proteine identifiziert werden. Durch bisherige Untersuchungen konnten zahlreiche Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen in Exosomen nachgewiesen werden. Einige von diesen sind zelltypspezifisch, andere wiederum können als Markerproteine von Exosomen angesehen werden. Zu den Markerproteinen zählen allgemeine Zytoskelettbestandteile (Tubulin, Aktin, Moesin), Proteine, die für Transport und Fusion von Membranen verantwortlich sind (Annexine, Rab7, -2) und *Heat-shock* Proteine (Hsp70, -90) (Thery et al., 2001; Skokos et al., 2001). Aber auch Moleküle, die für die Signaltransduktion verantwortlich sind (Protein-Kinase, heterotrimere G-Proteine), sowie metabolische Enzyme (Peroxidasen, Pyruvat- und Lipid-Kinasen) wurden detektiert (Thery et al., 2001; van Niel et al., 2001). Die Exosomen der meisten Zellen enthalten weiterhin MHC Klasse I Moleküle (Blanchard et al., 2002; Wolfers et al., 2001). Die am stärksten vertretene Proteinfamilie sind die Tetraspanine mit ihren Mitgliedern CD9, CD63, CD81 und CD82 (Escola et al., 1998; Heijnen et al., 1999; Zitvogel et al., 1998). Zelltypspezifische Proteine sind dagegen MHC Klasse II Moleküle, verschiedene Adhäsionsmoleküle oder Rezeptoren (z.B. Integrine). Auch raftassoziierte Proteine und Glykolipide, wie Flotillin, CD55 bzw.

GM1 und GM3, konnten in Exosomen identifiziert werden. Der Nachweis von Rafts in Exosomen führte auch zu der Vermutung, dass diese ebenfalls, neben dem bereits identifizierten ESCRT, eine Rolle bei der Sortierung von Proteinen in die Exosomen spielen könnten (Fevrier und Raposo, 2004). In **Abb. 6** ist die molekulare Struktur eines Exosoms schematisch dargestellt.



**Abb. 6: Molekulare Zusammensetzung von Exosomen.** Exosomen werden von einer Lipid-Doppelschicht umgeben. In Exosomen lassen sich zahlreiche Proteine, wie Integrine, Tetraspanine, *Heat-shock* Proteine, MHC Klasse I und II Moleküle, Annexine, Zytoskelettbestandteile und Kinasen, nachweisen. Davon sind einige zelltypspezifisch, während andere ständig vorhandene Markerproteine sind.

## 2 Aufgabenstellung

Die Funktion des Adhäsionsmoleküls L1 ist im Nervensystem bereits gut charakterisiert. So spielt L1 eine wichtige Rolle bei der Migration und Zielfindung der neuronalen Wachstumskegel. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass lösliches L1 von Neuronen als Überlebensfaktor genutzt werden kann. L1 ist auf vielen Tumoren überexprimiert. In Karzinomen der Ovarien und des Uterus sind Expression und Abgabe des Moleküls in löslicher Form mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung assoziiert. Das transmembrane Spaltfragment von L1 kann in Tumorlysaten nachgewiesen werden und die Expression der Metalloproteinase ADAM10 im Tumorgewebe korreliert mit der nachweisbaren Menge an löslichem L1 im Serum von Patienten. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass L1 nicht nur in löslicher Form von Tumorzellen abgegeben werden kann, sondern auch in Vesikeln.

Die Funktion von L1 auf Karzinomen der Ovarien sowie die Regulation der Abgabe von löslichem L1 sind bisher unbekannt. Daher sollen folgende Fragestellungen mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden zur besseren Charakterisierung des L1 Adhäsionsmoleküls auf Ovarialkarzinomen bearbeitet werden:

1. Apoptose ist ein ständig ablaufender Prozess in der Tumorentwicklung. Kann die Expression von L1 Tumorzellen vor Apoptose schützen?
2. Welchen Einfluss hat die Apoptose auf die Generierung von löslichem L1?
3. Charakterisierung der Abgabe von L1 in Vesikeln.
4. Identifikation möglicher Interaktionspartner von L1.

### 3 Material

#### 3.1 Antikörper

##### 3.1.1 Monoklonale Erstantikörper

Name	Antigen	Spezies	Herkunft
L1-11A	humanes L1	Maus	Hybridom
5G3	humanes L1	Maus	Pharmingen, Hamburg
anti- $\beta$ -Aktin	$\beta$ -Aktin	Maus	
anti-CD9 (Syb-1)	humanes CD9	Maus	E. Rubinstein, Paris
anti-Annexin-I	humanes Annexin-I	Maus	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
anti-EEA1	humanes EEA1	Maus	BD Biosciences, Heidelberg
anti-GM130	humanes GM130	Maus	BD Biosciences, Heidelberg
EpCAM (HEA 125)	humanes EpCAM	Maus	G. Moldenhauer, Heidelberg
BDCA4	humanes Neuropilin-1	Maus	Miltenyi, Bergisch Gladbach
BDCA4-PE	humanes Neuropilin-1	Maus	Miltenyi, Bergisch Gladbach
mAk $\alpha\beta$ 3 (LM609)	humanes Integrin $\alpha\beta$ 3	Maus	Pharmingen, Hamburg
mAk $\alpha\beta$ 5 (P1F6)	humanes Integrin $\alpha\beta$ 5	Maus	Chemicon, Hofheim
mAk $\alpha$ 5 (SAM-1)	humane Integrinkette $\alpha$ 5	Maus	Dianova, Hamburg
ecto-ADAM17 (34/4D)	humanes ADAM17	Maus	M.J. Humphries, London
ecto-ADAM10 (11G2)	humanes ADAM10	Maus	E. Rubinstein, Paris
Zytokeratin-19	humanes Zytokeratin-19	Maus	L. Langbein, Heidelberg
Vimentin1	humanes Vimentin1	Maus	L. Langbein, Heidelberg
ecto-CD44 (IM7)	humanes CD44	Ratte	M. Zöller, Heidelberg

### 3.1.2 Polyklonale Erstantikörper

Name	Antigen	Spezies	Herkunft
pcyt-L1	humanes L1	Kaninchen	V. Lemmon, Cleveland
pcyt-ADAM10	humanes ADAM10	Kaninchen	Chemikon, Hofheim
pcyt-ADAM17	humanes ADAM17	Kaninchen	Chemikon, Hofheim
#2547	humanes ADAM10	Kaninchen	eigene Herstellung, gegen extrazelluläre Domäne
Serum 71	humanes ADAM10	Kaninchen	eigene Herstellung, gegen zytoplasmatische Domäne
pcyt-CD44 (CT-1)	humanes CD44	Kaninchen	C. Isacke, London
C19	humanes NRP1	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
H286	humanes NRP1	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg

### 3.1.3 Zweitantikörper

am-POX	Peroxidase konjugierter anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg)
ar-POX	Peroxidase konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg)
ara-POX	Peroxidase konjugierter anti-Ratte-Antikörper (Dianova, Hamburg)
am-PE	Phycoerythrin konjugierter anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg)
ara-PE	Phycoerythrin konjugierter anti-Ratte-Antikörper (Targo)
ah-Fc-POX	Peroxidase konjugierter anti-human-Fc-Antikörper (Dianova, Hamburg)
am-ALEXA488	Fluoreszenz konjugierter anti-Maus-Antikörper (Molecular Probes, Karlsruhe)
ar-Cy3	Fluoreszenz konjugierter anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg)
Strep-POX	Peroxidase konjugiertes Streptavidin (Dianova, Hamburg)

## 3.2 Inhibitoren

Inhibitor	Spezifität	Herkunft	eingesetzte Konzentrationen
Complete Mini	Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim	1 Tablette/10ml
TAPI-0	Metalloproteinasen	Calbiochem, San Diego	10 $\mu$ M
TAPI-1	Metalloproteinasen	Calbiochem, San Diego	10 $\mu$ M
Leupeptin	Serin-/Cysteinproteinasen	Sigma, Taufkirchen	10 $\mu$ g/ml
Aprotinin	Serinproteinasen	Sigma, Taufkirchen	10 $\mu$ g/ml
Pepstatin	Aspartatproteinasen	Sigma, Taufkirchen	10 $\mu$ g/ml
NaF	Serin-Threoninproteinasen	Sigma, Taufkirchen	1mM
PMSF	Serinproteinasen	Sigma, Taufkirchen	1mM
ZVAD-fmk	Caspasen	Bachem, Weil am Rhein	1mM



### 3.3 Reagenzien zur Stimulation von Zellen

Abkürzung	Name	Herkunft	eingesetzte Konzentration
APMA	4-Aminophenylmercuric acetate	Sigma, Taufkirchen	50 $\mu$ M
EGTA	ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid		250mM
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma, Taufkirchen	100ng/ml
TFP	Trifluoperazine Dimaleate	Merck, Darmstadt	100 $\mu$ M
IONO	Ionomycin, Kalzium Salz	Calbiochem, San Diego	1 $\mu$ M
MCD	Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	Fluka, Buchs	11,37mg/ml

### 3.4 Reagenzien zur Induktion von Apoptose

#### Herstellung von Pervanadat

Pervanadat wurde vor Beginn jedes Experiments frisch angesetzt. Dazu wurden 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100mM, Merck, Darmstadt) und 51 $\mu$ l Natriumorthovanadat (100mM, Sigma, Taufkirchen) gevortext und 15min bei RT inkubiert. Pervanadat wurde in einer Endkonzentration von 200 $\mu$ M eingesetzt.

#### Weitere Substanzen

Abkürzung	Herkunft	eingesetzte Konzentration
C2-Ceramid	Sigma, Taufkirchen	40 $\mu$ M
Staurosporin	Sigma, Taufkirchen	2 $\mu$ M
Cisplatin	Sigma, Taufkirchen	10 $\mu$ M
Doxorubicin	Sigma, Taufkirchen	5 $\mu$ g/ml

### 3.5 Molekulargewichtstandards

Bezeichnung	Herkunft
Proteinmolekulargewichtsmarker, Rainbow	Pharmacia, Freiburg
100bp-DNA-Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe
$\lambda$ -DNA HindIII Fragmente	Gibco BRL, Karlsruhe

### 3.6 Oligodesoxynukleotide

Die Oligodesoxynukleotide wurden nach der Phospho-Amidite-Methode mit einem Oligo-Synthesizer (Expedite, Perseptive Biosystems) hergestellt (Wolfgang Weinig, DKFZ, Heidelberg) und mittels HPLC analysiert.

Alle nachfolgenden Sequenzen sind in 5'-3' Leserichtung dargestellt.

#### Oligonukleotide zum Nachweis von Neuropilin-1 und seinen Spleißvarianten

Neuropilin-1 Fragmentgröße: 375bp

<i>Sense Primer</i> NRP1 H	GAGGGCAACAACAACCTATGA
<i>Reverse Primer</i> NRP1 I	ATGTTCCAGTGGCAGAAGG

S<sub>11</sub>-Neuropilin-1 Fragmentgröße: 335bp

<i>Sense Primer</i> NRP1 H	GAGGGCAACAACAACCTATGA
<i>Reverse Primer</i> NRP1 J	TCGGTTTAGTACATTTAGCCA

S<sub>12</sub>-Neuropilin-1 Fragmentgröße: 332bp

<i>Sense Primer</i> NRP1 H	GAGGGCAACAACAACCTATGA
<i>Reverse Primer</i> NRP1 K	CTGTCACATTTCGTATTTT

#### Oligonukleotide zur Herstellung von Neuropilin-1-Fc

<i>Sense Primer</i> ECOR1	CATGAATTCGAGAATGGAGAGGGGGCTGCCGCTC
<i>Reverse Primer</i> BamH1	ATGAAGTCCACTTACCTAAGGTCTTCAACACATTGCC

### 3.7 Antisenseoligonukleotide

Die Sequenzen sind in 5'-3' Leserichtung dargestellt.

ADAM10 (ISIS 100750)	GGTCTGAGGATATGATCTCT
ADAM10 <i>mismatch</i> (ISIS 108030)	GGTCTGTGAATAAGGTCTCT
ADAM17 (ISIS 16337)	CCTAGTCAGTGCTGTTATCA
ADAM17 <i>mismatch</i> (ISIS 17965)	CCTAGTATGTGCTGCTATCA

### 3.8 siRNAs

Die siRNAs wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert und sind in 5'-3' Leserichtung dargestellt.

siADAM10	AGACAUUAUGAAGGAUUAUTT
siADAM17	GAGAAGCUUGAUUCUUUGCTT

### 3.9 Plasmide

pIG1:	Auf pCDM8 Vektor basierendes Plasmid zur Produktion löslicher, sezernierter Fc-chimärer Proteine, SV40 ori, polyoma ori, supF, CMV Promoter, M13 ori (Simmons, D.L., 1993)
-------	--

### 3.10 Zelllinien

OVMz	humane Ovarialkarzinomzelllinie (A. Krüger, München)
SKOV3ip	humane Ovarialkarzinomzelllinie (Tumorbank, DKFZ)
m130	humane Ovarialkarzinomzelllinie (Günkel, Frauenklinik HD)
m130-hL1	humane Ovarialkarzinomzelllinie, mit L1-Retrovirus infiziert
GG	humane Ovarialkarzinomzelllinie (Günkel, Frauenklinik HD)
PC3	humane Prostatakarzinomzelllinie (Tumorbank, DKFZ)
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie (Tumorbank, DKFZ)
SW707	humane Prostatakarzinomzelllinie
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie (Tumorbank, DKFZ)
HEK293-hL1	humane embryonale Nierenzelllinie, stabil mit humanem L1 transfiziert
CHO	Ovarialzelllinie vom chinesischen Hamster
CHO-hL1	Ovarialzelllinie vom chinesischen Hamster, stabil mit humanem L1 transfiziert
L929	Mausfibroblasten (S. Bourbie, Paris)
L929-NRP1	Mausfibroblasten mit NRP1-Lentivirus infiziert
COS-7	Affenieren-Zelllinie (Tumorbank, DKFZ)

### 3.11 Patientenmaterial

Die Analyse von Tumorgewebebeobungen und Aszites wurde von der Ethikkommission der Universität Heidelberg geprüft und genehmigt.

#### Aszites

Nr.	Diagnose
1	Endometriose, Zystadenokarzinom
2	serös-papilläres, oder seröses Adenokarzinom
3	
4	
5	

#### Tumorgewebe

Gewebe Nr.	Patienten Nr.	Diagnose	Stadium
1	1229	seröses Ovarialkarzinom	pT3c G3 R2
2	1208	serös-papilläres Ovarialkarzinom	pT3c G3 R2
3	1199	serös-papilläres Ovarialkarzinom	pT3c G3 R2
4	1166	serös-papilläres Ovarialkarzinom	pT3c G2 R3
5	1178	seröses Ovarialkarzinom	pT3c G3 R2
6	1160	seröses Ovarialkarzinom	pT3c G3 R1
7	1161	muzinöses Ovarialkarzinom	pT3c G2 R2
8	1171	seröses Adenokarzinom der Eileiter	pT3c G3 R1
9	1173	seröses Ovarialkarzinom	pT3c G3 R1
10	1197	serös-papilläres Adenokarzinom beider Ovarien	pT3c G2 R2

### 3.12 Puffer und Lösungen

#### 3.12.1 SDS-Gelelektrophorese

##### Acrylamidlösung (Roth, Karlsruhe)

Acrylamid	30%
N,N'-Methylbisacrylamid	0,8%

**Polyacrylamid-Gel****Trenngel (60ml)**

	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>12,5%</b>
Acrylamidlösung	15ml	20ml	24,9ml
3M Tris-HCl pH 8,8	8ml	8ml	8ml
ddH <sub>2</sub> O	37ml	32ml	27,1ml
10% SDS	0,6ml	0,6ml	0,6ml
TEMED	23µl	23µl	23µl
10% APS	200µl	200µl	100µl

**Sammelgel (10ml)**

Acrylamidlösung	1,35ml
0,5M Tris/HCl, pH 6,8,	2,5ml
ddH <sub>2</sub> O	6ml
SDS	100µl
APS	100µl
TEMED	10µl

**2x SDS Probenpuffer für Proteingele (reduzierend)**

Tris-HCl, pH 8,8	80mM
Saccharose	30%
SDS	3%
Bromphenolblau	0,05mg/ml
β-Mercaptoethanol (14,3 M)	5%

**5x Laufpuffer**

Tris-HCl, pH 8,3	25mM
Glycin	0,19M
SDS	0,1%

**3.12.2 Western Blot****1x Blotpuffer**

5x Blotpuffer	100ml
Methanol (100%)	100ml
ddH <sub>2</sub> O	300ml

**5x Blotpuffer**

Glycin	190mM
Tris-HCl	50mM

### 3.12.3 Gelatine-Zymogramme

#### Trenngel 7,5%

Acrylamidlösung	3,54ml
4x Trenngel-Puffer pH 8,8	3,5ml
0,3% Gelatine in ddH <sub>2</sub> O	5,7ml
ddH <sub>2</sub> O	0,56ml
TEMED	10µl
10% APS	70µl

#### Sammelgel

Acrylamidlösung	1,35ml
4x Sammelgel-Puffer pH 6,8	2,6ml
0,3% Gelatine in ddH <sub>2</sub> O	4,64ml
ddH <sub>2</sub> O	1,36ml
TEMED	13µl
10% APS	130µl

#### 4x Trenngel-Puffer

Tris	45,3g
SDS	1g
ddH <sub>2</sub> O	200ml
pH-Wert auf 8,8 einstellen	
ddH <sub>2</sub> O	auf 250ml auffüllen

#### 4x Sammelgel-Puffer

Tris	7,1g
SDS	0,5g
ddH <sub>2</sub> O	100ml
pH-Wert auf 6,8 einstellen	
ddH <sub>2</sub> O	auf 125ml auffüllen

#### Inkubationspuffer

Tris-Base	50mM
Tris-HCl	50mM
NaCl	0,2M
CaCl <sub>2</sub>	5mM
Brij 35	0,02%
	in ddH <sub>2</sub> O

#### Coomassie-Färbelösung für Zymogramme und PVDF-Membran

Coomassie-Brilliant-Blue R-250	1g
ddH <sub>2</sub> O	450ml
Methanol (100%)	450ml
Eisessig (100% Essigsäure)	100ml

**Entfärbelösung für Zymogramme und PVDF-Membran**

ddH <sub>2</sub> O	800ml
Methanol (100%)	100ml
Eisessig (100% Essigsäure)	100ml

**3.12.4 TNF $\alpha$ -Spaltassay****Spaltungspuffer**

Tris-HCl, pH 7,4	50mM
CaCl <sub>2</sub>	2mM
Triton-X100	0,1% (w/v)

**Fluoreszenzgekoppeltes Peptid**

TNF $\alpha$ <i>Fluorescence-Quenching substrate</i> (Abz-LAQAVRSSSR-Dap(Dnp)-NH <sub>2</sub> )	Peptides International, Louisville
--	------------------------------------

**3.12.5 Saccharose-Gradient****TBS-Inhibitor-Lösung**

TBS (autoklaviert)	60ml
Complete Mini (Roche)	5 Tabletten
Mg-Acetat	1mM

**Saccharose-Lösungen**

2M	6,85g Saccharose
1,3M	4,45g Saccharose
1,16M	3,97g Saccharose
0,8M	2,74g Saccharose
0,5M	1,71g Saccharose
0,25M	855,95mg Saccharose

Mit TBS-Inhibitor-Lösung auf 10ml auffüllen und zum Lösen im Wasserbad erwärmen.

**3.12.6 Nicolettipuffer zur Bestimmung der Apoptoserate**

Natriumcitrat	0,1%
TX-100	0,1%
Propidiumiodid	50 $\mu$ g/ml in ddH <sub>2</sub> O

### 3.12.7 Puffer und Lösungen für die Zelladhäsion

#### HBSS (*Hanks' balanced salt solution*)

KCl	5mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5mM
NaCl	137mM
NaHCO <sub>3</sub>	4mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,3mM
Glukose	6mM
Phenolrot	26,5µM
<b>frisch hinzugefügt:</b>	
MgCl <sub>2</sub>	2mM
CaCl <sub>2</sub>	2mM
MnCl <sub>2</sub>	2mM
HEPES	10mM

#### Kristallviolettlösung

Kristallviolett	0,1%
Borat-Puffer, pH 8,5	0,1M
Ethanol	3,0%

#### Percoll-Verdünnung

Ausgangslösung für die Percoll-Verdünnung war ein Ansatz aus einem Teil 10× PBS und neun Teilen Percoll (Amersham, Freiburg). Die Verdünnung wurde mit 1× PBS angesetzt.

### 3.12.8 Sonstige

#### TBS

Tris/HCl, pH 8,0	10mM
NaCl	150mM

#### TBS/Tween-Waschpuffer

0,05% Tween 20 in TBS (v/v)
-----------------------------

#### PBS

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5mM
NaCl	140mM
KCl	2,6mM
	pH 7,3



**TAE-Elektrophoresepuffer (50x) für DNA-Gelelektrophorese**

Tris	242g
Eisessig	57,1ml
0,5M EDTA, pH 8,0	100ml
ad 1000ml ddH <sub>2</sub> O	
pH 8,5	

**DNA Probenpuffer für Agarosegele (6x)**

Saccharose	40%
Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol	0,25%

**Trypanblau-Färbelösung**

Trypanblau	1,28g
NaCl	8,5g
	auf 1l H <sub>2</sub> O
	durch einen 0,45µm-Filter
	geben und mit 0,1% NaN <sub>3</sub>
	versetzen

**TBE-Elektrophoresepuffer**

Tris	89mM
Borsäure	89mM
EDTA, pH 8,0	1mM

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

#### 4.1.1 Isolation von RNA aus Zellen und Gewebeproben

Für die Isolation von RNA wurde der RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet, wobei das Herstellerprotokoll zur „Isolation der totalen RNA aus tierischen Zellen“ befolgt wurde. Gewebeproben ( $25\text{mm}^2$ ) wurden intraoperativ in RNA-later überführt und eingefroren (Dr. Alexander Marmè). Zur Gewinnung von RNA wurden 15 Schnitte ( $10\mu\text{m}$ ) in den Puffer RLT mit frisch hinzugefügtem  $\beta$ -Mercapthoethanol überführt. Für die Isolation von RNA aus Zelllinien wurden  $5 \times 10^6$  Zellen im gleichen Puffer aufgenommen. Zum mechanischen Aufbrechen und Homogenisieren der Zellen und der Gewebe wurden die Proben auf einen *QIAshredder* aufgeladen und 2min bei 13000rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Isolation der RNA erfolgte dann über eine Siliziummembran, an die die RNA in Anwesenheit von Ethanol bindet ( $>200\text{bp}$ , zur Anreicherung von mRNA). Durch verschiedene Waschschrte wurden Verunreinigungen entfernt. Die RNA wurde abschließend mit ddH<sub>2</sub>O eluiert.

#### 4.1.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die optische Dichte der zu bestimmenden Lösungen wurde photometrisch bei 260nm und 280nm Wellenlänge in Quarzküvetten bestimmt. Die Konzentration der Ausgangslösung lässt sich folgendermaßen errechnen:

Doppelsträngige DNA:      Konz. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) =  $\text{OD}_{260} \times 0,05 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Einzelsträngige DNA:      Konz. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) =  $\text{OD}_{260} \times 0,033 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Einzelsträngige RNA:      Konz. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) =  $\text{OD}_{260} \times 0,04 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

#### 4.1.3 Auftrennung von RNA mittels Elektrophorese

Die präparierte RNA wurde in einem 1%igen Agarosegel in TAE-Puffer (in DEPC-Wasser angesetzt) aufgetrennt. Der Gel-Lösung wurden  $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid zugesetzt.

Die RNA wurde mit 6x Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht konnte die 18s- und die 28s-rRNA sichtbar gemacht werden. Dies diente zum Nachweis für die Qualität der isolierten RNA.

#### 4.1.4 cDNA-Synthese (*Reverse Transkription*)

Um aus der isolierten RNA cDNA herzustellen, wurde das „SuperScript™ *First-Strand Synthesis System for RT-PCR*“-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dabei wurden 3µg isolierte RNA von Zelllinien und 1µg RNA von Gewebeproben eingesetzt. Die SuperScript™ *Reverse Transkriptase* kopiert unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern, die an die Poly-A-Sequenz der mRNAs bindet, die isolierte mRNA. Dabei entsteht einzelsträngige kopierte DNA (cDNA). Die Reaktion fand bei 42°C statt. Um die Aktivität eventuell vorhandener RNasen zu blockieren, wurde diese in Anwesenheit eines RNase-Inhibitors durchgeführt. Nach der Herstellung der cDNA wurde in einer weiteren Reaktion die in einer spezifischen PCR eventuell störende RNA durch RNase H verdaut.

#### 4.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) stellt eine sehr sensitive Methode zur spezifischen Amplifikation von DNA-Sequenzen dar. In mehreren Zyklen folgt auf eine Hitzedenaturierung der zu amplifizierenden DNA die Hybridisierung eines spezifischen Oligonukleotidprimer-Paares an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA. An die freien Hydroxylgruppen der Primer werden durch die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) komplementäre Nukleotide angeheftet und dadurch die DNA-Sequenz zwischen beiden Primern aufgefüllt. Die neusynthetisierte DNA diente wiederum im nächsten Zyklus als Matrize für die weitere Amplifikation. Die Reaktionsansätze für die PCR wurden nach Empfehlung des Herstellers pipettiert. Synthetisierte cDNA (1µl in 10µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt) wurden mit je 125ng der Primer (jeweils 1µl), 5µl 10x Reaktionspuffer, 1µl dNTP-Mix und 31µl ddH<sub>2</sub>O gemischt. Anschließend wurde 1µl (0,3U) Taq-DNA-Polymerase hinzugefügt. Die Reaktion wurde in einem PTC-100 *cycler* (MJ-Research, Watertown) unter Verwendung des folgenden PCR-Programms durchgeführt:

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Erste Hitzedenaturierung	95°C	2min	1
Hitzedenaturierung	95°C	45sec	35
Hybridisierung der Primer	56°C	30sec	
Elongation	72°C	30sec	
abschließende Elongation	72°C	10min	1

#### 4.1.6 Auftrennung von DNA mittels Elektrophorese

Nach durchgeführter PCR wurden die Proben in einem 1,5%igen horizontalen Agarosegel mit einem Volumen von 60ml oder 120ml elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden die einzelnen Proben mit einem entsprechenden Volumen 6x Probenpuffer versetzt. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose-Typ-I (Sigma, Taufkirchen) in 1x TAE-Puffer aufgeköcht und nach Abkühlung mit 6µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml; Roth, Karlsruhe) pro 100ml Gelvolumen versetzt. Die Elektrophorese wurde unter konstanter Spannung von 60V bzw. 120V durchgeführt. Die Auftrennung der DNA wurde unter UV-Licht kontrolliert und mithilfe eines Videodruckers dokumentiert.

## 4.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden

### 4.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Adhärenz wachsende Zelllinien wurden in dem der jeweiligen Zelllinie optimal angepasstem Medium bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden diese einmal mit 1x PBS gewaschen und danach je nach Zelllinie mit 1x Trypsin/EDTA in PBS, bzw. 0,5M EDTA (pH 8,0) in PBS für 5min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch mehrmaliges Pipettieren vollständig von der Kulturflasche abgelöst. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 300g wurden die Zellen in der gewünschten Dichte in Medium aufgenommen und ausgesät.

**Zellkultur-Medien:**

OVMz, SKOV3ip, m130, GG, PC3, HeLa, SW707, HEK293, CHO, COS-7	DMEM, 10% FCS, 2mM Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
Mo68, primäre Tumorzellen	DMEM, 20% FCS, 2mM Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
L929	RPMI, 10% FCS, 2mM Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
ASBC, primäre Mesothelzellen	DMEM, 10% FCS, 2mM Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Wachstumsfaktoren (Sigma, Taufkirchen)

**4.2.2 Kultivierung von Zellen unter Hypoxie**

Zur Induktion der Apoptose wurden  $5 \times 10^5$  Zellen der zu untersuchenden Zelllinie in eine Vertiefung einer 6-Loch Platte ausgesät. Nach der Adhäsion der Zellen wurde das Wachstumsmedium durch Serum-freies Medium ersetzt. Die Zellen wurden dann für die im jeweiligen Versuch angegebenen Zeiträume in einem Hypoxie-Inkubator (*Reming Bioinstruments chamber and oxygen regulator*, Reming Bioinstruments, Redfield) bei 0,1% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

**4.2.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Anfärben der toten Zellen mit 0,16% Trypanblau und 0,9% NaCl in PBS in einer Neubauer-Zählkammer.

**4.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Das Einfrieremedium setzte sich aus 90% FCS und 10% DMSO zusammen. Jeweils  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 1ml vorgekühltem Einfrieremedium aufgenommen und für 24h bei -70°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig bei 37°C im Wasserbad. Die aufgetauten Zellen wurden einmal mit vorgewärmtem Medium gewaschen, in Kulturmedium aufgenommen und ausgesät.

**4.2.5 Transfektion von Zellen**

Die Transfektion eukaryontischer Zellen wurde nach unterschiedlichen Verfahren durchgeführt. Zur Produktion von Fc-Fusionsproteinen wurden COS-7 Zellen mit dem

jetPEI<sup>TM</sup> Transfektionsreagenz transfiziert. Antisenseoligonukleotide und siRNAs wurden mit Oligofektamin in die Zellen eingebracht.

### **Transfektion von COS-7 Zellen mit jetPEI<sup>TM</sup>**

Die transiente Transfektion von COS-7 Zellen wurde mit dem jetPEI<sup>TM</sup> Transfektionsreagenz durchgeführt. Bei diesem Reagenz handelt es sich um ein lineares Polyethylenimin, das die DNA in positiv geladene Partikel bindet. Diese Partikel interagieren mit den anionischen Proteoglycanen der Zelloberfläche und können so von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden.

Es wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 8ml DMEM Kulturmedium, das 1% IgG depletiertes FCS enthielt, in einer Petrischale ( $\varnothing$  10cm) ausgesät und in Suspension transfiziert. Zur Herstellung der Transfektionslösung wurden 8 $\mu$ g DNA (in Wasser gelöst) in 500 $\mu$ l NaCl (150mM) gegeben und vorsichtig gemischt. In einem zweiten Ansatz wurden 16 $\mu$ l jetPEI<sup>TM</sup> Reagenz in 500 $\mu$ l NaCl (150mM) verdünnt. Anschließend wurde das jetPEI<sup>TM</sup> Gemisch auf die DNA-Lösung gegeben, vorsichtig gemischt und für 30min bei RT inkubiert. Hierbei bildeten sich die positiv geladenen jetPEI/DNA Komplexe. Nach der Inkubation wurden jeweils 500 $\mu$ l der Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 48h bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 48h erfolgte der Nachweis des Fusionsproteins im Western Blot.

### **Transfektion von OVMz Zellen mit Oligofektamin**

Die Transfektion der Zellen mit Antisenseoligonukleotiden oder siRNAs erfolgte mit Hilfe des Oligofektamin-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe). Dies ist ein positiv geladenes Lipid, das einen stabilen Komplex mit den negativ geladenen Oligonukleotiden bildet und so deren Aufnahme in die Zellen ermöglicht.

Um die für die Aufnahme in die Zellen optimale Konfluenz von 30-50% zu erreichen, wurden  $3 \times 10^5$  OVMz Zellen in eine Vertiefung einer 6-Loch Platte ausgesät. Für die Transfektion wurden die Oligo-Stocklösungen mit Serum-freiem Medium (OptiMem, Invitrogen, Karlsruhe) auf die gewünschte Endkonzentration (200nM bei siRNA, 100nM bei ASOs) in einem Endvolumen von 185 $\mu$ l verdünnt. 3 $\mu$ l des Oligofektamin-Reagenz wurden ebenfalls mit Serum-freiem Medium auf ein Endvolumen von 15 $\mu$ l verdünnt, gemischt und 10min bei RT inkubiert. Danach wurden die beiden Lösungen vermischt und weitere 20min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit Serum-freiem Medium gewaschen und mit

weiteren 800µl versetzt. Schließlich wurden die Nukleotid-Oligofektamin-Komplexe zu den Zellen gegeben und für 4h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 500µl Wachstumsmedium mit 30% FCS wurden die Zellen für weitere 48h, bzw. bis Versuchsbeginn, kultiviert.

#### 4.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflußzytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Grundsätzlich können alle Merkmale eines Partikels, die sich über Lichtbeugung, -streuung oder Fluoreszenz charakterisieren lassen, zur durchflusszytometrischen Analyse herangezogen werden. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu analysieren. Damit ist es möglich Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine einer Zelle zu quantifizieren.

Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Die Beugung und Streuung des Laserlichtes gibt Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns). Gleichzeitig bewirkt das Laserlicht eine Anregung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes, indem Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Nach dem Laserpuls fallen die angeregten Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierten Photonen werden durch einen Photodetektor registriert und verhalten sich proportional zur Menge an gebundenem Fluoreszenzfarbstoff. Letztere ist wiederum proportional zur Menge der vorhandenen Oberflächenantigene, an die der fluoreszenzmarkierte Antikörper bindet.

#### Immunfluoreszenzfärbung für die FACS Analyse

Für die Färbung wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in 1,5ml Eppendorf-Röhrchen oder Greiner-FACS-Röhrchen überführt und bei 300g für 5min sedimentiert. Auf das Pellet wurden 0,5µg Erstantikörper in 50µl PBS bzw. 50µl Hybridomüberstand gegeben. Danach wurden die Zellen in der Erstantikörperlösung resuspendiert. Nach 25min Inkubation auf Eis, wurden 500µl PBS zum Waschen auf die Zellsuspension gegeben. Danach erfolgte ein erneuter Zentrifugationschritt für 5min bei 300g. Nach der Abnahme des Überstandes wurden 0,5µg Zweitantikörperlösung in 50µl PBS auf die Zellen gegeben, vermischt und wiederum 15min

auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit 500µl PBS wurden die Zellen abermals sedimentiert und zur Analyse in 300µl PBS aufgenommen. Als Kontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit Zweitantikörper inkubiert wurden, um dessen unspezifische Bindung zu quantifizieren. Bei der Auswertung am FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) wurden 10.000 Ereignisse (lebende Zellen) jeder Probe aufgenommen. Tote und nicht erwünschte Zellen wurden bei der Aufnahme durch ihre unterschiedliche Größe (*forward scatter*, FSC) bzw. Granularität (*side scatter*, SSC) ausgegrenzt.

#### **4.2.7 Nachweis apoptotischer Zellen nach Nicoletti**

Um den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen zu ermitteln, wurde die Methode nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991) angewendet. Die Methode beruht darauf, dass während der Apoptose Nukleasen aktiviert werden, die das Chromatin zwischen den Nukleosomen im Zellkern schneiden. Durch einen hypotonen Puffer werden die Zellen permeabilisiert, wodurch einerseits der in die DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid in die Zellen gelangen kann, andererseits kleine DNA-Fragmente aus den apoptotischen Zellen herausgespült werden. Diese Zellen weisen dann eine geringere Fluoreszenz als normale diploide Zellen auf und können so in der FACS-Analyse quantifiziert werden.

Für die Färbung wurden ca.  $5 \times 10^5$  Zellen bei 300g sedimentiert, in 300µl Nicolettipuffer aufgenommen und im Dunkeln bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgten die FACS-Analyse am FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) und die Auswertung mit dem Programm CellQuest.

#### **4.2.8 Isolation von Zellen aus Aszites**

Zur Isolation von primären Tumor- und Mesothelzellen aus Aszites kam die Methode der magnetischen Zellseparation (MACS) zur Anwendung. Zunächst mussten dazu die Zellen aus Aszites isoliert und von störenden Erythrozyten, die sich ebenfalls in großer Zahl darin befinden, befreit werden. Dies ermöglichte eine Dichtegradientenzentrifugation. Erythrozyten haben eine höhere Dichte als mononukleäre Zellen und wandern dadurch im Dichtegradienten weiter als letztere. Zellen aus 50ml Aszites wurden bei 300g sedimentiert, mit PBS gewaschen, erneut bei 300g sedimentiert und für die Dichtezentrifugation in PBS aufgenommen. Für diese wurden bestimmte Zentrifugenröhrchen (Leucosep, Greiner, Frickenhausen) verwendet, die mit einer Filterscheibe versehen waren. Der Dichtegradient



wurde mit einer Ficoll-Lösung (Dichte 1,007g/ml) erstellt. 15ml Ficoll-Lösung wurden in ein Leucosep-Röhrchen pipettiert und für 3min bei 300g zentrifugiert. Jetzt befand sich die Ficoll-Lösung unter der Filterscheibe. Die Zellsuspension wurde nun auf die Filterscheibe pipettiert und der Ansatz für 20min bei 2000rpm ohne Bremse (um ein Aufwirbeln der entstehenden Interphase zu vermeiden) zentrifugiert. Die Interphase konnte anschließend vorsichtig abgenommen werden. Störende Erythrozyten befanden sich nun in der Ficoll-Lösung unterhalb der Filterscheibe. Die isolierten Zellen wurden bei 300g sedimentiert und konnten nun in der magnetischen Zellseparation eingesetzt werden.

Die Zellseparation wurde nach dem Herstellerprotokoll (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) mit kleineren Abweichungen durchgeführt. Dazu wurden die zuvor sedimentierten Zellen in Puffer (0,5% BSA/PBS) mit 0,5µg Primärantikörper (für die jeweilige Separation angegeben) resuspendiert und 30min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 5ml Puffer gewaschen, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Es folgte eine Zentrifugation bei 300g. Die Zellen wurden dann in Puffer mit paramagnetischen Polystyrol-Beads, deren Oberfläche mit anti-Maus Zweitantikörper beschichtet war, für 15min bei 4°C inkubiert. Überschüssige Beads wurden durch Waschen mit 5ml Puffer entfernt. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation bei 300g sedimentiert und in 500µl 0,5% BSA/PBS resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde auf eine LS+ Separationssäule aufgeladen, die zuvor mit 3ml 0,5% BSA/PBS gewaschen wurde, und einem starken Magnetfeld ausgesetzt. Zellen, die nicht mit den magnetischen Beads versehen waren und somit auch negativ für das gewünschte Oberflächenantigen waren, konnten nun durch mehrmaliges Waschen der Säule entfernt werden. Anschließend wurde das Magnetfeld entfernt und die markierten Zellen mit Puffer aus der Säule eluiert. Die so für ein bestimmtes Oberflächenantigen selektierten Zellen wurden sedimentiert, in entsprechendem Wachstumsmedium resuspendiert und für weitere Experimente ausgesät.

#### **4.2.9 Herstellung von Präparaten für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen in einer 12-Well-Platte ausgesät und in jeweiligem Kulturmedium kultiviert bis sie adhärent waren. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann folgte die Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd/PBS für 10min bei RT.

Paraformaldehyd wurde dazu in warmem PBS gelöst und anschließend mit Hilfe eines Sterilfilters filtriert. Die Lösung wurde für jede Fixierung neu angesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/Ammoniumchlorid (50mM) und mit PBS jeweils für 5min gewaschen.

Nach der Fixierung wurden die Zellen mit 0,1% Saponin in 5% Ziegen Serum/PBS für 15min bei RT permeabilisiert. Die Deckgläschen wurden dann mit einer Pinzette aus der 12-Well-Platte entnommen und mit der Zellseite nach oben auf Parafilm in eine feuchte Kammer überführt. Es erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in PBS für 45min. Daran schlossen sich drei Waschschrte von 5min mit PBS an, gefolgt von der Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörper für 30min im Dunkeln. Danach wurde wiederum dreimal gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne wurde im letzten Waschschrte DAPI zugesetzt. Die Zellen wurden erneut dreimal 10min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen kurz in ddH<sub>2</sub>O getaucht um störende Salze zu entfernen, abgetupft und in Kaisergelatine eingebettet.

#### **4.2.10 Zelladhäsion auf gereinigtem Substrat**

Beim Zelladhäsionsassay wird die Fähigkeit der Zellen, an ein Substrat zu binden untersucht. Die Methode beruht auf einer Überschichtung der Zellen mit Lösungen zunehmender Dichte, wobei nicht adhärenente Zellen nach oben gedrückt werden. Die an das Substrat gebundenen Zellen können dann gefärbt und kolorimetrisch quantifiziert werden.

Für die Beschichtung wurde eine flexible 96-Loch Platte (BD, Heidelberg) mit gereinigtem löslichem L1 (siehe 4.3.12) in den entsprechenden Verdünnungen in TBS bzw. zur Kontrolle mit 0,3% BSA/TBS für 16h bei 4°C inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden anschließend mit einer 1%igen BSA-Lösung in TBS für 60min bei RT blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit HBSS wurden pro Vertiefung  $5 \times 10^6$  Zellen in 100µl HBSS eingesetzt und zur Adhäsion 45min bei RT inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann zunächst mit 100µl 80% Percoll, danach mit 90% Percoll/2% Glutardialdehyd unterschichtet und 30min bei RT ruhen gelassen. Nach einem Waschschrte mit PBS wurden die Zellen 30min bei RT mit 100µl Kristallviolettlösung gefärbt und danach fünfmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Eluierung des Farbstoffs erfolgte mit 100µl 10%iger Essigsäure. Anschließend konnte die OD bei 595nm gemessen werden (Titerek Multiskan Plus MKII, Laborsystems, Helsinki).

#### 4.2.11 Untersuchung der Zell-Zellbindung durch Depletion

Die Zell-Zellbindung wurde indirekt mittels Depletion untersucht. Hierzu wurden zur Ausbildung einer Einzelzelzellschicht  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch Platte pipettiert. Für jede Zelllinie, die untersucht werden sollte, wurden vier Vertiefungen mit Zellen belegt. Am nächsten Tag wurden die zu untersuchenden Zellen auf  $1 \times 10^5$  Zellen/100 $\mu$ l Medium eingestellt und je nach experimenteller Fragestellung unbehandelt oder nach Vorinkubation mit Antikörpern (Menge beim jeweiligen Versuch angegeben) für 30min bei 37°C, auf die Zellschicht pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C oder 4°C wurden die 100 $\mu$ l Medium mit nicht gebundenen Zellen in das nächste Loch überführt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Abschließend wurden die 100 $\mu$ l Medium abgenommen und die darin verbliebenen nicht gebundenen Zellen im FACS-Vantage gezählt. Daraus konnte dann die Anzahl gebundener Zellen errechnet werden.

### 4.3 Biochemische Methoden

#### 4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Analyse von Proteingemischen und ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts und des Reinheitsgrades. Proteine binden das stark ionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (*Sodiumdodecylsulfate*, SDS) zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladung-zu Masse-Verhältnis (1,4g SDS pro g Protein in 1% SDS-Lösungen). Damit hängt die Wanderung im elektrischen Feld nicht mehr von der Eigenladung der Proteine, sondern nur noch von ihrem Molekulargewicht ab (Shapiro et al, 1967). Unterschiede in der Wanderung und somit in der Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld werden durch die Porengröße des Gels bestimmt. Die verschiedenen SDS-Gelelektrophoresesysteme unterscheiden sich unter anderem in den verwendeten Puffern. Bei dem diskontinuierlichen Laemmli-System wird ein Tris-Glycin-Puffer verwendet. Im oberen Sammelgel werden die Proteine bei niedriger Acrylamidkonzentration (3-4%) und pH 6,8 zu einer schmalen Bande konzentriert, um dann im Trenngel bei pH 8,8 und höherer Acrylamidkonzentration (5-15%) nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt zu werden.

Die Lösung für das Trenngel wurde vor der Zugabe von SDS, APS und TEMED unter Vakuum an der Wasserstrahlpumpe entgast. Nach Zusatz der restlichen Komponenten wurde

das Trenngel gegossen und zur Begradigung mit wassergesättigten Isobutanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Alkoholgemisch durch mehrmaliges Waschen mit ddH<sub>2</sub>O entfernt und das Sammelgel gegossen, in das sofort der Probenkamm (10 oder 13 Taschen) eingesetzt wurde. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Als Laufpuffer diente 1x Laufpuffer. Bis zu 40µl der mit unreduziertem bzw. reduziertem SDS-Probenpuffer versetzten und 5min bei 95°C erhitzten Proben wurden in die Taschen gefüllt. Außerdem wurde ein Molekulargewichtsmarker (Rainbow<sup>TM</sup>, Amersham, Freiburg) aufgetragen. Die Elektrophorese der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30mA, bis das Bromphenolblau des Probenpuffers die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

### 4.3.2 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Dies dient dem Nachweis von Proteinen unter Verwendung spezifischer Antikörper.

#### Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (*semi-dry* Blot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel wurden diese in einem halbtrocken Blot (*semi-dry* Blot) auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran (Mobilon Membran, Millipore, Eschborn) transferiert. Dazu wurden drei Whatmann-Filter in Blotpuffer getränkt und blasenfrei auf die positive Anode einer Blot-Apparatur gelegt. Darauf folgten die kurz in Methanol befeuchtete und in Blotpuffer getränkte Membran und anschließend das Gel, welches ebenfalls kurz mit Blotpuffer befeuchtet wurde. Den Abschluss bildeten drei weitere Filter, die in Blotpuffer getränkt waren. Anschließend wurde die negative Kathode der Blot-Apparatur aufgesetzt. Die Proteine wurden bei 0,8mA/cm<sup>2</sup> für 90min bei RT auf die Membran übertragen.

#### Reversible Färbung mit Ponceau-S

Die reversible Färbung mit Ponceau-S ermöglicht es auf die Membran übertragene Proteine nachzuweisen. Die Sensitivität des Ponceau-Färbung erlaubt es Proteinmengen von >50ng sichtbar zu machen. Dies diente zur Kontrolle des Proteintransfers. Die Membran wurde mit einer 10%igen Ponceau-S-Lösung (Sigma, Taufkirchen) gefärbt und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O entfärbt.

### **Reversible Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue R250**

Zur Färbung von Proteinen auf einer PVDF Membran kann auch der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue-R250 verwendet werden. Dazu wurden die Membranen 15min in Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Blot in verschiedenen Waschschritten mit Entfärbelösung behandelt.

### **Immundetektion**

Proteine können mit Hilfe der Immundetektion spezifisch nachgewiesen werden. Zur Absättigung der freien, unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran mit 5% Magermilch (Merck, Darmstadt) in TBS für 30min bei RT blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Erstantikörper (0,5µg/ml) in 2,5% Magermilch/TBS für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 15min mit 0,05% Tween/TBS erfolgte eine Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper in der entsprechenden Verdünnung in 2,5% Magermilch/TBS für 30min bei RT. Anschließend wurde wiederum dreimal für 15min mit 0,05% Tween/TBS gewaschen. Zur Detektion der Proteinbanden wurde ein Chemilumineszenz-Substrat (ECL, Amersham, Freiburg) verwendet. Dabei katalysiert der Peroxidase-konjugierte Antikörper die Oxidation von Luminol und löst dadurch eine Chemilumineszenz aus. Das entstehende Licht wird mit einem Film gemessen. Dieser zeigt eine Schwärzung an den Positionen der Membran, an denen die verwendeten Antikörper spezifisch das Antigen detektiert haben. Die Membran wurde dazu für 1min mit 0,125ml der Detektionsreagenzien 1 und 2 pro cm<sup>2</sup> Membran inkubiert. Anschließend wurde je nach Stärke des erwarteten Signals für die entsprechende Zeit ein ECL-Film (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) aufgelegt.

### **Peroxidase-Signal löschen**

Bereits entwickelte PVDF-Membranen können nochmals mit einem anderen Antikörper überprüft werden. Damit die bereits vorhandenen Signale nicht stören, kann die Peroxidase-Funktion der gebundenen Zweitantikörper durch Natriumazid zerstört werden. Dazu wurden die Blot-Membranen nach der Detektion für ca. 45min getrocknet, kurz in Methanol getränkt und mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Membranen 30min in 5% Magermilch mit 0,1% Natriumazid inkubiert. Nun konnte eine erneute Immundetektion durchgeführt werden.

### 4.3.3 Lyse von Zellen mit TX-100- bzw. BOG-Lysispuffer

Zur Proteingewinnung wurden die Zellen zunächst mit PBS/EDTA von den Kulturschalen gelöst und bei 300g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zum Waschen in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in TX-100-, bzw. BOG- (N-Octyl- $\beta$ ,D-glucopyranoside) Lysispuffer resuspendiert und 15min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von Protease-Inhibitoren wurde ein Proteinabbau durch die bei der Zelllyse freigesetzten intrazellulären Proteasen verhindert. Daraufhin wurde das Lysat 15min bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert, um die unlöslichen Zellrückstände zu sedimentieren. Der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge 2x SDS-Probenpuffer durchmischt oder in einer Immunpräzipitation weiter verarbeitet.

### 4.3.4 Lyse von Vesikeln mit BOG-Lysispuffer

Vesikel wurden ebenfalls zur Bestimmung der Proteinkonzentration bzw. für die Immunpräzipitation lysiert. Durch Ultrazentrifugation isolierte Vesikel wurden in dem gewünschten Volumen BOG-Lysispuffer aufgenommen, resuspendiert und für 15min auf Eis inkubiert. Unlösliche Membranreste wurden hier nicht abzentrifugiert. Die Lysate konnten für weitere Analysen direkt verwendet werden.

### 4.3.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinmengenbestimmung wurde das Bradford-Kit (Biorad, München) verwendet. Bei der Bindung von Protein an den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G-250 verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465nm (ohne Protein) zu 595nm (mit Protein). Diese Methode ermöglicht es die relative Proteinmenge einer Probe zu messen. Wird eine absolute Messung gewünscht, so muss zusätzlich noch eine Eichgerade mit bekannten Proteinmengen erstellt werden. Die zu untersuchende Proteinlösung wurde je nach erwarteter Proteinmenge entweder unverdünnt oder als Verdünnung eingesetzt. Es wurden Duplikate mit jeweils 5 $\mu$ l der zu messenden Probe in eine 96-Loch Platte (Greiner, Frickenhausen) vorgelegt und darauf 195 $\mu$ l einer 1:5 Verdünnung (in ddH<sub>2</sub>O) der Bioradlösung pipettiert. Anschließend wurde die optische Dichte im Photometer bei 595nm bestimmt. Durch die ermittelten Werte konnten für verschiedene Proben die Volumina für die jeweils gleiche Proteinmenge errechnet werden.

### 4.3.6 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) wurde eingesetzt, um Antigene aus Zellüberständen, Zelllysaten oder Vesikellysaten mit Hilfe spezifischer Antikörper zu präzipitieren. Dazu wurden Zellen oder Vesikel, wie zuvor beschrieben in 500µl BOG-Lysispuffer unter Zusatz von 1mM MgCl<sub>2</sub> und 1mM CaCl<sub>2</sub> lysiert. Die Lysate bzw. zellfreien Überstände wurden über Nacht mit 1µg Erstantikörper (beim jeweiligen Versuch angegeben) bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Proben mit 30µl Protein-A- oder Protein-G-Sepharose versetzt, an die die gebildeten Immunkomplexe binden sollten. Die Ansätze wurden für weitere 2h bei 4°C auf dem Überkopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit den daran gebundenen Immunkomplexen durch Zentrifugation für 1min bei 10000rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert. Die Überstände wurden verworfen und die Präzipitate durch fünfmaliges Waschen von Verunreinigungen (unspezifische Proteine) befreit. Dabei wurde zweimal jeweils mit 1ml BOG-Lysispuffer, einmal mit 0,5M LiCl/TBS und zweimal mit 1ml TBS gewaschen. Alle Waschschritte erfolgten auf Eis. Das Sepharosepellet konnte dann je nach Fragestellung in reduzierendem SDS-Probenpuffer zur Analyse in der SDS-Gelelektrophorese oder im TNF $\alpha$ -Spaltungspuffer zur Analyse im TNF $\alpha$ -Spaltassay aufgenommen werden.

### 4.3.7 Aufkonzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration

Für die Aufkonzentrierung von proteinhaltigen Lösungen wurden spezielle Amicon Konzentratoren (Millipore, Eschborn) mit einem Ausschlussvolumen von 10kDa verwendet. Die Proteinlösung wurde in den Probenbehälter eingefüllt und dieser in den Sammelbehälter eingesetzt. Die Proteinlösung wurde durch Zentrifugation bei 3000rpm bei 4°C ultrafiltriert. Hochmolekulare Substanzen (>10kDa) verblieben im Probenbehälter, niedermolekulare Substanzen (<10kDa) und Flüssigkeit wurden durch den semipermeablen Filter hindurchgepresst und im Sammelbehälter aufgefangen. Das Volumen des Filtrats wurde dabei durch die Dauer der Zentrifugation bestimmt.

