

# INAUGURAL – DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Yasmin Issa  
aus Bad Homburg vor der Höhe

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Thema

**Funktionelle Rolle und Regulation von L1CAM auf  
humanem Pankreas Tumorendothel unter Einfluss  
immunmodulatorischer Zytokine**

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hilgenfeldt  
Prof. Dr. Peter Altevogt

**Meinen Eltern**

*Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.*

Albert Einstein

# **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, den 30. September 2008

---

Yasmin Issa

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der funktionellen Rolle des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM und dessen heterophilen Bindungspartnern Neuropilin-1 (NRP-1) und  $\beta_1$  Integrin auf humanen Pankreas Tumorendothelzellen *in vitro*.

Es konnte gezeigt werden, dass das Pankreas Tumorgewebe sich im Vergleich zu peritumoralem nicht-malignem Pankreasgewebe durch erhöhte Vaskularisierung sowie durch eine selektiv erhöhte endotheliale L1CAM Expression *in situ* unterscheidet.

Zusätzlich konnten belegt werden, dass die Pankreas Tumorendothelzellen im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen eine erhöhte L1CAM Expression *in vitro* zeigten. Weitere Untersuchungen bewiesen eine Tumormikromilieu- sowie Zytokin-induzierte Modulation der endothelialen L1CAM Expression.

Die erhöhte L1CAM Expression der Tumorendothelzellen korrelierte mit einer selektiv verstärkten Migrations- und Angiogenesekapazität *in vitro*. Weiterhin vermittelte eine erhöhte L1CAM Expression der Tumorendothelzellen eine selektiv gesteigerte Zelladhäsion und – transmigration von Tumorzellen und regulatorischen T-Zellen durch Tumorendothel *in vitro*.

Die spezifische Blockade von L1CAM und dessen Bindungspartnern NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin auf Kontroll- und Tumorendothel *in vitro* bestätigte deren funktionelle Rolle an der selektiv gesteigerten Migration und Ausbildung tubulärer Fortsätze der Tumorendothelzellen *in vitro*. Ebenfalls die gesteigerte Zelladhäsion und transendotheliale Migration von Tumorzellen und regulatorischen T-Zellen konnte durch spezifische Blockade von L1CAM und dessen Bindungspartnern funktionell inhibiert werden.

Die Blockade von L1CAM und dessen Bindungspartnern NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin auf Tumorendothel könnte als therapeutische Ansatz zur Inhibition der Angiogenese, zur Blockade von Metastasierungsprozessen sowie zur Inhibition einer Treg-selektiven Infiltration ins Pankreas Tumorgewebe führen.

## Summary

The present work deals with the functional role of the cell adhesion molecule L1CAM and its heterophilic binding partners Neuropilin-1 (NRP-1) and  $\beta$ 1 integrin on human pancreatic tumor endothelial cells *in vitro*.

It could be demonstrated that the pancreatic tumor tissue compared to peritumoral non-malignant pancreatic tissue differs by increased vascularization and a selective increase of endothelial L1CAM expression *in situ*.

In addition, we observed that the pancreatic tumor endothelial cells compared to the control endothelial cells showed increased L1CAM expression *in vitro*. Further investigation demonstrated a tumor microenvironment- and cytokine-induced modulation of endothelial L1CAM expression.

The increased L1CAM expression of the tumor endothelial cells correlated with a selective increased migration and angiogenic capacity *in vitro*. Furthermore, the increased expression of L1CAM mediated a selective increase in cell adhesion and transmigration of tumor cells and regulatory T-cells through the tumor endothelium *in vitro*.

The specific inhibition of L1CAM and its binding partners NRP-1 and  $\beta$ 1 integrin in control and tumor endothelial cells *in vitro* confirmed their functional role in the selectively increased migration and tube formation of the tumor endothelial cells *in vitro*. Also the increased cell adhesion and transendothelial migration of tumor cells and regulatory T-cells could be functionally blocked by specific inhibition of L1CAM and its respective binding partners.

The inhibition of L1CAM and its binding partners NRP-1 and  $\beta$ 1 integrin tumor endothelial cells could serve as a therapeutic approach to an inhibition of vascularization and metastatic processes as well as to an inhibition of Treg-selective infiltration into the pancreatic tumor tissue.

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Endothelium .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Das Tumorendothelium .....	2
<b>1.2</b>	<b>Tumor Angiogenese.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3</b>	<b>Transendotheliale Migration.....</b>	<b>5</b>
<b>1.4</b>	<b>Das Zelladhäsionsprotein L1CAM (CD171).....</b>	<b>6</b>
1.4.1	Struktur von L1CAM .....	6
1.4.2	Vorkommen und Funktion von L1CAM.....	9
1.4.3	Bindungseigenschaften von L1CAM .....	12
<b>1.5</b>	<b>Neuropilin-1 .....</b>	<b>14</b>
<b>1.6</b>	<b>Integrine .....</b>	<b>16</b>
<b>1.7</b>	<b>Das Pankreaskarzinom .....</b>	<b>18</b>
<b>1.8</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Gebrauchsmaterialien.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>Chemikalien .....</b>	<b>23</b>
2.4.1	Lösungen und Reagenzien .....	25
<b>2.5</b>	<b>Medien und Mediensupplemente.....</b>	<b>25</b>
<b>2.6</b>	<b>Zytokine.....</b>	<b>25</b>
<b>2.7</b>	<b>Antikörper und Farbstoffe .....</b>	<b>26</b>
2.7.1	Farbstoffe .....	26
2.7.2	Konjugierte primäre anti-Human Antikörper.....	26
2.7.6	Dynalbeads® .....	27
<b>2.8</b>	<b>Primer.....</b>	<b>27</b>
<b>2.9</b>	<b>Enzyme .....</b>	<b>28</b>
<b>2.10</b>	<b>Kits.....</b>	<b>28</b>
<b>2.11</b>	<b>Proben und Zellen .....</b>	<b>28</b>
<b>2.12</b>	<b>Software.....</b>	<b>29</b>



<b>2.13</b>	<b>Datenbanken .....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>30</b>
3.1.1	Präparation von RNA aus großen Zellmengen .....	30
3.1.2	Präparation von RNA aus geringen Zellmengen.....	30
3.1.3	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	31
3.1.4	cDNA-Synthese aus mRNA (Reverse Transkription).....	31
3.1.5	Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) .....	31
<b>3.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Lösungen und Puffer .....	34
3.2.2	Medien und Mediensupplemente .....	35
3.2.3	Isolierung von mononukleären Zellen.....	35
3.2.4	Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen.....	36
<b>3.3</b>	<b>Kultivierung von Zellen .....</b>	<b>37</b>
3.3.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	37
3.3.2	Zellaussaat .....	37
3.3.3	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität .....	39
3.3.4	Ablösen der Zellen .....	39
<b>3.4</b>	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>39</b>
3.4.1	Lösungen und Puffer .....	39
3.4.2	Herstellung von Zelllysaten .....	41
3.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	41
3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) .....	42
3.4.5	Western Blot.....	43
<b>3.5</b>	<b>Analytische immunbiologische Methoden .....</b>	<b>44</b>
3.5.1	Lösungen und Medien .....	44
3.5.2	Klinisches Material von Pankreasgewebstdonoren.....	45
3.5.3	Anreicherung mikrovaskulärer Endothelzellen mittels Dynabeads®.....	45
3.5.4	Anreicherung von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-Zellen und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen mittels MACS MicroBeads® .....	45
3.5.5	Durchflusszytometrie .....	46
3.5.6	Immunhistologische Antikörperfärbungen.....	47
3.5.7	Immunzytologische Antikörperfärbungen .....	48
3.5.8	Hämatoxylin- und Eosinfärbung von Zellen .....	48
<b>3.6</b>	<b><i>In vitro</i> Angiogenesetest .....</b>	<b>49</b>
<b>3.7</b>	<b><i>In vitro</i> Transmigrationstest.....</b>	<b>50</b>
3.7.1	<i>In vitro</i> Transmigration von Endothelzellen .....	50
3.7.2.	<i>In vitro</i> transendotheliale Migration von Tumorzellen und T-Zellen .....	50
<b>3.8</b>	<b><i>In vitro</i> Adhäsionstest.....</b>	<b>51</b>
<b>3.9</b>	<b><sup>3</sup>[ H]-Thymidin Proliferationstest .....</b>	<b>51</b>
<b>3.10</b>	<b>Darstellung der Messergebnisse und Statistik.....</b>	<b>52</b>

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>3.11</b>	<b>Ethikvoten .....</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>Die endotheliale Expression des L1 Zelladhäsionsmoleküls (L1CAM) in Pankreas Kontroll- und Tumorgeweben <i>in situ</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2</b>	<b>Die L1CAM Expression von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>56</b>
4.2.1	Immunzytologische Bestimmung der konstitutiven L1CAM Expression auf Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	56
4.2.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der konstitutiven L1CAM Expression auf Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	57
4.2.3	Immunzytologische Bestimmung der Wirkung von allogenen Kontroll- und Tumorgewebe-Lysat auf die endotheliale L1CAM Expression <i>in vitro</i> .....	59
4.2.4	Immunzytologische Bestimmung der Wirkung von Kontroll- und Tumorzelllinien-Lysaten auf die endotheliale L1CAM Expression <i>in vitro</i> .....	60
4.2.5	Immunzytologische Bestimmung der Wirkung von immunmodulatorischen Zytokinen auf die endotheliale L1CAM Expression <i>in vitro</i> .....	62
4.2.6	Durchflusszytometrische Bestimmung der Wirkung von immunmodulatorischen Zytokinen auf die endotheliale L1CAM Expression <i>in vitro</i> .....	64
4.2.7	Biochemische Bestimmung der Wirkung von immunmodulatorischen Zytokinen auf die endotheliale L1CAM Expression <i>in vitro</i> .....	66
4.2.8	Analyse des L1CAM mRNA Expressionsniveaus nach Stimulation mit immunmodulatorischen Zytokinen <i>in vitro</i> .....	67
<b>4.3</b>	<b>Die Expression von Metalloproteinasen auf Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>69</b>
<b>4.4</b>	<b>Die Expression von L1CAM-Bindungspartnern auf Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>71</b>
<b>4.5</b>	<b>Die Transmigrationskapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>73</b>
4.5.1	Analyse der basalen Transmigrationskapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	74
4.5.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der endothelialen CXCR4 Expression <i>in vitro</i> .....	75
4.5.3	Analyse der Konzentrationsabhängigkeit der SDF-1 $\beta$ stimulierten Transmigration von Kontrollendothelzellen <i>in vitro</i> .....	76
4.5.4	Vergleichende Untersuchungen der SDF-1 $\beta$ -stimulierten Transmigrationskapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	77
4.5.5	Analyse der Inhibition der Transmigration von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	78
4.5.6	Analyse der additiven Inhibition der Transmigration durch L1CAM und NRP-1 spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	79
4.5.7	Analyse der additiven Inhibition der Transmigration durch L1CAM und $\beta_1$ Integrin spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	80
<b>4.6</b>	<b>Die angiogenetische Kapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>81</b>
4.6.1	Messung der Angiogenesekapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	81
4.6.2	Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	82

## INHALTSVERZEICHNIS

4.6.3	Analyse der additiven Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze durch L1CAM und NRP-1 spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .	84
4.6.4	Analyse der additiven Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze durch L1CAM und $\beta_1$ Integrin spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	86
4.6.5	Analyse der Aktivierung der Bildung tubulärer Fortsätze von Kontrollendothelzellen durch Panc1 Tumorzelllinien-Lysat <i>in vitro</i> .....	87
4.6.6	Messung des Einflusses von Panc1 Tumorzelllinien-Lysat auf die Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze von Kontrollendothelzellen <i>in vitro</i> .....	88
4.6.7	Charakterisierung des konstitutiven Expressionsprofils von Panc1 Tumorzellen <i>in vitro</i> .....	90
<b>4.7</b>	<b>Die Adhäsionskapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>91</b>
4.7.1	Bestimmung der Bindung von Panc1 Tumorzellen an Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	91
4.7.2	Inhibition der Panc1 Tumorzell-Bindung an Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	92
<b>4.8</b>	<b>Die transendotheliale Migration der Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>96</b>
4.8.1	Etablierung eines konfluenten Endothelzell-Monolayers auf einer Transmigrationsmembran.....	97
4.8.2	Die transendotheliale Migration von Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	98
4.8.3	Inhibition der transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	100
<b>4.9</b>	<b>Die L1CAM Expression von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen <i>in vitro</i> ....</b>	<b>102</b>
4.9.1	Analyse der Aufreinigung regulatorischer T-Zellen aus peripherem Blut.....	102
4.9.2	Analyse der suppressiven Wirkung regulatorischer T-Zellen auf die Proliferation CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-Zellen <i>in vitro</i> .....	104
4.9.3	Bestimmung der L1CAM Expression auf Kontroll T-Zellen und regulatorischen T-Zellen <i>in vitro</i> .....	105
<b>4.10</b>	<b>Die Adhäsionskapazität der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen an Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>107</b>
4.10.1	Bestimmung der Bindung von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>-</sup> T-Zellen an Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	107
4.10.2	Analyse der Inhibition der Adhäsion von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>-</sup> T-Zellen an Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	108
<b>4.11</b>	<b>Die transendotheliale Migration der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen durch Kontroll- und Tumorendothel <i>in vitro</i> .....</b>	<b>110</b>
4.11.1	Die Transmigration von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>-</sup> T-Zellen durch Kontroll- und Tumorendothel <i>in vitro</i> .....	110
4.11.2	Analyse der Inhibition der transendothelialen Migration der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>-</sup> T-Zellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	111
4.11.3	Analyse der Treg stimulierten transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	112
4.11.4	Analyse der TGF- $\beta$ 1 stimulierten transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	114

## INHALTSVERZEICHNIS

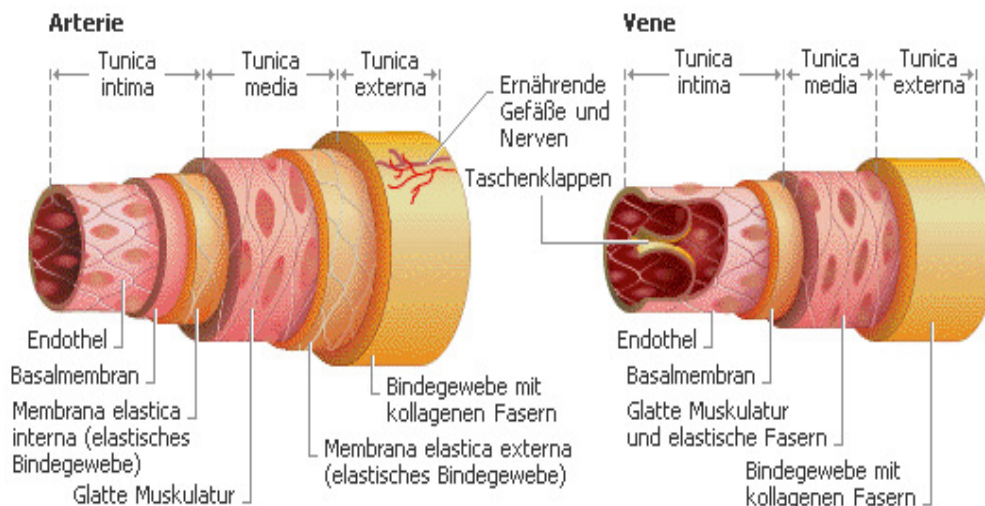
---

4.11.5	Analyse der TGF- $\beta$ 1 stimulierten transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen <i>in vitro</i> .....	115
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>117</b>
5.1	Die erhöhte Vaskularisierung von Pankreaskarzinomen <i>in situ</i> .....	117
5.2	Die erhöhte Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM in Pankreaskarzinomgeweben <i>in situ</i> .....	118
5.3	Die erhöhte Expression des Zelladhäsionsproteins L1CAM auf Pankreas Tumorendothel <i>in situ</i> und <i>in vitro</i> .....	120
5.3.1	Die Tumormikromilieu induzierte endotheliale L1CAM Expression <i>in vitro</i> ...	122
5.4	Das Expressionsmuster der L1CAM Bindungspartner auf Endothel-zellen <i>in vitro</i> .....	126
5.5	Die Rolle von endotheliale L1CAM für die Angiogenese .....	128
5.5.1	Endotheliales L1CAM erhöht die Transmigrationskapazität von Endothelzellen <i>in vitro</i> .....	129
5.5.2	Interaktion von endotheliale L1CAM mit den Bindungspartnern NRP-1 und $\beta$ <sub>1</sub> Integrin <i>in vitro</i> .....	131
5.5.3	Endotheliales L1CAM erhöht die Angiogenesekapazität von Endothelzellen <i>in vitro</i> .....	132
5.6	Die Rolle von endotheliale L1CAM für Metastasierungsprozesse .....	134
5.7	Die L1CAM Expression auf regulatorischen T-Zellen .....	142
5.8	Die selektive Adhäsion von Tregs an Tumorendothel <i>in vitro</i> .....	143
5.9	Die selektive transendotheliale Migration von Tregs durch Tumorendothel <i>in vitro</i> .....	144
5.10	Ausblick.....	147
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>149</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>153</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>184</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Endothelium

Das Endothel besteht aus einer konfluenten Einzelschicht von abgeflachten, rhomboidförmigen Zellen, welche die innere Schicht der Blutgefäße bilden. Der Großteil der Blutgefäße ist aus drei Schichten aufgebaut. Die innere, dem Blut zugewandte, Schicht wird *tunica intima* genannt. Sie besteht aus Endothel, Basalmembran und elastischem Bindegewebe, *membrana elastica interna*. Die *tunica media* liegt darunter und wird in glatte Muskulatur und bei Arterien vom muskulären Typ, in *membrana elastica externa* unterteilt. Den Abschluss des Gefäßes zur Peripherie, bildet eine Bindegewebsschicht, *tunica externa*, die neben Fibrozyten auch zahlreiche Mastzellen enthält (Abbildung 1.1) (Bassenge und Heusch, 1990; Heusch, 1990). Endothelzellen haben bei einem erwachsenen Menschen eine Masse von 1-1,5kg (Cines *et al.*, 1998; Luscher und Barton, 1997) und bekleiden eine Oberfläche von etwa 700m<sup>2</sup> (Luscher und Barton, 1997). Die phänotypische Heterogenität spiegelt die der endothelialen Funktionen wider (Fajardo, 1989).



**Abbildung 1.1:** Aufbau der Blutgefäße. Arterien und Venen, lassen sich in drei Schichten unterteilen. Die innere Schicht (Tunica intima) besteht aus der Endothelschicht und der anliegenden Basalmembran. Bei Arterien ist diese Schicht zur mittleren Schicht, der Tunica media, durch eine Membran aus elastischem Bindegewebe abgegrenzt. Die Tunica media besteht aus Muskelgewebe und bei Arterien aus einer weiteren elastischen Bindegewebsschicht. Die Tunica externa (oder adventitia) ist aus kollagenem Bindegewebe aufgebaut (geändert nach Vorlage der MSN Encarta, 2008).

Dabei ist das Rezeptorrepertoire orts- und situationsspezifisch angepasst (Polverini, 1996). Endothelzellen kontrollieren lebenswichtige physiologische Prozesse, wie Blutgerinnung und Homöostase des Blutes, sowie die Vermittlung der Transmigration von immunmodulatorischen Zellen (Biernacki *et al.*, 2001; Cines *et al.*, 1998; Hirata *et al.*, 2002; Marelli-Berg *et al.*, 1999; Prat *et al.*, 2001; Rodig *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 1999).

### 1.1.1 Das Tumorendothelium

Der Vergleich von Endothelien in normalen Geweben mit Tumorendothel zeigt mannigfaltige Unterschiede. Das Tumorendothel zeigt einen hohen Grad von Desorganisation und Disintegrität (Eberhard *et al.*, 2000; Konerding *et al.*, 2001). Der Blutfluss durch Tumorendothelien ist dysreguliert, wodurch es häufig zu Agglomeration, zum lokalen Erliegen des Blutflusses und zur Umkehr der Blutfließrichtung kommt (Tozer *et al.*, 2005; Tozer und Morris, 1990). Zudem ist das Blut und das umliegende Gewebe neben den Tumorzellen stark hypoxisch und zeigt einen veränderten vaskulären Tonus (Helmlinger *et al.*, 1997). In diesem Umfeld verhalten sich Endothelzellen stark abweichend. Das Tumorendothel proliferiert schneller und partizipiert aktiv an der Angiogenese (Denekamp und Hobson, 1982). Das peritumorale Gewebe sowie das Tumorgewebe sind mit Nährstoffen angereichert, was sich u. a. in einer erhöhten Glukosekonzentration äußert. Sie zeigen aufgrund der Laktatproduktion durch anaerobe Glykolyse einen stark erniedrigten pH-Wert und befinden sich in einem konstanten oxidativen Stress (Brown und Bicknell, 2001; Toyokuni *et al.*, 1995). Endothelzellen zeigen im Tumor einen veränderten Phänotyp, der dem einer aktivierten Endothelzelle im inflammatorischen Zustand ähnelt. Dies äußert sich in veränderten Expressionsmustern für Proteine verschiedenster Funktion, u. a. verschiedene Adhäsionsproteine, und einem erhöhten Metabolitentransport (Nanda und St Croix, 2004). Demnach ist das Endothelium stark vom Tumor beeinflusst, was sich auf Permeabilität, Motilität und Expression von Adhäsionsmolekülen auswirkt und somit auch die Zell-Zell Interaktion und die transendotheliale Migration beeinflusst (Engelhardt und Wolburg, 2004; Kawai *et al.*, 2000).

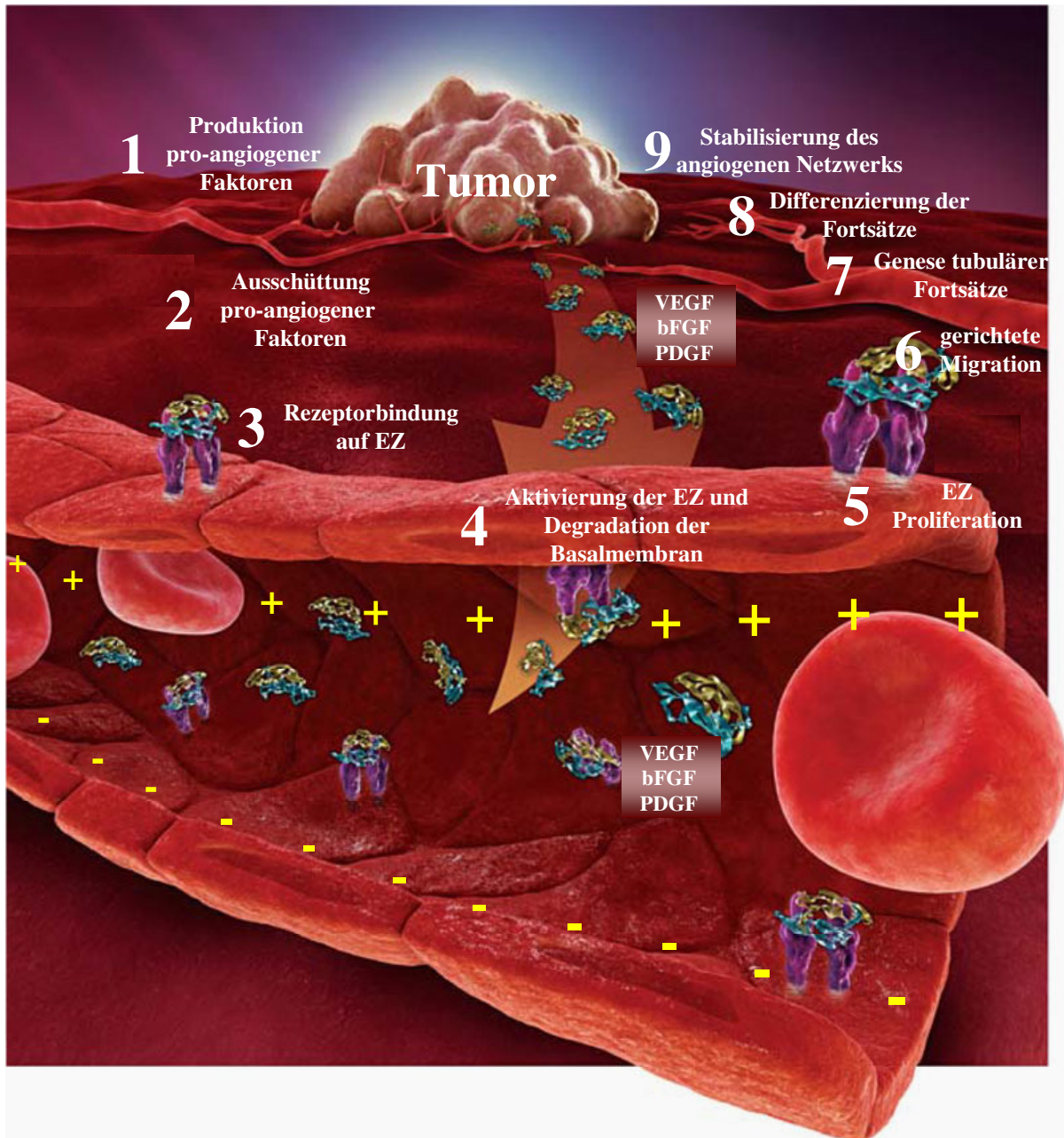
## 1.2 Tumor Angiogenese

Angiogenese bezeichnet die Neubildung von Blutgefäßen durch Sprossung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen (Folkman, 1984). Physiologisch tritt Angiogenese nur im Embryo sowie Fetus und im adulten Organismus bei zyklischen Prozessen im Eierstock und in der Plazenta sowie bei der Wundheilung auf. Alle weiteren Formen der Angiogenese sind mit pathologischen Vorgängen, wie Diabetes (Martin *et al.*, 2003), rheumatoider Arthritis (Cao *et al.*, 2005) und Tumorerkrankungen (Carmeliet, 2005), verbunden. Tumore wachsen bis zu einer Größe von etwa 1-2mm<sup>3</sup> bevor deren Versorgung mit Sauerstoff und Metaboliten aufgrund der Diffusionsgrenze eingeschränkt werden (Papetti und Herman, 2002). Induktion der Angiogenese, bezeichnet als *Angiogenic switch*, erfolgt durch eine Verschiebung des Gleichgewichts von pro- und anti-angiogenen Faktoren auf Seite der pro-angiogenen Faktoren durch physiologische Stimuli wie z. B. Hypoxie (Dor *et al.*, 2001). Als pro-angiogene Faktoren wurden u. a. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), der basale Fibroblasten Wachstumsfaktor (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) und der Blutplättchen abgeleitete Wachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor*, PDGF) identifiziert (Bergers und Benjamin, 2003).

Der Prozess der Angiogenese umfasst mehrere sequentielle Phasen, beginnend mit der Aktivierung der Endothelzellen durch vom Tumor sezernierte, pro-angiogene Faktoren, die an ihre jeweiligen Rezeptoren auf den Endothelzellen binden. Dies führt zu einer Aktivierung der Endothelzellen. Anschließend erfolgt die Degradation der Extrazellulären Matrix (EZM) und der Basalmembran durch aktivierte Metalloproteasen (Grant und Kleinman, 1997). Die aktivierten Endothelzellen proliferieren und migrieren durch die EZM. Durch Polarisation der migrierenden Endothelzellen kommt es schließlich zur Bildung tubulärer Fortsätze. Abschließend erfolgt die Generierung der EZM und die Stabilisierung der neu gebildeten Zell-Zell Kontakte durch Rekrutierung von glatten Muskelzellen und Perizyten (Abbildung 1.2) (Folkman, 1984).

Dieser klassische Mechanismus der Angiogenese kann durch alternative Mechanismen der Tumervaskularisierung ergänzt werden. Diskutiert werden augenblicklich die Mechanismen i) der *splittenden Angiogenese*, bei dem durch Einstülpung der Gefäßwand in das Lumen des Gefäßes zwei neue Gefäße ausgebildet werden, ii) der *Gefäß Kooption*, bei der der Tumor bereits bestehende Gefäße umwächst und sich dadurch zunutze macht, iii) der *vaskulogenen Mimikry*, bei der Tumorzellen zu einem Endothelzell-Phänotyp dedifferenzieren und Gefäß-

ähnliche Strukturen ausbilden, und iv) der *Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen* aus dem Knochenmark und einer damit einhergehenden Neovaskularisierung des Tumors (Hillen und Griffioen, 2007).



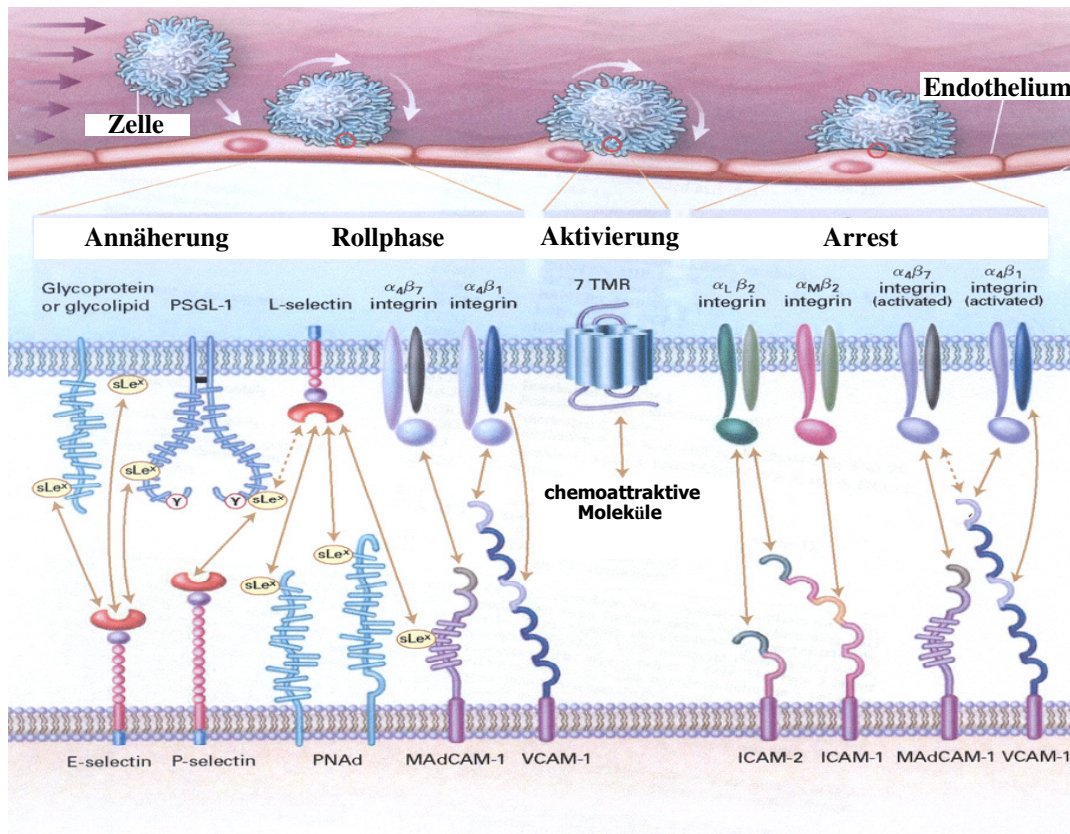
**Abbildung 1.2:** Der Prozess der Angiogenese besteht aus mehreren Phasen. Pro-Angiogene Faktoren werden vom Tumor produziert und ausgeschüttet. Sie binden an spezifische Rezeptoren auf Endothelzellen und induzieren eine modulierte Signaltransduktion, Aktivierung der Endothelzellen, Degradation der Basalmembran und Proliferation der Endothelzellen. Es kommt darauffolgend zur gerichteten Migration der Endothelzellen. Dies führt zum Auswachsen tubulärer Fortsätze und Neuordnung der EZM. Nach Stabilisierung der Zell-Zellkontakte kommt es zur Etablierung des neuen Blutstroms (geändert nach Vorlage der Genentech Biooncology, 2008).



### 1.3 Transendotheliale Migration

Die Migration von Zellen durch das Endothelium setzt spezifische adhäsive Interaktionen zwischen den transmigrierenden Zellen und den Endothelzellen voraus. Aktivierte Endothelzellen produzieren sowohl lösliche als auch Oberflächenmoleküle, die die Interaktion mit den transmigrierenden Zellen vermitteln. Zu den verantwortlichen Oberflächenmolekülen gehören die Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAMs), die in Integrine, Selektine und Immunglobulin-Superfamilien-Moleküle eingeteilt werden.

Die Vorgänge während der transendothelialen Migration können in vier Phasen eingeteilt werden. Während der **Annäherung** der Zelle an die Gefäßwand vermitteln hauptsächlich von Endothelzellen exprimierte Selektine eine kurze und gering affine Bindung von Glykoproteinen und/oder -Glykolipiden der transmigrierenden Zelle an das Endothel. Diese initiale Interaktion führt zu einer Verlangsamung der Zelle im Blutstrom, so dass es zu einer Rollbewegung entlang der Endothelzellen kommt. Während der **Rollphase**, erlaubt die Proximität der beiden Zelltypen verstärkte Interaktion über Integrine, hauptsächlich  $\beta_7$ - und  $\beta_1$  Integrine, welche die jeweiligen Rezeptoren, MAdCAM-1 und VCAM-1, auf der Endothelzelloberfläche binden. In der Rollphase entscheidet sich, ob die Interaktion über die jeweilig exprimierten Rezeptoren und Liganden ausreichen, um die Bindung der rollenden Zelle an das Endothel zu erhalten. Nur ein kleiner Anteil der rollenden Zellen erhält die nötigen Signaltransduktionen, um weiterhin zu adhären und somit durch Chemokine, die auf der Endothelzelloberfläche während der **Aktivierungsphase** exprimiert werden, eine weitere Stimulation zu erfahren (Davies und Hagen, 1993). Chemokin-aktivierte Zellen pressen sich flach an die Endothelzellen und zeichnen sich durch eine höhere Bindungsaffinität aus. Es kommt zu einer bidirektionalen Aktivierung der Zelltypen. Hierdurch werden die Zellen stimuliert, lokomotorisch an fenestrierte Verbindungsstellen zwischen den Endothelzellen zu gelangen. Dieser Stimulus sorgt für das Abstoppen des Rollens, dem **Arrest**, und für Zell-Interaktionsmöglichkeiten mit VCAM-1, ICAM-1 und PECAM-1, welche die transendotheliale Migration einleiten. Gleichzeitig werden die interendothelialen Verbindungen aufgelockt und somit den transmigrierenden Zellen die Diapedese erleichtert. Abschließend kann eine parazelluläre, d. h. zwischen zwei Endothelzellen hindurch, oder transzelluläre, d. h. durch eine Endothelzelle hindurch, Migration der Zelle durch das Endothelmonolayer ins anliegende Gewebe erfolgen (Abbildung 1.3) (Johnson-Leger *et al.*, 2000; Ley *et al.*, 2007).



**Abbildung 1.3:** Essentielle Interaktionen während der transendothelialen Migration. Die transendotheliale Migration kann in vier Abschnitte eingeteilt werden. 1. Die **Annäherung** der Zellen an das Endothel erfolgt durch lokale Verlangsamung des Blutflusses und Ausbildung schwacher Bindungen über Selektine. 2. Die **Rollphase** vermittelt eine Verlangsamung der Zellen am Endothel und eine verbesserte Interaktionsmöglichkeit mit dem Endothel über Integrine. 3. Die Rollphase sorgt mit den stark ausgeprägten Interaktionsmöglichkeiten für die **Aktivierung** beider Interaktionspartner. Diese Aktivierung wird durch chemoattraktive Moleküle und Transmembran-Rezeptoren (TMR) vermittelt. 4. Der **Arrest** der Zellen am Endothel sorgt lokal für eine permanente Aktivierung des Endothels und der Zelle. Diese Aktivierungskaskade kann zur Fenestration des Endothels führen, was eine Voraussetzung für die transendotheliale Migration darstellt (verändert nach von Andrian und Mackay, 2000).

## 1.4 Das Zelladhäsionsprotein L1CAM (CD171)

### 1.4.1 Struktur von L1CAM

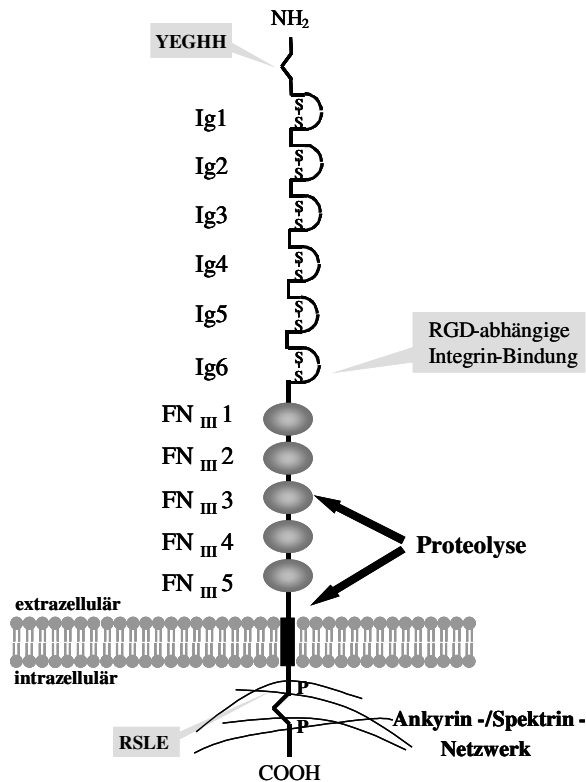
L1CAM ist ein 200-220kDa großes Glykoprotein, das zur Familie der Immunglobulin-(Ig-) Superfamilie gehört (Moos *et al.*, 1988). Das ursprünglich in der Maus charakterisierte Adhäsionsmolekül (Lindner *et al.*, 1983) weist homologe Formen im Menschen (Wolff *et al.*,

1988), in der Ratte (NILE) (Lee *et al.*, 1981), im Huhn (NgCAM) (Grumet *et al.*, 1984) und in *Drosophila* (Neuroglian) (Bieber *et al.*, 1989) auf. Der extrazelluläre Teil von L1CAM besteht aus sechs Ig-Domänen, gefolgt von fünf Fibronectin Typ III-ähnlichen Domänen (Hortsch, 1996). Die extrazellulären Domänen sind durch eine kurze transmembrane Sequenz mit einer hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne verbunden (Abbildung 1.5) (Moos *et al.*, 1988; Reid und Hemperly, 1992; Sonderegger und Rathjen, 1992). L1CAM besitzt mehr als 20 potentielle Glykosylierungsstellen (Moos *et al.*, 1988). Durch Sequenzierung wurden im murinen L1CAM zwei und im humanen L1CAM ein RGD-Motiv identifiziert, die in der sechsten Ig-Domäne lokalisiert sind. Das zweite RGD-Motiv im humanen L1CAM ist durch einen Aminosäureaustausch zu LGD mutiert. Weiterhin enthält das Molekül zwei alternativ gespleißte Mini-Exons. Durch alternatives Spleißen des Exons 2 enthält die extrazelluläre Domäne des neuronal exprimierten L1CAM das aus fünf Aminosäuren bestehende Motiv YEGHH (Jouet *et al.*, 1995), das im nicht-neuronal exprimierten L1CAM fehlt. Im zytoplasmatischen Teil von L1CAM wird durch alternatives Spleißen das Aminosäuremotiv RSLE (Exon 27) eingefügt, dessen Expression ebenfalls nur in Zellen des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden kann (Miura *et al.*, 1991; Takeda *et al.*, 1996).

L1CAM liegt nicht nur in einer transmembranen Form vor, sondern kann durch Abspaltung des extrazellulären Teils in eine lösliche Form überführt werden, die funktionell aktiv ist. Melanomzellen spalten L1CAM von der Zelloberfläche ab und bauen es in die benachbarte extrazelluläre Matrix ein (Montgomery *et al.*, 1996). Lösliches L1CAM kommt auch in malignem Aszites und Serum von Ovarialkarzinom Patientinnen vor (Fogel *et al.*, 2003a; Gutwein *et al.*, 2005). Es kann die Migration von Gliomzellen stimulieren (Izumoto *et al.*, 1996). Überdies induziert aus Aszites aufgereinigtes lösliches L1CAM die Zellmigration und die Phosphorylierung von Erk (Gutwein *et al.*, 2005).

Bei der proteolytischen Prozessierung von L1CAM sind mehrere Proteine beteiligt. Die extrazelluläre Spaltung von L1CAM kann im membranproximalen Bereich konstitutiv durch ADAM10 (*a disintegrin and metalloproteinase*) oder stimuliert durch ADAM17 erfolgen (Gutwein *et al.*, 2003; Maretzky *et al.*, 2005; Mechttersheimer *et al.*, 2001; Stoeck *et al.*, 2006a). Der in der Membran verbleibende C-terminale Teil von L1CAM wird dann mittels regulierter intramembraner Proteolyse (*regulated intramembrane proteolysis*, RIP) durch eine  $\gamma$ -Sekretase weiter prozessiert, wodurch ein kleines, lösliches, zytoplasmatisches Fragment entsteht, welches ins Zytosol entlassen wird (Maretzky *et al.*, 2005). Außerdem können die Serinproteinasen Plasmin und Trypsin L1CAM in der dritten FN<sub>III</sub>-Domäne spalten (Nayeem

*et al.*, 1999; Sadoul *et al.*, 1988). Kalus *et al.* (2003) konnten zeigen, dass L1CAM in diesem Bereich zusätzlich durch die Proprotein-Konvertase PC5A prozessiert werden kann. Die L1CAM Spaltung kann jedoch nicht nur an der Zelloberfläche sondern auch in intrazellulären Kompartimenten oder in von Tumorzellen abgegebenen Exosomen und apoptotischen Membranvesikeln sowohl konstitutiv als auch stimuliert durch ADAM10 stattfinden (Gutwein *et al.*, 2003; Gutwein *et al.*, 2005; Stoeck *et al.*, 2006a).



**Abb. 1.5:** Schematische Strukturübersicht von L1CAM. Die Darstellung zeigt die Ig-Domänen 1-6, gefolgt von den fünf Fibronectin Typ III-Einheiten, dem transmembranen Bereich und der hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne. Neben den Positionen der extrazellulär bzw. zytoplasmatisch alternativ gespleißten Mini-Exons (YEGHH und RSLE) sind die RGD-abhängige Integrinbindungsdomäne sowie die Bereiche der extrazellulären proteolytischen Spaltung gekennzeichnet. Das Protein ist über Ankyrin mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden. Die zytoplasmatische Domäne enthält mehrere Phosphorylierungsstellen.

Die zytoplasmatische Domäne von L1CAM enthält die hoch konservierte Sequenz <sup>1224</sup>SFIGQY<sup>1229</sup>, welche die Bindung an Ankyrin und damit eine Assoziation mit dem Zytoskelett ermöglicht (Garver *et al.*, 1997). Die Bedeutung dieser Interaktion zeigt sich in den schwerwiegenden neurologischen Defekten in AnkyrinB- und L1CAM-knockout Mäusen (Dahme *et al.*, 1997; Demyanenko *et al.*, 1999; Haney *et al.*, 1999; Scotland *et al.*, 1998).

Eine Erklärung für die bei diesen Tieren beobachteten Störungen des Axonwachstums bieten die Daten von (Nishimura *et al.*, 2003). Diese zeigen, dass die homophilische Interaktion der extrazellulären L1CAM-Domänen eine Assoziation zwischen L1CAM und AnkyrinB induziert. Da AnkyrinB zusätzlich mit F-Aktin verbunden ist, baut sich durch den retrograden Transport von F-Aktin eine Zugkraft auf, die Voraussetzung für das L1CAM-vermittelte Auswachsen der Neuriten ist. Im Widerspruch dazu beschreiben Gil *et al.* (2003), dass Ankyrin die Aktin-abhängige retrograde Bewegung von L1CAM inhibiert und eine Interaktion mit statischen Komponenten des Zytoskeletts vermittelt. Vermutlich spielen die Isoformen von Ankyrin unterschiedliche Rollen bei dynamischen Prozessen bzw. der statischen Adhäsion.

### 1.4.2 Vorkommen und Funktion von L1CAM

Das L1CAM Gen ist sowohl in der Maus als auch im Menschen X-chromosomal lokalisiert (Djabali *et al.*, 1990). Mehr als 100 Mutationen konnten in diesem Gen bereits identifiziert werden, welche zu schweren neurologischen Missbildungen und Fehlfunktionen führen (Brummendorf *et al.*, 1998). Dazu gehören X-chromosomal vererbter Hydrozephalus, MASA-Syndrom (*mental retardation, aphasia, shuffling gait and adducted thumbs*) oder spastische Paraplegie Typ I (SPG1) (Fransen *et al.*, 1994; Jouet *et al.*, 1994; Rosenthal *et al.*, 1992; Van Camp *et al.*, 1993; Vits *et al.*, 1994).

L1CAM wurde ursprünglich als ein Zelladhäsionsprotein des Nervensystems identifiziert. Dort wird es in erster Linie auf Axonen und Wachstumskegeln sich entwickelnder Neuronen exprimiert. Das neuronale L1CAM ist an der Migration (Lindner *et al.*, 1983; Thelen *et al.*, 2002), Adhäsion (Keilhauer *et al.*, 1985), am Auswachsen von Neuriten (Chang *et al.*, 1987; Doherty *et al.*, 1995) sowie an der Bündelung (Faszikulierung) (Fischer *et al.*, 1986) und Myelinisierung von Neuriten (Wood *et al.*, 1990) beteiligt. Es spielt damit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gehirns und Nervensystems. L1CAM wird auch auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen, wie Knochenmarkzellen, reife Thymozyten und der Mehrheit der peripheren B- und T-Lymphozyten in der Maus gefunden (Kowitz *et al.*, 1992; Kowitz *et al.*, 1993). Eine L1CAM Expression auf Endothelzellen konnte ebenfalls mehrfach nachgewiesen werden (Felding-Habermann *et al.*, 1997; Kaifi *et al.*, 2006a; Pancook *et al.*, 1997; Prevost *et al.*, 2002; Thies *et al.*, 2002; Voura *et al.*, 2001). Im humanen Immunsystem wird L1CAM

auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und peripheren B-Lymphozyten schwach exprimiert (Ebeling *et al.*, 1996; Pancook *et al.*, 1997). Daneben konnte L1CAM auf unterschiedlichen Tumorentitäten, wie z. B. Melanom, Neuroblastom, Gliom, Bronchial-, Nierenzell- und Pankreaskarzinome sowie gastrointestinale und kolorektale Tumore nachgewiesen werden (Allory *et al.*, 2005; Boo *et al.*, 2007; Fogel *et al.*, 2003b; Gavert *et al.*, 2005; Kaifi *et al.*, 2007; Kaifi *et al.*, 2006b; Meli *et al.*, 1999; Sebens Muerkoster *et al.*, 2007; Senner *et al.*, 2002; Thies *et al.*, 2002).

Während L1CAM im Nervensystem gut charakterisiert ist, ist über die funktionelle Bedeutung von L1CAM im Immunsystem und im Tumorgewebe noch wenig bekannt. L1CAM kann als co-stimulatorisches Protein bei der T-Zellaktivierung wirken. Transfektionen von murinen Myelomzellen mit humanem L1CAM erhöhen die Fähigkeit dieser Zellen, T-Lymphozyten zu aktivieren (Balaian *et al.*, 2000). In Tumorgeweben beeinflusst L1CAM vermutlich die Progredienz der Karzinome. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von L1CAM mit der Bildung von lymphatischen und hämatogenen Metastasen beim malignen Melanom assoziiert ist (Thies *et al.*, 2007; Thies *et al.*, 2002). Kowitz *et al.* (1993) berichteten, dass die Expression von L1CAM auf der murinen Lymphomzelllinie Esb-MP einen Einfluss auf das Tumorwachstum und die Metastasierung hat. Die Daten von Ohnishi *et al.* (1998) lassen vermuten, dass L1CAM durch die Erhöhung der Invasion und Migration von Gliomzellen die Metastasierung begünstigt. Ebenso zeigte die Publikation von Gavert *et al.* (2007), dass die Co-Expression von L1CAM und ADAM10 in Kolonkarzinomzellen die Kapazität der Zellen zur Bildung von Metastasen im Maus-Modell erhöht. In immunhistochemischen Analysen von Kolon- und Ovarialkarzinomen lokalisiert L1CAM an der invasiven Front des Tumors, während die innere Tumorzellmasse weitgehend negativ für L1CAM ist (Gast *et al.*, 2005; Gavert *et al.*, 2005). In Melanomen, kolorektalen Karzinomen sowie Karzinomen der Ovarien, des Uterus und des Endometriums korreliert die Expression von L1CAM mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten (Allory *et al.*, 2005; Boo *et al.*, 2007; Fogel *et al.*, 2003a; Fogel *et al.*, 2003b; Kaifi *et al.*, 2007; Thies *et al.*, 2002; Zecchini *et al.*, 2008).