### 4.3.8 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine aus zellfreien Überständen wurden mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurden die proteinhaltigen Lösungen 1:10 mit 40%iger TCA gemischt und 10min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C in einer

Tischzentrifuge. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1,5ml Diethylether versetzt. Der Ansatz wurde stark geschüttelt bis sich das Sediment löste. Dann wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment ein weiteres Mal mit 1,5ml Diethylether gewaschen. Nach Zentrifugation wurde das Sediment (von Salzen befreites Protein) an der Luft getrocknet und in SDS-Probenpuffer resuspendiert.

### 4.3.9 Isolation von Vesikeln durch Ultrazentrifugation

#### Aus Zellkulturüberständen

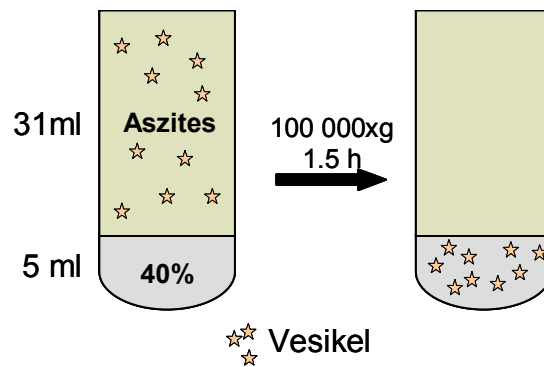
Die Isolation von Vesikeln aus Zellkulturüberständen wurde durch Ultrazentrifugation durchgeführt. Dazu wurde konditioniertes Medium von Zellen abgenommen und für 10min bei 800g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und erneut für 20min bei 10000g zentrifugiert. Durch diese beiden Zentrifugationsschritte wurden restliche Zellen und Zelltrümmer entfernt. Anschließend wurde der Überstand in Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Beckman) überführt und durch Ultrazentrifugation bei 100000g, 4°C und unter Vakuum sedimentiert. Die Überstände wurden verworfen und die Vesikel in dem gewünschten Puffer aufgenommen. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Rotoren und die damit verbundene Rotorgeschwindigkeit und Zentrifugationsdauer für eine optimale Anreicherung der Vesikel.

Rotortyp	Volumen	Rotorgeschwindigkeit für 100000g	Zentrifugationszeit
SW27	36ml	24000rpm	2,5h
SW40	12ml	24000rpm	2h

#### Aus Aszites

Um Vesikel aus Aszites im Saccharose-Gradienten analysieren zu können müssen diese zuerst aufgereinigt werden. Aszites wurde von Zellen und Zelltrümmern durch zwei Zentrifugationschritte befreit. Anschließend wurden in ein SW28-Zentrifugenröhrchen 5ml 40%ige Saccharose vorgelegt und mit Aszites überschichtet (**Abb. 7**). Anschließend wurde 90min bei 100000g, 4°C und unter Vakuum ultrazentrifugiert. Dadurch wandern die Vesikel des Aszites in das Saccharose-Kissen.



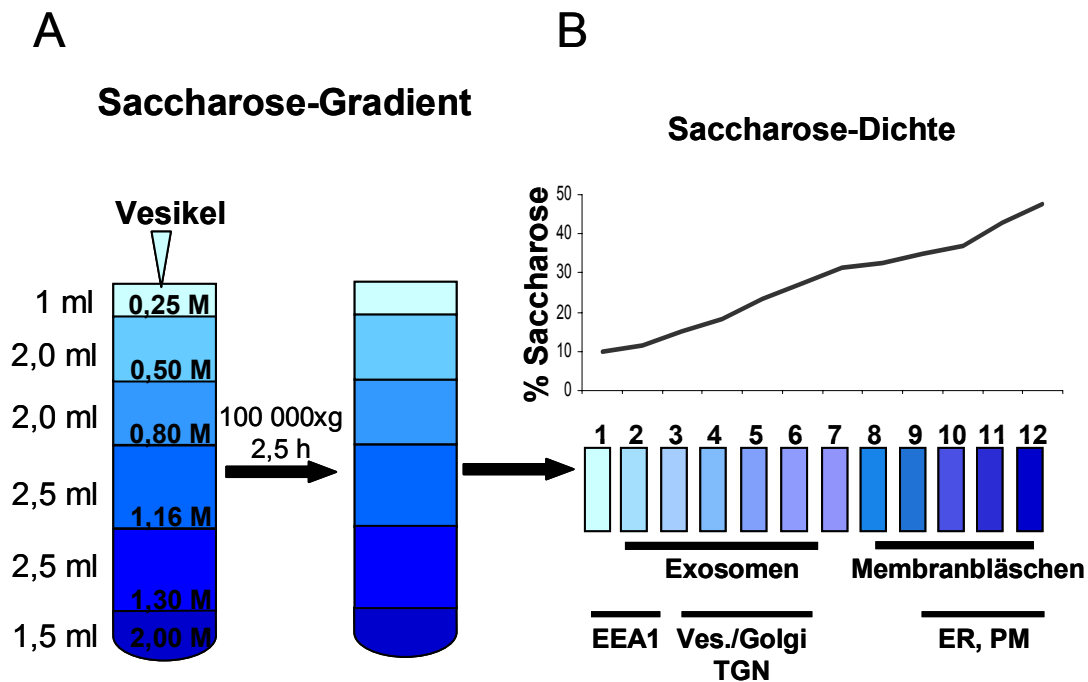


**Abb. 7: Schematische Darstellung der Vesikelaufreinigung aus Aszites.** Unlösliche Proteinaggregate werden sedimentiert, während Vesikel im Saccharose-Kissen angereichert werden.

Der Überstand wurde bis ca. 1cm über dem Kissen abgenommen und verworfen. Das Saccharose-Kissen und der restliche Überstand wurden in ein neues Röhrchen überführt und mit sterilem PBS aufgefüllt. Durch diesen Schritt wurde die Saccharose ausreichend verdünnt, um beim nächsten Zentrifugationsschritt (2h, 100000g, 4°C) die Vesikel zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet für ca. 5min getrocknet. Die isolierten Vesikel konnten nun für weitere Experimente in entsprechenden Lösungen bzw. Puffern aufgenommen werden.

#### 4.3.10 Fraktionierung im Saccharose-Gradient

Durch einen Saccharose-Gradient definierter Dichte können Zellhomogenate in subzelluläre Bestandteile (Zellorganellen, Plasmamembran) aufgetrennt werden (Yan et al., 2001). Desweiteren wurde der Gradient als Methode etabliert, um verschiedene aus Zellüberständen oder Aszites isolierte vesikuläre Strukturen voneinander zu unterscheiden. Zur Analyse von Zellhomogenaten im Saccharose-Gradient wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit einem Homogenisator in 1ml einer 0,25M Saccharoselösung homogenisiert. Darauf folgten drei Einfrier-/Auftauzyklen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bzw.  $37^{\circ}\text{C}$ . Isolierte Vesikel wurden in 1ml der 0,25M Saccharoselösung resuspendiert. Inzwischen wurde ein Saccharose-Stufengradient (**Abb. 8A**) vorgelegt, dieser wurde mit dem Homogenat bzw. den Vesikeln überschichtet. Nach 2,5h Ultrazentrifugation bei 100000g in einem SW40-Rotor wurden 1ml Fraktionen von oben vorsichtig abgenommen (**Abb. 8B**). Anschließend wurden die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine mit Chloroform-Methanol gefällt. Für weitere funktionelle Analysen oder Immunpräzipitation der Vesikel wurden die einzelnen Fraktionen mit PBS verdünnt und die darin jeweils enthaltenen Vesikel durch Ultrazentrifugation bei 100000g für 2h sedimentiert.



**Abb. 8: Schematische Darstellung der Auftrennung von Homogenaten und Vesikeln im Saccharose-Gradienten.** (A) Der Saccharose-Gradient wurde nach dem aufgeführten Schema beladen und danach bei 100000g für 2,5h zentrifugiert. (B) Nach Ultrazentrifugation wurden zwölf 1ml Fraktionen von oben abgenommen. Das Diagramm zeigt die kontinuierlich ansteigende Dichte der Saccharoselösung nach Zentrifugation. Sie wurde aus dem Gewicht der einzelnen Fraktionen berechnet. Der untere Teil zeigt in welchen Fraktionen die verschiedenen intrazellulären Strukturen wie frühe Endosomen (EEA1), Vesikel (Ves.), Golgi-Apparat (Golgi), Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), Endoplasmatisches Reticulum (ER), Plasmamembran (PM) angereichert wurden bzw. die verschiedenen vesikulären Strukturen identifiziert wurden (Exosomen, Membranbläschen).

#### 4.3.11 Methanol-Chloroform-Proteinfällung

Die Proteine aus den einzelnen Fraktionen des Gradienten wurden durch organisches Lösungsmittel gefällt. Dazu wurden pro 1ml Fraktion das vierfache Volumen Methanol, das dreifache Volumen ddH<sub>2</sub>O und das einfache Volumen Chloroform hinzugefügt und gut gemischt. Um das ausgefallene Protein zu sedimentieren wurden die Röhrchen dann bei 500g und 4°C für 20min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe bis kurz über die entstandene Chloroform/Protein-Phase abgesaugt. Anschließend wurde das 6fache Volumen Methanol hinzugefügt, wiederum gut gemischt und erneut 20min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das sedimentierte Protein über Nacht bei RT getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Pellets im entsprechenden Puffer aufgenommen und weiterverarbeitet.

### 4.3.12 Aufreinigen von löslichem L1 aus Aszites

Lösliches L1 wurde mittels Affinitätschromatographie aus Aszites gereinigt. Dazu wurde zell- und vesikelfreier Aszites an Sepharose-gekoppelten L1-11A Antikörper adsorbiert. Gebundenes L1 Protein wurde dann mit 0,1M Glycin/HCl Puffer (pH 2,7, 500mM NaCl) eluiert. Das Eluat wurde in 10 x 500µl Fraktionen gesammelt und der pH-Wert der einzelnen Fraktionen kontinuierlich überprüft. Zur Neutralisation wurden nach dem pH-Sprung in den sauren Bereich 50µl 3M Tris (pH 8,8) hinzu gegeben. Nachdem die positiven Fraktionen im ELISA ermittelt worden waren, wurden diese vereinigt und konzentriert. Für die Konzentrierung wurden Amicon Konzentratoren mit einem Ausschlussvolumen von 10kDa verwendet. Anschließend wurde das Konzentrat mit PBS aufgefüllt, um verbliebene Salze heraus zu waschen, und erneut zentrifugiert.

### 4.3.13 ELISA

#### Zum Nachweis von löslichem L1 im Aszites

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 4°C mit 100ng (in 100µl PBS-Puffer) anti-human L1-Antikörper (5G3) beschichtet. Darauf folgte ein Blockierungsschritt für 45min bei RT mit 150µl einer 3%igen BSA-Lösung (in PBS), woran sich drei Waschgänge mit 0,05% Tween/TBS-Puffer anschlossen. Dann wurde Aszites in verschiedenen Verdünnungen mit PBS auf die ELISA-Platte gegeben und für 1h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde Peroxidase-konjugierter L1-Antikörper (L1-11A) hinzugefügt und wieder für 1h bei RT inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte wonach dann 100µl TMB-Substratlösung (Sigma, Taufkirchen) zugefügt wurden. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50µl 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die optische Dichte bei 450nm im ELISA-Reader bestimmt. Es wurden grundsätzlich Triplikate gemessen und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

#### Zum Nachweis einer direkten Neuropilin-1/L1 Interaktion

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 4°C mit NRP1-Fc beschichtet. Im Anschluss erfolgte ein Blockierungsschritt für 45min bei RT mit 150µl einer 3%igen BSA-Lösung (in PBS), woran sich drei Waschgänge mit 0,05% Tween/TBS anschlossen. Dann wurde der Zellüberstand, der L1-Fc enthielt, oder gereinigtes lösliches L1 (sL1) auf die ELISA-Platte gegeben und für 1h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde Peroxidase-gekoppelter L1-11A (L1-11A-POX) Antikörper hinzugefügt und für 1h bei RT

inkubiert. Darauf folgten drei Waschschriffe wonach dann 100µl TMB-Substratlösung zugefügt wurden. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50µl 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die optische Dichte bei 450nm im ELISA-Reader bestimmt. Es wurden grundsätzlich Triplikate gemessen und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

#### 4.3.14 TNF $\alpha$ -Spaltassay

Die proteolytische Aktivität von ADAM10 und ADAM17 oder auch von intakten Vesikeln wurde mit einem TNF $\alpha$ -Spaltassay ermittelt. Dazu wurde ein synthetisches Peptid verwendet, dessen Sequenz der nativen ADAM17-Spaltsequenz (Abz-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Dap(Dnp)-NH<sub>2</sub>) entspricht. Zusätzlich besitzt das Peptid zwei synthetische Gruppen: einen Fluoreszenz-Donor (Reporter) und einen Fluoreszenz-Akzeptor (Quencher). Sind beide Moleküle in räumlicher Nähe, so wird die durch Anregung des Reporters emittierte Strahlung durch den Quencher abgefangen und unterdrückt. Bei der Spaltung des Peptids an der entsprechenden Stelle werden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt. Damit ist eine Unterdrückung der Fluoreszenz nicht mehr möglich. Die gemessene Fluoreszenz steigt proportional zur umgesetzten Substratmenge an.

Zur Messung wurden die Proben (z.B. präzipitiertes ADAM10 oder ADAM17, Vesikel) in 100µl TNF $\alpha$ -Spaltungspuffer aufgenommen und mit dem Peptid (50µM) inkubiert. Die Messung erfolge nach 12h im *Fluoroscan Ascent FL Reader* bei einer Extinktion von 320nm und Emission von 405nm.

Um die Inhibierbarkeit der Reaktion mit Metalloprotease-Inhibitoren zu untersuchen, wurden die jeweiligen Ansätze vor Zugabe des Peptids für 30min bei 37°C mit dem Inhibitor vorinkubiert.

#### 4.3.15 Zymogramm zur Bestimmung von Gelatinase-Aktivität

Im Zymogramm wurde die Gelatinase-Aktivität von Vesikeln aus Aszites getestet. Die durch Ultrazentrifugation gewonnenen Vesikel wurden in 25µl PBS resuspendiert und mit 2x nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben im SDS-Page auf einem Gelatine-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Unterschied zum SDS-Page werden hierbei die Proben nicht aufgekocht. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30min in 2,5% TX-100 in ddH<sub>2</sub>O auf dem Schüttler inkubiert. Zum Entfernen des Detergenz wurde das Gel viermal für 10min in ddH<sub>2</sub>O geschüttelt. Anschließend wurde das

Gelatine-Gel in Zymogrammpuffer, der auf die erwarteten Enzyme abgestimmt sein muss, überführt und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gel kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und danach mit Coomassie-Färbelösung 1h bei 37°C gefärbt. Anschließend wurde solange mit Entfärbelösung entfärbt, bis durchsichtige Banden an den Stellen sichtbar wurden, an denen die Gelatine durch die in den Vesikeln enthaltenen Enzyme verdaut wurde.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Der Einfluss von L1 auf die Apoptose von Tumorzellen**

Das L1 Protein wurde ursprünglich als ein Adhäsionsmolekül des Nervensystems identifiziert und vermittelt wichtige migratorische Prozesse bei dessen Entwicklung (Stallcup et al., 1983; Seilheimer und Schachner, 1987, Lindner et al., 1983). Eine weitere Funktion des L1 Adhäsionsmoleküls identifizierten Chen et al. (1999a). Sie zeigten, dass Neuronen von Ratte- und Mausembryonen unter Serum-freier Kultivierung vor Apoptose geschützt wurden, wenn ihnen lösliches L1 als Substrat angeboten wurde. Weitere Untersuchungen belegten, dass L1 durch die Bindung an Integrine anti-apoptotische Moleküle, wie Bcl-2 oder Bcl-x, regulierte und auf diese Weise die Neuronen vor Apoptose geschützt wurden (Chen et al., 1999a). Anti-apoptotische Mechanismen sind auch für Tumorzellen bekannt. Diese entwickeln häufig Resistenzen gegen Apoptose induzierende Substanzen, z.B. gegen verschiedene Chemotherapeutika, was zu schwerwiegenden Problemen bei der Behandlung solcher Tumoren führt. Im Folgenden sollte nun zunächst untersucht werden, ob die Expression des L1 Adhäsionsmoleküls auch Tumorzellen vor Apoptose schützen kann.

#### **5.1.1 Behandlung L1 positiver Zellen mit Apoptose induzierenden Substanzen**

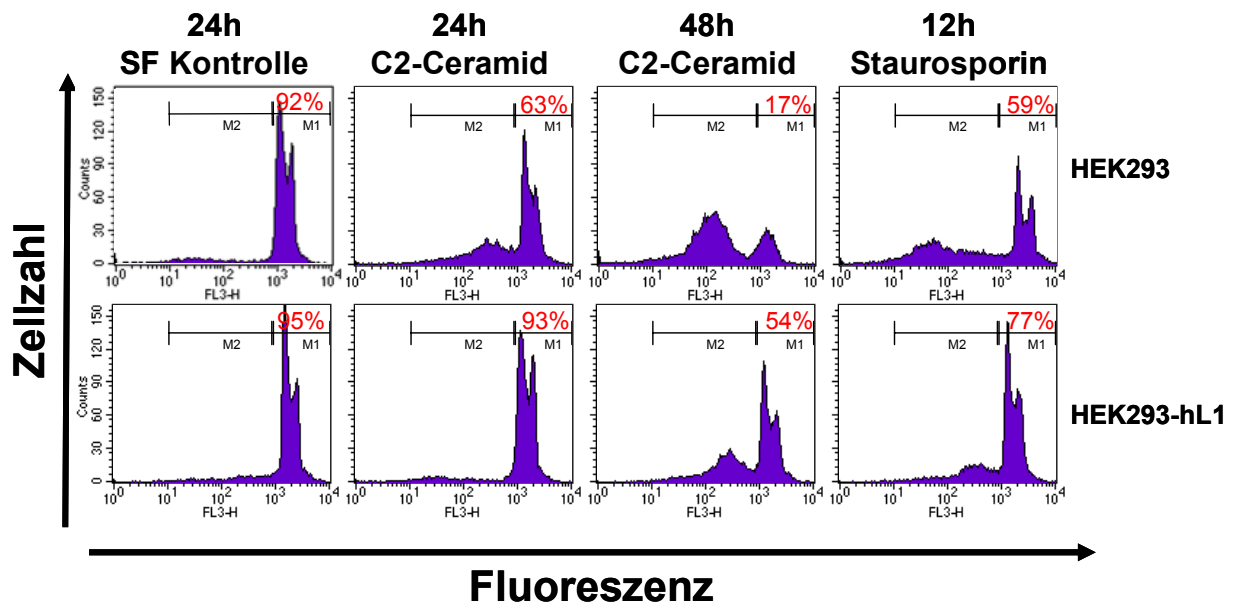
Um den Einfluss der L1 Expression auf die Apoptose von nicht neuronalen Zellen zu untersuchen, wurden L1-negative HEK293 Zellen und mit L1 stabil transfizierte HEK293-hL1 Zellen mit verschiedenen Apoptose induzierenden Substanzen behandelt. Anschließend wurde mit Hilfe der Nicolettifärbung der Grad der Apoptose bestimmt. Das Prinzip der Nicolettifärbung beruht darauf, dass während der Apoptose die DNA der Zellen fragmentiert wird. Durch die Fragmentierung kann sich weniger Propidiumiodid in die DNA einlagern. Die Fluoreszenz der einzelnen Zellkerne nimmt dadurch messbar ab. So lassen sich intakte Zellkerne von denen apoptotischer Zellen unterscheiden und damit der prozentuale Anteil lebender Zellen in einem Versuchsansatz ermitteln.

Apoptose kann auf verschiedenen Wegen induziert werden. In diesem Experiment wurde sie durch die chemischen Substanzen C2-Ceramid sowie Staurosporin herbeigeführt.

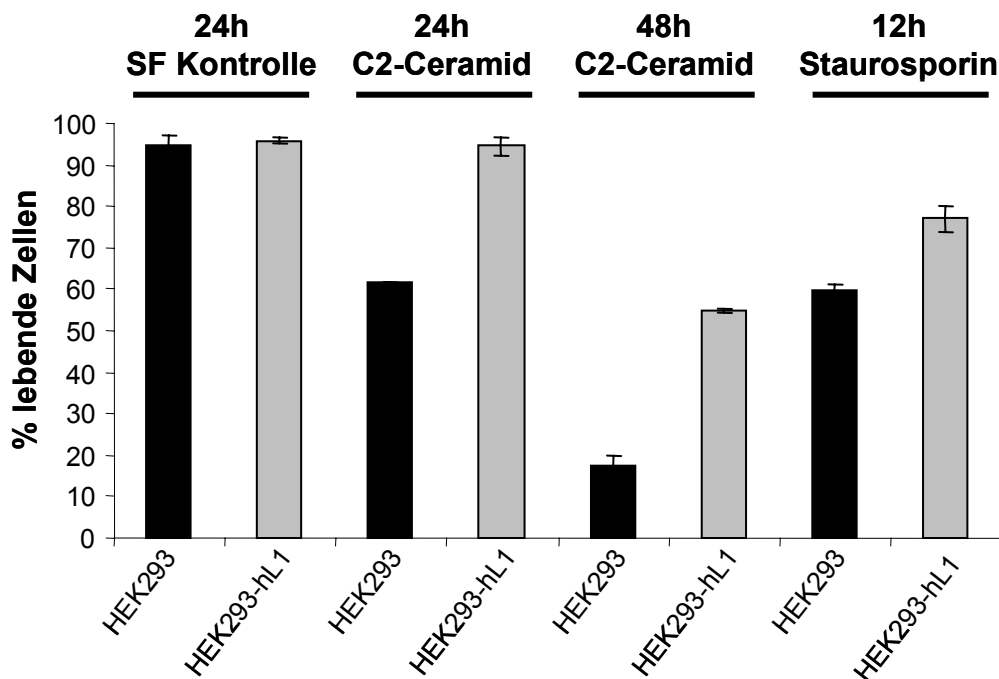
Zunächst wurden HEK293 und HEK293-hL1 Zellen in gleicher Zellzahl ( $5 \times 10^5$ ) in 6-Loch Platten ausgesät. Die Zellen wurden anschließend für 24h oder 48h mit  $40 \mu\text{M}$  C2-Ceramid oder mit  $2 \mu\text{M}$  Staurosporin in Serum-freiem Medium behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen für 24h nur in Serum-freiem Medium kultiviert, um die Auswirkungen dieser Kulturbedingungen auf das Zellsterben zu kontrollieren und somit eine Aussage über die Effektivität der zusätzlich induzierten Apoptose treffen zu können.

**Abb. 9A** zeigt die Auswertung der anschließenden Nicolettifärbung. Deutlich zu erkennen ist, dass beide Zelllinien durch Kultivierung unter Serum-freien Bedingungen nicht beeinflusst wurden. Alle Zellkerne befanden sich im Bereich der stärksten Fluoreszenz. In **Abb. 9A** ist dieser Bereich jeweils mit M1 gekennzeichnet. Der prozentuale Anteil lebender Zellen innerhalb M1 betrug für beide Zelllinien etwa 95%. Nach der Behandlung mit C2-Ceramid für 24h zeigten die L1-negativen Zellen jedoch eine deutliche Induktion der Apoptose. Nur noch 60% der Zellen überlebten die Behandlung, während die L1-positiven HEK293-hL1 Zellen tatsächlich keine Anzeichen für Apoptose aufzeigten. Erst nach einer 48-stündigen Behandlung wiesen auch diese Merkmale der Apoptose auf. Dennoch überlebten 50% der Zellen. Von den L1-negativen Zellen lebten dagegen nur noch 20%. Ein ähnliches Ergebnis wurde mittels Staurosporin erzielt. Etwa 75% der L1-positiven Zellen überlebten diese Behandlung, dagegen nur 55% der L1-negativen Zellen. **Abb. 9B** zeigt die graphische Darstellung der Nicolettifärbungen, ausgedrückt als prozentualer Anteil lebender Zellen. Alle Experimente zur Bestimmung der Apoptoserate wurden, wie auch im Folgenden, doppelt angesetzt, um die Abweichungen der einzelnen Ansätze untereinander zu ermitteln. Diese wurden als Fehlerbalken in die graphische Darstellung eingefügt. Das Experiment zeigte, dass die Expression von L1 auch nicht neuronale Zellen gegen die Induktion von Apoptose durch chemische Substanzen schützt.

A



B



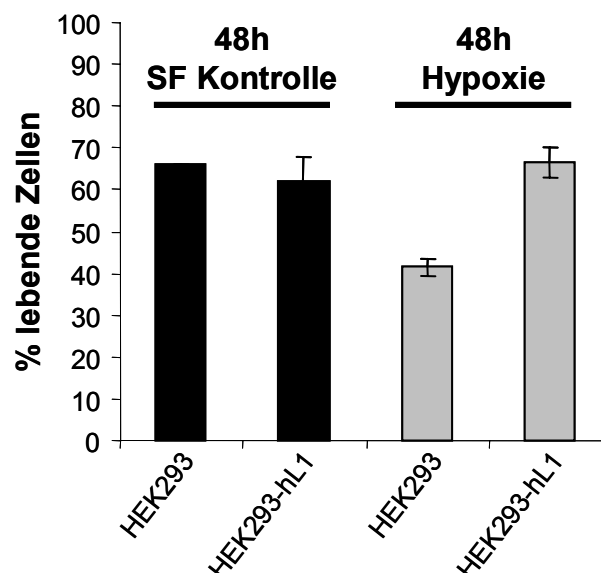
**Abb. 9: Bestimmung der Anzahl lebender Zellen nach Behandlung mit C2-Ceramid und Staurosporin.** (A) Mit Cellquest ausgewertete Nicolettifärbung. HEK293 und HEK293-hL1 Zellen wurden mit 40 $\mu$ M C2-Ceramid für 24h und 48h oder mit 2 $\mu$ M Staurosporin in Serum-freiem Medium für 12h behandelt. Die konstitutive Apoptoserate beider Zelllinien wurde nach 24h unter Serum-freien Bedingungen (SF) ermittelt. Die Zellen wurden in Nicolettipuffer resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Analyse erfolgte am FACS-Calibur. Im Bereich M1 befinden sich alle intakten Zellkerne, im Bereich M2 alle apoptotischen Zellkerne. Der prozentuale Anteil der Zellkerne in M1 ist für den jeweiligen Ansatz angegeben. (B) Graphische Darstellung der Nicolettifärbung als prozentualer Anteil lebender Zellen. Sie erfasst den prozentualen Anteil lebender Zellen aus (A) im Bereich M1. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Abweichungen der doppelt angesetzten Versuchsreihen.



### 5.1.2 Induktion der Apoptose durch Hypoxie

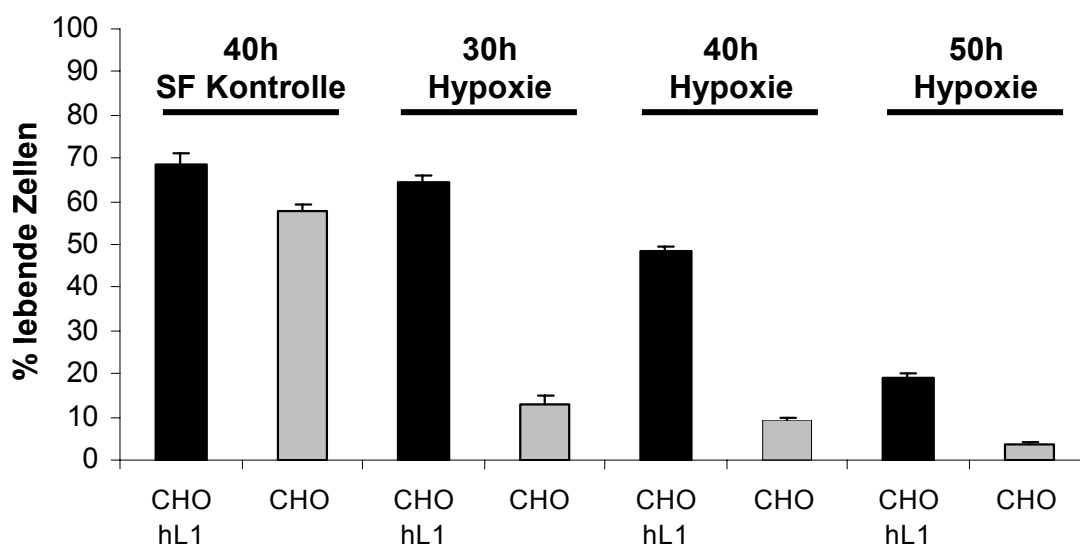
Bei der Kanzerogenese kann es zu einem Mangel an Sauerstoff und zu einem Anstieg des CO<sub>2</sub> Gehalts in bestimmten Bereichen von Tumorgewebe kommen, hervorgerufen durch eine Unterversorgung mit Blutgefäßen. Dieser als Hypoxie bezeichnete Zustand induziert in den meisten Fällen das Absterben der Tumorzellen. Manche Tumorzellen entwickeln jedoch Strategien, um sich gegen diesen Zustand zu schützen und werden dabei Apoptose-resistent. Dies erlaubt weiteres Tumorstadium trotz Hypoxie. Die Bedingungen (0,1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), die während einer Hypoxie vorherrschen, lassen sich sehr gut durch spezielle Zellkultur-Inkubatoren simulieren.

Von Interesse war die Frage, ob das L1 Protein Zellen auch unter hypoxischen Bedingungen vor Apoptose schützen kann. Hierzu wurden HEK293 und HEK293-hL1 Zellen für 48h in Serum-freiem Medium unter Hypoxie oder zur Kontrolle unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Das Ergebnis der anschließenden Nicolettifärbung ist in **Abb. 10** graphisch dargestellt. Nach 48h zeigten sich unter Standardbedingungen bereits erste Anzeichen von Zellsterben. Einen Unterschied zwischen L1-positiven und -negativen Zellen gab es jedoch nicht. Unter Hypoxie wurde die Apoptoserate der L1-negativen HEK293 Zellen deutlich verstärkt. Für HEK293-hL1 Zellen konnte keine Auswirkung der Hypoxie beobachtet werden.



**Abb. 10: Graphische Darstellung der Nicolettifärbung nach Induktion der Apoptose durch Hypoxie.** HEK293 und HEK293-hL1 Zellen wurden 48h unter Hypoxie kultiviert. Die konstitutive Apoptoserate wurde bestimmt durch 48-stündige Inkubation unter Serum-freien Bedingungen (SF). Angegeben ist der durch die Nicolettifärbung ermittelte prozentuale Anteil lebender Zellen. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Abweichungen der doppelt angesetzten Versuchsreihen.

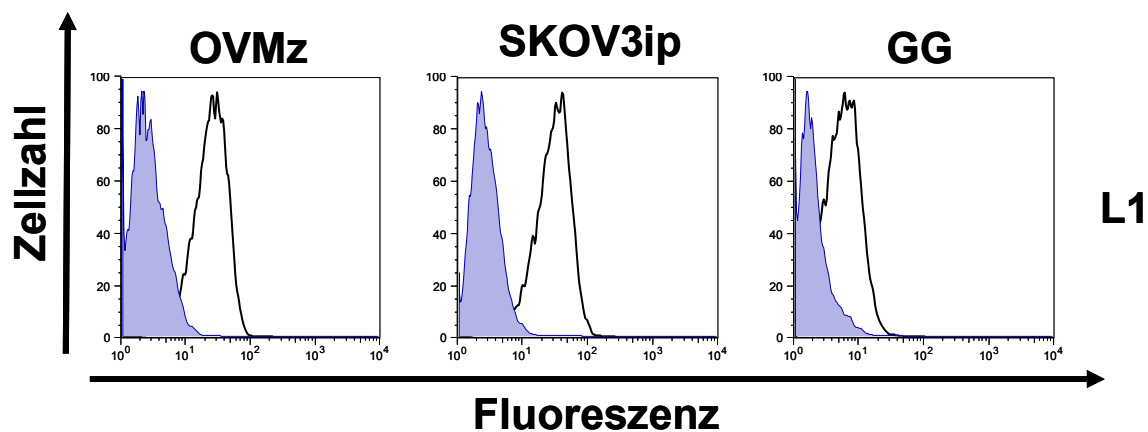
Dieses Ergebnis sollte nun für eine weitere Zelllinie bestätigt werden. Dazu wurden L1-negative CHO Zellen und mit humanem L1 stabil transfizierte CHO-hL1 Zellen verwendet. Beide Zelllinien wurden in gleicher Zellzahl ( $5 \times 10^5$ ) in 6-Loch Platten ausgesät und für 30, 40 und 50 Stunden unter Hypoxie in Serum-freiem Medium kultiviert. Zur Kontrolle wurden Zellen für 40h in Serum-freiem Medium unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Das Ergebnis des Experiments bestätigte die Aussage der Experimente mit HEK293 Zellen in einer deutlichen Kinetik (**Abb. 11**). Während die beiden Zelllinien gleichermaßen auf die Serum-freien Kulturbedingungen reagierten, erwiesen sich die L1-positiven CHO-hL1 Zellen deutlich resistenter gegen eine zusätzliche Induktion der Apoptose durch Hypoxie. Die L1-negativen CHO Zellen zeigten bereits nach 30h deutliche Anzeichen des Zellsterbens durch die sauerstoffarmen Kulturbedingungen. Nach 40h waren nur noch 10% dieser Zellen am Leben, während es bei den CHO-hL1 Zellen 50% waren. Nach 50h konnten immer noch 20% der L1-positiven Zellen als lebend identifiziert werden. Es wurde somit deutlich nachgewiesen, dass die L1 Expression, unabhängig von Zelltyp und Art der Apoptoseinduktion, zur Protektion der Zellen beiträgt.



**Abb. 11: Graphische Darstellung der Nicolettifärbung einer Hypoxie Kinetik.** CHO und CHO-hL1 Zellen wurden unter Serum-freien Bedingungen für 30h, 40h und 50h unter Hypoxie kultiviert. Die konstitutive Apoptoserate beider Zelllinien wurde nach 24h unter Serum-freien Bedingungen (SF) im Standard-Inkubator ermittelt. Angegeben ist der prozentuale Anteil lebender Zellen aus dem Bereich M1 der ausgewerteten Nicolettifärbungen. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Abweichungen der doppelt angesetzten Versuchsreihen.

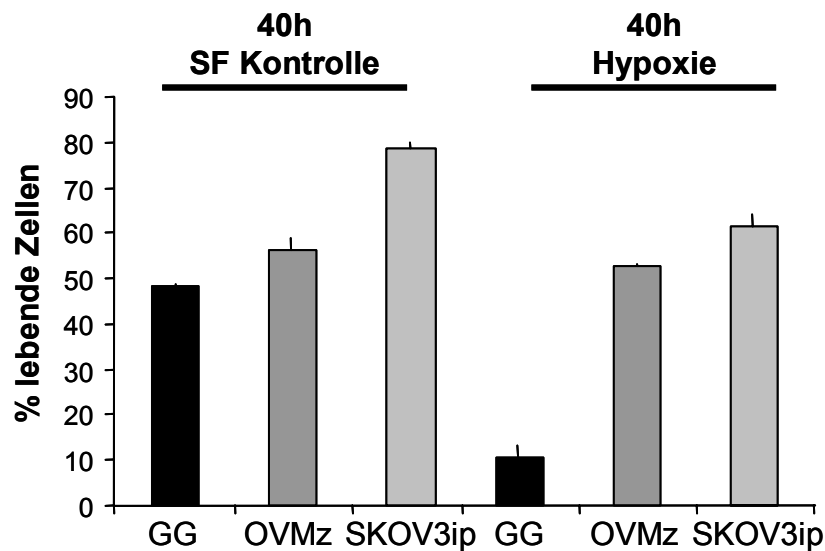
### 5.1.3 Apoptose von Ovarialkarzinomzellen mit unterschiedlichem L1 Expressionsprofil

Die erzielten Ergebnisse sollten nun an Ovarialkarzinomzellen überprüft werden. Dazu wurden drei Zelllinien mit unterschiedlichem L1 Expressionsprofil unter Hypoxie-Bedingungen miteinander verglichen. Die FACS-Analyse mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von L1 (L1-11A) zeigte auf OVMz und SKOV3ip Zellen eine stark positive L1 Zelloberflächenfärbung, während die Zelllinie GG eine deutlich schwächere Färbung erkennen ließ (**Abb. 12**).



**Abb. 12: FACS-Analyse.** Zur Untersuchung der L1-Zelloberflächenexpression wurden OVMz, SKOV3ip und GG Zellen mit dem mAk L1-11A gefolgt von einem anti-Maus-PE (am-PE) gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Die Analyse wurde am FACS-Calibur durchgeführt und mit Cellquest ausgewertet.

Die drei Zelllinien wurden für 40h unter Hypoxie kultiviert. Als Kontrolle dienten wiederum die gleichen Zellen unter Serum-freien Bedingungen im Standard-Inkubator kultiviert. Die anschließende Auswertung der Nicolettifärbung (**Abb. 13**) zeigte eine deutliche Induktion der Apoptose in GG Zellen, also in den L1 schwächer exprimierenden Zellen. SKOV3ip und OVMz Zellen reagierten dagegen kaum auf die Hypoxie. Somit konnte ein Zusammenhang zwischen der Stärke der L1 Expression und der Resistenz gegen Apoptose auch auf Ovarialkarzinomzellen übertragen werden. Dieser Befund eröffnete neue Aspekte in Hinsicht auf die Behandlung L1-positiver Tumoren mit den bereits erwähnten Chemotherapeutika. Die damit verbundenen Fragestellungen sollten nun in den nächsten Experimenten bearbeitet werden.

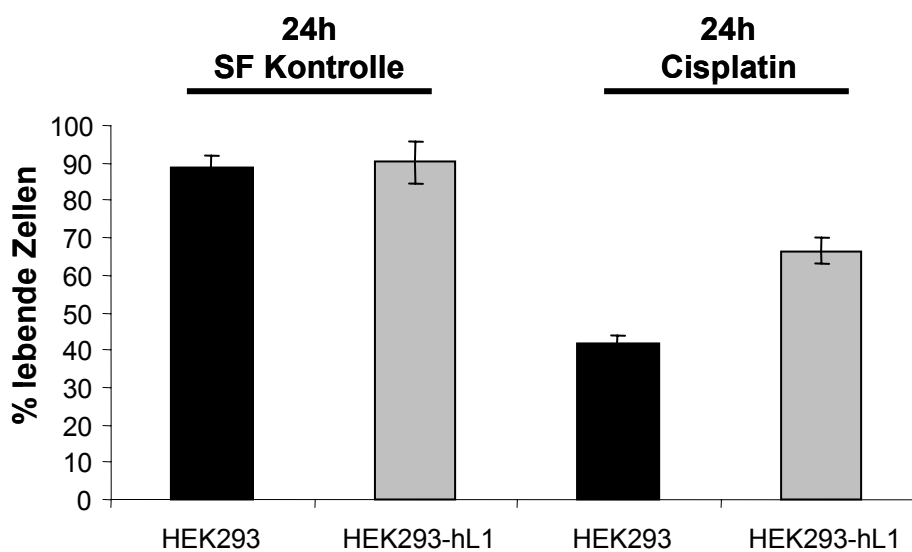


**Abb. 13: Prozentualer Anteil lebender Zellen verschiedener Tumorzelllinien nach Inkubation unter Hypoxie.** Die Tumorzelllinien GG, OVMz, SKOV3ip mit unterschiedlichem L1 Expressionsprofil wurden 40h in Serum-freiem Medium unter Hypoxie kultiviert. Mittels Nicolettifärbung wurde der prozentuale Anteil noch lebender Zellen bestimmt. Auswirkungen der Apoptose unter konstitutiven Bedingungen wurde durch Kultivierung unter Serum-freien Bedingungen im Standard-Inkubator ermittelt (SF). Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Abweichungen der doppelt angesetzten Versuchsreihen.

#### 5.1.4 Apoptoseinduktion mit Cisplatin

Die Wirkung von Chemotherapeutika zur Behandlung verschiedenster Krebsarten beschränkt sich nicht nur auf die Induktion von Apoptose in den Tumorzellen, sondern sie beeinflusst auch andere Faktoren. So greifen sie z.B. effektiv in den Zellzyklus ein. Dabei werden zwei erwünschte Effekte erzielt: zum einen greift die Substanz gezielter die schnell wachsenden Tumorzellen an, zum anderen verhindert oder zumindest verlangsamt sie die Ausbreitung des Tumors. Jedoch können Tumore auch gegen solche Substanzen Gegenstrategien entwickeln. Oftmals werden Tumorzellen während der Behandlung entweder resistent gegen die Substanz oder es sind bereits einige wenige Zellen von Anfang an geschützt. Diese überleben die Therapie in nicht nachweisbarer Anzahl und nach einiger Zeit führt dies zu einem Rezidiv, d.h. der Tumor kehrt zurück. Eine weitere Behandlung mit der gleichen Substanz führt zu keinem Erfolg mehr. Durch das breite Wirkungsspektrum der Chemotherapeutika auf verschiedene zelluläre Prozesse konnten bisher zahlreiche Proteine identifiziert werden, die zur Resistenzbildung notwendig sind. Ein Faktor alleine reicht in der Regel nicht aus, um die Tumorzellen effektiv zu schützen. Mit dem folgenden Experiment sollte geklärt werden, ob die Expression von L1 ebenfalls zu diesen Faktoren gerechnet werden kann.

HEK293 und HEK293-hL1 Zellen wurden wie in den vorangegangenen Versuchen ausgesät und für 24h mit 10 $\mu$ M Cisplatin behandelt. Als Kontrolle diente der gleiche Ansatz unter Serum-freien Bedingungen. Erstaunlicherweise zeigte sich auch in diesem Experiment, dass nach Behandlung 70% der L1-positiven Zellen überlebten, während nur 40% der L1-negativen Zellen am Leben waren. Wie erwartet konnten bei den Kontrollzellen keine Unterschiede beobachtet werden (**Abb. 14**). Dieses Experiment gab erste Hinweise darauf, dass das L1 Protein auch an einem Resistenzmechanismus gegen das Chemotherapeutikum Cisplatin beteiligt sein kann.

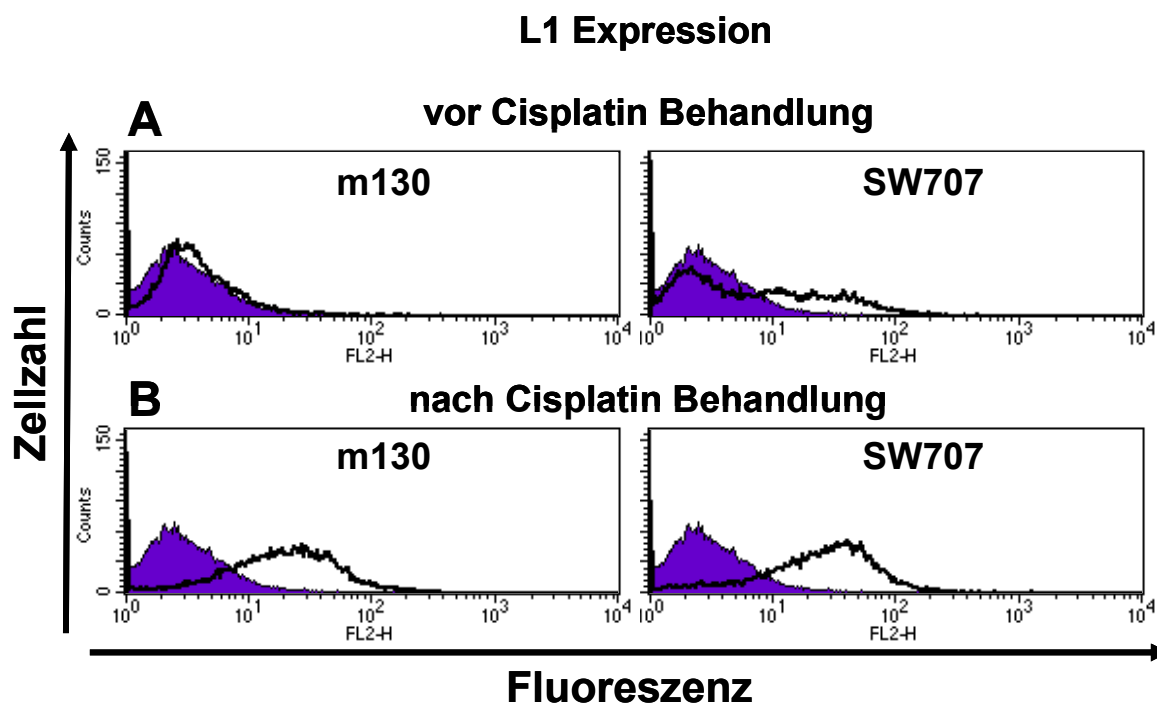


**Abb. 14: Prozentualer Anteil lebender Zellen nach Cisplatin Behandlung.** HEK293 und HEK293-hL1 Zellen wurden für 24h mit oder ohne 10 $\mu$ M Cisplatin in Serum-freiem Medium kultiviert. Die graphische Darstellung zeigt den prozentualen Anteil lebender Zellen durch Nicolettifärbung ermittelt. Fehlerbalken beziehen sich dabei auf Abweichungen der doppelt angesetzten Versuchsreihe.

### 5.1.5 Selektion L1-positiver Tumorzellen mittels Cisplatin-Behandlung

Die Behandlung mit Chemotherapeutika zieht sich gewöhnlich über eine längere Periode hin, in der dem Patienten wiederholt eine bestimmte Dosis der Substanz verabreicht wird. Es stellte sich nun die Frage, wie sich eine Mischpopulation aus L1-positiven und -negativen Zellen während einer ähnlichen Behandlung verhält. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die Ovarial- m130 und die Prostatakarzinomzelllinie SW707 verwendet, deren Zellen nur zu einem geringen Anteil L1 exprimieren (**Abb. 15**, vor Behandlung). Beide Karzinomzelllinien wurden in 100mm Kulturschalen ausgesät und über einen Zeitraum von zwei Wochen mit einer geringen Dosis (5 $\mu$ M) Cisplatin, in normalem

Kulturmedium verdünnt, behandelt. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage ausgetauscht und die Substanz frisch hinzugefügt. Einerseits sollte damit eine durchgehend gleichmäßige Wirkung, wie im Falle einer Patiententherapie, gewährleistet werden, andererseits aber auch um abgestorbene Zellen zu entfernen. Während der Behandlungsphase wurden die Zellen regelmäßig unter dem Lichtmikroskop auf ihren Zustand hin überprüft. Ein Großteil der Zellen starb, wie erwartet, im Verlauf der zwei Wochen. Gleichzeitig konnte kaum Zellwachstum festgestellt werden. Dies war ebenfalls zu vermuten, da Cisplatin auch in den Zellzyklus eingreift. Ferner war bei beiden Zelllinien eine morphologische Veränderung zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss an die zweiwöchige Behandlung wurde wiederum eine FACS-Analyse zur erneuten Kontrolle der L1 Expression durchgeführt. Das Ergebnis ist in **Abb. 15** (nach Behandlung) dargestellt. Die vor der Behandlung klar erkennbare L1-negative Zellpopulation war nahezu nicht mehr vorhanden. Weiterhin war die Oberflächenexpression von L1 deutlich stärker als zuvor. Die Abnahme der L1-negativen und die gleichzeitige Zunahme L1-positiver Zellen weist auf eine Selektion während der Cisplatin-Behandlung hin. Somit veränderte sich der Phänotyp von einer L1 Mischpopulation zu einer nahezu rein L1-positiven Population. Bei einer Patientenbehandlung wäre dies ein äußerst unerwünschter Effekt, in dem durch L1 Expression verstärkt resistente Zellen überleben.

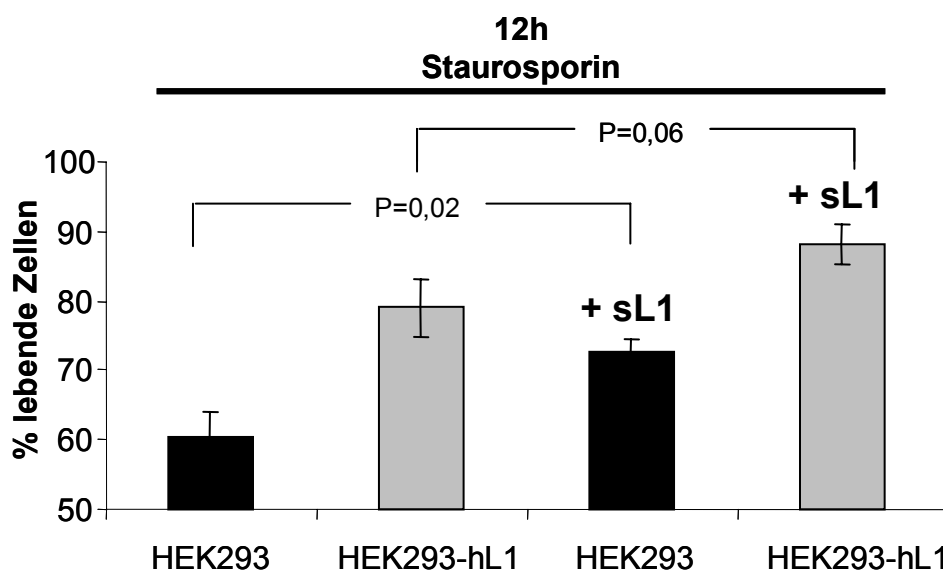


**Abb. 15: FACS-Analyse von m130 und SW707 Zellen vor und nach Cisplatin Behandlung. L1-Expressionsprofil.** Vor und nach einer zweiwöchigen Behandlung von m130 Zellen wurden diese mit dem mAk L1-11A gefolgt von einem am-PE gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Die Analyse wurde am FACS-Calibur durchgeführt und mit Cellquest ausgewertet.

### 5.1.6 Der Einfluss von löslichem L1 auf die Apoptose

Wie bereits beschrieben, konnten Chen et al. (1999a) nachweisen, dass lösliches L1, Neuronen als Substrat angeboten, vor Apoptose schützt. Lösliches L1 entsteht durch die Spaltung des Moleküls und kann in Zellkulturüberständen L1-positiver Zellen, aber auch im Serum und Aszites von Patientinnen nachgewiesen werden (Fogel et al., 2003). Durch die Bindung von löslichem L1 an Integrine wurden anti-apoptotische Moleküle, wie Bcl-2, verstärkt exprimiert (Chen et al., 1999a). Damit wurde die Apoptoserate der neuronalen Zellen deutlich gesenkt.

Basierend auf diesen Daten sollte im folgenden Experiment der Einfluss von löslichem L1 auf die Apoptose von HEK293 und HEK293-hL1 Zellen untersucht werden. Die beiden Zelllinien wurden für 12h mit 2 $\mu$ M Staurosporin mit oder ohne 1 $\mu$ g/ml aus Aszites gereinigtem löslichem L1 behandelt. **Abb. 16** zeigt das Ergebnis der anschließenden Nicolettifärbung in graphischer Darstellung. Wie bereits in den vorherigen Experimenten beobachtet, reagierten die HEK293 Zellen stärker auf den Apoptose-induzierenden Faktor. Zellen, die zusätzlich lösliches L1 als Substrat erhalten hatten, zeigten einen sichtbar verstärkten Schutz vor Apoptose. Dies galt sowohl für die L1-positiven als auch für die L1-negativen Zellen. Etwa 20% mehr Zellen überlebten die Behandlung im Vergleich zu denen, die das lösliche Substrat nicht erhalten hatten.



**Abb. 16: Schutz der Zellen vor Apoptose durch lösliches L1.** HEK293 und HEK293-hL1 Zellen wurden für 12h mit 2 $\mu$ M Staurosporin mit oder ohne 1 $\mu$ g/ml löslichem L1 (+sL1) behandelt. Anschließend wurde eine Nicolettifärbung durchgeführt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender Zellen nach Auswertung der Nicolettifärbung. Fehlerbalken beziehen sich auf Abweichung innerhalb der doppelten Versuchsreihe. Teststatistik wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt (hoch signifikant  $P \leq 0,05$ ; niedrig signifikant  $P < 0,1$ ).