Die funktionelle Rolle von L1CAM in Tumorzellen konnte in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien weiter definiert werden. So berichten Gast *et al.* (2005), dass eine L1CAM Überexpression in Ovarialkarzinomzellen ein verstärktes Tumorwachstum in NOD/SCID-Mäusen bewirkt. Eine erhöhte L1CAM Expression auf Tumorzellen führt ferner zu einer

verstärkten Motilität der Zellen auf EZM Proteinen und einer erhöhten Invasivität *in vitro* (Gast *et al.*, 2005; Gavert *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2006; Shtutman *et al.*, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von L1CAM in Karzinomzellen deren Apoptose- und Chemoresistenz fördert (Sebens Muerkoster *et al.*, 2007; Stoeck *et al.*, 2006a). Durch Depletion von L1CAM in Ovarialkarzinomzellen erlangen diese ihre Sensitivität zur Apoptoseinduktion zurück (Stoeck *et al.*, 2006a). Ebenso konnten Silletti *et al.* (2004) eine durch L1CAM induzierte, dauerhafte Aktivierung der MAP Kinase Erk nachweisen, die zu einer Erk-abhängigen Genregulation führt. Zugleich bewirkt die Expression von L1CAM in Tumorgewebe von Kolonkarzinom Patienten eine veränderte Genexpression (Gavert *et al.*, 2007). Gast *et al.* (2008) wiederum konnten zeigen, dass eine Mutation der Aminosäuren Threonin<sup>1247</sup> und Serin<sup>1248</sup> (hL1mutTS) im zytoplasmatischen Teil von L1CAM die Erk-abhängige Genregulation aufheben kann. Mit dieser mutierten L1CAM Form kann das Tumorstadium in NOD/SCID Mäusen, die Migration und Invasion von Tumorzellen und der embryonalen Nierenzelllinien HEK293 *in vitro*, sowie die L1CAM-abhängige Genregulation auf Ebene L1CAM negativer Zellen reduziert werden. Durch eine Behandlung der Tumorzellen mit einem L1CAM spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) können die durch diese mutierte Form von L1CAM beobachteten Effekte bestätigt werden (Gast *et al.*, 2008). Auch andere Autoren konnten ein therapeutisches Potential verschiedener L1CAM spezifischer mAk nachweisen. So bewirkt eine Behandlung von Tumorzellen mit L1CAM spezifischen mAk eine Reduktion der Zell-Proliferation *in vitro*, ein reduziertes Tumorstadium *in vivo*, sowie eine erhöhte Überlebensrate von Tumor-tragenden Mäusen, die mit einer Reduktion der Bildung von malignem Aszites einhergeht (Arlt *et al.*, 2006; Knogler *et al.*, 2007; Novak-Hofer *et al.*, 2008; Primiano *et al.*, 2003). Die bisher beschriebenen Effekte von L1CAM in verschiedenen Tumorzellsystemen konnten von Zecchini *et al.* (2008) noch weiter differenziert werden. So konnten die Autoren unterschiedliche Funktionen in nicht-karzinogenen ovariellen Epithelzellen und transformierten Ovarialkarzinomzellen L1CAM zuweisen. In den nicht-karzinogenen Epithelzellen fördert L1CAM die Zell-Zell-Adhäsion und verstärkt die induzierte Apoptose *in vitro*. L1CAM zeigt jedoch keinen Einfluss auf die Invasions- und Proliferationskapazität dieser Zellen *in vitro*. Im Unterschied dazu inhibiert L1CAM in Ovarialkarzinomzellen die interzelluläre Adhäsion, fördert die Apoptoseresistenz, die Invasions- und Proliferationskapazität der Zellen, sowie die transendotheliale Migrationskapazität *in vitro*.

Wie die L1CAM Expression reguliert wird, ist bisher weitgehend unbekannt. (Wolman *et al.*,

2007) beschreiben eine Regulation der axonalen L1CAM Proteinmenge über eine genetische Interaktion mit Semaphorin3D, was zur Faszikulierung von Axonen führt. Eine Inkubation von immortalisierten Epithelzellen des Pankreas mit dem Transformations-Wachstumsfaktor- $\beta 1$  (*transforming growth factor  $\beta 1$* , TGF- $\beta 1$ ) führt ebenfalls zu einer Erhöhung der L1CAM Expression. Alternativ lässt sich die L1CAM Expression durch Co-Kultur mit Pankreas Myofibroblasten, die TGF- $\beta 1$  sezernieren, erhöhen (Geismann *et al.*, 2008; zur Veröffentlichung eingereicht). In Ovarialkarzinomzellen ist die L1CAM Expression durch den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (*hepatocyte growth factor*, HGF) stimulierbar (Novak-Hofer *et al.*, 2008). Van Kilsdonk *et al.* (2008) konnten nachweisen, dass L1CAM in Melanomzellen durch das Zelladhäsionsprotein ALCAM regulierbar ist. Dabei führt eine lösliche Form von ALCAM, bestehend aus der ersten Ig-Domäne, zur Suppression der L1CAM Expression. Eine Deletionsmutante von ALCAM, bei der die ersten zwei Ig-Domänen deletiert wurden, bewirkt hingegen eine Verstärkung L1CAM Expressionsmenge. In Kolonkarzinomzellen wiederum konnte eine Regulation der L1CAM Expression über den  $\beta 1$ -Catenin/TCF Signalweg nachgewiesen werden (Gavert *et al.*, 2005).

### 1.4.3 Bindungseigenschaften von L1CAM

Die Gruppe der extrazellulären Bindungspartner von L1CAM kann unterteilt werden in i) neuronale Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) wie L1CAM selbst, Nr-CAM, F3/II/contactin und Axonin-1/TAG-1/TAX-1; ii) nicht Ig-Familien CAMs wie Integrine; iii) Komponenten der extrazellulären Matrix wie Laminin, Phosphocan und Neurocan und iv) Rezeptoren wie EGF-Rezeptor (Islam *et al.*, 2004), FGF-Rezeptor (FGFR) und Neuropilin-1 (NRP-1) (Castellani *et al.*, 2000). Die Assoziation mit unterschiedlichen Bindungspartnern bestimmt dabei die Funktion von L1CAM während der Entwicklung des Nervensystems. So nutzen PC12 Zellen die homophilische L1CAM-Interaktion für die homotypische Zelladhäsion, während die Bindung an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine sowie eine heterophilische Interaktion mit NCAM das Neuritenwachstum stimuliert (Heiland *et al.*, 1998; Horstkorte *et al.*, 1993; Kadmon *et al.*, 1990; Yip und Siu, 2001; Yip *et al.*, 1998). Weiterhin induzieren heterophilische Interaktionen mit Axonin-1/TAG-1/TAX-1 (Kuhn *et al.*, 1991) oder F3/FII/contactin (Brummendorf und Rathjen, 1993; Morales *et al.*, 1993) das initiale Auswachsen der Axone. Dieses wird durch Bindung von L1CAM an Neurocan blockiert (Friedlander *et al.*, 1994; Rauch *et al.*, 2001). Außerdem wurde beschrieben, dass die homophilische L1CAM-Interaktion eine Aktivierung des FGFR zur Folge hat, wodurch ebenfalls das



Neuritenwachstum stimuliert wird (Doherty und Walsh, 1996; Saffell *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1994). Cheng *et al.* (2005) konnten eine Interaktion von L1CAM mit dem Adapterprotein RanBPM *in vitro* und *in vivo* nachweisen. Diese Interaktion führt zur Blockade einer L1CAM-induzierten Aktivierung von Erk und einem L1CAM-vermittelten Neuritenwachstum. Daneben interagiert die erste Ig-Domäne von L1CAM mit NRP-1 und ist damit Teil eines Rezeptorkomplexes, der für die Repulsion von Axonen durch Semaphorin3A (Sema3A) verantwortlich ist (Castellani *et al.*, 2000; Castellani *et al.*, 2002). 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 L1CAM diese Repulsion umkehren. Die Bindung von Sema3A an NRP-1 führt zudem zu einer Co-Internalisierung von L1CAM und NRP-1 durch einen L1CAM-vermittelten Clathrin-abhängigen Mechanismus (Castellani *et al.*, 2004). Weiterhin wurde eine Interaktion von auf Ovarialkarzinomzellen exprimiertem L1CAM mit auf Mesothelzellen exprimiertem NRP-1 nachgewiesen (Stoeck *et al.*, 2006). Es konnte ebenfalls eine *trans* Interaktion von L1CAM mit dem GPI-verankerten Protein CD24 auf auswachsenden Neuriten bewiesen werden (Kadmon *et al.*, 1995; Kleene *et al.*, 2001). Mit Hilfe von aufgereinigtem murinen CD24 und L1CAM konnte zudem gezeigt werden, dass die Bindung zwischen CD24 und L1CAM nur zustande kommt, wenn CD24 mit  $\alpha$ -2,3-Sialylsäuren modifiziert ist (Kleene *et al.*, 2001). Weitere Bindungspartner von L1CAM stellen verschiedene Integrine dar. Neben  $\alpha_v\beta_5$  kann L1CAM auch mit  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  und dem Thrombozyten-spezifischen Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  über das RGD-Motiv in der sechsten Ig-Domäne interagieren (Blaess *et al.*, 1998; Ebeling *et al.*, 1996; Felding-Habermann *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 2004; Hall und Hubbell, 2004; Kleene *et al.*, 2001; Moos *et al.*, 1988; Oleszewski *et al.*, 1999; Reidy *et al.*, 2006; Ruppert *et al.*, 1995; Voura *et al.*, 2001). Eine RGD-unabhängige Bindung geht L1CAM mit  $\alpha_9\beta_1$  ein (Silletti *et al.*, 2000). Die Bindung der sechsten Ig-Domäne von L1CAM an  $\alpha_v\beta_3$  auf Endothelzellen bewirkt eine Phosphorylierung des L1CAM Proteins, des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*, VEGFR2) sowie des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (Hall und Hubbell, 2004; Reidy *et al.*, 2006).

Die Assoziationen zwischen L1CAM und den verschiedenen Bindungspartnern können in *cis*, innerhalb derselben Zellmembran, oder in *trans*, zwischen benachbarten Zellen, stattfinden. Weiterhin wurde dargestellt, dass *cis*-Interaktionen die Affinität der L1CAM-Bindung an Liganden in *trans* erhöhen (Feizi, 1994; Kadmon *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996). Die Mechanismen, welche die Affinität zu verschiedenen Bindungspartnern regulieren, sind nur

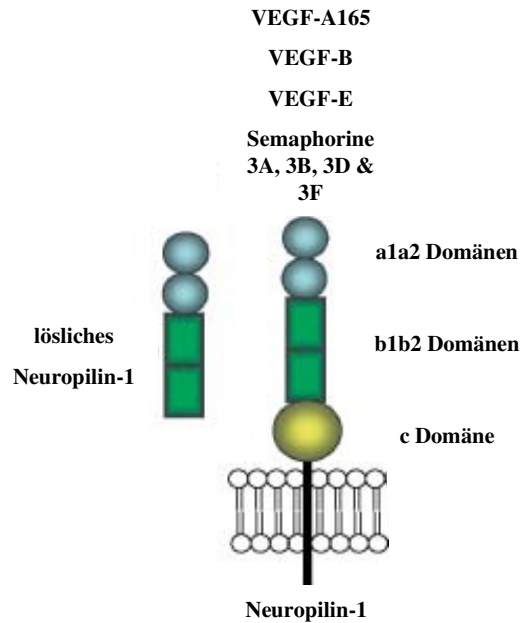
teilweise aufgeklärt. Arbeiten von De Angelis *et al.* (2002) zeigen, dass die N-terminale Sequenz YEGHH, die durch das Mini-Exon 2 kodiert wird, für die homo- sowie heterophilische Bindung an neuronale Liganden, wie Axonin-1/TAG-1/TAX-1, wichtig ist. (Haspel und Grumet, 2003) unterscheiden zwischen zwei Bindungsmodellen. Beim *modulären Modell* vermitteln einzelne extrazelluläre Domänen von L1CAM die Assoziation mit bestimmten Bindungspartnern. Beispielsweise lokalisieren die Bindungsstellen für Neurocan und Neuropilin-1 in der ersten Ig-Domäne (Castellani *et al.*, 2002; Oleszewski *et al.*, 1999), während die Bindung an verschiedene Integrine über das RGD-Motiv in der sechsten Ig-Domäne erfolgt (Felding-Habermann *et al.*, 1997; Montgomery *et al.*, 1996; Oleszewski *et al.*, 1999). Im *kooperativen Modell*, das die Assoziation zwischen L1CAM und neuronalen Zelladhäsionsmolekülen beschreibt, kooperieren die ersten vier Ig-Domänen miteinander. Vermutlich kommt es zur Ausbildung einer hufeisenförmigen Struktur, die bereits für die L1CAM verwandten Proteine Hemolin (Su *et al.*, 1998) und Axonin-1 (Freigang *et al.*, 2000) beschrieben wurde.

### 1.5 Neuropilin-1

Neuropilin-1 (NRP-1) ist ein 130kDa transmembranes Glykoprotein, das u. a. auf Neuronen, Osteoblasten, glomerulären Epithelzellen, arteriellen Endothelzellen, Dendriten und naiven T-Zellen sowie Tumorzellen exprimiert wird (Harper *et al.*, 2001a; Harper *et al.*, 2001b; Herzog *et al.*, 2001; Soker *et al.*, 1998; Tordjman *et al.*, 2002). NRP-1 stellt einen Rezeptor für die Klasse 3 Semaphorine 3A, 3B, 3C, 3D und 3F sowie verschiedene Mitglieder der VEGF Familie, VEGF-A165, VEGF-B, VEGF-E und Plazenta Wachstumsfaktor (*placental growth factor*, PlGF) (Staton *et al.*, 2007). NRP-1 besteht aus den drei extrazellulären Domänen a1/a2, b1/b2 und c, einer transmembranen Region und einem kurzen, 40 Aminosäureumfassenden, zytoplasmatischen Teil. Die Domänen a1/a2 und b1/b2 stellen Bindungsstellen für die Klasse 3 Semaphorine dar. Zusätzlich bindet die b1/b2 Domäne auch VEGF-A165 (Staton *et al.*, 2007). Durch Interaktion der c Domänen kann NRP-1 Homodimere ausbilden (Renzi *et al.*, 1999). Weiterhin kann NRP-1 durch alternatives Splicen als lösliches Molekül von der Zelle sezerniert werden. Lösliches NRP-1 umfasst die extrazellulären Domänen a1/a2 und b1/b2 (Abbildung 1.6). Liegt lösliches NRP-1 dimerisiert vor, kommt es u. a. zur Aktivierung des VEGFR2 durch VEGF-A165 und einer erhöhten Proliferation von

Endothelzellen. Als Monomer hingegen fungiert lösliches NRP-1 als natürlicher Inhibitor von VEGF durch Bindung desselben (Cackowski *et al.*, 2004; Gagnon *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2001).

NRP-1 ist während der Entwicklung des Nervensystems an der Wegfindung von Neuronen und am Auswachsen von Axonen beteiligt (Chen *et al.*, 2005). Dabei bilden NRP-1 und L1CAM Teil eines Rezeptorkomplexes für die Bindung von Semaphorin3A (Sema3A), die die Richtung des axonalen Wachstums durch Attraktion oder Repulsion beeinflussen (siehe Abschnitt 1.4.3) (Castellani *et al.*, 2000). Exprimiert auf Endothelzellen spielt NRP-1 eine wichtige Rolle bei der Bildung von Blutgefäßen. Eine Studie von Kitsukawa *et al.* (1995) zeigte, dass NRP-1 defiziente Mäuse durch schwere Fehlbildungen des Herz-Kreislauf-Systems bereits in der Embryonalphase sterben. Darüber hinaus konnten Murga *et al.* (2005) nachweisen, dass NRP-1 die Adhäsion von Endothelzellen an Proteine der EZM fördert. Durch Bindung an VEGF-A165 verstärkt NRP-1 die Funktion des VEGFR2 auf Endothelzellen. Dabei bildet sich ein Komplex aus VEGFR2, NRP-1 und VEGF-A165, der eine Aktivierung des VEGFR2 und eine VEGF-A165-vermittelte Migration der Endothelzellen bewirkt (Soker *et al.*, 1998). NRP-1 stellt somit einen Co-Rezeptor von VEGFR2 auf Endothelzellen dar (Staton *et al.*, 2007). NRP-1 Expression kann darüber hinaus bei verschiedenen Tumorentitäten, u. a. Brust-, Prostata-, Lungen-, Pankreas- und Kolonkarzinom nachgewiesen werden (Kawakami *et al.*, 2002; Lantuejoul *et al.*, 2003; Latil *et al.*, 2000; Parikh *et al.*, 2004; Parikh *et al.*, 2003; Soker *et al.*, 1998). Über die Funktion des in Tumorgewebe exprimierten Moleküls ist bisher wenig bekannt. Latil *et al.*, (2000) zeigten, dass die Expression von NRP-1 in Prostatakarzinomzellen zu einem aggressiveren Phänotyp und zur verstärkten Tumolvaskularisierung führt. Die Überexpression von NRP-1 in einer Ratten Prostatakarzinomzelllinie führt zur verstärkten Migration und gleichzeitig zur erhöhten Bindung von VEGF-A165 *in vitro*. Zudem bewirkte die Überexpression von NRP-1 in diesem Zellsystem bei *in vivo* Experimenten eine erhöhte Dichte mikrovaskulärer Gefäße, eine erhöhte Proliferation von Endothelzellen und eine geringere Apoptoserate der Tumorzellen. Bachelder *et al.* (2001) beobachteten, dass NRP-1 auf der metastasierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 exprimiert ist, während es auf der nicht-metastasierenden Zelllinie MDA-MB-453 fehlte. Die Expression von NRP-1 in MDA-MB-453 Zellen führt unter Hypoxie zu einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose. Interessanterweise kann NRP-1



**Abb. 1.6:** Schematisches Modell von Neuropilin-1 (NRP-1). NRP-1 besteht aus den drei extrazellulären Domänen a1/a2, b1/b2 und c, einer transmembranen Region und einem kurzen zytoplasmatischen Teil. NRP-1 bildet Homodimere durch Interaktion der c Domänen. Lösliches NRP-1 besteht nur aus den a1/a2 und b1/b2 Domänen. Die Bindung an Semaphorine und VEGF Spliceformen erfolgt ebenfalls an den a1/a2 und b1/b2 Domänen (aus Staton *et al.*, 2007; geändert).

einen Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K)-abhängigen Signalweg (Akt/PKB) unabhängig von VEGF Rezeptoren aktivieren. Dies lässt vermuten, dass NRP-1 in Tumorzellen auch durch andere Tyrosinkinase-assoziierte Rezeptoren Signalwege aktivieren kann (Chen *et al.*, 2005). Auch konnte bewiesen werden, dass NRP-1 in Tumorzellen die keine Expression des VEGFR1 sowie VEGFR2 zeigen, die autokrine Funktion von VEGF und eine dadurch erhöhte Migration der Tumorzellen fördert (Bachelder *et al.*, 2001; Bachelder *et al.*, 2003; Soker *et al.*, 1998).

## 1.6 Integrine

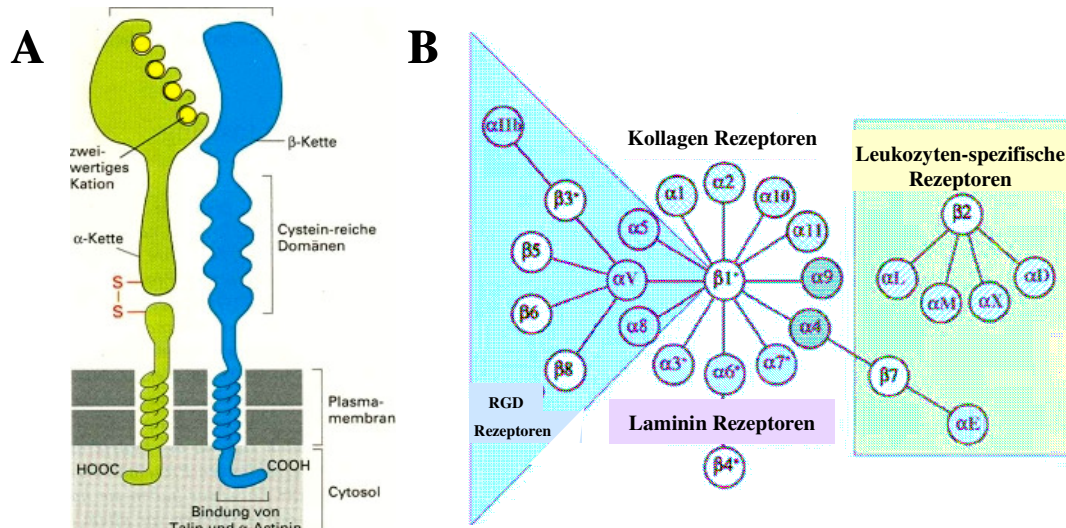
Integrine sind eine Gruppe von transmembranen Glykoproteinrezeptoren, die zuerst am Huhn entdeckt wurden (Hynes, 2002) und von fast allen Zellen exprimiert werden (Longhurst und Jennings, 1998). Jedes Integrin besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die nicht-kovalent

miteinander verbunden sind (Abbildung 1.8 A). Beide Untereinheiten sind Typ 1 Transmembranproteine mit einer großen extrazellulären und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne. Säugetiere exprimieren 18  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -Untereinheiten, die 24 verschiedene  $\alpha\beta$ -Heterodimere bilden können. Während einige Untereinheiten nur in einem einzigen Heterodimer vorkommen, konnten 12  $\beta_1$ - und 5  $\alpha_v$ -Dimere identifiziert werden (Abbildung 1.8 B) (Hynes, 2002). Integrine lassen sich aufgrund unterschiedlicher Substratbindung in vier Klassen aufteilen (Humphries *et al.*, 2006): Die Substrate der RGD-bindenden Integrine tragen das Tripeptid-Motiv Arg-Gly-Asp, welches sich an eine von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette gemeinsam ausgebildeten Struktur anlagern kann. Zu ihnen gehören alle  $\alpha_v$ -Integrine, sowie  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$  und  $\alpha_{11b}\beta_3$ . Im Gegensatz dazu zählen  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_7$ ,  $\alpha_9\beta_1$ , alle  $\beta_2$ -Integrine und  $\alpha_E\beta_7$  zu den LDV-bindenden Integrinen. Auch wenn nicht alle Mitglieder dieser Gruppe direkt an das Leu-Asp-Val (LDV)-Motiv binden besteht eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Bindungsstellen der Substrate dieser Integrine. Die  $\beta_1$ -bindenden  $\alpha$ -Ketten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$  und  $\alpha_{11}$  besitzen eine zusätzliche  $\alpha A$ -Domäne. Sie bilden eine separate Laminin/Kollagen-bindende Unterfamilie. Für die Bindung von Kollagen konnte eine Funktion der A-Domäne von  $\alpha_2$ -Integrin nachgewiesen werden (Emsley *et al.*, 2000).

Der Mechanismus der Laminin Bindung ist noch unbekannt. Die A-Domänen freien, Laminin-bindenden Integrine sind hingegen spezifische Rezeptoren für Laminin. Zu ihnen zählen  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_7\beta_1$  und  $\alpha_6\beta_4$ . Die Expression vieler Integrine ist spezifisch für bestimmte Zelltypen.  $\alpha_{11b}\beta_3$  stellt das wichtigste Integrin Dimer auf Thrombozyten dar. Es bindet an Fibrinogen und den von-Willebrand-Faktor (Phillips *et al.*, 1991).  $\beta_2$ -Integrine werden nur auf Leukozyten exprimiert und sind dort für die hetero- typische Bindung anderer Zellen verantwortlich (Hynes, 2002). Epitheliale Zellen hingegen exprimieren viele Integrine, die an EZM Komponenten binden. Dies umfasst u. a. verschiedene  $\beta_1$ -Integrine ( $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$ ), sowie  $\alpha_6\beta_4$ ,  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_v\beta_6$  (Gilcrease, 2007).

Die Aufgabe der Integrine besteht in der Interaktion mit EZM Proteinen und Bindungspartnern auf anderen Zellen. Die Bindung eines Liganden an ein Integrin resultiert in einer Konformationsänderung des  $\alpha\beta$ -Heterodimers, die sich bis zur zytoplasmatischen Domäne fortsetzt und diverse Signaltransduktionskaskaden in der Zelle auslöst. Dies hat u. a. eine Umstrukturierung des Zytoskeletts, Veränderungen im Adhäsions- und Migrationsverhalten und die Proliferation der Zellen zur Folge (Brakebusch und Fassler, 2003; Schwartz und Assoian, 2001; Watt, 2002; Zahir *et al.*, 2003). Aus diesem Grund sind

Integrine an der Embryonalentwicklung, der Regulation des Immunsystems, der Tumorprogression, sowie der Angiogenese beteiligt.



**Abb. 1.8:** **A** Schematische Darstellung des Integrin Heterodimers mit  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette (aus „Molekularbiologie der Zelle“ von Alberts, B.; Wiley-Vch Verlag; 2004). **B** Übersicht über die Integrin Heterodimere (aus Hynes; 2002; verändert).

## 1.7 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine aggressive, maligne Erkrankung. In den letzten Jahrzehnten hat die Häufigkeit des Auftretens in westlichen Industrienationen stark zugenommen. Es ist mit etwa 30.000 jährlichen Neuerkrankungen in Nordamerika der zweithäufigste maligne, gastrointestinale Tumor und die fünfthäufigste Todesursache unter den Karzinomen beim Adulten (Lockhart *et al.*, 2005; Nitecki *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 2005).

Nahezu alle Fälle gehen vom duktalem Ausführungsepithel aus. Histologisch ist es als tubuläres, alveoläres oder azinöses Adenokarzinom zu erkennen, welches u. a. Pseudozysten bildet. Häufig kommt es zu einem lokalen Sekretstau, der zur partiellen Autolyse führt. 80-90% aller Pankreaskarzinome entstehen im Pankreaskopf und nur sehr selten im Pankreasschwanz oder im Pankreaskörper. Die Erkrankung zeigt ein schnelles, invasives Tumorwachstum, welches mit frühzeitigem Gefäß- und Lymphbahninfiltrationen einher geht. 80% der Pankreaskarzinome zeigen zum Zeitpunkt der Diagnose Metastasen in Leber, Lunge, Nieren und am Skelett (Bilchik *et al.*, 2000; Nagai *et al.*, 1986; Nakao *et al.*, 1996). Der

symptomarme Verlauf der Erkrankung führt dazu, dass nur 20-30% aller Pankreaskarzinome operativ resektabel sind (Herfarth, 1996). 90% der Patienten versterben innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung (Gudjonsson, 1987). Die mittlere Überlebensrate liegt unter sechs Monaten (Neoptolemos *et al.*, 2004; Ozawa *et al.*, 2001) und bei primär kurativ operierten Patienten umfasst die 5-Jahres Überlebensrate etwa 30% der Patienten (Trede, 1996). Da Pankreaskarzinomzellen meist Resistenzen gegen zytostatisch-zytotoxische Therapien zeigen, verfehlen konservative Therapieansätze oft ihr Ziel. Momentan stellt eine frühzeitige chirurgische Resektion, die einzige kurative Therapie dar (Grace *et al.*, 1990; Schoenberg *et al.*, 1997).

### 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM wird von einer Reihe verschiedener Tumorentitäten exprimiert. Dabei korreliert die Expression von L1CAM in einigen Tumoren mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten (Fogel *et al.*, 2003a; Fogel *et al.*, 2003b). Die bisherigen Untersuchungen von L1CAM beschränkten sich jedoch weitgehend auf die funktionellen Eigenschaften in Tumorzellen.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit haben zum Ziel, die funktionellen Eigenschaften von L1CAM auf humanen Tumorendothelzellen im Vergleich zu humanen Kontrollendothelzellen zu charakterisieren.

Es sollte der Vaskularisierungsstatus von humanem Pankreaskarzinomen *in situ* und der L1CAM Expressionsstatus von humanem Pankreas Tumorendothel *in situ* und *in vitro* im Vergleich zu humanem Kontrollendothel charakterisiert werden.

Zusätzlich sollten mögliche angiogene Induktoren, die zu einer veränderten endothelialen L1CAM Expression führen könnten, identifiziert werden.

Weiterhin sollte der Expressionsstatus heterophiler L1CAM Bindungspartner analysiert werden.

Auf Basis der zugrundeliegenden Expressionsmuster von L1CAM und dessen Bindungspartnern sollte deren Relevanz für die Migrations- und Angiogenesekapazitäten von humanen Pankreas Tumorendothelzellen *in vitro* im Vergleich zu humanen

Kontrollendothelzellen analysiert werden.

Ebenfalls sollte die Relevanz von L1CAM und dessen Bindungspartner für die Zelladhäsions- und transendothelialen Migrationskapazitäten von Tumorzellen und regulatorischen T-Zellen *in vitro* untersucht werden.

Durch gezielte Blockade von L1CAM und dessen Bindungspartnern sollte eine Tumorendothel-spezifische Inhibition der Migration und Bildung tubulärer Fortsätze erzielt werden. Ebenso die Zelladhäsion und –transmigration von Tumorzellen und regulatorischen T-Zellen durch Tumorendothel sollte durch gezielte Blockade von L1CAM und dessen Bindungspartnern inhibiert werden.

Die spezifische Inhibition von L1CAM auf Tumorendothel könnte zu einer reduzierten Vaskularisierung des Tumorgewebes sowie verringerten Bildung früher Metastasen führen.



## 2 Material

### 2.1 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau; D
CASY1	Schärfe-System, Reutlingen; D
Cryostat CM 3050S	Leica, Wetzlar; D
Durchflußzytometer FACSCalibur®	Becton Dickinson, Heidelberg; D
Durchflußzytometer FACSCanto II®	Becton Dickinson, Heidelberg; D
ELISA-Meßgerät	Tecan, Crailsheim, D
Eppendorf-Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau; D
Feinwaage	Mettler-Toledo, Giessen, D
Folienschweißgerät	Perkin Elmer, Wellesley; USA
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr, Ochsenhausen; D
Gefrierschrank, -70°C Bio Freeze	Forma Scientific, USA
Heizblock	Grant Instruments, Cambridgeshire, GB
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen; D
Magnetheizrührer	Heidolph, Heidelberg; D
Mikroskop	Hund, Wetzlar; D
Mikroskop	Leitz, Wetzlar; D
Mikroskop mit Fluoreszenzeinheit	Zeiss, Göttingen; D
Mikrowelle	Sharp, Hamburg; D
Milli-Q-Wasserreinigungssystem	Millipore, Eschborn; D
MACS®, Separator, klein	Miltenyi, Bergisch-Gladbach; D
MACS®, Separator, groß	Miltenyi, Bergisch-Gladbach; D
MACS®, MultiStand Magnet	Miltenyi, Bergisch-Gladbach; D
MPC (magnet particle concentrator)	Dynal, Hamburg; D
Nano-Drop	NanoDrop Technologies, Wilmington; USA
pH-Meßgerät	WTW, Weilheim i. OB; D
Pipettierhilfe Pipetboy	IBS Integra Biosciences, Fernwald; D
RT-PCR-Cycler GeneAmp5700	Applied Biosystems, Darmstadt; D
Szintillations Zähler 1450 MicroBeta™	Perkin Elmer, Wellesley; USA

## MATERIAL

---

Spektrophotometer	Biochrom, Cambridge; GB
Sterilwerkbank	Baker, Sanford, Maine; USA
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau; D
Stickstofftank	Cryotherm, Kirchen/Sieg; D
Tischzentrifuge Biofuge	Heraeus, Hanau; D
Vortex Reax 2000	Heidolph, Heidelberg; D
Waage	Mettler-Toledo, Giessen; D
Wasserbad	Julabo, Seelbach; D
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen; D
Zentrifuge (Zellkultur)	Heraeus, Hanau; D

### 2.2 Gebrauchsmaterialien

Bechergläser, 200-2000ml	Fisher Scientific, Schwerte; D
Blotkammer	CTI GmbH, Idstein; D
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München; D
Erlenmayerkolben, 500-1000ml	Fisher Scientific, Schwerte; D
Färbekästen nach Hellendahl	Carl Roth, Karlsruhe; D
Gel Glasplatten	Bio-Rad, München; D
Glasflaschen, 50-500ml	Schott, Mainz; D
Glaspipetten	Hischmann, Eberstadt; D
Messzylinder	Vitlab, Großostheim; D
MicroAmp Splash Free 96-well Ständer	Applied Biosystems, Darmstadt; D
Multikanalpipette (8 Kanäle)	Rainin, Leiden; NL
Pipetten, 2-1000µl	Gilson, Bad Camberg; D
Probenkamm	Bio-Rad, München; D

### 2.3 Verbrauchsmaterialien

Blotfilter Whatman®	Carl Roth, Karlsruhe; D
Deckgläschen rechteckig	VWR, Darmstadt; D

## MATERIAL

---

Deckgläschen rund	Carl Roth, Karlsruhe; D
Einfrierröhrchen 1,5ml	Nalgene, Rochester; D
Einmalspritzen ohne Nadel, 5-50ml	Terumo, Eschborn; D
Save-lock-Röhrchen, 0,5, 1,5 und 2ml	Eppendorf, Eppendorf; D
FACS-Röhrchen aus Polystyrol	Greiner, Frickenhausen; D
Filterpapiermatte, A 90x120cm	Wallac, Turku; FI
Filterpipettenspitzen, 0-10, 10-200, 200-1000µl	Starlab, Ahrensburg; D
Flachbodenplatten, 6-, 24-, 48- und 96-Well	TPP, Trasadingen; CH
Glasobjektträger, 76 x 26 mm, Mattrand	Langenbrink, Emmendingen; D
Glaspasteurpipetten, 150 mm	WU, Mainz; D
Immobilon-Membran	Millipore, Eschborn; D
Kammerobjektträger	Nunc, Wiesbaden; D
Leucosep® Tubes, 30ml	Greiner, Frickenhausen; D
MACS®, MS Säulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach; D
MACS®, LS Säulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach; D
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt; D
MicroAmp Optical 96-well Platte	Applied Biosystems, Darmstadt; D
MicroSpin G-50 Säulen	Amersham, Braunschweig; D
Pipettenspitzen, 0-10, 10-200, 200-1000µl	Starlab, Ahrensburg; D
Röntgenfilm	Amersham, Braunschweig; D
Sterilfilter, 0,22µm	Millipore Eschborn; D
Transwell Migrationskammern	Corning, Schiphol-Rijk; NL
Zellkulturflaschen, 25, 75 und 150cm <sup>2</sup>	TPP, Trasadingen; CH
Zellkulturschalen, 100x20mm	TPP, Trasadingen; CH
Zellkulturschalen, 6x15mm	TPP, Trasadingen; CH
Zellsieb, 40µm	Falcon BD, Heidelberg; D
Zentrifugenröhrchen, 15 und 50ml	TPP, Trasadingen; CH

### 2.4 Chemikalien

Aceton	Riedl-de Haen, Seelze; D
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe; D

## MATERIAL

---

Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt; D
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, Deisenhofen; D
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen; D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt; D
EDTA	Biochrom, Berlin; D
Eosin	Merck, Darmstadt; D
Ethanol absolut	Riedl-de Haen, Seelze; D
Fibronektin	Roche, Mannheim; D
Gelatine	Sigma, Deisenhofen; D
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe; D
Glyzeringelatine	Merck, Darmstadt; D
Glyzin	GERBU Biochemicals, Gaiberg; D
Isobutanol	Riedl-de Haen, Seelze; D
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt; D
Magermilch	Merck, Darmstadt; D
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen; D
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg; D
Mayer's Hämalaun	AppliChem, Darmstadt; D
Methylbisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe; D
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen; D
Methanol	Riedl-de Haen, Seelze; D
Natriumazid	Merck, Darmstadt; D
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen; D
PBS (phosphate buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe; D
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen; D
SDS	Sigma, Deisenhofen; D
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe; D
Tissue-Tek O.C.T. <sup>TM</sup>	Sakura Finetek, Zoeterwonde, NL
Tris	Merck, Darmstadt; D
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen; D
Trypsin/EDTA 10x	PAA Laboratories, Pasching; A
Tween20	Gerbu Biotechnik, Gaiberg; D
[ <sup>3</sup> H] Thymidin	Amersham, Braunschweig; D
Xylol	Riedl-de Haen, Seelze; D

### 2.4.1 Lösungen und Reagenzien

Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin; D
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche Diagnostics, Darmstadt; D
Bradford Lösung	Bio-Rad Laboratories, München; D
Endobulin	Baxter Oncology, Frankfurt; D
Casy <sup>®</sup> ton Isotonlösung	Innovatis, Reutlingen; D
Chemilumineszenz Substrat (ECL)	Amersham, Braunschweig; D
Molekulargewichtsmarker Rainbow <sup>®</sup>	Amersham, Braunschweig; D
PBS-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe; D
Pinceau-S-Lösung	Sigma, Deisenhofen; D
TBS-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe; D
Triton-X 100	Invitrogen, Karlsruhe;
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin; D
Ziegenserum	Santa Cruz, Heidelberg; D

### 2.5 Medien und Mediensupplemente

DMEM Pulver	Sigma, Deisenhofen; D
Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell, Heidelberg; D
Endothelial Cell Supplement	PromoCell, Heidelberg; D
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin; D
Penicillin/Streptomycin	Pan <sup>™</sup> Biotech, Aidenbach; D
RPMI 1640 Pulver	Invitrogen, Karlsruhe; D

### 2.6 Zytokine

rekombinantes humanes Interferon- $\gamma$	PromoCell, Heidelberg; D
rekombinantes humanes SDF-1 $\beta$	PromoCell, Heidelberg; D
rekombinantes humanes TGF- $\beta$ 1	PromoCell, Heidelberg; D
rekombinantes humanes TNF- $\alpha$	PromoCell, Heidelberg; D

## 2.7 Antikörper und Farbstoffe

### 2.7.1 Farbstoffe

DAPI (bisBENZIMIDE)

Hoechst, Darmstadt; D

CFSE

Invitrogen, Karlsruhe; D

### 2.7.2 Konjugierte primäre anti-Human Antikörper

Spezifität	Spezies	Konjugat	Isotyp	Klon	Referenz oder Firma
CD3	Maus	PE-Cy5	IgG <sub>2a</sub>	HIT3a	BD Pharmingen
CD4	Maus	FITC	IgG <sub>1</sub>	RPA-T4	BD Pharmingen
CD25	Maus	PE	IgG <sub>2b</sub>	4E3	Miltenyi
FoxP3	Ratte	APC	IgG <sub>2a</sub>	PCH 101	eBioscience
L1CAM	Maus	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	IgG <sub>1</sub>	11A	P. Altevogt, DKFZ
Neuropilin-1	Maus	PE	IgG <sub>1</sub>	AD5-17F6	Miltenyi

### 2.7.3 Unkonjugierte primäre anti-Human Antikörper

Spezifität	Spezies	Isotyp	Klon	Referenz oder Firma
ADAM10	Maus	IgG <sub>2a</sub>	111633	R & D Systems
ADAM17	Maus	IgG <sub>2B</sub>	163003	R & D Systems
CD31	Kaninchen	polyklonal		Spring Bioscience
CXCR4	Maus	IgG <sub>2B</sub>	44716	R & D Systems
β <sub>1</sub> Integrin	Maus	IgG <sub>1</sub>	MAR4	BD Pharmingen
β <sub>1</sub> Integrin	Maus	IgG <sub>1</sub>	TDM29	Chemicon
Neuropilin-1	Maus	IgG <sub>1</sub>	AD5-17F6	Miltenyi
HLA-A,B,C	Maus	IgG <sub>1</sub>	W6/32	G. Moldenhauer, DKFZ
L1CAM	Kaninchen	polyklonal	zytL1	V. Lemmon, Cleveland

## MATERIAL

### 2.7.4 Konjugierte sekundäre anti-Human Antikörper

Spezifität	Spezies	Konjugat	Isotyp	Referenz oder Firma
Maus IgG	Ziege	PE	IgG, F(ab)2-Fragment	Dianova
Maus IgG	Ziege	Cy3	IgG, F(ab)2-Fragment	Dianova
Kaninchen IgG	Ziege	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	IgG	Invitrogen
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	IgG, F(ab)2-Fragment	Invitrogen
Maus IgG	Ziege	FITC	IgG, F(ab)2-Fragment	Dianova
Kaninchen IgG	Ziege	Peroxidase	IgG, F(ab)2-Fragment	Dianova

### 2.7.5 Kontroll Immunglobuline

Spezies	Isotyp	Konjugat	Referenz oder Firma
Maus	IgG <sub>1</sub>	PE	Santa Cruz
Maus	IgG <sub>1</sub>	FITC	Santa Cruz
Maus	IgG <sub>1</sub>	nicht konjugiert	Santa Cruz

### 2.7.6 Dynalbeads<sup>®</sup>

Anti-Maus Pan IgG Beads	Invitrogen, Karlsruhe; D
Anti-Human CD3 Beads	Invitrogen, Karlsruhe; D
Anti-Human ExpanderBeads CD3/CD28	Invitrogen, Karlsruhe; D
Anti-Human CD31	Invitrogen, Karlsruhe; D

## 2.8 Primer

### Human β-Aktin

*Forward Primer* 5`-ACAAGATGAGATTGGCATGGC-3`

*Reverse Primer* 5`-GCCACATTGTGAACTTTGGGG-3`

## Human L1CAM

*Forward Primer* 5`-ATC GTA CGG GAA GGA GGC ACT ATG-3`

*Reverse Primer* 5`-CTT GAT GTC CCC GTT GAG CGA T-3`

## 2.9 Enzyme

Kollagenase Typ1 CLS1

Cell Systems, Heidelberg; D

Dispase I

Roche, Darmstadt; D

## 2.10 Kits

CD4/CD25 regulatory T cell isolation kit

Miltenyi, Bergisch-Gladbach; D

SYBR Green PCR Master Mix

Applied Biosystems, Darmstadt; D

High Pure RNA Isolation Kit

Roche Diagnostics, Mannheim; D

RNeasy Mini Kit

Qiagen, Hilden; D

Superscript First Strand cDNA Synthesis Kit

Invitrogen, Karlsruhe; D

ReverAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit

Fermentas, St. Leon-Rot; D

## 2.11 Proben und Zellen

Leukozytenkonzentrat (Buffy Coats)

Blutspendezentrale Heidelberg

Endothelzellen (CD31<sup>+</sup>)

Isolierung aus Pankreasgewebe

T-Zellen (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>)

Isolierung aus Leukozytenkonzentrat

HUVEC

ProVitro, Berlin; D

HPMEC

ProVitro, Berlin; D

Panc1

Susanne Sebens-Müerköster, Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Kiel; D

HEK293-L1

Peter Altevogt, DKFZ, Heidelberg; D



## 2.12 Software

AnalySIS Software®	Olympus, Münster; D
AxioVision	Zeiss, Göttingen; D
Microsoft® Excel	Microsoft; USA
FlowJo 4.3	TreeStar, San Carlo; USA
GraphPadPrism® 5.0	GraphPad Software Inc.; USA
LSM Image Browser	Zeiss, Göttingen; D
Microsoft® PowerPoint	Microsoft; USA
VisiCapture 1.1	Scion, Frederick; USA

## 2.13 Datenbanken

NCBI	<a href="http://www.pubmed.de">www.pubmed.de</a>
Protein reviews on the web (PROW)	<a href="http://www.mpr.nci.nih.gov/prow/">www.mpr.nci.nih.gov/prow/</a>
Bioinformatic Harvester	<a href="http://www.harvester.embl.de">www.harvester.embl.de</a>
Ensembl Genome Browser	<a href="http://www.ensembl.org">www.ensembl.org</a>
Cytokine Pathfinder	<a href="http://www.copewithcytokines.de">www.copewithcytokines.de</a>
Information Hyperlinked over Proteins	<a href="http://www.ihop-net.org">www.ihop-net.org</a>

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Präparation von RNA aus großen Zellmengen

Die Isolation von Gesamt-RNA basiert auf der „single step“ Methode. Dabei wird das Material mit einem GITC-haltigen Puffer (Guanidinisothiocyanat) lysiert, wobei gleichzeitig auch enthaltene RNasen inaktiviert werden. Anschließend werden Proteine und kleine DNA-Fragmente entfernt und die Gesamt-RNA isoliert.

Für die Präparation von Gesamt-RNA wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Dafür wurden zwischen  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden pelletiert und in 600µl Puffer RLT lysiert, dem zuvor 10µl β-Mercaptoethanol frisch hinzugefügt wurden. Das entstandene Lysat wurde auf einen QIAshredder überführt und für 2min bei 13000rpm zentrifugiert, wodurch das Lysat homogenisiert und genomische DNA in kleinere Fragmente zerkleinert wurde. Anschließend wurden 600µl 70%igen Ethanol zugegeben, um die notwendigen Konditionen für eine RNA-Bindung an die Säulen-Matrix herzustellen. Der Ansatz wurde dann auf eine Qiagen-RNeasy Mini Säule überführt und für 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Dabei wurde die RNA an das Säulenmaterial gebunden. Danach wurde die Säule mit 700µl Puffer RW1 und anschließend mit 500µl Puffer RPE gewaschen. Die RNA wurde mit 50µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 3.1.2 Präparation von RNA aus geringen Zellmengen

Für die Präparation von Gesamt-RNA aus Zellmengen zwischen  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen wurde der High Pure RNA Isolation Kit (Roche) verwendet. Die Zellen wurden pelletiert und in 200µl PBS aufgenommen. Zur Zellyse wurden 400µl Lyse Puffer hinzugefügt. Die so freigesetzte RNA und DNA wurden dann zur Bindung an eine Säulen-Matrix auf ein High Pure Filterröhrchen überführt und für 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Danach wurde die ebenfalls gebundene DNA mittels DNase I verdaut. Nach anschließendem dreimaligem Waschen der Säule wurde die RNA mit 50µl Elutionspuffer aus der Säulenmatrix gelöst.

### 3.1.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260nm. Eine optische Dichte von 1,0 entspricht einem RNA-Gehalt von 40µg/ml. Die Reinheit der RNA lässt sich aus dem Quotienten der Absorption bei 260nm und 280nm berechnen. Bei sehr reiner RNA liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0.

### 3.1.4 cDNA-Synthese aus mRNA (Reverse Transkription)

Für die cDNA-Synthese wurde das SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) verwendet. 3µg Gesamt-RNA wurden mit 10mM dNTPs und 50ng Randomprimern für 5min bei 65°C inkubiert und anschließend für mindestens 1min auf Eis abgekühlt. Dem Ansatz wurden dann 25mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1M DTT und 1µl RNase Inhibitor zugegeben und für 2min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden 50 Einheiten der reversen Transkriptase SuperScript™ II zugegeben und für 10min bei 25°C inkubiert. Bei diesem Prozess wird die mRNA von der reversen Transkriptase in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde der Ansatz für 50min bei 42°C inkubiert, dann für 15min bei 70°C abgestoppt und anschließend auf Eis abgekühlt. 2 Einheiten RNase H wurden abschließend hinzugefügt und für 20min bei 37°C inkubiert. Dies diente dazu, um die RNA des RNA-DNA-Hybrids abzubauen.

### 3.1.5 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Das der quantitativen Polymerase Kettenreaktion (PCR) zugrunde liegende Prinzip ist eine kontinuierliche Messung eines Fluoreszenzsignals, das während der PCR proportional mit der Menge des Amplifikationsproduktes ansteigt. Dadurch ist es möglich, eine DNA-Probe zu quantifizieren. Dem Probengemisch wird zusätzlich zu den benötigten Primerpaaren ein Fluoreszenzfarbstoff, wie z. B. SYBR®-Green I, gegeben. SYBR®-Green I bindet unspezifisch an die doppelsträngige DNA, was mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führt.