Dieses Ergebnis konnte in weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch war grundsätzlich der Effekt durch die Zugabe von löslichem L1 geringer als er durch eine dauerhafte Expression dieses Adhäsionsmoleküls beobachtet werden konnte (siehe Abb. 9).

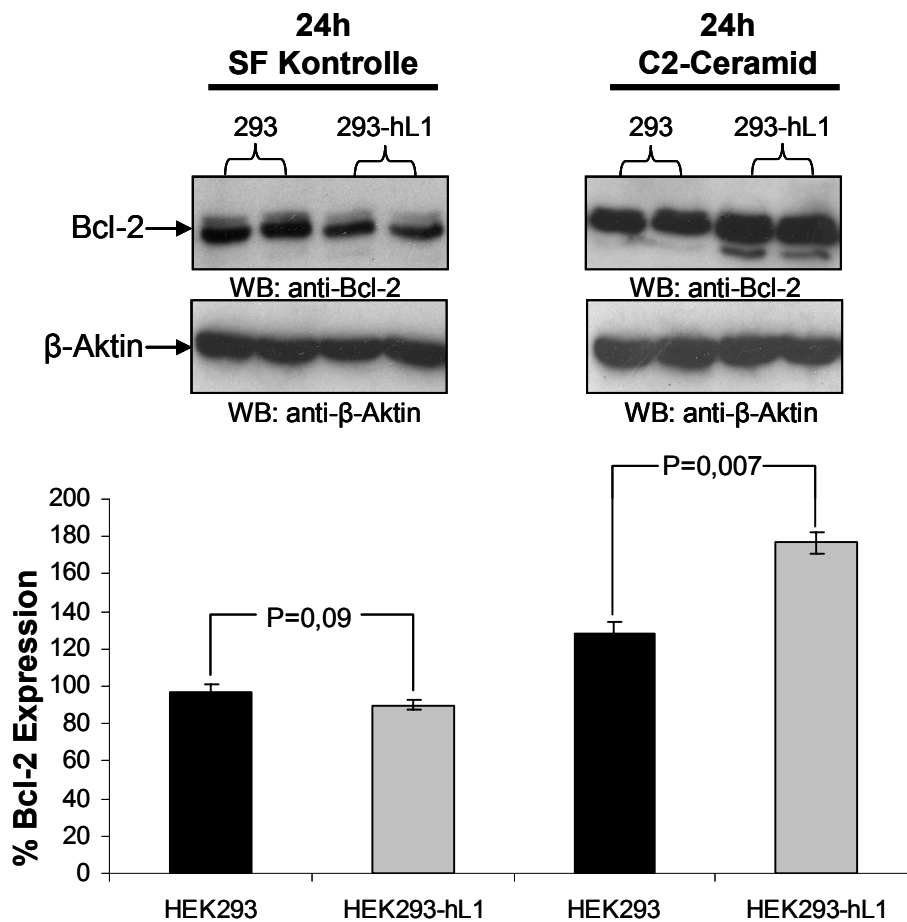
### **5.1.7 Induktion von Apoptose führt zur verstärkten Bcl-2 Expression in L1-positiven Zellen**

Um die Expression von Bcl-2 in L1-positiven und -negativen Zellen nach der Induktion der Apoptose zu vergleichen, wurden HEK293 und HEK293-hL1 Zellen für eine 24-stündige Behandlung mit C2-Ceramid in 6-Loch Platten in gleicher Zellzahl ausgesät. Nach der Behandlung wurden die Zellen abgeschabt und in TX-100 Lysispuffer lysiert. Anschließend erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Methode von Bradford, um sicher zu stellen, dass gleiche Proteinmengen in jeder Probe enthalten waren. Anschließend wurden die Proben in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis von Bcl-2 und  $\beta$ -Aktin erfolgte im Western Blot mit spezifischen Antikörpern. Die einzelnen Banden für  $\beta$ -Aktin und Bcl-2 der jeweiligen Proben wurden mit einem Durchlichtscanner eingescannt und mit der Software TINA densitometrisch ausgewertet. Der Nachweis von  $\beta$ -Aktin diente noch einmal als zusätzliche Kontrolle für gleiche Proteinmengen der einzelnen Proben.

Während die Expression von Bcl-2 in L1-negativen Zellen nach der Induktion der Apoptose um etwa 20% erhöht war, konnte eine Verdopplung der Bcl-2 Expression in L1-positiven Zellen beobachtet werden. Zwischen der Bcl-2 Expression in den unbehandelten Kontrollzellen konnten keine Unterschiede beobachtet werden (**Abb. 17**).

Dieses Experiment zeigte einen möglichen Mechanismus wie L1 über die Bindung an Integrine einen protektiven Effekt auf Zellen gegen Apoptose ausübt und dieser zumindest teilweise durch eine erhöhte Expression von Bcl-2 erklärt werden kann.





**Abb. 17: Western Blot Analyse von unbehandelten und C2-Ceramid behandelten HEK293 Zellen und densitometrische Auswertung.** HEK293 und HEK293-hL1 Zellen wurden für 24h unter Serum-freien Bedingungen (SF) oder mit 40 $\mu$ M C2-Ceramid in Serum-freiem Medium inkubiert. Nach Zelllyse erfolgte im Western Blot der Nachweis von Bcl-2 und  $\beta$ -Aktin. Die Menge der Bcl-2 Expression wurde durch densitometrische Auswertung mit dem Programm TINA ermittelt. Der Serum-freie Kontrollwert der HEK293 Zellen wurde als 100% definiert. Fehlerbalken beziehen sich auf Abweichungen innerhalb der doppelt angesetzten Versuchsreihe. Teststatistik wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt (hoch signifikant  $P \leq 0,05$ ; niedrig signifikant  $P < 0,1$ ).

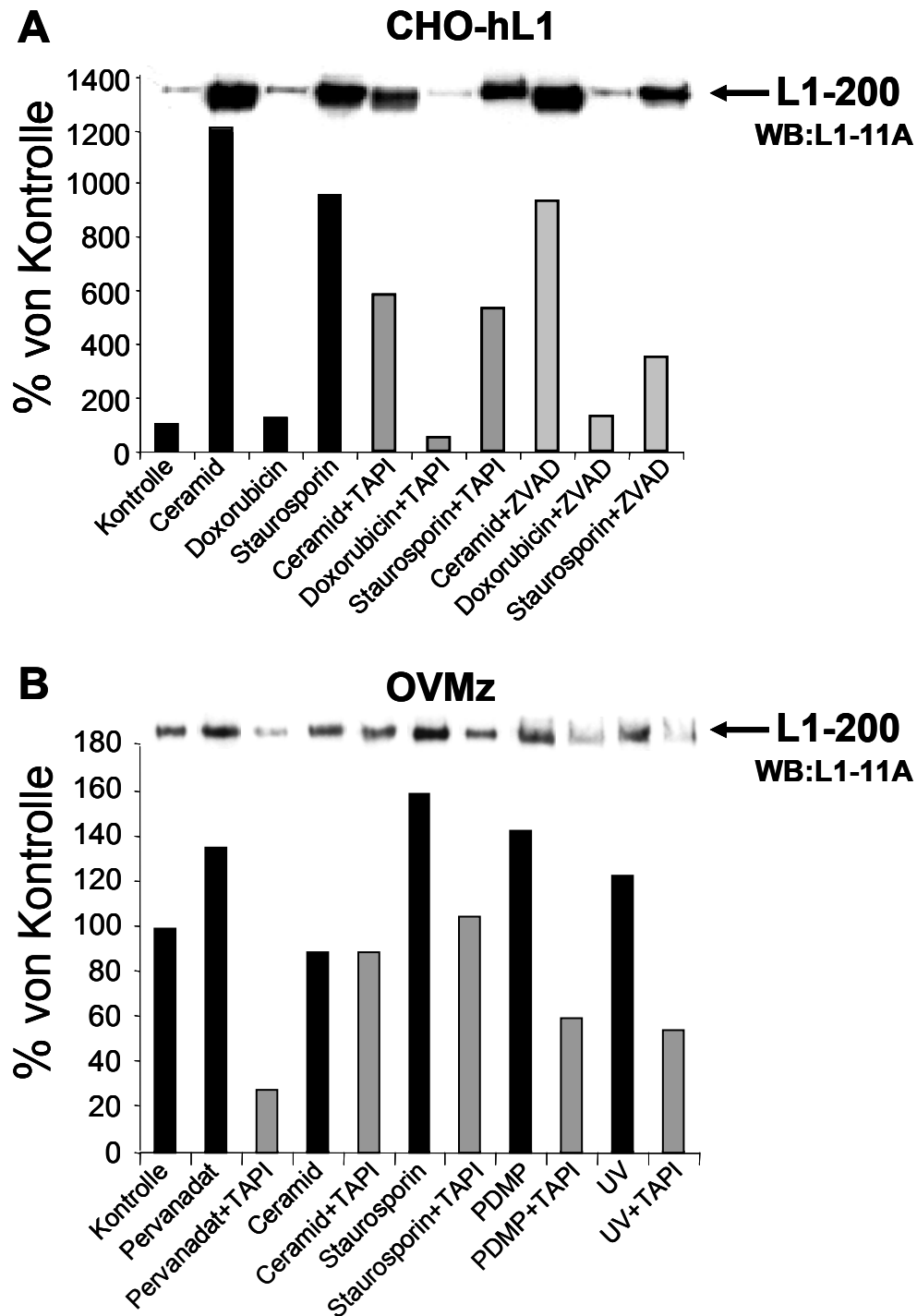
## 5.2 Einfluss der Apoptose auf die Spaltung von L1

Bisher konnte gezeigt werden, dass lösliches L1 einen protektiven Effekt auf Zellen gegen Apoptose ausüben kann. Aber auch andere Prozesse, wie die Zellmigration, können durch lösliches L1 als Substrat gefördert werden (Mechtersheimer et al., 2001). Vorausgegangene Arbeiten aus unserer Gruppe hatten gezeigt, dass lösliches L1 auf verschiedenen Wegen generiert werden kann: zum einen durch Spaltung an der Zelloberfläche, zum anderen aber auch durch die Freisetzung von Membran-Vesikeln (Gutwein et al., 2003). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob apoptotische Stimuli die Spaltung oder die Freisetzung des L1 Adhäsionsmoleküls beeinflussen.

### 5.2.1 Induktion von Apoptose führt zur verstärkten Freisetzung von löslichem L1

Verschiedene Arbeiten (Ilan et al., 2001; Kern et al., 2001; Steinhilber et al., 2001) konnten bereits zeigen, dass Adhäsionsmoleküle, wie E-Cadherin, L-Selectin und PECAM-1, während der Apoptose vermehrt gespalten werden. Nun sollte untersucht werden, ob dies auch für das Adhäsionsmolekül L1 zutrifft. Dazu wurden CHO-hL1 und OVMz Zellen jeweils in gleicher Zellzahl ( $5 \times 10^5$ ) in 6-Loch Platten ausgesät und für 18h mit verschiedenen apoptotischen Stimuli behandelt. Als Kontrolle dienten in Serum-freiem Medium kultivierte Zellen. Zusätzlich sollte der Einfluss des Metalloproteinase-Inhibitors TAPI und des Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk während der Apoptoseinduktion untersucht werden. Nach der jeweiligen Inkubation wurden die Proteine aus den Zellüberständen mittels Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis von löslichem L1 (L1-200) im Western Blot erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper L1-11A. Die Proteinbanden wurden im Durchlichtscanner gescannt und densitometrisch ausgewertet. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Behandlung beider Zelllinien mit C2-Ceramid und Staurosporin zu einer deutlich verstärkten Freisetzung von L1 führte (**Abb. 18**). Drei auf OVMz Zellen angewendete apoptotische Stimuli, wie Pervanadat, PDMP und UV-Bestrahlung, führten zur vermehrten Abgabe von L1 (**Abb. 18B**). Doxorubicin, ein Chemotherapeutikum, das im gewählten Zeitraum keine Apoptose induzierte, hatte auch keinen Einfluss auf die nachgewiesene Menge von L1 im Überstand im Vergleich zur Kontrolle. Dabei war die Beobachtung sehr aufschlussreich, dass die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem Metalloproteinase-Inhibitor TAPI in allen Fällen die vermehrte Spaltung von L1 unterdrücken konnte. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass Metalloproteinasen in die durch Apoptose induzierte Spaltung von L1 involviert sind. Des Weiteren konnte mittels zusätzlicher Behandlung von CHO-hL1 Zellen mit der Apoptose blockierenden Substanz ZVAD-fmk auch die induzierte Spaltung von L1 vermindert werden (**Abb. 18A**).

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass auch L1 durch die Apoptoseinduktion verstärkt gespalten wird. Metalloproteinasen spielen in diesem Prozess eine wichtige Rolle.

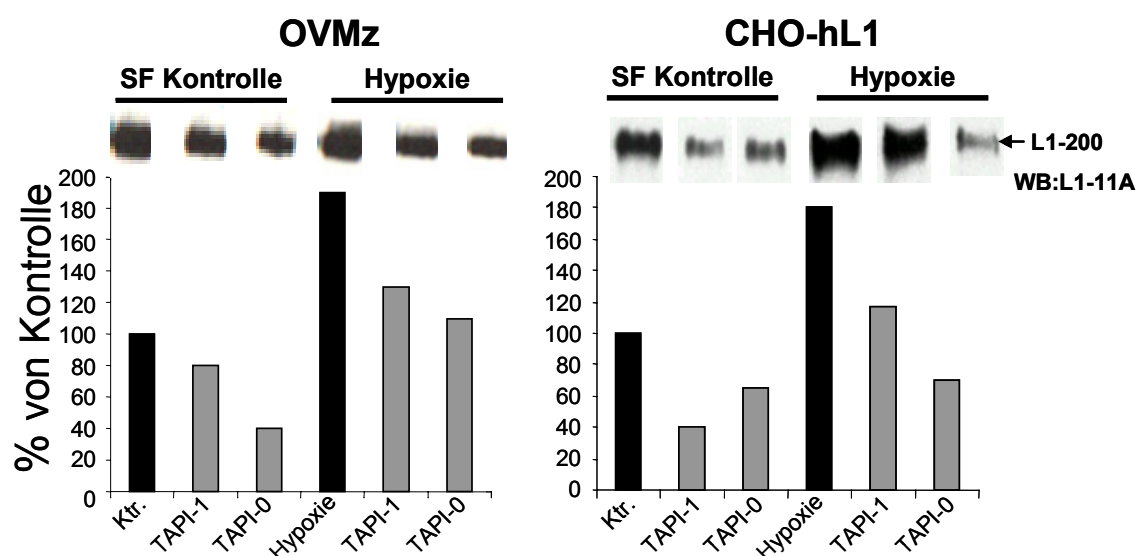


**Abb. 18:** Analyse der durch Apoptose induzierten Spaltung von L1 in CHO-hL1 und OVMz Zellen. (A) CHO-hL1 Zellen wurden für 18h mit 40 $\mu$ M C2-Ceramid, 5 $\mu$ g/ml Doxorubicin oder 2 $\mu$ M Staurosporin in Serum-freiem Medium behandelt. (B) OVMz Zellen wurden für 18h mit 200 $\mu$ M Pervanadat, 40 $\mu$ M C2-Ceramid, 2 $\mu$ M Staurosporin in Serum-freiem Medium inkubiert oder mit UV bestrahlt.

Der Metalloproteinase-Inhibitor TAPI-0 (10 $\mu$ M) oder der Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk (25 $\mu$ M) wurden jeweils 30min vor dem Stimulus zugegeben. Als Kontrolle dienten jeweils Zellen, die in Serum-freiem Medium für 18h kultiviert wurden. Die einzelnen Überstände wurden mit TCA präzipitiert und im Western Blot mit dem mAk L1-11A analysiert. Die einzelnen Banden der dargestellten Western Blots wurden densitometrisch ausgewertet. Die so ermittelten Mengen an löslichem L1 (L1-200) im Überstand sind als Prozent im Vergleich zur Kontrolle (als 100% definiert) graphisch dargestellt.

### 5.2.2 Hypoxie verstärkt die Freisetzung von L1

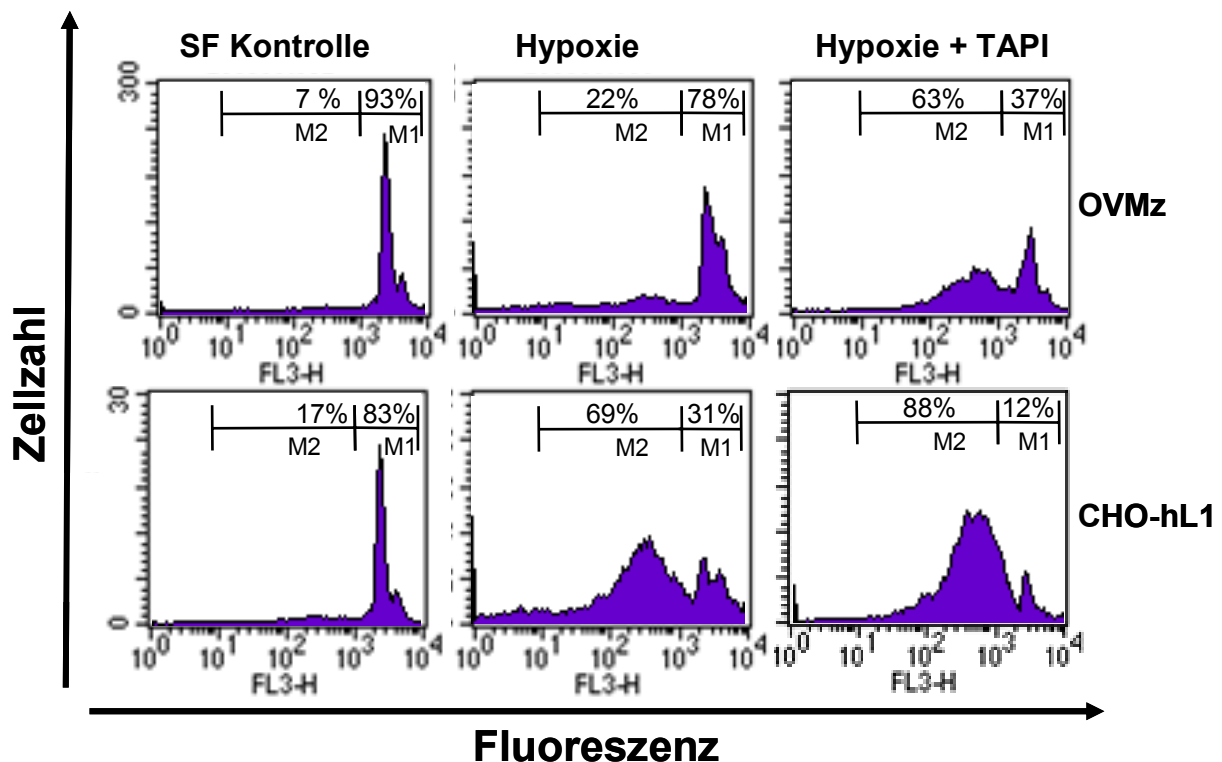
In einem weiteren Experiment wurden OVMz und CHO-hL1 Zellen für 36h im Hypoxie-Inkubator mit oder ohne Metalloproteinase-Inhibitor kultiviert. Als Kontrolle dienten Zellen, die für 36h unter Serum-freien Bedingungen im Standard-Inkubator kultiviert wurden. Anschließend wurden die Überstände wiederum auf die nachweisbare Menge von freigesetztem L1 untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass auch die Induktion der Apoptose durch Hypoxie zur vermehrten Spaltung von L1 führte. Da auch diese von dem Metalloproteinase-Inhibitor TAPI blockiert werden konnte, wurden die ersten Hinweise, dass Metalloproteinasen in die Freisetzung involviert sind, bestätigt (**Abb. 19**).



**Abb. 19: Western Blot Analyse von löslichem L1 im Zellüberstand nach Hypoxie.** CHO-hL1 und OVMz Zellen wurden für 60h unter Standardbedingungen oder Hypoxie in An- oder Abwesenheit der Metalloproteinase-Inhibitoren TAPI-1 oder TAPI-0 (10 $\mu$ M) Serum-frei inkubiert. Die Zellüberstände wurden mit TCA präzipitiert und im Western Blot mit dem Antikörper L1-11A analysiert. Die einzelnen Banden der dargestellten Western Blots wurden densitometrisch ausgewertet. Die so ermittelten Mengen an löslichem L1 im Überstand sind als Prozent im Vergleich zur Kontrolle (Ktr. als 100% definiert) graphisch dargestellt.

Zum Nachweis der Apoptoseinduktion wurde bei diesem Experiment nach der 36-stündigen Inkubation der Zellen eine Nicolettifärbung durchgeführt (**Abb. 20**). Dabei ergab sich ein weiterer unerwarteter Befund: Zellen, die zusätzlich mit dem Metalloproteinase-Inhibitor behandelt wurden, zeigten eine deutlich erhöhte Apoptoserate. Während nach 36h Hypoxie noch 78% der OVMz Zellen und 31% der CHO-hL1 Zellen am Leben waren, konnten durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor TAPI nur noch 37% der OVMz Zellen und 12% der CHO-hL1 Zellen als lebend erfasst werden. Diese Feststellung zeigte, dass Metalloproteinasen eine wichtige Rolle in der Protektion von Zellen gegen Apoptose spielen können. Durch die fehlende Generierung löslicher Schutzfaktoren, wie L1-200 und

andere, z.B. HB-EGF, (Fischer et al., 2004), werden Zellen offensichtlich empfindlicher gegenüber Apoptose-induzierende Einflüsse.

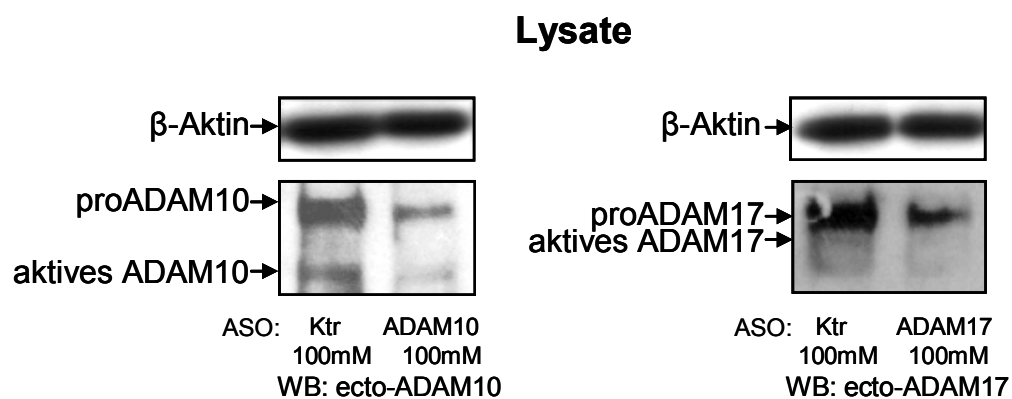


**Abb. 20: Nicolettifärbung von OVMz und CHO-hL1 Zellen.** OVMz und CHO-hL1 Zellen wurden für 60h unter Hypoxie in An- oder Abwesenheit von TAPI-0 (10 $\mu$ M) inkubiert. Die Zellen wurden in Nicolettipuffer aufgenommen und am FACS-Calibur analysiert. Die in den Bereichen M1 und M2 sich befindenden Zellkerne sind prozentual erfasst.

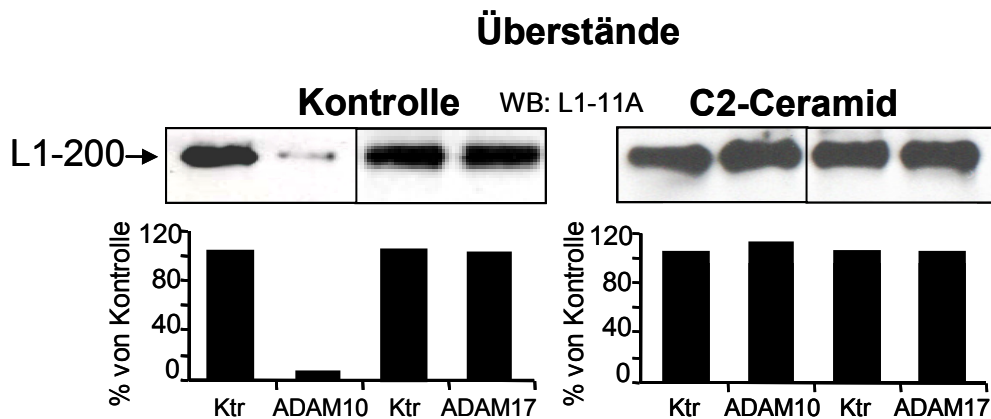
### 5.2.3 Spaltung von L1 durch multiple Metalloproteinasen während der Apoptose

In Vorarbeiten wurde ADAM10 bereits als Metalloprotease identifiziert, die an der konstitutiven Spaltung von L1 beteiligt ist (Mechtersheimer, et al. 2001; Gutwein et al. 2003). Nun sollte untersucht werden, ob ADAM10 auch für die durch Apoptose induzierte Spaltung von L1 verantwortlich ist. Mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden (ASO), wie in Condon et al. (2001) beschrieben, sollte die Expression von ADAM10 oder ADAM17 spezifisch inhibiert werden. Nach Induktion der Apoptose wurden die Mengen an freigesetztem löslichem L1-200 im Zellüberstand bestimmt. Zu diesem Zweck wurden OVMz Zellen mittels Oligofektamin mit jeweils 100mM der ASO gegen ADAM10 oder ADAM17, bzw. einem nicht relevanten Kontroll-Nukleotid transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für weitere 24h mit oder ohne 40 $\mu$ M C2-Ceramid in Serum-freiem Medium behandelt.

Anschließend wurden die Zellen in TX-100 Lysispuffer lysiert. Die Überstände wurden mittels TCA präzipitiert. Lysate und Proteine aus den Überständen wurden im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot analysiert. In den Lysaten wurde der Einfluss der Antisense-Oligonukleotide auf die Regulation der beiden Proteasen mit den Primärantikörpern ecto-ADAM10 und ecto-ADAM17 überprüft. Deutlich zu erkennen war, dass die Expression der Proteasen durch die Transfektion der spezifischen ASO inhibiert wurde, während die jeweiligen Kontroll-Nukleotide keinen Einfluss darauf zeigten. Als Proteinmengen-Kontrolle diente der Nachweis von  $\beta$ -Aktin (**Abb. 21**). Die Untersuchung der Menge an L1-200 im Zellüberstand mit dem Antikörper L1-11A zeigte, dass unter Inhibition der ADAM10 Expression die Spaltung von L1 unter konstitutiven Bedingungen deutlich verringert wurde. Nach der Behandlung der Zellen durch C2-Ceramid war der Gehalt an löslichem L1 im Überstand für alle Transfektionsansätze gleich (**Abb. 22**). Daraus wurde ersichtlich, dass ADAM10, wie erwartet, unter konstitutiven Bedingungen für die intrazelluläre Spaltung von L1 verantwortlich ist, nach Induktion der Apoptose jedoch verschiedene weitere Proteasen beteiligt sind. Die Regulation von ADAM17 hatte, wie auch die Transfektion der Zellen mit dem Kontroll-Nukleotid, in keinem Ansatz einen Einfluss auf die L1 Spaltung.



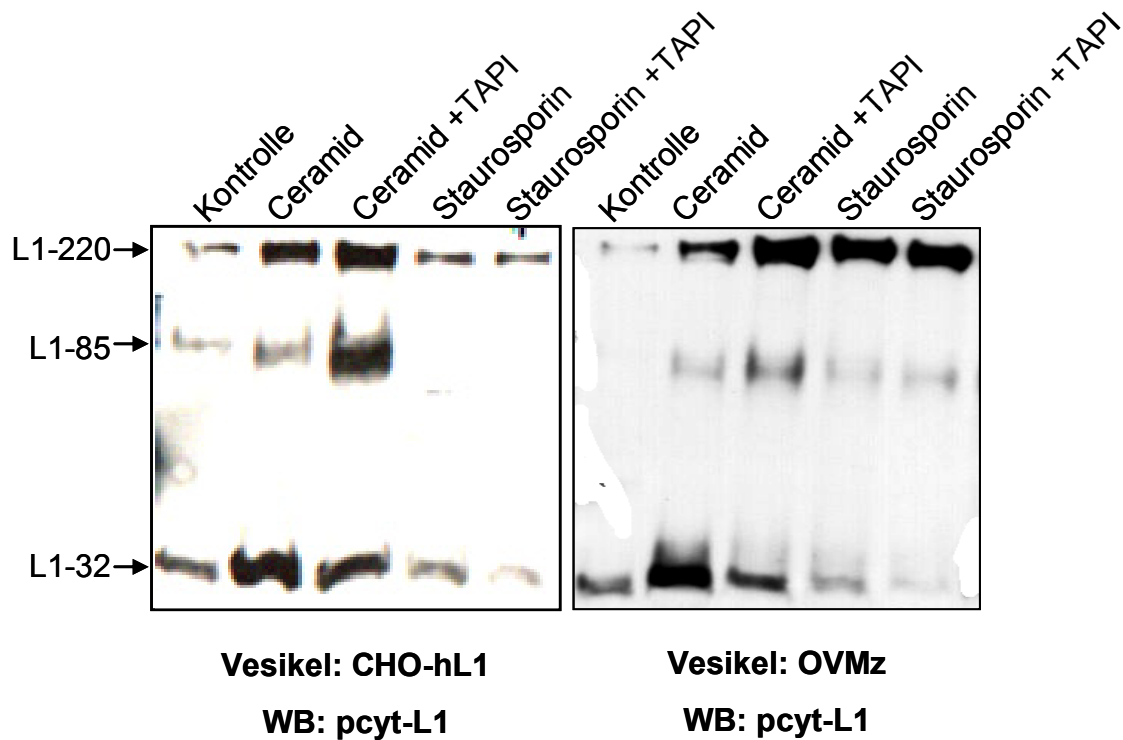
**Abb. 21: Western Blot Analyse der Zelllysate nach ASO-Transfektion.** OVMz Zellen wurden mit 100mM ASO gegen ADAM10 oder ADAM17, sowie einem Kontroll-ASO transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen in TX-100 Lysispuffer lysiert. Die Lysate wurden im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Im anschließenden Western Blot erfolgte der Nachweis von ADAM10 und ADAM17 mit den entsprechenden Antikörpern ecto-ADAM10 bzw. ecto-ADAM17. Als Proteinmengen-Kontrolle diente der Nachweis von  $\beta$ -Aktin.



**Abb. 22: Western Blot Analyse der Zellüberstände nach ASO-Transfektion.** OVMz Zellen wurden mit 100mM ASO gegen ADAM10 oder ADAM17, sowie einem Kontroll-ASO transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für weitere 24h mit 40 $\mu$ M C2-Ceramid in Serum-freiem Medium behandelt oder zur Kontrolle Serum-frei kultiviert. Anschließend wurden die Überstände mit TCA präzipitiert. Im Western Blot erfolgte der Nachweis von löslichem L1-200 mit dem mAk L1-11A. Die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet und sind prozentual im Vergleich zur Kontrolle (als 100% definiert) graphisch dargestellt.

#### 5.2.4 Durch Apoptose induzierte Spaltung von L1 in Vesikeln

Lösliches L1 kann auf verschiedenen Wegen generiert werden. Zum einen durch intrazelluläre Spaltung, Spaltung von der Plasmamembran, aber auch über einen vesikulären Weg (Gutwein et al., 2003). Um zu klären, welcher Mechanismus zur verstärkten Produktion von löslichem L1 während der Apoptose führt, wurden OVMz und CHO-hL1 Zellen mit C2-Ceramid oder mit Staurosporin mit oder ohne Metalloproteinase-Inhibitor TAPI für 48h Serum-frei behandelt oder nur unter Serum-freien Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation aus den Überständen entfernt. Die noch darin enthaltenen Vesikel wurden durch Ultrazentrifugation bei 100000g für 2,5h sedimentiert, dann in reduzierendem Probenpuffer resuspendiert, aufgeköcht und im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis von L1 erfolgte im Western Blot mit dem Antikörper pcyt-L1 gegen die zytoplasmatische Domäne von L1, der sowohl gesamtes L1 als auch dessen transmembrane Spaltprodukte erkennt. Dabei konnte beobachtet werden, dass beide Zelllinien deutlich verstärkte Mengen von vesikulärem L1 nach der Behandlung mit C2-Ceramid und Staurosporin im Vergleich zur Kontrolle abgegeben hatten (**Abb. 23**). Der Metalloproteinase-Inhibitor TAPI konnte die Spaltung von L1 in Vesikeln inhibieren, wie an der Reduktion des L1-32 Spaltproduktes im Western Blot zu erkennen ist. Dabei hatte jedoch TAPI keinen Einfluss auf die Freisetzung von Vesikeln, da die Abnahme von L1-32 gleichzeitig zu einer Zunahme von nicht gespaltenem L1-220 führte.

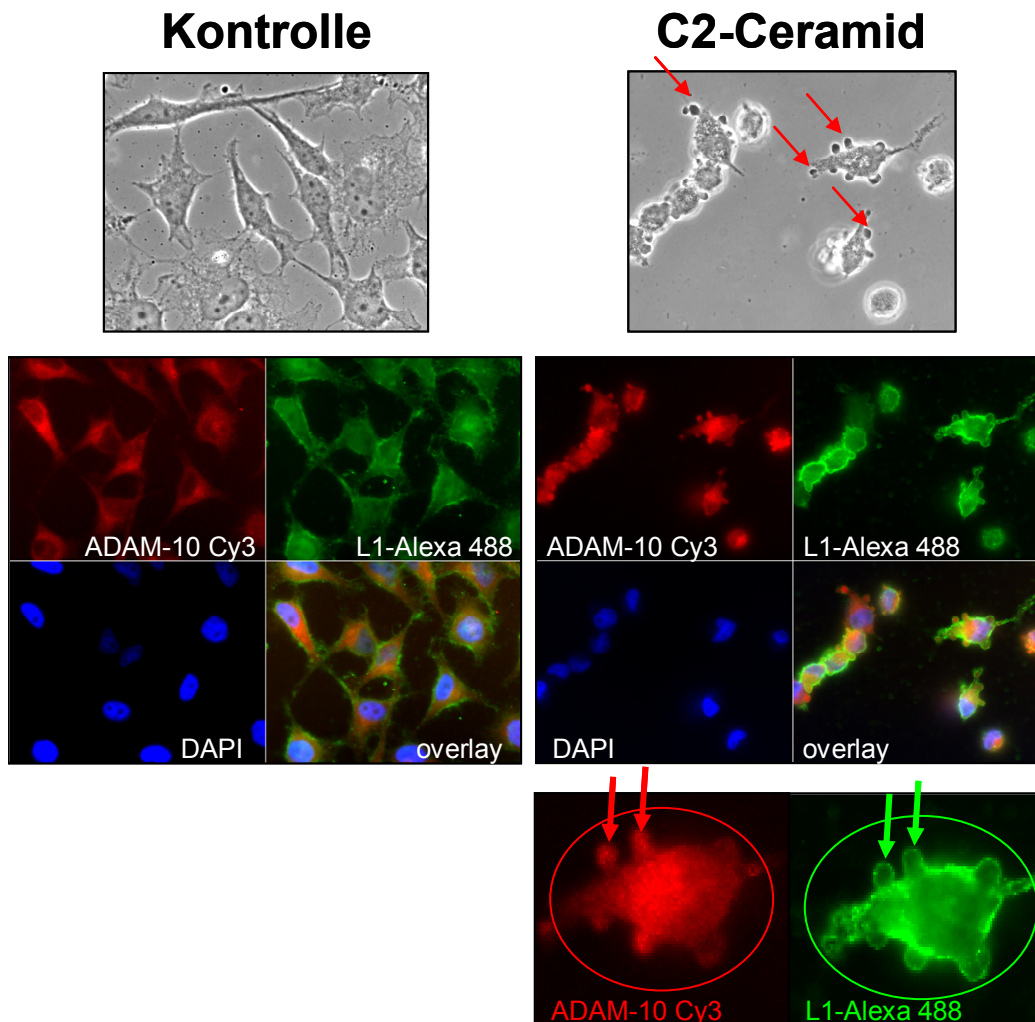


**Abb. 23: Western Blot Analyse isolierter Vesikel.** CHO-hL1 und OVMz Zellen wurden für 18h mit 40 $\mu$ M C2-Ceramid oder 2 $\mu$ M Staurosporin in Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von TAPI (10 $\mu$ M) behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen in Serum-freiem Medium für 18h kultiviert. Die Überstände wurden anschließend durch Zentrifugation bei 300g für 10min und 10000g für 20min von Zellen und deren Trümmern befreit. Durch Ultrazentrifugation bei 100000g wurden dann Vesikel pelletiert, in reduzierendem Probenpuffer resuspendiert und im Western Blot mit dem Antikörper pcyt-L1 analysiert.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung gelang es den Prozess der durch Apoptose-induzierten Vesikelbildung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Dazu wurden HeLa Zellen in 12-Loch Platten auf Glasdeckgläschen ausgesät und für 6h mit C2-Ceramid behandelt, oder zur Kontrolle unter normalen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 20min bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Es folgten zwei Waschschrte zunächst mit 50mM Ammoniumchlorid und dann mit PBS. Die Lyse der Zellen und das Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen erfolgten durch 15-minütige Inkubation der Zellen mit 0,1% Saponin in 5% Ziegenserum/PBS. Die Zellen wurden erst mit den Primärantikörpern gegen ADAM10 (#2547) und L1 (L1-11A) und anschließend mit den grün- bzw. rot- fluoreszierenden Sekundärantikörpern anti-Maus(am)-Alexa488 und anti-Kaninchen(ar)-Cy3 behandelt. Die Analyse der Präparate erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop. Die Kontrollzellen zeigten eine deutliche Lokalisation von L1 an der Plasmamembran, während ADAM10 im Zytoplasma lokalisiert war (**Abb. 24**). Eindeutig zu erkennen war die durch Apoptose hervorgerufene Entstehung der typischen Membranbläschen in C2-Ceramid behandelten Zellen. Bei stärkerer Vergrößerung einer



einzelnen Zelle wurde deutlich, dass diese L1 und ADAM10 enthielten. Das Experiment verdeutlichte, dass Apoptose-induzierte Membranbläschen für die verstärkte Generierung von löslichem L1 verantwortlich sind und in diesen auch die Metalloproteinase ADAM10 nachgewiesen werden kann.



**Abb. 24: Immunfluoreszenz-Färbung behandelter und unbehandelter HeLa-Zellen.** HeLa Zellen wurden auf Glasdeckgläschen in einer 12-Loch Platte ausgesät und für 6h mit oder ohne 40 $\mu$ M C2-Ceramid inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit den Primärantikörpern #2547 und L1-11A gefolgt von den Sekundärantikörpern ar-Cy3 (rot) bzw. am-Alexa488 (grün) durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit 4'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) gefärbt (blau). Anschließend wurden die Präparate in einem Fluoreszenzmikroskop erst im Durchlicht, dann unter Fluoreszenz analysiert. Die Lokalisation von ADAM10 und L1 in Vesikeln ist in der größten Auflösung mit roten bzw. grünen Pfeilen hervorgehoben.

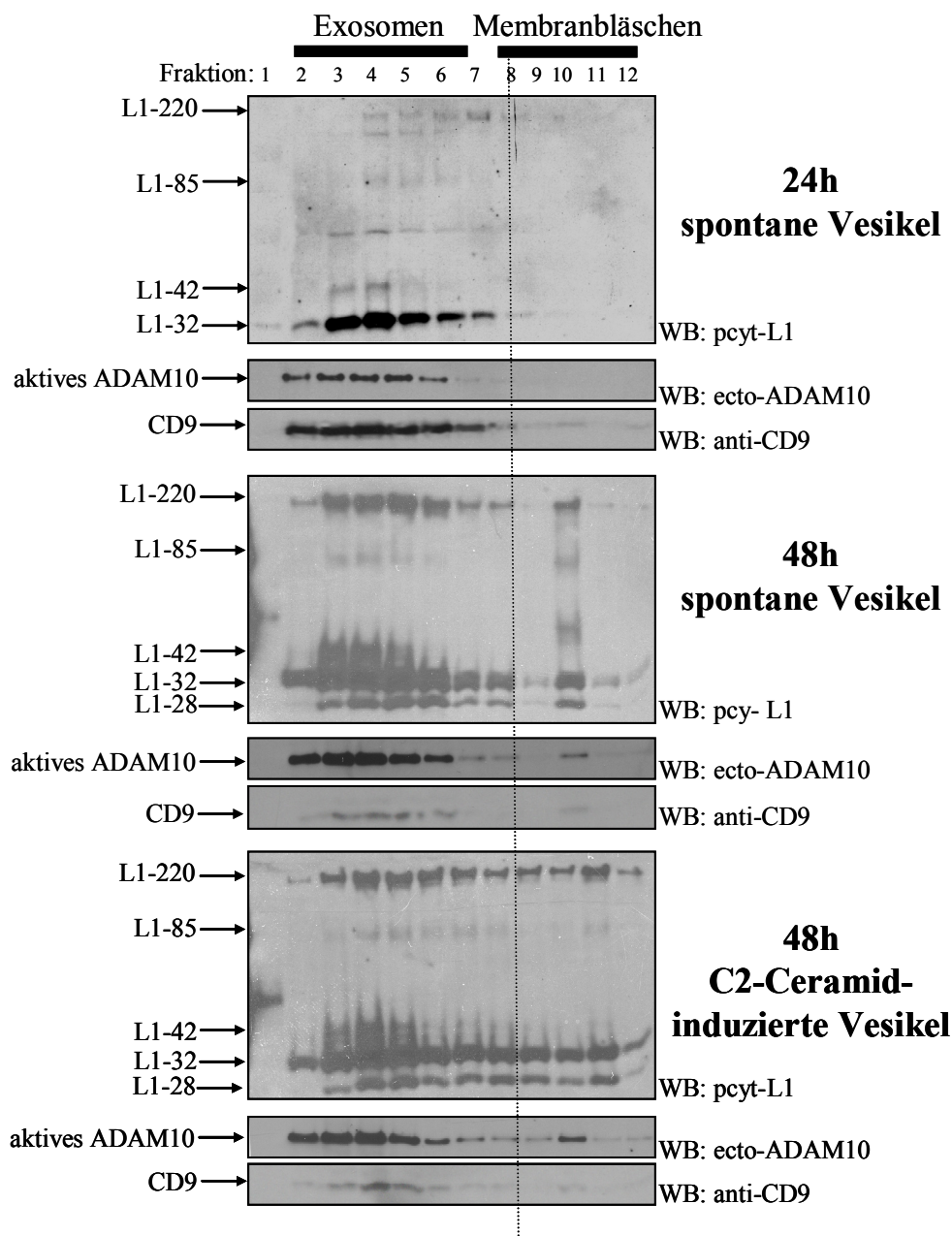
### 5.2.5 Nachweis von L1 in verschiedenen vesikulären Strukturen

Die Entstehung von Membranbläschen während der Apoptose von Zellen ist ein durchaus bekanntes Phänomen. Aber auch unter konstitutiven Bedingungen kann L1 über einen vesikulären Weg, der bisher noch nicht weiter charakterisiert wurde, von Zellen

abgegeben werden. Zur weiteren Unterscheidung verschiedener vesikulärer Strukturen, in denen L1 nachgewiesen werden kann, sollte nun eine Methode entwickelt werden, mit der man diese aufgrund unterschiedlicher Dichte voneinander trennen kann. Hierfür wurde ein Saccharose-Dichte-Gradient verwendet, der bisher dazu genutzt wurde, Zellorganellen aus homogenisierten Zellen anzureichern und voneinander zu trennen (Gutwein et al., 2003; Yan et al., 2001). Es wurde dabei erwartet, dass die verschiedenen vesikulären Strukturen sich ebenfalls in ihrer Dichte unterscheiden und sich im Saccharose-Gradienten ähnlich wie die Zellorganellen verteilen, von denen sie abstammen.

Zu diesem Zweck wurden OVMz Zellen in gleicher Zellzahl ausgesät und entweder für 24h und 48h unter Serum-freien Bedingungen kultiviert oder für 48h mit 40 $\mu$ M C2-Ceramid behandelt. Anschließend wurden die so konditionierten Überstände gesammelt, die Vesikel nach dem Entfernen von Zellen und deren Trümmern durch Ultrazentrifugation bei 100000g für 2,5h sedimentiert, in 0,25M Saccharose resuspendiert und auf einen Saccharose-Gradienten aufgeladen. Dieser wurde ebenfalls für 2,5h bei 100000g ultrazentrifugiert. Anschließend erfolgte das Ernten des Gradienten in zwölf 1ml Fraktionen. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Chloroform-Methanol präzipitiert und die so erhaltenen Proteine in Probenpuffer aufgenommen. Diese wurden dann im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis von L1, ADAM10 und CD9 erfolgte anschließend im Western Blot. Nach 24h konnten L1-haltige Vesikel nur in den Fraktionen eins bis sieben nachgewiesen werden. Dies stimmte auch mit der Verteilung der Metalloproteinase ADAM10 im Gradienten überein: ein weiterer Hinweis darauf, dass sich beide Proteine in gleichen Vesikeln befanden (**Abb. 25**, 24h Wert). Nach 48h nahm die Menge an Vesikeln in den gleichen Fraktionen noch einmal deutlich zu, aber nun wurden auch Proteinbanden in den Fraktionen höherer Dichte (acht bis zwölf) erkennbar (**Abb. 25**, 48h Wert). Die Behandlung mit C2-Ceramid führte zu einer deutlichen Proteinzunahme in den Fraktionen höherer Dichte, nicht aber in den Fraktionen eins bis sieben, in denen sich nur die konstitutiven Vesikel befanden (**Abb. 25**, C2-Ceramid). Induktion der Apoptose führte also zur Ansammlung von Membranbläschen in Fraktionen höherer Dichte. Die Untersuchung der Lokalisation des Tetraspanin CD9, einem bekannten Exosomenmarker, ergab, dass dieser sich ebenfalls im Bereich der konstitutiv abgegebenen Vesikel anreichterte. Somit konnte der Saccharose-Gradient verschiedene Fragestellungen erfolgreich beantworten: zum einen können verschiedene L1 und ADAM10 enthaltende vesikuläre Strukturen im Gradienten voneinander getrennt werden, nämlich konstitutive Vesikel und Membranbläschen und zum anderen konnten die konstitutiven Vesikel in den

Fraktionen zwei bis sieben, durch die Anwesenheit des Tetraspanin CD9, als von Tumorzellen sekretierte Exosomen identifiziert werden.



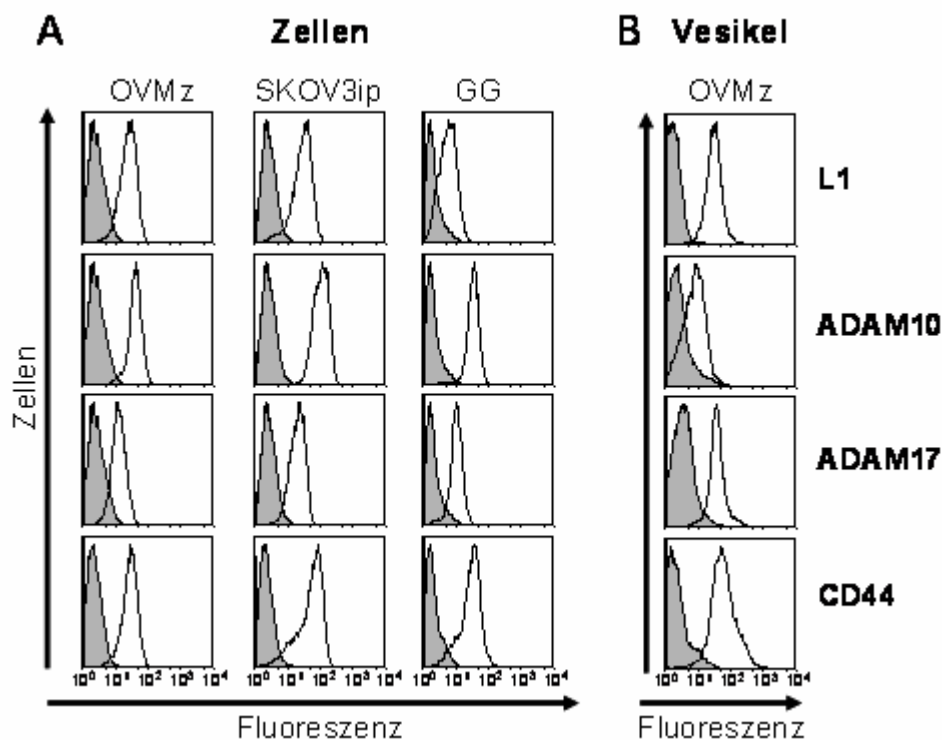
**Abb. 25: Saccharose-Dichte-Gradienten zur Identifikation verschiedener vesikulärer Strukturen.** OVMz Zellen wurden für 24h und 48h in Serum-freiem Medium kultiviert (spontane Vesikel) bzw. für 48h mit 40 $\mu$ M C2-Ceramid behandelt. Die Überstände wurden anschließend durch Zentrifugation bei 300g für 10min und 10000g für 20min von Zellen und Zelltrümmern befreit. Durch Ultrazentrifugation bei 100000g wurden die im Überstand enthaltenen Vesikel sedimentiert, in 0,25M Saccharose resuspendiert und in Saccharose-Dichte-Gradienten durch Zentrifugation bei 100000g für 2,5h aufgetrennt. Nach der Isolation von zwölf 1ml Fraktionen wurden diese mittels Chloroform-Methanol gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und im Western Blot mit den Primärantikörpern pcyt-L1, ecto-ADAM10 und anti-CD9 analysiert.

## 5.3 Exosomen von Ovarialkarzinomzellen

### 5.3.1 Metalloproteinasen und ihre Substrate in Exosomen

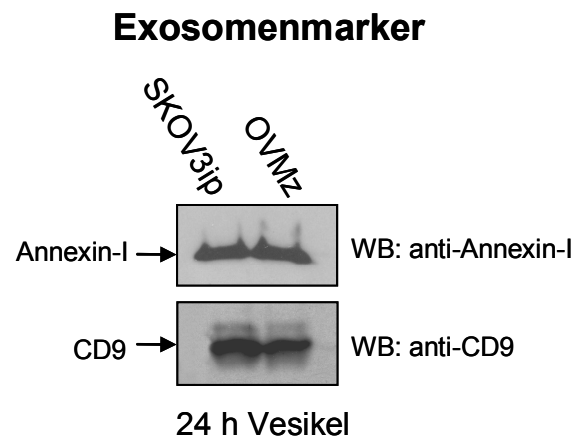
Die im vorherigen Experiment identifizierten Exosomen und ihre Bedeutung für die Spaltung von L1 sollten im Folgenden weiter charakterisiert werden. Neben den bereits bekannten Zelloberflächenmolekülen L1 und ADAM10 wurde nun auch die Expression von CD44 sowie der Metalloproteinase ADAM17 überprüft. CD44 ist einer der wichtigsten Hyaluronsäure-Rezeptoren und auf fast allen Zellen vertreten. Wie das L1 Adhäsionsmolekül spielt auch CD44 eine Rolle bei der Zellmigration und kann in gleicher Weise von verschiedenen Metalloproteinasen gespalten werden. Eine kürzlich erschienene Studie hatte gezeigt, dass CD44 auch durch ADAM10 und ADAM17 gespalten werden kann (Nagano et al., 2004). CD44 wurde daher zu den Untersuchungen als ein weiteres Substrat für Metalloproteinase-vermittelte Spaltung hinzugezogen. Dies sollte klären, ob die nachfolgenden Ergebnisse nicht nur für ein einzelnes Substrat zutreffend sind, sondern einen allgemein für Metalloproteinase-induzierte Spaltung wichtigen Mechanismus beschreiben. Zunächst wurden die auch für weitere Experimente verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien mittels Durchflußzytometrie auf die Expression der oben genannten Oberflächenantigene hin untersucht. Alle vier Moleküle konnten an der Zelloberfläche der untersuchten Zelllinien, mit spezifischen Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne der Proteine, nachgewiesen werden (**Abb. 26A**).

Im darauf folgenden Experiment wurden konstitutive Vesikel durch 24-stündige Inkubation in Serum-freiem Medium von OVMz Zellen generiert. Der Zeitraum von 24h wurde gewählt, da sich ausschließlich Exosomen bilden und keine apoptotischen Membranbläschen (vgl. Abb. 25). Anschließend wurden diese auf Latex-Beads immobilisiert und in einer FACS-Analyse ebenfalls auf die Expression der oben genannten Moleküle hin überprüft. Auch die isolierten Vesikel konnten für die zu untersuchenden Moleküle als positiv identifiziert werden (**Abb. 26B**, Daten von S. Riedle). Damit konnte eine weitere Eigenschaft, die bereits für Exosomen beschrieben wurde, nachgewiesen werden, nämlich die Orientierung der Antigene: die extrazelluläre Domäne nach außen, also erkennbar für die entsprechenden Antikörper, und die zytoplasmatische Domäne im Lumen der Exosomen (Thery et al., 2002; Andre et al., 2002). Außerdem konnten erstmals CD44 und die Metalloproteinase ADAM17 in Exosomen nachgewiesen werden.



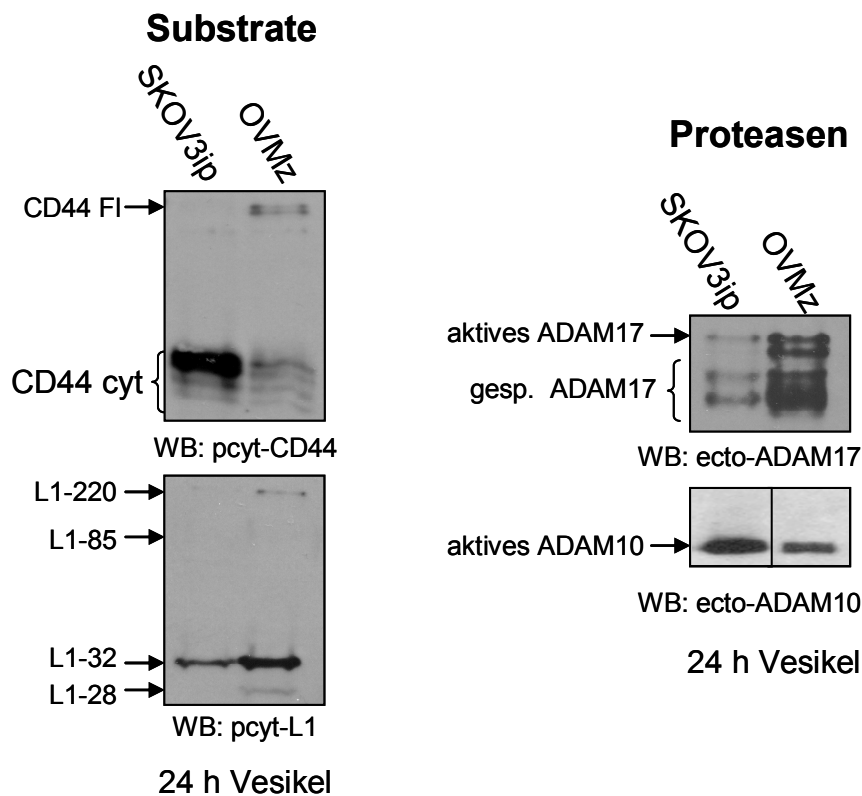
**Abb. 26: FACS-Analyse von Zellen (A) und Vesikeln (B).** (A) Die Zellen wurden mit einem Erstantikörper gegen verschiedene Oberflächenantigene gefärbt (L1-11A, ecto-ADAM10, ecto-ADAM17, ecto-CD44). Die weitere Behandlung mit einem PE-konjugierten Zweitantikörper erlaubt die Analyse mittels der Durchflusszytometrie. (B) Zur Analyse der Vesikel wurden diese aus konditioniertem Medium von OVMz-Zellen isoliert und auf Latex-Beads adsorbiert. Zur Detektion wurde ebenfalls mit Erst- und Zweitantikörpern inkubiert. Die graue Kurve stellt jeweils die Zweitantikörper-Kontrolle dar.

Mit Hilfe der FACS-Analyse konnten zwar die verschiedenen Zelloberflächenmoleküle auf den Exosomen nachgewiesen werden, dies ließ jedoch keine Aussage über das Vorkommen verschieden prozessierter Formen oder von Spaltfragmenten zu. Daher war eine weitere biochemische Analyse der Vesikel mittels SDS-PAGE und anschließender Western Blot Analyse der einzelnen Proteine notwendig. Dazu wurden, wie für die zuvor durchgeführte FACS-Analyse, Exosomen aus dem Zellüberstand von OVMz und SKOV3ip Zellen isoliert, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und im Western Blot analysiert. Zunächst wurde die Anwesenheit von Exosomen-Markern überprüft. Wie aus **Abb. 27** ersichtlich, konnte neben dem CD9 auch Annexin-I, ein weiterer bekannter Exosomen-Marker, in beiden Zelllinien nachgewiesen werden (They et al., 2002).



**Abb. 27: Nachweis von Exosomen-Markern im Western Blot.** Konstitutive Vesikel wurden nach Inkubation von OVMz und SKOV3ip Zellen unter Serum-freien Bedingungen durch Zentrifugation isoliert, in reduzierendem SDS-Probenpuffer resuspendiert und im Western Blot mit Antikörpern gegen exosomale Markerproteine analysiert.

Zur Untersuchung, welche Fragmente von L1 und CD44 sich in den Exosomen befinden, wurden für den Nachweis im Western Blot Antikörper gegen die zytoplasmatischen Domänen der Proteine verwendet (**Abb. 28**). Dabei konnte gezeigt werden, dass in den Exosomen auch CD44 nicht nur als komplettes Molekül nachweisbar ist, sondern, wie für das L1 Molekül bereits beschrieben, auch dessen Spaltprodukte. Eine Voraussetzung dafür, dass die Entstehung der Spaltprodukte in Exosomen stattfinden kann, ist die Anwesenheit aktiver Proteasen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die bereits durch FACS-Analyse identifizierten Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 als aktive Formen in den Exosomen nachweisbar sind (**Abb. 28**). Während ADAM10 ausschließlich als aktive Form vorhanden war, konnten mehrere ADAM17 spezifische Proteinbanden detektiert werden. Diese wurden als Spaltfragmente oder Degradationsprodukte der Metalloprotease identifiziert. Der Prozess der Proteolyse von ADAM17 stimmt mit Beobachtungen von Blobel et al. (2000) überein, die zeigen, dass sich aktives ADAM17 durch Autoproteolyse selbst abbaut und somit zur Entstehung von verschiedenen Spaltfragmenten führt. Tatsächlich konnte in unserer Arbeitsgruppe mittlerweile gezeigt werden, dass diesen Degradationsprodukten ein Teil der zytoplasmatischen Domäne fehlt. Die extrazelluläre Domäne ist dabei aber immer noch proteolytisch aktiv (S.Keller, Diplomarbeit).



**Abb. 28: Western Blot Analyse von Exosomen zum Nachweis der Substratmoleküle CD44 und L1, sowie der Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17.** Nach Inkubation von OVMz Zellen unter Serum-freien Bedingungen für 24h wurden die Exosomen durch Zentrifugation bei 100000g für 2h aus dem Zellüberstand sedimentiert, in reduzierendem Probenpuffer resuspendiert und im Western Blot mit den Primärantikörpern pcyt-CD44, pcyt-L1, ecto-ADAM17 und ecto-ADAM10 analysiert.

### 5.3.2 Der Einfluss von Kalzium auf Spaltung und Exosomen-Freisetzung

Die Behandlung der leukämischen Zelllinie K562 mit Ionomycin-Kalzium-Salz kann zu einer verstärkten Freisetzung von Exosomen führen (Savina et al., 2003). Ein weiterer Prozess, der durch Kalzium-Einstrom in Zellen hervorgerufen wird, ist die Aktivierung der ADAM10-vermittelten Spaltung verschiedener Substratmoleküle, wie CD44 oder Betacellulin (Nagano et al., 2004; Sanderson et al., 2005).

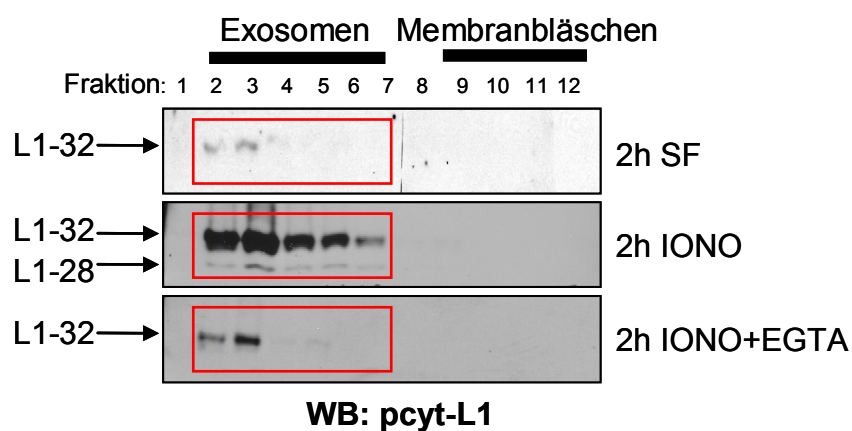
Zur Untersuchung, welche Auswirkungen die Behandlung der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip mit Ionomycin hat, wurde diese für 2h mit 1 $\mu$ M der Substanz in Serum-freiem Medium inkubiert. Zur anschließenden Quantifizierung der abgegebenen Vesikelmenge von behandelten und unbehandelten Zellen wurde diese aus den Überständen isoliert und in einer Bradford-Proteinbestimmung eingesetzt. Die Behandlung mit Ionomycin führte dabei zu einer Verdreifachung der ermittelten Gesamtproteinmenge im Vergleich zur konstitutiven Freisetzung von Exosomen im gleichen Zeitraum (**Abb. 29**).





### 5.3.3 Analyse Ionomycin- induzierter Vesikel im Saccharose-Gradienten

Zur Untersuchung der Frage, ob es sich bei den vesikulären Strukturen, die im vorausgegangenen Experiment identifiziert wurden, ebenfalls um Exosomen handelt, wurden SKOV3ip Zellen mit oder ohne Ionomycin in An- und Abwesenheit von EGTA für 2h in Serum-freiem Medium kultiviert. Der Kalzium-Chelator EGTA sollte die durch das Ionomycin eingebrachten Kalzium-Ionen binden und so deren Aufnahme in die Zelle verhindern. Dies diente als zusätzlicher Nachweis dafür, dass die gezeigten Effekte tatsächlich auf die Wirkung des Kalziums zurückzuführen waren. Die Vesikel in den konditionierten Überständen wurden ultrazentrifugiert und auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen. Durch die Behandlung mit Ionomycin konnte eine deutliche Zunahme der Vesikelmenge in den bereits als solche identifizierten Exosomen-Fractionen (2-7) des Gradienten nachgewiesen werden (**Abb. 31**). Ionomycin induzierte während des untersuchten Zeitraumes keine Apoptose, was, wie bereits beschrieben, ebenfalls zu einer Zunahme der Vesikelmenge führt. Dies wurde daraus ersichtlich, dass keine L1 enthaltenden Vesikel in den Membranbläschen-Fractionen (9-12) detektiert werden konnten. Das Abfangen der zugeführten Kalzium-Ionen durch EGTA blockierte effizient die induzierte Freisetzung von Exosomen, womit der Nachweis für die Kalziumabhängigkeit des aufgedeckten Mechanismus erbracht wurde. Der plötzliche Einstrom von Kalzium in das Zellinnere kann also einen Einfluss auf die Regulation der Exosomen-Freisetzung ausüben. Im Folgenden sollte nun der Aspekt der durch Kalzium-induzierten Spaltung untersucht werden. Das vermehrte Auftreten von L1-32 war noch kein Beweis für eine Induktion der Spaltung in Exosomen, da auch im Falle der konstitutiven Exosomen stets sowohl Spaltfragmente als auch ungespaltene Moleküle nachweisbar sind.

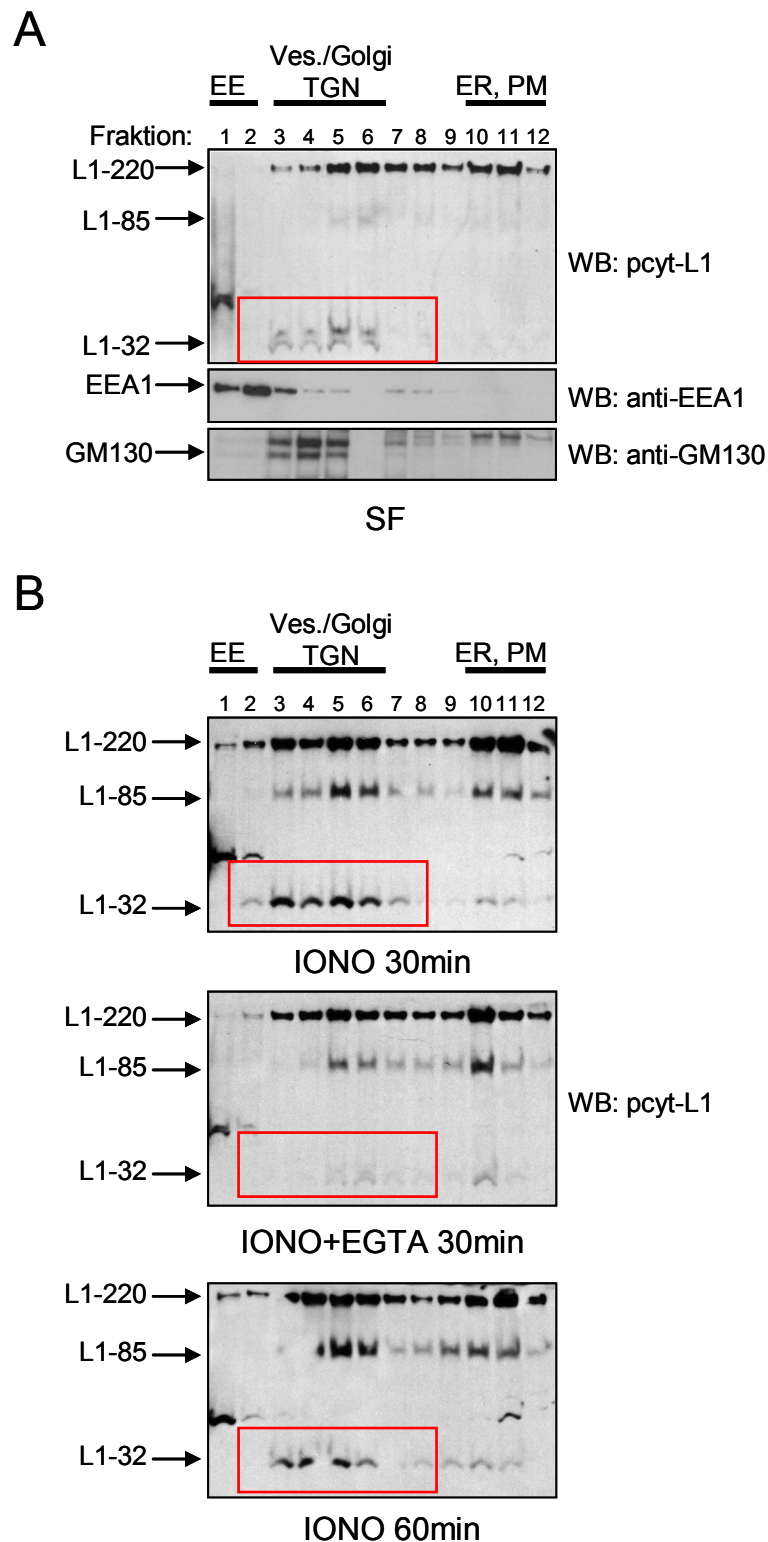


**Abb. 31: Western Blot Analyse der Saccharose-Dichte-Gradienten konstitutiver und induzierter Vesikel.** Die Behandlung der Zellen mit Ionomycin erfolgte für 2h in An- und Abwesenheit von EGTA. Zur Kontrolle wurden Zellen für 2h Serum-frei inkubiert. Die Vesikel wurden isoliert und im Saccharose-Gradienten wie beschrieben aufgetrennt. Die Fraktionen wurden im Western Blot mit dem Antikörper pcyt-L1 analysiert. Die relevanten Bereiche mit der Anreicherung der L1-Spaltfragmente sind in rot hervorgehoben.

### 5.3.4 Aktivierung der L1-Spaltung durch Ionomycin

Wie bereits erwähnt beobachteten Nagano et al. (2004) eine rasche Aktivierung von Metalloproteinasen durch die Behandlung von Zellen mit Ionomycin und dadurch eine verstärkte intrazelluläre Spaltung verschiedener Substratmoleküle.

Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob dies auch auf SKOV3ip Zellen zutrifft, wurden diese für 30 und 60min mit Ionomycin behandelt, für 60min unter Serum-freien Bedingungen kultiviert oder für 60min mit Ionomycin zusammen mit dem Kalzium-Chelator EGTA inkubiert. Die Zellen wurden nach den jeweiligen Inkubationszeiten in einem Homogenator in 0,25M Saccharose-Lösung homogenisiert und auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen. Dieser ermöglicht, wie bereits zuvor beschrieben, die Auftrennung verschiedener subzellulärer Membranen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte. Die Aktivierung der Spaltung durch Ionomycin wurde durch die Anwesenheit des Spaltproduktes L1-32 bestimmt (**Abb. 32**). Eine 30-minütige Behandlung der Zellen mit Ionomycin führte zu einer deutlich erkennbaren Zunahme von L1-32 in den Fraktionen 2-6. Diese stimmten erstaunlicherweise genau mit den Fraktionen der konstitutiven bzw. mit Ionomycin induzierten Exosomen-Fraktionen im Vesikel-Gradienten überein (vgl. Abb. 31). Für den Zellhomogenat-Gradienten bedeutete dies eine Induktion der Spaltung in Membranstrukturen der Endosomen, bzw. des Golgi-Apparates. Durch den Kalzium-Chelator EGTA konnte auch dieser Effekt deutlich blockiert werden und kaum L1-32 Spaltprodukt nachgewiesen werden, wie auch in den unbehandelten Kontroll-Zellen. Ein marginaler Effekt ist auch in den Fraktionen 10-13 zu erkennen. Diese beinhalten die Plasmamembranen und die Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Eine längere Inkubationsphase mit Ionomycin (60min) führte zu keiner weiteren Anreicherung des Spaltproduktes, sondern eine deutliche Abnahme, verglichen mit der 30-minütigen Inkubationszeit. Offensichtlich steht die Abnahme des L1-32 im Homogenat in direktem Zusammenhang mit der bereits beschriebenen, durch Ionomycin induzierten, Freisetzung von Exosomen. Zusammenfassend lässt sich der Effekt von Ionomycin folgendermaßen beschreiben: durch den plötzlichen Kalzium-Einstrom in die Zelle kommt es zur verstärkten Akkumulation von Exosomen, die ihren Ursprung in Membranstrukturen der Endosomen bzw. des Golgi-Apparates haben. Innerhalb der MVBs (*multivesicular bodies*) treffen Metalloproteinasen und Substrat aufeinander und die Spaltung wird initialisiert. Durch die Fusion der MVBs mit der Plasmamembran werden dann die Exosomen freigesetzt



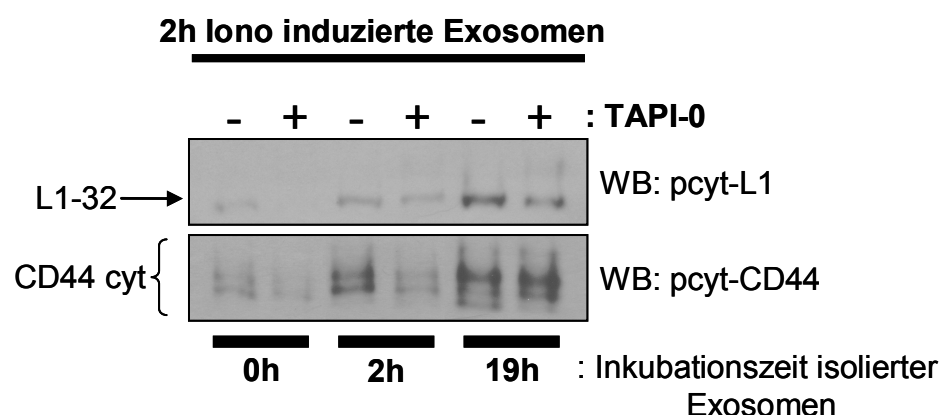
**Abb. 32: Effekte von Ionomycin auf L1-Spaltung in SKOV3ip-Zellen.** (A) Homogenat unbehandelter Zellen. (B) Homogenate nach Behandlung. Die Zellen wurden für verschiedene Zeiträume mit 1 $\mu$ M Ionomycin in An- und Abwesenheit von EGTA behandelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und nach Homogenisierung in 0,25M Saccharose in einem Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Die separierten Fraktionen wurden mit dem Antikörper pcyt-L1 im Western Blot analysiert. Der Gradient der unbehandelten Zellen wurde zusätzlich mit Antikörpern gegen den Endosomen-Marker EEA1 und den Golgi-Marker GM130 geprobt. EE= Frühe Endosomen, Ves.= Vesikel, Golgi= Golgi-Apparat, TGN= Trans-Golgi-Netzwerk, ER= endoplasmatisches Retikulum, PM= Plasmamembran

### 5.3.5 Nachweis der Spaltung in Exosomen

Im vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass die Spaltung bereits intrazellulär beginnt. Es sollte nun in einem zellfreien System überprüft werden, ob die Spaltung auch nach Freisetzung der Exosomen möglich ist.

Der Nachweis einer zellunabhängigen Aktivität von Exosomen erfolgte durch eine zellfreie Vesikelinkubation. Dazu wurden Zellen in An- oder Abwesenheit von TAPI-0 für 2h mit Ionomycin behandelt. Anschließend wurden die Überstände von Zellen und Zelltrümmern befreit und für verschiedene Zeiträume bei 37°C inkubiert. Die noch darin enthaltenen Exosomen wurden nach den entsprechenden Inkubationszeiten durch Ultrazentrifugation sedimentiert und direkt in Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit den Antikörpern pcyt-L1 und pcyt-CD44 analysiert. Als Nachweis der Spaltung dienten die Mengen an L1-32 und CD44 Spaltprodukten.

Dabei war eine deutliche, zeitabhängige Zunahme des L1-32 und der verschiedenen CD44 Spaltfragmente zu erkennen (**Abb. 33**). Innerhalb eines gewissen Zeitraums konnte die Spaltung beider Moleküle durch den Inhibitor TAPI blockiert werden; ein Hinweis darauf, dass Metalloproteinasen für die Spaltung in Exosomen tatsächlich verantwortlich sind. Mit zunehmender Dauer wurde die Wirkung des Inhibitors schwächer und die Menge der Spaltprodukte glichen sich an. Dies liegt vermutlich an der Instabilität des Inhibitors, dessen Wirkungsgrad zeitabhängig bei 37°C abnimmt. Die Exosomen bilden somit eine intakte subzelluläre Struktur zur Produktion löslicher Moleküle.



**Abb. 33: Western Blot Analyse der zellfreien Vesikelinkubation.** Die Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von TAPI-0 (10µM) für 2h mit 1µM Ionomycin in Serum-freiem Medium behandelt. Anschließend wurden die zellfreien Überstände für verschiedene Zeiträume bei 37°C inkubiert. Nach Isolation der Exosomen wurde deren Spaltaktivität im Western Blot mit den Antikörpern pcyt-L1 und pcyt-CD44 analysiert.

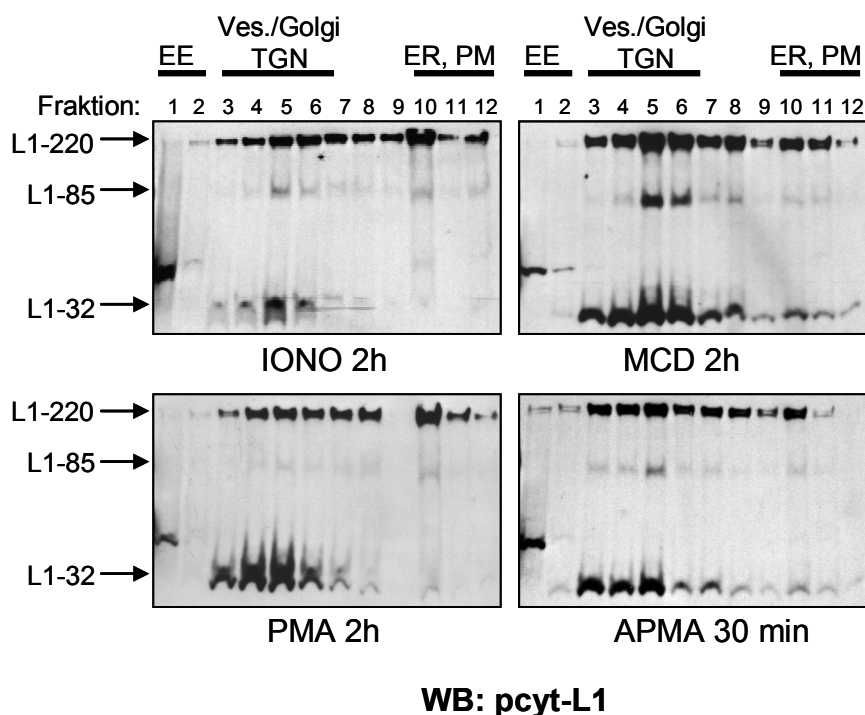
### 5.3.6 Mechanismus weiterer Spaltung-induzierender Substanzen

Aus der Literatur sind weitere Substanzen bekannt, die die Spaltung von Transmembranmolekülen induzieren. Darunter zählt man Cholesterol-extrahierende Reagenzien wie MCD (Methyl- $\beta$ -cyclodextrin), Phorbolester (z.B. PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate), sowie den Metalloproteinaseaktivator APMA (4-Aminophenylmercuric-acetate) (Kojro et al., 2001; Gutwein et al., 2002; Sanderson et al., 2005).

Für PMA konnte bereits gezeigt werden, dass es die Spaltung von L1 an der Plasmamembran von CHO Zellen aktivieren kann (Gutwein et al., 2002). Ebenfalls war bekannt, dass MCD zu einer erhöhten Freisetzung von L1-haltigen Vesikeln führt (Gutwein et al., 2002). Nun sollte überprüft werden, welchen Mechanismus die jeweilige Substanz in Ovarialkarzinomzellen aktiviert und ob dieser mit der durch Ionomycin induzierten Substratspaltung in Exosomen vergleichbar ist.

Dazu wurden wie, im vorherigen Experiment, SKOV3ip Zellen für 2h erneut mit Ionomycin oder mit PMA bzw. MCD behandelt. In einem weiteren Ansatz wurden Zellen für 30min mit APMA stimuliert. Alle Stimuli wurden in Serum-freiem Medium angesetzt. Nach der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen homogenisiert und in einem Saccharose-Gradienten untersucht. Die Initialisierung der Spaltung wurde anhand des L1-32 im Western Blot analysiert (**Abb. 34**).

Dabei konnte zunächst einmal beobachtet werden, dass alle verwendeten Reagenzien zu einer verstärkten L1 Spaltung im Vergleich zur Kontrolle führten (siehe Abb. 32A). Bei allen Substanzen fand die Induktion der Spaltung in identischen Membranstrukturen statt.

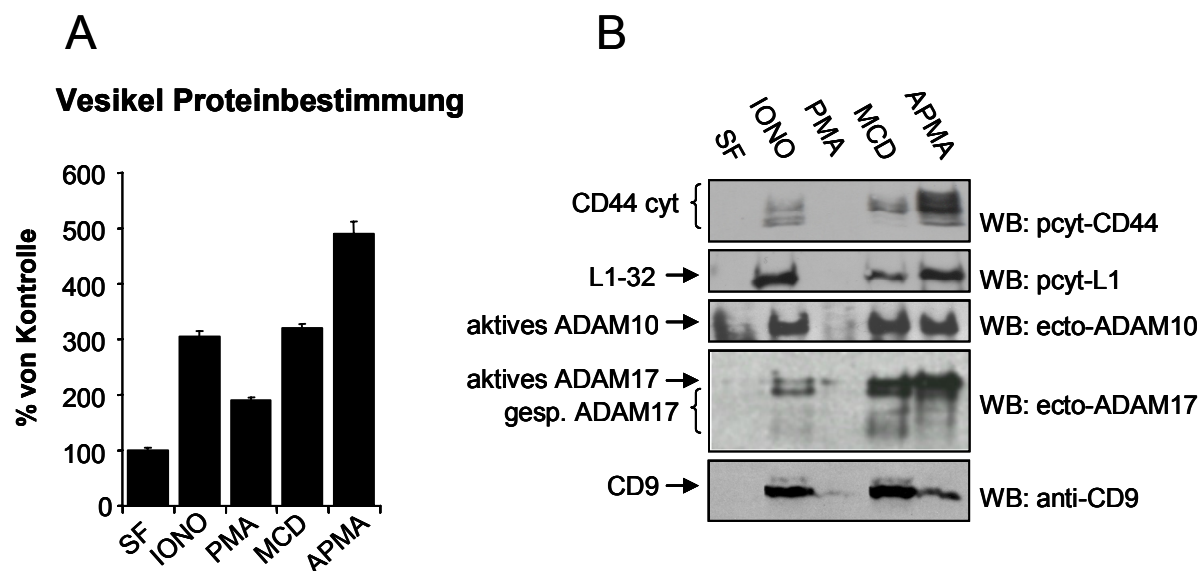


**Abb. 34: Effekte verschiedener Stimuli auf L1-Spaltung in SKOV3ip-Zellen.** SKOV3 Zellen wurden für 2h mit Ionomycin (1 $\mu$ M), PMA (50ng/ml), MCD (10mM) oder für 30min mit APMA (50 $\mu$ M) in Serum-freiem Medium kultiviert. Zellen wurden anschließend in 0,25M Saccharose homogenisiert und auf einen Saccharose-Dichte-Gradienten aufgetragen. Die Verteilung von L1 wurde mit dem Antikörper pcyt-L1 im Western Blot analysiert.

Die Induktion der Spaltung durch die verschiedenen Substanzen im gleichen intrazellulären Kompartiment war der erste Hinweis darauf, dass es sich hierbei um den jeweils gleichen Mechanismus handelt. Um dies jedoch eindeutig zu zeigen, sollte nun die Menge an freigesetzten Vesikeln während der Inkubationszeit überprüft werden. Dazu wurden die Vesikel aus den Überständen der behandelten Zellen isoliert und in einer Bradford-Proteinbestimmung eingesetzt (**Abb. 35A**).

Dabei war festzustellen, dass alle Substanzen die Freisetzung von Vesikeln deutlich verstärkten, PMA jedoch den schwächsten Effekt ausübte. Anschließend wurden im Western Blot einzelne Proteine analysiert (**Abb. 35B**). Vergleicht man die nachgewiesene Vesikelmenge aus der Bradford-Proteinbestimmung mit den jeweiligen Bandenintensitäten der Proteine im Western Blot, so ist eine eindeutige Korrelation zwischen beiden Methoden erkennbar. Es wurde deutlich, dass Ionomycin, MCD und APMA zur verstärkten Freisetzung von Vesikeln führten, die CD44- und L1- Spaltfragmente enthielten, sowie in gleichem Maße die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17. Tatsächlich konnte auch der Exosomen-Marker CD9 in den induzierten Vesikeln nachgewiesen werden. Dies bestätigt, dass neben Ionomycin auch die Substanzen MCD und APMA die Spaltung von L1 und CD44 in Exosomen induzieren. PMA scheint sich dabei als Sonderfall zu etablieren, indem es zwar

intrazellulär die Spaltung in den gleichen Membranstrukturen aktiviert, diese allerdings nicht gleichzeitig freigesetzt werden. Damit konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der aktivierten Spaltung durch verschiedenste Substanzen und der gleichzeitigen Generierung von Exosomen nachgewiesen werden.



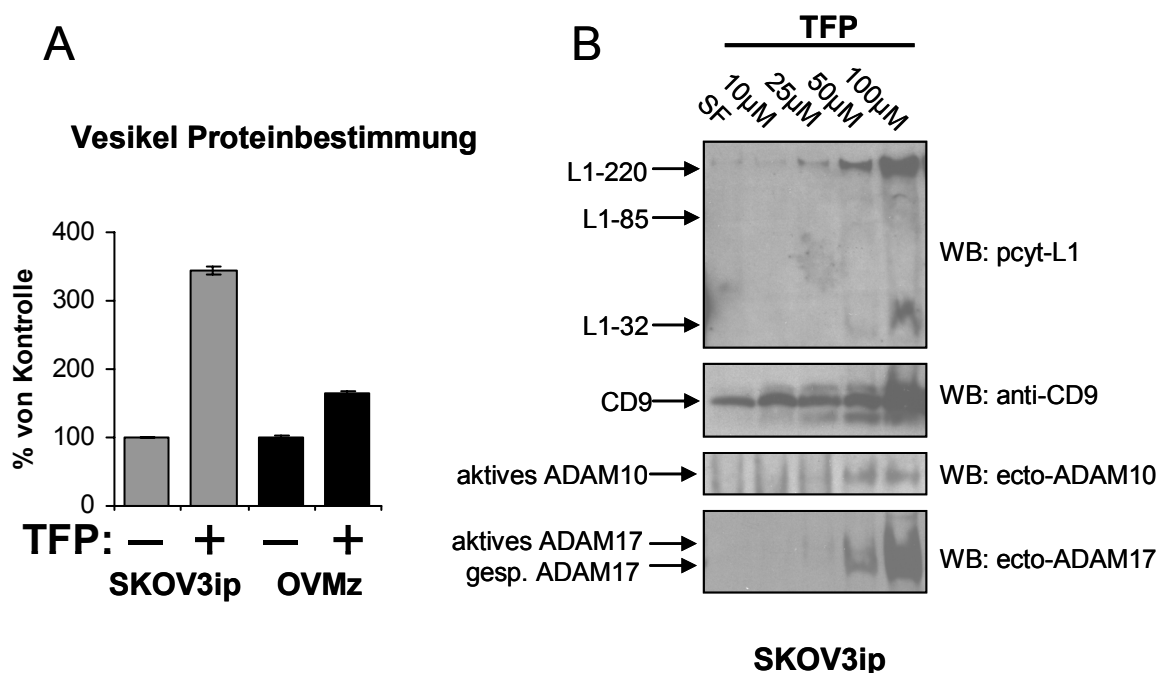
**Abb. 35: Effekt verschiedener Stimuli auf die Vesikel-Freisetzung von SKOV3ip Zellen.** SKOV3ip Zellen wurden für 2h mit Ionomycin (1 $\mu$ M), PMA (50ng/ml), MCD (10mM) oder für 30min mit APMA (50 $\mu$ M) in Serum-freiem Medium inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen für 2h in Serum-freiem Medium kultiviert. Die Überstände wurden separiert und von Zellen und Zelltrümmern durch Zentrifugation befreit. Anschließend wurden die Vesikel aus dem Überstand sedimentiert. **(A)** Die Menge abgegebener Vesikel wurde mit einer Bradford-Proteinbestimmung ermittelt. **(B)** Im Western Blot wurde die Menge von vesikulärem ADAM10 (ecto-ADAM10), ADAM17 (ecto-ADAM17), CD9 (anti-CD9), CD44 (pcyt-CD44) und L1 (pcyt-L1) analysiert.

### 5.3.7 Die Wirkung des Calmodulin-Inhibitors TFP auf die Vesikelbildung

Nagano et al. (2004) konnten zeigen, dass der Kalzium-Einstrom in die Zelle zu einer Aktivierung der Spaltung von CD44 durch ADAM10 führt. Durch das Kalzium wird die Interaktion von ADAM10 mit Calmodulin verändert, was zu einer Aktivierung der Metalloproteinase führt.

Da die Aktivierung der Spaltung durch verschiedene Substanzen mit einer verstärkten Generierung von Vesikeln einhergeht, wurde nun die Wirkung eines Calmodulin-Inhibitors auf die Abgabe von Vesikeln untersucht. Hierfür wurden SKOV3ip und OVMz Zellen mit dem Calmodulin-Inhibitor Trifluoperazine-Dimaleate (TFP) behandelt. Die Menge an abgegebenen Vesikeln wurde mittels Bradford-Proteinbestimmung ermittelt (**Abb. 36A**). Dabei war zu beobachten, dass bei einer Konzentration von 100 $\mu$ M TFP die Vesikelbildung zunahm: bei SKOV3ip Zellen um das 3,5fache, bei OVMz um das 1,7fache. Da der Inhibitor gleichzeitig eine stark toxische Wirkung auf Zellen ausübt, wurde dieser im nächsten

Experiment titriert. Die Vesikel wurden aus den Zellüberständen isoliert und im Western Blot charakterisiert (**Abb. 36B**). Dabei war zu erkennen, dass bereits bei einer Konzentration von 25 $\mu$ M deutlich mehr L1, ADAM10 und ADAM17 in Vesikeln nachweisbar waren. Besonders deutlich wirkte sich die Titration auf den Exosomen-Marker CD9 aus, der eine lineare Zunahme an Exosomen mit steigender TFP Konzentration aufwies.



**Abb. 36: Analyse der TFP-vermittelten Vesikulierung.** (A) SKOV3ip und OVMz Zellen wurden mit oder ohne 100 $\mu$ M TFP für 30min in Serum-freiem Medium kultiviert. Vesikel wurden aus den Überständen isoliert und in einer Bradford-Proteinbestimmung analysiert. (B) SKOV3ip Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von TFP für 30min in Serum-freiem Medium behandelt. Die Charakterisierung der Vesikel erfolgte im Western Blot mit Antikörper gegen L1 (pcyt-L1), den Exosomen-Marker CD9 (anti-CD9), sowie gegen die Proteasen ADAM10 (ecto-ADAM10) und ADAM17 (ecto-ADAM17).

### 5.3.8 Aktivität der Metalloproteinasen in Exosomen

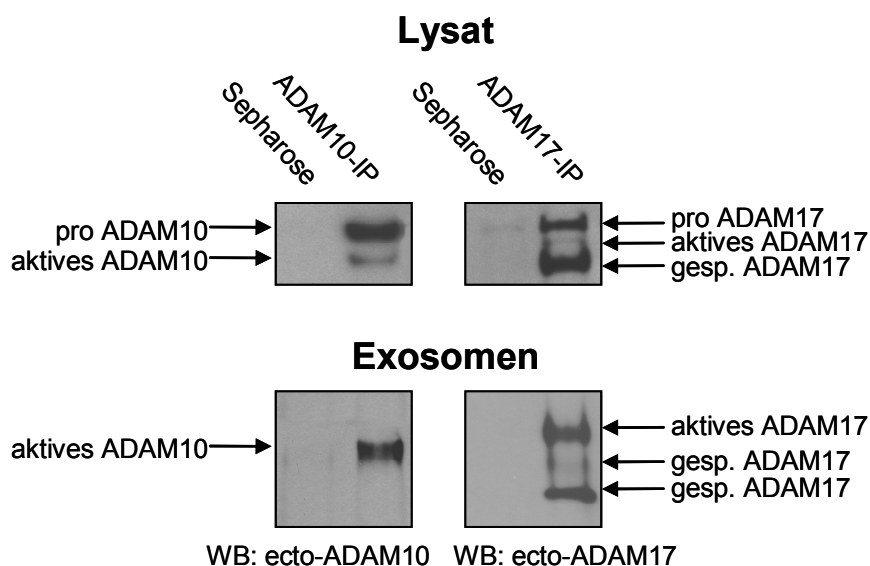
Die bisherigen Untersuchungen zeigten zum einen, dass die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 in ihrer aktiven Form in den Exosomen nachweisbar sind und zum anderen, dass die Spaltung der Substrate L1 und CD44 in Exosomen stattfindet. Eine direkte Beteiligung der beiden Proteasen an dieser Spaltung in Exosomen konnte allerdings noch nicht gezeigt werden. Daher sollte mit Hilfe eines neu etablierten Spaltungsassays die Aktivität der Proteasen in Exosomen nachgewiesen werden.

Sowohl für ADAM10 als auch für ADAM17 ist bekannt, dass sie eine bestimmte Sequenz des TNF $\alpha$  Proteins spalten können. Zum Nachweis ihrer Aktivität wurde daher ein synthetisches Peptid, welches die Spaltsequenz des TNF $\alpha$  Proteins enthält, eingesetzt um die Aktivität der



Proteasen nachzuweisen. Die Spaltung des synthetischen Peptides führt zur Freisetzung von Fluoreszenz, welche anschließend im Photometer bestimmt werden kann.

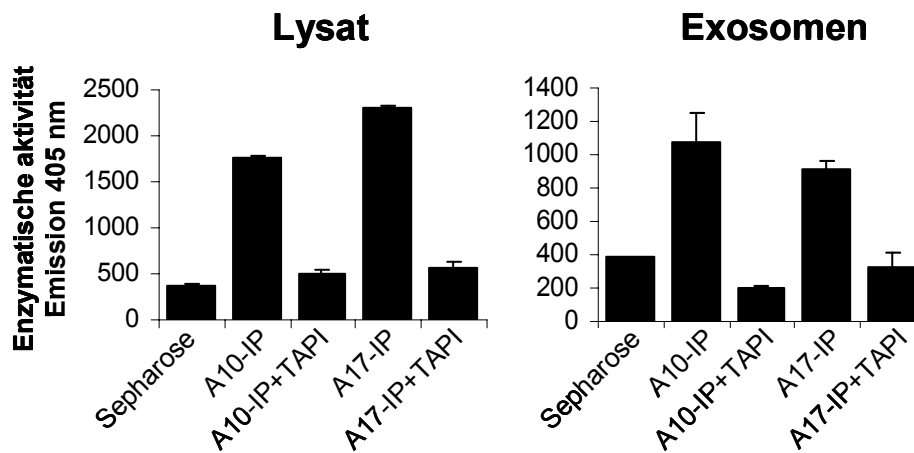
Beide Proteasen wurden mit ADAM10 bzw. ADAM17 spezifischen Antikörpern aus BOG-(N-Octyl- $\beta$ ,D-glucopyranoside) lysierten Zellen bzw. Exosomen präzipitiert. Die Qualität der Präzipitate wurde im Western Blot überprüft. Sowohl für die Zelllysate als auch für Exosomen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Proteasen spezifisch isoliert werden konnten (**Abb. 37**). In der Sepharose-Kontrolle ohne Antikörper konnte dagegen keine der beiden Proteasen detektiert werden. Wie schon in vorherigen Experimenten beobachtet, konnte auch hier im Gegensatz zu den Lysaten, in denen sowohl die aktive als auch die Pro-Form präzipitiert werden konnte, nur die aktive Form der Proteasen in den Exosomen nachgewiesen werden. Im Fall von ADAM17 waren zusätzlich einige Degradationsprodukte detektierbar.



**Abb. 37: Immunpräzipitation von ADAM10 und ADAM17 aus Zelllysaten und Exosomen.** Zellen und isolierte Exosomen wurden in BOG-Lysispuffer lysiert. Die Proteasen ADAM10 und ADAM17 wurden mit den Antikörpern ecto-ADAM10 bzw. ecto-ADAM17 präzipitiert. Die Spezifität der Immunpräzipitate wurde im Western Blot mit den gleichen Antikörpern analysiert. Zur Kontrolle wurde nur mit Protein-G-Sepharose (Sepharose) präzipitiert.

Anschließend wurden die immunaffinitätsgereinigten Proteasen im TNF $\alpha$ - Spaltassay eingesetzt und die Fähigkeit zur Spaltung des synthetischen Peptids ermittelt (**Abb. 38**). Dabei konnte für die Präzipitate aus Lysaten und Exosomen spezifische Aktivität für ADAM10 und ADAM17 nachgewiesen werden. Die Zugabe des Metalloproteinaseinhibitors TAPI konnte die Spaltaktivität blockieren. Die Sepharose-Kontrolle zeigte keinerlei Aktivität. Auf diese Weise konnte eindeutig gezeigt werden, dass beide Metalloproteinasen ADAM10

und ADAM17 sowohl in den Exosomen als auch in Zelllysaten aktiv sind und damit möglicherweise an der Spaltung von L1 und CD44 in Exosomen beteiligt sind.



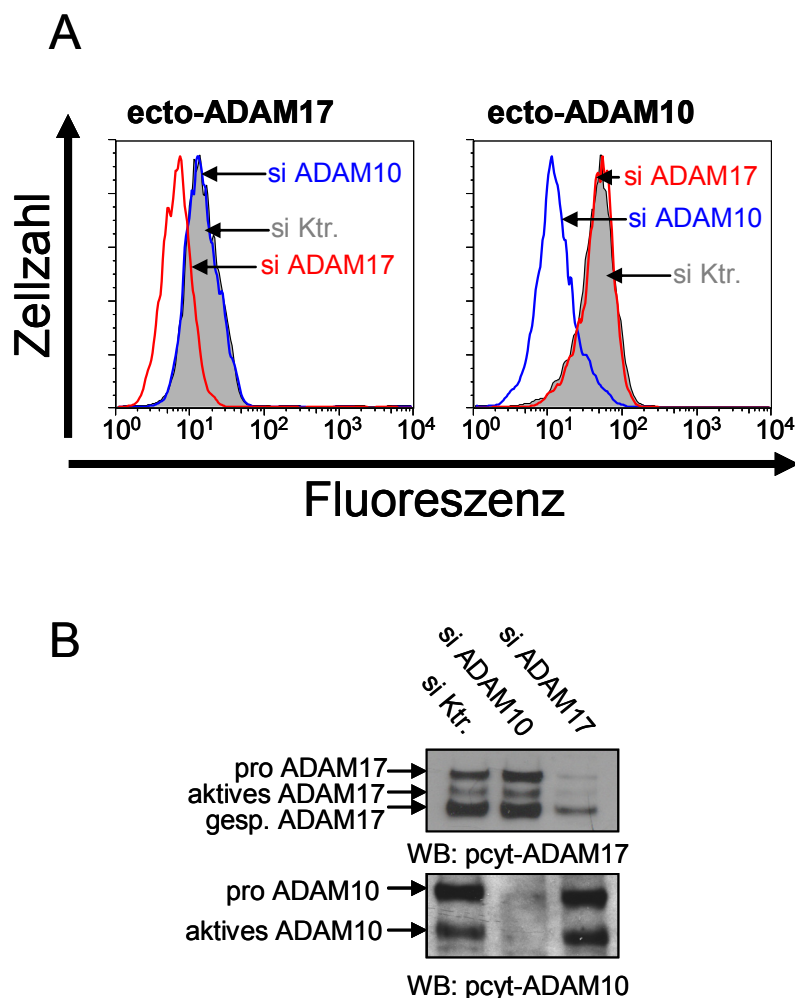
**Abb. 38: Nachweis der enzymatischen Aktivität der Proteasen nach Immunpräzipitation.** ADAM10 (A10) bzw. ADAM17 (A17) Immunpräzipitate aus Zelllysaten und Exosomen wurden in An- oder Abwesenheit von TAPI-0 (10 $\mu$ M) mit dem TNF $\alpha$ -Peptid für 12h inkubiert. Die enzymatische Aktivität der Präzipitate und der Sepharose-Kontrolle wurden durch Emmission bei 405nm im ELISA-Reader bestimmt.

### 5.3.9 Identifikation der L1 und CD44 spaltenden Protease in Exosomen

Eine weitere effiziente Methode zur Modulation der Expression von Proteinen ist die Technik der *small interfering RNAs* (siRNAs) (Elbashir et al., 2001 a,b,c). Das Prinzip dieser 21bp langen RNAs besteht darin, dass sie nach Aufnahme in die Zelle die Degradation ihrer komplementären mRNA einleiten und dadurch die Proteinsynthese verhindern. Diese vielseitig untersuchte Methode wird nicht nur zur Charakterisierung bestimmter Funktionen einzelner Proteine verwendet, sondern auch in ersten Modellen zu Therapiezielen verwendet.

Mit Hilfe der ASOs konnte in vorherigen Experimenten bereits gezeigt werden, dass ADAM10 die intrazelluläre Spaltung von L1 unter konstitutiven Bedingungen vermittelt. Durch Transfektion spezifischer siRNAs sollte im Folgenden untersucht werden, ob ADAM10 bzw. ADAM17 in die Spaltung von CD44 und L1 in Exosomen involviert ist.

Die siRNAs gegen ADAM10, ADAM17 und eine Kontroll-siRNA (siKtr.) wurden mit Oligofektamin transient in OVMz Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 48h unter normalen Bedingungen kultiviert. In diesem Zeitraum sollte vorhandenes Protein abgebaut und alle vorhandenen mRNAs der beiden Proteasen degradiert werden, um eine neue Synthese der Proteine zu verhindern. Die Effizienz der siRNA-vermittelten Depletion wurde zunächst in der FACS-Analyse sowie im Western Blot untersucht.

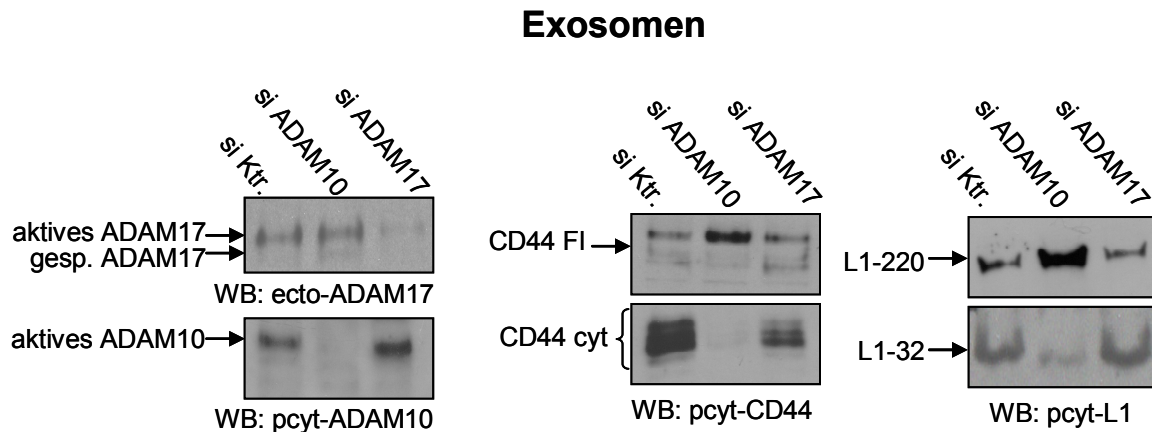


**Abb. 39: Nachweis der ADAM10 und ADAM17 Expression nach Transfektion mit siRNAs.** OVMz Zellen wurden mit siRNAs gegen ADAM10 oder ADAM17 bzw. mit einer Kontroll-siRNA (siKtr) transfiziert. **(A)** Nach 48h wurde eine FACS-Analyse mit Antikörpern gegen ADAM17 (ecto-ADAM17) und ADAM10 (ecto-ADAM10), gefolgt von einem PE-konjugierten am-IgG Sekundärantikörper, durchgeführt. **(B)** Western Blot Analyse mit siRNA transfizierter Zellen. Nach 48h wurden die transfizierten Zellen in TX-100 Lysispuffer lysiert und die Zellysate im Western Blot mit Antikörpern gegen ADAM10 (pcyt-ADAM10) und ADAM17 (pcyt-ADAM17) untersucht.

Dabei zeigte sich, dass nach Transfektion der jeweiligen spezifischen siRNA die Expression der entsprechenden Metalloproteinase deutlich abnahm; die Kontroll-siRNA hatte, wie erwartet, keinen Effekt (**Abb. 39A**). Das gleiche Bild zeigte die Analyse der transfizierten Zellen im Western Blot. Auch hier war kaum noch ADAM10 bzw. ADAM17 nachweisbar (**Abb. 39B**).