Es werden jedoch nicht nur das gewünschte Template, sondern auch Dimere und andere Nebenprodukte aufgrund der unspezifischen Bindungen von SYBR<sup>®</sup>-Green I fluoreszenzmarkiert. Eine Unterscheidung zwischen dem spezifischen Produkt und den Primer-Dimeren erfolgt mittels einer Schmelzkurvenanalyse. Dabei werden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt, bis sie ihrem Schmelzpunkt  $T_m$  entsprechend nur noch als Einzelstrang vorliegen. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperaturen können spezifische Produkte und Primer-Dimere voneinander unterscheiden werden, da Primer-Dimere bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR Produkte.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold-Cycle oder  $C_T$ -Wert. Der  $C_T$ -Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der Reaktion. Dafür wird als Richtlinie der  $C_T$ -Wert genommen, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie z. B. Primer- oder Nucleotidmangel, gibt. Parallel dazu werden bei jeder PCR bekannte Templatemengen amplifiziert, um eine Standardkurve zu erstellen, anhand derer aus einem bestimmten  $C_T$ -Wert auf eine Templatekonzentration geschlossen werden kann. Da die in dieser Arbeit verfolgte Fragestellung einen Vergleich gleicher Gene in verschiedenen Zelllinien verfolgte, wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen, wofür die Erstellung einer Standardkurve nicht notwendig war. Für eine relative Quantifizierung wird als Standard ein Haushaltsgen ( $\beta$ -Aktin, GAPDH) gewählt, bei dem von einer konstanten Expression ausgegangen wird. Die Menge an spezifischem Produkt wird dann auf die des Haushaltsgenes bezogen.

Für die relative Quantifizierung wurde zunächst der  $\Delta C_T$ -Wert aus den Mittelwerten der  $C_T$ -Werte des zu quantifizierenden Gens und  $\beta$ -Aktin bestimmt:

$$\Delta C_T = MW_{\beta\text{-Aktin}} - MW_{\text{Gen}}$$

Der Standard Fehler des  $\Delta C_T$ -Wertes berechnet sich aus den jeweiligen Standard Fehlern von  $\beta$ -Aktin und des zu quantifizierenden Gens:

$$STABW_{\Delta C_T} = \sqrt{(STABW_{\beta-Aktin})^2 + (STABW_{Gen})^2}$$

Die Menge des zu quantifizierenden Gens wurde im Bezug zu einer endogenen Referenz, (z. B. wildtyp Zellen, Kontrollpatient) normalisiert:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} \quad \text{wobei} \quad \Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(wildtyp)} - \Delta C_{T(transf. Zellen)}$$

Daraus ergibt sich für die endogene Referenz ein Wert von 1. Die zu quantifizierenden Gene errechneten sich relativ zu dem endogenen Referenz Wert = 1.

Der Gesamtfehler ergibt sich durch folgende Rechnung:

$$STABW_{gesamt} = 2^{-(\Delta\Delta C_T + STABW_{\Delta C_T})} \quad \text{und} \quad STABW_{gesamt} = 2^{-(\Delta\Delta C_T - STABW_{\Delta C_T})}$$

Die in der quantitativen PCR verwendete cDNA wurde über MicroSpin G-50 Säulen (Amersham Biosciences) aufgereinigt und am Nanodrop Messgerät vermessen. Es wurde 1 $\mu$ l cDNA (1-10ng pro Ansatz) mit 10 $\mu$ l 2 x SYBR<sup>®</sup>-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), je 1 $\mu$ l forward und reverse Primer und 7 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O gemischt. Die Optimierung der Primer erfolgte in einer separaten PCR nach den in **Tab. 1** angegebenen Konzentrationen. Die Reaktion wurde im GeneAmp5700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Das verwendete PCR-Programm ist in **Tab. 2** dargestellt.

Reverse Primer (nM)	Forward Primer (nM)		
	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

**Tab.1:** Konzentrationen zur Primer Optimierung.

## METHODEN

<b>Zeit und Temperatur</b>			
<b>Initiale Schritte</b>		<b>jeder von 40 Zyklen</b>	
		<b>Schmelzen</b>	<b>Anlagerung und Elongation</b>
<b>Halten</b>	<b>Halten</b>	<b>Zyklus</b>	
2 min	10 min	15 sec	1 min
50°C	95°C	95°C	60°C

**Tab.2:** Universelle Thermal Cycling Parameter für SYBR<sup>®</sup>-Green I Experimente.

### 3.2 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1 Lösungen und Puffer

##### PBS

NaCl	8g
KCl	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	2,85g
ad 1l ddH <sub>2</sub> O; pH 7,2; Lagerung bei 4°C	

##### Erylyse Puffer

NH <sub>4</sub> Cl	155mM
KHCO <sub>3</sub>	10mM
EDTA, 0,5M, pH8,0	0,1mM

### 3.2.2 Medien und Mediensupplemente

#### EZBM (Endothelzell Basal Medium MV); pH 7.4

FKS	0,5 ml
ECGS/H	3mg/ml
Amphotericin	50 ng/ml
Gentamycin	50 µg/ml
rhEGF	10ng//ml
Hydrokortison	1µg/ml

#### DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)

L-Glutamin	
D-Glukose	4,5g/L
NaHCO <sub>3</sub>	3,7g/ml

#### RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)

L-Glutamin	
NaHCO <sub>3</sub>	2g/ml

### 3.2.3 Isolierung von mononukleären Zellen

Wie von (Bai *et al.*, 2002; Solomayer *et al.*, 2003) beschrieben wurde, konnten mononukleäre Zellen aus peripherem Blut mittels Ficoll Dichtegradient isoliert werden. Hierzu wurden 15ml Biocoll-Lösung (Dichte: 1,077g/cm<sup>3</sup>) in ein Leucosep<sup>®</sup> Röhrchen pipettiert und bei 2000rpm 5min zentrifugiert. Daraufhin wurden 15ml RPMI-Medium zugegeben. Nach der Zugabe von 20ml peripherem Blut wurde das Lösungsgemisch einer Zentrifugation von 20min. bei RT und 2000rpm ohne Bremse unterzogen. Nach der Zentrifugation ist eine deutliche Interphase entstanden in der sich die mononukleären Zellen befinden. Diese konnten vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen und zweimal in PBS gewaschen werden. Anschließend wurden eventuell noch vorhandene Erythrozyten mit 5ml Erylysepuffer zerstört. Die Inkubation hierbei erfolgte für 1min bei RT. Danach wurde die Suspension mit PBS auf 40ml aufgefüllt und anschließend abermals zentrifugiert. Anschließend wurden die mononukleären Zellen für die Aufreinigung von T-Zell Subpopulationen verwendet (siehe Abschnitt 3.5.4).

### 3.2.4 Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen

#### Verwendete Lösungen und Reagenzien

PBS

Dispase (2Einheiten/ml)

Kollagenase IV

Trypsin-EDTA-Lösung

FKS (Fötale Kälberserum)

Endothelial Cell Basal Medium MV mit Supplement

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden aus dem Pankreasgewebe isoliert. Das Gewebe wurde in eine große Petrischale gelegt und mit wenig PBS benetzt. Überschüssiges Gewebe, wie makroskopisch sichtbare Gefäße, wurde mit einer stumpfen, gebogenen Schere entfernt. Danach wurde das Gewebe mechanisch in etwa 1mm<sup>3</sup> große Stücke zerlegt und mit PBS gewaschen. Die Gewebestückchen wurden dann in 5ml EZBM (*Endothelial Cell Basal Medium*, ECBM) versetzt mit 200µl Dispase (2 Einheiten/ml) und 200µl Kollagenase IV aufgenommen und für 1-1,5h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Gewebestückchen dreimal in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Stücke in 5ml 0,02% EDTA in PBS mit 0,04% Trypsin für 2h bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wobei das Röhrchen zwischendurch mehrmals vorsichtig bewegt werden sollte. Nun wurde der Überstand abgesaugt und mittels 2ml hitze-inaktiviertem FKS der Verdauungsvorgang gestoppt. Im Anschluss wurden die Gewebestücke in eine Petrischale geschüttet und 5ml EZBM zugegeben. Mit der Rückseite eines Skalpell wurde nun jedes Gewebestückchen ausgedrückt, wodurch die einzelnen Zellen aus dem Gewebe gelöst werden konnten. Die gewonnene Zellsuspension enthält sowohl mikrovaskuläre Endothelzellen als auch kontaminierende Zelltypen (Fibroblasten, Erythrozyten). Die Zellsuspension wurde dann durch einen 100µm Porenfilter gegeben, wobei dreimal mit PBS nachgespült wurde. Die Zellen wurden dann bei 1200rpm für 5min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10ml Medium aufgenommen und in einer 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät. Nach 24h wurde das Kulturmedium der Primärkultur (P0) gewechselt. Bevor die Kultur einen konfluenten Status erreicht (ca. 3 Tage nach der Aussaat) wurden mikrovaskuläre Endothelzellen von den anderen Zellen durch immuno-magnetische Isolation mit CD31-Dynabeads<sup>®</sup> (siehe Abschnitt 3.5.3) isoliert und in einer neuen Flasche ausgesät. Die CD31-Trennung erfolgte sowohl in P1 als auch in P2 um eine reine Endothelzell-Kultur zu erlangen.



### 3.3 Kultivierung von Zellen

#### 3.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mittels Zentrifugation (5min, 1200rpm) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 900µl FCS und 100µl DMSO aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden bei -70°C eingefroren und zur Langzeitlagerung nach 24h in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde auf 37°C erwärmtes Medium zur Zellsuspension zugegeben und resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5min bei 1200rpm, um die Zellen vom zytotoxischen DMSO zu befreien. Schließlich wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in Kulturflaschen ausgesät. Das Auftauen von Endothelzellen erfolgte durch Resuspendieren mit auf 37°C erwärmtem EZBM. Danach wurden die Zellen in das für die jeweilige Kulturflaschengröße benötigte Endvolumen EZBM aufgenommen und ausgesät.

#### 3.3.2 Zellaussaat

##### Zellaussaat in Zellkulturflaschen

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

Endothelial Cell Basal Medium MV, 37°C

Fibronectinlösung 100µg/ml

PBS, 37°C

EDTA 5mM, 37°C

Nach der Isolation der Zellen wurde die Zellsuspension mit jeweils 10ml Kultivierungsmedium in die Zellkulturflaschen überführt. Nach 24h Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde die Kultur im Verhältnis 1:3 passagiert.

### Zellaussaat auf Kammerobjektträger

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

Endothelial Cell Basal Medium MV, 37°C

Fibronektinlösung 100µg/ml

PBS, 37°C

EDTA 5mM, 37°C

Zur Fluoreszenzfärbung der mikrovaskulären Endothelzellen und Analyse der Zelladhäsion wurden sogenannte Kammerobjektträger verwendet. Die Zellzahl wurde nach Ablösen der Zellen aus der Kulturschale (EDTA) mit dem Casy® Zellzähler bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.3). Währenddessen wurden die Glasobjektträger mit Fibronektin mindestens 1h bei 37°C beschichtet. Danach wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Einzelkammer ausgesät und für 24h zu einem konfluenten Zellrasen wachsen gelassen.

### Zellaussaat auf Transmigrationsmembranen

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

Endothelial Cell Basal Medium MV, 37°C

Gelatinelösung 0,2%

PBS, 37°C

EDTA 5mM, 37°C

Zum Anwachsen von Endothelzellmonolayern auf Migrationsmembranen wurden sogenannte Transmigrationskammern verwendet. Die Zellzahl wurde nach Ablösen der Zellen aus der Kulturschale (EDTA) mit dem Casy® Zellzähler bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.3). Währenddessen wurden die Transmigrationsmembranen auf der Innenseite mit kalter Gelatine 1h bei 4°C beschichtet. Danach wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Kammer ausgesät und für 48h zu einem konfluenten Zellrasen wachsen gelassen.

### 3.3.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Zelldichte einer Zellsuspension wurde mit Hilfe des computer-unterstützten Casy<sup>®</sup> Zellzählers bestimmt. Dabei werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem Lichtstrahl vorbeigeführt. Die Unterbrechung des Lichts wird quantifiziert und durch die Dauer der Unterbrechung kann zusätzlich die Zellgröße bestimmt werden. Aufgrund der zugeordneten Zellgröße können dann Zelldebris und tote Zellen aus der Auswertung ausgenommen werden.

### 3.3.4 Ablösen der Zellen

Der Zellkulturüberstand wurde nach Kultivierung abgenommen und der Monolayer mit PBS gespült. Nach dem Absaugen des PBS wurde 5mM EDTA/PBS der Zellkulturflasche zugegeben und für 5min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die so abgelösten Zellen mittels Zentrifugation (5min bei 1200rpm) sedimentiert und anschließend in Medium oder 10% FKS/PBS aufgenommen und weiterverarbeitet.

## 3.4 Proteinchemische Methoden

### 3.4.1 Lösungen und Puffer

#### PBS

NaCl	8g
KCl	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	2,85g
ad 1l ddH <sub>2</sub> O; pH 7,2; Lagerung bei 4°C	

#### Acrylamidlösung

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

## METHODEN

---

### Trenngel, 10%

Acrylamidlösung	6,7ml
Tris-HCl, 3M, pH 8,0	2,65ml
ddH <sub>2</sub> O	9,63ml
SDS, 10%	200µl
APS, 10%	65µl
TEMED	15µl

### Sammelgel

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

### 2 x Probenpuffer

Tris-HCl, pH 6,8	0,5M
Glyzerin	10%
SDS	2%
β-Mercaptoethanol, 14,3M	5%
Bromphenolblau	0,1%

### Laufpuffer

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

### 5 x Blotpuffer

Glyzin	190mM
Tris-HCl	50mM

## METHODEN

---

### 1 x Blotpuffer

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

### TBS/Tween-Waschpuffer

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

### 3.4.2 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten aus primären mononukleären Zellen und Tumorzelllinien wurden die entsprechenden Zellen zentrifugiert und dreimal mit PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde je nach Größe in 1ml PBS aufgenommen und in ein 1,5ml Eppendorfgesäß überführt.

Durch fünfmaliges, abwechselndes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im Wasserbad bei 37°C wurde eine vollständige Lyse der Zellen erreicht. Das Lysat wurde für 30min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorfgesäß überführt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (siehe Abschnitt 3.3.1) wurde das Zelllysat bei -20°C aufbewahrt.

### 3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue* von 465nm zu 595nm durch nicht-kovalente Bindung an Protein in saurer Lösung. Dabei verhält sich die Absorption bei 595nm direkt proportional zur vorhandenen Proteinmenge. Eine Eichkurve zur Bestimmung unbekannter Proteinkonzentrationen wurde mit Hilfe von standardisierten Proteinlösungen bekannter Rinderserumalbumin-Konzentrationen (0,125 –1mg/ml) erstellt. Die Farblösung „BioRad®-Protein Assay“ wurde 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und jeweils 200µl dieser Lösung mit 5µl der

unbekannten Probe bzw. der bekannten Standard-Proteinlösungen in Triplikaten pipettiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595nm gemessen. Die Eichgerade wurde mit dem Computerprogramm *Graph Pad Prism* erstellt und daraus die Konzentration der Proben ermittelt.

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

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) kann das Molekulargewicht und der Reinheitsgrad von Proteinen bestimmt werden. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteine werden durch Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS), einem starken ionischen Detergenz, mit einer negativen Ladung überzogen. 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 von Proteinen im elektrischen Feld werden durch die Porengröße des Gels bestimmt. Im oberen Sammelgel werden die Proteine bei niedriger Acrylamidkonzentration und pH 6,8 zu einer schmalen Bande konzentriert, um dann im Trenngel bei pH 8,8 und höherer Acrylamidkonzentration nach ihren Molekulargewichten getrennt zu werden. Die Vorschriften für die Durchführung und das Puffersystem entstammen dem Protokoll von (Laemmli, 1970).

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 der Probenkamm eingesetzt wurde. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und 1 x Laufpuffer zugegeben. 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) aufgetragen. Die Elektrophorese der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40mA, bis das Bromphenolblau des Probenpuffers die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

### 3.4.5 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis membrangebundener Proteine unter Verwendung spezifischer Antikörper im Anschluss an eine SDS-PAGE.

#### 3.4.5.1 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine in einem Elektro-Trockenblot auf eine Immobilon-Membran (Millipore) transferiert. Dazu wurden drei Filter (Schleicher und Schuell) in Blotpuffer getränkt und blasenfrei auf die positive Elektrode einer Blot-Apparatur (Renner) gelegt. Darauf folgte 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 Filter, die in Blotpuffer getränkt waren. Anschließend wurde die negative Elektrode der Blot-Apparatur aufgesetzt. Die Proteine wurden bei  $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$  für 90min bei RT auf die Membran geblottet.

#### 3.4.5.2 Reversible Färbung der transferierten Proteine mit Ponceau-S

Die Effizienz des Proteintransfers wurde mittels Färbung der Membran in einer 10%igen Ponceau-S Lösung und anschließender Entfärbung mit ddH<sub>2</sub>O überprüft.

#### 3.4.5.3 Immunodetektion

Zur Absättigung der freien, unspezifischen Bindungen wurde die Membran nach dem Blotten mit 5% Magermilch in TBS für 30min bei RT blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Erstantikörper in einer Konzentration von  $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$  in 5% Magermilch/TBS für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05% Tween/TBS erfolgte eine Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:50.000 in 5% Magermilch/TBS für 30min bei RT. Anschließend wurde dreimal für 15min mit 0,05%

Tween/PBS gewaschen. Zur Detektion der Proteinbanden wurde ein Chemilumineszenz-Substrat (ECL) verwendet. Hierbei wird in einer von der Peroxidase katalysierten Reaktion, der Oxidation von Luminol in Gegenwart von  $H_2O_2$  Energie in Form von Licht emittiert. Dies führt zur Schwärzung des Röntgenfilms an den Positionen der Membran, an denen die verwendeten Antikörper spezifisch das Antigen detektiert haben. Die Membran wurde dazu für 1min mit 0,125ml Detektionsreagenzien 1 und 2 pro  $cm^2$  Membran inkubiert. Anschließend wurde je nach Stärke des erwarteten Signals für die entsprechende Zeit ein Röntgenfilm aufgelegt

### 3.5 Analytische immunbiologische Methoden

#### 3.5.1 Lösungen und Medien

##### PBS

NaCl	8g
KCl	0,2g
$KH_2PO_4$	0,2g
$NaH_2PO_4 \times 12H_2O$	2,85g
ad 1l ddH <sub>2</sub> O; pH 7,2; Lagerung bei 4°C	

##### FACS-Puffer

1 x PBS	50 ml
FKS	3% (v/v)

##### MACS Puffer

1 x PBS	pH 7.2
BSA	0,5% (v/v)
EDTA	2mM

##### Erylyse Puffer

NH <sub>4</sub> Cl	155mM
KHCO <sub>3</sub>	10mM
EDTA, 0,5M, pH8,0	0,1mM



### 3.5.2 Klinisches Material von Pankreasgewebsdonoren

Klinisches Material wurde den Tumorpatienten nach schriftlicher Einwilligung in der Universitätsklinik Heidelberg im Bereich Chirurgie entnommen. Dabei wurde das Pankreasgewebe sofort nach der Operation in EZBM überführt und innerhalb von zwei Stunden weiterverarbeitet oder kryokonserviert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.5.3 Anreicherung mikrovaskulärer Endothelzellen mittels Dynabeads<sup>®</sup>

Zur Isolierung bzw. Depletion bestimmter Zellfraktionen wurden magnetische Dynabeads<sup>®</sup> eingesetzt. Dynabeads<sup>®</sup> sind monodisperse Polystyrol-Beads, die mit einer gleichmäßigen Schicht an Eisenoxiden ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) überzogen sind. An die Oberfläche der Beads sind Antikörper gekoppelt, die entweder gegen bestimmte Oberflächenantigene oder Immunglobuline gerichtet sind. Aufgrund der magnetischen Eigenschaften lassen sich spezifisch an die Beads gebundene Zellen mit Hilfe eines Magnetfeldes anreichern. Nach mechanischer Aufarbeitung des Gewebes (siehe Abschnitt 3.2.4) konnte die Einzelzellsuspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Mit Hilfe von anti-CD31-Beads konnten Endothelzellen aus dem Zellgemisch isoliert werden. Für  $1 \times 10^7$  Zellen wurden hierzu  $7\mu\text{l}$  anti-CD31-Beads zweimal mit PBS gewaschen und in  $100\mu\text{l}$  EZBM aufgenommen. Die Beads wurden zu dem Zellgemisch zugegeben und für 30min bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einem Schüttler inkubiert. Die im Überstand befindlichen Endothelzellen wurden anschließend mittels *Magnetic Particle Concentrator* (MPC) isoliert. Dazu wurde das Röhrchen am MCP fixiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt, um die Beads und die daran anhaftenden Zellen vollständig zu entfernen.

### 3.5.4 Anreicherung von $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen und $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ regulatorische T-Zellen mittels MACS MicroBeads<sup>®</sup>

Die Aufreinigung von regulatorischen T-Zellen erfolgte im Anschluss an eine Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut mittels Ficoll Dichtegradient (siehe Abschnitt 3.2.3). Nach der Isolation der mononukleären Zellen wurden diese zunächst in RPMI 1650 Medium aufgenommen und für 1 bis 2h in einer Kulturflasche ausgesät, um adhärenente Zellen zu isolieren.

Die restlichen in Suspension befindlichen Zellen wurden dann für die Aufreinigung regulatorischer T-Zellen verwendet. Dafür wurden die Zellen zunächst sedimentiert (1200rpm, 10min), in RPMI-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Jeweils  $1 \times 10^8$  Zellen wurden anschließend in 900µl MACS Puffer aufgenommen. Zunächst wurden alle nicht-CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten magnetischen MACS MicroBeads<sup>®</sup> isoliert. Jeweils  $1 \times 10^8$  Zellen wurden mit 100µl eines Biotin-markierten Antikörpergemisches bestehend aus den Markern CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ und CD235a für 10min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 200µl anti-Biotin-MicroBeads<sup>®</sup> für 15min auf Eis. Das Gemisch wurde dann mit 2ml MACS Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die so markierten Zellen wurden an eine LS MACS-Säule magnetisch gebunden. Die im Durchlauf befindlichen CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100µl anti-CD25-MicroBeads<sup>®</sup> für 15min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die so markierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen über eine MS MACS-Säule magnetisch separiert. So konnten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen unterschieden werden. Die Reinheit der Aufreinigung wurde mit dem Durchflusszytometer bestimmt.

### 3.5.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Coons *et al.*, 1995) ist ein Verfahren, bei dem Zellen in einem Flüssigkeitsstrom phänotypisch charakterisiert und quantifiziert werden können. Dabei geben Unterschiede in Lichtbeugung und Lichtstreuung Aufschluss über Größe sowie Granularität der Zellen. Mit Hilfe von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern können definierte Zelloberflächenstrukturen oder intrazelluläre Proteine markiert und untersucht werden.

In einem Flüssigkeitsstrom der an einem Laserstrahl vorbeigelenkt wird verursachen die Zellen eine Lichtstreuung, die zellgebundene Fluorochrome zur Fluoreszenzstrahlung anregt. Die Photomultiplier detektieren das gestreute Licht, welches Auskunft gibt über Größe und Granularität der Zellen. Die Fluoreszenzstrahlung, welche die Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche bzw. im Zellinnern nachweist, wird zusätzlich detektiert.

Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCantoII bestimmt. Je nach Experiment wurden  $2 \times 10^4$  bis  $10^5$  Ereignisse aufgenommen und anschließend mittels *FlowJo*-Software analysiert.

Pro Ansatz wurden  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^6$  Zellen zweimal mit eiskaltem FACS-Puffer (je 500 $\mu$ l) gewaschen. Die Zellsedimente wurden dann in 100 $\mu$ l (2,5mg/ml) Endobulin aufgenommen und für 10min. auf Eis inkubiert. Endobulin enthält humanes IgG, welches Fc-Rezeptoren und somit unspezifische Bindungsstellen für die Fluoreszenz-konjugierten Antikörper absättigt. Die Zellen wurden anschließend einmal mit eiskaltem FACS-Puffer (je 500 $\mu$ l) gewaschen und in 50-100 $\mu$ l Antikörperlösung (Verdünnung in FACS-Puffer) für 30min auf Eis inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden dann durch zweimaliges Waschen mit 500 $\mu$ l FACS-Puffer entfernt. Bei einer indirekten Färbung wurde nun 100 $\mu$ l des entsprechenden sekundären Antikörpers zu den Zellen gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Bei direkten Färbungen wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit 500 $\mu$ l FACS-Puffer anschließend in 200 $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen.

### Nachweis von toten Zellen mittels Propidiumiodid-Inkorporation

Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender aromatischer Kohlenwasserstoff, der von spät-apoptotischen sowie nekrotischen Zellen nach einsetzender Permeabilisierung der Zellmembran inkorporiert wird und schließlich in die DNA interkaliert. PI kann sowohl zur Ermittlung der Anzahl toter Zellen innerhalb einer Gesamtpopulation als auch zum Ausschluss toter Zellen bei der Analyse definierter Oberflächenmoleküle herangezogen werden.

Nach der Inkubation mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurde kurz vor der Messung im Durchflußzytometer 1 $\mu$ g/ml PI zugegeben und die Zellen für ca. 1min. inkubiert.

### 3.5.6 Immunhistologische Antikörperfärbungen

In Vorbereitung für die immunhistologischen Färbungen wurden am Kryostat bei  $-20^{\circ}\text{C}$  5 $\mu$ m dicke Schnitte aus verschiedenen Donorgeweben hergestellt und auf Glasobjektträger gebracht. Die Schnitte wurden dann mit eiskaltem Aceton für 5min bei RT fixiert und darauffolgend für die Färbungen eingesetzt.

Immunhistochemische Färbetechniken erlauben die Sichtbarmachung von Gewebe- bzw. Zellantigenen. Dabei wurden ursprünglich direkte Färbetechniken genutzt, bei der die Antikörper direkt an Enzyme gekoppelt waren, die einen Substrat-Farbumschlag an der Stelle der Antigenexpression verursachen. Mit Einführung der indirekten Methode verbesserte sich auch die Sensitivität signifikant. Dabei wird ein Sekundärantikörper genutzt der den jeweiligen Primärantikörper bindet und sein Signal verstärkt.

Das Gewebe wurde zunächst mit Serum aus der Herkunftsspezies des jeweiligen Sekundärantikörpers für 10min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dann folgte eine Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper für 30-60min bei RT. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal je 5min mit PBS bei RT gewaschen. Darauffolgend wurde das Gewebe im abgedunkelten Raum mit einem fluorchrom-gekoppelten sekundären Antikörper für 30min bei RT inkubiert, der den jeweiligen Primärantikörper detektierte. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS folgte eine Inkubation mit DAPI für 3min bei RT im dunkeln. Dieser Farbstoff bindet an die DNA der Zellen und markiert die Zellkerne. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal für 10min mit PBS gewaschen, auf den Objektträgern mit 150µl Kaiser's Glyzeringelatine eingedeckelt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

### 3.5.7 Immunzytologische Antikörperfärbungen

Für die immunzytologischen Färbungen wurden die Zellen am Vortag auf Kammerobjektträger in der entsprechenden Zellzahl ausgesät (siehe Abschnitt 3.3.2). Die Zellen wurden für 15min bei RT in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend für 15min bei RT in 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Danach standen sie für die Färbungen zur Verfügung (siehe Abschnitt 3.5.6.).

### 3.5.8 Hämatoxylin- und Eosinfärbung von Zellen

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

Mayer's Hämalunlösung

Eosinlösung, 1%

Ethanol, 75%

Ethanol, 90%

Ethanol, absolut

Leitungswasser

VE-Wasser

Xylol

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum. Um seine färbende Eigenschaft zu entwickeln, muss er zu Hämalan, ein basischer Hämateinlack, aufbereitet werden. Hämalan färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung zunächst rötlich-braun, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen DNS und das raue endoplasmatische Retikulum. Durch Erhöhung des pH-Wertes (Bläuen) mittels Spülen in Leitungswasser schlägt der Farbton in das typische Blauviolett um. Anschließend folgt die Zytoplasma-Färbung in einer alkoholischen oder wässrigen Lösung von Eosin. Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff, der alle acidophilen bzw. basischen (eosinophilen) Strukturen rot färbt, was vor allem die Zellplasmaprotein umfasst. Durch weitere Spülschritte über Alkohollösungen in aufsteigender Konzentration bis zu absolutem Alkohol wird das Wasser aus dem Gewebeschnitt verdrängt. Schließlich wird der entwässerte Schnitt in dem organischen Lösungsmittel Xylol geklärt.

Es wurden  $1 \times 10^5$  bis  $3 \times 10^5$  Endothelzellen auf Migrationsmembranen ausgesät und für 24h bis 48h wachsen gelassen (siehe Abschnitt 3.3.2). Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und mit 0,1% Triton permeabilisiert (siehe Abschnitt 3.5.7). Für die Kernfärbung werden die Membranen für 5-10min in Mayer's Hämalanlösung gelegt und anschließend zunächst in Leitungswasser und dann in VE-Wasser für jeweils 1min gebläut. Nach Entwässern mit 70%igem und 90%igen Ethanol erfolgte für 1min die Plasmafärbung in der Eosinlösung. Zum endgültigen Entwässern erfolgt dann die Behandlung mit abs. Ethanol. Die entwässerten Zellen wurden dann in Xylol geklärt. Zum Schluss wurden die Membranen mit 150 $\mu$ l Kaiser's Glyzeringelatine eingedeckelt und am Mikroskop ausgewertet.

### **3.6 *In vitro* Angiogenesetest**

In dem *in vitro* Angiogenesetest sollte die Kapazität von Endothelzellen zur Angiogenese-Induktion getestet werden. Dazu wurden 100 $\mu$ l Matrigel pro well in einer 96-well Platte ausgesät und bei 37°C für 1h inkubiert, so dass das Matrigel polymerisierte. Je  $2 \times 10^4$  Endothelzellen wurden dann pro well auf das Matrigel in Suspension gegeben. Bei den Blockade-Experimenten wurden den Endothelzellen blockierende Antikörpern in den Mediumüberstand zugegeben. Nach 24h wurde die Anzahl der ausgebildeten tubulären Fortsätze pro mm<sup>2</sup> mikroskopisch ausgezählt.

### 3.7 *In vitro* Transmigrationstest

#### 3.7.1 *In vitro* Transmigration von Endothelzellen

Für die *in vitro* Transmigrationstests wurden Transwell-Membran-Einsätze mit einer Porengröße von 8µm 1h bei 4°C mit kalter 0,2%iger Gelatine beschichtet. Danach wurden  $5 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Endothelzellen pro Kammer dazugegeben. Die Endothelzellen wurden zuvor für 16h mit TNF-α stimuliert. Als chemoattraktives Molekül wurde das Medium in der unteren Kammer mit SDF-1β (100ng/ml) versetzt. Nach 24h wurde die Anzahl der transmigrierten Zellen mit computer-unterstützter Auszählung am Casy® Zellzähler bestimmt. Bei den Blockade-Experimenten wurden den Endothelzellen blockierende Antikörpern in den Mediumüberstand zugegeben.

#### 3.7.2. *In vitro* transendotheliale Migration von Tumorzellen und T-Zellen

Für die *in vitro* transendothelialen Migrationstests wurden Transwell-Membran-Einsätze mit einer Porengröße von 5µm 1h bei 4°C mit kalter 0,2%iger Gelatine beschichtet. Danach wurden  $1 \times 10^5$  bis  $3 \times 10^5$  Endothelzellen pro Kammer dazugegeben und für 24h bis 48h auf der Membran zu einem konfluenten Zellrasen wachsen gelassen (siehe Abschnitt 3.3.2). Die Endothelzellen wurden die letzten 16h mit TNF-α stimuliert. Nach 48h wurden  $5 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Tumorzellen bzw. T-Zellen in die obere Kammer zugegeben. Als chemoattraktives Molekül wurde das Medium in der unteren Kammer mit SDF-1β versetzt. Nach 24h wurde die Anzahl der transmigrierten Zellen mit computer-unterstützter Auszählung am Casy® Zellzähler bestimmt. Bei den Blockade-Experimenten wurden den Endothelzellen blockierende Antikörpern in den Mediumüberstand zugegeben bzw. die Tumorzellen und T-Zellen mit den blockierenden Antikörpern in Suspension vorinkubiert. Bei den T-Zell Stimulations-Experimenten wurden  $1 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  T-Zellen in die untere Kammer zugegeben. Für die Aktivierung der T-Zellen wurden CD3/CD28 Expander Beads (4 Beads pro Zelle) in die untere Kammer zugegeben. Nach 24h konnten die T-Zellen von den transmigrierten Tumorzellen durch immuno-magnetische Isolation mittels der CD3/CD28 magnetischen Beads (siehe Abschnitt 3.5.3) isoliert werden. So konnte die Anzahl der transmigrierten Tumorzellen mit computer-unterstützter Auszählung am Casy® Zellzähler bestimmt werden.

### 3.8 *In vitro* Adhäsionstest

1 x 10<sup>5</sup> Endothelzellen wurden am Vortag auf Fibronectin beschichteten Kammerobjektträgern ausgesät (siehe Abschnitt 3.3.2). Die Tumorzellen wurden mit 25mM Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE) für 30min in 3% FKS/PBS bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1200rpm, 5min) und für weitere 30min in 10% FKS/DMEM Medium inkubiert. Dies diente der Bindung überschüssigen Farbstoffes. Die Zellen wurden dann einmal mit 10% FKS/DMEM Medium gewaschen und 1 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Kammer auf die ausgesäten Endothelzell-Monolayer gegeben. Die Inkubation erfolgt für 60min bei 37°C. Anschließend wurden nicht-gebundene Tumorzellen durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen auf den Objektträgern mit 150µl Kaiser's Glyzeringelatine eingedeckelt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Bei den Blockade-Experimenten wurden den Endothelzellen blockierende Antikörpern in den Mediumüberstand zugegeben bzw. die Tumorzellen mit den blockierenden Antikörpern in Suspension vorinkubiert. Danach wurde überschüssiger Antikörper im Überstand gewaschen.

### 3.9 [<sup>3</sup>H]-Thymidin Proliferationstest

Während der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus erfolgt die Replikation der DNA. Für diesen Replikationsvorgang benötigt die Zelle die vier Nukleoside Adenosin, Guanosin, Cytidin und Thymidin. Wenn einer Zellkultur während eines Zeitraums von mindestens 4h und maximal 18h radioaktiv markiertes [<sup>3</sup>H]-Thymidin zur Verfügung gestellt wird, wird dieses in die DNA einer proliferierenden Zelle eingebaut. Anschließend kann die radioaktiv markierte DNA auf einen Glasfaserfilter mit hoher Bindungskapazität für Nukleinsäuren gebunden werden. Durch eine Szintillator-Lösung wird die durch den radioaktiven Zerfall des markierten [<sup>3</sup>H]-Thymidins freigesetzte β-Strahlung in sichtbares Licht umgewandelt. Die Menge der emittierten β-Strahlung wird im Szintillationsmessgerät als Zählereignisse pro Minute (cpm, *counts per minute*) registriert und dient als ein Maß für die Zellproliferation.

Mononukleäre Zellen wurden frisch aus peripherem Blut mittels Ficoll Dichtegradienten isoliert (siehe Abschnitt 3.2.3). Anschließend erfolgte eine Aufreinigung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> konventioneller T-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen mittels MACS MicroBeads<sup>®</sup> (siehe Abschnitt

3.5.4).  $5 \times 10^4$  CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> konventionelle T-Zellen wurden in eine 96-well Platte ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen (1:0, 2:1, 4:1, 8:1 und 16:1) für 72h co-kultiviert. Zusätzlich wurden  $5 \times 10^4$  regulatorische T-Zellen ohne Zugabe von konventionellen T-Zellen (negative Kontrolle) sowie  $1 \times 10^5$  konventionelle T-Zellen ohne Zugabe von regulatorischen T-Zellen (positive Kontrolle) kultiviert. Für die Aktivierung der T-Zellen wurden CD3/CD28 Expander Beads (4 Beads pro Zelle) zugegeben und für 72h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde [<sup>3</sup>H]-Thymidin (1μCi pro well) zugegeben und für weitere 16h bei 37°C kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen für eine Stunde bei -80°C tiefgefroren und anschließend bei 37°C aufgetaut. In der Ansaugvorrichtung wurden die eingespannten Filtermatten zunächst durch destilliertes Wasser benetzt. Dann wurde die Lösung aus den Kulturplatten aufgesaugt und auf die Filtermatten übertragen. Die einzelnen Vertiefungen der Zellkulturplatte wurden in drei vollautomatischen Spülgängen abschließend mit ddH<sub>2</sub>O ausgespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls durch die Filtermatte gefiltert. Die Filtermatten wurden im Mikrowellen-Gerät getrocknet, mit Szintillatorlösung vollständig benetzt, in transparente Tüten eingeschweißt und im Szintillationsmessgerät (BetaCounter) gemessen.

### 3.10 Darstellung der Messergebnisse und Statistik

Für eine Messreihe mit  $n$  unabhängigen Experimenten wurde aus den Messergebnissen der Mittelwert  $\bar{x}$  und die Standardabweichung  $SD$  errechnet. Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte als  $\bar{x} \pm SD$ . Nachfolgend wurden die Mittelwerte der Messreihen mit einem zweiseitigen *t-Test* für unverbundene Stichproben nach Student analysiert. Der *p-Wert* ist das Ergebnis eines Signifikanztests (Bender und Lange, 2001). Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  (Signifikanzniveau) wurde angegeben, wobei die Mittelwerte als signifikant verschieden gelten, wenn  $p < 0,05$  ist.

### 3.11 Ethikvoten

Für die Gewinnung und Untersuchungen sämtlicher humaner Gewebeproben lag das schriftliche Einverständnis der betroffenen Patienten vor. Das Versuchsvorhaben erfolgte jeweils nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Heidelberg.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die endotheliale Expression des L1 Zelladhäsionsmoleküls (L1CAM) in Pankreas Kontroll- und Tumorgewebe *in situ*

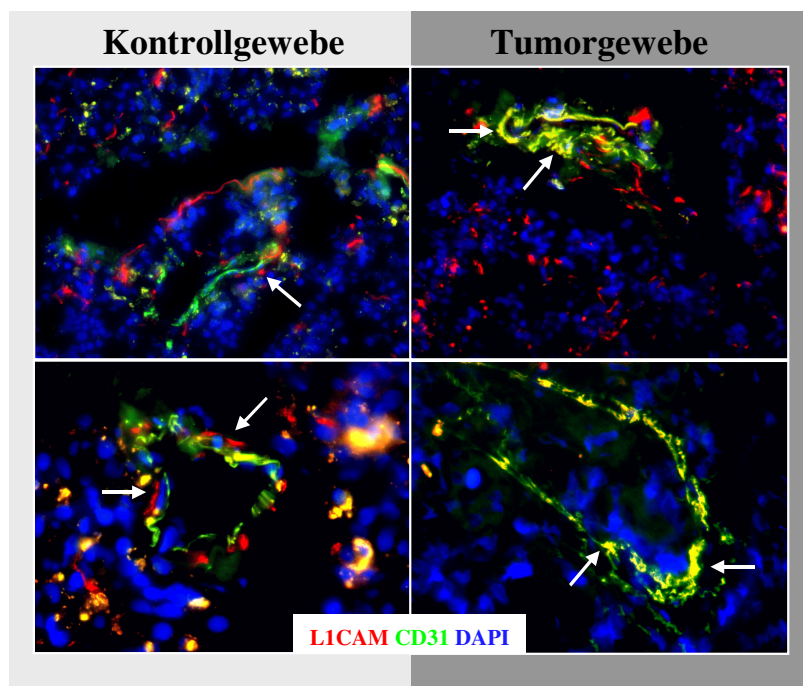
Die Vaskularisierung des Tumorgewebes ist eine entscheidende Bedingung für eine ausreichende Versorgung des Tumorgewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff. Gleichzeitig stellt sie eine notwendige Voraussetzung für die Infiltration immunmodulatorischer Zellen ins Tumorgewebe und für Metastasierungsprozesse dar. Der Ein- und Austritt von Zellen wird durch das Endothel reguliert. Die molekularen Determinanten, die für die Koordination dieser Funktion verantwortlich sind, bilden die der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie angehörigen Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAMs). Viele Mitglieder der Ig-Superfamilie, wie z. B. PECAM-1 (CD31), sind als notwendige Faktoren für die parazelluläre Transmigration durch die Endothelzell-Barriere beschrieben worden (Ley *et al.*, 2007). Ein weiteres Mitglied der Ig-Superfamilie ist das Zelladhäsionsprotein L1CAM (CD171). Eine endotheliale L1CAM Expression konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden (Felding-Habermann *et al.*, 1997; Kaifi *et al.*, 2006a; Pancook *et al.*, 1997; Prevost *et al.*, 2002; Thies *et al.*, 2002; Voura *et al.*, 2001). Um die Bedeutung von L1CAM bei der transendothelialen Migration von Tumorzellen und Lymphozytensubpopulationen im Kontext der Metastasierung zu klären, wurden Expressionsniveau, Adhäsions- und Migrationsverhalten der für die Metastasierung verantwortlichen Zellen *in vitro* untersucht.

Um den Grad der Vaskularisierung der L1CAM Expression auf Pankreas Tumor- und Kontrollgewebe sowie Pankreas Tumor- und Kontrollendothel *in situ* zu analysieren, wurden immunhistologische Färbungen auf unterschiedlichen Kontroll- und Primärtumorgeweben angefertigt. Als Kontrollgewebe wurde tumorfreies peritumorales Gewebe der Pankreaskarzinompatienten herangezogen. Die Detektion des Endothels im Gewebe erfolgte mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAk) gegen CD31, welches von allen Endothelzellen konstitutiv exprimiert wird und als Endothelzell-Markerprotein gilt. Zur sensitiveren Detektion der Gefäßstrukturen wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI gefärbt. Die Quantifizierung der Färbung erfolgte computergestützt mit Hilfe der AnalySIS<sup>®</sup> Software. Dadurch konnte der prozentuale Anteil Antikörper-gefärbter Gewebebereiche an der Gesamtgewebefläche berechnet werden.

## ERGEBNISSE

Die Färbungen zeigten in Kontroll- und Tumorgewebe eine homogene Verteilung der Gefäße. Der prozentuale Anteil der durch den CD31 spezifischen mAk gefärbten Fläche betrug im Kontrollgewebe  $0,7\% \pm 0,1\%$  und im Tumorgewebe  $1,6\% \pm 0,3\%$ . Daraus ergibt sich ein zweifach höherer Anteil der CD31 gefärbten Endothelzellen in Tumorgewebe im Vergleich zu den Kontrollgeweben (Abbildung 4.1 und 4.2).

Um den prozentualen Anteil einer L1CAM Expression in Kontroll- und Tumorgewebe analysieren zu können, wurde auf den gleichen Geweben L1CAM mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk L1-11A) sowie CD31 mit einem zweiten Fluorochrom (Doppelfärbung) gefärbt. So konnte gleichzeitig zum prozentualen Anteil der L1CAM Expression im Gewebe auch die endotheliale L1CAM Expression bestimmt werden. Dieses wurde anhand der Überlagerung der beiden gefärbten Bereiche für CD31 und L1CAM auf Basis der Gesamtgewebefläche im Sichtfeld quantifiziert.

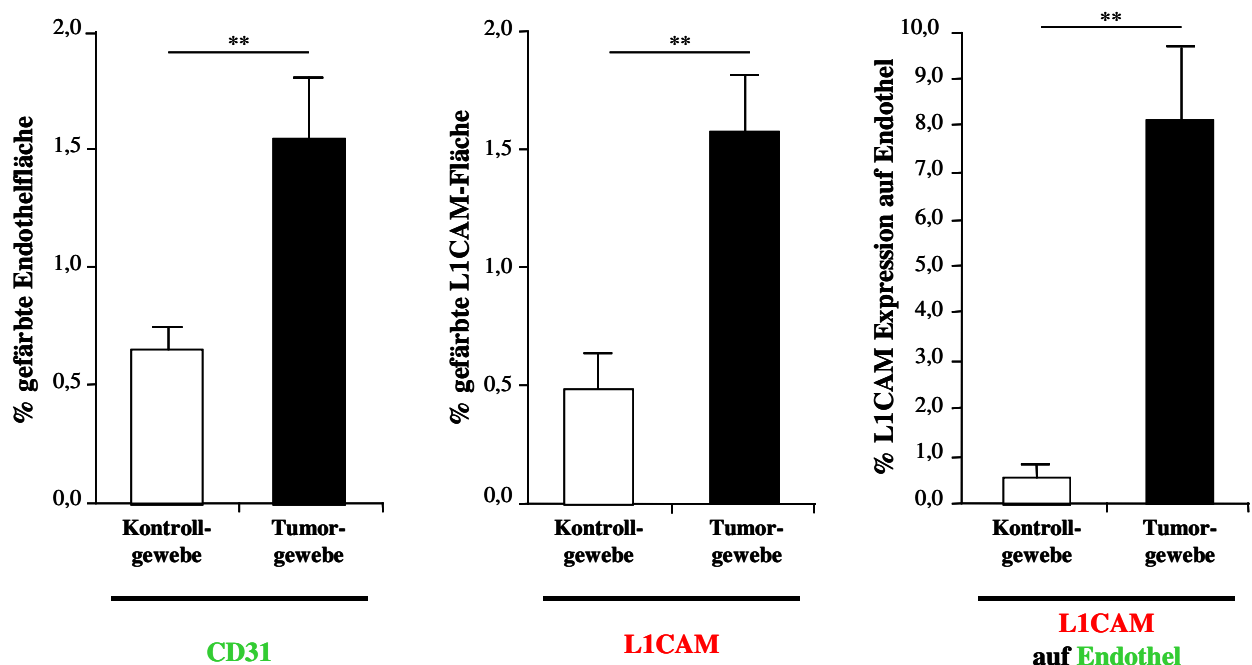


**Abbildung 4.1:** Repräsentative immunhistologische Färbung von L1CAM (rot) auf Endothelzellen (CD31; grün) in Kontroll- und Tumorgewebe *in situ*. Das Tumorgewebe zeigt im Vergleich zum Kontrollgewebe eine stärkere Vaskularisierung, eine erhöhte L1CAM Expression sowie eine basolaterale L1CAM Expression im Kontrollgewebe (links; Pfeile) und Co-Lokalisation mit CD31 (gelb) im Tumorgewebe (rechts; Pfeile). Die Zellkerne wurden zur besseren Detektion von Gefäßstrukturen mit DAPI gefärbt. Originalvergrößerung 400x (obere Reihe) und 630x (untere Reihe).

## ERGEBNISSE

Die Färbungen zeigten in den Tumorgeweben eine deutliche Erhöhung der L1CAM Expression im Vergleich zu den Kontrollgeweben. Der prozentuale Anteil der durch L1CAM gefärbten Fläche betrug im Kontrollgewebe  $0,5\% \pm 0,1\%$  und im Tumorgewebe  $1,5\% \pm 0,3\%$ . Daraus ergibt sich eine Erhöhung der L1CAM Expression auf die 3fache Fläche in den Tumorgeweben gegenüber den Kontrollgeweben (Abbildung 4.1 und 4.2).

Die Expressionssteigerung in den Tumorgeweben ging mit einer veränderten L1CAM Lokalisation einher. So war in den Kontrollgeweben häufig eine basolaterale Lokalisation von L1CAM zu beobachten, wohingegen in den Tumorgeweben oft eine luminale Expression, co-lokalisiert mit CD31, zu finden war (Abbildung 4.1, Pfeile). Zur Bestimmung des prozentualen Anteils der endothelialen L1CAM Expression wurden die Gesamtendothelanteile der Kontroll- und Tumorgewebe mit dem Anteil der L1CAM Expression auf dem jeweiligen Endothel korreliert. Der prozentuale Anteil der endothelialen L1CAM Expression betrug im Kontrollgewebe  $0,6\% \pm 0,3\%$  und im Tumorgewebe  $8,1\% \pm 1,7\%$ . Daraus ergibt sich eine Erhöhung auf das 13,5fache der endothelialen L1CAM Expression in den Tumorgeweben im Vergleich zu den Kontrollgeweben (Abbildung 4.1 und 4.2).