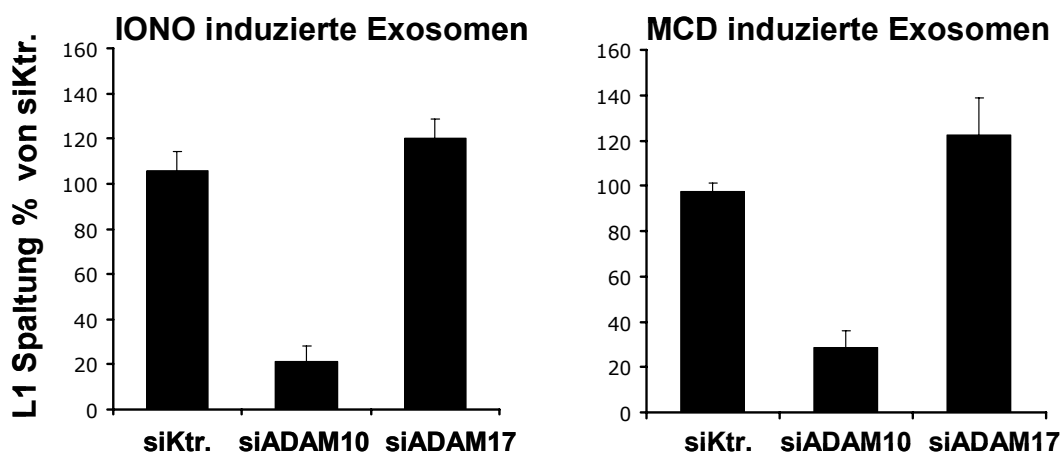
Nach Etablierung der Methode sollte der Einfluss auf die konstitutive Spaltung in Exosomen analysiert werden. Dazu wurden OVMz Zellen 48h nach Transfektion für weitere 24h unter Serum-freien Bedingungen kultiviert. Die Exosomen wurden isoliert, in Probenpuffer aufgenommen und im Western Blot untersucht (**Abb. 40**). Beide Proteasen konnten nach Transfektion der spezifischen siRNAs kaum noch in Exosomen detektiert werden. Die Untersuchung der Spaltung von L1 und CD44 ergab, dass kaum L1-32 Spaltfragment in

ADAM10 depletierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Die siRNAs hatten aber keinen direkten Einfluss auf den Vorgang der Vesikelabgabe, da im Falle der Inhibition der Spaltung die Menge an L1-220 in gleicher Weise zunahm. Für CD44 konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. So konnte erstmals gezeigt werden, dass CD44 in Exosomen durch die Metalloproteinase ADAM10 gespalten wird. Ein schwacher Effekt konnte hier jedoch auch durch Depletion von ADAM17 erzielt werden.



**Abb. 40: Western Blot Analyse von Exosomen nach siRNA Transfektion.** OVMz Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA (si Ktr), bzw. mit siRNAs gegen ADAM10 oder ADAM17 transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für 24h unter Serum-freien Bedingungen zur Generierung von Exosomen kultiviert. Die Exosomen wurden aus den Überständen isoliert und im Western Blot mit Antikörpern gegen ADAM17 (ecto-ADAM17), ADAM10 (pcyt-ADAM10), CD44 (pcyt-CD44) und L1 (pcyt-L1) untersucht.

Da bekannt war, dass verschiedene Stimuli unterschiedliche Proteasen aktivieren, sollte abschließend geklärt werden, ob es zu einer Veränderung der in die Spaltung involvierten Metalloproteinasen durch MCD oder Ionomycin kommen kann. Dazu wurden mit siRNAs transfizierte OVMz Zellen mit Ionomycin bzw. MCD behandelt. Anschließend wurden die Exosomen isoliert und im Western Blot untersucht. Die Menge an L1-32 Spaltprodukt wurde densitometrisch bestimmt (**Abb. 41**). Das Ergebnis zeigte deutlich, dass unter beiden Stimuli auch hier die Spaltung durch Depletion von ADAM10 inhibiert wurde. Sowohl die Transfektion der Kontroll- als auch die der ADAM17 siRNA hatte keinen Einfluss auf die induzierte Spaltung von L1 in Exosomen.



**Abb. 41: Densitometrische Auswertung von L1-32 in induzierten Exosomen nach siRNA Transfektion.** OVMz Zellen wurden mit siRNAs gegen ADAM10 oder ADAM17, bzw. mit einer Kontroll-siRNA (siKtr) transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für 2h mit 1 $\mu$ M Ionomycin oder 10mM MCD in Serum-freiem Medium behandelt. Exosomen wurden aus den Überständen isoliert und im Western Blot mit dem Antikörper pcyt-L1 analysiert. Die Menge an L1-32 wurde densitometrisch bestimmt. Der Versuch wurde in Triplikaten angesetzt. Einer der Triplikat-Werte der siKtr. wurde als 100% bestimmt. Abweichungen der jeweiligen Triplikate sind als Fehlerbalken in der Abbildung dargestellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Exosomen eine wichtige Rolle in der Spaltung von L1 und CD44 spielen. Sie enthalten die für den Spaltprozess notwendigen Proteasen in aktiver und funktioneller Form und tragen dadurch möglicherweise zur Generierung löslicher Moleküle von L1 und CD44 bei.

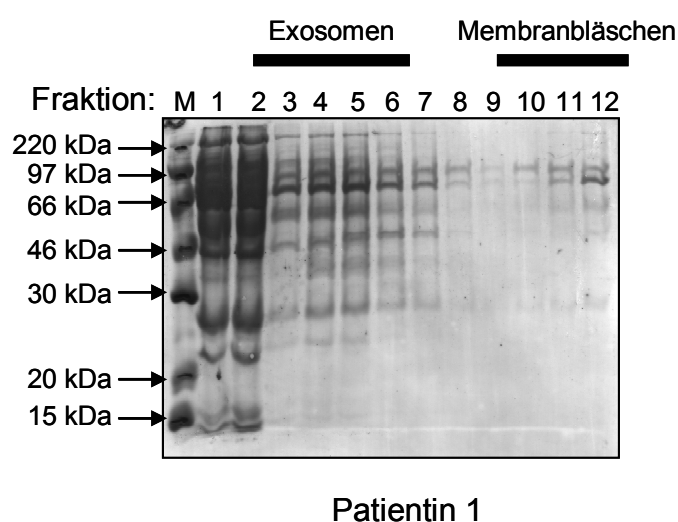
## 5.4 Nachweis von Exosomen *in vivo*

In Ovarialkarzinomzelllinien wurde die Freisetzung von Exosomen als ein wichtiger Mechanismus zur Generierung löslicher Moleküle, wie L1 und CD44, identifiziert. Das Auftreten von löslichem L1 in Serum und Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom wurde bereits beobachtet (Fogel et al., 2003). Der Nachweis von löslichem L1 im Serum und auch im Aszites von Patientinnen könnte eventuell für diagnostische Zwecke nutzbar sein. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Exosomen auch *in vivo* auftreten und dort als möglicher Mechanismus zur Freisetzung von löslichem L1 in Frage kommen.

### 5.4.1 Biochemische Analyse aus Aszites isolierter Vesikel

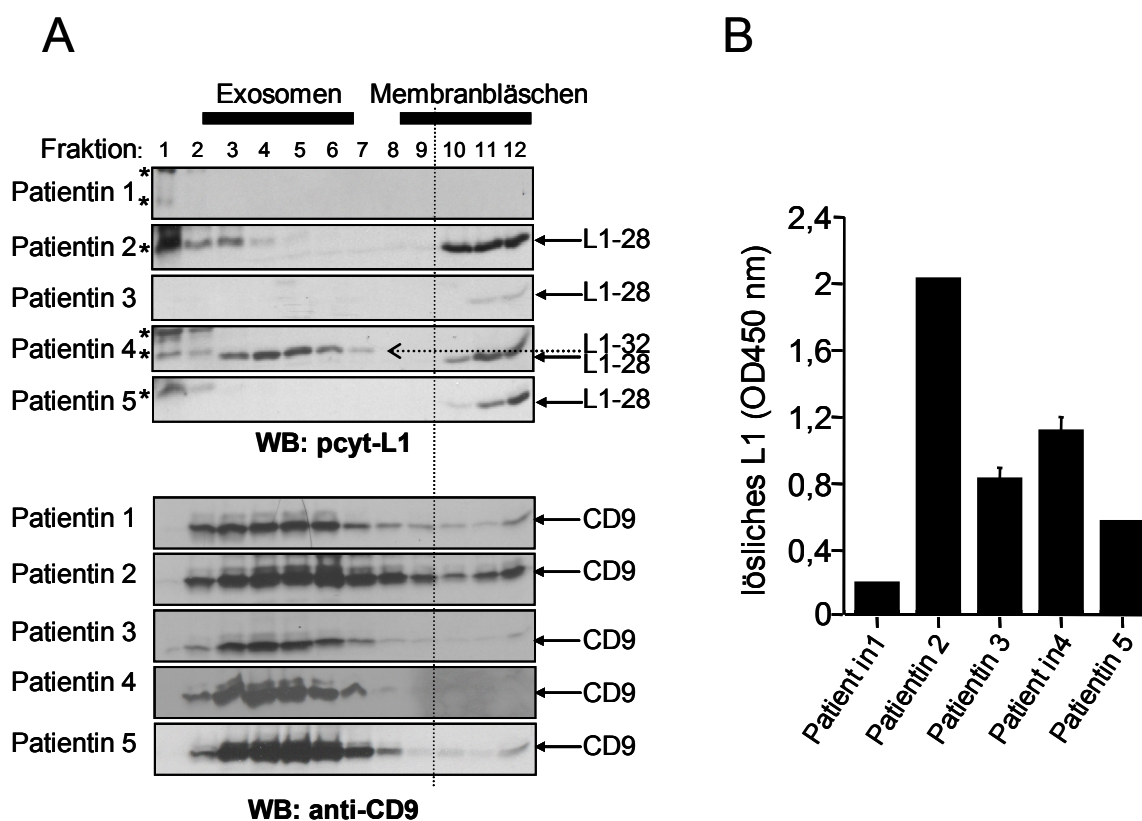
Als Aszites bezeichnet man die Ansammlung klarer seröser Flüssigkeit im normalerweise kappilären Peritonealspalt. Dieser kann bei verschiedenen Tumorerkrankungen

auftreten, wie beispielsweise dem Ovarialkarzinom. In der Aszitesflüssigkeit befinden sich verschiedene Zelltypen, wie Mesothelzellen, Lymphozyten und Tumorzellen. Die Menge an löslichem L1 im Aszites kann im ELISA bestimmt werden. Voraussetzung dafür ist, dass der Tumor positiv für das L1 Adhäsionsmolekül ist. Da Exosomen als Quelle für die Produktion von löslichem L1 diskutiert werden, sollten Exosomen aus dem Aszites verschiedener Patientinnen isoliert und charakterisiert werden. Zur Aufreinigung wurde der Aszites zunächst von Zellen und Zelltrümmern befreit. Anschließend erfolgte ein Zwischenschritt vor der eigentlichen Isolation der Exosomen, um diese anzureichern. Dazu wurde ein 25%iges Saccharose-Kissen in einem SW28 Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit etwa 40ml Aszites überschichtet. Nach einer Ultrazentrifugation bei 100000g von 90min wurde der Aszites verworfen und das Saccharose-Kissen, in dem sich die Vesikel ansammelten, in ein frisches Röhrchen überführt. Die Saccharose wurde mit PBS verdünnt und die Vesikel für 2h30 bei 100000g sedimentiert. Das Pellet wurde in 0,25M Saccharose resuspendiert und auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen. **Abb. 42** zeigt die Proteinverteilung der aufgereinigten Vesikel einer Ovarialkarzinom-Patientin im Saccharose-Gradienten. Die einzelnen Fraktionen des Gradienten wurden in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und anschließend die Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Deutlich erkennbar waren große Proteinmengen in den exosomalenen Bereichen (Fraktion 2-7) und etwas geringere Mengen im Bereich der apoptotischen Membranbläschen (Fraktion 9-12).



**Abb. 42: Verteilung der Proteine aus Vesikeln im Saccharose-Dichte-Gradienten.** Vesikel wurden aus dem Aszites einer Ovarialkarzinom-Patientin isoliert und im Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem 12,5% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mittels Coomassie-Brilliant-Blue ge- und mit Entfärbelösung entfärbt.

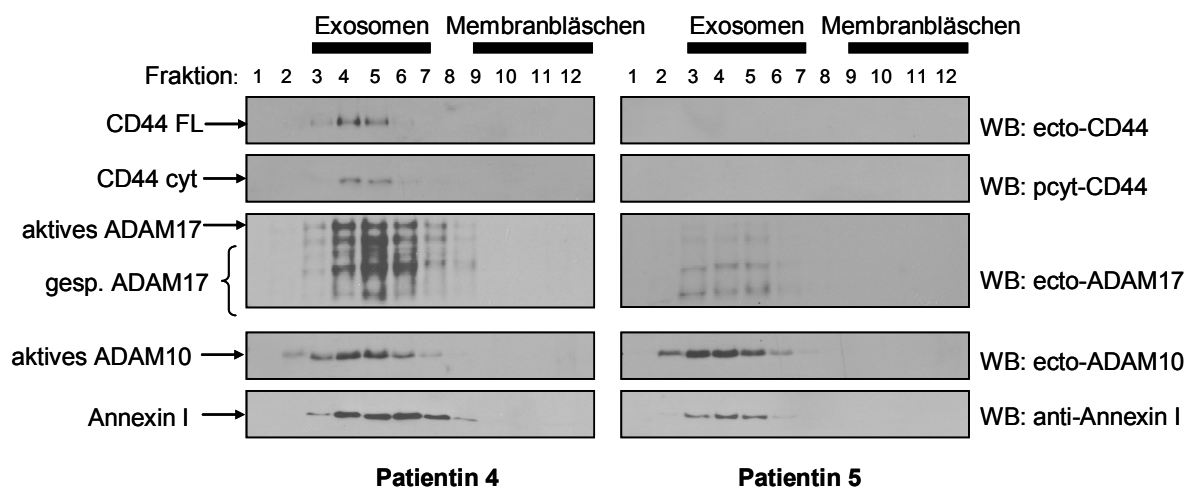
Nun wurden Vesikel aus Aszites von fünf Ovarialkarzinom-Patientinnen untersucht. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran erfolgte die Immundetektion mittels spezifischer Antikörper. Dabei konnten in allen untersuchten Aszites Exosomen mit der gleichen Dichte, wie bereits bei den Ovarialkarzinomzelllinien beschrieben, durch den Exosomen-Marker CD9 nachgewiesen werden (**Abb. 43A**). Interessanterweise befanden sich nur in einem von fünf Aszites L1-positive Exosomen (Patientin 4, Fraktion 3-7). In vier Aszites konnte L1-28, ein Abbauprodukt von L1-32, in den Membranbläschen-Fractionen detektiert werden. In einem Aszites konnte kein L1 detektiert werden. Die Anwesenheit von L1 in Vesikeln korrelierte mit der Menge an löslichem L1 im Aszites, die parallel in einem L1 spezifischen ELISA bestimmt wurde (**Abb. 43B**).



**Abb. 43:** Analyse aus Aszites isolierter Vesikel im Saccharose-Gradient (A) und Nachweis von löslichem L1 im Aszites mittels ELISA (B). Vesikel aus Aszites von fünf Ovarialkarzinom-Patientinnen wurden isoliert und im Saccharose-Dichte-Gradienten aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen L1 (pcyt-L1) und dem Exosomen-Marker CD9 (anti-CD). In den gleichen Aszites wurde die Menge von löslichem L1 im ELISA bestimmt. Angegeben ist die im ELISA-Reader bestimmte OD (optische Dichte) bei 450nm.

In weiteren Untersuchungen wurden die Vesikel aus Aszites der Patientinnen 4 und 5 näher charakterisiert. In den Exosomen von Patientin 4, in denen L1 detektiert werden konnte, war ebenfalls CD44 in voller Länge sowie ein spezifisches Spaltfragment nachweisbar (**Abb. 44**).

In beiden Patientinnen konnte aktives und degradiertes ADAM17, aktives ADAM10 und Annexin-I, ein weiterer Exosomen-Marker, nachgewiesen werden. Damit konnten aus Aszites von Patientinnen die gleichen vesikulären Strukturen mit vergleichbarer Proteinzusammensetzung isoliert werden, wie die der zuvor untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien. Dies stellt einen Nachweis dafür dar, dass *in vivo* ein ähnlicher vesikulärer Mechanismus zur Freisetzung von Proteasen und Substraten existiert.

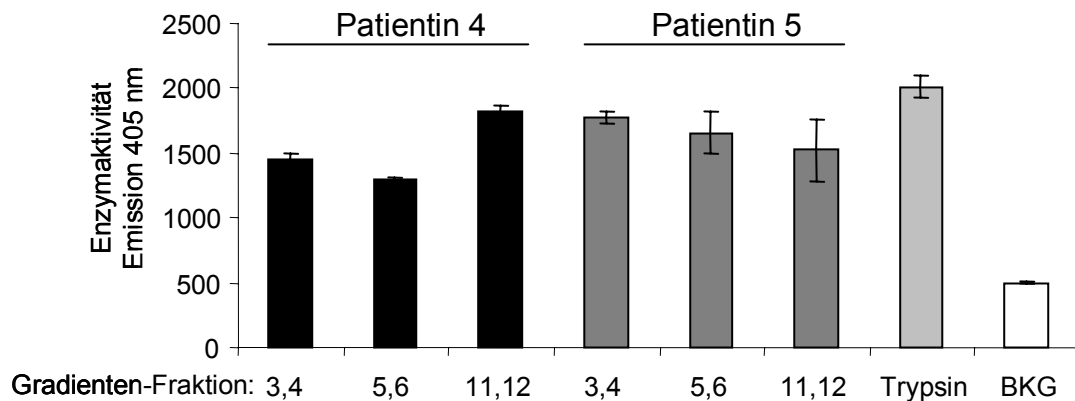


**Abb. 44: Analyse von fraktionierten Aszites-Vesikeln zweier Ovarialkarzinom-Patientinnen.** Vesikel aus Aszites zweier Ovarialkarzinom-Patientinnen wurden isoliert und im Saccharose-Dichte-Gradienten aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen der Gradienten wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen CD44 (ecto-CD44, pcyt-CD44), ADAM17 (ecto-ADAM17), ADAM10 (ecto-ADAM10) und Annexin-I (anti-Annexin-I) untersucht.

#### 5.4.2 Enzymatische Aktivität der Aszites-Vesikel

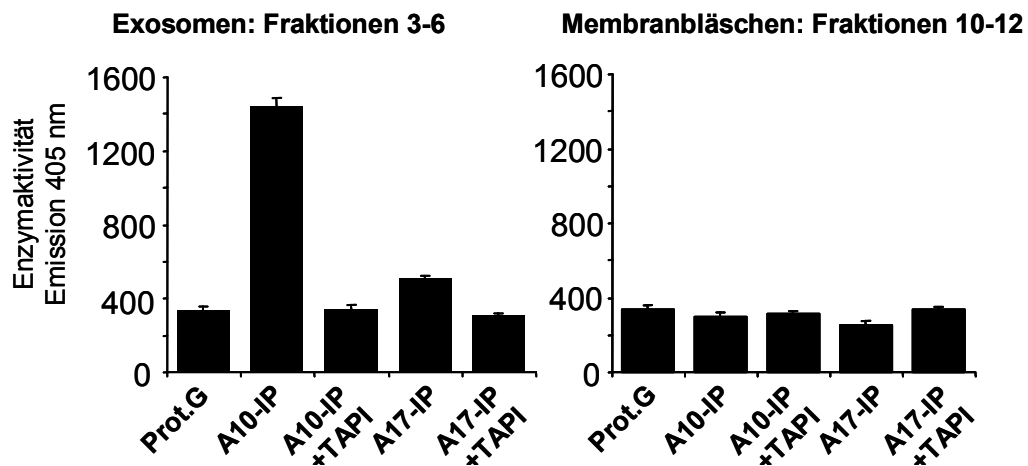
Die bereits untersuchten Exosomen der Ovarialkarzinomzelllinien zeigten eine ADAM10 und ADAM17 spezifische Spaltaktivität für das TNF $\alpha$ -Peptid. Diese sollte nun auch in den Vesikeln der Ovarialkarzinom-Patientinnen untersucht werden. Dazu wurden wiederum Vesikel aus den Aszites von Patientinnen 4 und 5 isoliert und im Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Anschließend wurden jeweils die Fraktionen 3, 4 und 5, 6, welche die Exosomen enthalten, zusammengeführt; ebenso die Fraktionen 11 und 12 mit den darin enthaltenen Membranbläschen. Die Vesikel der zusammengeführten Fraktionen wurden in TNF $\alpha$ -Spaltungspuffer aufgenommen und 14h mit dem TNF $\alpha$ -Peptid inkubiert. Aus **Abb. 45** geht hervor, dass sowohl in Exosomen als auch in Membranbläschen Spaltaktivität vorhanden war. Trypsin als Kontrolle konnte das Substrat ebenfalls spalten. Die Spaltaktivität in den Membranbläschen war deshalb erstaunlich, da dort weder ADAM10 noch ADAM17 in den vorherigen Experimenten detektiert werden konnte.





**Abb. 45: TNF $\alpha$ -Spaltassay mit aus Aszites isolierten Vesikeln.** Vesikel aus Aszites zweier Ovarialkarzinom-Patientinnen wurden isoliert und im Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Anschließend wurden die Exosomen aus den Fraktionen 3,4 und 5,6 bzw. die Membranbläschen aus den Fraktionen 11 und 12 der jeweiligen Gradienten gepoolt, isoliert und mit dem TNF $\alpha$ -Peptid für 14h inkubiert. Trypsin diente als Positivkontrolle. Zur Bestimmung der Autofluoreszenz (BKG) wurde das Peptid nur in Spaltungspuffer inkubiert. Bestimmt wurde die Enzymaktivität durch Emissionsmessung bei 405nm.

Zur genaueren Charakterisierung der für die Spaltung verantwortlichen Proteinasen wurden ADAM10 und ADAM17 aus den Exosomen-Fractionen 3-6 und den Membranbläschen-Fractionen 10-12 eines Aszites, wie bereits beschrieben, präzipitiert und ihre Aktivität im TNF $\alpha$ -Spaltassay überprüft (**Abb. 46**). Dabei konnte festgestellt werden, dass nur in den Exosomen-Fractionen ADAM10 und ADAM17 enzymatisch aktiv waren, wobei ADAM17 eine bedeutend schwächere Aktivität zeigte. Dies war jedoch damit erklärbar, dass ADAM17 in den Exosomen aus Aszites zu einem hohen Maß degradiert war. In beiden Fällen konnte die Aktivität mit dem Metalloproteinase-Inhibitor TAPI blockiert werden. In der Kontrolle mit Protein-G-Sepharose war, wie erwartet, keine Aktivität zu beobachten. In den Membranbläschen konnte ebenfalls keine Aktivität nach Präzipitation nachgewiesen werden, übereinstimmend mit dem Befund, dass hier weder ADAM10 noch ADAM17 detektiert werden konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass Membranbläschen aus Aszites zwar proteolytisch aktiv sind, die Aktivität jedoch anderen Enzymen zuzuordnen ist.

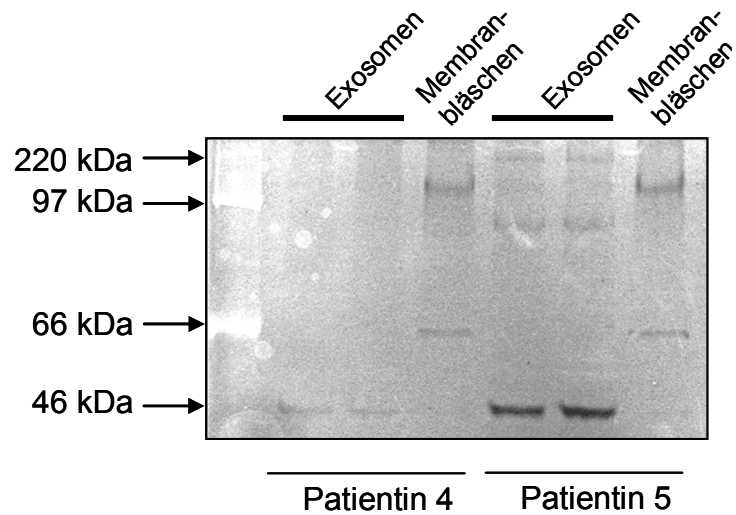


**Abb. 46: Bestimmung der enzymatischen Aktivität von ADAM10 und ADAM17 in Exosomen und Membranbläschen aus Aszites.** Vesikel aus dem Aszites einer Ovarialkarzinom-Patientin wurden isoliert und im Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Anschließend wurden die Exosomen aus den Fraktionen 3-6 bzw. die Membranbläschen aus den Fraktionen 10-12 gepoolt, isoliert und mit BOG-Lysispuffer lysiert. ADAM10 und ADAM17 wurden präzipitiert und in An- oder Abwesenheit von TAPI-0 für 14h mit dem TNF $\alpha$ -Peptid inkubiert. Zur Kontrolle wurde nur mit Protein-G-Sepharose (Prot.G) präzipitiert. Bestimmt wurde die enzymatische Aktivität durch die Emission bei 405nm im Fluoreszenz-Reader.

### 5.4.3 Nachweis von Matrixmetalloproteinasen in Vesikeln aus Aszites

In Vorexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass von Tumorzellen abgegebene Vesikel auch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) enthalten, jedoch war eine Zuordnung zu den bisher charakterisierten vesikulären Strukturen nicht möglich. Zum Nachweis von MMPs in Exosomen und Membranbläschen wurden diese aus den Aszites zweier Patientinnen, wie bereits beschrieben, isoliert und durch einen Saccharose-Gradienten voneinander getrennt. Exosomen und Membranbläschen wurden anschließend in einem Gelatine-Zymogramm zum Nachweis von gelatinolytischer Aktivität untersucht. Dabei wurde insbesondere eine Aktivität der Gelatinasen MMP2 und MMP9 erwartet.

Mit diesem Experiment konnte festgestellt werden, dass das MMP-Profil und damit die Verteilung der Gelatinasen im Saccharose-Gradienten bei beiden Aszites identisch war (**Abb. 47**). Exosomen und Membranbläschen unterscheiden sich jedoch in diesem Profil voneinander. In Exosomen von Tumorzellen werden andere MMPs exprimiert als in apoptotischen Membranbläschen. Während in den Exosomen jeweils Banden bei 46kDa, 90kDa und 220kDa sichtbar waren, konnten in den Membranbläschen MMPs bei 66kDa sowie 130kDa beobachtet werden. Damit konnte eine weitere charakteristische Eigenschaft zur Unterscheidung verschiedener vesikulärer Strukturen aufgezeigt werden.



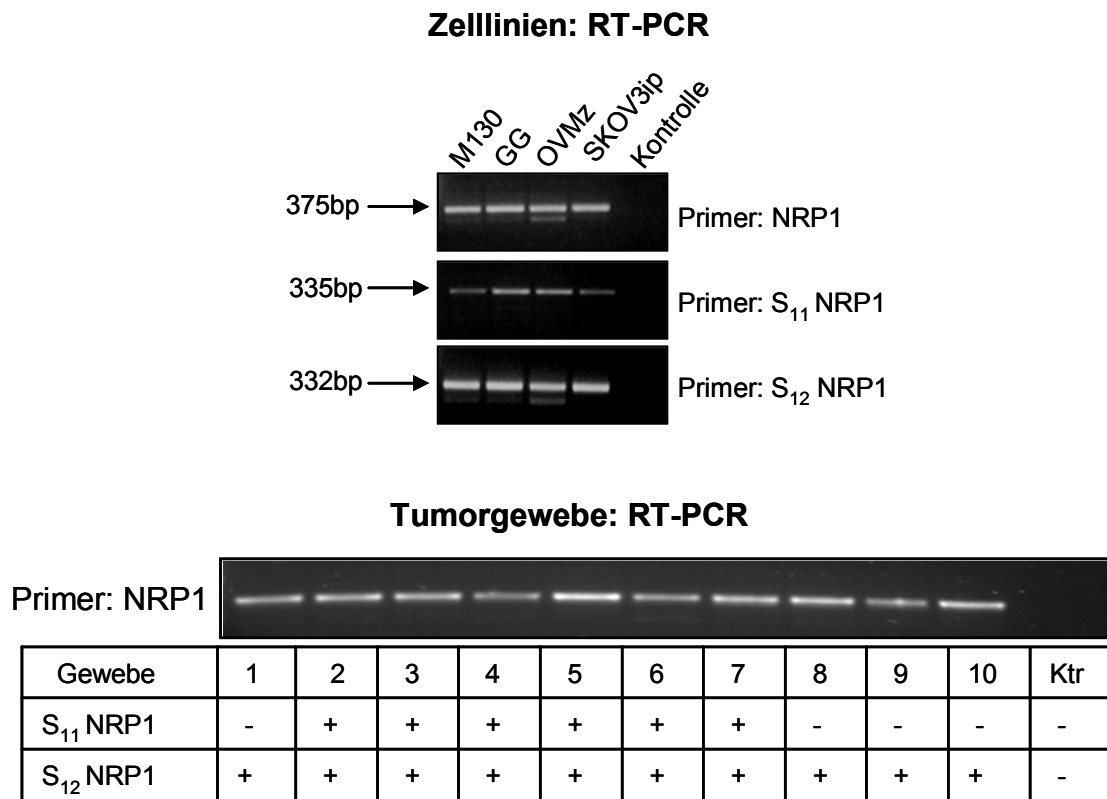
**Abb. 47: Gelatinolytische Aktivität von Exosomen und Membranbläschen aus Aszites.** Vesikel wurden aus Aszites zweier Ovarialkarzinom-Patientinnen isoliert. Anschließend wurden Exosomen und Membranbläschen durch einen Saccharose-Gradienten angereichert und isoliert. Diese wurden in Probenpuffer aufgenommen und in einem Gelatine-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde über Nacht im Zymogrammpuffer bei 37°C inkubiert, in Coomassie gefärbt und in Enfärbelösung entfärbt.

## 5.5 Untersuchungen einer möglichen Neuropilin-1-L1 Interaktion

Der Zelloberflächenrezeptor Neuropilin-1 (NRP1) spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) und dem Auswachsen von Neuronen (Neufeld et al. 2002). Dabei kann NRP1 mit einer Vielzahl verschiedener Liganden interagieren. Die bekanntesten unter ihnen sind Mitglieder der VEGF Familie, die an der Angiogenese beteiligt sind, oder gehören zu den Semaphorinen, die eine wichtige Rolle bei der Repulsion von Axonen spielen (Kolodkin et al., 1997; Soker et al., 1998). Im Nervensystem kann L1 über seine erste Ig-Domäne an NRP1 binden (Castellani et al., 2002). Dabei gehören beide Moleküle zu einem Multirezeptor-Komplex, der Sema3A bindet (Castellani et al., 2000). Die Bindung von L1 an NRP1 kann sowohl in *cis* als auch in *trans* durch transmembranes bzw. lösliches L1 erfolgen (Castellani et al., 2002). Interessanterweise wird NRP1 ebenfalls in verschiedenen Tumorerkrankungen überexprimiert. Dies kann zu verstärkter Angiogenese, zu verstärktem Tumorwachstum, -überleben und -invasion führen (Chen et al., 2005). Über das Vorkommen von NRP1 im Ovarialkarzinom war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Auf der Grundlage bisher zur Verfügung stehender Erkenntnisse der NRP1 Expression in anderen Tumorerkrankungen, wie etwa dem Prostatakarzinom (Miao et al., 2000), wurde im Folgenden untersucht, ob NRP1 auch im Ovarialkarzinom nachgewiesen werden kann und ob es dort einen möglichen Interaktionspartner von L1 darstellt.

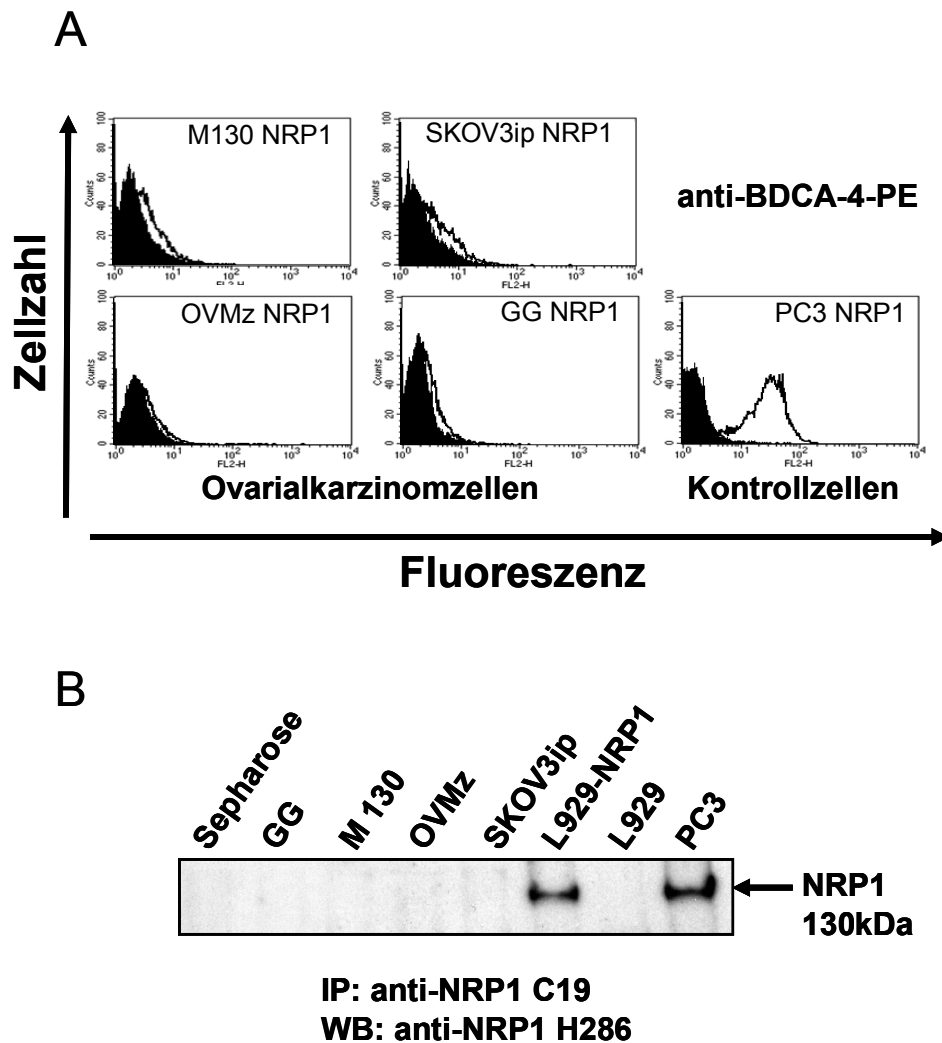
### 5.5.1 Nachweis von NRP1 in Ovarialkarzinomzellen und Tumorgewebe

Zum Nachweis von NRP1 wurde RNA aus vier Ovarialkarzinomzelllinien und zehn Tumorgewebe von Ovarialkarzinom-Patientinnen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte der Nachweis von NRP1 in einer spezifischen PCR mit Primern für die transmembrane Form und zwei lösliche Isoformen des Moleküls, S<sub>11</sub>-NRP1 und S<sub>12</sub>-NRP1 (Rossignol et al., 2000). Dabei konnte erstmals mRNA von transmembranem NRP1 und von den zwei löslichen Isoformen in allen Ovarialkarzinomzelllinien nachgewiesen werden (**Abb. 48**). Die getesteten Tumorgewebe zeigten ebenfalls die Anwesenheit der NRP1 mRNA. Sechs davon konnten zudem als positiv für S<sub>11</sub>-NRP1 und acht für S<sub>12</sub>-NRP1 identifiziert werden. Im Falle der Tumorgewebe muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die nachgewiesene mRNA möglicherweise von kontaminierenden Zellen (Nerven- oder Endothelzellen) stammen kann, deren Anwesenheit im Gesamtgewebe nicht auszuschließen ist.



**Abb. 48: RT-PCR zum Nachweis von NRP1 in Ovarialkarzinomzellen und Tumorgeweben.** RNA wurde aus den Zelllinien M130, GG, SKOV3ip und OVMz bzw. aus zehn Tumorgeweben isoliert. In der RT-PCR erfolgte dann der Nachweis von NRP1, S<sub>11</sub>-NRP1 und S<sub>12</sub>-NRP1 mit spezifischen Primern. Der Kontrollansatz (Ktr.) enthielt keine cDNA.

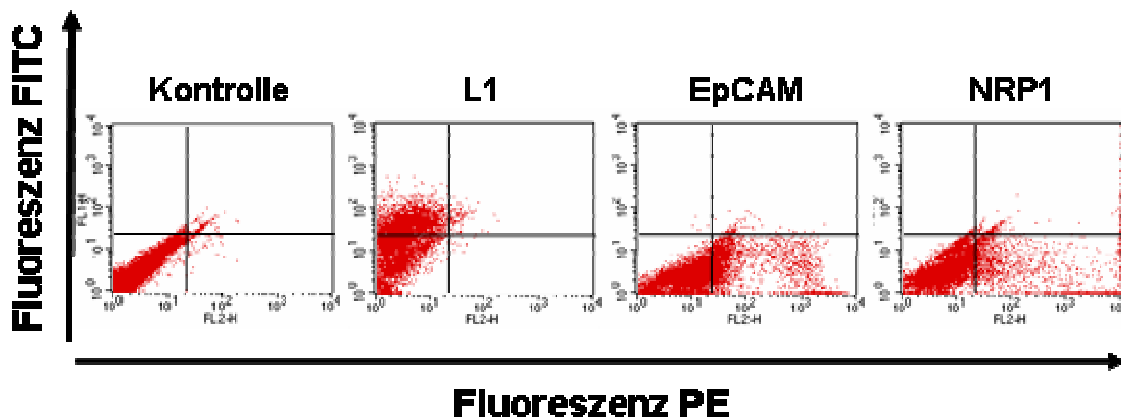
Als nächstes sollte die Proteinexpression von NRP1 überprüft werden. Dazu wurden die verschiedenen Tumorzelllinien einer FACS-Analyse unterzogen, wobei ein PE-konjugierter Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von NRP1 verwendet wurde (BDCA-4-PE). Erstaunlicherweise konnte in der FACS-Analyse keine NRP1 Expression an der Zelloberfläche nachgewiesen werden, während die als Kontrolle eingesetzte Prostatakarzinomzelllinie PC3 positiv war (**Abb. 49A**). Eine Immunpräzipitation sollte klären, ob NRP1 in den Ovarialkarzinomzelllinien intrazellulär vorliegt und somit für die FACS-Analyse nicht zugänglich war. Dazu wurden die verschiedenen Zelllinien in TX-100 Lysispuffer lysiert und mit dem NRP1 spezifischen Antikörper C19 inkubiert. Durch eine weitere Inkubation mit Protein-G-Sepharose wurden die gebildeten Immunkomplexe aus den Lysaten isoliert. Der Nachweis von NRP1 erfolgte im Western Blot mit dem NRP1 spezifischen Antikörper H286 (**Abb. 49B**). Auch hierbei konnte in keiner der Ovarialkarzinomzelllinien NRP1 nachgewiesen werden, während in den als Kontrolle verwendeten PC3 und stabil mit NRP1 transfizierten L929-NRP1 Zellen deutliche Mengen des Proteins detektiert werden konnten. Offensichtlich korreliert die Neuropilin-1 mRNA nicht mit der Expression des NRP1 Proteins in den Ovarialkarzinomzelllinien.



**Abb. 49: FACS-Analyse und Immunpräzipitation zum Nachweis der NRP1 Expression in Zelllinien. (A)** Verschiedene Ovarialkarzinomzelllinien und die Prostatakarzinomzelllinie PC3 wurden einer FACS-Analyse mit dem PE-konjugiertem Antikörper BDCA-4 gegen NRP1 unterzogen. Zur Kontrollfärbung wurde eine PE-konjugierte IgG-Isotypkontrolle verwendet (schwarze Kurve). **(B)** Immunpräzipitation mit einem NRP1 spezifischem Antikörper (anti-NRP1 C19) aus verschiedenen Zelllinien und anschließende Western Blot Analyse mit dem Antikörper H286 gegen NRP1. Zur Kontrolle wurde nur mit Protein-G-Sepharose präzipitiert (Sepharose).

### 5.5.2 NRP1 positive Zellen im Aszites von Patientinnen

Auf eine Immunpräzipitation von NRP1 aus Tumorgewebe wurde wegen der möglichen Kontamination durch andere Zelltypen verzichtet. Zur Untersuchung der *in vivo* Situation wurden daher Zellen aus dem Aszites einer Patientin isoliert und diese ebenfalls einer FACS-Analyse unterzogen. Dabei wurde die Expression von L1, NRP1 sowie dem Tumormarker EpCAM untersucht. Die graphische Darstellung in **Abb. 50** zeigt das Ergebnis der Analyse. Im Aszites konnten, wie erwartet, sowohl L1 als auch EpCAM positive Zellpopulationen nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine Neuropilin-1 positive Zellpopulation detektiert.



**Abb. 50: FACS-Analyse von Zellen aus Aszites.** Zellen wurden aus dem Aszites einer Ovarialkarzinom-Patientin isoliert und mit Antikörpern gegen L1 (L1-11A) bzw. EpCAM (HEA125) gefolgt von einem FITC- bzw. PE-gekoppelten Zweitantikörper oder mit dem PE-gekoppelten BDCA-4 Antikörper gegen NRP1 gefärbt. Zur Kontrolle wurden die Zellen in einem Gemisch aus den Zweitantikörpern und einer PE-konjugierten IgG Isotypkontrolle inkubiert.

### 5.5.3 Charakterisierung der aus Aszites isolierten Zellpopulationen

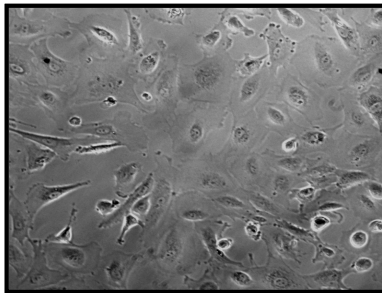
Da sich im Aszites, wie bereits an anderer Stelle beschrieben, unterschiedliche Zelltypen befinden, sollten die einzelnen als positiv identifizierten Populationen isoliert und charakterisiert werden.

Verschiedene Methoden ermöglichen die spezifische Isolation von Zellen, die sich in der Expression von Oberflächenantigenen voneinander unterscheiden. Zur jeweiligen Isolation der L1, EpCAM und NRP1 positiven Zellpopulationen wurde die MACS-Methode verwendet. Dabei wurden sämtliche aus Aszites isolierte Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen eines der drei genannten Oberflächenantigene markiert, gefolgt von einem an Metallbeads gekoppeltem entsprechenden Sekundärantikörper. Über eine Magnetsäule wurden die so markierten Zellen von den nicht markierten getrennt und in Kulturmedium zu weiteren Untersuchungen aufgenommen. Als erstes erfolgte eine morphologische Charakterisierung der drei isolierten Zellpopulationen im Lichtmikroskop (**Abb. 51A**). Dabei wurde deutlich, dass sich die L1- bzw. EpCAM-positiven Zellen morphologisch von den NRP1-positiven Zellen unterscheiden. Die NRP1-positiven Zellen zeigten eine eher runde Morphologie mit ziegelförmiger Anordnung, wie sie bereits für Mesothelzellen beschreiben wurde (Weusten et al., 2000). Zur Untersuchung, ob es sich bei den aus Aszites isolierten Zellen tatsächlich um Mesothelzellen handelt, wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung die Anwesenheit der Mesothelzell-Marker Vimentin-1 und Zytokeratin-19 überprüft (Kikkawa et al., 1995). Beide Moleküle konnten in den NRP1-positiven Zellen detektiert werden (**Abb. 51B**). Damit wurde erstmals die Expression von NRP1 auf Mesothelzellen nachgewiesen.

Dies ermöglicht die spezifische Anreicherung von Mesothelzellen aus dem Aszites über den Zelloberflächenrezeptor NRP1.

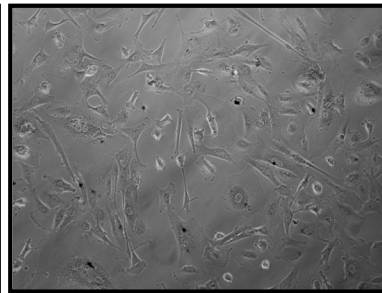
**A**

**Tumorzellen**



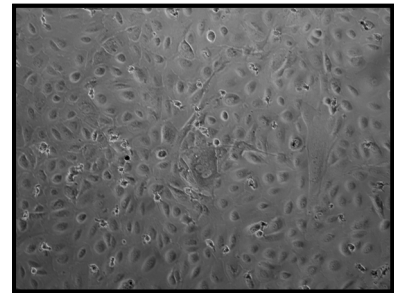
**MACS:**

**L1**



**EpCAM**

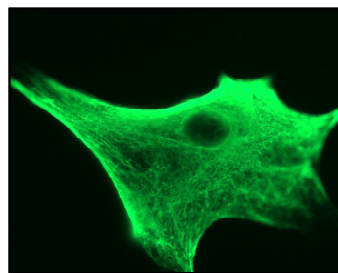
**Mesothelzellen**



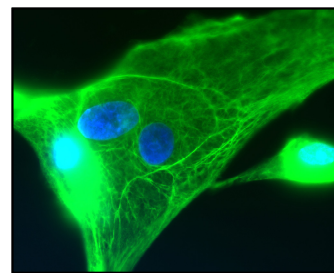
**NRP1**

**B**

**Mesothelzellen**



**Vimentin-1**



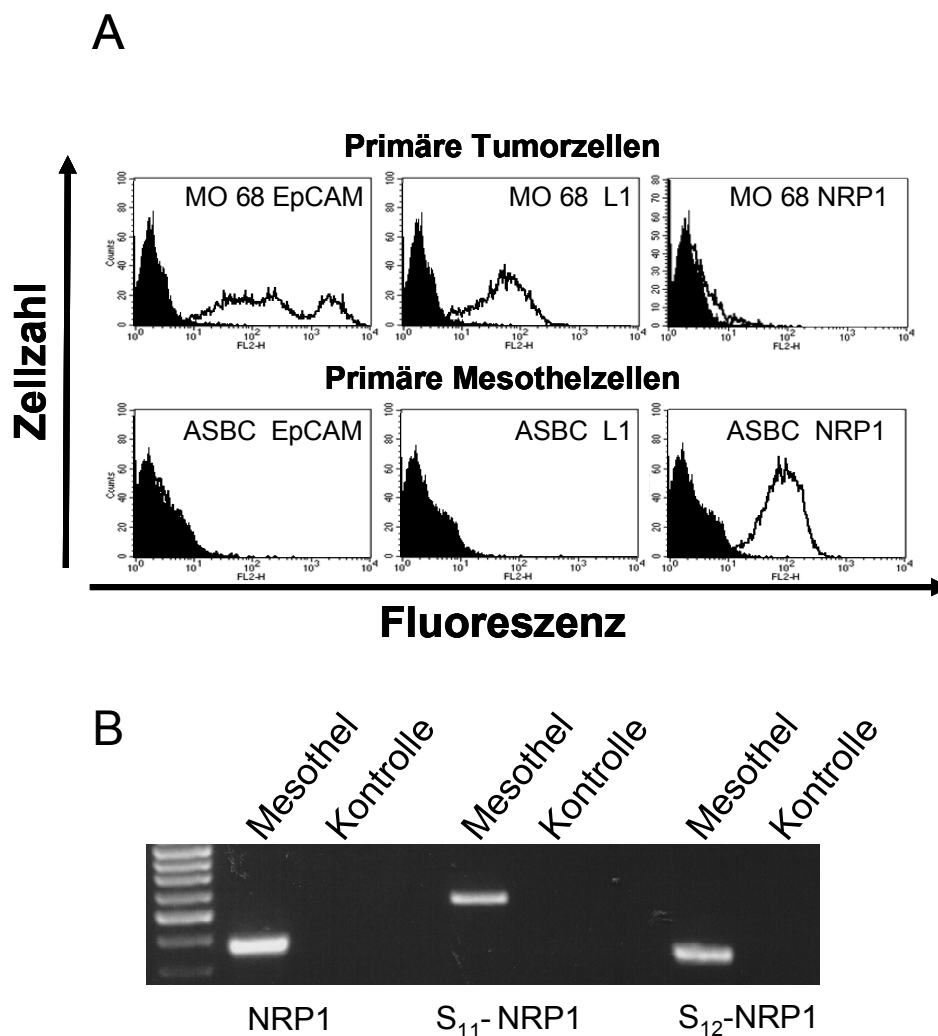
**Cytokeratin-19**

**Abb. 51:** (A) Lichtmikroskopische Untersuchung aus Aszites isolierter Zellpopulationen. (B) Fluoreszenzfärbung der NRP1 positiven Zellen. (A) Durch die MACS-Methode wurden Zellen mit Antikörpern gegen L1 (L1-11A), EpCAM (HEA125) und NRP1 (BDCA-4) isoliert und deren Morphologie im Lichtmikroskop untersucht. (B) Zur weiteren Charakterisierung wurden die NRP1 positiven Zellen mit Antikörpern gegen die Mesothelzell-Marker Vimentin-1 und Zytokeratin-19 gefolgt von einem Alexa488-konjugiertem am-Sekundärantikörper gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau).

In einem zweiten Ansatz wurden, wie bereits beschrieben, L1- und NRP1-positive Zellen mit Hilfe der MACS-Methode aus einem weiteren Aszites isoliert und einer FACS-Analyse unterzogen (**Abb. 52A**). Hierbei konnte bestätigt werden, dass L1-positive Zellen gleichzeitig für den Tumorzell-Marker EpCAM positiv waren und wurden somit eindeutig als Tumorzellen identifiziert. Diese waren auch, wie erwartet, negativ für NRP1. Umgekehrt konnte an der Zelloberfläche der NRP1 positiven Mesothelzellen kein L1 oder EpCAM nachgewiesen werden. Mittels RT-PCR und NRP1 spezifischen Primern konnte mRNA in Mesothelzellen nachgewiesen werden (**Abb. 52B**), sowie mRNAs für die beiden löslichen



Isoformen  $S_{11}$ -NRP1 und  $S_{12}$ -NRP1. Dieses Ergebnis lässt die Aussage zu, dass Mesothelzellen eine membranständige und lösliche Formen von NRP1 exprimieren.

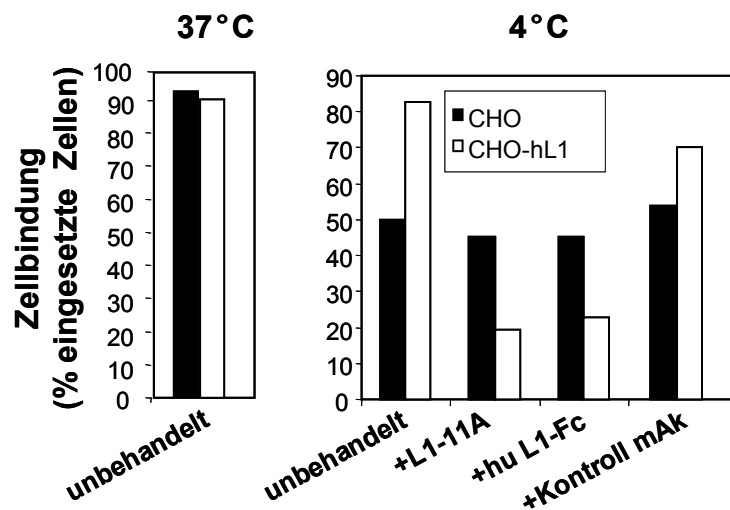


**Abb. 52: (A) FACS-Analyse aus Aszites isolierter Tumor- und Mesothelzellen.** Aus Aszites isolierte Tumorzellen (Mo 68) und Mesothelzellen (ASBC) wurden einer FACS-Analyse mit den Antikörpern L1-11A, HEA125 und BDCA-4 unterzogen. Die schwarz hinterlegte Kurve stellt die jeweilige Sekundärantikörper-Kontrolle dar. **(B) RT-PCR zum Nachweis der NRP1 Expression in Mesothelzellen.** RNA wurde aus Mesothelzellen isoliert und in cDNA umgewandelt. Der Nachweis der NRP1 Expression sowie die der beiden löslichen NRP1 Formen ( $S_{11}$ -NRP1,  $S_{12}$ -NRP1) erfolgte in einer spezifischen PCR mit entsprechenden Oligonukleotiden. Die Kontrollen enthielten keine cDNA.