**Abbildung 4.2:** Prozentualer Anteil der durch CD31 (links), L1CAM (mitte) und endotheliales L1CAM (rechts) gefärbten Fläche in Kontroll- (n=20) und Tumorgeweben (n=24). Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

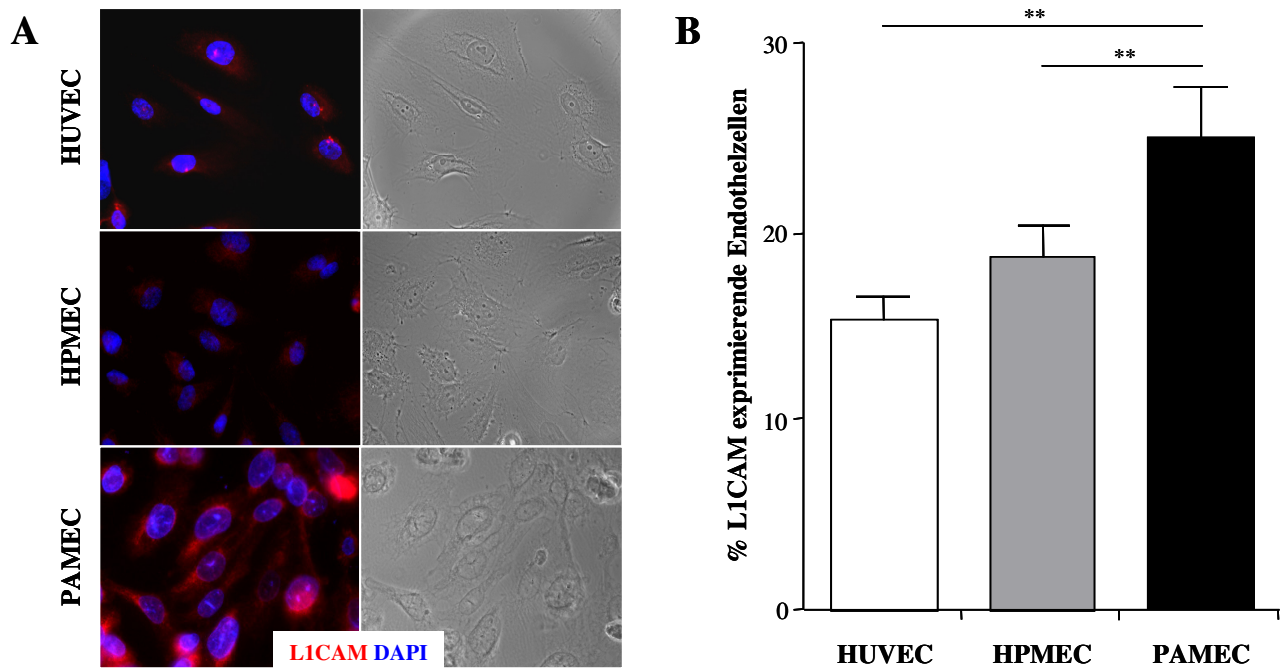
## 4.2 Die L1CAM Expression von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

### 4.2.1 Immunzytologische Bestimmung der konstitutiven L1CAM Expression auf Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Um die Rolle von L1CAM auf Kontroll- und Tumorendothel genauer zu untersuchen, sollte verifiziert werden, ob die endotheliale L1CAM Expression auch *in vitro* detektierbar ist. Ebenso sollte bestimmt werden, ob die *in situ* analysierten quantitativen Unterschiede der L1CAM Expression auf Pankreas Kontroll- und Tumorendothel sich auch *in vitro* widerspiegeln.

Die Detektion von L1CAM erfolgte durch einen spezifischen mAk (mAk L1-11A). Es wurden Tumorendothelzellen aus Pankreas Tumorgewebe isoliert und unter Standardkulturbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Als Kontrollendothelzellen wurden nicht-maligne makrovaskuläre HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*; aus der humanen Nabelschnurvene isolierte Endothelzellen) und mikrovaskuläre HPMEC (*human pulmonary microvascular endothelial cells*; aus der humanen Lunge isolierte Endothelzellen) verwendet. Die immunzytologischen Färbungen sollten die konstitutive L1CAM Expression der Kontrollendothelzellen (HUVEC und HPMEC) mit der konstitutiven L1CAM Expression der Pankreas Tumorendothelzellen (PAMEC) vergleichen. Zur Vereinfachung der Quantifizierung der Zellzahlen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Quantifizierung der Färbung erfolgte in drei unabhängigen Ansätzen durch Auszählen von fünf Gesichtsfeldern am Fluoreszenzmikroskop. Dadurch konnte der prozentuale Anteil L1CAM exprimierender Endothelzellen berechnet werden.

Die Färbung der PAMEC zeigte eine deutliche Erhöhung der konstitutiven L1CAM Expression (rot) im Vergleich zu den HUVEC bzw. HPMEC. Der prozentuale Anteil der L1CAM exprimierenden Kontrollendothelzellen betrug 15,3% ± 1,3% (HUVEC) sowie 19,5% ± 1,4% (HPMEC). Der prozentuale Anteil der L1CAM exprimierenden Tumorendothelzellen betrug 25,2% ± 2,5%. Daraus ergibt sich eine Erhöhung der L1CAM Expression der PAMEC auf das 1,6fache im Vergleich zu den HUVEC bzw. eine Erhöhung auf das 1,3fache im Vergleich zu den HPMEC (Abbildung 4.3 A und B).

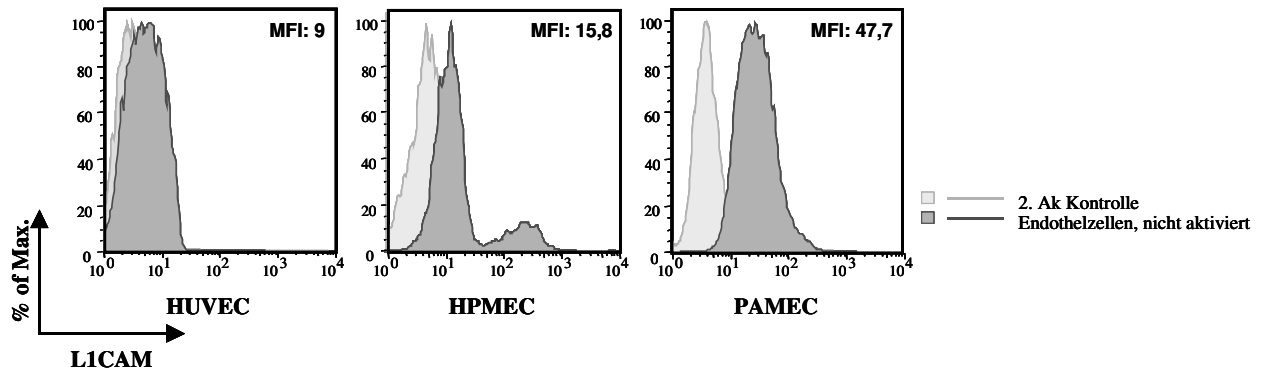


**Abbildung 4.3:** Repräsentative immunzytologische Färbung der konstitutiven L1CAM Expression auf Kontrollendothelzellen (HUVEC und HPMEC) sowie Pankreas Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro*. **A** Deutliche Erhöhung der L1CAM Expression (rot) der PAMEC im Vergleich zu HUVEC und HPMEC. Die Kernfärbungen mit DAPI ermöglichen ein einfacheres Quantifizieren der Zellzahlen. Originalvergrößerung 400x. **B** Vergleich des prozentualen Anteils L1CAM exprimierender Kontroll- und Tumorendothelzellen. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

#### 4.2.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der konstitutiven L1CAM Expression auf Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

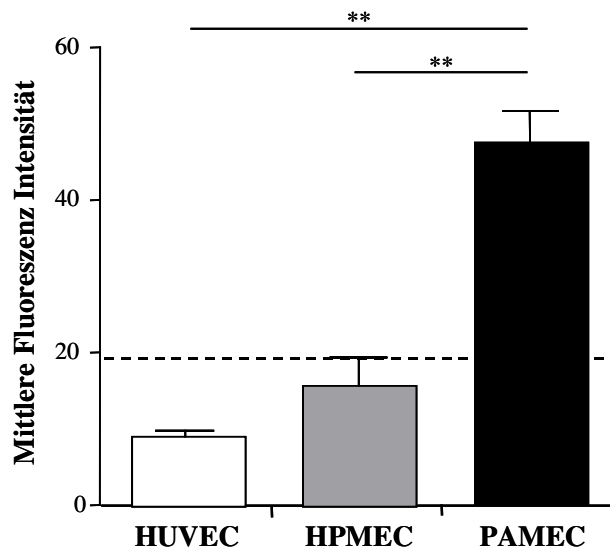
Die durch die immunzytologische Analyse detektierte erhöhte L1CAM Expression auf Pankreas Tumorendothelzellen (siehe Abschnitt 4.2.1) sollte mittels durchflusszytometrischer Messung verifiziert werden. Dabei sollte die konstitutive L1CAM Expression der Kontrollendothelzellen mit der konstitutiven L1CAM Expression der Pankreas Tumorendothelzellen verglichen werden. Um Apoptotische und nekrotische Zellen aus der Quantifizierung auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Mit Hilfe streng vorbestimmter Qualitätskriterien bei der Identifizierung der quantifizierten Zellen konnte eine vitale Zellpopulation detektiert werden, welche sich durch ein homogenes Muster an Größe und Granularität auszeichnete. Diese festgelegten Parameter wurden für alle weiteren FACS-Analysen von Endothelzellen verwendet.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.4:** FACS-Analyse der konstitutiven L1CAM Expression auf Kontrollendothelzellen (HUVEC und HPMEC) und Pankreas Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro*. Dargestellt sind repräsentative Expressionsvergleiche der konstitutiven L1CAM Expressionen der HUVEC, HPMEC und PAMEC. Die Abbildung zeigt eine deutlich stärkere konstitutive L1CAM Expression der PAMEC. Es wurden 30.000 Ereignisse am FACSCanto® II ausgezählt.

Die durchflusszytometrische Analyse der PAMEC zeigte, wie die immunzytologische Bestimmung, ebenfalls eine deutliche Erhöhung der konstitutiven L1CAM Expression im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen. Die mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) der L1CAM exprimierenden Kontrollendothelzellen betrug  $9 \pm 1$  (HUVEC) sowie  $15,8 \pm 3,7$  (HPMEC) und der Tumorendothelzellen  $47,7 \pm 4,1$  (Abbildung 4.4).

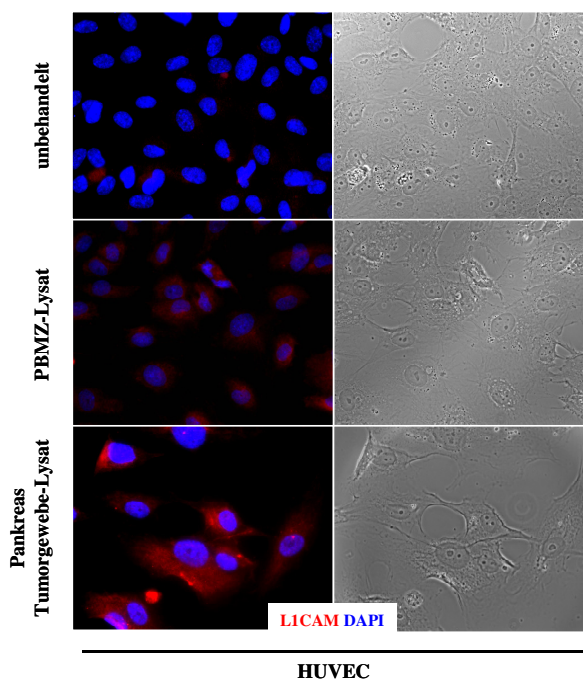


**Abbildung 4.5:** Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) der L1CAM gefärbten Endothelzellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen FACS-Analysen. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Daraus ergibt sich eine Erhöhung der konstitutiven L1CAM Expression der PAMEC auf das 4,6fache im Vergleich zu HUVEC bzw. auf das 3fache im Vergleich zu HPMEC (Abbildung 4.5). Die Ergebnisse zeigten, dass mit beiden Methoden, Immunzytologie und Durchflusszytometrie, eine signifikante Erhöhung der L1CAM Expression auf den Pankreas Tumorendothelzellen gemessen werden konnte.

### 4.2.3 Immunzytologische Bestimmung der Wirkung von allogenen Kontroll- und Tumorgewebe-Lysat auf die endotheliale L1CAM Expression *in vitro*

Im folgenden sollte untersucht werden, ob die gemessene erhöhte konstitutive L1CAM Expression der PAMEC (siehe Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2) auf einen direkten Einfluss des Tumors zurückzuführen ist. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob die festgestellten Unterschiede der konstitutiven L1CAM Expression zwischen HUVEC bzw. HPMEC und PAMEC auf das Tumormikromilieu zurückzuführen sind. Dazu musste zunächst ausgeschlossen werden, dass die analysierten Unterschiede lediglich auf unterschiedlichen Organursprüngen (Nabelschnur bzw. Lunge im Vergleich zu Pankreas) oder Gefäßarten (makro- im Vergleich zu mikrovaskulären Gefäßen) beruhen.



**Abbildung 4.6:** Immunzytologische Analyse der L1CAM Expression der HUVEC nach Kultivierung mit allogenen Pankreas Tumorgewebe-Lysat *in vitro*. Als allogenes Kontroll-Lysat dienten mononukleäre Zellen aus peripherem Blut. Zur besseren Übersicht wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Originalvergrößerung 400x.

Es sollte evaluiert werden, ob die verwendeten HUVEC und HPMEC als Kontrollendothelzellen herangezogen werden können. Hervorgerufene Unterschiede aufgrund unterschiedlicher Gefäßarten konnten im Vorfeld ausgeschlossen werden, da als Kontrollendothelzellen sowohl makrovaskuläre HUVEC als auch mikrovaskuläre HPMEC verwendet wurden, die beide signifikante L1CAM Expressionsunterschiede im Vergleich zu den PAMEC zeigten (siehe Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2).

Um das Tumormikromilieu zu imitieren, wurden HUVEC einerseits mit Endothelzell Basal Medium (EZBM) kultiviert und andererseits mit EZBM, welches allogenes Pankreas Tumorgewebe-Lysat (50µg/ml) aus homogenisiertem Pankreasgewebe enthielt. Als allogenes Kontroll-Lysat dienten mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMZ). Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Erhöhung der L1CAM Expression der HUVEC *in vitro*, wenn die Zellen zusätzlich mit allogem Pankreas Tumorgewebe-Lysat kultiviert wurden (Abbildung 4.6).

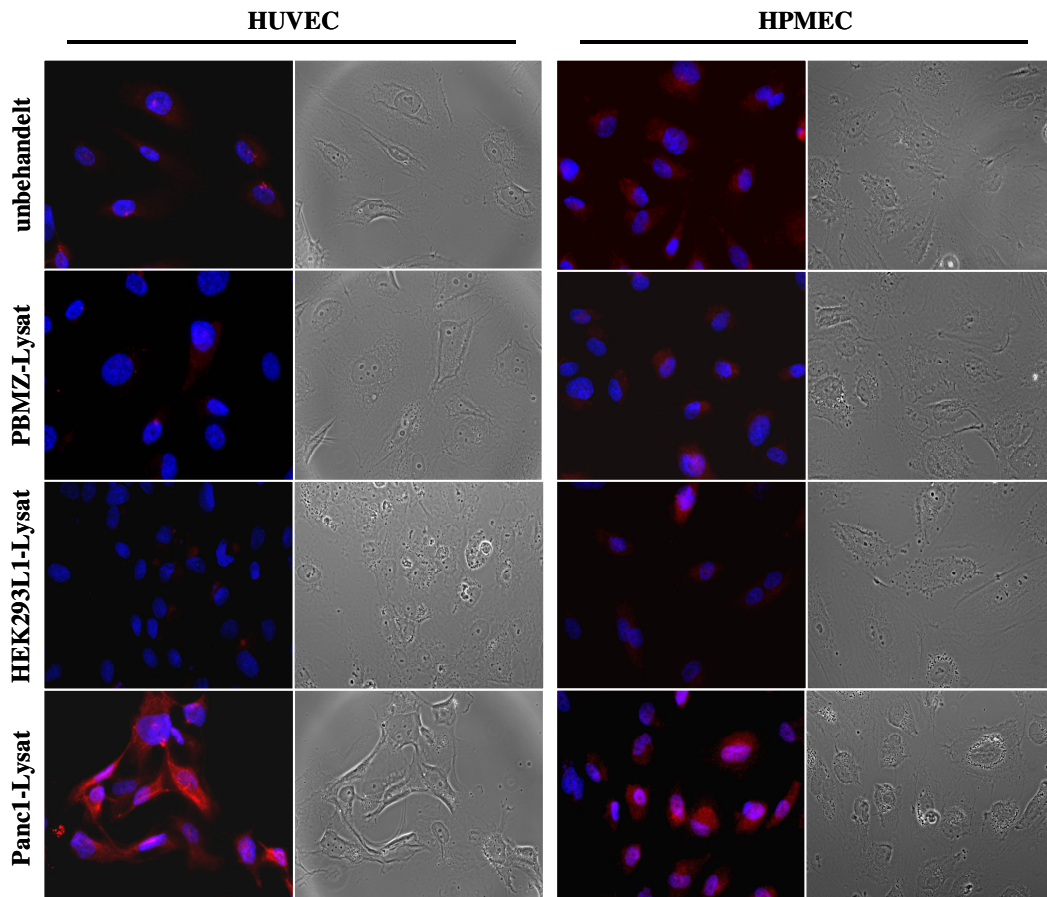
#### 4.2.4 Immunzytologische Bestimmung der Wirkung von Kontroll- und Tumorzelllinien-Lysaten auf die endotheliale L1CAM Expression *in vitro*

Nachdem eine erhöhte L1CAM Expression der mit allogem Pankreas Tumorgewebe-Lysat inkubierten HUVEC gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.3), sollte analysiert werden, ob diese Wirkung auch durch ein Pankreas Tumorzelllinien-Lysat hervorgerufen werden kann. Zu untersuchen war, ob dieses Lysat ebenfalls das Tumormikromilieu imitieren und dadurch zu einer erhöhten L1CAM Expression der Kontrollendothelzellen *in vitro* führen kann.

HUVEC und HPMEC wurden mit EZBM oder EZBM, welches Panc1 Tumorzelllinien-Lysat (50µg/ml) enthielt, kultiviert. Für das Kontroll-Lysat wurden PBMZ verwendet. Sowohl PBMZ als auch Panc1 Zellen (siehe Abschnitt 4.6.8) exprimieren L1CAM (Ebeling *et al.*, 1996; Felding-Habermann *et al.*, 1997). Des Weiteren konnten Mechttersheimer *et al.* (2001) zeigen, dass lösliches L1CAM autokrin oder parakrin an Zellen binden kann. Um zu zeigen, dass die beobachtete erhöhte L1CAM Expression nicht auf eine Bindung von löslichem L1CAM aus den Lysaten zurückzuführen ist, wurde für ein weiteres Kontroll-Lysat die embryonale Nierenzelllinie HEK293L1 verwendet.

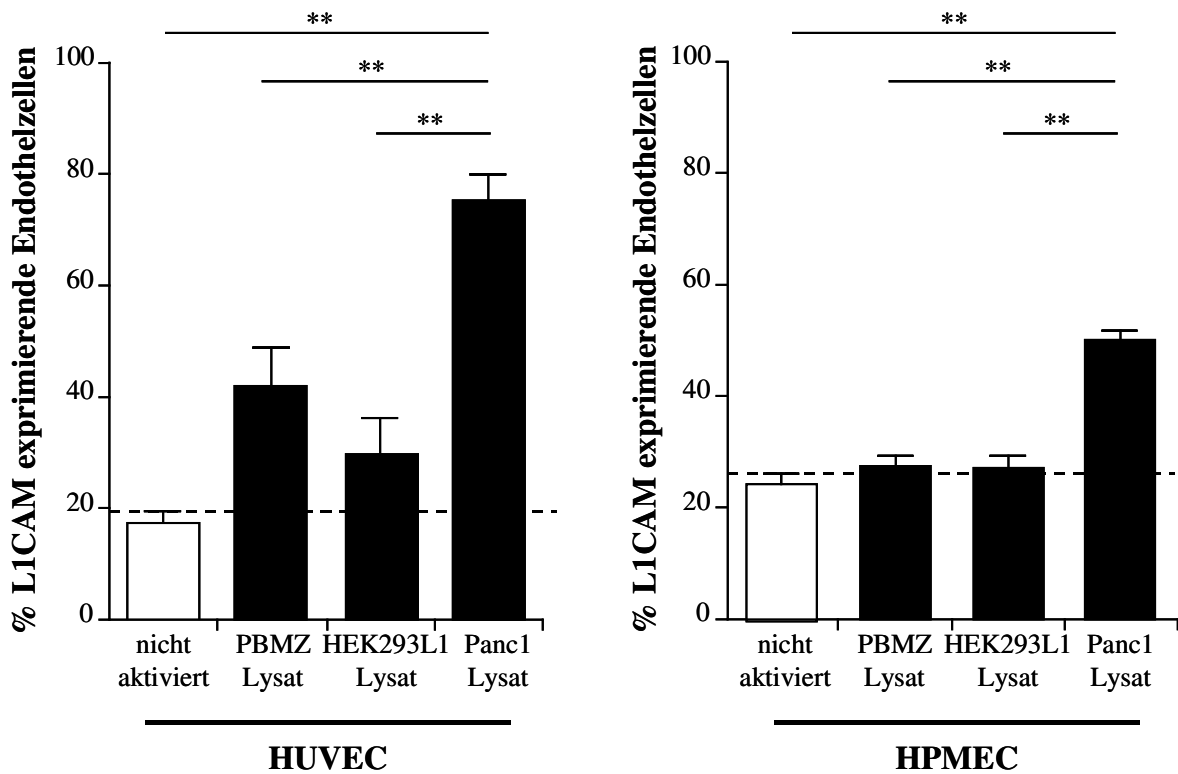


## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.7:** Immunzytologische Bestimmung der LICAM Expression der HUVEC und HPMEC nach Kultivierung mit Panc1 Tumorzelllinien-Lysat *in vitro*. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen der LICAM Expression (rot) der HUVEC und HPMEC nach Inkubation mit Panc1 Tumorzelllinien-Lysat. Als Kontroll-Lysate wurden PBMZ und HEK293L1 Zell-Lysate verwendet. Die Kernfärbungen mit DAPI ermöglichen ein einfacheres Quantifizieren der Zellzahlen. Originalvergrößerung 400x.

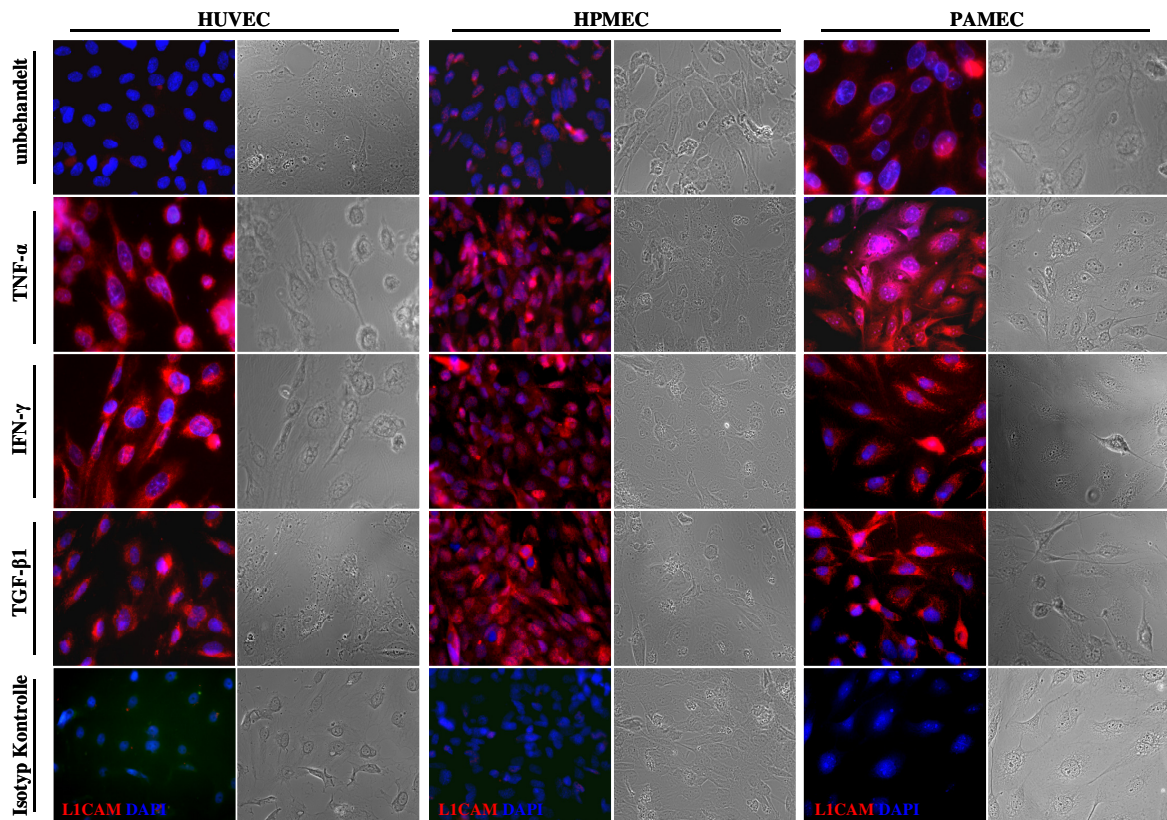
Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung der LICAM Expression von Panc1 Tumorzelllinien-Lysat behandelt HUVEC und HPMEC von  $75,4\% \pm 4,5\%$  (HUVEC) bzw.  $53,3\% \pm 2,9\%$  (HPMEC) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ( $17,6\% \pm 1,8\%$  bei HUVEC bzw.  $26,4\% \pm 4,2\%$  bei HPMEC) und den mit PBMZ-Lysat ( $42\% \pm 6,9\%$  bei HUVEC bzw.  $24,6\% \pm 3,2\%$  bei HPMEC) und HEK293L1-Lysat ( $29,8\% \pm 6,5\%$  bei HUVEC bzw.  $24,3\% \pm 3,5\%$  bei HPMEC) behandelten Zellen. Die PBMZ und HEK293L1 Kontroll-Lysate führten zu keiner signifikanten Erhöhung der LICAM Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 4.7 und 4.8).



**Abbildung 4.8:** Vergleich des prozentualen Anteils L1CAM exprimierender Kontrollendothelzellen (HUVEC und HPMEC) nach Inkubation mit Panc1 Tumorzelllinien-Lysat ermittelt durch Quantifizierung der immunzytologische Bestimmung der L1CAM Expression. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

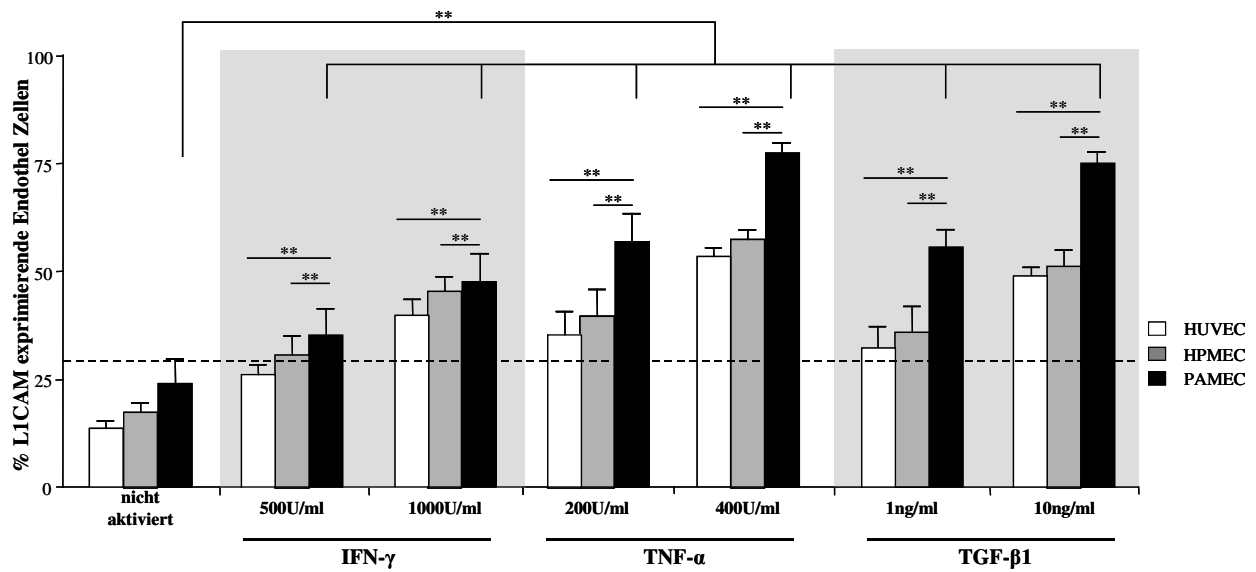
#### 4.2.5 Immunzytologische Bestimmung der Wirkung von immunmodulatorischen Zytokinen auf die endotheliale L1CAM Expression *in vitro*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl allogenes Pankreas Tumorgewebe-Lysat als auch Panc1 Tumorzelllinien-Lysat zu einer Erhöhung der L1CAM Expression der HUVEC und HPMEC führte (siehe Abschnitt 4.2.3 und 4.2.4), stellte sich die Frage, auf welche vom Tumor sezernierten Faktoren diese beobachtete Wirkung zurückzuführen sein könnte. Um diese Frage zu untersuchen, wurde die Wirkung der immunmodulatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 auf die endotheliale L1CAM Expression bestimmt. Für diese Zytokine ist eine aktivierende Wirkung auf Endothelzellen beschrieben worden (Iruela-Arispe und Sage, 1993; Madge und Pober, 2001; Madri *et al.*, 1992; Munro *et al.*, 1989; Pepper *et al.*, 1993; Plouet und Gospodarowicz, 1989; Pober, 1988; Pober *et al.*, 1986). Kontroll- (HUVEC und HPMEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) wurden mit EZBM oder EZBM, welches TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder TGF- $\beta$ 1 in zwei verschiedenen Konzentration enthielt, für 24h kultiviert.



**Abbildung 4.9:** Repräsentative Aufnahmen der immunzytologischen Analyse der L1CAM Expression (rot) auf Zytokin-aktivierten HUVEC, HPMEC und PAMEC *in vitro*. Die Kernfärbungen mit DAPI ermöglichen ein einfacheres Quantifizieren der Zellzahlen. Originalvergrößerung 400x.

Die Inkubation der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder TGF- $\beta$ 1 induzierte eine dosisabhängige Zunahme der Anzahl L1CAM-exprimierender HUVEC, HPMEC und PAMEC. Dabei bewirkten TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 die stärkste Zunahme der Anzahl L1CAM-exprimierender Zellen bei den PAMEC. Die Stimulation mit 400U/ml TNF- $\alpha$  bewirkte die stärkste Zunahme der Anzahl L1CAM-exprimierender PAMEC auf  $77\% \pm 2,3\%$  im Vergleich zu nicht aktivierten PAMEC ( $24,7\% \pm 5,5\%$ ) sowie mit 400U/ml TNF- $\alpha$  stimulierte HUVEC ( $53,4\% \pm 2\%$ ) bzw. mit 400U/ml TNF- $\alpha$  stimulierte HPMEC ( $57,6\% \pm 2,4\%$ ). Sowohl die Stimulationen mit IFN- $\gamma$  als auch mit TGF- $\beta$ 1 bewirkten eine signifikante Zunahme der Anzahl L1CAM-exprimierender PAMEC im Vergleich zur IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 Stimulation der HUVEC und HPMEC sowie nicht aktivierter PAMEC (Abbildung 4.9 und 4.10).

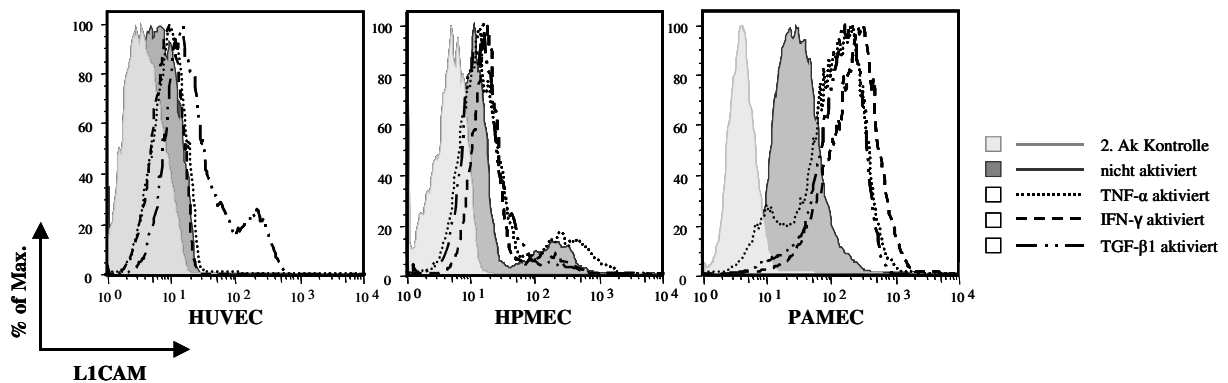


**Abbildung 4.10:** Vergleich des prozentualen Anteils L1CAM exprimierender HUVEC, HPMEC und PAMEC nach Inkubation mit den immunmodulatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

#### 4.2.6 Durchflusszytometrische Bestimmung der Wirkung von immunmodulatorischen Zytokinen auf die endotheliale L1CAM Expression *in vitro*

Die durch die immunzytologische Analyse gezeigte induzierbare signifikante Erhöhung der L1CAM Expression der PAMEC durch die Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 (siehe Abschnitt 4.2.5) sollte mittels durchflusszytometrischer Messung verifiziert werden. Dabei sollte die stimulierbare L1CAM Expression der HUVEC bzw. HPMEC mit der von PAMEC verglichen werden. Da die Vorarbeiten bereits zeigten, dass die Stimulation mit der jeweils höheren Zytokin-Konzentration auch eine höhere L1CAM Expression bewirkte, wurde bei der FACS-Analyse bei allen drei Zytokinen die höchste Konzentration verwendet (siehe Abschnitt 4.2.5).

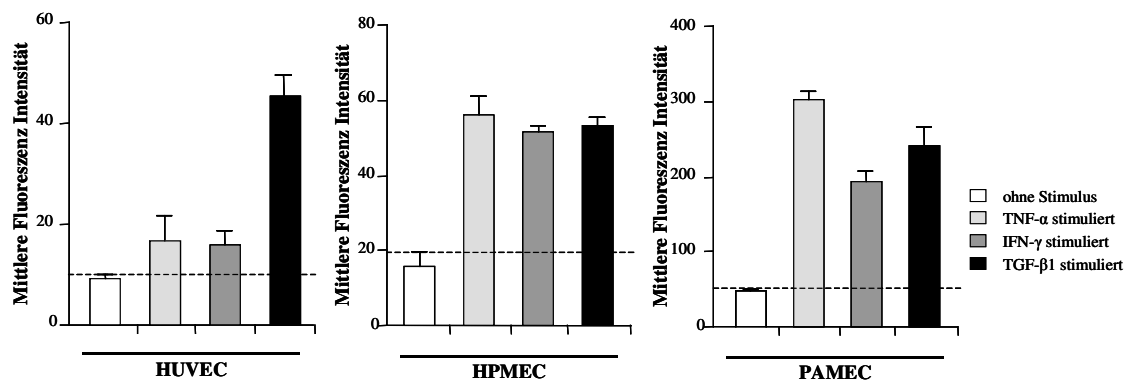
Für die FACS-Analyse wurden die zuvor festgesetzten Parameter verwendet (siehe Abschnitt 4.2.2). Die eingesetzten Einzelzellsuspensionen wurden mit einem L1CAM-spezifischen Antikörper (mAk L1-11A) angefärbt. Um Apoptotische und nekrotische Zellen aus der Quantifizierung auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich mit PI gefärbt.



**Abbildung 4.11:** FACS-Analyse der L1CAM Expression der HUVEC, HPMEC und PAMEC nach Inkubation (24h) mit den immunmodulatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 *in vitro*. Dargestellt sind repräsentative Expressionsvergleiche induzierter L1CAM Expression auf Kontroll- und Tumorendothelzellen. Die Abbildung zeigt eine deutlich stärker stimulierbare L1CAM Expression der PAMEC. Nach der Färbung wurden 30.000 Ereignisse am FACSCanto<sup>®</sup> II ausgezählt.

Die durchflusszytometrische Messung der PAMEC zeigte ebenfalls eine deutliche Erhöhung der induzierbaren L1CAM Expression durch Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu den HUVEC bzw. HPMEC (Abbildung 4.11 und 4.12). Der MFI der L1CAM exprimierenden PAMEC betrug nach TNF- $\alpha$  Stimulation  $302 \pm 12,7$ , nach IFN- $\gamma$  Stimulation  $193 \pm 13,1$  und nach TGF- $\beta$ 1 Stimulation  $239,7 \pm 26,4$ . Daraus ergibt sich eine Erhöhung der L1CAM Expression nach TNF- $\alpha$  Stimulation auf das 6,3fache, nach IFN- $\gamma$  Stimulation auf das 4fache und nach TGF- $\beta$ 1 Stimulation auf das 5fache im Vergleich zu der L1CAM Expression nicht aktivierter PAMEC (MFI  $47,7 \pm 4,1$ ). Die HUVEC und HPMEC zeigten ebenfalls eine Zytokin induzierte Erhöhung der L1CAM Expression, die jedoch bei allen drei Zytokinen deutlich schwächer war als die Erhöhung der Zytokin induzierten L1CAM Expression der PAMEC (HUVEC: TNF- $\alpha$  Stimulation  $16,4 \pm 5,3$ , IFN- $\gamma$  Stimulation  $15,7 \pm 3$  und TGF- $\beta$ 1 Stimulation  $45,3 \pm 4,3$ ; HPMEC: TNF- $\alpha$  Stimulation  $56,2 \pm 5$ , IFN- $\gamma$  Stimulation  $51,4 \pm 2$  und TGF- $\beta$ 1 Stimulation  $53 \pm 2,7$ ) (Abbildung 4.11 und 4.12).

## ERGEBNISSE



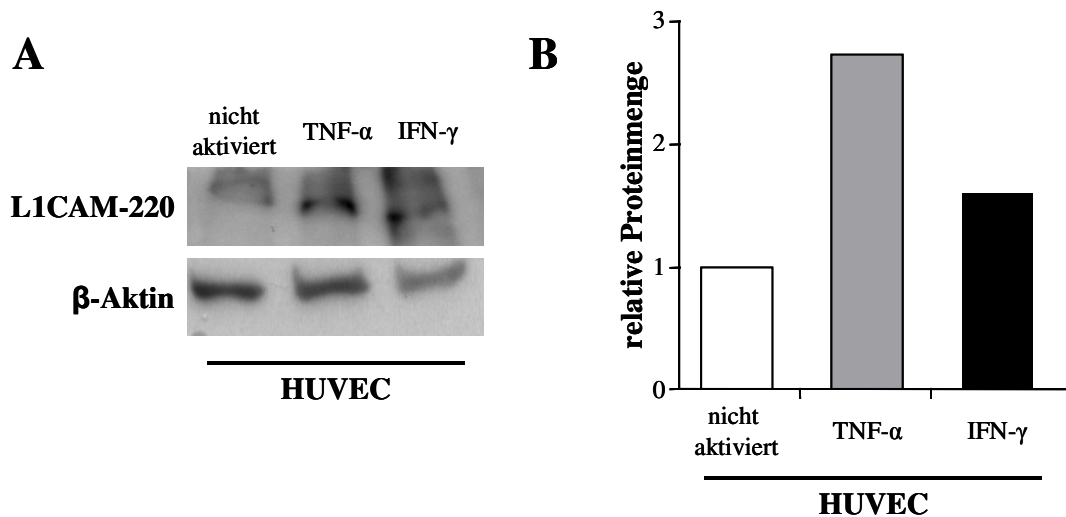
**Abbildung 4.12:** Mittlere Fluoreszenz Intensitäten der FACS-Analyse der L1CAM gefärbten Endothelzellen nach Inkubation mit den immunmodulatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 *in vitro*. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen.

### 4.2.7 Biochemische Bestimmung der Wirkung von immunmodulatorischen Zytokinen auf die endotheliale L1CAM Expression *in vitro*

Die durch die immunzytologischen und durchflusszytometrischen Messungen gezeigte induzierbare Erhöhung der endothelialen L1CAM Expression durch die immunmodulatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 (siehe Abschnitt 4.2.5 und 4.2.6) sollte mittels biochemischer Analyse verifiziert werden. Da bereits durch diese zwei unterschiedlichen Methoden die Stimulierbarkeit der L1CAM Expression durch die jeweiligen Zytokine auf Kontroll- (HUVEC und HPMEC) und Tumorendothel (PAMEC) verifiziert werden konnte, wurde die Auswahl der Zellen in diesem Experiment auf HUVEC begrenzt. Auch beschränkte sich hier die Analyse auf eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ .

Die Western Blot Analyse der L1CAM Expression auf HUVEC zeigte ebenfalls eine durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  induzierbare Erhöhung der L1CAM Expression. Hierbei wurde ein polyklonaler Antikörper gegen den zytoplasmatischen Teil von L1CAM verwendet (pAk zytL1), so dass mögliche Spaltfragmente von L1CAM detektiert werden konnten. Die detektierten L1CAM Fragmente im Western Blot hatten eine Größe von 220kDa, was dem Laufverhalten von ungespaltenem L1CAM im Western Blot entspricht. Die nach Plasmin-, ADAM10- bzw. ADAM17-Spaltung entstehenden kleineren Fragmente von 85kDa, 42kDa und 32kDa (Beer *et al.*, 1999; Gutwein *et al.*, 2000; Marezky *et al.*, 2005; Mechttersheimer *et al.*, 2001) konnten nicht detektiert werden (Abbildung 4.13 A). Immunpräzipitations-Experimente mit einem gegen die extrazelluläre Domäne von L1CAM gerichteten spezifischen Antikörper (mAk L1-11A) zum Nachweis von gespaltenem, löslichem L1CAM aus dem Zellkulturüberstand konnten ebenfalls

keine lösliche L1CAM Form und somit keine L1CAM-Spaltung nachweisen (Daten nicht dargestellt). Die Bestimmung der relativen Proteinmenge zeigte eine Erhöhung der L1CAM Expression auf das 2,7fache nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  bzw. auf das 1,6fache nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  im Vergleich zu nicht aktivierten HUVEC (Abbildung 4.13 B).



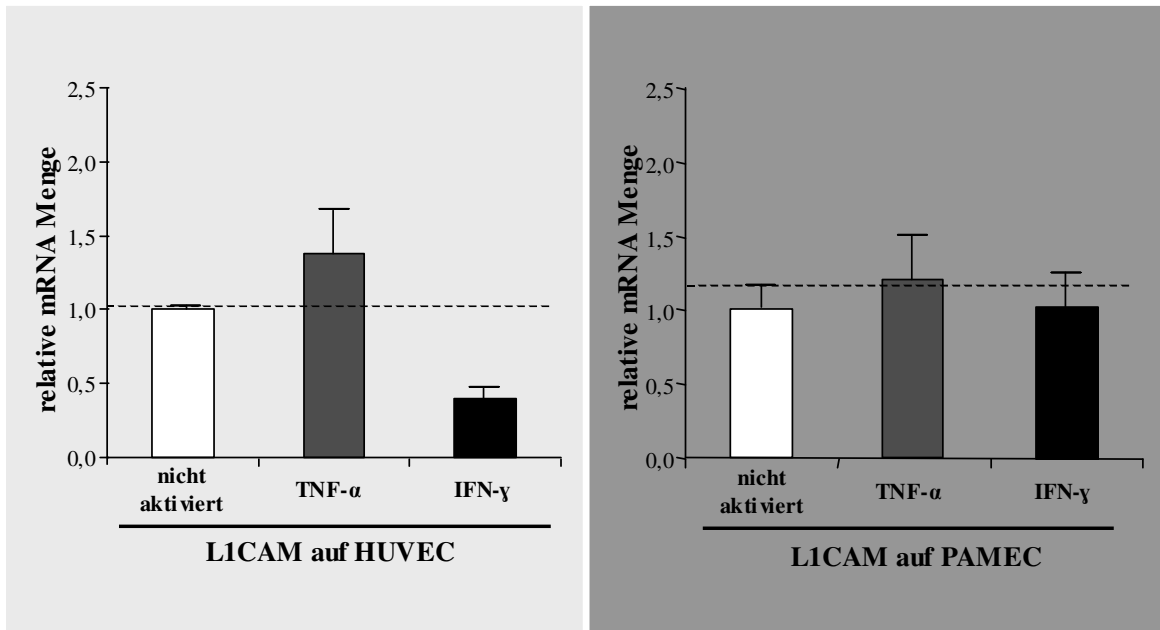
**Abbildung 4.13:** Western Blot Analyse der induzierten L1CAM Expression der HUVEC nach Inkubation mit den immunmodulatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  *in vitro*. **A** Repräsentative Expressionsvergleiche der L1CAM Expression nach Zytokin-Stimulation von HUVEC *in vitro*. **B** Die relativen Proteinmengen zeigen eine Zunahme der L1CAM Expression nach TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  Stimulation *in vitro*.

#### 4.2.8 Analyse des L1CAM mRNA Expressionsniveaus nach Stimulation mit immunmodulatorischen Zytokinen *in vitro*

Wie bisher durch die immunzytologischen, durchflusszytometrischen und biochemischen Messungen gezeigt werden konnte, induzieren die verwendeten immunmodulatorischen Zytokine eine Erhöhung der L1CAM Proteinmenge (siehe Abschnitt 4.2.5, 4.2.6 und 4.2.7). Es sollte weiterhin untersucht werden, ob die Zytokin Stimulation der Kontroll- und Tumorendothelzellen auch Veränderungen der L1CAM mRNA Menge bewirken können. Für diese Analyse wurden HUVEC und PAMEC mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  stimuliert und anschließend für eine quantitative PCR verwendet. Da vorherige L1CAM Proteinanalysen nach 24ständiger Zytokin Stimulation gemessen wurden, erfolgte auch hier eine Zytokin-Inkubation für 24h. Die relative Quantifizierung der L1CAM mRNA Menge zeigte, dass eine 24stündige Stimulation von HUVEC mit TNF- $\alpha$  eine Erhöhung der L1CAM mRNA Menge auf das 1,4fache im Vergleich zu

## ERGEBNISSE

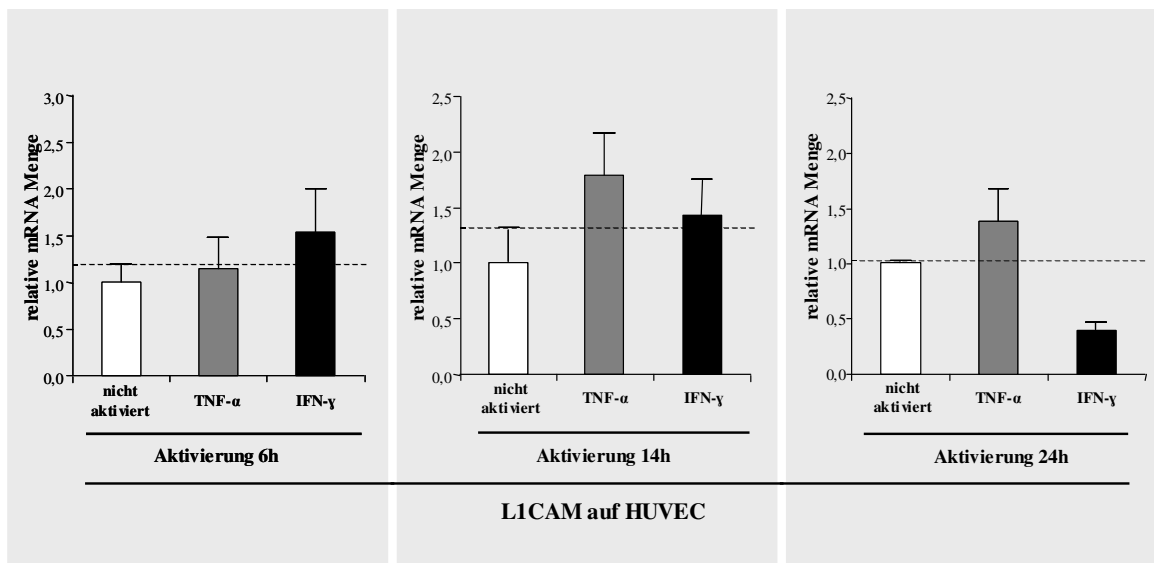
nicht aktivierten HUVEC bewirkte. Die Stimulation von HUVEC mit IFN- $\gamma$  hingegen bewirkte eine Erniedrigung der L1CAM mRNA Menge auf das 0,4fache. Eine 24stündige Stimulation der PAMEC mit TNF- $\alpha$  zeigte eine Erhöhung der L1CAM mRNA Menge auf das 1,2fache im Vergleich zu nicht aktivierten PAMEC. Die Stimulation von PAMEC mit IFN- $\gamma$  bewirkte eine Erhöhung der L1CAM mRNA Menge auf das 1,1fache im Vergleich zu nicht aktivierten PAMEC (Abbildung 4.14 und 4.15).



**Abbildung 4.14:** Quantitative PCR Analyse der L1CAM mRNA Menge der HUVEC (links) und PAMEC (rechts) nach Inkubation mit den immunmodulatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  *in vitro*. Dargestellt ist die qPCR Messung nach 24stündiger Inkubation von HUVEC (links) und PAMEC (rechts) mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  *in vitro*.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich eine zeitabhängige Veränderung der L1CAM mRNA Menge durch Zytokin Stimulation nachweisen lässt. Dafür wurden HUVEC für 6h, 14h und 24h mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  stimuliert und anschließend die Veränderungen der L1CAM mRNA Menge durch quantitative PCR Analyse gemessen. Die relative Quantifizierung zeigte, dass eine TNF- $\alpha$  Stimulation von HUVEC nach 6h eine Erhöhung der L1CAM mRNA Menge auf das 1,1fache, nach 14h eine Erhöhung auf das 1,8fache und nach 24h eine Erhöhung auf das 1,4fache im Vergleich zu nicht aktivierten HUVEC bewirkte. Die Stimulation von HUVEC mit IFN- $\gamma$  zeigte nach 6h eine Erhöhung der L1CAM mRNA Menge auf das 1,5fache, nach 14h eine Erhöhung auf das 1,4fache und nach 24h eine Erniedrigung auf das 0,4fache im Vergleich zu nicht aktivierten HUVEC (Abbildung 4.15).





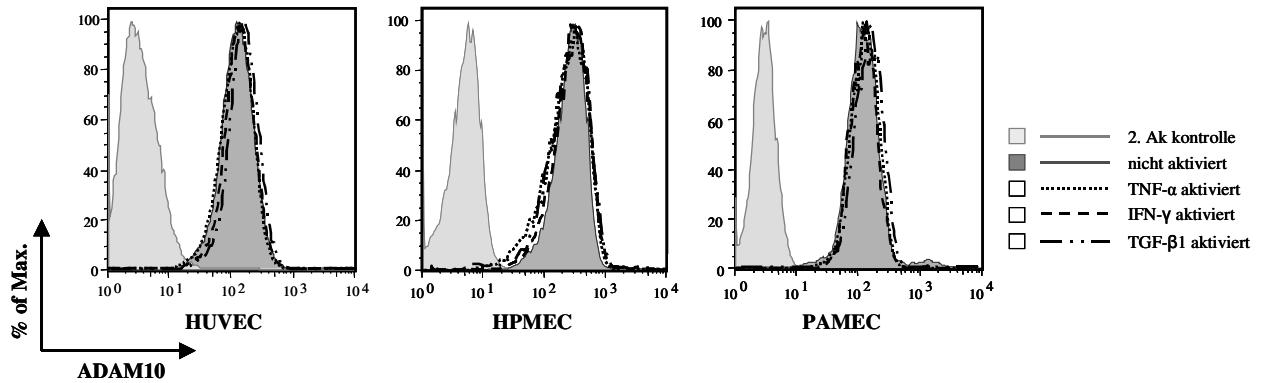
**Abbildung 4.15:** Quantitative PCR Analyse der L1CAM mRNA Menge der HUVEC nach Inkubation mit den immunmodulatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  *in vitro*. Gezeigt wird die zeitabhängige Analyse der L1CAM mRNA Menge nach 6h, 14h und 24h Inkubation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  *in vitro*.

### 4.3 Die Expression von Metalloproteinasen auf Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

L1CAM ist ein 200-220kDa großes Glykoprotein, das membranproximal durch ADAM10 oder ADAM17 gespalten werden kann, wodurch es in eine lösliche Form von 200kDa überführt wird. Zusätzlich verbleibt nach der Spaltung ein Fragment mit einer Größe von 32kDa in der Membran, das durch eine  $\gamma$ -Sekretase weiter prozessiert werden kann (Beer *et al.*, 1999; Gutwein *et al.*, 2000; Maretzky *et al.*, 2005; Mechtersheimer *et al.*, 2001). Wie bereits in Abschnitt 4.2.7 gezeigt wurde, findet auf HUVEC keine Prozessierung von L1CAM statt. Im folgenden sollte deswegen das Expressionsprofil der für die Spaltung notwendigen Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 untersucht werden.

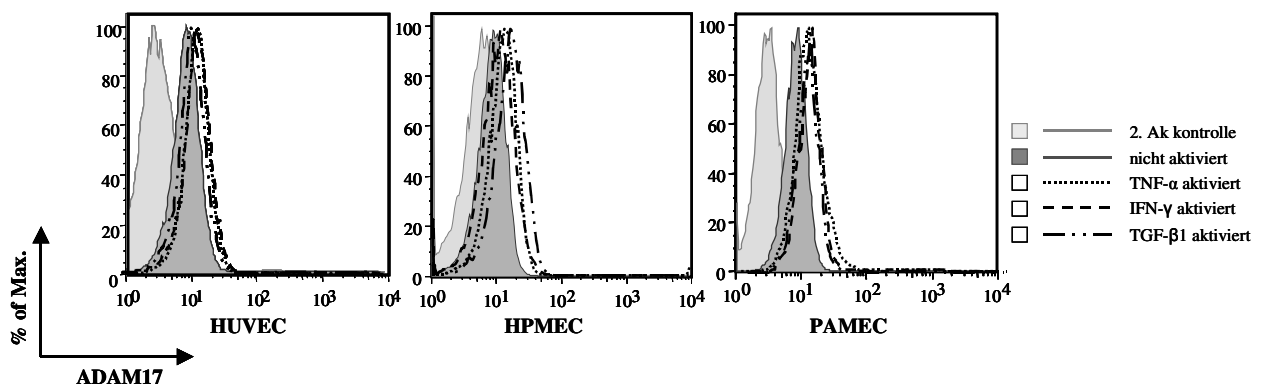
Um eine mögliche Wirkung durch eine Zytokin Stimulation auf die ADAM10 bzw. ADAM17 Expression zu untersuchen, wurden die Endothelzellen für 24h mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 aktiviert. Für die durchflusszytometrische Bestimmung der endothelialen Expression von ADAM10 bzw. ADAM17 wurden die zuvor festgelegten FACS-Parameter verwendet (siehe Abschnitt 4.2.2). In den so erhaltenen Endothelzellpopulationen wurde die jeweilige ADAM-Expression untersucht.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.16:** FACS-Analyse der ADAM10 Expression der HUVEC, HPMEC und PAMEC nach Inkubation (24h) mit den immunmodulatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 *in vitro*. Dargestellt sind repräsentative Expressionsvergleiche der ADAM10 Expression von Kontroll- und Tumorendothelzellen.

Die durchflusszytometrische Analyse der Kontroll- (HUVEC und HPMEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) zeigte eine deutliche ADAM10 Expression der HUVEC, HPMEC und PAMEC. Im Vergleich zu HUVEC und PAMEC zeigte sich auf den HPMEC eine etwas stärkere ADAM10 Expression. Die Zytokin Stimulation der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 bewirkte keine Veränderung der ADAM10 Expression im Vergleich zu den nicht aktivierten Endothelzellen (Abbildung 4.16).



**Abbildung 4.17:** FACS-Analyse der ADAM17 Expression auf HUVEC, HPMEC und PAMEC nach Inkubation (24h) mit den immunmodulatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 *in vitro*. Dargestellt sind repräsentative Expressionsvergleiche der ADAM17 Expression auf Kontroll- und Tumorendothelzellen. Die Zytokin Stimulation bewirkt sowohl auf Kontroll- als auch Tumorendothelzellen eine schwache Erhöhung der ADAM17 Expression *in vitro*.

Die durchflusszytometrische Analyse der HUVEC bzw. HPMEC und PAMEC zeigte ebenfalls eine deutliche ADAM17 Expression auf allen drei Endothelzelltypen, die jedoch schwächer war als die ADAM10 Expression. Die Zytokin Stimulation der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 bewirkte sowohl auf den HUVEC bzw. HPMEC als auch auf den PAMEC eine schwache Erhöhung der ADAM17 Expression im Vergleich zu den nicht aktivierten Endothelzellen (Abbildung 4.17).

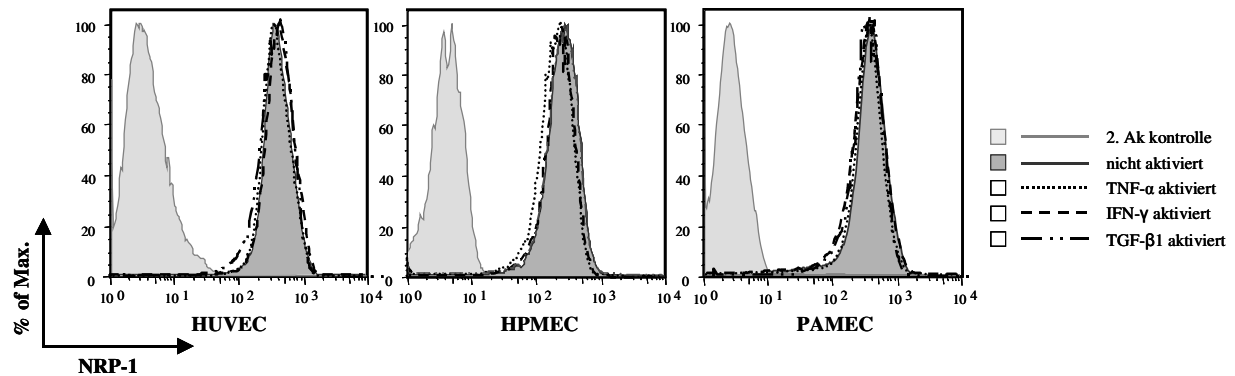
#### **4.4 Die Expression von L1CAM-Bindungspartnern auf Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro***

Für L1CAM sind sowohl homophilische Bindungseigenschaften als auch heterophilische Interaktionen mit unterschiedlichen extrazellulären Bindungspartnern beschrieben worden. So konnten unter anderem heterophilische Interaktionen von L1CAM mit verschiedenen Integrinen, CD24, Neurocan, Neuropilin-1 (NRP-1) und FGF-Rezeptor gezeigt werden (Brummendorf *et al.*, 1998; Castellani *et al.*, 2000; Friedlander *et al.*, 1994; Hortsch, 2000; Kleene *et al.*, 2001; Oleszewski *et al.*, 1999; Oleszewski *et al.*, 2000; Rauch *et al.*, 2001; Yip und Siu, 2001; Yip *et al.*, 1998). Da bei späteren funktionellen Untersuchungen von L1CAM auf Endothelzellen eine heterophilische Interaktion von L1CAM zu einem oder mehreren L1CAM-Bindungspartnern eine Rolle spielen könnte, sollte zunächst das Expressionsprofil verschiedener L1CAM-Bindungspartner auf Kontroll- und Tumorendothelzellen charakterisiert werden. Dafür wurden aus der Reihe potentieller L1CAM-Bindungspartner NRP-1 und  $\beta$ 1 Integrin ausgewählt, da eine endotheliale NRP-1 und  $\beta$ 1 Integrin Expression bereits mehrfach nachgewiesen werden konnte (Eichmann *et al.*, 2005; Klagsbrun und Eichmann, 2005; Rupp und Little, 2001; Stupack und Chersesh, 2002).

Um eine mögliche Wirkung durch eine Zytokin Stimulation auf die NRP-1 bzw.  $\beta$ 1 Integrin Expression zu untersuchen, wurden die Endothelzellen für 24h mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 aktiviert. Die Expressionsprofile wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Dafür wurden die zuvor festgelegten FACS-Parameter verwendet (siehe Abschnitt 4.2.2).

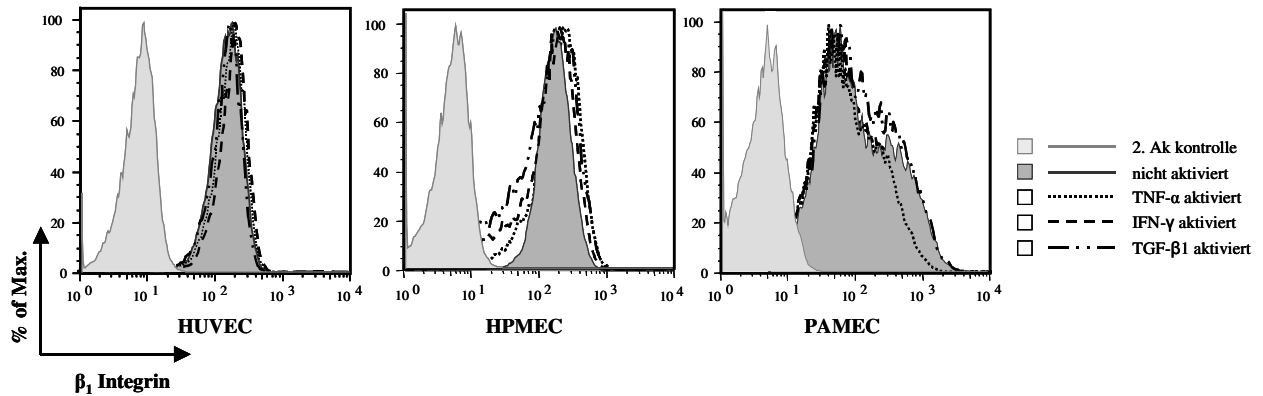
Die durchflusszytometrische Analyse der HUVEC bzw. HPMEC und PAMEC zeigte eine deutliche NRP-1 Expression auf allen drei Zelltypen. Die Zytokin Stimulation der Endothelzellen

durch TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 bewirkte sowohl auf den HUVEC und HPMEC, als auch auf den PAMEC keine Veränderung der NRP-1 Expression im Vergleich zu den nicht aktivierten Endothelzellen (Abbildung 4.18).



**Abbildung 4.18:** FACS-Analyse der NRP-1 Expression von HUVEC, HPMEC und PAMEC nach Inkubation (24h) mit den immunmodulatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 *in vitro*. Dargestellt sind repräsentative Expressionsvergleiche der NRP-1 Expression von Kontroll- und Tumorendothelzellen.

Die durchflusszytometrische Analyse der Kontroll- und Tumorendothelzellen zeigte ebenfalls eine deutliche  $\beta$ 1 Integrin Expression auf den drei Endothelzell Arten. Die Zytokin Stimulation der Endothelzellen durch TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 bewirkte auf den HUVEC keine Veränderung der  $\beta$ 1 Integrin Expression im Vergleich zu den nicht aktivierten HUVEC. Die Zytokin Stimulation der HPMEC durch TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 bewirkte eine gering schwächere  $\beta$ 1 Integrin Expression im Vergleich zu den nicht aktivierten HPMEC. Die Zytokin Stimulation der PAMEC durch IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 bewirkte keine Veränderung der  $\beta$ 1 Integrin Expression im Vergleich zu den nicht-aktivierten Endothelzellen, die Stimulation durch TNF- $\alpha$  bewirkte eine gering schwächere  $\beta$ 1 Integrin Expression im Vergleich zu den nicht aktivierten PAMEC (Abbildung 4.19).



**Abbildung 4.19:** FACS-Analyse der  $\beta_1$  Integrin Expression auf HUVEC, HPMEC und PAMEC nach Inkubation (24h) mit den immunmodulatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta_1$  *in vitro*. Dargestellt sind repräsentative Expressionsvergleiche der  $\beta_1$  Integrin Expression von Kontroll- und Tumorendothelzellen.

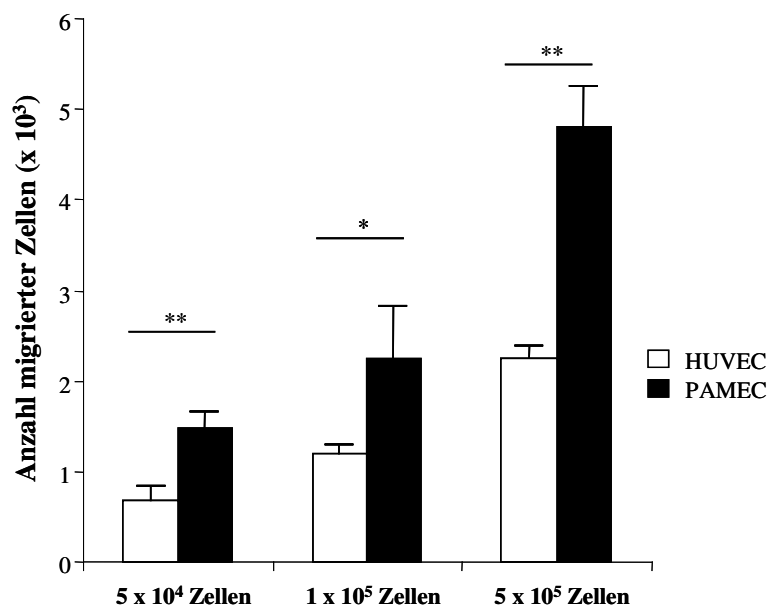
#### 4.5 Die Transmigrationskapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Einen wichtigen Teilprozess der Tumor Angiogenese stellt die Migration der aktivierten Endothelzellen von einem angrenzenden, gesunden Gewebe ins Tumorgewebe dar. Dabei folgen die Endothelzellen einem Zytokin-Gradienten, der sich aus verschiedenen, von Tumor- oder Stromazellen sezernierten pro-angiogenen Faktoren aufbaut (Bergers und Benjamin, 2003; Carmeliet, 2005).

Um die Transmigrationskapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen zu analysieren und miteinander zu vergleichen, wurden *in vitro* Transmigrationsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden Transmigrationsmembranen mit 0,2%iger Gelatine beschichtet (Imitierung der EZM). Anschließend wurden die zuvor mit TNF- $\alpha$  stimulierten Endothelzellen (24h) in die Transmigrationskammern überführt. Bei den chemotaktisch stimulierten Experimenten, wurde SDF-1 $\beta$  als chemoattraktives Molekül in die untere Kammer pipettiert (siehe Abschnitt 4.5.3 und 4.5.4). Die Anzahl transmigrierter Zellen wurde nach 24h Inkubation im Brutschrank quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.

4.5.1 Analyse der basalen Transmigrationskapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Zunächst sollte die basale Transmigrationskapazität ohne Chemokinstimulus zwischen Kontroll- (HUVEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) verglichen werden. Des Weiteren sollte die Anzahl der optimal einzusetzenden Zellzahlen titriert werden. Dafür wurden drei verschiedene Zellzahlen ( $5 \times 10^4$  Zellen/100 $\mu$ l,  $1 \times 10^5$  Zellen/100 $\mu$ l und  $5 \times 10^5$  Zellen/100 $\mu$ l) der HUVEC bzw. PAMEC für die Transmigrationen eingesetzt. Die Anzahl transmigrierter Zellen wurde nach 24h quantifiziert.



**Abbildung 4.20:** Analyse der basalen Transmigrationskapazität von Kontroll- (HUVEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro*. Es wurden drei verschiedene Zellzahlen getestet. Dabei zeigten bei allen Ansätzen die PAMEC eine stärkere basale Transmigrationskapazität. Porengröße: 8 $\mu$ m. n=3. Signifikanzniveau: \*p<0,1 \*\*p<0,05

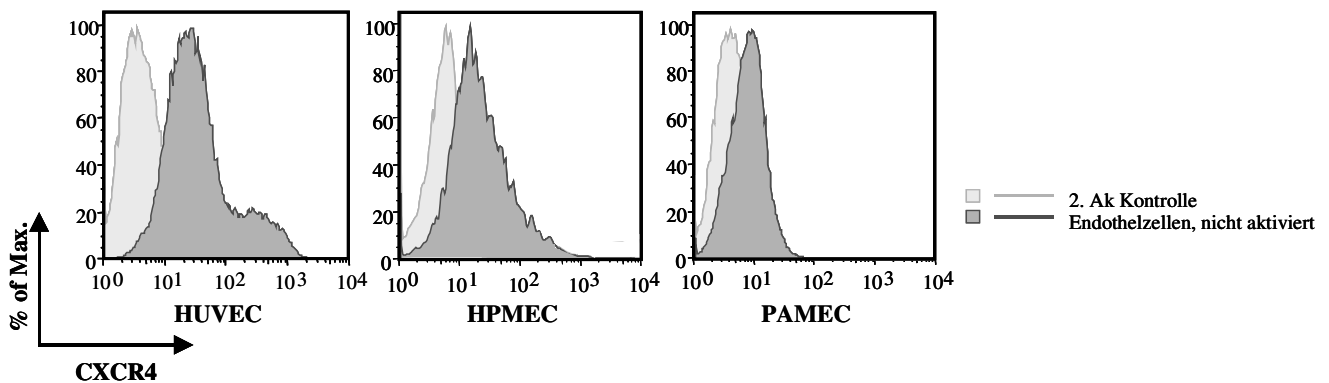
Die Ergebnisse zeigten eine signifikant stärkere basale Transmigration der PAMEC. Bei  $5 \times 10^4/100\mu$ l eingesetzten Endothelzellen migrierten  $1500 \pm 160$  PAMEC bzw.  $690 \pm 115$  HUVEC. Das entspricht bei den PAMEC 3% und bei den HUVEC 1,4% der eingesetzten Zellzahl. Wurden  $1 \times 10^5/100\mu$ l Endothelzellen eingesetzt migrierten  $2250 \pm 450$  PAMEC und  $1180 \pm 80$  HUVEC. Das entspricht bei den PAMEC 2,3% und bei den HUVEC 1,2% der eingesetzten Zellzahl. Bei  $5 \times 10^5/100\mu$ l Zellen eingesetzten Endothelzellen migrierten  $4800 \pm 370$  PAMEC bzw.  $2230 \pm 125$  HUVEC. Das entspricht bei den PAMEC 0,9% und bei den HUVEC 0,4% der eingesetzten Zellzahl (Abbildung 4.20). Im Vergleich zu den HUVEC zeigten die PAMEC bei

den drei verschiedenen Ausgangszellzahlen eine jeweils auf das 2fache gesteigerte Transmigrationskapazität im Vergleich zu den HUVEC. Diese Resultate belegen eine selektiv erhöhte Transmigrationskapazität der Pankreas Tumorendothelzellen *in vitro*. Da Zellzahlen über  $5 \times 10^4$  Zellen/100 $\mu$ l keine weitere Steigerung der basalen Transmigration bewirkten, wurden für weiterführende Versuche  $5 \times 10^4$  bzw.  $1 \times 10^5$  Zellen/100 $\mu$ l eingesetzt.

#### 4.5.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der endothelialen CXCR4 Expression *in vitro*

Im folgenden sollte die chemotaktische Transmigrationskapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen getestet werden. Dazu sollte mit einem Chemokin stimuliert werden. Als Chemokin sollte SDF-1 $\beta$  verwendet werden. Für diese Fragestellung musste zunächst das Expressionprofil des für SDF-1 $\beta$  spezifischen Rezeptors CXCR4 auf Kontroll- (HUVEC und HPMEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) analysiert werden. Für die durchflusszytometrische Bestimmung der endothelialen CXCR4 Expression wurden die zuvor festgelegten FACS-Parameter verwendet (siehe Abschnitt 4.2.2).

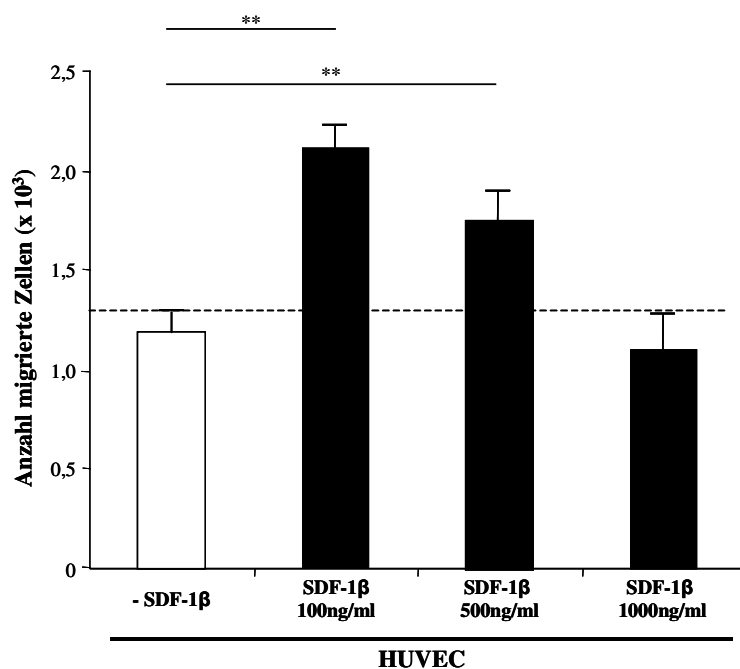
Die durchflusszytometrische Analyse der Kontroll- und Tumorendothelzellen zeigte eine deutliche konstitutive CXCR4 Expression auf allen Endothelzell Arten. Dabei zeigte sich die stärkste konstitutive CXCR4 Expression auf den HUVEC im Vergleich zu HPMEC und PAMEC. Die schwächste CXCR4 Expression wurde auf den PAMEC detektiert (Abbildung 4.21).



**Abbildung 4.21:** FACS-Analyse der konstitutiven CXCR4 Expression. Dargestellt sind repräsentative Expressionsmuster von CXCR4 auf Kontroll- (HUVEC und HPMEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro*.

4.5.3 Analyse der Konzentrationsabhängigkeit der SDF-1 $\beta$  stimulierten Transmigration von Kontrollendothelzellen *in vitro*

Um die optimale SDF-1 $\beta$  Konzentration für die chemotaktischen Transmigrationsexperimente zu bestimmen, wurden die HUVEC Transmigrationskapazitäten innerhalb einer SDF-1 $\beta$  Konzentrationsreihe ermittelt. Für die chemotaktische Stimulation der Transmigration wurden dem EZBM in der untere Migrationskammer unterschiedliche Konzentrationen von SDF-1 $\beta$  zugegeben (siehe Abb. 4.22). Als Kontrolle wurde dem EZBM in der unteren Migrationskammer das selbe Volumen des Zytokins an EZBM zugesetzt. Die Anzahl transmigrierter Zellen wurde nach 24h quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.



**Abbildung 4.22:** Messung der Konzentrationsabhängigkeit der chemotaktischen Transmigrationskapazität anhand von HUVEC ( $1 \times 10^5$  Zellen/100 $\mu$ l) *in vitro*. Es wurden drei SDF-1 $\beta$  Konzentrationen getestet. Dabei zeigte die niedrigste SDF-1 $\beta$  Konzentration (100ng/ml) die stärkste stimulatorische Wirkung auf die Transmigration von HUVEC. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

Die Ergebnisse zeigten eine signifikant stärkere Transmigration der HUVEC in Anwesenheit von SDF-1 $\beta$ . Dabei bewirkten 100ng/ml SDF-1 $\beta$  die stärkste Transmigration ( $1920 \pm 230$  migrierte HUVEC). Bei einer SDF-1 $\beta$  Konzentration von 500ng/ml migrierten  $1750 \pm 1150$  HUVEC. Eine Konzentration von 1000ng/ml SDF-1 $\beta$  konnte die Migration nicht weiter stimulieren. Bei den

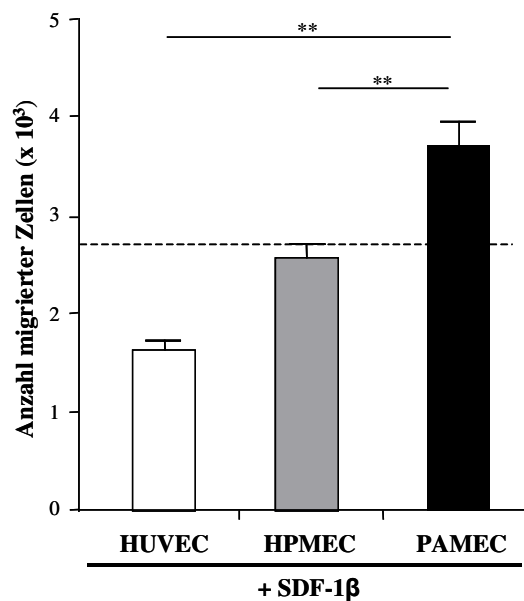


## ERGEBNISSE

nicht stimulierten HUVEC migrierten  $1183 \pm 81$  Zellen. Bei einer SDF-1 $\beta$  Konzentration von 100ng/ml ergab sich demnach eine Zunahme der Transmigration von HUVEC von 62% im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Bei einer SDF-1 $\beta$  Konzentration von 500ng/ml nahm die Migration um 48% zu (Abbildung 4.22). Ein Stimulus von 100ng/ml SDF-1 $\beta$  zeigte sich demnach als die optimalste SDF-1 $\beta$  Konzentration und wurde für alle weiteren Transmigrationen verwendet.

### 4.5.4 Vergleichende Untersuchungen der SDF-1 $\beta$ -stimulierten Transmigrationskapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Nachdem die optimalsten Bedingungen für die Transmigration bestimmt wurden (siehe Abschnitt 4.5.1 und 4.5.3), konnten unter diesen Voraussetzungen weitere Transmigrationstests durchgeführt werden. Zunächst sollte die chemotaktische Transmigrationskapazität von HUVEC bzw. HPMEC und PAMEC verglichen werden. Dafür wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Endothelzellen/100 $\mu$ l verwendet. Als chemoattraktives Molekül wurde SDF-1 $\beta$  (100ng/ml) verwendet. Die Anzahl transmigrierter Zellen wurde nach 24h quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.



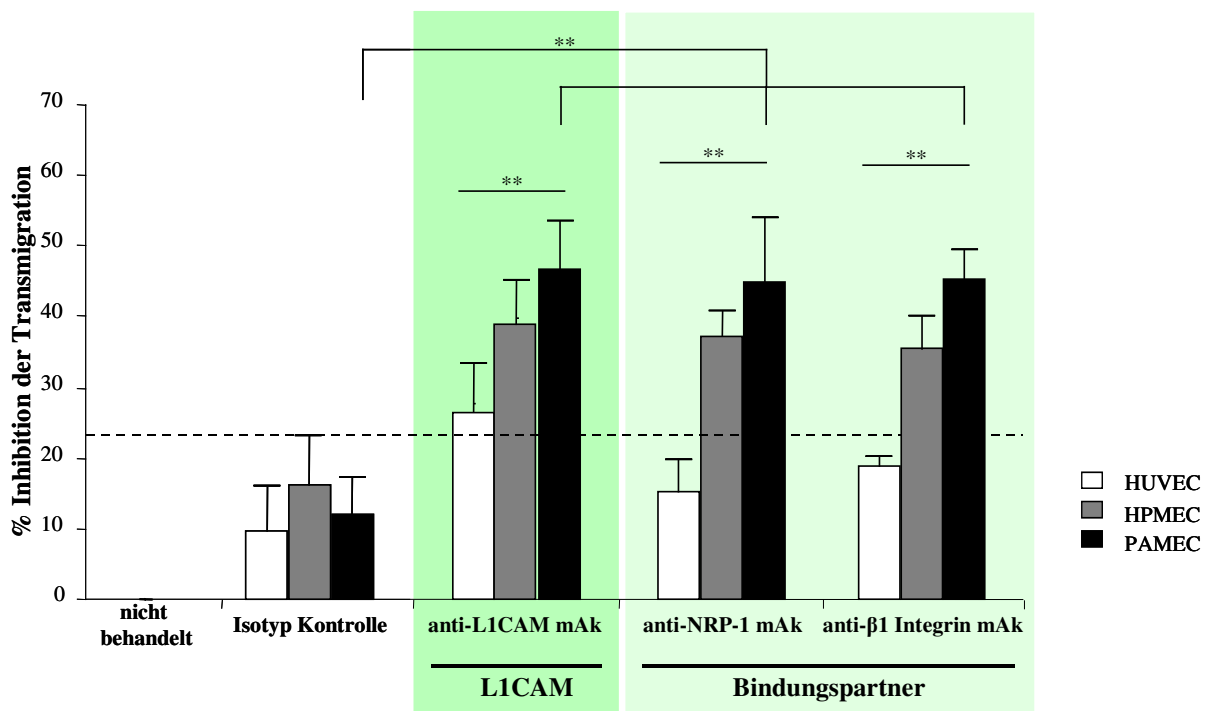
**Abbildung 4.23:** Vergleichende Analyse der chemotaktischen Transmigrationskapazität von Kontroll- (HUVEC bzw. HPMEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro*. Die PAMEC zeigen eine signifikant stärkere chemotaktische Transmigrationskapazität. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

## ERGEBNISSE

Die Ergebnisse zeigten die stärkste SDF-1 $\beta$ -vermittelte Migration bei den PAMEC im Vergleich zu HPMEC und HUVEC. Es migrierten  $3710 \pm 240$  PAMEC. Im Vergleich dazu migrierten  $2578 \pm 125$  HPMEC bzw.  $1621 \pm 110$  HUVEC (Abbildung 4.23). Daraus ergibt sich ein Anstieg der Transmigrationsrate der PAMEC um 44% im Vergleich zu den HPMEC und um 129% im Vergleich zu den HUVEC.

### 4.5.5 Analyse der Inhibition der Transmigration von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Im folgenden sollte untersucht werden, ob L1CAM und die L1CAM-Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin für die Transmigrationskapazität von Endothelzellen *in vitro* funktionell notwendig sind. Für die Transmigration wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Endothelzellen/100 $\mu$ l eingesetzt, die zuvor für 24h mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden. Als chemoattraktives Molekül wurde SDF-1 $\beta$  (100ng/ml) verwendet.



**Abbildung 4.24:** Analyse der funktionellen Rolle von L1CAM und der L1CAM-Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin bei der chemotaktischen Transmigration von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*. Um die Funktion der zu untersuchenden Proteine in der Transmigration zu inhibieren wurden jeweils spezifische Antikörper gegen L1CAM und dessen Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin verwendet. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

Für die Inhibition der Transmigration wurden spezifische mAk gegen L1CAM (mAk L1-11A, 10 $\mu$ g/ml), NRP-1 (mAk AD5-17F6, 5 $\mu$ g/ml) bzw.  $\beta_1$  Integrin (mAk MAR4, 10 $\mu$ g/ml) verwendet. Als Spezifitätskontrolle wurde 10 $\mu$ g/ml IgG<sub>1</sub> Isotyp (Maus) verwendet. Die Anzahl transmigrierter Zellen wurde nach 24h computergestützt quantifiziert.

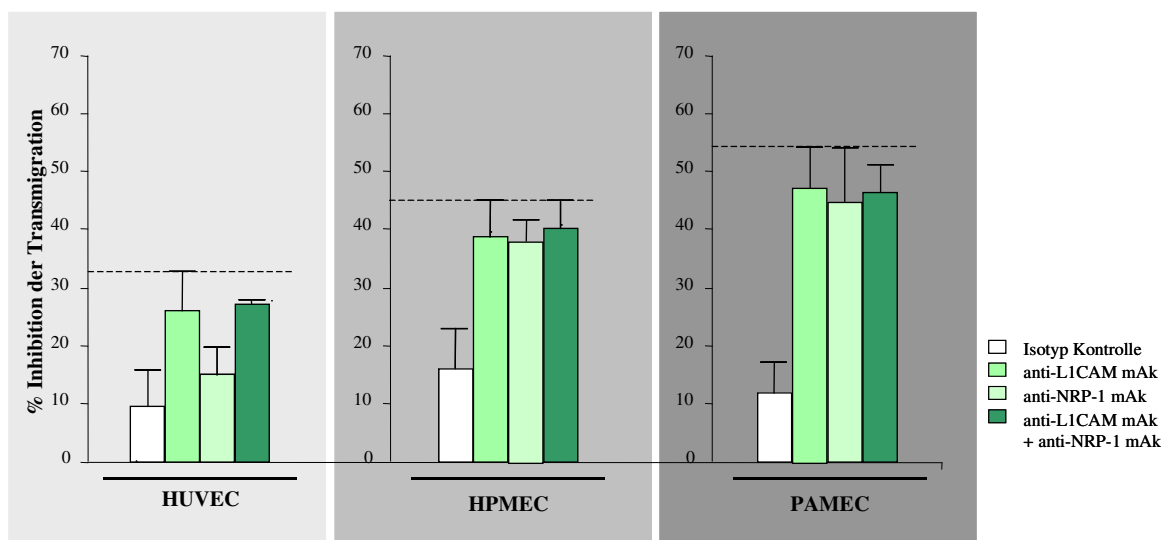
Die Transmigration der Kontroll- (HUVEC und HPMEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) war sowohl durch den L1CAM spezifischen mAk, als auch durch die spezifischen mAk gegen die jeweiligen L1CAM-Bindungspartner auf HUVEC, HPMEC und PAMEC inhibierbar. Dabei zeigte sich bei den PAMEC die stärkste Inhibition mit anti-L1CAM mAk (48,1%  $\pm$  5,5%) im Vergleich zur Isotyp Kontrolle (12,1%  $\pm$  6,4%) und zu den Kontrollendothelzellen (HUVEC 27,5%  $\pm$  5,9%; HPMEC 38,4%  $\pm$  7,3%). Ebenso zeigten die NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin spezifischen mAk auf den PAMEC eine signifikant stärkere Inhibition im Vergleich zur Isotyp Kontrolle und zu den Kontrollendothelzellen (Abbildung 4.24).

#### 4.5.6 Analyse der additiven Inhibition der Transmigration durch L1CAM und NRP-1 spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es während der Transmigration von Endothelzellen zu einer möglichen L1CAM-NRP-1 Bindungspartner-Interaktion kommt. Eine nicht-additive Inhibition der Transmigration durch Antikörper gegen L1CAM und NRP-1 würde einen Hinweis für eine mögliche Interaktion der beiden Proteine sein. Die Transmigration wurde mit den zuvor festgelegten Parametern durchgeführt (siehe Abschnitt 4.5.1 und 4.5.3). Für die Inhibition der Transmigration wurden spezifische Antikörper gegen L1CAM (mAkL1-11A, 10 $\mu$ g/ml) und NRP-1 (mAk AD5-17F6, 5 $\mu$ g/ml) sowohl einzeln als auch in Kombination (je 5 $\mu$ g/ml) eingesetzt. Als Spezifitätskontrolle wurden 10 $\mu$ g/ml IgG<sub>1</sub> Isotyp (Maus) verwendet. Die Anzahl transmigrierter Zellen wurde nach 24h quantifiziert.

Zur besseren Übersicht sind die inhibitorischen Einzeleffekte der L1CAM und NRP-1 spezifischen mAk (siehe Abschnitt 4.5.5) erneut dargestellt. Die additive Verwendung der L1CAM und NRP-1 spezifischen mAk zeigte sowohl bei den Kontroll- (HUVEC und HPMEC) als auch bei den Tumorendothelzellen (PAMEC) keine signifikante Erhöhung der Inhibition der Transmigration im Vergleich zu den Inhibitionswerten der Einzelinkubationen (Abbildung 4.25). Die Daten belegen eine nicht-additive Inhibition der Transmigration durch Antikörper gegen L1CAM und NRP-1 sowohl bei den HUVEC und HPMEC als auch bei den PAMEC.

## ERGEBNISSE



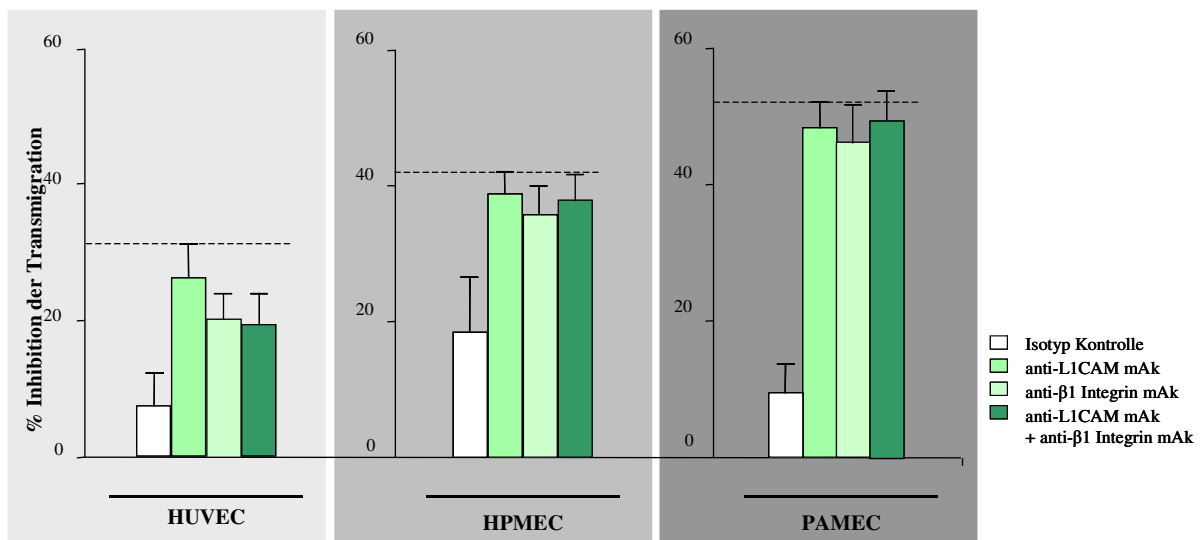
**Abbildung 4.25:** Messung der additiven Inhibition der chemotaktischen Transmigration durch L1CAM und NRP-1 spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*. Untersucht werden sollte eine mögliche L1CAM-NRP-1 Bindungspartner-Interaktion. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

### 4.5.7 Analyse der additiven Inhibition der Transmigration durch L1CAM und $\beta_1$ Integrin spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Es sollte untersucht werden, ob es während der Transmigration von Endothelzellen zu einer möglichen L1CAM- $\beta_1$  Integrin Bindung kommt. Die Transmigration wurde mit den zuvor festgelegten Parametern durchgeführt (siehe Abschnitt 4.5.1 und 4.5.3). Für die Inhibition der Transmigration wurden spezifische mAk gegen L1CAM (mAk L1-11A, 10 $\mu$ g/ml) und  $\beta_1$  Integrin (mAk MAR4, 10 $\mu$ g/ml) sowohl einzeln als auch in Kombination (je 5 $\mu$ g/ml) eingesetzt. Als Spezifitätskontrolle wurden 10 $\mu$ g/ml IgG<sub>1</sub> Isotyp (Maus) verwendet. Die Anzahl transmigrierter Zellen wurde nach 24h computergestützt quantifiziert.

Es wurden erneut die inhibitorischen Einzeleffekte der L1CAM und  $\beta_1$  Integrin spezifischen mAk (siehe Abschnitt 4.5.5) zur besseren Übersicht dargestellt. Die additive Verwendung der L1CAM und  $\beta_1$  Integrin spezifischen mAk zeigte sowohl bei den HUVEC und HPMEC als auch bei den PAMEC keine signifikante Erhöhung der Inhibition der Transmigration im Vergleich zu den Inhibitionswerten der Einzelinkubationen (Abbildung 4.26). Die Daten belegen ebenfalls eine nicht-additive Inhibition der Transmigration durch Antikörper gegen L1CAM und  $\beta_1$  Integrin sowohl bei den Kontroll- als auch bei Tumorendothelzellen.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.26:** Messung der additiven Inhibition der chemotaktischen Transmigration durch L1CAM und  $\beta_1$  Integrin spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*. Untersucht werden sollte eine mögliche L1CAM- $\beta_1$  Integrin Bindung. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

### 4.6 Die angiogenetische Kapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Der Prozess der Angiogenese besteht aus mehreren Phasen. Dabei stellt neben der Proliferation und gerichteten Migration der Endothelzellen das Auswachsen tubulärer Fortsätze ein weiteres wichtiges Ereignis der Bildung von Blutgefäßen dar.

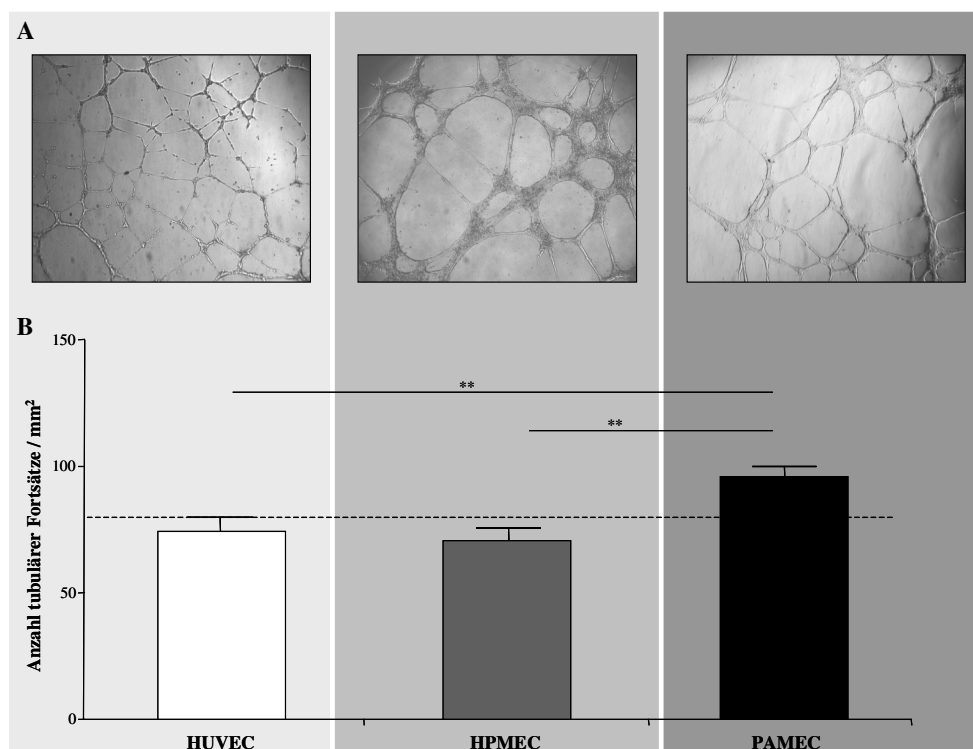
Es sollte die Kapazität von Endothelzellen zur Angiogenese-Induktion mit Hilfe eines *in vitro* Angiogenesetests analysiert werden. Dazu wurden die Endothelzellen auf Matrigel (Imitation der extrazellulären Matrix) ausgesät und nach 24h die Anzahl der ausgebildeten tubulären Fortsätze pro mm<sup>2</sup> quantifiziert. Die Messungen wurden dreimal unabhängig voneinander jeweils als Triplikate ausgewertet.

#### 4.6.1 Messung der Angiogenesekapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Die Quantifizierung der tubulären Fortsätze zeigte eine signifikante Erhöhung der Angiogenesekapazität der PAMEC im Vergleich zu den HUVEC bzw. HPMEC. Bei den HUVEC bildeten sich nach 24h Inkubation der Zellen auf Matrigel  $74 \pm 5$  tubuläre Fortsätze pro

## ERGEBNISSE

mm<sup>2</sup> aus. Bei den HPMEC wurden  $69,3 \pm 4,6$  tubuläre Fortsätze pro mm<sup>2</sup> gemessen. Im Vergleich dazu hatten sich bei den PAMEC  $94,3 \pm 3,8$  tubuläre Fortsätze pro mm<sup>2</sup> gebildet. Daraus ergibt sich eine Erhöhung der Angiogenesekapazität der PAMEC um 30% im Vergleich zu den HUVEC bzw. um 40% im Vergleich zu den HPMEC (Abbildung 4.27 A und B). Die Daten belegen ein deutlich erhöhtes Potential der PAMEC zur Neoangiogenese.