### 5.5.4 L1-vermittelte Bindung von Tumorzellen an Mesothelzellen

Burleson et al. (2004) beschrieben bereits Interaktionen von Tumorzellen mit Mesothelzellen. Diese sind vergleichbar mit der Interaktion von Tumorzellen und Endothelzellen (Cameron et al., 2005). Interessanterweise exprimieren auch Endothelzellen NRP1 (Murga et al., 2005). Nun sollte untersucht werden, ob L1 und NRP1 eine Bindung von

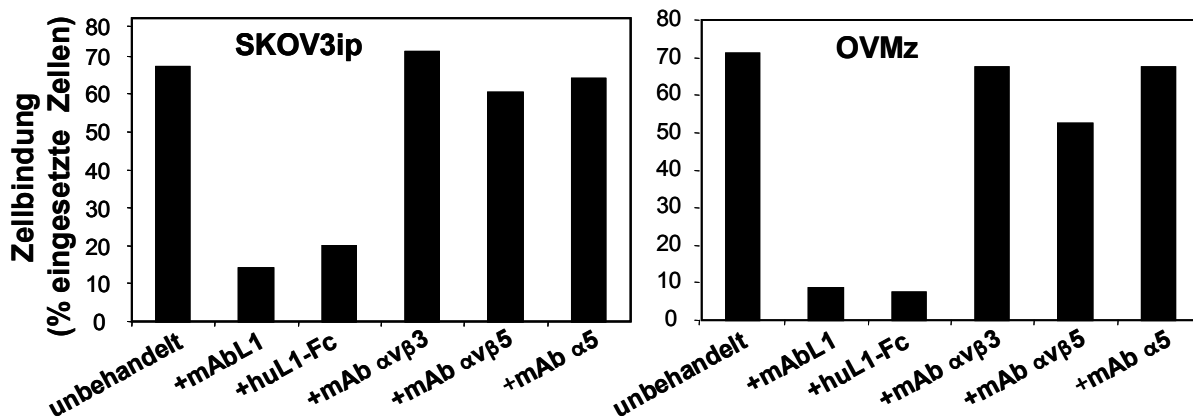
Tumorzellen an Mesothelzellen vermitteln können. Dazu mussten jedoch vorerst passende Methoden und Versuchsbedingungen etabliert werden, da sich auf beiden Zelltypen verschiedene Moleküle befinden, die diese spezifische Interaktion überlagern würden. An erster Stelle sind hier die Integrine zu nennen, die auf der Oberfläche beider Zelltypen exprimiert sind und zu einer starken Zellbindung führen können. Zum Nachweis einer L1-vermittelten Bindung wurden in einem Vorexperiment Mesothelzellen als Einzelzellschicht in 6-Loch-Platten ausgesät. Zu diesen wurden CHO bzw. CHO-hL1 Zellen ( $1 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ ) hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Bindung bei  $37^\circ\text{C}$  für 30min. Daraufhin wurden die ungebundenen Zellen im Überstand abgenommen und auf eine neue Einzelzellschicht übertragen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Abschließend wurden die im Überstand verbliebenen Zellen im FACS-Vantage ausgezählt. Daraus konnte nun der prozentuale Anteil gebundener Zellen von der anfangs eingesetzten Zellzahl ermittelt werden. Unter diesen Versuchsbedingungen war keine L1 abhängige Bindung an die Mesothelzellen zu beobachten (**Abb. 53**). Dieses Experiment wurde nun noch einmal durchgeführt, allerdings wurden die Ansätze jetzt bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Auf diese Weise sollte die Aktivität der Integrine inhibiert werden, um eine L1-abhängige Interaktion mit den Mesothelzellen hervorzuheben. Tatsächlich war jetzt ein deutlicher Unterschied in der Anzahl gebundener Zellen zwischen CHO und CHO-hL1 Zellen zu erkennen. Während nur noch 50% der CHO Zellen an die Mesothelzellen binden konnten, waren es bei CHO-hL1 Zellen über 80%. Als ein weiterer Nachweis, dass die Bindung L1 abhängig war, wurden in den Ansatz zusätzlich  $1 \mu\text{g/ml}$  L1-11A Antikörper, hL1-Fc bzw. ein Kontrollantikörper (IgG1-Isotypkontrolle) hinzugefügt. Der Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von L1 und auch das zur Kompetition eingesetzte hL1-Fc sollten dabei an das L1 Molekül binden und somit eine Interaktion mit den Bindungspartnern auf den Mesothelzellen verhindern. Wie vermutet, wurde durch die Anwesenheit von L1-11A oder des hL1-Fc Proteins die Bindung effektiv blockiert. So konnten nur noch etwa 25% der CHO-hL1 Zellen binden, während kein Einfluss auf die Bindung der CHO Zellen beobachtet wurde. Auch die Isotyp-Kontrolle zeigte keinen Effekt. Somit konnte ein System etabliert werden, das die Untersuchung einer L1-abhängigen Bindung von Tumorzellen an Mesothelzellen ermöglichte.



**Abb. 53: Vergleich der Bindung L1-positiver und -negativer Zellen an Mesothelzellen.** Mesothelzellen wurden als Einzelzellschicht ausgesät. CHO und CHO-L1 Zellen wurden in gleichen Mengen hinzugefügt und bei 37°C oder 4°C für 30min in An- oder Abwesenheit von 1µg/ml L1-11A, 0,5µg/ml huL1-Fc oder einem Kontrollantikörper (1µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die noch darin enthaltenen Zellen auf eine neue Einzelzellschicht übertragen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und abschließend die im Überstand verbliebenen Zellen im FACS-Vantage ausgezählt. Aus der ermittelten Zahl konnte dann der Anteil gebundener Zellen in Prozent errechnet werden.

Zum Nachweis einer Integrin-unabhängigen, jedoch L1-vermittelten Bindung von Ovarialkarzinomzellen an Mesothelzellen wurden unter den beschriebenen Versuchsbedingungen, bei 4°C, SKOV3ip und OVMz Zellen auf eine Mesothelzellschicht ausgesät und der Prozentsatz gebundener Zellen bestimmt (**Abb. 54**). Dabei konnten etwa 70% der ausgesäten Zellen beider Tumorzelllinien an die Mesothelzellen binden. Auch in diesem Fall konnte die Bindung durch Zugabe des L1-11A Antikörpers und von hL1-Fc inhibiert werden. Als Beweis einer Integrin-unabhängigen Interaktion wurden noch Antikörper gegen die ausgewählten Integrine  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$  und die Integrinkette  $\alpha5$  zugefügt. Keiner der eingesetzten Antikörper konnte die L1-abhängige Bindung an Mesothelzellen blockieren. Damit wurde ausgeschlossen, dass eines dieser Integrine, weder auf den Mesothelzellen noch auf den Tumorzellen, an der Zellbindung beteiligt war.

Durch diese Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass L1 auch unabhängig von Integrinen die Bindung von Tumorzellen an Mesothelzellen vermitteln kann.

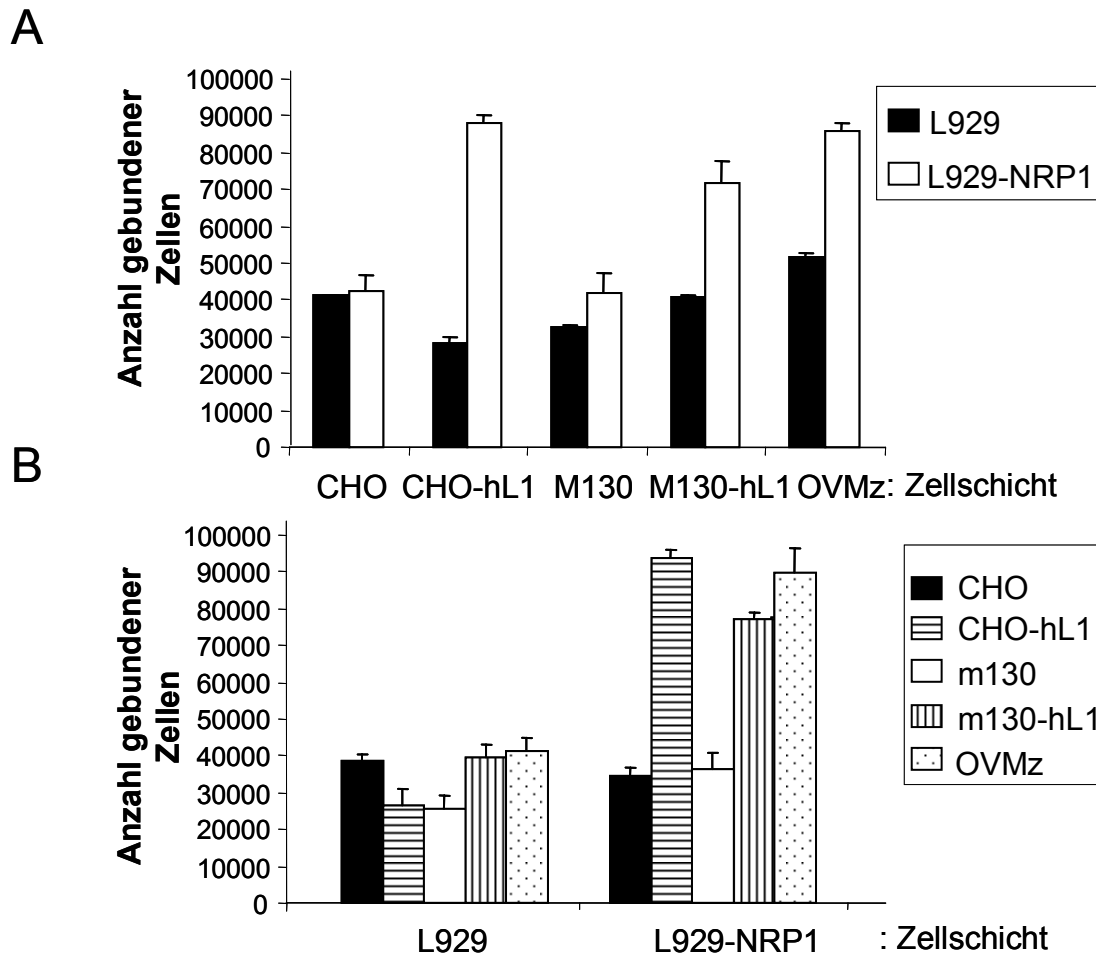


**Abb. 54: Untersuchung der Bindung von Tumorzellen an Mesothelzellen.** Mesothelzellen wurden als Einzelzellschicht ausgesät und SKOV3ip oder OVMz Zellen wurden zu diesen in gleichen Mengen hinzugefügt und bei 4°C für 30min in An- oder Abwesenheit von 1µg/ml L1-11A (mAbL1), 0,5µg/ml huL1-Fc oder Antikörpern (1µg/ml) gegen die Integrine  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha5$  inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die noch darin enthaltenen und damit nicht gebundenen Zellen ausgezählt. Aus der ermittelten Zahl konnte dann der Anteil gebundener Zellen in Prozent errechnet werden.

### 5.5.5 L1-vermittelte Bindung an NRP1 exprimierende Fibroblasten

Zur Untersuchung der Frage, ob NRP1 einen möglichen Bindungspartner von L1 bei einer Zell-Zell-Bindung darstellt, wurden L929 Mausfibroblasten mit einem Lentivirus infiziert, in dessen Genom die cDNA für NRP1 eingebracht worden war (S. Bourbie, Paris). Dies führte zur stabilen Expression von NRP1. Zur Kontrolle wurden L929 Zellen ebenfalls mit einem Lentivirus infiziert, der keine weitere kodierende Sequenz trug. Die Bindungseigenschaften beider Zelllinien wurden nun mit der zuvor etablierten Methode, bei 4°C, untersucht. Dabei wurden zunächst verschiedene L1-negative und -positive Zelllinien als Einzelzellschicht kultiviert. Zu diesen wurden L929 bzw. L929-NRP1 Zellen hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Bindung bei 37°C für 30min. Daraufhin wurden die ungebundenen Zellen im Überstand abgenommen und auf eine neue Einzelzellschicht übertragen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die im Überstand verbliebenen Zellen wurden im FACS-Vantage ausgezählt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die größte Zahl gebundener Zellen durch eine Kombination L1- und NRP1- positiver Zellen erreicht wurde (**Abb. 55A**). Gleiches konnte gezeigt werden, wenn L929 und L929-NRP1 Zellen als Einzelzellschicht angeboten wurden und L1-positive sowie -negative Zellen zu diesen hinzugefügt wurden. Eine deutlich verstärkte Zellbindung wurde auch hier erreicht, wenn L1-positive Zelllinien auf die L929-NRP1 Zellen trafen (**Abb. 55B**). Die geringste Anzahl gebundener Zellen wurde immer dann beobachtet, wenn keines oder nur eins der beiden Moleküle im System präsent war.

Diese Experimente gaben erste Hinweise, dass NRP1 ein möglicher Kandidat für die L1-vermittelte Bindung von Tumorzellen an Mesothelzellen ist.

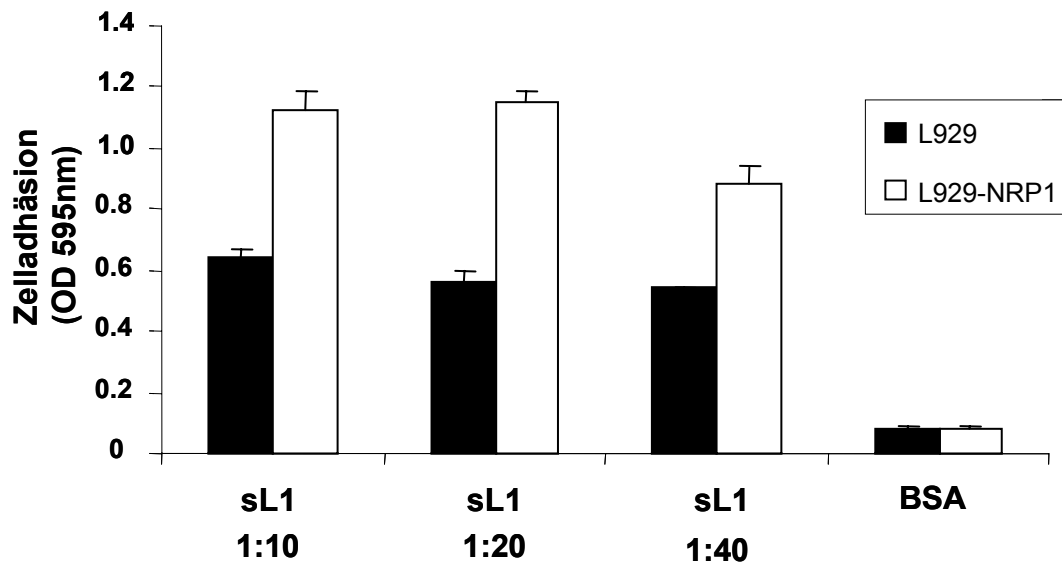


**Abb. 55: Zelldpletion zum Nachweis einer L1-NRP1 vermittelten Zellbindung.** (A) L929 und L929-NRP1 wurden in gleicher Zellzahl als Einzelzellschicht in 96-Loch Platten ausgesät. Verschiedene L1-positive (CHO-hL1, m130-hL1 und OVMz) wurden zu diesen für 30min bei 4°C hinzugefügt. Der Überstand mit ungebundenen Zellen wurde abgenommen und auf eine neue Einzelzellschicht übertragen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Abschließend wurden die im Überstand verbliebenen Zellen im FACS-Vantage ausgezählt. Dies ließ die Berechnung der gebundenen Zellen zu. (B) Gleiche Versuchsbedingungen wie unter (A), jedoch L929 und L929-NRP1 als Einzelzellschicht.

### 5.5.6 Untersuchung einer NRP1-vermittelten Zelladhäsion auf L1 als Substrat

Lösliches L1 kann aus dem Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen isoliert werden. An der Bindung von L1 an NRP1 ist die erste Ig. Domäne des L1 Moleküls beteiligt, die sich im extrazellulären Abschnitt des Moleküls befindet (Castellani et al., 2002). Durch die bisherigen Ergebnisse unterstützt, lag die Vermutung nahe, dass auch lösliches L1 an das NRP1 Molekül an der Oberfläche von Zellen binden kann. Zum Nachweis dieser Interaktion

wurde aus Aszites gereinigtes lösliches L1 als Substrat angeboten. Dazu wurde eine 96-Loch Platte mit gereinigtem löslichem L1 in den entsprechenden Verdünnungen in TBS bzw. zur Kontrolle mit BSA/TBS für 16h bei 4°C inkubiert. L929 und L929-NRP1 Zellen wurden in gleicher Zellzahl in die Vertiefungen der beschichteten 96-Loch Platte ausgesät und für 45min bei 4°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann mit verschiedenen Percoll-Lösungen unterschichtet, um ungebundene Zellen zu entfernen. Die verbliebenen gebundenen Zellen wurden mit Kristallviolettlösung gefärbt und mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Eluierung des Farbstoffs erfolgte mit Essigsäure. Abschließend konnte die OD bei 595nm gemessen werden. Die Intensität der Färbung ließ dabei Rückschlüsse auf die Anzahl gebundener Zellen zu. Dabei konnte beobachtet werden, dass die L929-NRP1 Zellen deutlich besser an das als Substrat angebotene lösliche L1 binden konnten als die NRP1 negativen L929 Zellen (**Abb. 56**). Keine Zellbindung konnte beobachtet werden, wenn die Vertiefungen der Platte nur mit BSA beschichtet wurden. Die Expression von NRP1 kann also eine verstärkte Zelladhäsion auf L1 als Substrat vermitteln. Dieser Befund zeigt ebenfalls die Möglichkeit, dass lösliches L1 ein Ligand von NRP1 auf Mesothelzellen ist.

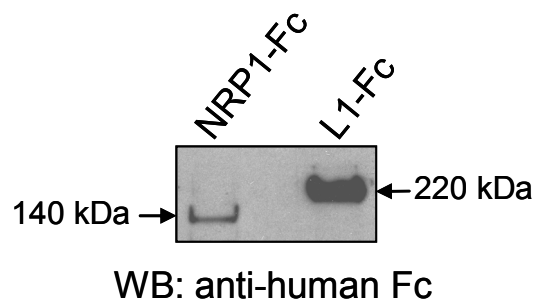


**Abb. 56: Untersuchung der Zelladhäsion NRP1-positiver und -negativer Zellen auf L1 als Substrat.** Eine 96-Loch Platte wurde mit aus Aszites gereinigtem löslichem L1 (sL1) in den entsprechenden Verdünnungen in TBS bzw. zur Kontrolle mit BSA für 16h bei 4°C inkubiert. L929 und L929-NRP1 Zellen wurden in gleicher Zellzahl in die Vertiefungen der beschichteten 96-Loch Platte ausgesät und für 45min bei 4°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann mit verschiedenen Percoll-Lösungen unterschichtet, um ungebundene Zellen zu entfernen. Die verbliebenen gebundenen Zellen wurden mit Kristallviolettlösung gefärbt und danach fünfmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Eluierung des Farbstoffs erfolgte mit Essigsäure. Abschließend wurde die OD bei 595nm bestimmt. Abweichungen der jeweiligen Triplikate-Werte sind als Fehlerbalken dargestellt.

### 5.5.7 Nachweis einer direkten Protein-Protein Interaktion

Bisher wurde die Interaktion der beiden Proteine NRP1 und L1 auf zellulärer Ebene untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit beider Moleküle die Zell-Zell Bindung bzw. die Zelladhäsion deutlich verstärkt werden konnte. Abschließend sollte nun untersucht werden, ob beide Moleküle dabei direkt miteinander interagieren können. Dazu wurde ein System etabliert, in dem die beiden Proteine in gereinigter Form aneinander binden konnten.

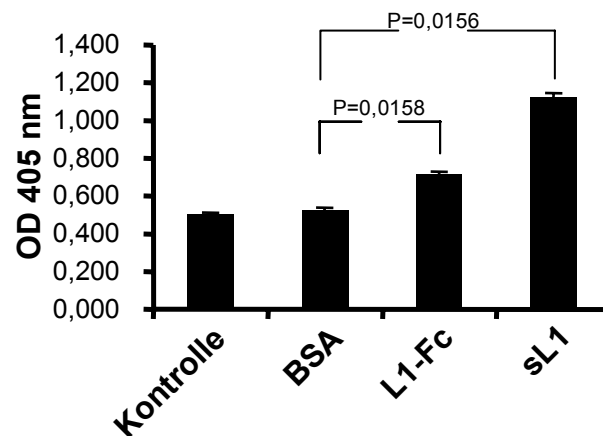
Die cDNA der extrazellulären Domäne des NRP1 Moleküls wurde aus einem Plasmid mit spezifischen Primern amplifiziert und in den pIG1 Expressionsvektor inkloniert. Dieses Plasmid enthält neben einer Spleiß-Akzeptor-Stelle die Sequenzen der Hinge-Region, sowie der Domänen CH2 und CH3 des humanen Immunglobulin G1 (Simmons et al., 1993). Diese Regionen ersetzen die transmembrane- und die zytoplasmatische Domäne des NRP1 Moleküls und sorgen für dessen Sezernierung in löslicher Form. Dieses Konstrukt wurde zur Gewinnung von NRP1-Fc Fusionsprotein in COS-7 Zellen transfiziert. Nach 48h wurde der Überstand abgenommen und von Zellen und Zelltrümmern befreit. Anschließend wurde das Fusionsprotein aus dem Überstand mit Protein-A-Sepharose präzipitiert und im Western Blot überprüft (**Abb. 57**). Dabei konnte das erwartete 140-kDa NRP1-Fc identifiziert werden. Zur Kontrolle wurde ebenfalls bereits hergestelltes L1-Fc Fusionsprotein im Western Blot überprüft, das, wie erwartet, bei 220-kDa detektiert werden konnte. Mithilfe des NRP1-Fc Fusionsproteins war es nun möglich, eine direkte Protein-Protein Interaktion der beiden Moleküle im ELISA-Format zu untersuchen.



**Abb. 57: Western Blot zum Nachweis des NRP1-Fc Fusionsproteins im Überstand von COS-7 Zellen.** COS-7 Zellen wurden mit dem NRP1-pIG1 Konstrukt transfiziert. Nach 48h wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und das Fusionsprotein mit Protein-A-Sepharose aus diesem präzipitiert. Der Nachweis erfolgte im Western Blot mit dem Peroxidase-gekoppelten anti-human-Fc Antikörper. Als Kontrolle diente bereits hergestelltes L1-Fc Fusionsprotein.

Eine 96-Loch ELISA-Platte wurde über Nacht bei 4°C mit NRP1-Fc aus dem Überstand der transfizierten COS-7 Zellen beschichtet. Anschließend wurden die beschichteten Vertiefungen mit L1-Fc enthaltenden Überstand, gereinigtem löslichem L1, einem Kontroll-Überstand ohne Fusionsprotein oder mit BSA inkubiert. Der Nachweis von gebundenem L1 erfolgte mit dem Peroxidase-gekoppelten L1-11A Antikörper (**Abb. 58**). Dabei wurde beobachtet, dass L1-Fc und noch effektiver lösliches L1 aus Aszites an NRP1 binden konnten. In den beiden Kontrollen konnte, wie erwartet, keine Bindung festgestellt werden.

Mit diesem Experiment konnte erstmals gezeigt werden, dass NRP1 und L1 in gereinigter Form aneinander binden können und damit möglicherweise an einer Interaktion von Tumorzellen mit Mesothelzellen beteiligt sind.



**Abb. 58: ELISA zum Nachweis einer direkten L1-NRP1 Proteininteraktion.** Eine 96-Loch ELISA-Platte wurde über Nacht bei 4°C mit NRP1-Fc aus dem Überstand der transfizierten COS-7 Zellen beschichtet. Die beschichteten Vertiefungen wurden mit BSA, L1-Fc, löslichem L1 aus Aszites (sL1) oder einem Fusionsprotein-freien Kontroll-Überstand (Kontrolle) inkubiert. Der Nachweis von gebundenem L1 erfolgte durch Detektion mit dem Peroxidase-gekoppelten L1-11A Antikörper. Teststatistik wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt (hoch signifikant  $P \leq 0,05$ ; niedrig signifikant  $P < 0,1$ ).



## 6 Diskussion

### 6.1 L1 Expression schützt Zellen vor Apoptose

Die Apoptose stellt den wichtigsten Mechanismus dar, durch den Zellen mit irreparablen DNA Schäden sterben. Während der Entwicklung eines Organismus werden durch den kontrollierten Zelltod die Zellzahl und die Proliferation reguliert. Des Weiteren ist Apoptose ein Bestandteil der zentralen und peripheren Toleranz des Immunsystems, wobei selbst-reaktive Lymphozyten eliminiert werden. Prinzipiell kann die Apoptose über den extrinsischen (zytoplasmatischen) oder den intrinsischen (mitochondrialen) Weg induziert werden. Beim extrinsischen Weg werden spezielle Zellmembranrezeptoren, so genannte Todesrezeptoren, aktiviert. Die Bindung ihrer korrespondierenden Liganden, wie Fas, Apo oder TNF, führt zur Initialisierung der rezeptorassoziierten Todesdomänen, zu denen die Initiator-Caspasen-8 und -10 gehören. Diese wiederum aktivieren die in der Enzymkaskade nachfolgenden Caspasen zur Prozessierung der Apoptose. Alternativ kann die Caspase-8 zelltypspezifisch auch den intrinsischen Weg der Apoptose einleiten. Im Mittelpunkt des intrinsischen Weges stehen die Mitochondrien, die überwiegend als Antwort auf irreparable DNA Schäden sowohl Caspase-abhängige als auch -unabhängige Signalkaskaden zur Induktion der Apoptose aktivieren können (zusammengefasst in Ghobrial et al., 2005).

Die Behandlung von Tumorpatient(inn)en durch Bestrahlung oder mit Chemotherapeutika, wie Cisplatin, führt zu DNA Schäden in Tumorzellen, wodurch die intrinsische Apoptose eingeleitet wird (Eastman, 1983; Kim et al., 2002; Kim, 2005). Die Apoptose ist jedoch ein streng regulierter Prozess und die Signalkaskade kann durch die Expression anti-apoptotischer Moleküle, wie die der Bcl-2 Familie, unterbrochen oder blockiert werden (Kim, 2005). Eine darauf basierende Apoptoseresistenz führt zur deutlich verminderten Effizienz der angewandten Therapie (Kim et al., 2002; Pommier et al., 2004). Daher wird nach Möglichkeiten gesucht, Resistenz -induzierende Moleküle als Ziele für neue Therapieansätze zu nutzen, um die Sensitivität der Tumorzellen gegen Apoptose wiederherzustellen oder zu erhöhen.

Studien von Chen et al. (1999a) und Nishimune et al. (2005) konnten zeigen, dass lösliches L1 verschiedene Neuronen vor Apoptose schützen kann. Zu Beginn dieser Arbeit gab es keine Hinweise auf eine ähnliche Wirkung von L1 auf Zellen außerhalb des Nervensystems.

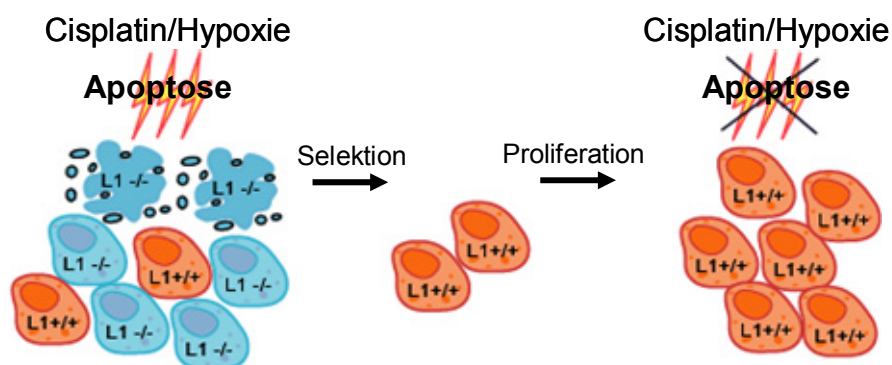
Lösliches L1 kann jedoch im Aszites und im Serum von Ovarialkarzinom-Patientinnen mit L1-positiven Tumoren nachgewiesen werden (Fogel et al., 2003). Zudem belegte die gleiche Studie, dass die Expression von L1 in Tumoren der Ovarien und des Uterus mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patientinnen korreliert. Auch beim Ovarialkarzinom stellt die Expression anti-apoptotisch wirkender Moleküle ein besonderes Problem dar, da die Zellen auf die in der Therapie eingesetzten Chemotherapeutika nicht oder nur unzureichend ansprechen (Liu et al., 1998; Mano et al., 1999; Williams et al., 2005). In dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob die Expression von L1 einen Einfluss auf die Apoptose von Tumorzellen hat.

In einem Vergleich von L1-positiven mit L1-negativen HEK293 bzw. CHO Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von L1 diese Zellen vor Apoptose schützen kann. Der Entzug von Serum stellt für primäre neuronale Zellen in der Gewebekultur bereits ein Signal zur Apoptose dar (Chen et al., 1999a; Nishimune et al., 2005). Dies konnte bei den transfizierten Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, nicht beobachtet werden. Daher wurde die Apoptose durch Substanzen, wie C2-Ceramid, Staurosporin oder durch im Tumorgewebe häufig vorkommende Hypoxie, induziert. Alle drei Stimuli aktivieren den Mitochondrien-abhängigen Weg der Apoptose (Kim, 2005). Unabhängig vom verwendeten Zelltyp und der Art der Induktion der Apoptose führte die L1 Expression zu einer erhöhten Resistenz. Ein Vergleich verschiedener Ovarialkarzinomzelllinien unter Hypoxie zeigte dann, dass die Stärke der L1 Expression mit der Apoptoseresistenz korreliert (Abb. 13).

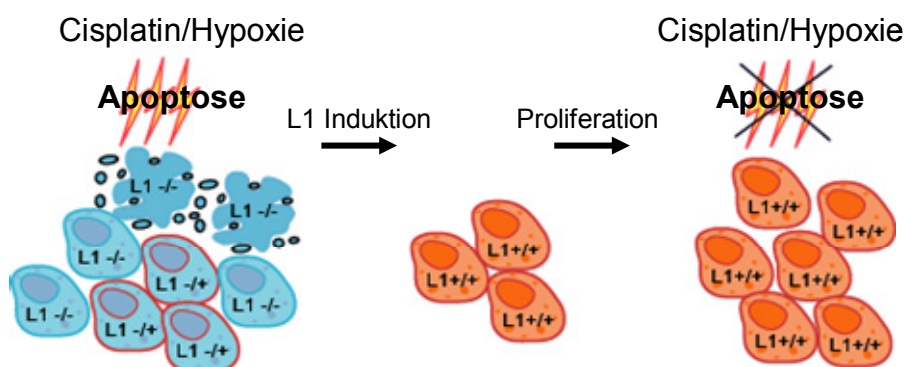
Tumorzellen entwickeln oftmals Strategien um sich gegen Apoptose-induzierende Einflüsse zu schützen. Sie sind also nicht immer von Anfang an gegen diese resistent sondern passen sich den gegebenen Umständen an (Okuda et al., 2005). So kann das Auftreten von Hypoxie im Tumorgewebe oder die Behandlung mit Chemotherapeutika die Genexpression der Zellen beeinflussen und somit zur Generierung neuer hochresistenter Klone führen (Schabel et al., 1980; Fink et al., 1998; Lin und Howell, 1999; Weinmann et al., 2005). Durch die Behandlung zweier schwach L1-exprimierender Tumorzelllinien mit Cisplatin konnte beobachtet werden, dass Zellen die nach der Behandlungsphase noch am Leben waren, eine deutlich erhöhte L1 Oberflächenexpression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigten (Abb. 15). Dabei stellt sich die Frage, ob dieser Effekt auf eine veränderte Genregulation als eine Antwort auf die Behandlung zurückzuführen ist oder ob es sich dabei um eine Selektion und Anreicherung bereits vorhandener L1-positiver Zellen handelt (**Abb. 59**). Wykoff et al.

(2004) identifizierten L1 in einer Genexpressionsanalyse verschiedener Zelllinien (786-0, A549, HBL100) als ein durch Hypoxie induzierbares Gen. Somit haben diese Zellen die Möglichkeit L1 als ein zytoprotektiv wirkendes Molekül in Reaktion auf die Hypoxie vermehrt zu exprimieren. Gavert et al. (2005) beobachteten, dass verschiedene Kolonkarzinomzelllinien ihr L1 Expressionsprofil unter bestimmten Zellkulturbedingungen verändern können. Sowohl in HCT116 als auch in SW480 Zellen war die L1 Expression deutlich verstärkt wenn die Zellen in einer geringen Dichte kultiviert wurden. Mit zunehmender Konfluenz konnte auch weniger L1 nachgewiesen werden. Die Autoren zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen einer  $\beta$ -Catenin vermittelten Genregulation und der Expression von L1 (Gavert et al., 2005).

### A Selektionsmodell



### B Induktionsmodell



**Abb. 59: Mögliche Modelle zur Anreicherung L1-positiver Zellen aus einer Mischpopulation durch Induktion der Apoptose. (A) Selektion:** bei der Behandlung einer Mischpopulation L1-positiver und -negativer Zellen sterben überwiegend die L1-negativen Zellen ab. Dadurch kommt es zur Selektion und Anreicherung bereits vorhandener L1-positiver Zellen, die deutlich resistenter gegen Apoptose sind. **(B) Induktion:** schwach L1-exprimierende Zellen sind in der Lage auf Hypoxie oder Behandlung mit Cisplatin mit einer veränderten Genregulation zu reagieren. Die zunehmende Expression von L1 schützt die Zellen vor Apoptose und führt ebenfalls zur Anreicherung L1-positiver Zellen.

In weiteren Untersuchungen muss sich erst noch zeigen, ob die Behandlung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen mit Cisplatin einen Einfluss auf die Expression von L1 hat. Dennoch ist die Beobachtung, dass L1-positive Zellen durch Cisplatin angereichert werden können, im Hinblick auf die Behandlung von Ovarialkarzinom-Patientinnen, äußerst interessant. Es zeigt die Dringlichkeit der Entwicklung alternativer Therapien.

Zurzeit wird in unserer Arbeitsgruppe zusammen mit verschiedenen Kooperationspartnern an einer Therapie, die sich speziell gegen L1-positive Tumorzellen richtet, geforscht. Hierbei wird der Antikörper L1-11A verwendet. Die Behandlung mit dem Antikörper konnte sowohl Migration als auch Proliferation L1-positiver Tumorzellen *in vitro* blockieren (Arlt et al., eingereicht 2005). Auch *in vivo* konnten mit L1-11A erste Erfolge beobachtet werden, wobei die Behandlung das Tumorstadium in Mäusen deutlich inhibierte (Arlt et al., eingereicht 2005). Weiterhin ist es denkbar, eine solche Antikörpertherapie mit der Chemotherapie zu verbinden, da Tumorgewebe nicht immer homogen positiv für L1 sind. Gavert et al. (2005) konnten beim Kolonkarzinom L1-positive Zellen nur in der invasiven Front nachweisen, während die innere Tumormasse negativ war. Ähnliche Beobachtungen machten auch Gast et al. (2005) beim Ovarialkarzinom. Die Kombination beider Therapien würde die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass alle Tumorzellen getötet werden. Zudem könnte die in eigenen Untersuchungen beobachtete Selektion L1-positiver Zellen durch das Chemotherapeutikum mit dem Antikörper verhindert werden. Solch eine Kombinationstherapie aus Chemotherapeutikum und Antikörpern wird bereits bei der Behandlung von Brustkrebs angewendet (zusammengefasst in De Laurentiis et al., 2005). Dabei wird Patientinnen der Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) sowie ein Chemotherapeutikum verabreicht. Der Antikörper ist gegen ErbB2 (HER2), ein Mitglied der EGFR (*epidermal growth factor receptor*) Familie, gerichtet. ErbB2 ist in etwa 20-30% der invasiven Mammakarzinome überexprimiert (Ross et al., 1998; De Laurentiis et al., 2002). In einer klinischen Phase III Studie konnten Slamon et al. (2001) eine signifikant erhöhte Überlebensrate nach der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit dem Chemotherapeutikum beobachten. Kürzlich auf dem „ASCO Meeting 2005“ präsentierte Ergebnisse zeigten, dass Herceptin® auch als *first-line* Therapie erfolgreich angewendet werden kann.

## 6.2 Mechanismen der anti-apoptotischen Wirkung von L1

Die vorgestellten Daten haben gezeigt, dass die Expression von L1 mit der Apoptoseresistenz korreliert. Allerdings lässt sich hieraus nicht ableiten, dass L1 selbst direkt daran beteiligt ist. Chen et al. (1999a) führten die durch Behandlung mit löslichem L1 hervorgerufene Resistenz von Neuronen auf eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-2 (B-Zell-Lymphom-Proto-onkogen-2) zurück. Auch in eigenen Untersuchungen konnten HEK293 Zellen durch die Behandlung mit löslichem L1 vor Apoptose geschützt werden (Abb. 16). Des Weiteren zeigten HEK293-hL1 Zellen unter apoptotischen Bedingungen eine erhöhte Expression von Bcl-2 im Vergleich zu L1-negativen HEK293 Zellen (Abb. 17).

Die Bcl-2 Familie, zu der das Bcl-2 Molekül gehört, reguliert die mitochondriale Apoptoseinduktion (Kim, 2005). Mitglieder dieser Familie, die überwiegend durch c-terminale hydrophobe Ketten in der Mitochondrienmembran verankert vorliegen, besitzen sowohl pro-apoptotische (Bax, Bak) als auch zytoprotektive (Bcl-2, Bcl-x) Eigenschaften. Bcl-2 selbst inhibiert die Freisetzung von Cytochrom c, des Apoptose-induzierenden-Faktors (AIF) und der Proteine Smak und Diablo aus der äußeren Mitochondrienmembran (Adams et al., 1998, Kim, 2005). Es stellt sich nun die Frage, wie L1 die Expression von Bcl-2 beeinflussen kann.

In der Literatur lassen sich Hinweise darauf finden, dass Integrine eine bedeutende Rolle dabei spielen könnten. So gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen der Zelladhäsion und der Resistenz gegen Apoptose: verlieren Zellen den Integrin-vermittelten Kontakt zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix (ECM), kann dies bereits zur Induktion von Apoptose führen (Anoikis); umgekehrt kann die Resistenz gegen Apoptose durch Bindung von Liganden oder Bestandteilen der ECM an Integrine erhöht werden (Guo und Giancotti, 2005). Die dadurch aktivierten Signalwege beeinflussen die Expression von pro- und anti-apoptotischen Molekülen. Reginato et al. (2003) konnten beobachten, dass die Expression des pro-apoptotischen Moleküls BIM der Bcl-2 Familie durch Integrin-vermittelte Signalwege inhibiert wird. In CHO Zellen kann die Expression von Bcl-2 durch die Bindung der Integrine  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha v\beta 3$  an RGD-Motive in Vitronektin bzw. Fibronektin erhöht werden (Matter und Ruoslahti, 2001). Die Signaltransduktion erfolgt durch die Rekrutierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) an die  $\beta$ -Untereinheit der Integrine. FAK selbst aktiviert dann den PI3K/Akt Signalweg, der zur erhöhten Expression von Bcl-2 führt (Matter und Ruoslahti, 2001).

FAK ist der wichtigste Mediator Integrin-abhängiger Signalwege, die nicht nur das Überleben von Zellen, sondern auch deren Motilität und Proliferation regulieren (Guo und Giancotti, 2004). Eine motilitätsfördernde Wirkung von L1 durch Interaktionen mit Integrinen wurde bereits vielfach beschrieben (Mechtersheimer et al., 2001; Voura et al., 2001; Siletti et al., 2004; Gutwein et al., 2005; Gast et al., 2005). Arbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, dass L1 über ein RGD-Motiv in der sechsten Ig-Domäne an Integrine binden kann (Mechtersheimer et al., 2001). Gutwein et al. (2005) konnten nachweisen, dass lösliches L1 aus Aszites durch Bindung an die Integrine  $\alpha\beta5$  und  $\alpha5\beta1$  die haptotaktische Migration von HEK293 Zellen fördert. Ein geringer Effekt auf die L1-vermittelte Migration von HEK293 Zellen konnte durch blockierende Antikörper gegen  $\alpha\beta3$  beobachtet werden (Gutwein et al., 2005). Auch andere Studien belegen eine Interaktion von L1 mit  $\alpha\beta3$  (Montgomery et al., 1996; Duczmal et al., 1997; Voura et al., 2001; Hall et al., 2004, Hall und Hubbel, 2004). L1 kann demnach an die gleichen Integrine binden, die nach Matter und Ruoslahti (2001) die Expression von Bcl-2 beeinflussen. Es ist also durchaus möglich, dass die in dieser Arbeit beobachtete Protektion von HEK293 Zellen durch lösliches L1 und die erhöhte Expression von Bcl-2 in HEK293-hL1 über Integrin-abhängige Signalwege vermittelt werden.

Eine mögliche L1-abhängige Expression von Bcl-2 in Ovarialkarzinomzellen muss erst noch untersucht werden. Interessanterweise wird jedoch in verschiedenen Studien Bcl-2, oder das Homologe Bcl-xL, für die Resistenz von Ovarialkarzinomen gegen Chemotherapeutika verantwortlich gemacht (Mano et al., 1999; Kim et al., 2004; Raspollini et al., 2004; Williams et al., 2005). Dabei korreliert die Expression von Bcl-2 oder Bcl-xL ebenfalls mit einer schlechten Prognose für die Patientinnen, in ähnlicher Weise, wie es für das L1 Molekül beschrieben ist (Mano et al., 1999; Williams et al., 2005; Fogel et al., 2003).

Die Depletion von Bcl-2 durch siRNA wird bereits als weiterer Therapieansatz diskutiert um die Chemoresistenz von Tumorzellen zu verringern (Kim et al., 2004).

Verglichen mit dem Effekt von löslichem L1 schützt eine stabile L1 Expression die Zellen deutlich besser vor Apoptose. Dies lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass stabil L1 exprimierende Zellen ständig lösliches L1 produzieren, während den L1-negativen Zellen lediglich eine einmalige Dosis vor der Induktion der Apoptose zugegeben wurde. Es gibt jedoch Hinweise auf einen weiteren Mechanismus, wie die L1 Expression eventuell Zellen vor Apoptose schützen kann.

In unabhängigen Studien konnten sowohl Gast et al. (2005) als auch Siletti et al. (2004) zeigen, dass L1 die Expression verschiedener Gene reguliert. Siletti et al. (2004) untersuchten

den Einfluss der L1 Expression in NIH3T3 Mausfibroblasten und K1735 Melanomzellen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die stabile Expression von L1 zu einer dauerhaften Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) führte. Bei der ERK-Aktivierung unterscheidet man zwischen einer kurzen, transienten und einer anhaltenden, chronischen Aktivierung. Für eine Translokation von ERK in den Nukleus und eine daraus resultierende Aktivierung von Transkriptionsfaktoren ist eine länger anhaltende Aktivierung von ERK erforderlich (Schaeffer und Weber, 1999; Colucci-D'Amato et al., 2003; Morrison and Davis, 2003). Siletti et al. (2004) konnten beobachten, dass die L1-induzierte anhaltende Aktivierung von ERK die Transkription von ERK-abhängigen Genen, wie die Cysteinproteasen Cathepsin-B und -L, Osteopontin, CD44 und RhoC, induziert. Diese Veränderungen in der Genexpression bewirken eine Zunahme im migratorischen und invasiven Verhalten der Zellen (Siletti et al., 2004). In L1-positiven Zellen ist zudem das Apoptose-Inhibitor-Protein-5 (IAP-5) deutlich überexprimiert. IAP-5 ist ein Caspase-Inhibitor, der die Funktion des Apoptosoms blockiert. Beim mitochondrialen Weg der Apoptose bilden Cytochrom c, Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) mit der Pro-Caspase-9 das Apoptosom, wodurch zusammen mit dATP die Caspase-9 durch Abspalten der Pro-Domäne aktiviert wird (Kim, 2005; Ghobrial et al., 2005).

Zudem konnte in den Studien von Siletti et al. (2004) und Gast et al. (2005) übereinstimmend  $\alpha\beta3$  als ein Integrin identifiziert werden, das in Abhängigkeit von der L1 Expression über ERK-vermittelte Signaltransduktion reguliert wird. Dies konnte sowohl für 3T3 (Siletti et al., 2004) als auch für HEK293 Zellen (Gast et al., 2005) bestätigt werden.

Die oben genannten Befunde zeigen einen möglichen direkten Zusammenhang zwischen der Expression von L1, der Regulation des Integrins  $\alpha\beta3$  und der erhöhten Expression von Bcl-2 in HEK293 Zellen. Die Protektion von Ovarialkarzinomzellen lässt sich auf diese Weise nicht erklären. Im Gegensatz zu den HEK293 und den 3T3 Zellen konnte in diesen keine Regulation von  $\alpha\beta3$  in Abhängigkeit von L1 beobachtet werden. Gast et al. (2005) postulieren daher eine zelltypspezifische Regulation des Integrins durch L1. Weiterhin zeigen die Autoren auch keine Ko-Expression von L1 und  $\alpha\beta3$  in Ovarialkarzinomgeweben.  $\alpha\beta3$  ist jedoch nicht das einzige Integrin, welches die Bcl-2 Expression beeinflussen kann. So müssen erst weitere Untersuchungen zeigen, ob zelltypspezifisch auch andere Integrine durch L1 reguliert werden können, die eine ähnliche Funktion wie  $\alpha\beta3$  erfüllen.

### 6.3 Durch Apoptose induzierte Spaltung von L1

Lösliches L1 erhöht die Motilität von Tumorzellen und kann, wie in dieser Arbeit gezeigt, Zellen vor Apoptose schützen. Aus diesem Grund sollte die Spaltung von L1 unter apoptotischen Bedingungen näher charakterisiert werden. Dabei wurde festgestellt, dass verschiedene apoptotische Stimuli die Spaltung von L1 deutlich erhöhen. Die Freisetzung von löslichem L1 konnte sowohl durch Metalloproteinase-Inhibitoren als auch durch den Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk vermindert werden (Abb. 18). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass L1 auch während der Apoptose durch Metalloproteinasen gespalten wird.

In früheren Arbeiten wurde bereits eine Beteiligung der Metalloproteinase ADAM10 bei der L1 Spaltung unter konstitutiven Bedingungen mit Hilfe einer dominant negativen Form der Protease (DN-ADAM10) aufgezeigt (Mechtersheimer et al., 2001). Dies konnte durch Depletion von ADAM10 und ADAM17 mit Antisenseoligonukleotiden in OVMz Zellen bestätigt werden. Jedoch wurde die Freisetzung von löslichem L1 unter apoptotischen Bedingungen durch die Depletion nicht inhibiert. Möglicherweise sind hier multiple Metalloproteasen an der Spaltung von L1 beteiligt. Eine ähnliche Beobachtung machten Egeblad und Werb (2002). Sie zeigten, dass der EGF-Rezeptor Ligand HB-EGF ebenfalls unter dem Einfluss der Apoptose durch multiple Proteasen vermehrt gespalten wird. Somit scheint es sich hierbei möglicherweise um einen allgemeinen Mechanismus zu handeln. Eine weitere interessante Beobachtung in diesem Zusammenhang war, dass sowohl OVMz als auch CHO-hL1 Zellen deutlich empfindlicher auf Hypoxie reagierten, wenn diese zusätzlich mit einem Metalloproteinase-Inhibitor behandelt wurden. In ähnlicher Weise kann auch die L1-abhängige haptotaktische Zellmigration durch Metalloproteinase-Inhibitoren blockiert werden (Mechtersheimer et al., 2001). Dies konnte auf die fehlende Generierung von löslichem L1 zurückgeführt werden, da die Zugabe von löslichem L1 die Inhibition der Zellmigration wieder aufheben konnte (Mechtersheimer et al., 2001). Möglicherweise ist das Fehlen der zusätzlich durch Apoptose generierten löslichen Schutzfaktoren, wie L1, auch für die verminderte Resistenz verantwortlich. Ein solcher Mechanismus konnte bereits identifiziert werden. Verschiedene Mitglieder der ADAM Familie spalten, wie bereits erwähnt, den Heparin-bindenden EGF-Vorläufer (pro-HB-EGF), wodurch lösliches HB-EGF freigesetzt wird. Durch die Bindung an den EGFR werden Signale generiert, die Zellen vor Apoptose schützen, bzw. Zellteilung und -migration fördern (Yarden und Sliwkowsky, 2001; Yu et al., 2002). Eine Studie von Fischer et al. (2004) konnte nachweisen, dass die Spaltung von pro-HB-EGF in Tumorzellen durch osmotischen oder oxidativen Stress induziert werden



kann. Die vermehrte Produktion von löslichem HB-EGF wurde auch hier durch multiple Metalloproteinasen (ADAM9, -10 und -17) vermittelt und führte zur erhöhten Aktivierung EGFR-abhängiger Signalwege. Die gleichzeitige Behandlung von Tumorzellen mit dem Chemotherapeutikum Doxorubizin und dem Metalloproteinase-Inhibitor Batimastat resultierte in einer deutlich verminderten Resistenz gegen Apoptose (Fischer et al., 2004). Die Autoren führten dies auf die fehlende Generierung von löslichem HB-EGF zurück, das von Zellen als autokrines Überlebenssignal genutzt werden kann. Metalloproteinase-Inhibitoren, wie Batimastat und Marimastat, werden bereits in der Krebstherapie eingesetzt (Hidalgo und Eckhardt, 2001).

## 6.4 Exosomen von Ovarialkarzinomzellen

Die Induktion der Apoptose führt zur vermehrten Spaltung von L1 in charakteristischen Membranbläschen. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass L1 entweder direkt von der Oberfläche von CHO-hL1 und HEK293-hL1 Zellen abgespalten oder durch sekretorische Vesikel freigesetzt werden kann (Gutwein et al., 2003). Zur Unterscheidung der apoptotischen Membranbläschen und der konstitutiv freigesetzten Vesikel wurde eine Methode etabliert, um diese zu trennen und näher zu charakterisieren. Eine Auftrennung der unterschiedlichen vesikulären Strukturen gelang durch einen Saccharose-Dichte-Gradienten. Neben der Charakterisierung von konstitutiven Vesikeln war die Untersuchung der Bedeutung dieser für die Spaltung von L1 ein weiterer Bestandteil der Arbeit.

Eine in der Literatur bereits beschriebene Vesikelart sind die Exosomen. Diese können einerseits über ihre distinkte Dichte, die jedoch zelltypspezifisch aufgrund unterschiedlichen Proteingehalts variieren kann (Stoorvogel et al., 2002), andererseits durch den Nachweis bestimmter Markerproteine identifiziert werden (zusammengefasst in Fevrier und Raposo, 2004). Tatsächlich konnte eine Ko-Lokalisation von L1 und ADAM10 mit dem Exosomenmarker CD9 im Saccharose-Gradienten in Vesikeln von OVMz Zellen gezeigt werden (Abb. 25). Dies war der erste Hinweis darauf, dass es sich bei diesen Vesikeln um Exosomen handeln könnte. Mit Moesin, hsp70 und Annexin-I wurden noch weitere Exosomen-spezifische Marker detektiert. Durch eine FACS-Analyse isolierter Vesikel konnte auch die richtige Orientierung der Antigene festgestellt werden (Abb. 26). Die Anwesenheit von Exosomenmarker, die spezifische Dichte und die Orientierung der untersuchten Antigene

stimmen mit der Definition von Exosomen nach Thery et al. (2001) überein. In weiteren biochemischen Analysen konnten neben L1 und ADAM10 auch CD44 und ADAM17 erstmals in Exosomen von Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden.

Auch die durch „*ectodomain shedding*“ generierten Spaltfragmente von L1 und CD44 waren in Exosomen detektierbar. Eine kürzlich durchgeführte Studie von Nagano et al. (2004) hat gezeigt, dass CD44 unter PMA-Stimulation durch ADAM17 bzw. unter dem Einfluss von Kalzium durch ADAM10 gespalten werden kann. In weiteren Studien konnte ebenfalls eine erhöhte ADAM10 vermittelte Spaltung von Betacellulin, einem Mitglied der EGF-Familie (Sanderson et al., 2005), bzw. dem Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin (Maretzky et al., 2005) unter dem Einfluss von Kalzium beobachtet werden. Savina et al. (2003) beschrieben einen weiteren durch Kalzium induzierten Effekt in K562 Zellen. Hier kommt es durch den Einstrom von Kalzium zu einer verstärkten Ausschüttung von Exosomen. Es stellte sich also die Frage, ob es zwischen der Kalzium-induzierten Spaltung und der Freisetzung von Exosomen einen direkten Zusammenhang gibt. Tatsächlich führte die Behandlung von SKOV3ip Zellen mit dem Ionomyzin-Kalziumsalz zur Verdreifachung der freigesetzten Exosomenmenge, in denen auch die Spaltfragmente von L1 und CD44 akkumulierten (Abb. 29, 30). Eine genauere Analyse des Zelllysats ergab, dass bei einer 30-minütigen Behandlung mit Ionomycin die Menge an L1-32 im Vergleich zu den Kontrollzellen zunächst deutlich anstieg. Durch die Auftrennung der intrazellulären Kompartimente im Saccharose-Gradienten konnte gezeigt werden, dass die L1 Spaltung in Membranstrukturen der Endosomen und des Golgi-Apparates stattfindet (Abb. 32). Nach 60-minütiger Behandlung nahm die detektierbare Menge an L1-32 jedoch ab. Eine parallel durchgeführte Untersuchung der freigesetzten Exosomen machte deutlich, dass nach 60min die Exosomenausschüttung stark erhöht war. Außerdem konnte die Zunahme von L1-32 in den Exosomen detektiert werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die im Saccharose-Gradienten identifizierten Membranstrukturen zu den *multivesicular bodies* (MVBs) gehören. Dies lässt sich aus der Biogenese von Exosomen ableiten.

Exosomen werden durch Fusion der limitierenden Membran der MVBs in den extrazellulären Raum freigesetzt (Fevrier und Raposo, 2004). MVBs sind späte Endosomen, die durch einen Reifungsprozess aus den frühen Endosomen entstehen. Der Reifungsprozess beinhaltet sowohl die Akkumulation zahlreicher intraluminaler Vesikel (ILV, die späteren Exosomen) als auch eine veränderte Fusionsbereitschaft mit Transportvesikeln aus dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Von dort werden Proteine des biosynthetisch-sekretorischen Transportwegs

in die MVBs transportiert. Die Spaltung von L1 und CD44 wird vermutlich in den ILV der MVBs initialisiert und im weiteren Verlauf werden die ILV als Exosomen freigesetzt. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung der ADAMs durch Proproteinkonvertasen, wie Furin oder PC7, im TGN katalysiert wird (Lun et al., 1998, Roghani et al., 1999, Kang et al., 2002). Es wäre demnach möglich, dass der Kalziumeinstrom zur Aktivierung von ADAM10 im TGN führt und die Protease anschließend in die MVBs rekrutiert wird, wo sie auf ihr Substrat trifft.

Vorausgegangene Arbeiten unserer Gruppe hatten gezeigt, dass die Behandlung von Zellen mit dem Cholesterol-extrahierenden Agens MCD sowohl die Spaltung von L1 erhöht als auch die Freisetzung von L1 in Vesikeln fördert (Gutwein et al., 2003). Dies ließ vermuten, dass noch weitere Substanzen einen ähnlichen Mechanismus nutzen, wie er für das Kalzium-Ionophor identifiziert werden konnte. Tatsächlich zeigten die durchgeführten Untersuchungen, dass MCD, APMA und der Calmodulin-Inhibitor TFP die Spaltung von L1 und CD44 in Membranstrukturen der Endosomen und des TGN induzierten und dies in einem direkten Verhältnis mit der Ausschüttung von Exosomen steht (Abb. 34, 35, 36). Diese Beobachtung war unerwartet, da einige Studien bisher die Induktion der Spaltung auf andere Mechanismen zurückführten.

Durch APMA werden latente Metalloproteinasen durch das Entfernen der inhibitorischen Pro-Domäne aktiviert (Allinson et al., 2004; Sanderson et al., 2005). Sowohl APMA als auch das Kalzium-Ionophor können die Spaltung des EGF-Rezeptor Liganden Betacellulin durch Aktivierung von ADAM10 stimulieren (Sanderson et al., 2005). Weitere Studien zeigten, dass Pro-TGF- $\alpha$  sowohl in ADAM17 defizienten Fibroblasten als auch in CHO-M2 Zellen durch den Einfluss von APMA vermehrt gespalten wird (Borroto et al., 2003). ADAM17 ist für die Spaltung von Pro-TGF- $\alpha$  unter konstitutiven Bedingungen verantwortlich (Sahin et al., 2004), jedoch scheint APMA auch in diesem Fall andere Proteasen zu aktivieren, die die induzierte Spaltung katalysieren.

Auch Calmodulin-Inhibitoren, wie TFP, beeinflussen die Aktivität von Metalloproteinasen zu beeinflussen. So konnten frühere Studien zeigen, dass die Behandlung von Zellen mit den Inhibitoren die Spaltung von L-Selektin, L1 und CD44 erhöht (Kahn et al., 1998; Kalus et al., 2003; Nagano et al., 2004). Dabei scheint Calmodulin speziell die Aktivität von ADAM10 zu reguliert (Nagano et al., 2004). Vermutlich wird die Dissoziation des Calmodulin von Pro-ADAM10 unter dem Einfluss von Kalzium gefördert, was eine Aktivierung der Protease zur Folge hat. Ähnlich wirken Calmodulin-Inhibitoren, die ebenfalls zur Aktivierung von

ADAM10 führen (Nagano et al., 2004). Da die Aktivierung der Metalloproteinasen im TGN stattfindet (Lun et al., 1998, Roghani et al., 1999, Kang et al., 2002), könnte die vermehrte Aktivierung gleichzeitig zu einer erhöhten Rekrutierung der Proteasen in die MVBs führen.

Die Behandlung von Zellen mit dem Cholesterol-extrahierenden Agens MCD führt zur ADAM10 vermittelten Spaltung von APP (Kojro et al., 2001), von CD30 (von Tresckow et al., 2004) und des IL-6-Rezeptors (Matthews et al., 2003). Im Gegensatz zu APMA und TFP scheint es sich jedoch nicht um eine unmittelbare Aktivierung von Metalloproteinasen zu handeln. Kojro et al. (2001) postulierten, dass die vermehrte Spaltung von APP durch eine erhöhte Fluidität der Plasmamembran nach Cholesterinentzug bedingt ist. Demzufolge treffen Protease und Substrat vermehrt an der Plasmamembran aufeinander (Kojro et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine erhöhte Spaltung von L1 an der Zelloberfläche beobachtet werden. Auch eine erst nach der Spaltung erfolgte Internalisierung scheint unwahrscheinlich, da durch den Entzug von Cholesterol die Clathrin-vermittelte Endozytose blockiert wird (Subtil et al., 1999; Rodal et al., 1999). Es ist jedoch bekannt, dass lösliches APP $\alpha$  auch im TGN und innerhalb des sekretorischen Weges vom TGN zur Plasmamembran generiert wird (Xu et al., 1995; Sambamurti et al., 1992; Kouchi et al., 1998). Da die Behandlung der Zellen mit MCD auch zur partiellen Fragmentierung des Golgi-Apparates in vesikuläre Strukturen führt (Hansen et al., 2001), könnte die induzierte Spaltung von APP auch in diesen Kompartimenten stattfinden. Übertragen auf das L1 Molekül würde dies bedeuten, dass die im Saccharose-Gradienten identifizierten Membranstrukturen, in denen L1-32 detektiert wurde, ebenfalls durch Fragmentierung des Golgi-Apparates entstanden sind und in ähnlicher Weise wie die ILV der MVB freigesetzt wurden.

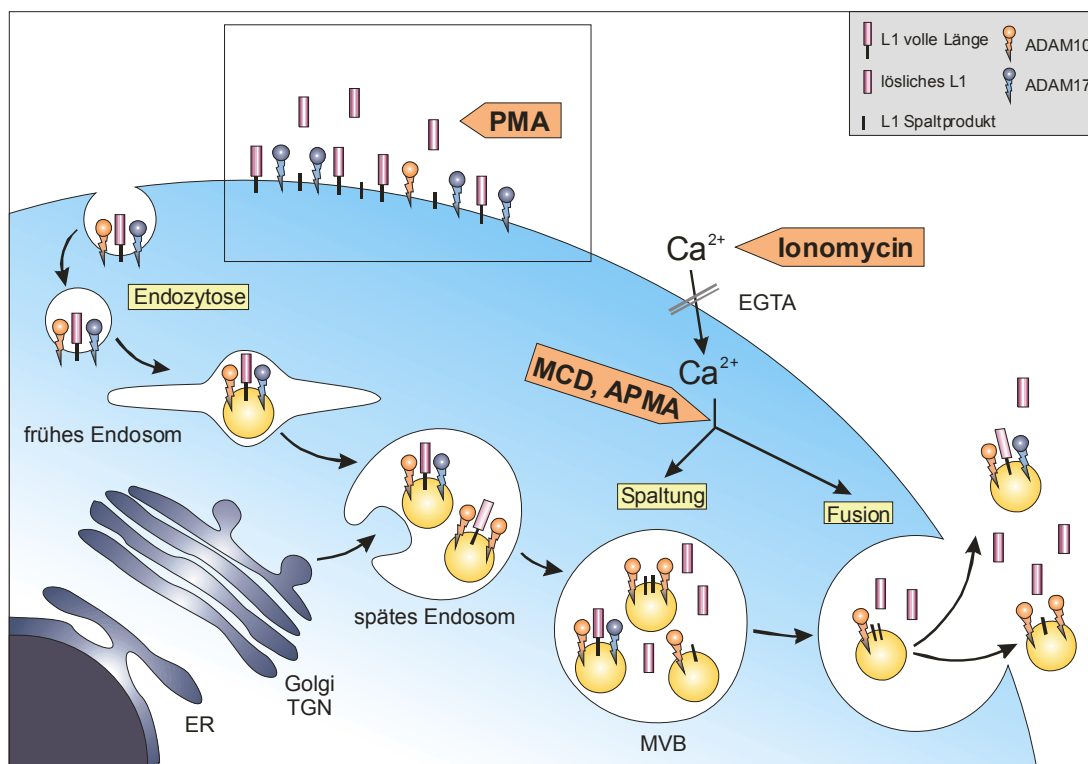
Verglichen mit den zuvor beschriebenen Substanzen scheint die Stimulation der Zellen mit PMA einen weiteren Mechanismus zu aktivieren. Zwar führte die Behandlung mit PMA ebenfalls zur vermehrten intrazellulären Spaltung von L1 im scheinbar gleichen Kompartiment, jedoch konnte dies nicht in Verbindung mit einer vermehrten Exosomen-Freisetzung beobachtet werden (Abb. 35). Aus vorangegangenen Arbeiten war bereits bekannt, dass in CHO-hL1 Zellen die Stimulation mit PMA zur vermehrten Spaltung von L1 an der Plasmamembran führt (Gutwein et al., 2003). Dies wurde unter anderem daraus ersichtlich, dass L1-32 und L1-200 an der Plasmamembran biotinyliert werden konnten. Die Spaltung von L1 an der Zelloberfläche der Ovarialkarzinomzellen konnte hier nicht beobachtet werden. Daraus lässt sich ein Unterschied im Mechanismus der PMA-

Induzierbarkeit verschiedener Zelllinien erkennen. Aus einer Studie von Jolly-Tornetta und Wolf (2000) geht hervor, dass die  $\alpha$ -Spaltung von APP durch PMA sowohl an der Zelloberfläche als auch im Golgi/TGN erhöht werden kann. In Ovarialkarzinomzellen führt die Behandlung mit PMA eventuell zur Spaltung von L1 in Membranstrukturen des Golgi/TGN und nicht in denen der MVBs, die in den gleichen Fraktionen des Gradienten akkumulieren. Ungeklärt bleibt jedoch, warum die Spaltung in Ovarialkarzinomzellen nicht an der Plasmamembran stattfindet. Diese Beobachtung könnte auf verschiedenen Ursachen beruhen. Durch die Behandlung mit PMA wird der Proteinkinase C (PKC)-abhängige Signalweg induziert, der zur erhöhten enzymatischen Aktivität einer Metalloproteinase, vermutlich ADAM17, führt (Buxbaum et al., 1998; Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Buxbaum et al. (1998) beobachteten, dass die Spaltung von APP in ADAM17 defizienten Zellen unter konstitutiven Bedingungen normal verlief, jedoch führte die PMA Stimulation zu keiner erhöhten Spaltung. Mögliche Mutationen der PKC in Ovarialkarzinomzellen können einen Einfluss auf die in der Signalkaskade nachfolgenden Moleküle haben und so die Induktion der Spaltung durch ADAM17 blockieren. In CHO-hL1 Zellen konnte mittlerweile ADAM17 als Protease identifiziert werden, die die PMA induzierte Spaltung von L1 an der Zelloberfläche katalysiert, nicht aber in OVMz oder SKOV3ip Zellen (Daten von S. Riedle). Merlos-Suarez et al. (1998) zeigten, dass die PMA-induzierte Spaltung in CHO-M2 Zellen für verschiedene Substratmoleküle defekt war. Wie sich herausstellte beruhte dies auf fehlerhafter Aktivierung und Transport von ADAM17.

Die bisher aufgeführten Studien schreiben ADAM17 eine zentrale Rolle bei der PMA-Induzierbarkeit zu. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Marezky et al. (2005) demonstrierte jedoch, dass das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin in Fibroblasten und Keratinozyten durch PMA-Stimulation vermehrt durch ADAM10 gespalten wird. Zudem zeigten eigene Untersuchungen, dass sowohl ADAM10 als auch ADAM17 an der Plasmamembran von Ovarialkarzinomzellen nachweisbar sind. Da weder konstitutiv noch durch die bisher untersuchten Stimuli die Spaltung von L1 an der Plasmamembran beobachtet werden konnte, scheint ein Defekt der Proteasen eher unwahrscheinlich. Denkbar sind jedoch auch natürliche Regulationsmechanismen. Bennett et al. (2000) konnten nachweisen, dass L-Selektin durch Interaktion mit einer Protein-Disulfid-Isomerase in einer nicht spaltbaren Konformation vorliegt. Phenyl-Arsin-Oxid modifiziert die dabei gebildeten Disulfidbrücken und induziert die Spaltung von L-Selektin. Demnach ist denkbar, dass auch L1 in einer nicht spaltbaren Konformation vorliegt. Schließlich könnten L1 und die PMA-induzierte Protease durch Lokalisation in unterschiedlichen Lipidrafts voneinander getrennt sein. Genauere

Untersuchungen sind jedoch nötig um die Regulation der unterschiedlichen Mechanismen richtig einzuordnen.

Die vorliegende Arbeit deckt unterschiedliche Mechanismen zur Generierung von löslichem L1 auf: einerseits durch Spaltung von L1 an der Plasmamembran, durch PMA induzierbar und ADAM17 vermittelt; andererseits durch Spaltung in den ILV der MVBs, wobei lösliches L1 erst nach deren Freisetzung als Exosomen im extrazellulären Milieu nachgewiesen werden kann (**Abb. 60**). In Ovarialkarzinomzellen konnte nur der letztere Mechanismus identifiziert werden. Dieser ist möglicherweise für die Freisetzung von löslichem L1 unter konstitutiven Bedingungen essentiell.



**Abb. 60: Modell der Spaltung von L1 in den ILV der MVB.** In Ovarialkarzinomzellen findet die ADAM10 vermittelte Spaltung von L1 unter konstitutiven Bedingungen ausschließlich in den ILV der MVB statt. Der Einstrom von Kalzium in die Zellen erhöht sowohl die Spaltung in den ILV als auch deren Freisetzung als Exosomen. Die Stimulation durch APMA und MCD scheint ebenfalls einen ähnlichen Mechanismus zu aktivieren, der neben einer vermehrten Spaltung auch die Freisetzung von Exosomen-ähnlichen Vesikeln fördert. Die PMA induzierte Spaltung an der Plasmamembran, durch ADAM17 katalysiert, konnte zwar in CHO-hL1 Zellen beobachtet werden, aber nicht in Ovarialkarzinomzellen.

### 6.4.1 Charakterisierung der Exosomen aus Aszites

Aus einer Studie von Taylor et al. (1998) ging hervor, dass Exosomen in Abhängigkeit vom Stadium der Krebserkrankung in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachweisbar sind. In dieser Arbeit wurden Vesikel aus Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen untersucht. In der Aszitesflüssigkeit sind verschiedene Zellen, wie Mesothelzellen, Lymphozyten und auch Tumorzellen vorhanden. Fogel et al. (2003) konnten lösliches L1 im Aszites und im Serum von Ovarialkarzinom-Patientinnen mit L1-positivem Tumor nachweisen. Dies führte zu der Vermutung, dass hier ein ähnlicher Mechanismus zur Produktion von löslichem L1 vorliegt, wie er für Ovarialkarzinomzellen *in vitro* gezeigt werden konnte. Um dies zu klären, wurden aus Aszites isolierte Vesikel mit den gleichen Methoden, wie für die Zelllinien beschrieben, untersucht. Hierbei zeigte sich, dass *in vivo* Vesikel mit gleicher Dichte und denselben Markerproteinen nachweisbar sind wie *in vitro* (Abb. 43). In Vesikeln von vier Patientinnen konnte L1-28 in apoptotischen Membranbläschen detektiert werden. Dabei handelt es sich vermutlich um ein Abbauprodukt von L1-32, das ebenfalls in Vesikeln aus den Kulturüberständen von OVMz Zellen vorkommt. Im Aszites einer Patientin konnten zusätzlich L1-32 sowie Spaltfragmente von CD44 in den Exosomen-Fractionen des Saccharose-Gradienten identifiziert werden. Ein weiterer Aszites war negativ für lösliches L1 und tatsächlich konnten auch keine L1-positiven Vesikel darin gefunden werden. Bei allen Patientinnen korrelierte die Menge an löslichem L1 im Aszites mit der Anwesenheit von L1-positiven Vesikeln (Abb. 43). Des Weiteren konnten in den Exosomen aller Patientinnen sowohl ADAM10 als auch ADAM17 detektiert werden. Diese waren jedoch nicht in den Fractionen der Membranbläschen enthalten.

Bisher ungeklärt ist die Frage, warum L1 in den Exosomen von nur einer Patientin detektierbar war. Hinweise hierfür lassen sich jedoch aus Vorarbeiten und verschiedenen anderen Studien finden. Gutwein et al. (2003) beobachteten, dass bevorzugt die neuronale Form von L1, welche das Exon 27 mit der Aminosäuresequenz RSLE enthält, in konstitutive Vesikel rekrutiert wird, während die nicht neuronale Form dort kaum nachweisbar ist. Das RSLE-Motiv führt nach Dephosphorylierung eines Tyrosins unmittelbar vor diesem zu einer verstärkten Clathrin-vermittelten Endozytose von L1 (Kamiguchi et al. 1998; Schaefer et al., 2002). Die nicht neuronale Form wird hingegen über einen vermutlich Clathrin-unabhängigen Weg bedeutend langsamer endozytiert (Long et al., 2001). Die Clathrin-vermittelte Endozytose spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Proteinen in die MVBs (Schmid et al., 2000). Mit Hilfe der *real time* RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass in

den Ovarialkarzinomzelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden, beide Formen von L1 exprimiert sind (Daten nicht gezeigt). Meli et al. (1999) konnten bereits mittels Northern Blot in verschiedenen Neuroblastomzellen ebenfalls beide Spleißvarianten von L1 detektieren, während in verschiedenen Nierenkarzinomzelllinien nur die nicht neuronale Form von L1 exprimiert war. Tumorzellen aus Aszites wurden nicht auf die An- oder Abwesenheit des Exon 27 untersucht. Es ist jedoch durchaus möglich, dass nur die Tumorzellen aus dem Aszites, aus dem die L1-positiven Exosomen isoliert werden konnten, auch die neuronale Form von L1 exprimierten.

Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität von Vesikeln aus Aszites ergaben, dass sowohl Exosomen als auch Membranbläschen das TNF $\alpha$ -Peptid spalten (Abb. 45). Nach Präzipitation von ADAM10 und ADAM17 aus den Vesikeln zeigten jedoch nur die Präzipitate der Exosomen TNF $\alpha$ -spezifische Spaltaktivität (Abb. 46). Dieser Befund stimmte mit der Beobachtung überein, dass in Membranbläschen kein ADAM10 und -17 detektiert werden konnte. Daraus wurde ersichtlich, dass noch weitere aktive Proteasen in den Vesikeln vorhanden sind. Dolo et al. (1999) zeigten, dass Tumorzellen auch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) über Vesikel abgeben können. Weiterhin korrelieren die Menge der freigesetzten Vesikel und deren proteolytische Aktivität mit der Invasionsfähigkeit humaner Tumorzelllinien *in vitro* und der Malignität von Ovarialkarzinomen *in vivo* (Ginestra et al., 1998; 1999).

Die gelatinolytische Eigenschaft von MMP2 und MMP9 erlaubt eine genauere Untersuchung des MMP-Profiles von Exosomen und Membranbläschen mittels Gelatine-Zymographie. Hierbei wurde eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung von Exosomen und Membranbläschen beobachtet. Anscheinend werden in Exosomen andere MMPs rekrutiert als in Membranbläschen (Abb. 47). Eine genaue Zuordnung der verschiedenen im Zymogramm detektierten Banden zu bestimmten MMPs war bisher nicht möglich. Es könnte sich dabei jedoch nicht nur um verschiedene MMPs, sondern auch um verschiedene prozessierte Formen von diesen handeln.

Eine Reihe von Proteinen wurde bisher in Exosomen von malignen und benignen Zellen identifiziert. Dies lässt auf eine Reihe möglicher Funktionen schließen. Die biologische Relevanz der Exosomen rückt dabei immer mehr in den Vordergrund. Die bisher durchgeführten Studien weisen daraufhin, dass Exosomen einen Beitrag zur interzellulären



Kommunikation leisten (Fevrier und Raposo, 2004). Dabei werden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, wie die Exosomen mit Zellen interagieren.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen eine weitere Rolle der Exosomen. Sie dienen offensichtlich als ein eigenes Kompartiment zur Spaltung und Freisetzung von löslichen Molekülen, wie L1 und CD44. Diese können wiederum in autokriner/ parakriner Weise viele zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Migration, Invasion und Apoptoseresistenz, beeinflussen. Dabei scheint der Mechanismus nicht nur auf L1 und CD44 beschränkt zu sein. So beobachteten Hakulinen et al. (2004) die Metalloproteinase-vermittelte Spaltung von CD46 in konstitutiven Vesikeln verschiedener Tumorzelllinien. Diese Studien unterstützen die durch die vorliegende Arbeit aufgestellte These, dass Exosomen eine wichtige Rolle in der Produktion löslicher Moleküle mit unterschiedlichen biologischen Funktionen spielen. Auch andere Moleküle, wie die Zytokinrezeptoren, die durch Proteasen in eine lösliche Form überführt werden, können über Exosomen freigesetzt werden (Hawari et al., 2004). Eventuell werden auch diese in Exosomen gespalten.

Die Produktion löslicher Moleküle ist demnach eine Möglichkeit, wie Exosomen an der interzellulären Kommunikation beteiligt sein können. Allerdings war in Exosomen auch ungespaltenes L1 nachweisbar. Diese Beobachtung deutet auf eine weitere mögliche Interaktion von L1-positiven Exosomen mit Zellen hin. In einer vorausgegangenen Arbeit unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von CHO-Zellen mit L1-positiven Vesikeln zur erhöhten haptotaktischen Migration führte (Gutwein et al., 2003). Dafür könnte einerseits lösliches L1 verantwortlich sein, das, wie in dieser Arbeit demonstriert, auch nach Freisetzung der Exosomen generiert werden kann (Abb. 33). Andererseits könnte aber auch Exosomen-assoziiertes transmembranes L1 durch juxtakrine Interaktion daran beteiligt sein (**Abb. 61**). Beispiele für die Interaktion Exosomen-assoziiierter Moleküle mit Zellen sind in der Literatur bereits beschrieben.

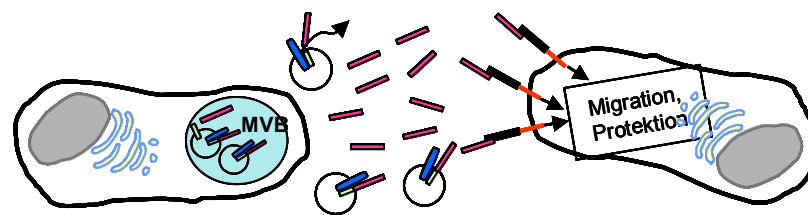
So können Exosomen von B-Zellen Integrin-vermittelt an Bestandteile der extrazellulären Matrix und an Fibroblasten *in vitro* binden (Clayton et al., 2004). Interessanterweise beobachteten die Autoren einen Unterschied im Bindungsverhalten der Exosomen an nicht proliferierende Fibroblasten sowie an durch TNF $\alpha$  aktivierte Fibroblasten. Die Behandlung der Zellen mit TNF $\alpha$  simuliert eine Entzündungsreaktion, durch die verschiedenen Integrin-Liganden verstärkt exprimiert werden. Die erhöhte Expression ermöglicht gleichzeitig die vermehrte Bindung von Exosomen an die Zytokin-aktivierten Fibroblasten (Clayton et al.,

2004). Die Autoren postulieren, dass die Exosomen dabei juxtakrine Interaktionen nachahmen, die normalerweise durch B-Zellen selbst vermittelt werden.

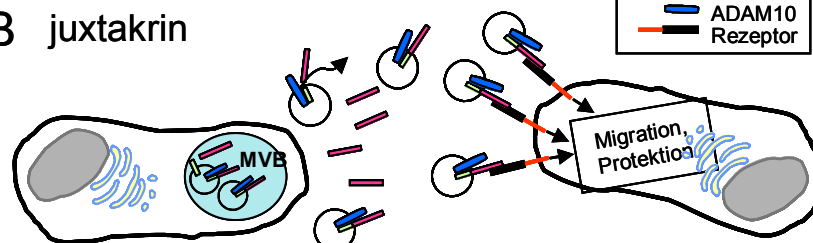
Des Weiteren sind Exosomen von Tumorzellen eventuell an der Suppression des Immunsystems beteiligt. Um einer Immunantwort zu entgehen, exprimieren verschiedene Tumore den Fas-Liganden (FasL) (Gastman et al., 1999; Hahne et al., 1996), welcher ebenfalls durch eine Metalloproteinase in eine lösliche Form überführt werden kann (Yagita et al., 1997). Interessanterweise scheint die Produktion von löslichem FasL hier eine untergeordnete Rolle zu spielen, da dieser weniger effektiv ist als die transmembrane Form (Schneider et al., 1998). Aus verschiedenen Arbeiten geht hervor, dass sich im Serum von Krebspatienten Exosomen mit transmembranem FasL befinden (Andreola et al. 2002; Taylor et al., 2003; Kim et al., 2005). Während die Expression des FasL in Tumorzellen in erster Linie lokal auf Fas-sensitive infiltrierende T Lymphozyten wirkt, haben FasL-positive Exosomen durch ihre Verteilung im ganzen Organismus auch Auswirkung auf die Anzahl zirkulierender T- Lymphozyten (zusammengefasst in Bohana-Kashtan und Civin, 2005).

Welche Rolle L1-positive Exosomen bei der Tumorprogression spielen muss noch eingehender untersucht werden. Es wäre durchaus denkbar, dass neben der Produktion von löslichem L1 in Exosomen auch die vesikelassoziierte transmembrane Form von L1 an der Induktion verschiedener Signalwege beteiligt ist.

### A autokrin/ parakrin



### B juxtakrin



**Abb. 61: Modell zur L1-vermittelten Signaltransduktion.** (A) Durch Exosomen generiertes lösliches L1 kann in autokriner bzw. parakriner Weise an Rezeptoren von Zellen (z.B. Integrine) binden und Signalwege aktivieren. (B) Vesikelassoziiertes transmembranes L1 bindet in juxtakriner Weise an Rezeptoren und aktiviert Signalwege, die normalerweise von Zell-Zell Kontakten vermittelt werden. Beide Möglichkeiten können das Migrationsverhalten und eventuell die Resistenz gegen Apoptose beeinflussen.

## 6.5 Neuropilin-1, ein möglicher Bindungspartner von L1 im Ovarialkarzinom

Neuropilin-1 (NRP1) wurde zuerst als ein Oberflächen-Glykoprotein im Nervensystem identifiziert. Dort lässt es sich auf Axonen im sich entwickelnden Nervensystem nachweisen. NRP1 spielt eine wichtige Rolle bei der Wegfindung von Neuronen und beim Auswachsen von Axonen (Chen et al., 2005). Dabei sind NRP1 und L1 Teil eines Rezeptorkomplexes für die Bindung von Semaphorinen/Collapsinen (Kolodkin et al., 1997; Castellani et al., 2000). L1 kann sowohl in *cis* als auch in *trans* an NRP1 binden. Während die Bindung in *cis* zur Bildung des Rezeptorkomplexes für Sema3A notwendig ist und zur Repulsion von Axonen führt, kann die Bindung in *trans* durch lösliches L1 diese Repulsion umkehren. Lösliches L1 wirkt demnach als ein Antagonist von Sema3A (Castellani et al., 2002).

NRP1 Expression konnte ebenfalls bei verschiedenen Krebserkrankungen, wie Mamma- (Soker et al., 1998), Prostata- (Latil et al., 2000) und Kolonkarzinom (Parikh et al., 2004) nachgewiesen werden. Dabei begünstigt NRP1 scheinbar die Tumorprogression. Die Überexpression von NRP1 in Ratten-Prostatakarzinomzellen führt zu erhöhter Angiogenese (Miao et al., 2000). Die autokrine Bindung von VEGF-A<sub>165</sub> an NRP1 auf Brustkrebszellen vermittelt Überlebenssignale und die Behandlung dieser Zellen mit anti-NRP1 Antikörpern oder VEGF Antisenseoligonukleotiden inhibieren die Zellmigration und -invasion (Bachelder et al., 2001, 2002). In einer kürzlich veröffentlichten Studie beim Pankreaskarzinom konnten Wey et al. (2005) nachweisen, dass die Expression von NRP1 zur erhöhten transienten Aktivierung des MAPK-Signalweges führte. Diese scheint im Zusammenhang mit der Inhibition von Anoikis und einer erhöhten Chemoresistenz zu stehen. Die Autoren postulieren, dass NRP1 ein Ziel für neue Therapieansätze darstellen könnte, wodurch die Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen gegen Chemotherapeutika erhöht werden kann (Wey et al., 2005).

Über die Expression von NRP1 in Ovarialkarzinomzellen war zu Beginn dieser Arbeit noch nichts bekannt. Basierend auf Vorarbeiten, in denen die L1-NRP1 Interaktion im sich entwickelnden Maushirn untersucht wurde (Itoh et al., 2004), sollte nun überprüft werden, ob NRP1 auch im Ovarialkarzinom exprimiert wird und ob hier ebenfalls eine Interaktion von L1 und NRP1 von Bedeutung ist.

In ersten Untersuchungen konnte sowohl die mRNA von transmembranem NRP1 als auch zweier löslicher Spleißvarianten in Ovarialkarzinomzelllinien und in Tumorgeweben

nachgewiesen werden (Abb. 48). Über die Funktionen der Spleißvarianten ist bisher wenig bekannt. Beide löslichen Isoformen können vermutlich an VEGF-A<sub>165</sub> binden und dessen Funktionen inhibieren (Gagnon et al., 2000). Die Expression von S<sub>12</sub>-NRP1 in einer Ratten-Prostatakarzinomzelllinie führte zur verstärkten Apoptose und zur verminderten Angiogenese (Gagnon et al., 2000). Daher wird vermutet, dass die löslichen Moleküle die Funktionen von transmembranem NRP1 regulieren (Gagnon et al., 2000; Cackowski et al., 2004).

Unerwartet war der Befund, dass keine nachweisbaren Mengen an NRP1-Protein in den untersuchten Zelllinien vorhanden waren. Dies lässt vermuten, dass entweder NRP1 auf Proteinebene gezielt reguliert wird oder ein Defekt in der Proteinsynthese vorliegt. Beim Nachweis der mRNAs im Tumorgewebe könnte es sich jedoch auch um kontaminierende Zellen von Blutgefäßen oder um Nervenzellen handeln, die ebenfalls NRP1 exprimieren. Im Aszites befinden sich, wie bereits erwähnt, Mesothelzellen, Lymphozyten und Tumorzellen. Interessanterweise konnte hier eine NRP1-positive Zellpopulation nachgewiesen werden, die anhand von Zytoskelettkomponenten eindeutig als Mesothelzellen identifiziert wurden (Abb. 51). Tumorzellen, die über die Tumormarker L1 und EpCAM isoliert wurden, waren dagegen, wie auch die untersuchten Zelllinien, negativ für NRP1 (Abb. 50). Eine ähnliche Beobachtung machten Thijssen et al. (2004) in einem Mausmodell von xenotransplantierten Ovarialkarzinomen. Dabei zeigte auch hier der Tumor selbst keine NRP1 Expression, während nicht maligne Zellen NRP1-positiv waren.

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte NRP1 als ein neues Markerprotein für Mesothelzellen identifiziert werden. Zudem konnten Mesothelzellen spezifisch aus dem Aszites von Patientinnen isoliert werden. Basierend auf diesen Befunden, sollte nun eine mögliche Interaktion von L1-positiven Tumorzellen mit NRP1-positiven Mesothelzellen untersucht werden.

Das Peritoneum (Bauchfell) ist die innere Auskleidung des Bauchraums und umhüllt mit einer Einzelzellschicht aus Mesothelzellen sowohl die gesamten inneren Organe als auch die Innenseite der Bauchwand. peritoneale Mesothelzellen sekretieren mehrere Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie IL-6, IL-8, bzw. VEGF und FGF-2 (Topley et al., 1993; Betjes et al., 1993; Jayne et al., 2000; Cronauer et al., 1999), und spielen im Falle einer Erkrankung der inneren Organe eine zentrale Rolle (Topley, 1995).

In Krebserkrankungen des Magen-Darm-Traktes disseminieren Tumorzellen häufig ins Peritoneum. Dies führt zur Ansammlung von Aszitesflüssigkeit und ist gleichzeitig mit einer

schlechten Prognose assoziiert. Der genaue Mechanismus der peritonealen Dissemination ist noch unklar. In verschiedenen Studien wird jedoch berichtet, dass sich Tumorzellen, die ins Peritoneum gelangen, an die Mesothelzellen anheften (Jonjic et al., 1992; Nishimura et al., 1996; Nakashi et al., 1997). Auch Ovarialkarzinomzellen können an Mesothelzellen binden und auf diesen wachsen (Cannistra et al., 1993). Eine Reihe von Molekülen konnte identifiziert werden, die diese Zell-Zell Adhäsion fördern. Dazu gehören z.B. die Dipeptidyl-Peptidase IV (Kikkawa et al., 2003) oder auch CA125 (Rump et al., 2004). Eine weitere wichtige Rolle bei diesem Prozess spielt die Zelloberflächen-Glykosylierung (Casey et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte mit L1 ein weiteres Molekül identifiziert werden, das die Adhäsion von Tumorzellen an Mesothelzellen fördern kann (Abb. 54). In ähnlicher Weise konnte dies für die Bindung von Lymphomzellen an Endothelzellen bereits gezeigt werden (Hubbe et al., 1993). Integrine auf Endothelzellen wurden dabei als Bindungspartner für L1 auf Lymphomzellen identifiziert. Interessanterweise wird jedoch auch NRP1 auf Endothelzellen exprimiert. In eigenen Untersuchungen konnten bei 37°C keine Unterschiede zwischen der Bindung L1-positiver und -negativer Zellen an Mesothelzellen beobachtet werden (Abb. 53). Erst nach Inaktivierung der Integrine bei 4°C wurde eine deutliche L1-abhängige Bindung erkennbar (Abb. 53). Daraus wurde ersichtlich, dass auch hier in erster Linie Integrine an der Zell-Zell Adhäsion beteiligt waren, die eine L1-abhängige Bindung überlagerten. Die Beobachtung, dass die L1-vermittelte Bindung bei 4°C durch Antikörper gegen bekannte mit L1-interagierende Integrine nicht inhibierbar war, machte deutlich, dass es einen weiteren Rezeptor für L1 auf den Mesothelzellen geben muss. Ein direkter Nachweis, dass es sich dabei um NRP1 handelt konnte bisher nicht erbracht werden. Versuche mit NRP1-positiven und -negativen Mausfibroblasten konnten den Verdacht allerdings erhärten, dass es sich um eine L1-NRP1 vermittelte Adhäsion handelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass lösliches L1 verstärkt an NRP1 exprimierende Zellen binden kann bzw. NRP1-positive Zellen auf L1 als Substrat adhären. Im Folgenden wird daher diskutiert, welche weitere Rolle diese Interaktion spielen könnte.

Die Disseminierung von Ovarialkarzinomzellen ins Peritoneum ist ebenfalls mit der Bildung von Aszites assoziiert. Dieser Prozess geht mit der Entwicklung neuer Blutgefäße zur Versorgung des Tumorgewebes sowie der erhöhten Permeabilität der Endothelzellschicht einher (Naora und Montell, 2005). Zu den wichtigsten Faktoren, die die Bildung neuer

Blutgefäße sowohl in normalen als auch in malignen Geweben anregen, gehören die VEGFs. Diese sind multifunktionelle Zytokine, die von vielen verschiedenen Geweben produziert werden können, unter anderem auch von Tumorzellen und Mesothelzellen (Berns et al., 2003; Gorski et al., 2003; Sako et al., 2003). Die VEGFs wirken als chemotaktisches Agens für die Blutgefäß-bildenden Endothelzellen, stimulieren deren Proliferation und vermitteln ihnen Überlebenssignale. Die Aktivität der VEGFs kann dabei durch drei verschiedene Tyrosinkinaseassoziierte VEGF-Rezeptoren vermittelt werden (Chen et al., 2005). In Endothelzellen wirkt NRP1 als ein Ko-Rezeptor für VEGF, reguliert die VEGF-abhängige Angiogenese und beeinflusst zudem die Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix (Soker et al., 1998; Chen et al., 2005). Des Weiteren ist NRP1, wie bereits erwähnt, auch an der Tumorangio-genese beteiligt. Eine Studie von Hall et al. (2004) bringt auch L1 mit der Angiogenese in Verbindung. Die Autoren konnten beobachten, dass die extrazelluläre Domäne von L1 durch die Ligandierung des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  mit dem VEGF-R2 einen Angiogenese-fördernden Effekt ausüben kann. Dabei scheint die Integrin-vermittelte Bindung an L1 die gleichen VEGF-R2-abhängigen Signalwege zu aktivieren, wie sie durch Bindung von VEGF-A<sub>165</sub> an den VEGF-R2 induziert werden (Hall und Hubbel, 2004). Demnach könnte von Tumorzellen produziertes lösliches bzw. ECM-assoziiertes L1 auch mit NRP1 interagieren und auf diese Weise ebenfalls einen Angiogenese-fördernden Effekt induzieren. Für den Nachweis einer solchen Interaktion sind jedoch noch weitere Studien notwendig, die zu einem größeren Verständnis über die ablaufenden Prozesse während der Tumorentwicklung beitragen könnten.

## 7 Zusammenfassung

Das L1 Adhäsionsmolekül vermittelt wichtige migratorische Prozesse bei der Entwicklung des Nervensystems und schützt Neuronen vor Apoptose. Außerdem wird L1 auf vielen Tumoren exprimiert, wo es die Motilität von Tumorzellen erhöht und so vermutlich die Metastasierung begünstigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss von L1 auf die Apoptose von Tumorzellen untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass die Expression von L1 zu einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose führt. In Ovarialkarzinomzellen korreliert die Stärke der Expression mit der Apoptoseresistenz und die Behandlung einer Mischpopulation aus L1-positiven und -negativen Zellen mit Cisplatin führt zur Selektion und Anreicherung ersterer. An der Induktion der Apoptoseresistenz ist nicht nur transmembranes L1 beteiligt, sondern auch durch membranproximale Spaltung freigesetztes lösliches L1, das durch Apoptose vermehrt generiert wird. Die Inhibition der Spaltung mit Metalloproteinase-Inhibitoren stellt die Sensitivität gegen Apoptose wieder her und weist auf eine wichtige Rolle der Spaltung von L1 bzw. anderer Faktoren (z.B. HB-EGF) bei der Zytoprotektion hin.

L1 kann nicht nur an der Plasmamembran gespalten, sondern auch über Vesikel freigesetzt werden. In dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, um verschiedene vesikuläre Strukturen zu trennen und zu charakterisieren. Dies ermöglichte erstmals den Nachweis von L1, ADAM10 und -17 in von Tumorzellen sekretierten Exosomen. In Ovarialkarzinomzellen findet die Spaltung von L1 unter konstitutiven Bedingungen in Membranstrukturen der Endosomen und des Golgi-Apparates statt und steht in einem direkten Zusammenhang mit der Ausschüttung von Exosomen. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch nach Behandlung der Zellen mit Spaltung-induzierenden Substanzen, wie APMA, MCD, TFP oder Ionomycin, zu beobachten. In Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen konnten ebenfalls Exosomen nachgewiesen werden. Die Sekretion von Exosomen stellt einen wichtigen Mechanismus zur ADAM10-vermittelten Generierung von löslichem L1 *in vitro* und vermutlich auch *in vivo* dar.

Mit Neuropilin-1 konnte ein neuer Interaktionspartner von L1 auf Mesothelzellen identifiziert werden. Dabei können Tumorzellen L1-vermittelt an NRP1-positive Zellen adhären. Weiterhin kann lösliches L1 als Ligand an NRP1-exprimierende Zellen binden. Dies zeigt eine neue Möglichkeit zur Interaktion von disseminierten Tumorzellen mit Mesothelzellen im Peritoneum.

## 8 Abkürzungen

<b>A</b>	A	Ampère	
	A $\beta$	$\beta$ -amyloides Peptid	
	Abb	Abbildung	
	ADAM	a disintegrin and metalloproteinase	
	ah	anti-human	
	Ak	Antikörper	
	am	anti-Maus	
	APMA	4-Aminophenylmercuric acetate	
	APP	alzheimer precursor protein, Alzheimer-Vorläufer-Protein	
	ar	anti-rabbit, anti-Kaninchen	
	ara	anti-rat	
	AS	Aminosäure	
	ASO	Antisenseoligonukleotid	
	ATP	Adenosintriphosphat	
	<b>B</b>	BACE	$\beta$ -site APP cleaving enzyme
		Bcl-2	B-Zell-Lymphom-Proto-onkogen-2
bp		Basenpaar	
BSA		bovine serum albumin; Albumin aus Rinderserum	
BOG		N-Octyl- $\beta$ ,D-glucopyranoside	
bzw.		beziehungsweise	
<b>C</b>	CAM	cell adhesion molecule, Zelladhäsionsmolekül	
	cDNA	Komplementäre DNA (complement DNA)	
	CHO	chinese hamster ovary	
<b>D</b>	DAPI	2'-[4-Ethoxyphenyl]-5-[-4-methyl-1-piperazinyl]-2-5'-bi-1H benzimidazol	
	DC	Dendritic cell	
	ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser	
	DEAE	Diethylaminoethyl	
	DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	
	DMSO	Dimethylsulfoxid	
	DNA	Desoxyribonukleinsäure	
	dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat	
	<b>E</b>	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
		EGF	epidermal growth factor
		EGTA	(Ethylenebis(oxyethylenitrilo)) tetra-; ethylene glycol bis(2- aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
		ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
		Ep-CAM	epithelial cell adhesion molecule
		ER	endoplasmatisches Retikulum
		ERK	extracellular regulated kinase
		et al.	et ali
EZM		extrazelluläre Matrix	
<b>F</b>		FACS	fluorescence activated cell sorter, Durchflusszytometrie
	FAK	focal adhesion kinase	
	FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum	
	FDZ	follikuläre dendritische Zellen	
	FGF	Fibroblast Growth Factor	
	FITC	Fluoresceinthiocyanat	



<b>G</b>	FN <sub>III</sub>	Fibronectin Typ-III Einheit	
	g	Gramm	
	GPCR	G-protein coupled receptor	
<b>H</b>	GTP	Guanidin-Triphosphat	
	h	Stunde	
	HB-EGF	Heparin binding-epidermal growth factor	
	HEK	human embryonic kidney	
	HEPES	N-2-Hydroxyethylpeperazin-N'-Ethanol-sulfonsäure	
	Her2	human EGF-like receptor	
	hL1	humanes L1	
	hu	human	
	<b>I</b>	ICAM	intercellular adhesion molecule
		Ig	Immunglobulin
IgG		Immunglobulin Gamma	
ILV		Intraluminale Vesikel	
Iono		Ionomycin, Calcium Salt	
<b>K</b>		kb	Kilobase(n)
		kDa	Kilodalton
	<b>L</b>	l	Liter
<b>M</b>		m	milli
	M	molar	
	MACS	magnetic cell sorting	
	mAk	monoklonaler Antikörper	
	MAP	mitogen activated protein	
	MASA	Mental retardation, Aphasia, Shuffling gait and Adducted thumbs	
	MCD	Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	
	$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol	
	MEK	MAP and ERK-Kinase	
	MHC	major histocompatibility complex	
	min	Minute	
	ml	Milliliter	
	mM	Millimolar	
	MMP	matrix metalloproteinase	
	mRNA	messenger Ribonukleinsäure	
	MT-MMP	membrane type MMP	
	MVBs	multivesicular bodies	
<b>N</b>	NaF	Natriumfluorid	
	NCAM	neural cell adhesion molecule	
	ng	Nanogramm	
	Ng-CAM	Neuronal-glia cell adhesion molecule	
	NILE	nerve growth factor-inducible large external (glycoprotein)	
	nm	Nanometer	
	nM	Nanomol	
	NRP1	Neuropilin-1	
	<b>O</b>	OD	optische Dichte
		<b>P</b>	PAGE
PBS	phosphate buffered saline		
PC	protein-convertase		
PCR	polymerase chain reaction		
PE	Phycoerythrin		
pH	$-\log [H^+]$		

	PKC	Protein Kinase C
	PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
	POX	Peroxidase
	Prot. G	Protein-G Sepharose
	Prot. A	Protein-A Sepharose
<b>R</b>	RXR	retinoic X receptor
	RNA	Ribonukleinsäure
	RNase	Ribonuklease
	rpm	rounds per minute
	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
	RT	Raumtemperatur
	RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
<b>S</b>	SDS	Natriumdodecylsulfat
	SH3	Src-homology-3
	siRNA	small interfering RNA
	SPG	Spastische Paraplegie
<b>T</b>	TACE	TNF- $\alpha$ Converting Enzyme
	TAE	Tris-Acetat-EDTA
	TAPI-0 (1)	N-(R)-[2-(Hydroxyaminocarbonyl)methyl]-4-methylpentanoyl-L-naphthylalanyl-L-alanine Amide
	TBE	Tris-Borsäure-EDTA
	TCA	Trichloressigsäure
	TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylendiamin
	TFP	Trifluoperazine Dimaleate
	TGN	trans-Golgi Netzwerk
	TGF	Tumor Growth Factor
	TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
	TNF $\alpha$	Tumor Nekrosis Faktor $\alpha$
	TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
	Tris	Tris (hydroxymethyl) amino-Methan
	TX-100	Triton X-100
<b>U</b>	U	Einheit (Unit)
	ÜN	Über Nacht
	Upm	Umdrehungen pro Minute
	UV	Ultraviolett
<b>V</b>	V	Volt
	Vol	Volumen
<b>W</b>	W	Watt
<b>Z</b>	z.B.	zum Beispiel
	%	Prozent
	$\alpha$	anti
	$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
	$\mu$	mikro
	x g	Zentrifugalkraft

---

**Abkürzungen für Aminosäuren**

<b>A</b>	<b>Ala</b>	Alanin
<b>C</b>	<b>Cys</b>	Cystein
<b>D</b>	<b>Asp</b>	Asparaginsäure
<b>E</b>	<b>Glu</b>	Glutaminsäure
<b>F</b>	<b>Phe</b>	Phenylalanin
<b>G</b>	<b>Gly</b>	Glycin
<b>H</b>	<b>His</b>	Histidin
<b>I</b>	<b>Ile</b>	Isoleucin
<b>K</b>	<b>Lys</b>	Lysin
<b>L</b>	<b>Leu</b>	Leucin
<b>M</b>	<b>Met</b>	Methionin
<b>P</b>	<b>Pro</b>	Prolin
<b>Q</b>	<b>Gln</b>	Glutamin
<b>R</b>	<b>Arg</b>	Arginin
<b>S</b>	<b>Ser</b>	Serin
<b>T</b>	<b>Thr</b>	Threonin
<b>V</b>	<b>Val</b>	Valin
<b>W</b>	<b>Trp</b>	Tryptophan
<b>Y</b>	<b>Tyr</b>	Tyrosin

## 9 Literaturverzeichnis

- Adams J.M.**, Cory S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381), 1322-1326.
- Allinson T.M.**, Parkin E.T., Condon T.P., Schwager S.L., Sturrock E.D., Turner A.J. und Hooper N.M. (2004). The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein. *Eur. J. Biochem.* 271, 2539-2547.
- Allory Y.**, Matsuoka A., Bazille C., Christensen E.I., Ronco P. und Debiec H. (2005). The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis and clear cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 11, 1190-1197.
- Andre F.**, Scharzt N.E., Chaput N., Flament C., Raposo G., Amigorena S., Angevin E. und Zitvogel L. (2002). Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine* 20 (Suppl 4), A28-A31.
- Andre F.**, Scharzt N.E., Movassagh M., Flament C., Pautier P., Morice P., Pomel C., Lhomme C., Escudier B., Le C.T., Tursz T., Amigorena S., Raposo G., Angevin E. und Zitvogel L. (2002). Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 360, 295-305.
- Andreola G.**, Rivoltini L., Castelli C. (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J. Exp. Med.* 195, 1303-1316.
- Arlt M.**, Novak-Hofer I., Gast D., Gschwend V., Moldenhauer G., Grünberg J., Honer M., Schubiger B.A., Altevogt P. und Krüger A. (2005). Efficient inhibition of intraperitoneal tumor growth and dissemination of ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1CAM monoclonal antibody treatment. *Cancer Res.* submitted.
- Atashi J. R.**, Klinz S. G., Ingraham C. A., Matten W. T., Schachner M. und Maness P. F. (1992). Neural cell adhesion molecules modulate tyrosine phosphorylation of tubulin in nerve growth cone membranes. *Neuron* 8, 831-842.
- Aupeix K.**, Hugel B., Martin T., Bischoff P., Lill H., Pasquali J.L. und Freyssinet J.M. (1997). The significance of shed membrane particles during programmed cell death *in vitro*, and *in vivo*, in HIV-1 infection. *J. Clin. Invest.* 99, 1546-1554.
- Bachelder R.E.**, Crago A., Chung J., Wendt M.A., Shaw L.M., Robinson G. und Mercurio A.M. (2001). Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 61, 5736-5740.
- Bachelder R.E.**, Wendt M.A. und Mercurio A.M. (2002). Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res.* 62, 7203-7206.
- Balaian L.B.**, Moehler T. und Montgomery A.M. (2000). The human neural cell adhesion molecule L1 functions as a costimulatory molecule in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 30, 938-43.
- Bennett T.A.**, Edwards B.S., Sklar L.A. und Rogelj S. (2000). Sulfhydryl regulation of L-selectin shedding: phenylarsine oxide promotes activation-independent L-selectin shedding from leukocytes. *J. Immunol.* 164, 4120-4129.
- Berns E.M.**, Klijn J.G., Look M.P., Grebenchtchiko N., Vossen R., Peter H., Geurts-Moespot A., Portengen H., van Staveren I.L., Meijer-van Gelder M.E., Bakker B., Sweep F.C. und Foekens J.A. (2003). Combined vascular endothelial growth factor and TP53 status predicts poor response to tamoxifen therapy in estrogen receptor-positive advanced breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 3032-3037.
- Betjes M.G.**, Tuk C.W., Struijk D.G., Krediet R.T., Arisz L., Hart M. und Beelen R.H. (1993). Interleukin-8 production by human peritoneal mesothelial cells in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1, and medium conditioned by macrophages cocultured with *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* 168, 1202.