**Abbildung 4.27:** Die Kapazität von Tumor- und Kontrollendothelzellen zur Angiogenese-Induktion *in vitro*. Originalvergrößerung 50x. **A** Je 20000 Endothelzellen wurden auf Matrigel ausgesät und 24h inkubiert. **B** Nach 24h wurde die Anzahl der ausgebildeten tubulären Fortsätze pro mm<sup>2</sup> quantifiziert. Die PAMEC zeigten ein deutlich erhöhtes Potential zur Neoangiogenese. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

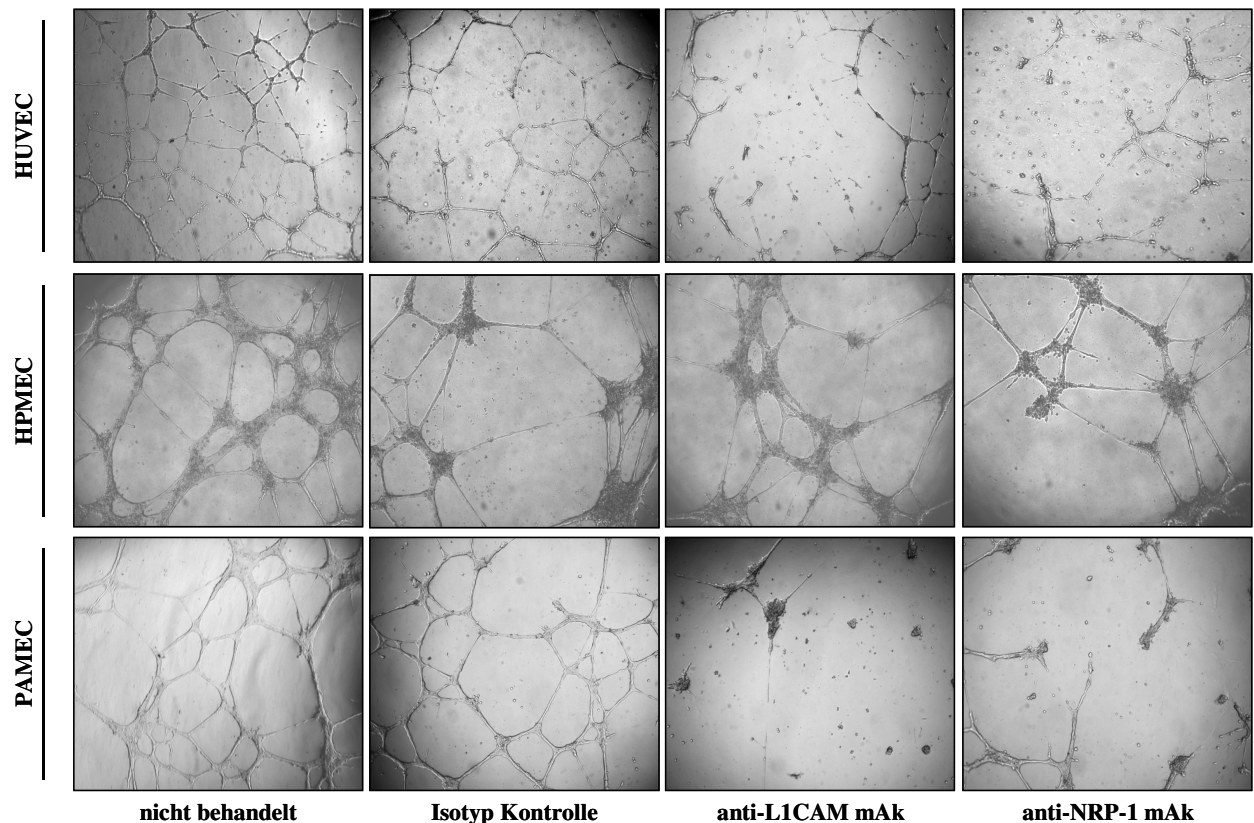
### 4.6.2 Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Im folgenden sollte untersucht werden, ob L1CAM und die L1CAM-Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin für die Bildung tubulärer Fortsätze von Endothelzellen *in vitro* funktionell notwendig sind. Für die Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze wurden die zuvor genannten spezifischen mAk gegen L1CAM, NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin verwendet (siehe Abschnitt 4.5.5). Als Spezifitätskontrolle wurden 10 $\mu$ g/ml IgG<sub>1</sub> Isotyp (Maus) verwendet. Die Anzahl gebildeter

## ERGEBNISSE

tubulärer Fortsätze wurde nach 24h quantifiziert.

Die Bildung tubulärer Fortsätze der Kontroll- (HUVEC und HPMEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) wurde sowohl durch den L1CAM spezifischen mAk als auch durch die spezifischen mAk gegen die jeweiligen L1CAM-Bindungspartner auf HUVEC, HPMEC und PAMEC inhibiert.

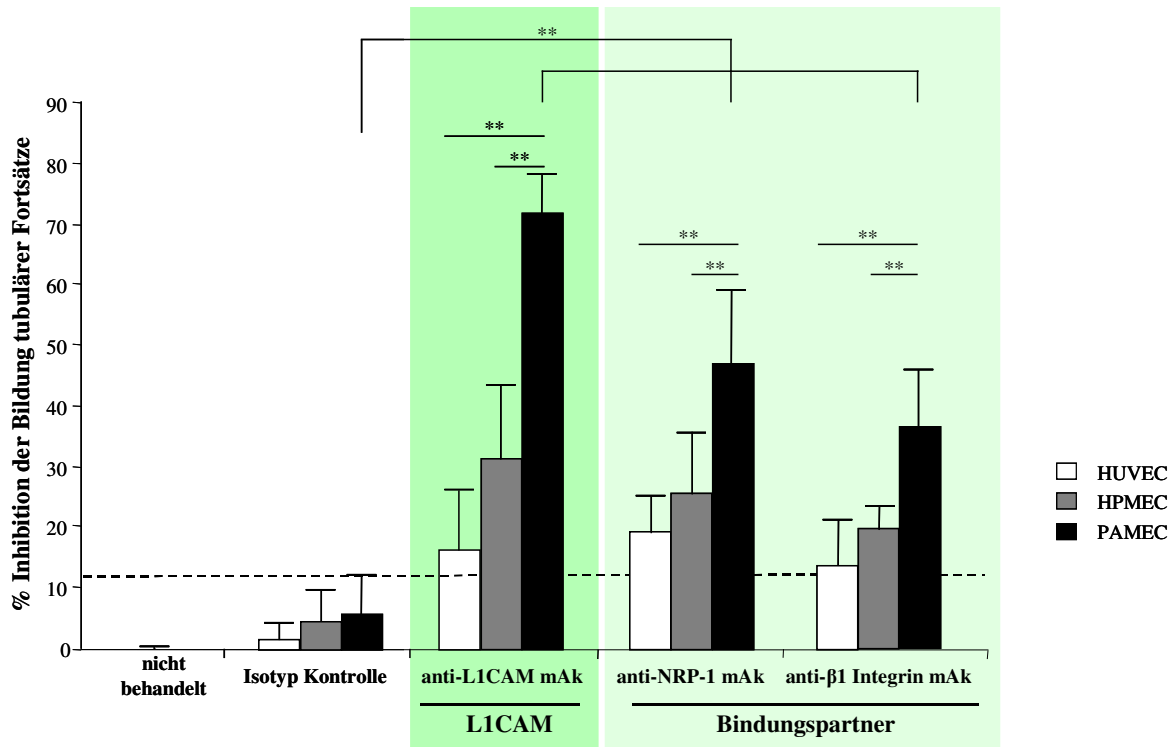


**Abbildung 4.28:** Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze von HUVEC und HPMEC sowie PAMEC *in vitro* mittels spezifischen mAk gegen L1CAM und NRP-1. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der inhibierten Bildung tubulärer Fortsätze durch anti-L1CAM und anti-NRP-1 spezifische mAk *in vitro*. Originalvergrößerung 50x.

Dabei zeigte sich bei den PAMEC eine signifikant stärkere Inhibition mit anti-L1CAM mAk ( $71,7\% \pm 6,3\%$ ) im Vergleich zur Isotyp Kontrolle ( $5,2\% \pm 6,0\%$ ) und zu den Kontrollendothelzellen (HUVEC  $17,5\% \pm 8\%$ ; HPMEC  $32,4\% \pm 11,2\%$ ). Ebenso zeigten die NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin spezifischen mAk bei den PAMEC eine signifikant stärkere Inhibition (NRP-1  $46,7\% \pm 12,3\%$ ;  $\beta_1$  Integrin  $36,8\% \pm 10\%$ ) im Vergleich zur Isotyp Kontrolle ( $5,2\% \pm 6\%$ ) und zu den Kontrollendothelzellen (HUVEC: NRP-1  $18,8\% \pm 6\%$ ;  $\beta_1$  Integrin  $14,3\% \pm$

## ERGEBNISSE

6,8%; HPMEC: NRP-1 25,3% ± 11,7%;  $\beta_1$  Integrin 19,8% ± 2,9%) (Abbildung 4.28 und 4.29). Der L1CAM spezifische mAk bewirkte die stärkste Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze sowohl auf den PAMEC als auch auf den HUVEC bzw. HPMEC. Der  $\beta_1$  Integrin spezifische mAk zeigte die schwächste Inhibition.



**Abbildung 4.29:** Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze von UVEC und HPMEC sowie PAMEC *in vitro* mittels spezifischen mAk gegen L1CAM und die L1CAM-Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin. Gezeigt wird die Quantifizierung der inhibierten Bildung tubulärer Fortsätze nach Zugabe spezifischer mAk gegen L1CAM und die jeweiligen L1CAM-Bindungspartner. Die PAMEC zeigten eine signifikant erhöhte Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze durch Blockade von L1CAM und dessen Bindungspartner. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

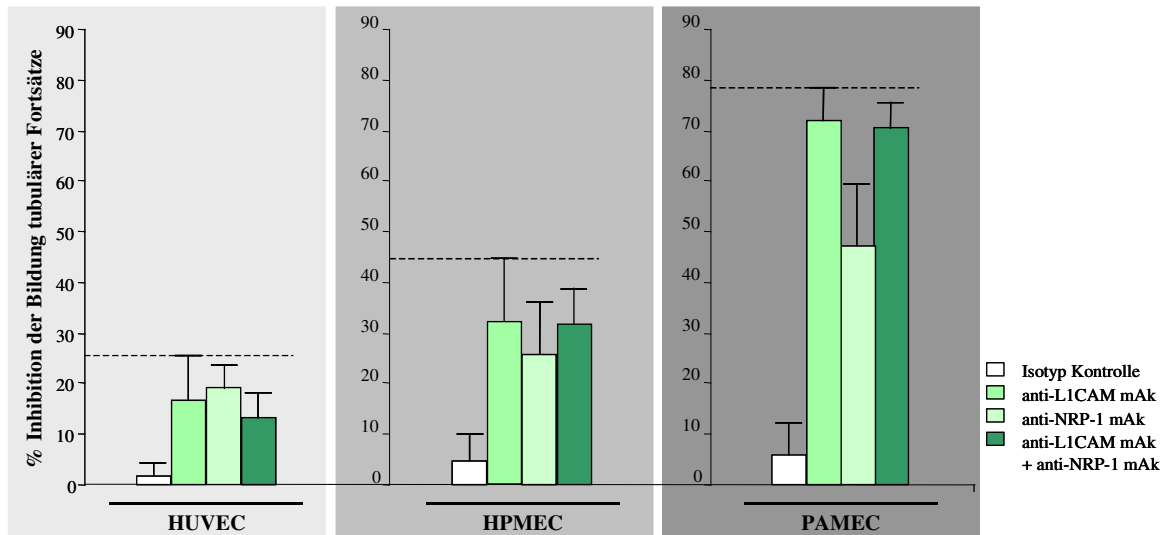
### 4.6.3 Analyse der additiven Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze durch L1CAM und NRP-1 spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es während der Bildung tubulärer Fortsätze von Endothelzellen zu einer möglichen L1CAM-NRP-1 Bindungspartner-Interaktion kommt. Eine nicht-additive Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze durch Antikörper gegen L1CAM und NRP-1 würde einen Hinweis für eine mögliche Interaktion der beiden Proteine darstellen. Für die Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze wurden spezifische mAk gegen L1CAM (mAk L1-



## ERGEBNISSE

11A, 10µg/ml) und NRP-1 (mAk AD5-17F6, 5µg/ml) sowohl einzeln als auch in Kombination (je 5µg/ml) eingesetzt. Als Spezifitätskontrolle wurden 10µg/ml IgG<sub>1</sub> Isotyp (Maus) verwendet. Die Anzahl tubulärer Fortsätze wurde nach 24h quantifiziert.



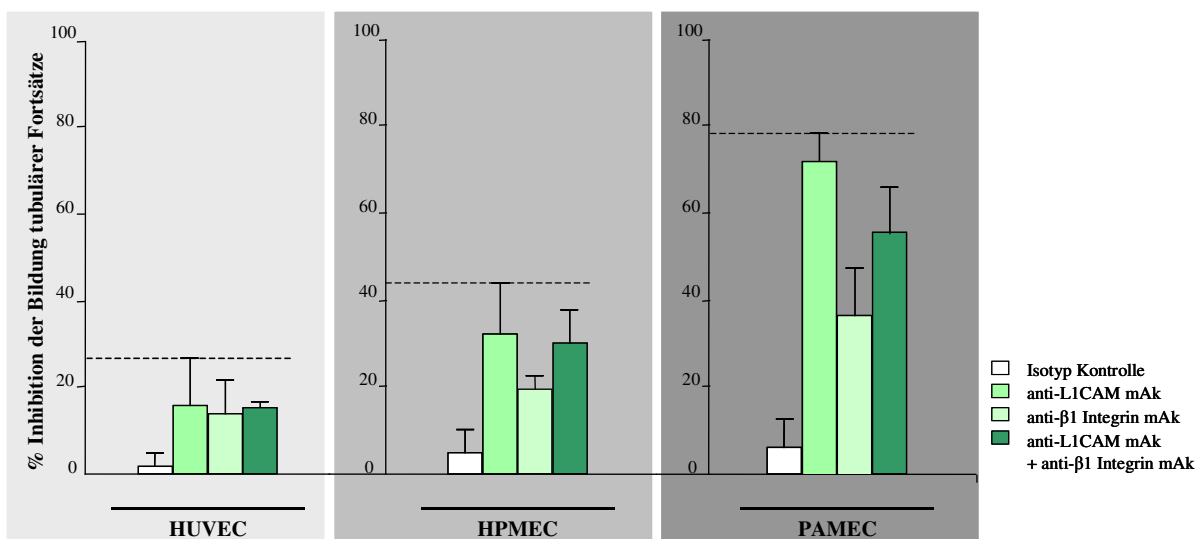
**Abbildung 4.30:** Messung der additiven Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze durch L1CAM und NRP-1 spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*. Untersucht werden sollte eine mögliche L1CAM-NRP-1 Bindungspartner-Interaktion. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

Zur besseren Übersicht sind die inhibitorischen Einzeleffekte der L1CAM und NRP-1 spezifischen mAk (siehe Abschnitt 4.6.2) erneut dargestellt. Die additive Verwendung der L1CAM und NRP-1 spezifischen mAk zeigte sowohl bei den Kontroll- (HUVEC und HPMEC) als auch bei den Tumorendothelzellen (PAMEC) keine signifikante Erhöhung der Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze im Vergleich zum Inhibitionsgrad der Einzelinkubationen (Abbildung 4.30). Die Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze zeigte, wie zuvor die additive Inhibition der Transmigration, eine nicht-additive Inhibition durch spezifischer mAk gegen L1CAM und NRP-1 sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Tumorendothelzellen.

4.6.4 Analyse der additiven Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze durch L1CAM und  $\beta_1$  Integrin spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob es während der Bildung tubulärer Fortsätze von Endothelzellen zu einer möglichen L1CAM- $\beta_1$  Integrin Bindungspartner-Interaktion kommt. Für die Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze wurden spezifische mAk gegen L1CAM (mAk L1-11A, 10 $\mu$ g/ml) und  $\beta_1$  Integrin (mAk MAR4, 10 $\mu$ g/ml) sowohl einzeln als auch in Kombination (je 5 $\mu$ g/ml) eingesetzt. Als Spezifitätskontrolle wurden 10 $\mu$ g/ml IgG<sub>1</sub> Isotyp (Maus) verwendet. Die Anzahl tubulärer Fortsätze wurde nach 24h quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.

Zur besseren Übersicht sind die inhibitorischen Einzeleffekte der L1CAM und  $\beta_1$  Integrin spezifischen mAk (siehe Abschnitt 4.6.2) erneut dargestellt. Die additive Verwendung der L1CAM und  $\beta_1$  Integrin spezifischen mAk zeigte sowohl bei den HUVEC und HPMEC als auch bei den PAMEC keine signifikante Erhöhung der Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze im Vergleich zum Inhibitionsgrad der Einzelinkubationen (Abbildung 4.31). Die Ergebnisse belegen, wie zuvor die additive Inhibition der Transmigration, eine nicht-additive Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze durch Kombination L1CAM und  $\beta_1$  Integrin spezifischer mAk sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Tumorendothelzellen.

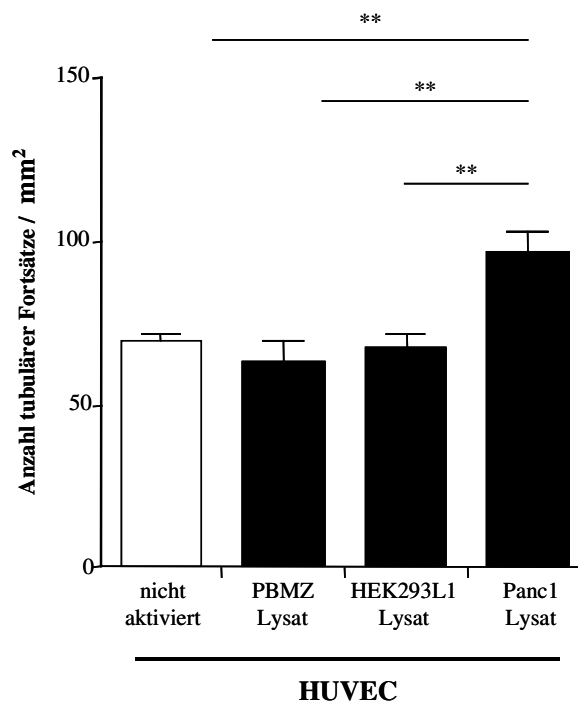


**Abbildung 4.31:** Messung der additiven Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze durch L1CAM und  $\beta_1$  Integrin spezifische mAk von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*. Untersucht werden sollte eine mögliche L1CAM- $\beta_1$  Integrin Bindungspartner-Interaktion. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

## ERGEBNISSE

### 4.6.5 Analyse der Aktivierung der Bildung tubulärer Fortsätze von Kontrollendothelzellen durch Panc1 Tumorzelllinien-Lysat *in vitro*

Wie in Abschnitt 4.2.3 dargestellt wurde, konnte die erhöhte konstitutive L1CAM Expression der PAMEC (siehe Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2) auf einen direkten Einfluss des Tumormikromilieus zurückgeführt werden. Dies konnte durch Inkubation sowohl mit allogenen Pankreas Tumorgewebe-Lysat (siehe Abschnitt 4.2.3) als auch mit einem Panc1 Tumorzelllinien-Lysat imitiert werden (siehe Abschnitt 4.2.4). Es sollte nun analysiert werden, ob die Imitation des Tumormikromilieus durch das Panc1 Tumorzelllinien-Lysat auch einen direkten Einfluss auf die Angiogenesekapazität der Kontrollendothelzellen *in vitro* hat. Dafür wurden HUVEC mit je 50µg/ml Kontroll-Lysaten (PBMZ- und HEK293L1-Lysate) und Tumorzelllinien-Lysat (Panc1 Zell-Lysat) für 72h inkubiert. Anschließend wurden je 20000 Zellen auf Matrigel ausgesät und nach 24h die Anzahl tubulärer Fortsätze pro mm<sup>2</sup> quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.



**Abbildung 4.32:** HUVEC wurden mit PBMZ-, HEK293L1- oder Panc1 Tumorzelllinien-Lysat behandelt (50µg/ml; 3d). Je 20000 Endothelzellen wurden dann auf Matrigel ausgesät und nach 24h die Anzahl tubulärer Fortsätze pro mm<sup>2</sup> quantifiziert. Die Inkubation mit Panc1 Tumorzelllinien-Lysat zeigte eine signifikante Erhöhung des Potentials von HUVEC zur Neoangiogenese. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

Abbildung 4.32 zeigt, dass der Einfluss der Kontroll-Lysate auf HUVEC keine Erhöhung der Bildung tubulärer Fortsätze bewirkten. Die Imitation des Tumormikromilieus durch das Panc1 Tumorzelllinien-Lysat bewirkte einen pro-angiogenen Effekt. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Bildung tubulärer Fortsätze von HUVEC unter Einfluss von Panc1 Tumorzelllinien-Lysat um 40% im Vergleich zu nicht aktivierten HUVEC (Abbildung 4.32).

#### 4.6.6 Messung des Einflusses von Panc1 Tumorzelllinien-Lysat auf die Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze von Kontrollendothelzellen *in vitro*

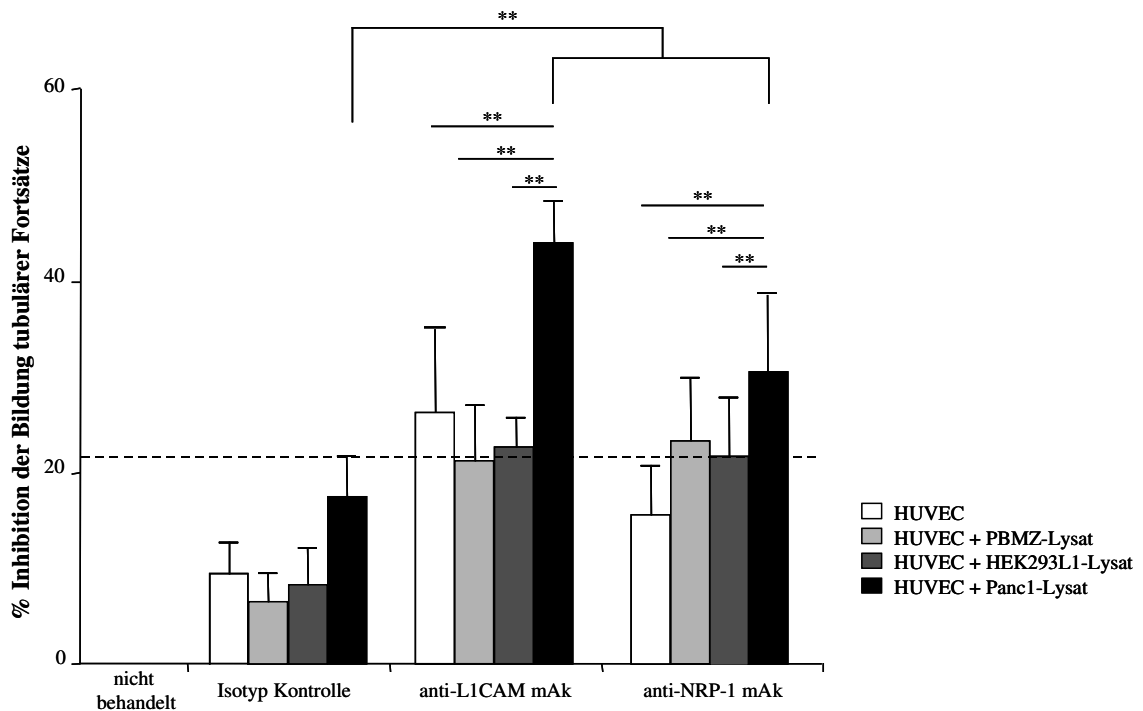
Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss des Tumormikromilieus einen pro-angiogenen Effekt auf HUVEC hatte, der sich in einer verstärkten Bildung tubulärer Fortsätze auswirkte (siehe Abschnitt 4.6.6). Der direkte Einfluss des Tumormikromilieus durch mögliche pro-angiogene Faktoren könnte auch eine verstärkte L1CAM-vermittelte Angiogenesekapazität der Kontrollendothelzellen bewirken, indem es eine Veränderungen der Kontrollendothelzellen in Tumor-ähnliche Endothelzellen bewirken könnte. Dies sollte in dem folgenden Experiment untersucht werden.

Es wurden HUVEC mit 50µg/ml Kontroll-Lysaten (PBMZ- und HEK293L1-Lysate) und Panc1 Tumorzelllinien-Lysat für 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden je 20000 Zellen auf Matrigel ausgesät und nach 24h die Anzahl tubulärer Fortsätze pro mm<sup>2</sup> quantifiziert. Für die Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze wurden den Zellen spezifische mAk gegen L1CAM (mAk L1-11A, 10µg/ml) und NRP-1 (mAk AD5-17F6, 5µg/ml) in den Ansatz zugegeben. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.

Abbildung 4.36 zeigt, dass unter Einfluss der Kontroll-Lysate keine Erhöhung der Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze durch L1CAM und NRP-1 spezifische mAk bewirkt werden konnte. HUVEC, die nur mit anti-L1CAM mAk inkubiert wurden, zeigten 26,5% ± 10,2% Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze. Im Vergleich dazu zeigten HUVEC die mit PBMZ-Lysat vorinkubiert wurden, durch Blockade mit anti-L1CAM mAk 22,1% ± 6,5% Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze. Ebenso zeigten HUVEC, die mit HEK293L1-Lysat vorinkubiert wurden, durch Inkubation mit anti-L1CAM mAk keine Erhöhung der Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze (23% ± 2,9%). Hingegen zeigten HUVEC die mit Panc1 Tumorzelllinien-Lysat vorinkubiert wurden, bei einer Blockade von L1CAM eine signifikante Erhöhung der Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze (43,1% ± 5,9%) im Vergleich zu unbehandelten

## ERGEBNISSE

HUVEC und den Kontroll-Lysat vorinkubierten HUVEC (Abbildung 4.33). Ähnliche Ergebnisse bewirkte eine Blockade von NRP-1. Es zeigte sich bei mit anti-NRP-1 mAk inkubierten HUVEC eine Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze von  $17,2\% \pm 3,7\%$ . Im Vergleich dazu zeigten HUVEC, die mit PBMZ-Lysat vorinkubiert wurden, durch Blockade mit anti-NRP-1 mAk  $22,7\% \pm 7\%$  Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze. Ebenso war auf HUVEC, die mit HEK293L1-Lysat vorinkubiert wurden, durch Inkubation mit anti-NRP-1 mAk keine Erhöhung der Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze ( $23,3\% \pm 5,3\%$ ) feststellbar. Hingegen die mit Panc1 Tumorzelllinien-Lysat vorinkubierten HUVEC, zeigten bei einer Blockade von NRP-1 eine signifikante Erhöhung der Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze ( $32\% \pm 6,4\%$ ) im Vergleich zu unbehandelten HUVEC und Kontroll-Lysat vorinkubierten HUVEC (Abbildung 4.33).

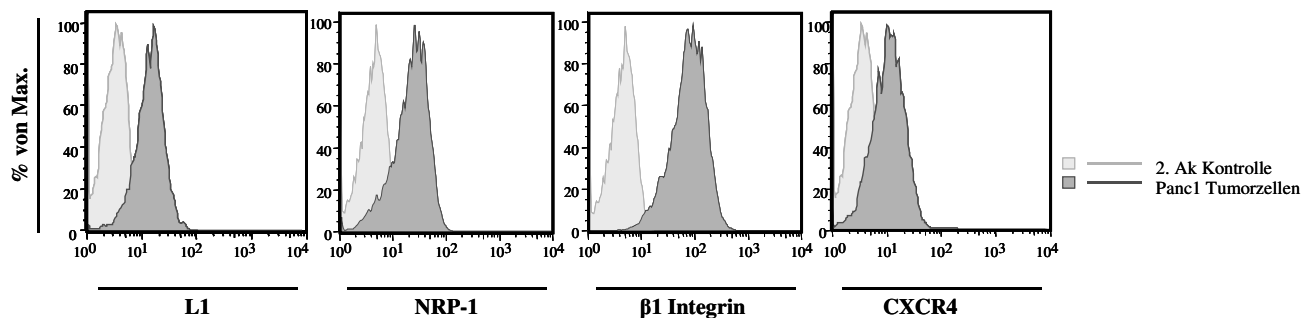


**Abbildung 4.33:** HUVEC wurden mit PBMZ-, HEK293L1- oder Panc1 Tumorzelllinien-Lysat behandelt (50µg/ml; 3d). Je 20000 Endothelzellen wurden dann auf Matrigel ausgesät und nach 24h die Anzahl tubulärer Fortsätze pro  $\text{mm}^2$  quantifiziert. Die Inkubation mit Panc1 Tumorzelllinien-Lysat zeigte eine signifikante Erhöhung der Inhibition der Bildung tubulärer Fortsätze unter Einfluss von anti-L1CAM bzw. anti-NRP-1 mAk. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

4.6.7 Charakterisierung des konstitutiven Expressionsprofils von Panc1 Tumorzellen *in vitro*

Die Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM ist bereits für eine Reihe verschiedener Tumorentitäten beschrieben worden (Boo *et al.*, 2007; Fogel *et al.*, 2003a; Fogel *et al.*, 2003b; Kaifi *et al.*, 2007; Thies *et al.*, 2002). Da in den folgenden Experimenten die Interaktionsfähigkeit der Panc1 Tumorzellen mit Endothelzellen (Mikromilieu) näher untersucht werden sollte, wurde zunächst das konstitutive Expressionsprofil der Panc1 Zellen charakterisiert. Dabei interessierte zum Einen die konstitutive L1CAM Expression und zum Anderen die bisher untersuchten L1CAM-Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin. Da später auch SDF-1 $\beta$  stimulierte transendotheliale Migrationen quantifiziert werden sollten, wurden die Panc1 Tumorzellen zusätzlich auf CXCR4 Expression untersucht. Für diesen Ansatz wurden  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Panc1 Tumorzellen mit den jeweils spezifischen mAk der zu untersuchenden Proteine inkubiert. Um apoptotische und nekrotische Zellen aus der Quantifizierung auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich mit PI gefärbt.

Die durchflusszytometrische Analyse der Panc1 Tumorzellen zeigte eine deutliche konstitutive Expression von L1CAM, NRP-1,  $\beta_1$  Integrin und CXCR4 (Abbildung 4.34).



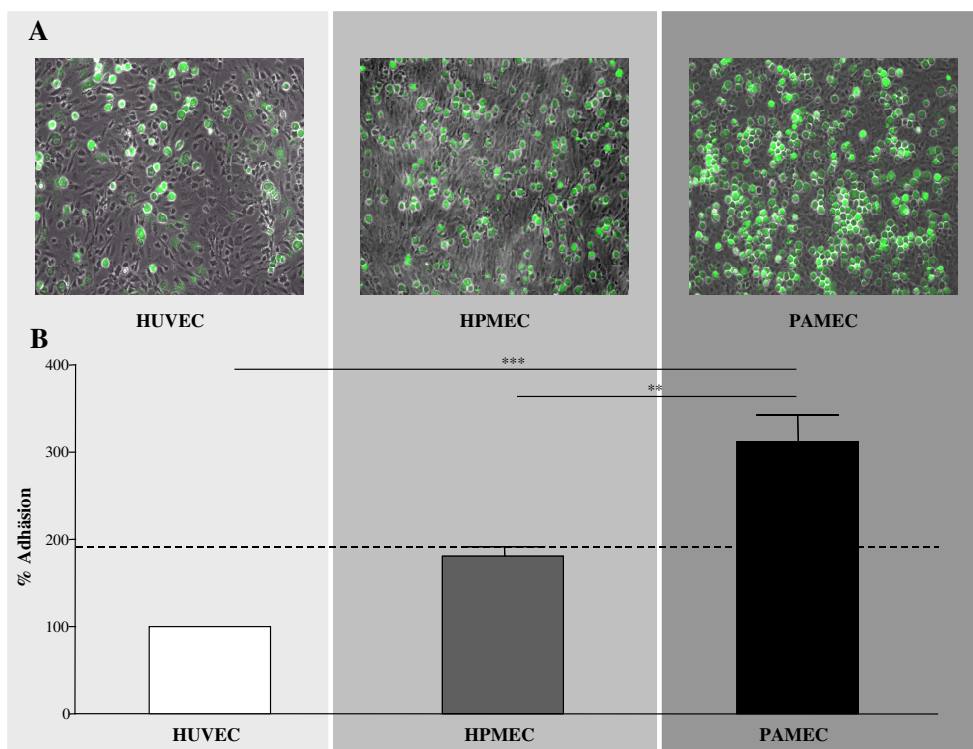
**Abbildung 4.34:** FACS-Analyse der konstitutiven L1CAM Expression sowie der L1CAM-Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin sowie CXCR4 der Panc1 Tumorzellen *in vitro*. Gezeigt wird eine repräsentative Darstellung des Panc1 Expressionsprofils. Es wurden 30.000 Ereignisse am FACSCanto<sup>®</sup> II ausgezählt.

## **4.7 Die Adhäsionskapazität von Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro***

Die Adhäsion von Tumorzellen und Endothelzellen stellt einen wichtigen Teilprozess der Intravasation von Zellen in Blut- oder Lymphgefäße sowie deren Extravasation in anliegende Gewebe dar (Ley *et al.*, 2007). Es sollte analysiert werden, ob L1CAM und die bisher untersuchten L1CAM-Bindungspartner bei der Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen eine funktionelle Rolle spielen. Hierzu wurden 100.000 Endothelzellen Kammerobjektträger ausgesät und zu einem konfluenten Monolayer wachsen gelassen (1-2d). CFSE-markierte Panc1 Tumorzellen wurden dem zuvor mit TNF- $\alpha$  (24h) stimulierten Endothelzell-Monolayer zugegeben und für 60min adhären gelassen. Nicht adhären Zellen wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt und anschließend die Anzahl adhären Zellen quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.

### **4.7.1 Bestimmung der Bindung von Panc1 Tumorzellen an Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro***

Die Ergebnisse des Bindungstests von Panc1 Tumorzellen an Tumor- und Kontrollendothel Monolayer *in vitro* wurden prozentual ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl adhären Panc1 Zellen an HUVEC Monolayer auf 100% gesetzt und die Anzahl adhären Panc1 Zellen an HPMEC und PAMEC Monolayer in Relation dazu berechnet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Panc1 Tumorzellen die stärkste Bindung an die PAMEC eingingen (Abbildung 4.35 A und B).

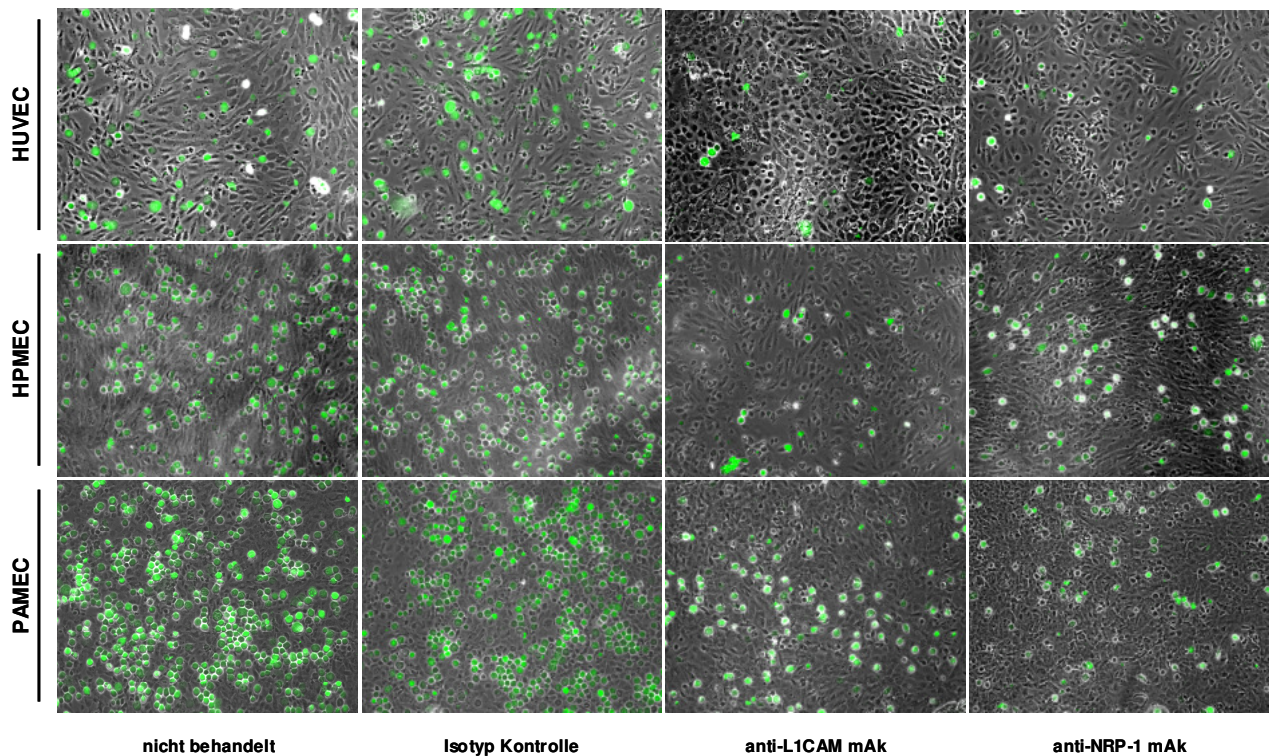


**Abbildung 4.35:** Bindung von Panc1 Tumorzellen an HUVEC und HPMEC sowie PAMEC *in vitro*. Originalvergrößerung 100x. **A** Endothelzellen wurden auf Fibronectin-beschichteten Kammerobjektträgern ausgesät und zu einem konfluenten Monolayer wachsen gelassen (1-2d). Je 100.000 Panc1 Tumorzellen (grün) wurden anschließend für 60min dem Endothelzell-Monolayer zugegeben. **B** Computergestützte Quantifizierung der adhärennten Panc1 Tumorzellen an die Endothelzell-Monolayer von Tumor- und Kontrollendothelzellen. Die PAMEC zeigten ein deutlich erhöhtes Potential zur Adhäsion der Tumorzellen. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

#### 4.7.2 Inhibition der Panc1 Tumorzell-Bindung an Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Es sollte analysiert werden, ob L1CAM und die jeweiligen L1CAM-Bindungspartner sowohl auf Seite der Endothelzellen, als auch auf Seite der Panc1 Tumorzellen für die Adhäsion an Endothelzellen funktionell notwendig sind. Für die Inhibition der Bindung wurden die zuvor genannten spezifischen mAk gegen L1CAM, NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin verwendet (siehe Abschnitt 4.5.5). Die Endothel- bzw. Panc1 Zellen wurde mit den jeweiligen Antikörpern für 4h vorinkubiert. Als Spezifitätskontrolle wurden 10 $\mu$ g/ml IgG<sub>1</sub> Isotyp (Maus) verwendet. Die Anzahl adhärennter Panc1 Zellen wurde nach 60min quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.

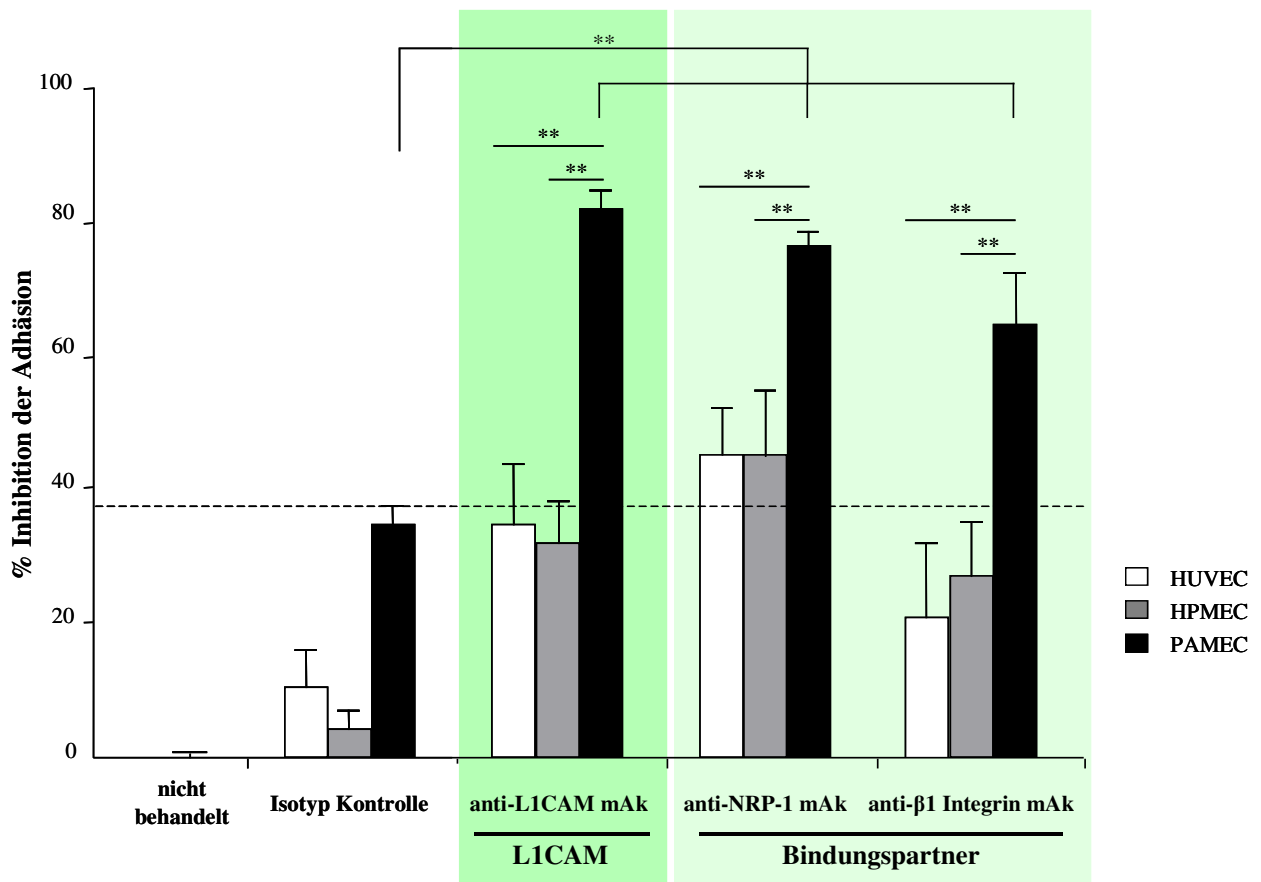




**Abbildung 4.36:** Inhibition der Adhäsion von Panc1 Tumorzellen an Kontroll- (HUVEC und HPMEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro* mittels spezifischer mAk gegen L1CAM und NRP-1. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der inhibierten Adhäsion durch anti-L1CAM und anti-NRP-1 spezifische mAk *in vitro*. Originalvergrößerung 100x. Der Bindungstest wurde bei 37°C für 1h durchgeführt.

Die Adhäsion der Panc1 Zellen an HUVEC und HPMEC sowie PAMEC wurde sowohl durch den L1CAM spezifischen mAk, als auch durch die spezifischen mAk gegen die jeweiligen L1CAM-Bindungspartner auf HUVEC, HPMEC und PAMEC inhibiert. Dabei zeigte sich auf den PAMEC eine signifikant stärkere Inhibition mit anti-L1CAM mAk ( $82,2\% \pm 2,4\%$ ) im Vergleich zur Isotyp Kontrolle ( $34,8\% \pm 2,3\%$ ) und zu den Kontrollendothelzellen (HUVEC  $34,7\% \pm 9\%$ ; HPMEC  $31,8\% \pm 6,4\%$ ). Ebenso zeigten die NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin spezifischen mAk auf den PAMEC eine signifikant stärkere Inhibition im Vergleich zur Isotyp Kontrolle und zu den Kontrollendothelzellen (Abbildung 4.36 und 4.37).

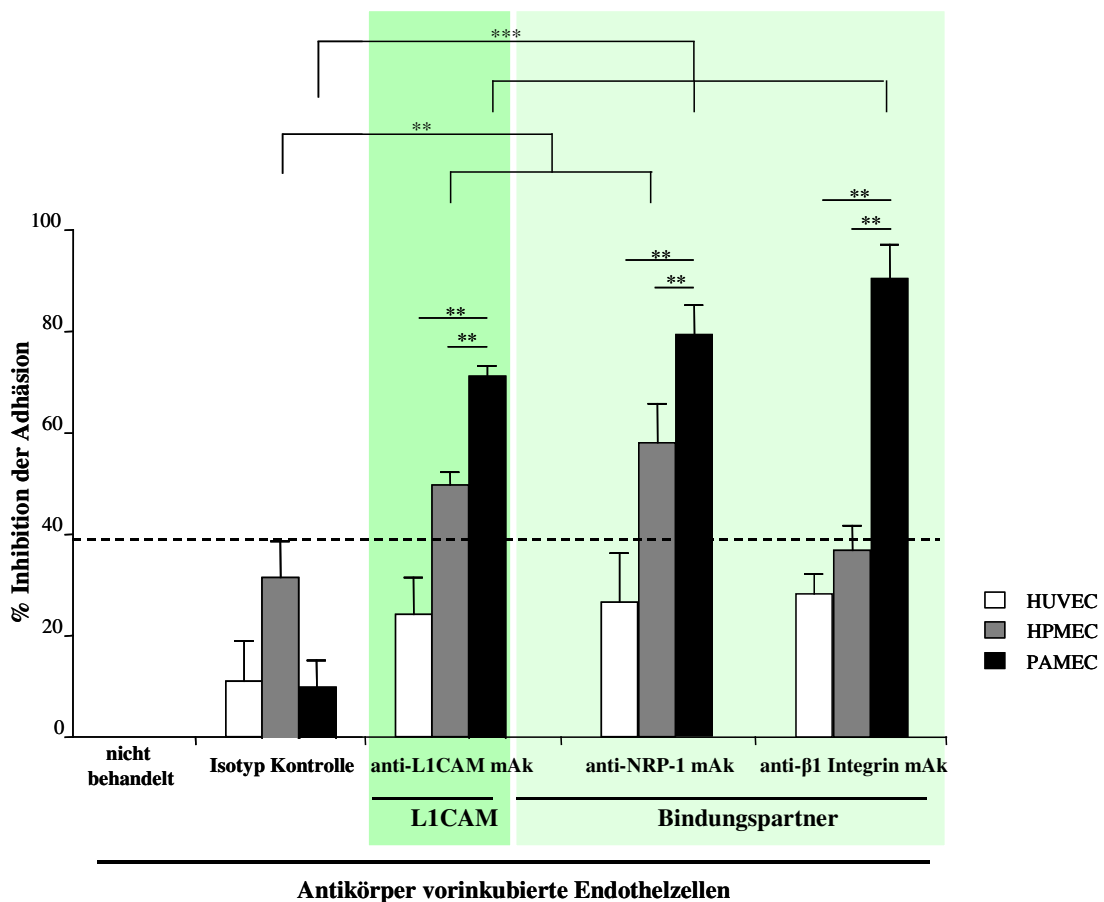
## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.37:** Inhibition der Adhäsion von Panc1 Tumorzellen an HUVEC und HPMEC sowie PAMEC *in vitro* mittels spezifischer mAk gegen L1CAM und die L1CAM-Bindungspartner. Gezeigt wird die Quantifizierung der inhibierten Adhäsion nach Zugabe spezifischer mAk gegen L1CAM und die jeweiligen L1CAM-Bindungspartner. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Inhibition der Panc1 Zell-Adhäsion durch Blockade von L1CAM und dessen jeweilige Bindungspartner an PAMEC. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

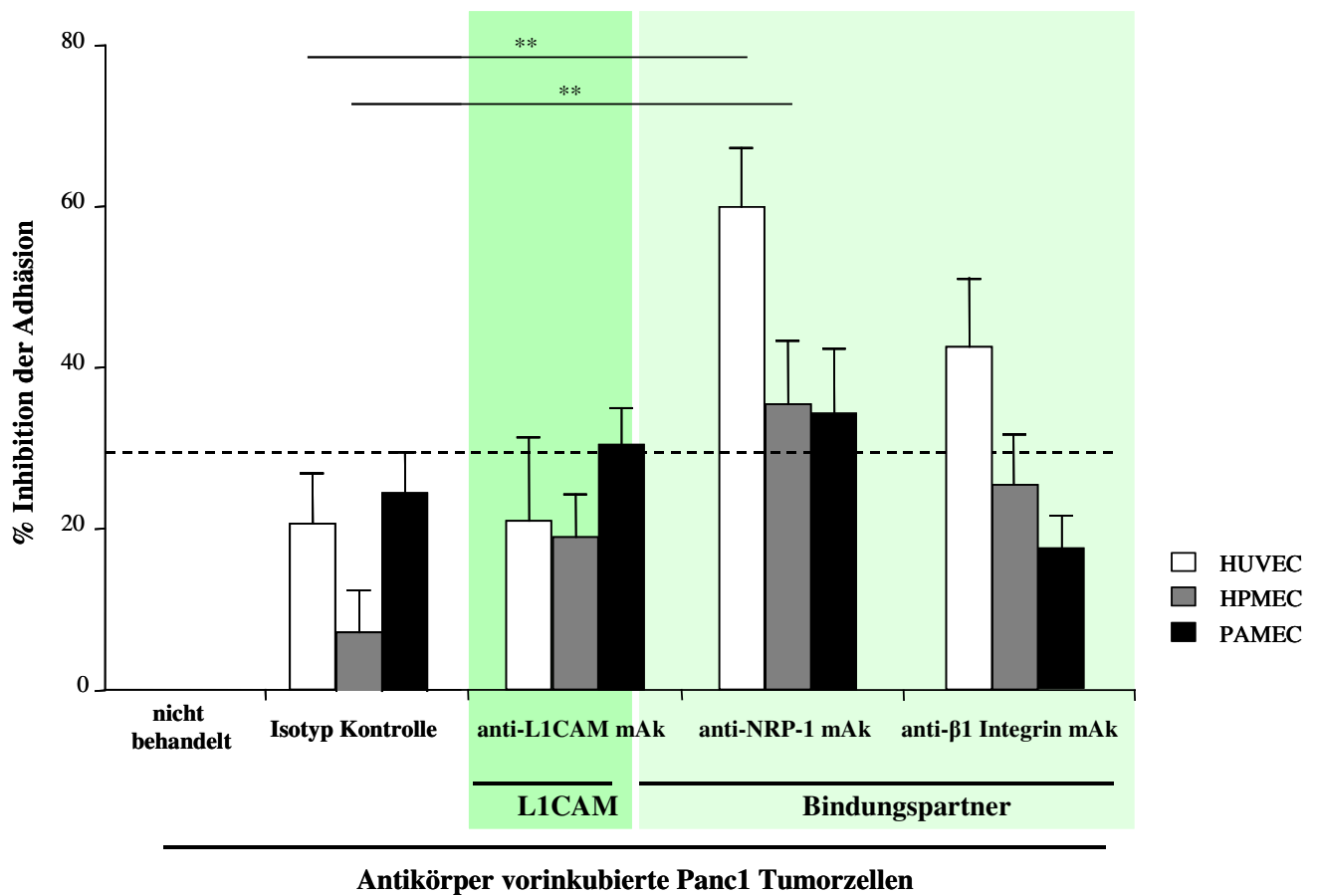
Die Vorinkubation der Endothelzellen mit L1CAM, NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin spezifische mAk zeigte sowohl für L1CAM als auch für die L1CAM-Bindungspartner eine signifikante Erhöhung der Inhibition der Panc1 Zell-Adhäsion an PAMEC-Monolayer im Vergleich zur Inhibition der Panc1 Zell-Adhäsion an HUVEC- bzw. HPMEC-Monolayer und im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Die Ergebnisse der Inhibition auf den HPMEC zeigten sich bei L1CAM und NRP-1 ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zur Isotyp Kontrolle (Abbildung 4.38).

## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.38:** Inhibition der Panc1 Zell-Adhäsion an HUVEC und HPMEC sowie PAMEC *in vitro* mittels spezifischer mAk gegen L1CAM und die L1CAM-Bindungspartner. Die Endothelzellen wurden mit den jeweiligen Antikörpern vorinkubiert. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

Die Vorinkubation der Panc1 Tumorzellen mit L1CAM, NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin spezifische mAk zeigte im Gegensatz zu den Resultaten von Abbildung 4.38 nur für NRP-1 eine signifikante Erhöhung der Inhibition der Panc1 Zell-Adhäsion an HUVEC- bzw. HPMEC-Monolayer im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Des Weiteren zeigte die Vorinkubation der Panc1 Tumorzellen keine signifikante Erhöhung der Inhibition der Panc1 Zell-Adhäsion an PAMEC-Monolayer im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Die Vorinkubation der Panc1 Tumorzellen zeigte ebenfalls keine signifikante Erhöhung der Inhibition der Panc1 Zell-Adhäsion an HUVEC- bzw. HPMEC-Monolayer bei Verwendung spezifischer mAk gegen L1CAM und  $\beta_1$  Integrin im Vergleich zur Isotyp Kontrolle (Abbildung 4.39). Die Ergebnisse belegen eine selektiv erhöhte funktionelle Wirkung von L1CAM und  $\beta_1$  Integrin auf den PAMEC für die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen *in vitro*.



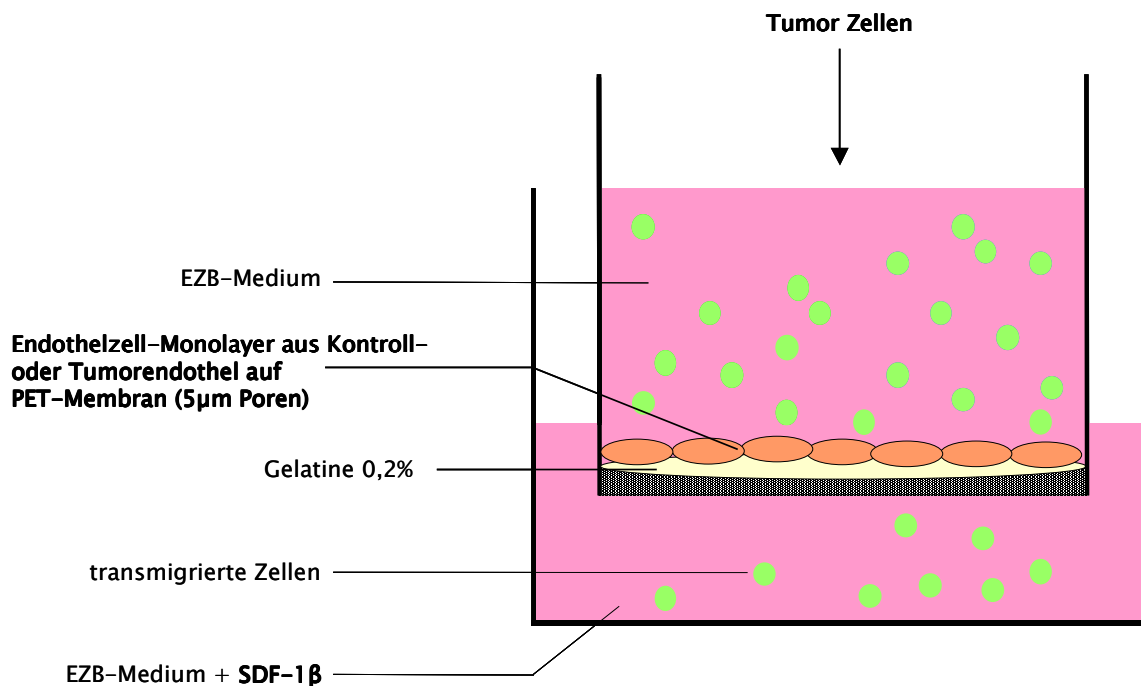
**Abbildung 4.39:** Inhibition der Panc1 Zell-Adhäsion an HUVEC und HPMEC sowie PAMEC *in vitro* mittels spezifischer mAk gegen L1CAM und die L1CAM-Bindungspartner. Die Panc1 Tumorzellen wurden mit den jeweiligen Antikörpern vorinkubiert. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

#### 4.8 Die transendotheliale Migration der Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Ein weiterer wichtiger Teilprozess der Extravasation von Zellen aus Blut- oder Lymphgefäßen in anliegende Gewebe stellt die parazelluläre Migration dar (Ley *et al.*, 2007). Um festzustellen, ob die erhöhte Adhäsion der Panc1 Tumorzellen an Tumorendothelzellen in einer erhöhten transendothelialen Migration resultierte, wurde ein transendothelialer Migrationstests etabliert. Hierzu wurden Kontroll- (HUVEC und HPMEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) auf Gelatine beschichteten Transmigrationsmembranen mit einer Porengröße von 5µm bis zur Konfluenz (2-3d) kultiviert. Nachdem die Konfluenz des Endothelzell-Monolayers überprüft

## ERGEBNISSE

wurde (siehe Abschnitt 4.8.1), konnten die zu testenden Panc1 Tumorzellen in die Transmigrationskammern gegeben werden. Als physiologisch wirksames chemoattraktives Molekül wurde SDF-1 $\beta$  (100ng/ml) in die untere Kammer dem EZBM hinzugefügt (Abbildung 4.40). Die Anzahl transmigrierter Panc1 Zellen wurde nach 24h quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.



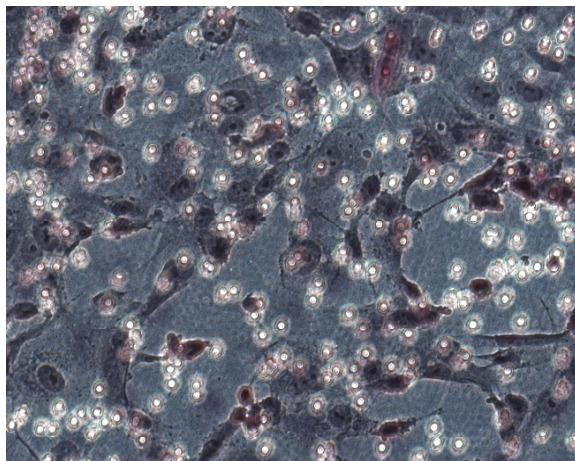
**Abbildung 4.40:** Schematische Darstellung des transendothelialen Migrationstests. Kontroll- (HUVEC und HPMEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) wurden auf den Transmigrationsmembranen (5µm Porengröße) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Als chemoattraktives Molekül wurde SDF-1 $\beta$  (100ng/ml) verwendet. Nach 24h wurde die Anzahl transmigrierter Panc1 Zellen mit computergestützter Auszählung bestimmt.

### 4.8.1 Etablierung eines konfluenten Endothelzell-Monolayers auf einer Transmigrationsmembran

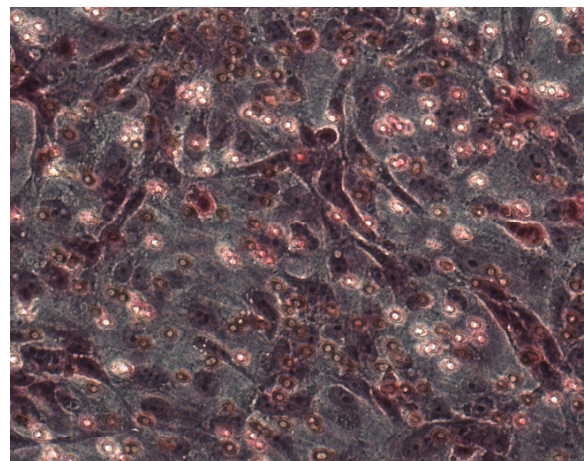
Anhand von HUVEC wurden die Parameter Zeit und Anzahl der Zellen ausgetestet, die für das Erhalten eines konfluenten Endothelzell-Monolayer auf der Transmigrationsmembran von Bedeutung sein könnten. 100.000 HUVEC/100µl bis 300.000 HUVEC/100µl wurden auf Gelatine beschichteten Transmigrationsmembranen für 24h, 48h und 72h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Hämatoxylin- und Eosinlösung gefärbt. Abbildung 4.41 zeigt repräsentative Aufnahmen von 100.000 HUVEC/100µl nach 24h Wachstum auf der Transmigrationsmembran und  $2 \times 10^5$  HUVEC/100µl nach 48h Wachstum auf der

## ERGEBNISSE

Transmigrationsmembran. Die Bilder zeigten, dass 200.000 HUVEC/100 $\mu$ l nach 48h Wachstum auf der Transmigrationsmembran einen konfluenten Endothelzell-Monolayer bildeten. Bei 100.000 HUVEC/100 $\mu$ l, die für 24h auf der Transmigrationsmembran kultiviert wurden, war kein konfluenter Endothelzell-Monolayer zu erkennen. Bei Verwendung einer höheren Zellzahl (300.000 HUVEC/100 $\mu$ l) und längerer Kultivierung (72h) konnte keine Verbesserung erzielt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass 200.000 HUVEC/100 $\mu$ l, die für 48h auf der Transmigrationsmembran kultiviert wurden, die besten Bedingungen für das Erlangen eines konfluenten Endothelzell-Monolayers darstellten. Diese Parameter wurden für alle weiteren transendothelialen Migrationen verwendet.



**1 x 10<sup>5</sup> Zellen/24h**



**2 x 10<sup>5</sup> Zellen/48h**

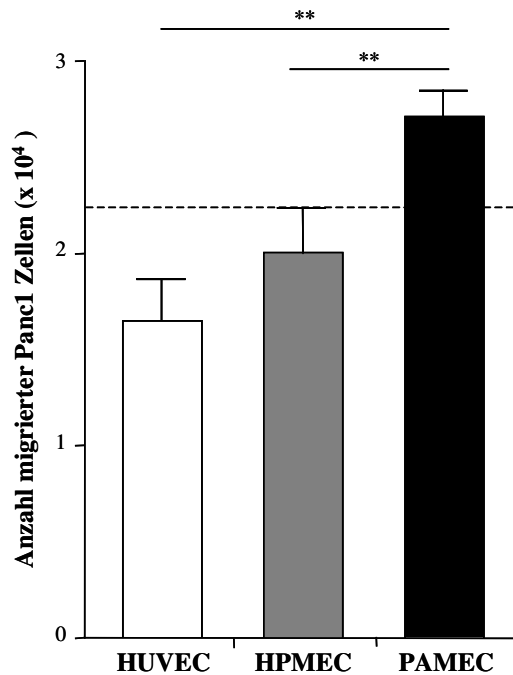
**Abbildung 4.41:** 100.000 HUVEC/100 $\mu$ l bis 300.000 HUVEC/100 $\mu$ l wurden auf Gelatine beschichteten Transmigrationsmembranen (5 $\mu$ m Porengröße) für 24h, 48h und 72h kultiviert und mit einer Hämatoxylin- und Eosinlösung gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der schlechtesten Bedingungen (100.000 HUVEC/100 $\mu$ l, kultiviert für 24h) und der besten Bedingungen (200.000 HUVEC/100 $\mu$ l, kultiviert für 48h) für das Erlangen eines konfluenten Endothelzell-Monolayers. Die Poren der Transmigrationsmembran sind als helle Kreise zu erkennen. Original Vergrößerung 400x.

### 4.8.2 Die transendotheliale Migration von Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Um eine basale transendotheliale Migration zu analysieren, wurden zunächst vergleichende Untersuchungen mit Panc1 Zellen durchgeführt. Als Kontrolle wurde in den Experimenten

## ERGEBNISSE

jeweils bei einem Triplikat auf die Zugabe der Panc1 Zellen verzichtet, um festzustellen wie hoch die basale Transmigrationskapazität der Endothelzellen ist. Diese Werte wurden von den Ergebnissen der Panc1 Migration jeweils abgezogen. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.

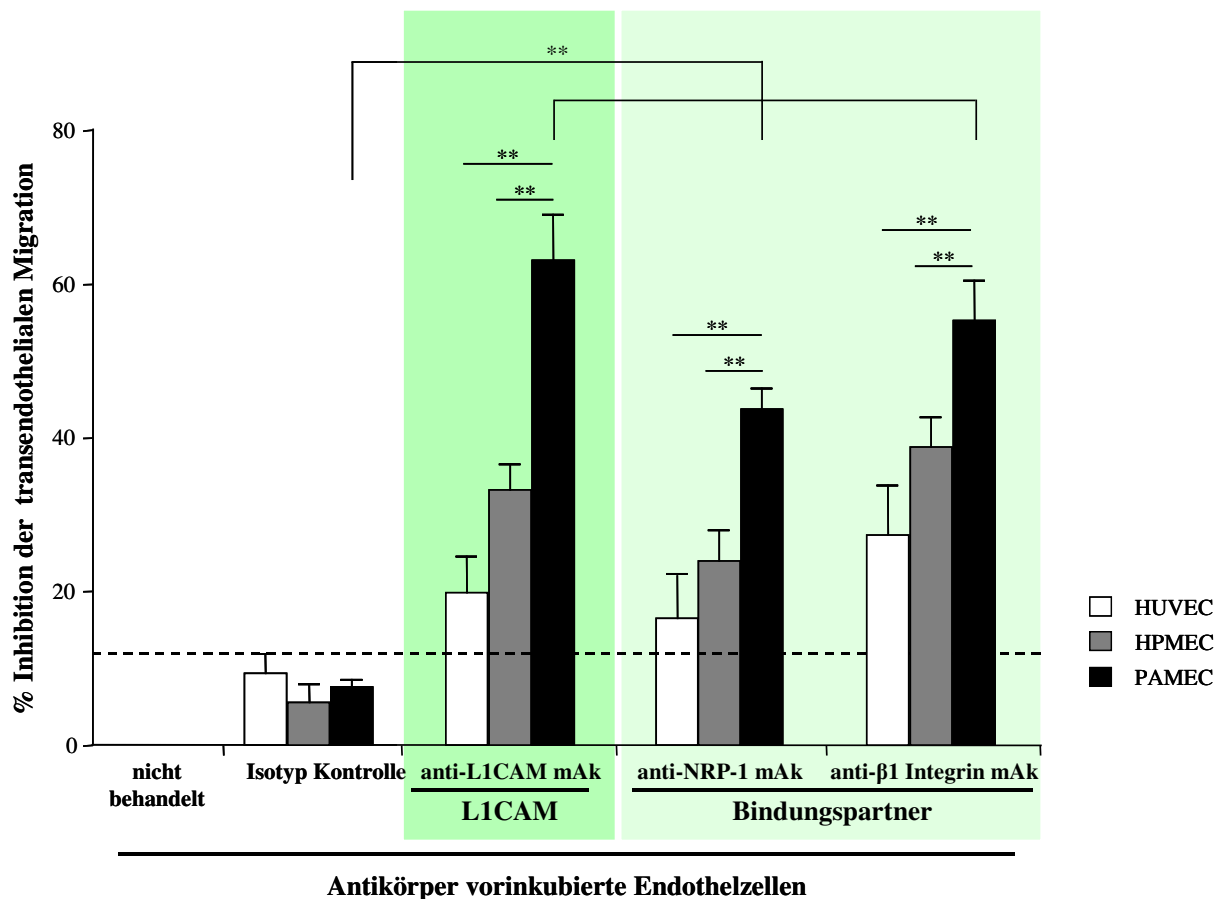


**Abbildung 4.42:** Basale transendotheliale Migration der Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- (HUVEC und HPMEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro*. Die Panc1 Zellen zeigen eine selektiv erhöhte transendotheliale Migration durch PAMEC-Monolayer. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

Die Abbildung 4.42 zeigt die basale transendotheliale Migration von Panc1 Zellen durch HUVEC- bzw. HPMEC- und PAMEC-Monolayer. Die Panc1 Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung transendotheliale Migration durch PAMEC-Monolayer von 63% im Vergleich zu HUVEC- und von 35% im Vergleich zu HPMEC-Monolayer. Diese Resultate belegen eine selektiv erhöhte transendotheliale Migrationskapazität der Panc1 Zellen durch Tumorendothelzell-Monolayer.

4.8.3 Inhibition der transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Die Untersuchungen sollten zeigen, ob L1CAM und die L1CAM-Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin sowohl auf den Endothelzellen, als auch auf den Panc1 Tumorzellen für die transendotheliale Migrationskapazität von Panc1 Tumorzellen *in vitro* funktionell notwendig sind. Für die Inhibition der transendothelialen Migration wurden die zuvor genannten spezifischen mAk gegen L1CAM, NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin verwendet (siehe Abschnitt 4.5.5). Endothelzellen und Panc1 Zellen wurden mit den jeweiligen Antikörpern für 4h vorinkubiert. Als Spezifitätskontrolle wurde 10 $\mu$ g/ml IgG<sub>1</sub> Isotyp (Maus) verwendet. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper durch mehrmaliges Waschen entfernt und die transendothelialen Migrationen wie beschrieben durchgeführt (siehe Abschnitt 4.8 und 4.8.1). Die Anzahl transmigrierter Panc1 Zellen wurde nach 24h quantifiziert.

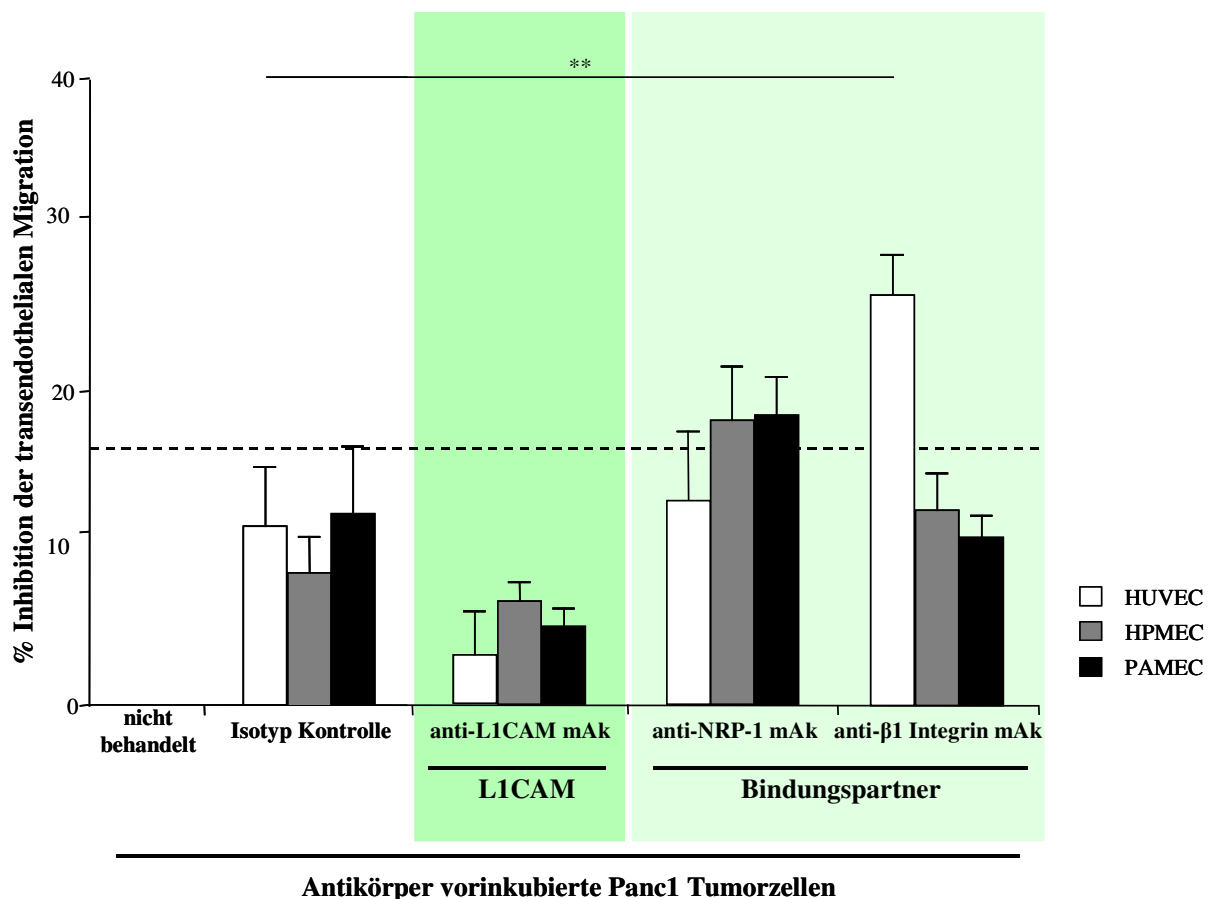


**Abbildung 4.43:** Analyse der funktionellen Rolle von L1CAM und den L1CAM-Bindungspartnern NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin bei der transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch HUVEC- bzw. HPMEC-Monolayer und PAMEC-Monolayer *in vitro*. Die Endothelzellen wurden mit den jeweiligen Antikörpern vorinkubiert. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05



## ERGEBNISSE

Die transendotheliale Migration der Panc1 Zellen durch HUVEC- bzw. HPMEC-Monolayer und PAMEC-Monolayer wurde sowohl durch den L1CAM spezifischen mAk, als auch durch die spezifischen mAk gegen die jeweiligen L1CAM-Bindungspartner auf HUVEC, HPMEC und PAMEC inhibiert. Die Vorinkubation der Endothelzellen zeigte sowohl für L1CAM, als auch für die L1CAM-Bindungspartner eine signifikante Erhöhung der Inhibition der transendothelialen Migration der Panc1 Zellen durch das PAMEC-Monolayer im Vergleich zu der Inhibition der transendothelialen Migration der Panc1 Zellen durch HUVEC- bzw. HPMEC-Monolayer. Dabei zeigte sich die stärkste Inhibition der transendothelialen Migration mit dem L1CAM spezifischen mAk ( $63\% \pm 6\%$ ). Die Vorinkubation der PAMEC zeigte weiterhin für alle getesteten L1CAM Bindungspartner eine signifikante Inhibition der transendothelialen Migration im Vergleich zur Isotyp Kontrolle und im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen (Abbildung 4.43).



**Abbildung 4.44:** Analyse der funktionellen Rolle von L1CAM und den L1CAM-Bindungspartnern NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin bei der transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch HUVEC- bzw. HPMEC-Monolayer und PAMEC-Monolayer *in vitro*. Die Panc1 Tumorzellen wurden mit den jeweiligen Antikörpern vorinkubiert.  $n=3$ . Signifikanzniveau:  $**p<0,05$

Die Vorinkubation der Panc1 Tumorzellen zeigte im Gegensatz zu den Resultaten von Abbildung 4.43 nur für  $\beta_1$  Integrin eine signifikante Erhöhung der Inhibition der transendothelialen Migration der Panc1 Zellen durch das HUVEC-Monolayer im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Des Weiteren zeigte die Vorinkubation der Panc1 Tumorzellen keine signifikante Erhöhung der Inhibition der transendothelialen Migration der Panc1 Zellen durch das HPMEC- und PAMEC-Monolayer im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Auch zeigte die Vorinkubation der Panc1 Tumorzellen keine signifikante Erhöhung der Inhibition der transendothelialen Migration der Panc1 Zellen durch das HUVEC-Monolayer bei Verwendung spezifischer mAk gegen L1CAM und NRP-1 im Vergleich zur Isotyp Kontrolle (Abbildung 4.44). Die Ergebnisse belegen eine selektiv erhöhte funktionelle Wirkung von L1CAM, NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin auf Tumorendothelzellen für die transendothelialen Migration von Tumorzellen durch Endothelzellen *in vitro*.

### **4.9 Die L1CAM Expression von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro***

Nummer *et al.* (2007) konnten nachweisen, dass regulatorischen T-Zellen (Treg) eine veränderte Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle im Vergleich zu Kontroll T-Zellen (Tkon) aufzeigen, welches zu einer selektiv erhöhten Infiltration von Tregs in Pankreastumorgewebe *in vivo* führte.

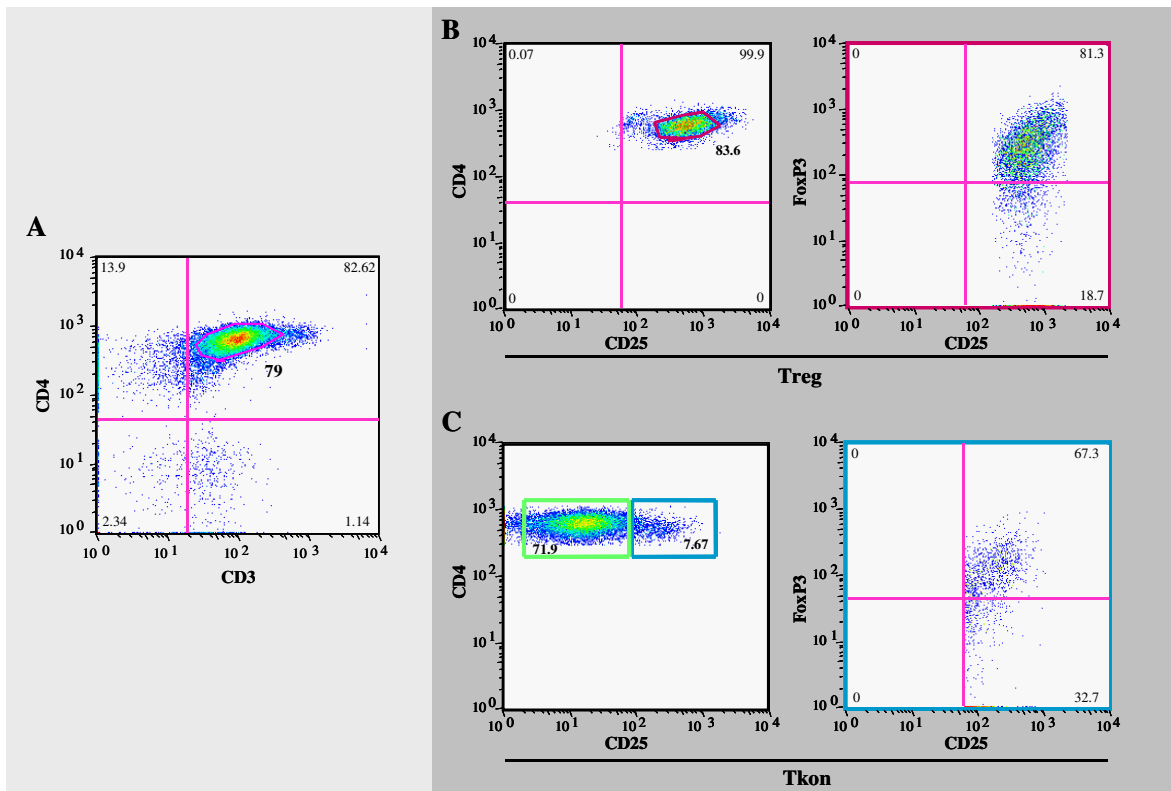
Es sollte untersucht werden, ob eine Expression von L1CAM auf Tregs für eine Infiltration erforderlichen Teilprozesse Adhäsion und transendotheliale Migration ebenfalls funktionell notwendig ist.

#### **4.9.1 Analyse der Aufreinigung regulatorischer T-Zellen aus peripherem Blut**

Die folgenden Untersuchungen sollten die Reinheit der Aufreinigung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Treg) analysieren. Für diesen Ansatz wurden Tregs mit Hilfe eines Dichtegradienten und einer darauf folgenden immuno-magnetischen Isolation aus peripherem Blut isoliert. Die aufgereinigten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Populationen wurden direkt für die FACS-Färbung verwendet. Um die aufgereinigten Populationen genau charakterisieren zu

können, wurden die Zellen mit den T-Zell Markern anti-CD3, anti-CD4 und den Treg Markern anti-CD25 und anti-FoxP3, die Fluorochrom gekoppelt waren, gefärbt. Die detektierten Zellen wurden durch typische Größen- und Granularitätsparameter als Lymphozyten charakterisiert. Diese festgelegten Parameter wurden für alle weiteren FACS-Analysen von T-Zellen verwendet.

Zunächst wurden die Zellen als CD3 Antigen und CD4 Antigen exprimierende T-Helfer-Zellen charakterisiert. Abbildung 4.45 A zeigt eine repräsentative Darstellung des Anteils CD3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> exprimierender T-Helfer-Zellen in der aufgereinigten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Population. Dabei zeigte sich, dass es sich bei 79% der aufgereinigten Zellen um CD3 Antigen und CD4 Antigen exprimierende T-Helfer-Zellen handelte. Abbildung 4.45 B zeigt eine beispielhafte Analyse der als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> aufgereinigten Fraktion regulatorischer T-Zellen. Diese wurden zunächst als CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> exprimierende T-Zellen identifiziert. Die als CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> identifizierten T-Zellen wurden dann im nächsten Schritt auf ihre CD25 Expression untersucht. Dabei zeigte sich, dass 83,6% der als CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> erkannten T-Zellen auch das CD25 Antigen exprimierten. Anschließend wurden diese Zellen als CD4<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup> identifiziert und auf die Expression von FoxP3 untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass von den 83,6% der CD4<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup> T-Zellen 81,3% ebenfalls FoxP3 exprimierten und es sich demnach um Tregs handelte (Abbildung 4.45 B). Abbildung 4.45 C zeigt die Analyse der als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> aufgereinigten T-Zell Population. Diese wurden ebenfalls, wie beispielhaft in Abbildung 4.45 A dargestellt, als CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> identifiziert und anschließend auf deren CD25 Expression untersucht. Dabei zeigte sich, dass 71,9% der Zellen kein CD25 exprimierten (grüner Kasten). 7,67% der Zellen zeigten eine CD25 Expression (blauer Kasten), von denen wiederum 67,3% der CD25<sup>+</sup> auch FoxP3 exprimierten (Abbildung 4.45 C).



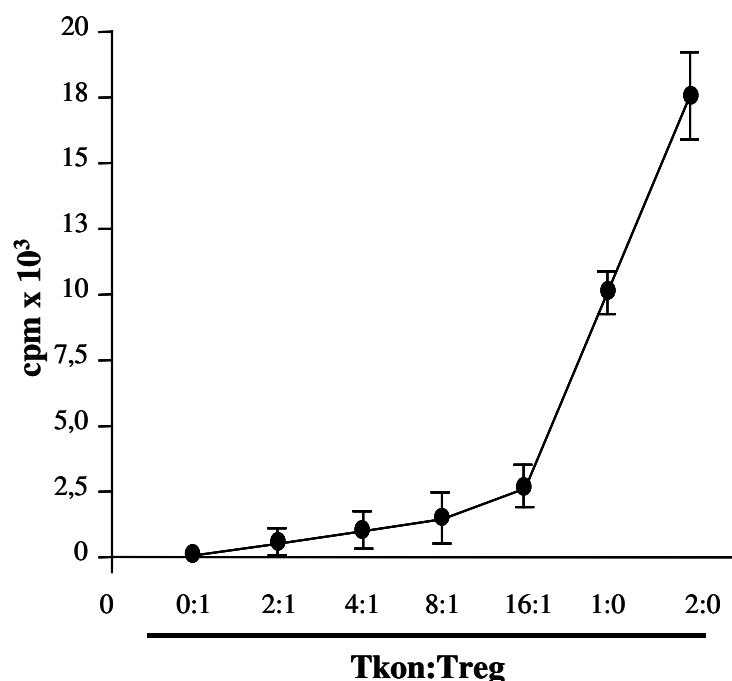
**Abbildung 4.45:** FACS-Analyse der Aufreinigung regulatorischer T-Zellen aus peripherem Blut *in vitro*. **A** Repräsentative Darstellung des Anteils CD3 Antigen und CD4 Antigen exprimierender T-Helfer-Zellen in der aufgereinigten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Population *in vitro*. **B** Analyse der FoxP3 Expression in der aufgereinigten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Population. **C** Messung des Anteils regulatorischer T-Zellen in der als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> aufgereinigten T-Zell Population.

#### 4.9.2 Analyse der suppressiven Wirkung regulatorischer T-Zellen auf die Proliferation CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen *in vitro*

Als Charakteristikum regulatorischer T-Zellen gilt deren Fähigkeit die Proliferation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Kontroll T-Zellen (Tkon) zu supprimieren (Miyara und Sakaguchi, 2007). Deshalb sollte untersucht werden, ob die aus peripherem Blut isolierten und phänotypisch als Tregs identifizierten T-Zellen (siehe Abschnitt 4.9.1) auch die funktionellen Eigenschaften regulatorischer T-Zellen widerspiegeln. Dazu wurde die Inhibition der Proliferation CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin Proliferationstests gemessen. Für diese Analyse wurden 50.000 Tkon Zellen und in unterschiedlichen Verhältnissen zu Treg Zellen (2:0, 1:0, 2:1, 4:1, 8:1 und 16:1) für 72h co-kultiviert. Als negative Kontrolle wurden 50.000 Treg Zellen ohne Zugabe von Tkon Zellen kultiviert. Als positive Kontrolle wurden 100.000 und 200.000 Tkon Zellen ohne Zugabe von Treg Zellen kultiviert. Für die Aktivierung der T-Zellen wurden CD3/CD28 pAk

zugegeben. Anschließend wurde [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben und die Zellen für weitere 16h kultiviert.

Abbildung 4.46 zeigt die [<sup>3</sup>H]-Thymidin Aufnahme der Tkon Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass mit abnehmender Anzahl von Tkon Zellen die [<sup>3</sup>H]-Thymidin Aufnahme dosis-abhängig abnimmt, was einer Zunahme der suppressiven Wirkung von Tregs auf die Tkon Proliferation entspricht. Die Resultate belegen, dass die phänotypisch als regulatorische T-Zellen identifizierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen auch die funktionell charakteristische Eigenschaft einer suppressiven Wirkung auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen widergeben.



**Abbildung 4.46:** Die Inhibition der Proliferation von Tkon Zellen durch Treg Zellen wurde mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin Proliferationstest gemessen. Die aus peripherem Blut isolierten Tregs wurden durch CD3/CD28 pAk aktiviert. Das Verhältnis der Zusammensetzung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Tkon ist auf der x-Achse dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte der [<sup>3</sup>H]-Thymidin Aufnahme nach 16h.

#### 4.9.3 Bestimmung der L1CAM Expression auf Kontroll T-Zellen und regulatorischen T-Zellen *in vitro*

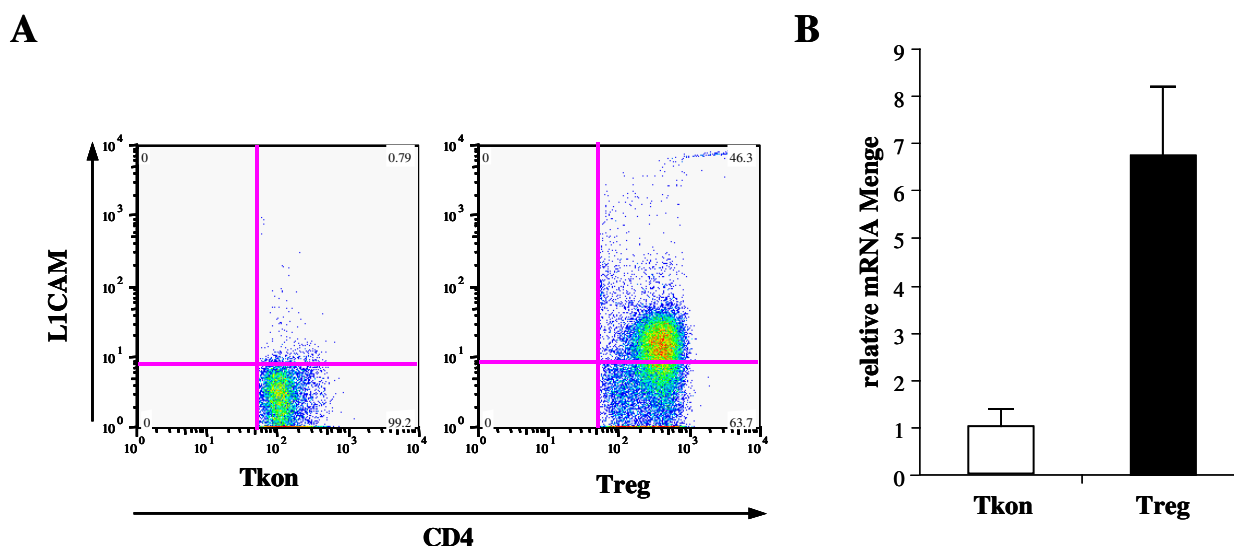
Die Untersuchungen sollten zeigen, ob regulatorische T-Zellen L1CAM exprimieren. Für diesen Ansatz wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Tkon Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Zellen mit Hilfe eines

## ERGEBNISSE

Dichtegradienten aus peripherem Blut isoliert und direkt für die FACS-Färbung verwendet. Die Zellen wurden mit den T-Zell Markern anti-CD3, anti-CD4 und den Treg Markern anti-CD25 und anti-FoxP3 gefärbt. Nach der Färbung wurden 50.000 Ereignisse am FACSCanto® II ausgezählt. Bei der Auswertung wurden die bereits zuvor festgesetzten Parameter verwendet (siehe Abschnitt 4.9.1). Die Treg Zellen wurden als CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> und die Tkon Zellen als CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup> und FoxP3<sup>-</sup> identifiziert.

Die FACS-Färbungen in Abbildung 4.47 zeigen repräsentative Ergebnisse zur Evaluation der L1CAM Expression auf den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> Tkon Zellen und auf den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg Zellen. Dabei zeigte sich, dass 46,3% der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> identifizierten Tregs auch L1CAM exprimierten. Die als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> erkannten Tkon zeigten keine bedeutende L1CAM Expression. Lediglich 0,79% der Zellen exprimierten L1CAM (Abbildung 4.47 A).

Die durch die durchflusszytometrische Bestimmung detektierte L1CAM Expression der Treg Zellen (Abbildung 4.47 A) sollte mittels quantitativer PCR Analyse verifiziert werden. Dabei sollte die L1CAM Expression der Treg Zellen mit der L1CAM Expression der Tkon Zellen verglichen werden. Die Analyse der L1CAM Expression der T-Zellen mittels quantitativer PCR zeigte, wie die durchflusszytometrische Bestimmung, ebenfalls eine deutlich stärkere Expression von L1CAM auf Tregs im Vergleich zu den Tkon. Die L1CAM Expression auf den Tregs zeigte eine Erhöhung auf das 6,8fache im Vergleich zu den Tkon (Abbildung 4.47 B).



**Abbildung 4.47:** Bestimmung der L1CAM Expression der Tkon und Treg Zellen mittels FACS-Analyse und quantitativer PCR *in vitro*. **A** Repräsentative FACS-Färbung der L1CAM Expression der Tkon und Tregs *in vitro*. Tregs wurden als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> identifiziert. Tkon wurden als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> bestimmt. **B** Quantitative PCR Analyse der L1CAM Expression der Tkon und Tregs. Die Ergebnisse zeigen eine deutlich stärkere L1CAM Expression der Tregs.

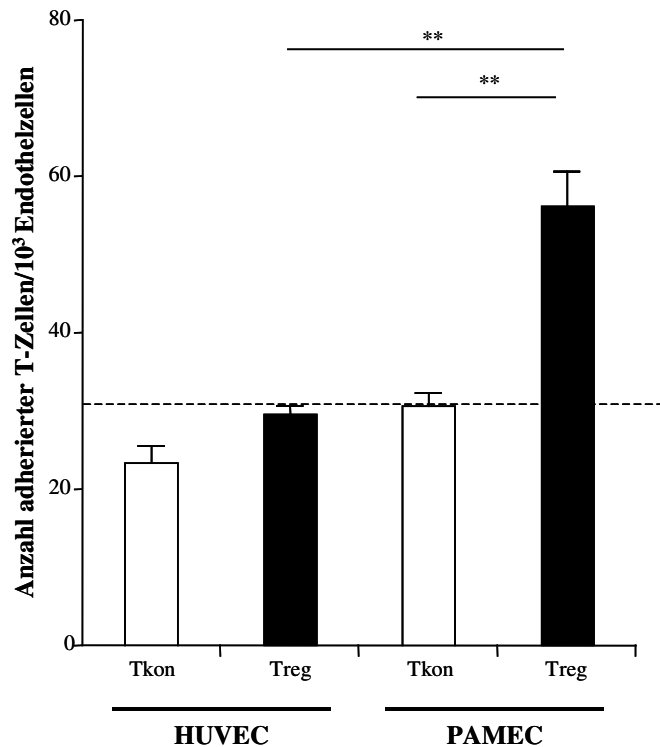
#### 4.10 Die Adhäsionskapazität der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen an Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Nummer *et al.* (2007) konnten zeigen, dass in Pankreaskarzinomen eine erhöhte Infiltration regulatorischer T-Zellen *in vivo* vorliegt. Da dieser Infiltration die Teilprozesse der Adhäsion von Lymphozyten an das Endothelzell-Monolayer und anschließend die Extravasation in das Karzinom-Gewebe zugrunde liegt, sollte in den folgenden Versuchen zunächst die Adhäsion von Treg Zellen an Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro* untersucht werden. Um die Adhäsion der Tkon und Treg Zellen zu testen, wurden Bindungstests, wie in Abschnitt 4.8 beschrieben, durchgeführt. Da für diese Experimente eine hohe Anzahl an Zellen benötigt wurde, wurde hier auf die Verwendung der HPMEC verzichtet und als Kontrollendothelzellen nur HUVEC herangezogen.

##### 4.10.1 Bestimmung der Bindung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen an Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Die in Abbildung 4.48 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Treg Zellen die stärkste Bindung an die PAMEC eingingen. Bei der Adhäsion der Tregs an das PAMEC-Monolayer zeigte sich eine signifikante Zunahme der Adhäsion auf  $54,8 \pm 4,5$  gebundene Tregs pro  $10^3$  Endothelzellen im Vergleich zu der Adhäsion der Tregs an das HUVEC-Monolayer ( $28,8 \pm 1,3$  gebundene Tregs pro  $10^3$  Endothelzellen) und der Tkon Zellen an das PAMEC-Monolayer ( $30,3 \pm 1,6$  gebundene Tkon pro  $10^3$  Endothelzellen). Daraus ergibt sich eine Erhöhung der Adhäsionskapazität der regulatorischen T-Zellen an PAMEC-Monolayer auf das 1,9fache im Vergleich zur Bindung der Tregs an HUVEC-Monolayer und auf das 1,8fache im Vergleich zur Adhäsion von Tkon an PAMEC-Monolayer. Die Resultate belegen eine selektiv erhöhte Adhäsion regulatorischen T-Zellen an die Tumorendothelzellen *in vitro*.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.48:** Die Adhäsionskapazität von Tkon und Treg Zellen an PAMEC- und HUVEC-Monolayer *in vitro*. Dargestellt ist die computergestützte Quantifizierung der Anzahl adhärterter T-Zellen pro  $10^3$  Tumor- bzw. Kontrollendothelzellen. Die Tregs zeigen ein deutlich erhöhtes Potential zur Adhäsion an die Tumorendothelzellen. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

### 4.10.2 Analyse der Inhibition der Adhäsion von $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ und $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ T-Zellen an Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Es sollte untersucht werden, ob L1CAM und die L1CAM-Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin für die Adhäsion von Tkon und Treg Zellen an Endothelzellen *in vitro* funktionell notwendig sind. Für die Inhibition der Adhäsion wurden die zuvor genannten spezifischen mAk gegen L1CAM, NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin verwendet (siehe Abschnitt 4.5.5). Als Spezifitätskontrolle wurden  $10\mu\text{g/ml}$  IgG<sub>1</sub> Isotyp (Maus) verwendet. Die Anzahl adhärterter T-Zellen wurde nach 60min quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.

Die Adhäsion der Tregs an die PAMEC-Monolayer wurde sowohl durch den L1CAM spezifischen mAk als auch durch die spezifischen mAk gegen die jeweiligen L1CAM-Bindungspartner inhibiert. Dabei zeigte sich bei der Inhibition der Adhäsion von Tregs an die

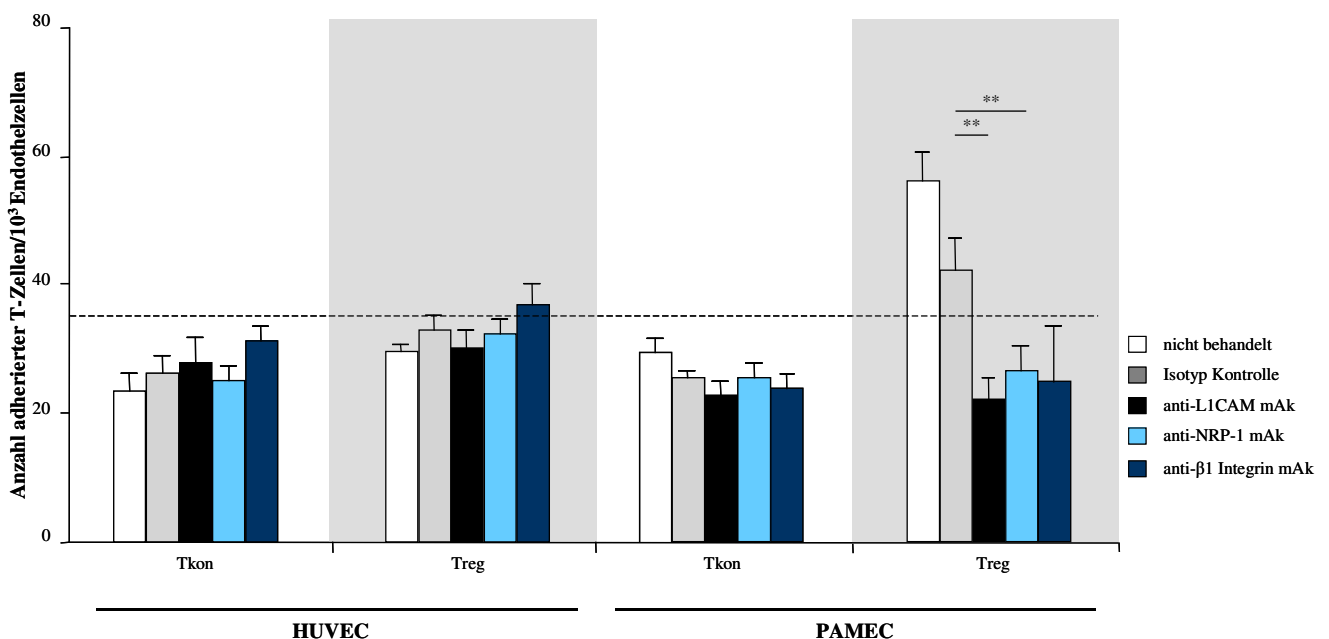


## ERGEBNISSE

PAMEC-Monolayer eine signifikant stärkere Inhibition mit anti-L1CAM mAk von 38% im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Ebenso zeigte der anti-NRP-1 eine signifikante Inhibition der Adhäsion von Tregs an PAMEC-Monolayer von 28% im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Die Inhibition durch  $\beta_1$  Integrin mAk zeigte keine signifikante Inhibition im Vergleich zu Isotyp Kontrolle (Abbildung 4.49).