- Bieber A. J.**, Snow P. M., Hortsch M., Patel N. H., Jacobs J. R., Traquina Z. R., Schilling J. und Goodman C. S. (1989). Drosophila neuroglian: a member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to the vertebrate neural adhesion molecule L1. *Cell* 59, 447-60.
- Black R. A.**, Rauch C. T., Kozlosky C. J., Peschon J. J., Slack J. L., Wolfson M. F., Castner B. J., Stocking K. L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K. A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J. N., Johnson R. S., Paxton R. J., March C. J. und Cerretti D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Black R.A.** et al. (2003). Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity. *Biochem. Soc. Symp.* 70, 39-52.
- Black R.A.** und White J.M. (1998). ADAMs: focus on the protease domain. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 654-659.
- Blaess S.**, Kammerer R. A. und Hall H. (1998). Structural analysis of the sixth immunoglobulin-like domain of mouse neural cell adhesion molecule L1 and its interaction with  $\alpha$ (v) $\beta$ 3,  $\alpha$ (IIb) $\beta$ 3, and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. *J. Neurochem.* 71, 2615-2625.
- Blanchard N.**, Lankar D., Faure F., Regnault A., Dumont C., Raposo G. und Hivroz C. (2002). TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J. Immunol.* 168, 3235-3241.
- Blobel C. P.** (2000). Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 606-612.
- Blobel C.P.** (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 32-43.
- Bohana-Kashtan O.** und Civin C.I. (2005). Profiling tumor counterattack: do Fas ligand-containing microvesicles reduce anticancer immunity? *Clin. Cancer Res.* 11, 968-970.
- Borroto A.**, Ruiz-Paz S., de la Torre T.V., Borrell-Pages M., Merlos-Suarez A., Pandiella A., Blobel C.P., Baselga J. und Arribas J. (2003). Impaired trafficking and activation of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme in cell mutants defective in protein ectodomain shedding. *J. Biol. Chem.* 278, 25933-25939.
- Brummendorf T.**, Kenwrick S. und Rathjen F.G. (1998). Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 87-97.
- Burleson K.M.**, Casey R.C., Skubitz K.M., Pambuccian S.E., Oegema T.R. Jr., Skubitz A.P. (2004). Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecol. Oncol.* 93, 170-181.
- Buxbaum J. D.**, Liu K. N., Luo Y., Slack J. L., Stocking K. L., Peschon J. J., Johnson R. S., Castner B. J., Cerretti D. P. und Black R. A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme is involved in regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273, 27765-27767.
- Cackowski F.C.**, Xu L., Hu B. und Cheng S.-H. (2004). Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms. *Genomics* 84, 82-94.
- Cameron I.L.**, Short N., Sun L., Hardman W.E. (2005). Endothelial cell pseudopods and angiogenesis of breast cancer tumors. *Cancer Cell Int.* 5(1), 17.
- Cannistra S.A.**, Kansas G.S., Niloff J., De Franzo B., Kim Y., Ottensmeier C. (1993). Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. *Cancer Res.* 53, 3830-3838.
- Casey R.C.**, Oegema T.R., Skubitz K.M., Pambuccian S.E., Grindle S.M., Skubitz A.P. (2003). Cell membrane glycosylation mediates the adhesion, migration, and invasion of ovarian carcinoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 20, 143-152.
- Castellani V.** (2002). The function of neuropilin/L1 complex. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 91-102.

- Castellani V.**, Chedotal A., Schachner M., Faivre-Sarrailh C. und Rougon G. (2000). Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Semaphorin 3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27, 237-249.
- Castellani V.**, De Angelis E., Kenwrick S. und Rougon G. (2002). *Cis* and *trans* interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J.* 21, 6348-6357.
- Castellani V.**, Falk j. und Rougon G. (2004). Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 89-100.
- Cavenee W.K.** und White R.L. (1996). The genetic basis of cancer. *Sci. Am.*, 272, 72-79.
- Ceresa B.P.** und Schmid S.L. (2000). Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 204-210.
- Chang S.**, Rathjen F.G. und Raper J.A. (1987). Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* 104, 355-362.
- Chaput N.**, Andre F., Scharz N.E., Flament C., Angevin E., Escudier B. und Zitvogel L. (2003). Exosomes and anti-tumour immunotherapy. *Bull. Cancer.* 90, 695-698.
- Chaput N.**, Scharz N.E., Andre F. und Zitvogel L. (2003). Exosomes for immunotherapy of cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 532, 215-221.
- Chaput N.**, Taïeb J., Scharz N.E.C., André F., Angevin E. und Zitvogel L. (2004). Exosome-based immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 234-239.
- Chen C.**, Li M., Chai H., Yang H., Fisher W.E. und Yao Q. (2005). Roles of neuropilins in neuronal development, angiogenesis, and cancers. *World J. Surg.* 29, 271-275.
- Chen M.S.**, Tung K.S., Coonrod S.A., Takahashi Y., Bigler D., Chang A., Yamashita Y., Kincade P. S., Herr J.C. und White J.M. (1999b). Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM12 and the egg integrin alpha6beta1: implication for murine fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 11830-11835.
- Chen S.**, Mantei N., Dong L. und Schachner M. (1999a). Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J. Neurobiol.* 38, 428-39.
- Cheng L.** und Lemmon V. (2004). Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect neurite outgrowth and branching on an L1 substrate. *Mol. Cell Neurosci.* 27, 522-530.
- Cheresh D. A.** (1992). Structural and biologic properties of integrin-mediated cell adhesion. *Clin. Lab. Med.* 12, 217-236.
- Clayton A.**, Turkes A., Dewitt S., Steadman R., Mason M.D. und Hallett M.B. (2004). Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J.* 18, 977-979.
- Clyman R. I.** Mauray F. und Kramer R. H. (1992). Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix. *Exp. Cell Res.* 200, 272-284.
- Colucci-D'Amato L.**, Perrone-Capano C., di Porzio U. (2003). Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays* 25, 1085-1095.
- Condon T.P.**, Flournoy S., Sawyer G.J., Baker B.F., Kishimoto T.K., Bennett C.F. (2001). ADAM17 but not ADAM10 mediates tumor necrosis factor-alpha and L-selectin shedding from leukocyte membranes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 11, 107-116.
- Cronauer M.V.**, Stadlmann S., Klocker H., Abendstein B., Eder I.E., Rogatsch H., Zeimet A.G., Marth C. und Offner F.A. (1999). Basic fibroblast growth factor synthesis by human peritoneal mesothelial cells: induction by interleukin-1. *Am. J. Pathol.* 155, 1977.

- De Angelis E.**, MacFarlane J., Du J.S., Yeo G., Hicks R., Rathjen F.G., Kenwrick S. und Brümmendorf T. (1999). Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities. *EMBO J.* 18, 4744-4753.
- De Angelis E.**, Watkins A., Schafer M., Brümmendorf T. und Kenwrick S. (2002) Disease-associated mutations in L1 CAM interfere with ligand interactions and cell-surface expression. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1-12.
- De Laurentiis M.**, Agripino G., Massarelli E. (2002). HER2 as a predictive marker of resistance to endocrine treatment (ET) for advanced breast cancer (ABC): a meta-analysis of published studies. *Breast Cancer Res. Treat.* 76 (Supplement 1), Abstract 233.
- De Laurentiis M.**, Canello G., Zinno L., Montagna E., Malorni L., Esposito A., Pennacchio R., Silvestro L., Giuliano M., Giordano A., Caputo F., Accurso A. und De Placido S. (2005). Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology. *Ann. Oncol.* 16 (supplement 4), iv7-iv13.
- Debiec H.**, Christensen E.I., Ronco P.M. (1998). The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *J. Cell Biol.* 143, 2067-2079.
- Denzer K.**, Kleijmeer M.J., Heijnen H.F., Stoorvogel W. and Geuze H.J. (2000). Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* 113, 3365-3374.
- Di Fiore P.P.** und Gill G.N. (1999). Endocytosis and mitogenic signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 483-488.
- Di Sciuolo G.**, Donahue T., Schachner M. und Bogen S.A. (1998). L1 antibodies block lymph node fibroblastic reticular matrix remodeling in vivo. *J. Exp. Med.* 187, 1953-1963.
- Djabali M.**, Mattei M.G., Nguyen C., Roux D., Demengeot J., Denizot F., Moos M., Schachner M., Goridis C. und Jordan B.R. (1990). The gene encoding L1, a neural adhesion molecule of the immunoglobulin family, is located on the X chromosome in mouse and man. *Genomics*, 7, 587-93.
- Doherty P.**, Williams E. und Walsh F.S. (1995). A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron* 14, 57-66.
- Dolo V.**, D'Ascenzo S., Viollini S., Pompucci L., Festuccia C., Ginestra A., Vittorelli M.L., Canevari S. und Pavan A. (1999). Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Clin. Exp. Metastasis* 17, 131-140.
- Duczmal A.**, Schöllhammer S., Katich S., Ebeling O., Schwartz A. R. und Altevogt P. (1997). The L1 adhesion molecule supports alpha v beta 3-mediated migration of human tumor cells and activated T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 236-239.
- Eastman A.** (1983). Characterization of the adducts produced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II). *Biochemistry.* 22, 3927-3933.
- Ebeling O.**, Duczmal A., Aigner S., Geiger C., Schöllhammer S., Kemshead J. T., Möller P., Schwartz A. R. und Altevogt P. (1996). L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur. J. Immunol.* 26, 2508-2516.
- Egeblad M.**, Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 161-174.
- Elbashir S.M.**, Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001b). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir S.M.**, Lendeckel W., Tuschl T. (2001c). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
- Elbashir S.M.**, Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T. (2001a). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877-6888.

- Escola J.M.**, Kleijmeer M.J., Stoorvogel W., Griffith J.M., Yoshie O. und Geuze H.J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 20121-20127.
- Feehan C.**, Darlak K., Kahn J., Walchek B., Spatola A. F. und Kishimoto T. H. (1996). Shedding of the lymphocyte adhesion molecule is inhibited by a hydroxamic acid-based protease inhibitor. Identification with an L-selectin-alkaline phosphatase reporter. *J. Biol. Chem.* 271, 7019-7024.
- Feizi T.** (1994). Evidence for carbohydrate-mediated interactions between the neural-cell-adhesion molecules NCAM and L1. *Trends Biochem. Sci.* 19, 233-234.
- Felding-Habermann B.**, Silletti S., Mei F., Siu C.-H., Yip P. M., Brooks P. C., Cheresch D. A., O'Toole T. E., Ginsberg M. H. und Montgomery A. M. P. (1997). A Single Immunoglobulin-like Domain of the Human Neural Cell Adhesion Molecule L1 Supports Adhesion by Multiple Vascular and Platelet Integrins. *J. Cell Biol.* 139, 1567-1581.
- Felsenfeld D. P.**, Hynes M. A., Skoler K. M., Furley A. J. und Jessell T. M. (1994). TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and beta 1 integrins. *Neuron* 12, 675-690.
- Février B.** und Raposo G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 415-421.
- Fischer O.M.**, Hart S., Gschwind A., Prenzel N. und Ullrich A. (2004). Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. *Mol. Cell. Bio.* 24, 5172-5183.
- Fogel M.**, Gutwein P., Mechttersheimer S., Riedle S., Stoeck A., Smirnov A., Edler L., Ben-Arie A., Huszar, M. und Altevogt, P. (2003). L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 363, 869-875.
- Fransen E.**, Schrandt S. C., Vits L., Coucke P., Van C. G. und Willems P. J. (1994). X-linked hydrocephalus and MASA syndrome present in one family are due to a single missense mutation in exon 28 of the L1CAM gene. *Hum. Mol. Genet.* 3, 2255-2256.
- Freigang J.**, Proba K., Leder L., Diederichs K., Sonderegger P. und Welte W. (2000). The crystal structure of the ligand binding module of axonin-1/TAG-1 suggests a zipper mechanism for neural cell adhesion. *Cell* 101, 425-433.
- Friedlander D. R.**, Milev P., Karthikeyan L., Margolis R. K., Margolis R. U. und Grumet M. (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 125, 669-680.
- Futter C.E.**, Pearse A., Hewlett L.J. und Hopkins C.R. (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J. Cell Biol.* 132, 1011-1023.
- Gagnon M.L.**, Bielenberg D.R., Gechtman Z., Miao H.Q., Takashima S., Soker S. und Klagsburg M. (2000). Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: *in vivo* expression and antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 2573-2578.
- Gast D.**, Riedle S., Schabath H., Schlich S., Schneider A., Issa Y., Stoeck A., Fogel M., Joumaa S., Wenger T., Herr I., Gutwein P. und Altevogt P. (2005). L1 augments cell migration and tumor growth but not  $\beta 3$  integrin expression in ovarian carcinomas. *Int. J. Cancer* 115, 658-665.
- Gastman B.R.**, Atarshi Y., Reichert T.E., Saito T., Balkir L., Rabinowich H., Whiteside T.L. (1999). Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res.* 59, 5356-5364.
- Gavert N.**, Conacci-Sorrell M., Gast D., Schneider A., Altevogt P., Brabletz T. und Ben-Ze'ev A. (2005). L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J. Cell Biol.* 168, 633-642.



- Gechtman Z.**, Alonso J. L., Raab G., Ingber D. E. und Klagsbrun M. (1999). The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J. Biol. Chem.* 274, 28828-28835.
- Geminard C.**, De Gassart A., Blanc L. und Vidal M. (2004). Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TgR for sorting into exosomes. *Traffic*, 1-13.
- Ghobrial I.M.**, Witzig T.E. und Adjei A.A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin.* 55, 178-194.
- Ginestra A.**, La Placa M.D., Saladino F., Cassara D., Nagase H. und Vittorelli M.L. (1998). The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their *in vitro* invasiveness. *Anticancer Res.* 18, 3433-3437.
- Ginestra A.**, Miceli D., Dolo V., Romano F.M. und Vittorelli M.L. (1999). Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res.* 19, 3439-3445.
- Gorski D.H.**, Leal A.D. und Goydos J.S. (2003). Differential expression of vascular endothelial growth factor-A isoforms at different stages of melanoma progression. *J. Am. Coll. Surg.* 197, 408-418.
- Grumet M.**, Flaccus A. und Margolis R. U. (1993). Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: interactions with neurons and neural cell adhesion molecules. *J. Cell Biol.* 120, 815-824.
- Grumet M.**, Hoffman S. und Edelman G. M. (1984). Two antigenically related neuronal cell adhesion molecules of different specificities mediate neuron-neuron and neuron-glia adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 267-271.
- Guo W.** und Giancotti F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nature Rev.* 5, 816-826.
- Gutwein P.**, Mechtersheimer S., Riedle S., Stoeck A., Gast D., Joumaa S., Zentgraf H., Fogel M. und Altevogt P. (2003). ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J.* 17, 292-294.
- Gutwein P.**, Oleszewski M., Mechtersheimer S., Agmon-Levin N., Krauss K. und Altevogt P. (2000). Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 275, 15490-15497.
- Gutwein P.**, Stoeck A., Riedle S., Gast D., Runz S., Condon T.P., Marmé A., Phong M.-C., Linderkamp O., Skorokhod A. und Altevogt P. (2005). Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 11, 2492-2501.
- Hahne M.**, Rimoldi D., Schroter M., Romero P., Schreier M., French L.E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J., Tschopp J. (1996). Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363-1366.
- Hakulinen, J.**, Junnikkala, S., Sorsa, T. und Meri, S. (2004). Complement inhibitor membrane cofactor protein (MCP; CD46) is constitutively shed from cancer cell membranes in vesicles and converted by a metalloproteinase to a functionally active soluble form. *Eur. J. Immunol.* 34, 2620-2629.
- Hall H.** und Hubbell J.A. (2004). Matrix-bound sixth Ig-like domain of cell adhesion molecule L1 acts as an angiogenic factor by ligating  $\alpha v \beta 3$ -integrin and activating VEGF-R2. *Microvasc. Res.* 68, 169-178.
- Hall H.**, Bozic D., Fauser C. und Engel J. (2000). Trimerization of cell adhesion molecule L1 mimics clustered L1 expression on the cell surface: influence on L1-ligand interactions and on promotion of neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 75, 336-346.
- Hall H.**, Carbonetto S. und Schachner M. (1997). L1/HNK-1 Carbohydrate- and beta 1 integrin-dependent neural cell adhesion to laminin-1. *J. Neurochem.* 68, 544-553.

- Hall H.**, Djonov V., Ehrbar M., Hoehli M. und Hubbell J.A. (2004). Heterophilic interactions between cell adhesion molecule L1 and  $\alpha_v\beta_3$ -integrin induce HUVEC process extension *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Angiogenesis* 7, 213-223.
- Hansen G.H.**, Immerdal L., Thorsen E., Niels-Christiansen L.L., Nystrom B.T., Demant E.J. und Danielsen E.M. (2001). Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 32338-32344.
- Hawari F.I.**, Rouhani F.N., Cui X., Yu Z.X., Buckley C., Kaler M., Levine S.J. (2004). Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 1297-1302.
- Heijnen H.F.**, Schiel A.E., Fijnheer R., Geuze H.J. und Sixma J.J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94, 3791-3799.
- Hidalgo M.** und Eckhardt S.G. (2001). Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 178-193.
- Holm J.**, Appel F. und Schachner M. (1995). Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in homophilic interactions. *J. Neurosci. Res.* 42, 9-20.
- Hunter T.** (1997). Oncogenetic networks. *Cell*, 88, 333-346.
- Huovila A.-P. J.**, Turner A.J., Pelto-Huikko M., Kärkkäinen I und Ortiz R.B. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Bioch. Sc.* in press.
- Hurskainen T.L.**, Hirohata S., Seldin M.F. und Apte S.S. (1999). ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteinases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family. *J. Biol. Chem.* 274, 25555-25563.
- Ignelzi M. J.**, Miller D. R., Soriano P. und Maness P. F. (1994). Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron* 12, 873-884.
- Ilan N.**, Mohsenin A., Cheung L., Madri J.A. (2001). PECAM-1 shedding during apoptosis generates a membrane-anchored truncated molecule with unique signaling characteristics. *FASEB J.* 15, 362-372.
- Itoh K.**, Cheng L., Kamei Y., Fushiki S., Kamiguchi H., Gutwein P., Stoeck A., Arnold B., Altevogt P. und Lemmon V. (2004). Brain development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion. *J. Cell Biol.* 165, 145-154.
- Izumi Y.**, Hirata M., Hasuwa H., Iwamoto R., Umata T., Miyado K., Tamai Y., Kurisaki T., Sehara-Fujisawa A., Ohno S. und Mekada E. (1998). A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin- $\square$ /ADAM9 and PKC $\square$  are involved in TPA-induced heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* 17, 7260-7272.
- Izumoto S.**, Ohnishi T., Arita N., Hiraga S., Taki T. und Hayakawa T. (1996). Gene expression of neural cell adhesion molecule L1 in malignant gliomas and biological significance of L1 in glioma invasion. *Cancer Res.* 56, 1440-1444.
- Jayne D.G.**, Perry S.L., Morrison E., Farmery S.M. und Guillou P.J. (2000). Activated mesothelial cells produce heparin-binding growth factors: implications for tumour metastases. *Br. J. Cancer* 82, 1233.
- Jiang W.** und Bond J.S. (1992). Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett.* 312, 110-114.
- Johnstone R.M.**, Adam M., Hammond J.R., Orr L. und Turbide C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262, 9412-9420.
- Jolly-Tornetta C.** und Wolf B.A. (2000). Protein kinase C regulation of intracellular and cell surface amyloid precursor protein (APP) cleavage in CHO695 cells. *Biochemistry* 39, 15282-15290.

- Jonjic N.**, Peri, G., Bernasconi S., Sciacca F.L., Colotta F., Pelicci P., Lanfrancone L. und Mantovani A. (1992). Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J. Exp. Med.* 176, 1165.
- Jouet M.**, Rosenthal A. und Kenwrick S. (1995). Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 30, 378-380.
- Jouet M.**, Rosenthal A., Armstrong G., MacFarlane J., Stevenson R., Paterson J., Metzberg A., Ionasescu V., Temple K. und Kenwrick S. (1994). X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nature Genet.* 7, 402-407.
- Kadmon G.**, Kowitz A., Altevogt P. und Schachner M. (1990). The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J. Cell Biol.* 110, 193-208.
- Kadmon G.**, von Bohlen und Halbach F., Horstkorte R., Eckert M., Altevogt P. und Schachner M. (1995). Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7, 993-1004.
- Kahn J.**, Walcheck B., Migaki G.I., Jutila M.A., Kishimoto T.K. (1998). Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell* 92, 809-818.
- Kalus I.**, Schnegelsberg B., Seidah N.G., Kleene R. und Schachner M. (2003). The proprotein convertase PC5A and a Metalloproteinase are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* 278, 10381-10388.
- Kamiguchi H.**, Long K. E., Pendergast M., Schaefer A. W., Rapoport I., Kirchhausen T. und Lemmon V. (1998). The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J. Neurosci.* 18, 5311-5321.
- Kang T.**, Nagase H. und Pei D. (2002). Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. *Cancer Res.* 6, 675-681.
- Katzmann D.J.**, Odorizzi G. und Emr S.D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 893-905.
- Kawasaki T.**, Kitsukawa T., Bekku Y., Matsuda Y., Sanbo M., Yagi T., Fujisawa H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126, 4895-4902.
- Keilhauer, G.**, Faissner, A. und Schachner, M. (1985). Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* 316, 728-730.
- Keller, S.** (2005). Diplomarbeit
- Kern P.M.**, Keilholz L., Kalden J.R., Herrmann M. (2001). Apoptotic UV-irradiated lymphocytes undergo protease mediated shedding of L-selectin in vitro. *Transfus. Apheresis Sci.* 24, 99-101.
- Kikkawa F.**, Ishikawa H., Tamakoshi K., Suganuma N., Mizuno K., Kawai M., Arii Y., Tamakoshi A., Kuzuya K., Tomoda Y. (1995). Prognostic evaluation of lymphadenectomy for epithelial ovarian cancer. *J. Surg. Oncol.* 60, 227-231.
- Kikkawa F.**, Kajiyama H., Ino K., Shibata K., Mizutani S. (2003). Adhesion potency to mesothelial cells by overexpression of dipeptidyl peptidase IV. *Adv. Exp. Med. Biol.* 524, 249-252
- Kim J.W.**, Wieckowski E., Taylor D.D., Reichert T.E., Watkins S. und Whiteside T.L. (2005). Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 11, 1010-1020.
- Kim R.** (2005). Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* 103, 1551-1560.

- Kim R.**, Emi M., Tanabe K. und Toge T. (2004). Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. *Cancer* 101, 2491-2502.
- Kim R.**, Tanabe K., Uchida Y., Emi M., Inoue H. und Toge T. (2002). Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 50, 343-352.
- Kleijmeer M.**, Ramm G., Schurhuis D., Griffith J., Rescigno M., Ricciardi-Castagnoli P., Rudensky A.Y., Ossendorp F., Melief C.J., Stoorvogel W. und Geuze H.J. (2001). Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J. Cell Biol.* 155, 53-63.
- Kojro E.**, Gimpl G., Lammich S., März W. und Fahrenholz F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 5815-5820.
- Kolodkin A.L.**, Levengood D.V., Rowe E.G., Tai Y.T., Giger R.J., Ginty D.D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753-762.
- Kouchi Z.**, Kinouchi T., Sormachi H., Ishiura S. und Suzuki K. (1998). The deletion of the C-terminal tail and addition of an endoplasmic reticulum targeting signal to Alzheimer's amyloid precursor protein change its localization, secretion, and intracellular proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 258, 291-300.
- Kowitz A.**, Kadmon G., Eckert M., Schirmmacher V., Schachner M. und Altevogt P. (1992). Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur. J. Immunol.* 22, 1199-1205.
- Kowitz A.**, Kadmon G., Verschueren H., Remels L., De B. P., Hubbe M., Schachner M., Schirmmacher V. und Altevogt, P. (1993). Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 11, 419-429.
- Krätzschmar J.**, Lum L. und Blobel C. P. (1996). Metargidin, a Membrane-anchored Metalloprotease-Disintegrin Protein with an RGD Integrin Binding Sequence. *J. Biol. Chem.* 271, 4593-4596.
- Kuhn T.B.**, Stoeckli E.T., Condrau M.A., Rathjen F.G. und Sonderegger P. (1991). Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1 (G4). *J. Cell Biol.* 115, 1113-11126.
- Latil A.**, Bieche I., Pesche S., Valeri A., Fournier G., Cussenot O., Lidereau R. (2000). VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int. J. Cancer* 89, 167-171.
- Le Roy C.** und Wrana J.L. (2005). Clathrin- and non-clathrin mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature Rev.* 6, 112-126.
- Leaquer C.**, Kinzler K. und Vogelstein B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Leavesley D. I.**, Ferguson G. D., Wayner E. A. und Cheresch D. A. (1992). Requirement of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *J. Cell Biol.* 117, 1101-1107.
- Lee V. M.**, Greene L. und Shelanski M. L. (1981). Identification of neural and adrenal medullary surface membrane glycoproteins recognized by antisera to cultured rat sympathetic neurons and PC12 pheochromocytoma cells. *Neuroscience* 6, 2773-2786.
- Lemmon V.**, Farr K. L. und Lagenaur C. (1989). L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2, 1597-603.
- Lin X.**, Howell S.B. (1999). Effect of loss of DNA mismatch repair on development of topotecan-, gemcitabine-, and paclitaxel-resistant variants after exposure to cisplatin. *Mol. Pharmacol.* 56, 390-395.
- Lindner J.**, Rathjen F.G. und Schachner M. (1983). L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305, 427-430.
- Linnemann D.**, Raz A. und Bock E. (1989). Differential expression of cell adhesion molecules in variants of K1735 melanoma cells differing in metastatic capacity. *Int. J. Cancer* 43, 709-712.

- Liu J.R.**, Fletcher B., Page C., Hu C., Nunez G. und Baker V. (1998). Bcl-xL is expressed in ovarian carcinoma and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Gynec. Oncol.* 70, 398-403.
- Lodish H.**, Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D. und Darnell J.E. Molecular cell biology. Zweite Auflage, 2000, Freeman Company, New York.
- Long K.E.**, Asou H., Snider M.D. und Lemmon V. (2001). The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 276, 1285-1290.
- Lum L.**, Reid M.S. und Blobel C.P. (1998). Intracellular maturation of the mouse metalloproteinase disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* 273, 26236-26247.
- Lunn C.A.**, Fan X., Dalie B., Miller K., Zavodny P.J., Narula S.K. und Lundell D. (1997). Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase. *FEBS Lett.* 400, 333-335.
- Mano Y.**, Kikuchi Y., Yamamoto K., Kita T., Hirata J., Tode T., Ishii K und Nagata I. (1999). Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. *Eur. J. Cancer* 35, 1214-1219.
- Maretzky T.**, Reiss K., Ludwig A., Buchholz J., Scholz F., Proksch E., de Strooper B., Hartmann D. und Saftig P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and  $\beta$ -catenin translocation. *Proc. Natl. Acad. Sc.* 102, 9182-9187.
- Margolis R. K.**, Rauch U., Maurel P. und Margolis R. U. (1996). Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3, 273-290.
- Martínez-Lorenzo M.J.**, Anel A., Alava M.A., Piñeiro A., Naval J., Lasierra P. und Larrad L. (2004). The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp. Cell Res.* 295, 315-329.
- Massague J.** und Pandiella A. (1993). Membrane-anchored growth factors. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 515-541.
- Matter M. L.** und Ruoslahti E. (2001). A signaling pathway from the  $\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$  integrins that elevates bcl-2 transcription. *J. Biol. Chem.* 276, 27757-27763.
- Matthews V.**, Schuster B., Schutze S., Bussmeyer I., Ludwig A., Hundhausen C., Sadowski T., Saftig P., Hartmann D., Kallen K.J. und Rose-John S. (2003). Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J. Biol. Chem.* 278, 38829-38839.
- Meckersheimer S.**, Gutwein P., Agmon-Levin N., Stoeck A., Oleszewski M., Riedle S., Fogel M., Lemmon V. und Altevogt P. (2001). Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.* 155, 661-673.
- Meli M.L.**, Carrel F., Waibel R., Amstutz H., Crompton N., Jaussi R., Moch H., Schubiger P.A., Novak-Hofer I. (1999). Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int. J. Cancer.* 83, 401-408.
- Merlos-Suarez A.**, Ruiz-Paz S., Baselga J und Arribas J. (1998). Metalloproteinase-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 276, 48510-48517.
- Miao H.Q.**, Lee P., Lin H., Soker S. und Klagsbrun M. (2000). Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J.* 15, 2532-2539.
- Miura M.**, Kobayashi M., Asou H. und Uyemura K. (1991). Molecular cloning of cDNA encoding the rat neural cell adhesion molecule L1. Two L1 isoforms in the cytoplasmic region are produced by differential splicing. *FEBS Lett.* 289, 91-95.
- Montgomery A. M.**, Becker J. C., Siu C. H., Lemmon V. P., Cheresch D. A., Pancook J. D., Zhao X. und Reisfeld R. A. (1996). Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J. Cell. Biol.* 132, 475-485.

- Montgomery A. M.**, Reisfeld R. A. und Cheresch D. A. (1994). Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 8856-8860.
- Moos M.**, Tacke R., Scherer H., Teplow D., Fruh K. und Schachner M. (1988). Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334, 701-703.
- Moos M.L.**, Lin S.L., Milla M.E., Bickett D.M., Burkhart W., Carter H.L., Chen W.J., Clay W.C., Didsbury J.R., Hassler D., Hoffman C.R., Kost T.A., Lambert M.H., Leesnitzer M.A., McCauley P., McGeehan G., Mitchell J., Moyer M., Paher G., Rocque W., Overton L.K., Schoenen F., Seaton T., Su J.L. und Becherer J.D. (1997). Cloning of a disintegrin and metalloproteinase that processes tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385, 733-736.
- Morrison D.K.**, Davis R.J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 91-118.
- Mullock B.M.**, Bright N.A., Fearon C.W., Gray S.R. und Luzio J.P. (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J. Cell Biol.* 140, 591-601.
- Murga M.**, Fernandez-Capetillo O., Tosato G. (2005). Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood* 105, 1992-1999.
- Nagano O.**, Murakami D., Hartmann D., de Strooper B., Saftig P., Iwatsubo T., Nakajima M., Shinohara M. und Saya H. (2004). Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca<sup>2+</sup> influx and PKC activation. *J. Cell Biol.* 165, 1-10.
- Nakashio T.**, Narita T., Akiyama S., Kasai Y., Kondo K., Ito K., Takagi H. und Kannagi R. (1997). Adhesion molecules and TGF-β1 are involved in the peritoneal dissemination of NUGC-4 human gastric cancer cells. *Int. J. Cancer* 70, 612.
- Naora H.** und Montell D.J. (2005). Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nature Rev.* 5, 355-366.
- Nayeem N.**, Silletti S., Yang X., Lemmon V.P., Reisfeld R.A., Stallcup W.B. und Montgomery A.M. (1999). A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J. Cell Sci.* 112, 4739-4749.
- Neufeld G.**, Kessler O., Herzog Y. (2002). The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 81-90.
- Nicoletti I.**, Migliorati G., Pagliacci M.C., Grignani F., Riccardi C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139, 271-279.
- Niewiarowski S.**, McLane M.A., Kloczewiak M., Stewart G.J. (1994). Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin. Hematol.* 31, 289-300.
- Nishimune H.**, Bernreuther C., Carroll P., Chen S., Schachner M. und Henderson C.E. (2005). Neural adhesion molecules L1 and CHL1 are survival factors for motoneurons. *J. Neurosci. Res.* 80, 593-599.
- Nishimura S.**, Chung Y.S., Yashiro M., Inoue T. und Sowa M. (1996). CD44H plays an important role in peritoneal dissemination of scirrhous gastric cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 87, 1235.
- Novikoff A.B.**, Essner E., Quintana N. (1964). Golgi apparatus and lysosomes. *Fed. Proc.* 23, 1010-1022.
- Ohnishi T.**, Matsumura H., Izumoto S., Hiraga S. und Hayakawa T. (1998). A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. *Cancer Res.* 58, 2935-2940.
- Okuda T.**, Lin X., Trang J. und Howell S.B. (2005). Suppression of hREV1 expression reduces the rate at which human ovarian carcinoma cells acquire resistance to cisplatin. *Mol. Pharm.* 67, 1852-1860.

- Oleszewski M.**, Beer S., Katich S., Geiger C., Zeller Y., Rauch U. und Altevogt P. (1999). Integrin and neurocan binding to L1 involves distinct Ig domains. *J. Biol. Chem.* 274, 24602-24610.
- Oleszewski M.**, Gutwein P., van der Lieth W., Rauch U. und Altevogt P. (2000). Characterization of the L1-neurocan-binding site. Implications for L1-L1 homophilic binding. *J. Biol. Chem.* 275, 34478-34485
- Olive S.**, Dubois C., Schachner M. und Rougon G. (1995). The F3 neuronal glycosylphosphatidylinositol-linked molecule is localized on glycolipid-enriched membrane subdomains and interacts with L1 and fyn kinase in cerebellum. *J. Neurochem.* 65, 2307-2317.
- Pancook J.D.**, Reisfeld R.A., Varki N., Vitiello A., Fox R.I. und Montgomery A.M. (1997). Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J. Immunol.* 158, 4413-4421.
- Parikh A.A.**, Fan F., Liu W.B., Ahmad S.A., Stoeltzing O., Reinmuth N., Bielenberg D., Bucana C.D., Klagsbrun M., Ellis L.M. (2004). Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 164, 2139-2151.
- Pierschbacher M. D.** und Ruoslahti E. (1987). Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 262, 17294-17298.
- Pommier Y.**, Sordet O., Antony S., Hayward R.L. und Kohn K.W. (2004). Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 23, 2934-2949.
- Postina R.**, Schroeder A., Dewachter I., Bohl J., Schmitt U., Kojro E., Prinzen C., Endres K., Hiemke C., Blessing M., Flamez P., Dequenue A., Godaux E., van Leuwen F. und Farenholz F. (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 113, 1456-1464.
- Raposo G.**, Nijman H.W., Stoorvogel W., Liejendekker R., Harding C.V., Melief C.J. und Geuze H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183, 1161-1172.
- Raspollini M.R.**, Castiglione F., Degl'Innocenti D.R., Baroni G., Amunni G., Villanucci A., Taddei G.L. (2004) Bcl-2 in ovarian carcinoma: a clinicopathologic, immunohistochemical and molecular study. *Pathologica* 96, 465-469.
- Reginato M.J.**, Mills K.R., Paulus J.K., Lynch D.K., Sgroi D.C., Debnath J., Muthuswamy S.K., Brugge J.S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat. Cell Biol.* 5, 733-740.
- Reid R. A.** und Hemperly J. J. (1992). Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of RNA. *J Mol Neurosci.* 3, 127-35.
- Rodal S.**, Skretting K., Garred G., Vilhardt F., van Deurs B. und Sandvig K. (1999). Extraction of cholesterol with methyl- $\beta$ -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol. Biol. Cell.* 10, 961-974.
- Roghani M.**, Becherer J.D., Moss M.L., Atherton R.E., Erdjument-Bromage H., Arribas J., Blackburn R.K., Weskamp G., Tempst P. und Blobel C.P. (1999). Metalloproteinase-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 274, 3531-3540.
- Roonpraput C.**, Huang W., Grill R., Friedlander D., Grumet M., Chen S., Schachner M. und Young W. (2003). Soluble cell adhesion molecule L1-Fc promotes locomotor recovery in rats after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 20, 871-882.
- Rosenthal A.**, Jouet M. und Kenwrick S. (1992). Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus. *Nature Genet.* 2, 107-112.
- Ross J.S.**, Fletcher J.A. (1999). HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 112, 53-67.

- Rossignol M.**, Gagnon M.L. und Klagsburn M. (2000). Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* 70, 211-222.
- Rump A.**, Morikawa Y., Tanaka M., Minami S., Umesaki N., Takeuchi M., Miyajima A. (2004). Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 279, 9190-9198.
- Ruoslahti E.** und Pierschbacher M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238, 491-497.
- Ruppert M.**, Aigner S., Hubbe M., Yagita H. und Altevogt P. (1995). The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J. Cell Biol.* 131, 1881-1891.
- Sadoul K.**, Sadoul R., Faissner A. und Schachner M. (1988). Biochemical characterization of different molecular forms of the neural adhesion molecule L1. *J. Neurochem.* 50, 510-521.
- Sahin U.**, Weskamp G., Kelly K., Zhou H.-M., Higashiyama S., Peschon J., Hartmann D., Saftig P. und Blobel C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* 164, 769-779.
- Sako A.**, Kitayama J., Yamaguchi H., Kaisaki S., Suzuki H., Fukatsu K., Fujii S. und Nagawa H. (2003). Vascular endothelial growth factor synthesis by human omental mesothelial cells is augmented by fibroblast growth factor-2: possible role of mesothelial cell on the development of peritoneal metastasis. *J. Surg. Res.* 115, 113-120.
- Sambamurti K.**, Refolo L.M., Shioi J., Pappolla M.A. und Robakis N.K. (1992). The Alzheimer's amyloid precursor is cleaved intracellularly in the trans-Golgi network or in a post-Golgi compartment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 674, 118-128.
- Sanderson M.P.**, Erickson S.N., Gough P.J., Garton K.J., Wille P.T., Raines E.W., Dunbar A.J. und Dempsey P.J. (2005). ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by  $\rho$ -aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J. Biol. Chem.* 280, 1826-1837
- Savina A.**, Furlán M., Vidal M. und Colombo M.I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 20083-20090.
- Schabel F.M. Jr.**, Skipper H.E. und Trader M.W. (1980). Concepts for controlling drug-resistant tumor cells, in *Breast cancer: Experimental and Clinical Aspects*. Pergamon Press, Oxford. 199-212
- Schaefer A.W.**, Kamei Y., Kamiguchi H., Wong E.V., Rapoport I., Kirchhausen T., Beach C.M., Landreth G., Lemmon S.K., Lemmon V (2002). L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J. Cell Biol.* 157, 1223-1232.
- Schaeffer H.J.**, Weber M.J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2435-2444.
- Schlomann U.**, Wildeboer D., Webster A., Antropova O., Zeuschner D., Knight C.G., Docherty A.J., Lambert M., Skelton L., Jockusch H., Bartsch J.W. (2002) The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 277, 48210-48219.
- Schmid R.S.**, Pruitt W.M., Maness P.F. (2000). A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J. Neurosci.* 20, 4177-4188.
- Schmidt C.**, Kunemund V., Wintergerst E. S., Schmitz B. und Schachner M. (1996). CD8 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration *in vitro* and is associated with the alpha 6/beta integrin and the neural adhesion molecule L1. *J. Neurosci. Res.* 43, 12-31.
- Schneider P.**, Holler N., Bodmer J.L., Hahne M., Frei K., Fontana A., Tschopp J. (1998). Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J. Exp. Med.* 187, 1205-1213.



- Seilheimer B.** und Schachner M. (1988). Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture. *J. Cell Biol.* 107, 341-351.
- Seilheimer B.**, Persohn E. und Schachner M. (1989). Antibodies to the L1 adhesion molecule inhibit Schwann cell ensheathment of neurons in vitro. *J. Cell Biol.* 109, 3095-3103.
- Shapiro A. L.**, Vinulela E. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-820.
- Silletti S.**, Yebra M., Perez B., Cirulli V., McMahon M. und Montgomery A.M.P. (2004). Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. *J. Biol. Chem.* 279, 28880-28888.
- Simmons D.L.**, (1993). Cellular interactions in development. A practical approach. *IRL Press Oxford*, 119-125.
- Skokos D.**, Le P.S., Villa I., Rousselle J.C., Peronet R., David B., Namane A. und Mecheri S. (2001). Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. *J. Immunol.* 166, 868-876.
- Slamon D.J.**, Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783-792.
- Smith K.M.**, Gaultier A., Cousin H., Alfandari D., White J.M., DeSimone D.W. (2002). The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J. Cell Biol.* 159, 893-902.
- Soker S.** (2001). Neuropilin in the midst of cell migration and retraction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 433-437.
- Soker S.**, Fidder H., Neufeld G. und Klagsbrun M. (1996). Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* 271, 5761-5767.
- Soker S.**, Miao H.Q., Nomi M., Takashima S., Klagsbrun M. (2002). VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J. Cell Biochem.* 85, 357-368.
- Soker S.**, Takashima S., Miao H.Q., Neufeld G., Klagsbrun M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745.
- Sonderegger P.** und Rathjen F.G. (1992). Regulation of axonal growth in the vertebrate nervous system by interactions between glycoproteins belonging to two subgroups of the immunoglobulin superfamily. *J. Cell Biol.* 119, 1387-1394.
- Sotelo J.R.** und Porter K.R. (1959). An electromicroscope study of the rat ovum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 327-342.
- Srour N.**, Lebel A., McMahon S., Fournier I., Fugere M., Day R. und Dubois C.M. (2003). TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett.* 554, 275-283.
- Stallcup W.B.**, Arner L.S. und Levine J.M. (1983). An antiserum against the PC12 cell line defines cell surface antigens specific for neurons and Schwann cells. *J. Neurosci.* 3, 53-68.
- Steinhusen U.**, Weiske J, Badock V., Tauber R., Bommert K. und Huber O. (2001). Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 4972-4980.
- Stoorvogel W.**, Kleijmeer M.J., Geuze H.J., Raposo G. (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 3, 321-330
- Stoorvogel W.**, Strous G.J., Geuze H.J., Oorschot V. und Schwartz A.L. (1991). Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 65, 417-427.

- Subtil A.**, Gaidarov I., Kobylarz K., Lampson M.A., Keen J.H., McGraw T.E. (1999). Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 6775-6780.
- Takeda Y.**, Asou H., Murakami Y., Miura M., Kobayashi M. und Uyemura K. (1996). A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. *J. Neurochem.* 66, 2338-2349.
- Taylor D.D.**, Gercel-Taylor C., Lyons K.S., Stanson J. und Whiteside T.L. (2003). T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3- $\zeta$  by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *Clin. Cancer Res.* 9, 5113-5119.
- Thery C.**, Boussac M., Veron P., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Garin J. und Amigorena S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* 166, 7309-7318.
- Thery C.**, Regnault A., Garin J., Wolfers J., Zitvogel L., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G. und Amigorena S. (1999). Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell Biol.* 147, 599-610.
- Thery C.**, Zitvogel L. und Amigorena S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569-579.
- Thies A.**, Schachner M., Moll I., Berger J., Schulze H.J.; Brunner G. und Schumacher U. (2002). Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* 38, 1708-1716.
- Thijssen V.L.**, Brandwijk R.J., Dings R.P., Griffioen A.W. (2004). Angiogenesis gene expression profiling in xenograft models to study cellular interactions. *Exp. Cell Res.* 299, 286-293.
- Topley N.** (1995). The cytokine network controlling peritoneal inflammation. *Perit. Dial. Int.* 15, S35.
- Topley N.**, Jorres A., Luttmann W., Petersen M.M., Lang M.J., Thierauch K.H., Muller C., Coles G.A., Davies M. und Williams J.D. (1993). Human peritoneal mesothelial cells synthesize interleukin-6: induction by IL1- $\beta$  und TNF $\alpha$ . *Kidney Int.* 43, 226.
- Van Camp G.**, Vits L., Coucke P., Lyonnet S., Schrandt S.C., Darby J., Holden J., Munnich A. und Willems P.J. (1993). A duplication in the L1CAM gene associated with X-linked hydrocephalus. *Nature Genet.* 4, 421-425.
- van Niel G.**, Raposo G., Candalh C., Boussac M., Hershberg R., Cerf-Bensussan N., Heyman M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337-349.
- Vecchi M.**, Baulida J. und Carpenter G. (1996). Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* 271, 18989-18995.
- Vogelstein B.** und Kinzler K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9, 138-141.
- von Schwedler U.K.**, Stuchell M., Muller B., Ward D.M., Chung H.Y., Morita E., Wang H.E., Davis T., He G.P., Cimbara D.M., Scott A., Krausslich H.G., Kaplan J., Morham S.G., Sundquist W.I. (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* 114, 701-713.
- von Tresckow B.**, Kallen KJ, von Strandmann EP, Borchmann P, Lange H, Engert A, Hansen HP. (2004). Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30. *J. Immunol.* 172, 4324-4231.
- Voura E. B.**, Ramjeesingh R. A., Montgomery A. M. P. und Siu C.-H. (2001). Involvement of integrin  $\alpha v \beta 3$  and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Mol. Biol. Cell.* 12, 2699-2710.
- Wang S. L.**, Kutsche M., DiSciullo G., Schachner M. und Bogen S. A. (2000). Selective malformation of the splenic white pulp border in L1-deficient mice. *J. Immunol.* 165, 2465-2473.

- Wayner E. A.**, Orlando R. A. und Cheresch D. A. (1991). Integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J. Cell Biol.* 113, 919-929.
- Weinberg R.A.** (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Weinmann M.**, Belka C., Guner D., Goecke B., Muller I., Bamberg M. und Jendrossek V. (2005). Array-based comparative gene expression analysis of tumor cells with increased apoptosis resistance after hypoxic selection. *Oncogene* (in press)
- Weskamp G.**, Kratzschmar J., Reid M.S., Blobel C.P. (1996). DC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J. Cell Biol.* 132, 717-726.
- Weusten A.Y.D.**, Groothuis P.G., Dunselman G.A.J., de Goeij A.F.P.M., Arends J.W. und Evers J.L.H. (2000). Morphological changes in mesothelial cells induced by shed menstrual endometrium *in vitro* are not primarily due to apoptosis or necrosis. *Human Repr.* 15, 1462-1468.
- Wey J.S.**, Gray M.J., Fan F., Belcheva A., McCarty M.F., Stoelzing O., Somcio R., Liu W., Evans D.B., Klagsbrun M., Gallick G.E. und Ellis L.M. (2005). Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer* , 1-9.
- Williams B.O.** (1994). Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. *Nature Genet.* 7, 480-484.
- Williams E.J.**, Furness J., Walsh F.S. und Doherty P. (1994). Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 13, 583-94.
- Williams J.**, Lucas P.C., Griffith K.A., Choi M., Fogors S., Hu Y.Y. und Liu J.R. (2005). Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. *Gynecol. Oncol.* 96, 287-295.
- Wolfers J.**, Lozier A., Raposo G., Regnault A., Thery C., Masurier C., Flament C., Pouzieux S., Faure F., Tursz T., Angevin E., Amigorena S. und Zitvogel L. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* 7, 297-303.
- Wood P. M.**, Schachner M. und Bunge R. P. (1990). Inhibition of Schwann cell myelination *in vitro* by antibody to the L1 adhesion molecule. *J. Neurosci.* 10, 3635-3645.
- Wykoff C.C.**, Sotiriou C., Cockman M.E., Ratcliffe P.J., Maxwell P., Liu E. und Harris A.L. (2004). *Br. J. Cancer* 90, 1235-1243.
- Xu H.**, Greengard P., Gandy S. (1995). Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer beta-amyloid precursor protein. *J. Biol Chem.* 270, 23243-23245.
- Yagita J.**, Seino K., Kayagaki N. und Okumura K. (1997). Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nature Med.* 3, 165-170.
- Yan R.**, Han P., Miao H., Greengard P. und Xu H. (2001). The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta-amyloid precursor protein (APP) substrate. *J. Biol.Chem.* 276, 36788-36796.
- Yarden Y.** und Sliwkowsky M.X. (2001).Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127-137.
- Yip P.M.** und Siu C.H. (2001). PC12 cells utilize the homophilic binding site of L1 for cell-cell adhesion but L1-alphavbeta3 interaction for neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 76, 1552-1564.
- Yip P.M.**, Zhao X.N., Montgomery A.M.P. und Siu C.H. (1998). The Arg-Gly-Asp motif in the cell adhesion molecule L1 promotes neurite outgrowth via interaction with alpha(v)beta(3) integrin. *Mol. Biol Cell.* 9, 277-290.
- Yu W.H.** Woessner J.F., McNeish J.D. und Stamenkovi I. (2002). CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev.* 16, 307-323.

**Zhang X.-P.**, Kamata T., Yokoyama K., Puzon-McLaughlin W. und Takada Y. (1998). Specific Interaction of the Recombinant Disintegrin-like Domain of MDC-15 (Metargidin, ADAM-15) with Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ . *J. Biol. Chem.* 273, 7345-7350.

**Zhao X.**, Yip P. M. und Siu (1998). Identification of a homophilic binding site in immunoglobulin like domain 2 of the cell adhesion molecule L1. *J. Neurochem.* 71, 960-971.

**Zitvogel L.**, Regnault A., Lozier A., Wolfers J., Flament C., Tenza D., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G. und Amigorena S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Med.* 4, 594-600.

## 10 Anhang

### 10.1 Publikationen

**Stoeck A**, Schlich S, Issa J, Gschwend V, Wenger T, Herr I, Marme A, Bourbie S, Altevogt P. and Gutwein P. (2005). L1 on ovarian carcinoma cells is a binding partner for Neuropilin-1 on mesothelial cells. (*Cancer Lett.*, in press)

**Stoeck A**, Keller S, Riedle S, Runz S, LeNaour F, Gutwein P, Ludwig A, Rubinstein E, Altevogt P. (2005). A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. (*Biochemical J.*, in revision)

**Stoeck A**, Gutwein P, Riedle S, Gast D, Runz S, Condon TP, Marme A, Phong MC Linderkamp O, Skorokhod A, Altevogt P. (2005). Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 11(7), 2492-2501.

Gast D, Riedle S, Riedle S, Schabath H, Schlich S, Schneider A, Issa Y, **Stoeck A**, Fogel M, Joumaa S, Wenger T, Herr I, Gutwein P, Altevogt P. (2005). L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int. J. Cancer* 115(4), 658-665.

Itoh K, Cheng L, Kamei Y, Fushiki S, Kamiguchi H, Gutwein P, **Stoeck A**, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V. (2004). Brain development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion. *J. Cell Biol.* 165(1), 145-154.

Fogel M, Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, **Stoeck A**, Smirnov A, Edler L, Ben-Arie A, Huszar M, Altevogt P. (2003). L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362(9387), 869-875.

Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, **Stoeck A**, Gast D, Joumaa S, Zentgraf H, Fogel M, Altevogt DP. (2003). ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J.* 17(2), 292-294.

Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, **Stoeck A**, Oleszewski M, Riedle S, Postina R, Fahrenholz F, Fogel M, Lemmon V, Altevogt P. (2001). Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.* 155(4), 661-673.

## 10.2 Lebenslauf

**Alexander Stoeck**

Brechtelstrasse 13

69126 Heidelberg

Tel.:06221/333666

e-mail: [a.stoeck@dkfz.de](mailto:a.stoeck@dkfz.de)

Persönliche Angaben:

Familienstand: ledig

Geboren: 27.04.1976 in Trier

### **Schulbildung**

1982-1986

Grundschule Britten

1986-1995

Peter-Wust-Gymnasium Merzig

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Ersatzdienst**

07/95-07/96

Zivildienst in der DRK-Sozialstation, Hermeskeil

### **Hochschulausbildung**

10/96-03/99

Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern,  
Studienortswechsel nach bestandener Diplom-Vorprüfung

03/99-06/02

Studium der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg, Abschluss als Diplombiologe (Note: 1,2)

04/01-12/02

Anfertigung der Diplomarbeit am Deutschen  
Krebsforschungszentrum in Heidelberg (DKFZ) unter Anleitung  
von Herrn Prof. Dr. Peter Altevogt zum Thema: „L1-Spaltung  
und Zellmigration: funktionelle Untersuchungen mutagenisierter  
L1-Formen“

### **Promotion**

12/02-05/06

Anfertigung der Promotionsarbeit am Deutschen  
Krebsforschungszentrum in Heidelberg (DKFZ) unter Anleitung  
von Herrn Prof. Dr. Peter Altevogt zum Thema: „Funktionelle  
Untersuchungen zur Expression von L1 beim Ovarialkarzinom“

### **10.3 Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe

Heidelberg, den 1. August 2005

---

Alexander Stoeck