Die Adhäsion der Tkon an PAMEC-Monolayer wurde sowohl durch den L1CAM spezifischen mAk als auch durch die spezifischen mAk gegen  $\beta_1$  Integrin inhibiert. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Inhibition der Tregs an PAMEC-Monolayer war die Inhibition der Adhäsion der Tkon an PAMEC-Monolayer deutlich schwächer. Die Inhibition der Adhäsion von Tkon Zellen an die PAMEC-Monolayer zeigte eine Inhibition mit anti-L1CAM mAk von 10% im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Bei Zugabe des spezifischen mAk gegen  $\beta_1$  Integrin zeigte sich eine geringe Inhibition der Adhäsion von Tkon Zellen an die PAMEC-Monolayer von 6% im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Die Inhibition durch anti-NRP-1 mAk zeigte keine Inhibition im Vergleich zu Isotyp Kontrolle.

Die Adhäsion sowohl von Tregs als auch von Tkon an HUVEC-Monolayer wurde sowohl durch den anti-L1CAM mAk als auch durch die anti-NRP-1 und anti- $\beta_1$  Integrin mAk nicht inhibiert (Abbildung 4.49). Die Ergebnisse zeigen eine selektiv erhöhte Inhibition der Adhäsion der Treg Zellen an PAMEC-Monolayer durch L1CAM und NRP-1 spezifische mAk *in vitro*.



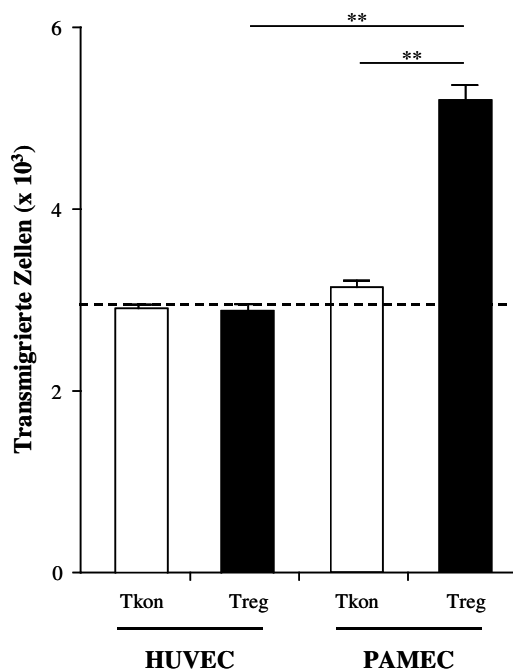
**Abbildung 4.49:** Quantifizierung der inhibierten T-Zell-Adhäsion an HUVEC und PAMEC *in vitro* mittels spezifischer mAk gegen L1CAM und die L1CAM-Bindungspartner. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

## 4.11 Die transendotheliale Migration der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen durch Kontroll- und Tumorendothel *in vitro*

Um festzustellen ob die erhöhte Adhäsionskapazität der Tregs an Tumorendothel in einer erhöhten Transmigration durch Tumorendothel resultiert, wurden transendotheliale Migrationstests, wie in Abschnitt 4.7 beschrieben, durchgeführt.

### 4.11.1 Die Transmigration von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen durch Kontroll- und Tumorendothel *in vitro*

Um eine basale transendotheliale Migration der T-Zellen zu analysieren, sollten zunächst vergleichende Untersuchungen zur transendothelialen Migration von Tkon und Treg Zellen durch Kontroll- (HUVEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) durchgeführt werden. Als Kontrolle wurde in den Experimenten jeweils bei einem Triplikat auf die Zugabe der T-Zellen verzichtet, um festzustellen wie hoch die basale Transmigrationskapazität der Endothelzellen ist. Diese Werte wurden von den Ergebnissen der T-Zell Migration jeweils abgezogen.



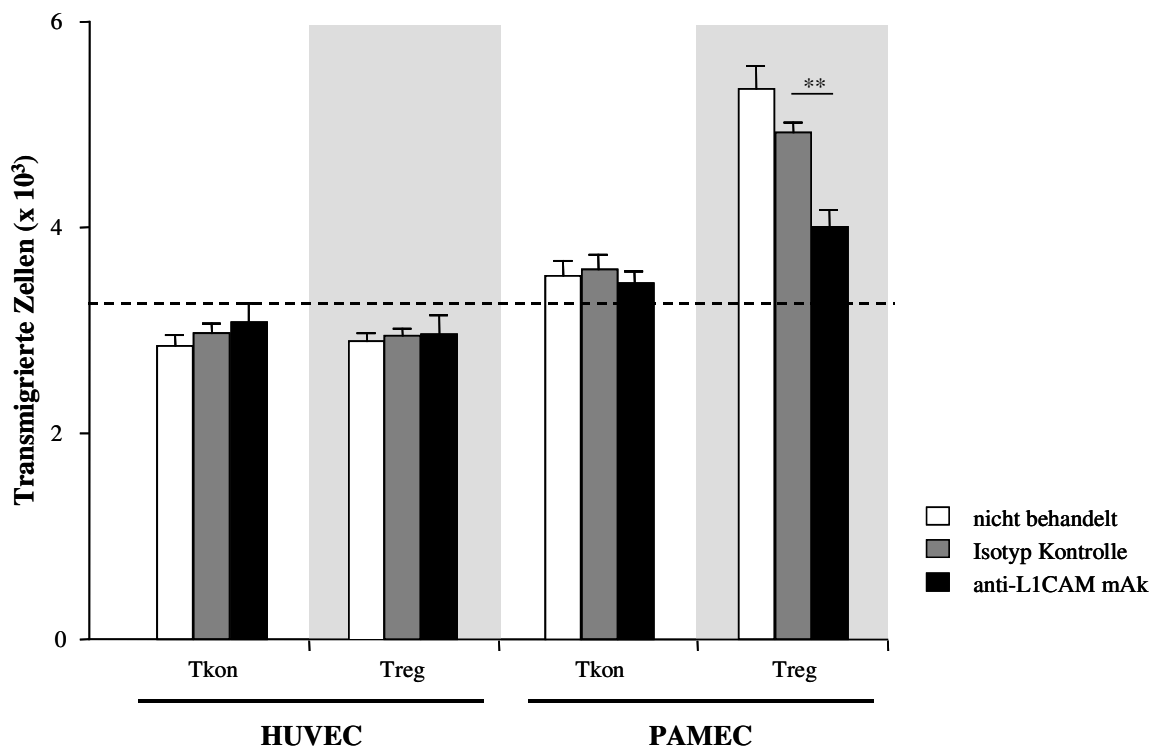
**Abbildung 4.50:** Basale transendotheliale Migration der konventionellen und regulatorischen T-Zellen durch Kontroll- (HUVEC) und Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro*. Tregs zeigen eine selektiv erhöhte transendotheliale Migration durch PAMEC-Monolayer *in vitro*. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

Die Abbildung 4.50 zeigt die basale transendotheliale Migration von Tkon und Treg Zellen durch HUVEC- und PAMEC-Monolayer. Die Tregs zeigten eine selektiv signifikant erhöhte transendotheliale Migration durch PAMEC-Monolayer ( $5203 \pm 163,5$  transmigierte Tregs) im Vergleich zur transendothelialen Migration von Tkon durch PAMEC-Monolayer ( $3144 \pm 72$  transmigierte Tkon) und zur transendothelialen Migration von Tregs durch HUVEC-Monolayer ( $2892 \pm 61,5$  transmigierte Tregs). Im Vergleich zur transendothelialen Migration von Tkon durch HUVEC-Monolayer ( $2915 \pm 41,6$  transmigierte Tkon) zeigte sich keine Erhöhung der transendothelialen Migration der Tregs durch HUVEC-Monolayer. Die Resultate belegen eine selektiv erhöhte transendotheliale Migration der Tregs durch Tumorendothel *in vitro*.

#### 4.11.2 Analyse der Inhibition der transendothelialen Migration der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ und $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ T-Zellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Die Untersuchungen sollten verifizieren, ob L1CAM für die transendotheliale Migration von T-Zellen *in vitro* funktionell notwendig ist. Für die Inhibition der transendothelialen Migration wurde ein spezifische Antikörper gegen L1CAM (mAk L1-11A,  $10\mu\text{g/ml}$ ) verwendet. Als Spezifitätskontrolle wurde  $10\mu\text{g/ml}$  IgG<sub>1</sub> Isotyp (Maus) verwendet. Die Anzahl transmigrierter T-Zellen wurde nach 24h quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.

Die transendotheliale Migration der Tregs durch PAMEC-Monolayer zeigte eine signifikante Erhöhung der Inhibition durch den L1CAM spezifischen mAk im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Die Inhibition der transendothelialen Migration regulatorischer T-Zellen durch PAMEC-Monolayer bei der Zugabe von L1CAM spezifischen Antikörpern betrug 19% im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Die Zugabe der Isotyp Kontrolle zeigte eine Inhibition von 7,9% im Vergleich zu den nicht behandelten Tregs. Die transendotheliale Migration der Tkon Zellen durch PAMEC-Monolayer zeigte keine signifikante Inhibition durch den L1CAM mAk. Sowohl bei der transendothelialen Migration der Treg, als auch der Tkon Zellen durch HUVEC-Monolayer zeigte sich durch den L1CAM mAk keine Veränderung der transendothelialen Migrationskapazität beider Populationen (Abbildung 4.51). Diese Resultate demonstrieren eine selektiv erhöhte Inhibition durch den L1CAM spezifischen mAk der transendothelialen Migration regulatorischer T-Zellen durch Tumorendothel *in vitro*.



**Abbildung 4.51:** Analyse der funktionellen Rolle von L1CAM bei der transendothelialen Migration von T-Zellen durch HUVEC- und PAMEC-Monolayer *in vitro*. Um die Funktion von L1CAM in der transendothelialen Migration zu inhibieren, wurde ein spezifischer mAk gegen L1CAM verwendet. Die Ergebnisse zeigen eine selektiv erhöhte Inhibition durch den anti-L1CAM mAk der transendothelialen Migration von Tregs durch Tumorendothel *in vitro*. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

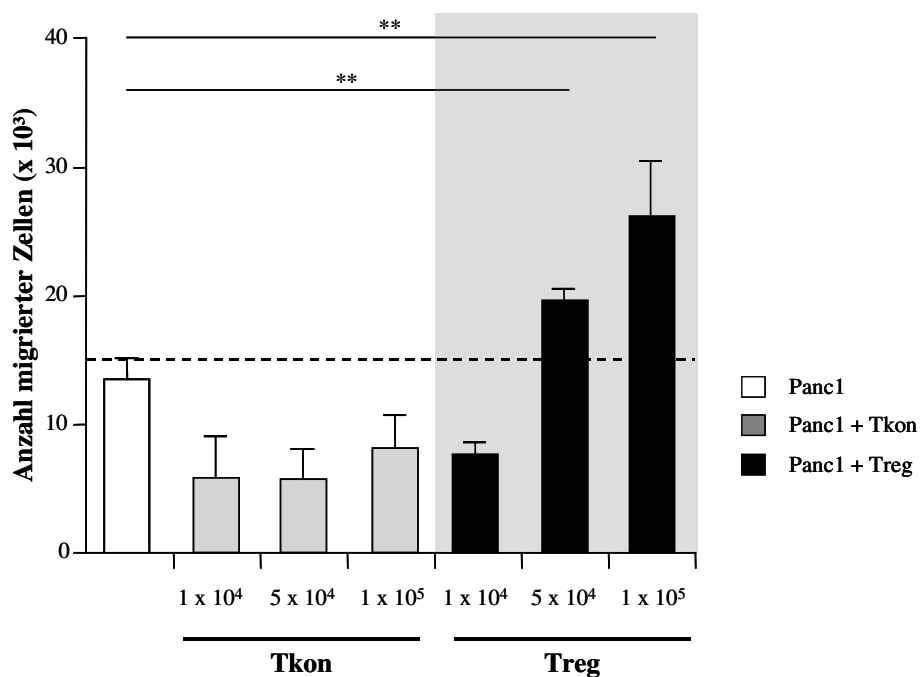
#### 4.11.3 Analyse der Treg stimulierten transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Wie Nummer *et al.*, (2007) zeigen konnten, erfolgt eine selektive Infiltration regulatorischer T-Zellen in humanes Pankreaskarzinomgewebe *in vivo*. Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob Tregs bzw. von Tregs sekretierte lösliche Faktoren einen möglichen Einfluss auf die transendotheliale Migrationskapazität von Tumorzellen und somit auf Metastasierungsprozesse haben könnten. Die transendothelialen Migrationstests wurden, wie in Abschnitt 4.8 beschrieben, durchgeführt. Anstelle des chemoattraktiven Moleküls SDF-1 $\beta$  wurden jedoch unterschiedliche Konzentrationen von Tkon und Treg Zellen ( $1 \times 10^4$  Zellen/500 $\mu$ l,  $5 \times 10^4$  Zellen/500 $\mu$ l und  $1 \times 10^5$  Zellen/500 $\mu$ l) in die untere Kammer hinzugefügt. Zur Aktivierung der T-Zellen wurden zusätzlich an magnetische Partikel gekoppelte CD3/CD28 pAk zugegeben. Bevor die Anzahl

## ERGEBNISSE

transmigrierter T-Zellen nach 24h quantifiziert werden konnte, wurden die T-Zellen über die CD3/CD28-gekoppelten magnetischen Partikel, die an die T-Zellen gebunden hatten, aus dem Medium entfernt. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.

Die Ergebnisse der transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch HUVEC-Monolayer zeigten eine starke dosis-abhängige Erhöhung der Migration, die durch Treg Zellen stimuliert wurde. Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme der transendothelialen Migration bei Zugabe von  $5 \times 10^4$  Tregs/500 $\mu$ l um 45% und bei  $1 \times 10^5$  Tregs/500 $\mu$ l um 94% im Vergleich zu der Anzahl transmigrierter Panc1 Zellen ohne Stimulus. Die Zugabe von  $1 \times 10^4$  Tregs/500 $\mu$ l bewirkte keine Erhöhung der transendothelialen Migration von Panc1 Zellen. Im Unterschied zu den Tregs bewirkte die Zugabe von Tkon Zellen eine Inhibition der transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen im Vergleich zu der Anzahl transmigrierter Panc1 Zellen ohne Stimulus (Abbildung 4.52). Die Ergebnisse zeigen eine selektiv erhöhte transendotheliale Migration von Panc1 Tumorzellen bei Zugabe von regulatorischen T-Zellen *in vitro*.

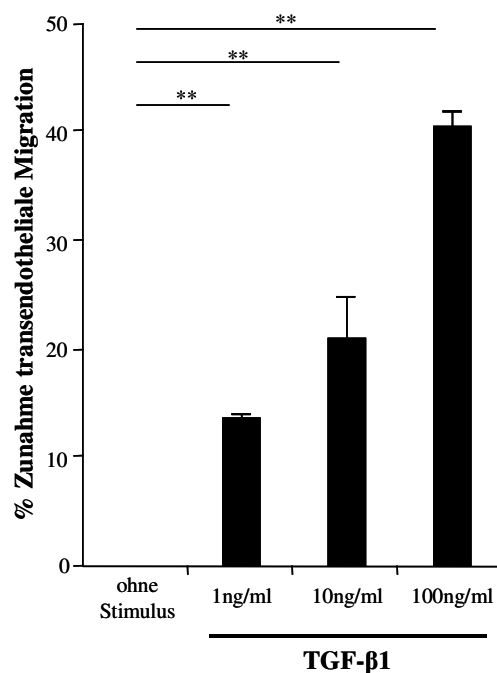


**Abbildung 4.52:** Messung der Treg-stimulierten transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch HUVEC-Monolayer *in vitro*. Die Ergebnisse zeigen eine selektiv erhöhte transendotheliale Migration der Panc1 Tumorzellen bei Zugabe von regulatorischen T-Zellen *in vitro*. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

### 4.11.4 Analyse der TGF- $\beta$ 1 stimulierten transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

IL-10 und TGF- $\beta$ 1 gehören zu den löslichen Faktoren, die von Tregs sekretiert werden (Bommireddy und Doetschman, 2007). In Abschnitt 4.2.6 konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Kontroll- und Tumorendothelzellen mit TGF- $\beta$ 1 sowohl auf HUVEC und HPMEC als auch auf PAMEC zu einer Erhöhung der L1CAM Expression führte. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Blockade von L1CAM bei der transendothelialen Migration von sowohl Tumorzellen als auch Treg Zellen eine selektive Inhibition der transendothelialen Migration durch das Tumorendothel bewirkte (siehe Abschnitt 4.8.3 und 4.11.2). Daher sollte getestet werden, ob TGF- $\beta$ 1 die transendotheliale Migration von Panc1 Tumorzellen stimulieren kann. Die transendothelialen Migrationstests wurden, wie in Abschnitt 4.8 beschrieben, durchgeführt. Um einen möglichen Einfluss von TGF- $\beta$ 1, als ein von Treg Zellen sezernierter Faktor, auf die transendotheliale Migration von Panc1 Zellen zu untersuchen, wurde anstelle des chemoattraktiven Moleküls SDF-1 $\beta$  unterschiedliche Konzentrationen TGF- $\beta$ 1 (1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml) in die untere Kammer hinzugefügt. Die Anzahl transmigrierter Panc1 Zellen wurde nach 24h quantifiziert. Dabei wurde die Anzahl ohne TGF- $\beta$ 1 Stimulus transmigrierter Panc1 Zellen auf 100% gesetzt und die Anzahl mit TGF- $\beta$ 1 Stimulus transmigrierter Panc1 Zellen in Relation dazu berechnet. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.

Die Ergebnisse der TGF- $\beta$ 1 stimulierten transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch HUVEC-Monolayer *in vitro* zeigten eine dosisabhängige Erhöhung der transendothelialen Migration. Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme der transendothelialen Migration bei Stimulation mit 1ng/ml TGF- $\beta$ 1 von 13,5 %  $\pm$  0,5 %, bei Stimulation mit 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 von 21 %  $\pm$  3,8 % und bei Stimulation mit 100ng/ml TGF- $\beta$ 1 von 40,5 %  $\pm$  1,5 % im Vergleich zu den ohne Stimulus transmigrierten Panc1 Zellen (Abbildung 4.53).



**Abbildung 4.53:** Messung der TGF-β1 stimulierten transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch HUVEC-Monolayer *in vitro*. Die Ergebnisse zeigen eine dosis-abhängige Zunahme der transendothelialen Migration von Panc1 Zellen *in vitro*. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05

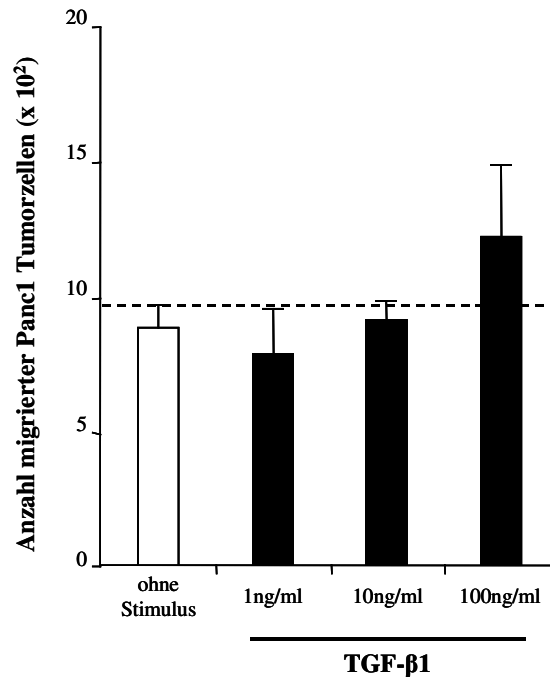
#### 4.11.5 Analyse der TGF-β1 stimulierten transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch Kontroll- und Tumorendothelzellen *in vitro*

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die in Abschnitt 4.11.4 gezeigte Zunahme der transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch HUVEC-Monolayer auf einer direkten Stimulation der Endothelzellen oder einer aktivierenden Wirkung von TGF-β1 auf die Panc1 Tumorzell-Migration beruhte. Deshalb sollte getestet werden, ob TGF-β1 die Transmigration von Panc1 Tumorzellen durch Gelatine-beschichtete Transmigrationsmembranen stimulieren kann. Die Migrationstests wurden, wie in Abschnitt 4.5 beschrieben, durchgeführt. Anstelle des chemoattraktiven Moleküls SDF-1β wurden jedoch unterschiedliche Konzentrationen TGF-β1 (1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml) in die untere Kammer hinzugefügt. Die Anzahl migrierter Panc1 Tumorzellen wurde nach 24h quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Triplikate ausgewertet.

Die Ergebnisse der TGF-β1-stimulierten Transmigration von Panc1 Tumorzellen durch Gelatine-beschichtete Transmigrationsmembranen *in vitro* zeigten keine signifikante Zunahme der

## ERGEBNISSE

Migration im Vergleich zur basalen Transmigration der Panc1 Zellen ohne Stimulus (Abbildung 4.54). Die Ergebnisse belegen, dass die gezeigte Zunahme der transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch HUVEC-Monolayer nicht auf einer aktivierenden Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf die Panc1 Tumorzell-Migration beruhte.



**Abbildung 4.54:** Messung der TGF- $\beta$ 1 stimulierten Migration von Panc1 Tumorzellen durch Gelatine-beschichtete Migrationsmembranen *in vitro*. Die Ergebnisse zeigen keine Zunahme der TGF- $\beta$ 1 stimulierten Transmigration von Panc1 Tumorzellen *in vitro*. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05



## 5 Diskussion

### 5.1 Die erhöhte Vaskularisierung von Pankreaskarzinomen *in situ*

Eine notwendige Voraussetzung für die Vaskularisierung von Geweben ist die Angiogenese. Angiogenese bezeichnet die Neubildung von Blutgefäßen durch Sprossung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen (Folkman, 1984). Physiologisch wird Angiogenese nur im Embryo und Fetus, sowie im adulten Organismus bei zyklischen Prozessen im Eierstock und in der Plazenta oder bei der Wundheilung gefunden. Alle anderen Formen der Angiogenese sind mit pathologischen Vorgängen, so auch bei fortschreitenden Tumorerkrankungen, verbunden (Carmeliet, 2005). Durch die histologischen Untersuchungen an Pankreas Tumor- und Kontrollgeweben wurde der Grad der Vaskularisierung *in situ* festgestellt. In den getesteten Tumorgeweben konnte im Vergleich zu den Kontrollgeweben eine auf das 2fache erhöhte Vaskularisierung mittels CD31 Färbung festgestellt werden (Abbildung 4.1 und 4.2).

Für viele Tumorgewebe, u. a. Brust-, Lungen-, Kolorektal- und Prostatakarzinome, konnte eine erhöhte Gefäßdichte nachgewiesen werden, die meist mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten korrelierte (Chandrachud *et al.*, 1997; Lackner *et al.*, 2004; Lindmark *et al.*, 1996; Weidner, 1993; Weidner *et al.*, 1993; Weidner *et al.*, 1991). Eine zunehmende Gefäßdichte geht mit einer erhöhten Invasivitäts- und Metastasierungsrate bei unterschiedlichen Tumorentitäten einher. Für das Pankreaskarzinom konnte ebenfalls in verschiedenen Studien eine positive Korrelation der Gefäßdichte mit dem Krankheitsverlauf des Tumors festgestellt werden (Couvelard *et al.*, 2005; Ellis *et al.*, 1998; Fujioka *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 1999; Karademir *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002; Korc, 2003; Kuwahara *et al.*, 2003; Linder *et al.*, 2001; Mirecka *et al.*, 2001; Niedergethmann *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2000; Stipa *et al.*, 2002). Einige Autoren konnten weiterhin belegen, dass eine hohe Gefäßdichte im Pankreaskarzinom zu Lebermetastasen führt und mit einer schlechten Prognose der Patienten korreliert (Kuwahara *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2000; Takagi *et al.*, 2005).

Eine Gefäßneubildung (Neovaskularisierung) oder Angiogenese wird sehr stark durch angiogene Faktoren kontrolliert. Im Tumorgewebe verschiedener Tumorentitäten kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von pro- und anti-angiogenen Faktoren auf Seite der pro-angiogenen Faktoren. Zu den tumoralen und peritumoralen Veränderungen der physiologischen Stimuli und des Tumormikromilieus gehören die Unterversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie), ein niedriger pH-Wert und ein erhöhtes Vorkommen freier Radikale, die eine erhöhte Expression

von pro-angiogenen Wachstumsfaktoren bewirken. Zu diesen werden u. a. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) und der basale Fibroblasten Wachstumsfaktor (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) gezählt. Zusätzlich kann das Mikromilieu durch Zytokine, wie z. B. durch den transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ) und den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) moduliert werden (Denko *et al.*, 2003; Dor *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2000; Xie, 2001; Xie und Huang, 2003a; Xie und Huang, 2003b; Xie *et al.*, 2004). Diese pro-angiogenen Wachstumsfaktoren und Zytokine können eine Induktion der Angiogenese (*angiogenic switch*) bewirken (Bergers und Benjamin, 2003), die zu einer zunehmenden Dichte mikrovaskulärer Gefäße führt. Dadurch ist die für ein weiteres Tumorwachstum notwendige Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff und Metaboliten sicher gestellt. Pankreaskarzinome sind durch stark hypoxische Bedingungen und eine deutliche Erhöhung von pro-angiogenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen sowie deren Rezeptoren, wie z. B. VEGF/VEGFR2 und TGF- $\beta$ /T $\beta$ RII, charakterisiert (Kleeff *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2004). Es ist anzunehmen, dass diese Mechanismen von Bedeutung für die analysierte, stärkere Vaskularisierung des Pankreaskarzinomgewebes sind.

### **5.2 Die erhöhte Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM in Pankreaskarzinomgeweben *in situ***

Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAMs) spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen physiologischen Prozessen, wie Migration, Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von Zellen. Die Mitglieder der Ig-Superfamilie sind u. a. das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1), das vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1), das Neuronen-Glia-ähnliche Zelladhäsionsmolekül (*neuron-glia-related cell adhesion molecule*, Nr-CAM), das neuronale Zelladhäsionsmolekül (*neural cell adhesion molecule*, NCAM) sowie das L1 Zelladhäsionsmolekül (*L1 cell adhesion molecule*, L1CAM).

Eine L1CAM Expression konnte bereits auf einer Vielzahl unterschiedlicher Karzinome detektiert werden. Deshalb sollte untersucht werden, ob ebenfalls in Pankreaskarzinomgeweben eine erhöhte L1CAM Expression detektierbar ist. Durch quantitative Auswertung histologischer Untersuchungen von Pankreas Tumor- und Kontrollgeweben wurde in den Pankreas

Tumorgewebe eine Erhöhung der L1CAM Expression *in situ* auf die dreifache gefärbte Fläche festgestellt (Abbildung 4.1 und 4.2). Als Grundlage hierfür wurde die spezifisch gefärbte L1CAM Fläche in Tumor- und Kontrollgewebe mit der gesamten Gewebeoberfläche korreliert und verglichen.

Sebens Muerkoster *et al.* (2007) berichten ebenfalls von einer histologisch nachweisbar erhöhten L1CAM Expression in Pankreaskarzinomgeweben. Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression von L1CAM bei einer Reihe verschiedener Tumorentitäten wie z. B. Melanom, Neuroblastom, Gliom, Bronchial- und Nierenzellkarzinome, gastrointestinale und kolorektale Tumore und bei der monozytären Leukämie gefunden (Allory *et al.*, 2005; Boo *et al.*, 2007; Fogel *et al.*, 2003a; Fogel *et al.*, 2003b; Gavert *et al.*, 2005; Kaifi *et al.*, 2007; Kaifi *et al.*, 2006a; Kaifi *et al.*, 2006b; Meli *et al.*, 1999; Senner *et al.*, 2002; Shtutman *et al.*, 2006; Thies *et al.*, 2002).

Das Pankreaskarzinom ist eine aggressive, maligne Erkrankung, die durch ein schnelles, invasives Tumorwachstum, welches mit frühzeitigen Gefäß- und Lymphbahninfiltrationen einher geht. Fast 100% der Patienten entwickeln während des Krankheitsverlaufes Metastasen u. a. in Leber, Lunge, Nieren und am Skelett (Bilchik *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 1986; Nakao *et al.*, 1996). Die Veränderungen der Expressionsmengen von verschiedenen Ig-CAM Proteinen in Karzinomgeweben stellen oft einen wichtigen Faktor bei Invasions- und Metastasierungsprozessen dar (Keleg *et al.*, 2003; Mousa, 2008). Um Interaktionen mit der Gefäßwand und der EZM zu erleichtern, machen sich Tumorzellen häufig eine erhöhte Ig-CAM Expression, z. B. PECAM-1, ICAM-1 und NCAM, zu nutze (Tang und Honn, 1994). So wurde eine erhöhte Expression von ICAM-1 u. a. in Blasen- und Lungenkarzinomen, kolorektalen Tumoren sowie Melanomen festgestellt (Campbell *et al.*, 1994; Dippold *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1989; Maurer *et al.*, 1998; Schardt *et al.*, 1993; Tomita *et al.*, 1993). Ebenso wurden erhöhte Mengen von VCAM-1 auf malignen Zellen von Brust-, Nierenzell- und Kolorektalkarzinomen gefunden (Ali *et al.*, 2000; Hemmerlein *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 1998). Im Pankreastumor konnten ebenfalls erhöhte Expressionen von ICAM-1, VCAM-1 sowie Nr-CAM detektiert werden (Dhodapkar *et al.*, 2001; Keleg *et al.*, 2003; Kuehn *et al.*, 1999; Schwaeble *et al.*, 1993). Eine erhöhte ICAM-1 und VCAM-1 Expression konnte weiterhin mit einer erhöhten Metastasierungsrate in verschiedenen Tumoren korreliert werden (Alexiou *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2003; Johnson, 1999; Lin *et al.*, 2006; Maurer *et al.*, 1998; Natali *et al.*, 1997). Die Überexpression von L1CAM in Melanomen und Gliomen konnte mit einer erhöhten Metastasierungsrate assoziiert werden (Ohnishi *et al.*, 1998; Thies *et al.*, 2007; Thies *et al.*, 2002). Ebenso zeigte die Publikation von Gavert *et al.* (2007), dass die Co-Expression von L1CAM und ADAM10 in Kolonkarzinomzellen die Kapazität der Zellen zur Bildung von

Metastasen im Maus-Modell erhöht. Zusammenfassend ist zu vermuten, dass eine Überexpression von L1CAM in Pankreaskarzinomen von Bedeutung für die früh auftretenden Metastasierungsprozesse im Pankreastumor sein könnte.

### **5.3 Die erhöhte Expression des Zelladhäsionsproteins L1CAM auf Pankreas Tumorendothel *in situ* und *in vitro***

Im Mittelpunkt der Angiogenese stehen die Endothelzellen, welche während dieses Prozesses kaskadenartig die Phasen der Proliferation, Migration und Differenzierung durchlaufen (Folkman, 1984). Der Vergleich von Endothelien in nicht-malignen Geweben mit Tumorendothelien zeigt mannigfaltige Unterschiede. Endothelzellen zeigen im Tumor einen veränderten Phänotyp, der dem einer aktivierten Endothelzelle im inflammatorischen Zustand ähnelt. Dies äußert sich u. a. in veränderten Expressionsmustern von verschiedenen Ig-CAMs mit unterschiedlichen Funktionen. Die histologischen Untersuchungen der Pankreas Tumor- und Kontrollgewebe *in situ* zeigten eine signifikante Erhöhung der endothelialen L1CAM Expression auf das 13,5fache in den Pankreas Tumorgeweben im Vergleich zu den Kontrollgeweben (Abbildung 4.1 und 4.2). Ebenso konnte die erhöhte L1CAM Expression auf Pankreas Tumorendothelzellen (PAMEC) im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen (HUVEC und HPMEC) *in vitro* durch immunzytologische und durchflusszytometrische Analysen bestätigt werden (Abbildung 4.3, 4.4 und 4.5).

Eine L1CAM Expression konnte bereits mehrfach auf Endothelzellen unterschiedlicher Organursprünge *in situ* und *in vitro* nachgewiesen werden. So wurde eine L1CAM Expression sowohl auf mikrovaskulären Endothelzellen der Lunge (Voura *et al.*, 2001), als auch auf makrovaskulären Endothelzellen der Nabelschnur (Murga *et al.*, 2005; Prevost *et al.*, 2002) *in vitro* nachgewiesen. Ebenso wurde eine L1CAM Expression auf angrenzenden Gefäßen von Hauttumoren *in situ* bestimmt (Felding-Habermann *et al.*, 1997; Thies *et al.*, 2002). Des Weiteren konnten Kaifi *et al.* (2006a) eine erhöhte L1CAM Expression auf Tumorendothelien von Neurofibrosarkomen und Tumoren glatter Muskelzellen *in situ* nachweisen.

Eine differentielle Expression von Ig-CAMs auf Tumorendothelien wurde bereits mehrfach beschrieben (Albeda *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1995; Kuzu *et al.*, 1993). Erhöhte Expressionsmengen von ICAM-1 und VCAM-1 konnten u. a. auf Tumorendothelien von Lungen-, Brust- und Kolorektalkarzinomen sowie Lymphomen nachgewiesen werden (Jain *et al.*, 1996; Yoong *et al.*,

1998). Ebenfalls wurde eine erhöhte Expression von ICAM-2 und ICAM-3 auf Tumorendothelien von malignen Lymphomen detektiert (Jain *et al.*, 1996). Tumorendothelien des Pankreaskarzinoms zeigten ebenfalls signifikant stärkere Expressionen der Ig-CAM Proteine ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1 (Nummer *et al.*, 2007). Zusammenfassend lassen sich diese Expressionsteigerungen durch den allgemein aktivierten Zustand der Endothelzellen durch das Mikromilieu des Gewebes erklären.

An der Angiogenese sind auch peri-endotheliale Komponenten, wie beispielsweise die Basalmembran, *membrana basalis*, beteiligt. Die Basalmembran liegt zwischen dem Endothel und dem ihm angrenzendem Bindegewebe. Die Basalmembran weist multiple Bindungsstellen für verschiedene CAMs auf. Somit finden zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den EZM Bestandteilen der Basalmembran, hauptsächlich Kollagen Typ IV und Laminin, und verschiedenen CAMs statt. Dadurch wird die Stabilität der Basalmembran durch Bindung an benachbarte Zellen gefestigt. So binden beispielsweise Integrine an Kollagen Typ IV und Laminin in der Basalmembran.

Die histologischen Untersuchungen der Pankreaskarzinomgewebe *in situ* zeigten, dass die Expressionssteigerung von endotheliale L1CAM in den Tumorgeweben mit einer veränderten L1CAM Lokalisation einher ging. In den Kontrollgeweben war häufig eine basolaterale Lokalisation von L1CAM zu beobachten, wohingegen in den Tumorgeweben oft eine luminale Expression, co-lokalisiert mit CD31, zu finden war (Abbildung 4.1, Pfeile).

Die Gruppe der extrazellulären Bindungspartner von L1CAM umfasst u. a. auch Komponenten der EZM wie beispielsweise Laminin und die Proteoglykane Neurocan und Phosphocan (Milev *et al.*, 1994; Montgomery *et al.*, 1996; Oleszewski *et al.*, 2000). Die basolaterale Lokalisation von L1CAM in den Kontrollgeweben lässt auf eine mögliche Interaktion der Endothelzellen mit der Basalmembran vermittelt über eine L1CAM-Laminin, L1CAM-Neurocan und/oder L1CAM/Phosphocan Interaktion schließen. Diese Interaktion könnte einen weiteren Faktor zur Einbettung der Gefäße in die umliegende Matrix sowie Verstärkung der Stabilität der Basalmembran darstellen.

Um eine Migration der Endothelzellen und damit ein Auswachsen neuer Gefäße während der Angiogenese zu ermöglichen, muss die Basalmembran durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) zunächst abgebaut und später als Umhüllung der neu entstandenen Gefäße wieder aufgebaut werden (Grant und Kleinman, 1997). Neu gebildete Tumorgefäße zeigen dabei oft eine veränderte Basalmembranstruktur, die meist löchrig und fragmentiert ist (Nagy *et al.*, 1989). Dies könnte ebenfalls die veränderte Lokalisation des L1CAM im Tumorgewebe erklären. Die Ausschüttung angiogener Faktoren im Tumorgewebe vermittelt eine Expressionssteigerung der

CAMs auf Tumorendothel und sorgt für eine gesteigerte Adhäsions- und Migrationskapazität der Endothelzellen gegenüber der Basallamina (Albelda und Buck, 1990; Ruoslahti und Pierschbacher, 1987; Szekanecz und Szegedi, 1992). Verschiedene Autoren konnten einer erhöhten L1CAM Expression auf Tumor- und neuronalen Zellen eine verstärkte Motilität der Zellen auf EZM Proteinen zuweisen (Gast *et al.*, 2005; Gavert *et al.*, 2005; Mechtersheimer *et al.*, 2001; Silletti *et al.*, 2004; Thelen *et al.*, 2002). Die veränderte Lokalisation von L1CAM auf den Tumorendothelien von einer basolateralen zu einer luminalen Expression könnte auf einen Verlust der L1CAM-vermittelten Zell-Matrix Interaktionen und einer dadurch möglichen L1CAM-abhängigen Motilitäts-steigernden Wirkung auf den Endothelzellen hinweisen, was zu einer verstärkten Ausbildung von Gefäßstrukturen und dadurch zu einer verstärkten Vaskularisierung führen könnte. Des Weiteren könnte L1CAM durch die luminale Lokalisation an der Adhäsion und darauf folgenden Extravasation von immunmodulatorischen und/oder Tumorzellen beteiligt sein.

### **5.3.1 Die Tumormikromilieu induzierte endotheliale L1CAM Expression *in vitro***

Durch die Produktion von Stroma-modulierenden Faktoren wie u. a. VEGF, bFGF, Blutplättchen Wachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor*, PDGF), epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor Liganden (*epidermal growth factor receptor ligands*, EGFR Liganden) und immunmodulatorische Zytokine wie Interleukine, Kolonie-stimulierende Faktoren, TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$ , schaffen sich Tumorzellen ein dauerhaft anhaltendes, Progressions-förderndes Mikromilieu. Ähnlich wie bei der Wundheilung verschieben diese Faktoren die im Gewebe bestehende Homöostase und bewirken eine persistente, parakrine Induktion von Stromazellen, wie z. B. Endothelzellen. Die Aktivierung der Stromazellen bewirkt dann eine weitere zusätzliche Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (McCawley und Matrisian, 2001; Mueller und Fusenig, 2004). Diese Mechanismen können zu inflammatorischen Reaktionen und zur Angiogenese führen. Die Ausschüttung pro-angiogener Faktoren im Tumorgewebe könnte die L1CAM Expressionssteigerung des Tumorendothels *in situ* erklären. Hierzu müssten nicht-maligne Endothelzellen sensitiv auf eine Erhöhung pro-angiogener Faktoren reagieren.

Deshalb sollte festgestellt werden, ob die in einem allogenen Pankreas Tumorgewebe-Lysat vorhandenen pro-angiogenen Faktoren auch stimulierende Effekte auf die L1CAM Expression

auf nicht-malignen Endothelzellen *in vitro* zeigen. Die immunzytologischen Untersuchungen zeigten eine durch allogenes Pankreas Tumorgewebe-Lysat induzierte L1CAM Expressionssteigerung von HUVEC Zellen *in vitro* (Abbildung 4.6). Auch konnte durch Verwendung eines Pankreas Tumorzelllinien-Lysats eine L1CAM Expressionssteigerung auf HUVEC und HPMEC *in vitro* bewirkt werden (Abbildung 4.7 und 4.8).

Mehrere Autoren konnten bereits einen Einfluss des Tumormikromilieus auf die Expression verschiedener CAMs nachweisen. Nummer *et al.* (2007) konnten einen direkten Einfluss des Tumormikromilieus auf den Expressionsstatus verschiedener endothelialer CAMs belegen. Als Tumormikromilieu Imitat verwendeten die Autoren autologes Pankreas Tumorgewebe-Lysat. Durch Inkubation von Pankreas Tumorendothelzellen mit autologem Pankreas Tumorgewebe-Lysat konnte eine Expressionssteigerung verschiedener Ig-CAMs, u. a. ICAM-1, VCAM-1 und MAdCAM-1, auf den Pankreas Tumorendothelzellen induziert werden. Jain *et al.* (1996) berichten, dass HUVECs, die mit der interstitiellen Flüssigkeit von Tumortransplantaten inkubiert wurden, eine erhöhte ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin Expression zeigen. Diese Effekte können durch die Stimulation mit einem einzelnen Zytokin (TNF- $\alpha$ ) ausgelöst werden (Jain *et al.*, 1996).

Es ist anzunehmen, dass die durch das Tumorgewebe-Lysat induzierte L1CAM Expressionssteigerung auf den Kontrollendothelzellen durch verschiedene pro-angiogene Faktoren des Pankreas Tumorgewebe- bzw. Tumorzelllinien-Lysats zurückzuführen ist.

Verschiedene Zytokine konnten mit einer pro-angiogenen Wirkung in Verbindung gebracht werden. So wurden u. a. einige Interleukine, wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-18, der Hepatozyten Wachstumsfaktor (*hepatocyte growth factor*, HGF), der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-1 (*insulin-like growth factor-1*, IGF-1), TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  sowie TGF- $\beta$ 1 als angiogene Faktoren *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Aggarwal *et al.*, 2006; Bertolino *et al.*, 2005; Carmeliet und Jain, 2000; Frater-Schroder *et al.*, 1987; Jakob *et al.*, 2006; Korc, 2003; Sarma *et al.*, 1992). Dabei zeigen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 bi-funktionale Effekte auf das Endothelium *in vitro* und *in vivo*. Diese Zytokine können in geringen Konzentrationen die Proliferation und Migration von Endothelzellen stimulieren, in hohen Konzentration hingegen inhibitorisch auf Endothelzellen wirken. Die Zusammensetzung des Tumorgewebe-Lysats kann nicht nur pro-angiogene Wachstumsfaktoren sondern auch eine Reihe pro-angiogener Zytokine enthalten. In verschiedenen Tumorentitäten konnten erhöhte Mengen an immunmodulatorischen Zytokinen nachgewiesen werden. Beispielsweise zeigten sich in Melanomen, Brust- und Prostatakarzinomen erhöhte Mengen TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  (Aggarwal *et al.*, 2006; Jakob *et al.*,

2006; Teicher, 2007). In Pankreaskarzinomen wurden erhöhte Mengen von TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 und IFN- $\gamma$  detektiert (Friess *et al.*, 1999; Friess *et al.*, 1993; Le *et al.*, 2000). Dabei korrelierten die erhöhten TGF- $\beta$ 1 Mengen mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, stärkerer Metastasierung und einer schlechten Prognose bei den betroffenen Patienten (Friess *et al.*, 1993).

Es sollte untersucht werden, ob auch einzelne immunmodulatorische Zytokine eine L1CAM Expressionssteigerung bewirken können. Durch die immunzytologischen, durchflusszytometrischen und biochemischen Untersuchungen konnte eine durch TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  induzierte signifikante Expressionssteigerung von L1CAM sowohl auf Kontroll- (HUVEC und HPMEC) als auch auf Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro* gezeigt werden. Dabei wurde die stärkste L1CAM Expressionssteigerung auf den PAMEC detektiert (Abbildung 4.9 – 4.13).

Die Aktivierung von Endothelzellen durch immunmodulatorische Zytokine kann eine Veränderung der Ig-CAM Expression zur Folge haben. Beispielsweise konnte eine Stimulation von Endothelzellen durch TGF- $\beta$ 1 eine Expressionssteigerung verschiedener CAMs bewirken (Enestein *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1991; Szekanecz *et al.*, 1995). Viele Autoren belegen, dass IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  eine Expressionssteigerung von ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1 auf unterschiedlichen Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* induzieren (Jain *et al.*, 1996; Munro *et al.*, 1989; Pober *et al.*, 1986; Sana *et al.*, 2005; Sutton *et al.*, 1991; Tang und Hendricks, 1996; ten Kate *et al.*, 2006; Tudor *et al.*, 2001). Eine Zytokin-induzierte Regulation der L1CAM Expression konnte bereits auf unterschiedlichen Zellen nachgewiesen werden. In Ovarialkarzinomzellen wurde eine HGF-induzierte Erhöhung der L1CAM Expression nachgewiesen (Novak-Hofer *et al.*, 2008). Vorläufige Experimente konnten zeigen, dass eine HGF-induzierte Erhöhung der L1CAM Expression ebenfalls auf HUVEC nachweisbar ist (Daten nicht veröffentlicht). Die Inkubation von immortalisierten Epithelzellen des Pankreas mit TGF- $\beta$ 1 führt ebenfalls zu einer Erhöhung der L1CAM Expression. Alternativ konnte die L1CAM Expression durch Co-Kultur mit Pankreas Myofibroblasten, die TGF- $\beta$ 1 sezernieren, erhöht werden (Geismann *et al.*, 2008; zur Veröffentlichung eingereicht). Des Weiteren wurde eine TNF- $\alpha$ -induzierte L1CAM Expression auf dendritischen Zellen nachgewiesen (Pancook *et al.*, 1997). Die Zytokin-induzierte Expressionssteigerung von L1CAM auf den PAMEC könnte auf eine mögliche höhere Zytokinsensitivität der Tumorendothelzellen, ausgelöst durch erhöhte Expressionsmengen der jeweiligen Zytokin Rezeptoren, zurückzuführen sein. Fonsatti *et al.* (2003) konnten erhöhte Expressionsmengen von Endoglin, eine Komponente des TGF- $\beta$  Rezeptor Komplexes, auf proliferierenden Endothelzellen nachweisen. Weiterhin konnten die Autoren eine starke Expression von Endoglin auf neu ausgebildeten Gefäßen in einer Reihe



unterschiedlicher Karzinome detektieren. Ebenso wurden auf Leber Tumorendothelzellen erhöhte Mengen des TNF- $\alpha$  Rezeptors, TNFR2, nachgewiesen (Wu *et al.*, 2008).

Neben den durch TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 induzierten erhöhten L1CAM Proteinmengen konnten durch Zytokinstimulation erhöhte L1CAM mRNA Mengen in HUVEC und PAMEC detektiert werden (Abbildung 4.14 und 4.15). Die Veränderung der Ig-CAM Expression durch Endothelzellaktivierung mittels immunmodulatorischer Zytokine kann auch zu Veränderung der mRNA Mengen unterschiedlicher Ig-CAMs führen. Sana *et al.* (2005) konnten belegen, dass stimulatorische Effekte von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  ebenfalls auf erhöhte mRNA Mengen von ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1 zurückzuführen sind. Da die L1CAM mRNA Mengen nach TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  Stimulation jedoch nicht stark erhöht waren, ist zu vermuten, dass zusätzliche posttranskriptionelle Mechanismen, wie beispielsweise eine Stabilisierung der mRNA, eine gesteigerte Translationsrate, eine verstärkte Proteinakkumulation an der Zelloberfläche oder ein verringerter Proteinabbau, eine Rolle spielen könnten.

L1CAM kann durch ADAM10 oder ADAM17 Spaltung in eine lösliche Form überführt werden, die funktionell aktiv ist. Melanomzellen spalten L1CAM von der Zelloberfläche ab und bauen es in die benachbarte extrazelluläre Matrix ein (Montgomery *et al.*, 1996). Lösliches L1CAM kommt auch in malignem Aszites und Serum von Ovarialkarzinom Patientinnen vor (Fogel *et al.*, 2003a; Gutwein *et al.*, 2005). Es kann die Migration von Gliomzellen stimulieren (Izumoto *et al.*, 1996). Überdies induziert aus Aszites aufgereinigtes lösliches L1CAM die Zellmigration (Gutwein *et al.*, 2005). Gesteigerte CAM Expressionen auf Endothelien können auch eine gesteigerte Segregation von löslichen CAMs zur Folge haben (Blue *et al.*, 1993; Kawaguchi *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1994). Koch *et al.* (1994) bewiesen, dass lösliche Formen von VCAM-1 und E-Selektin als pro-angiogene Faktoren wirken können. Die Blockade dieser CAMs resultiert in einer verminderten Angiogenese *in vivo* (Koch *et al.*, 1994). Durch die durchflusszytometrischen Analysen konnte eine ADAM10 und ADAM17 Expression sowohl auf HUVEC und HPMEC als auch auf den PAMEC nachgewiesen werden (Abbildung 4.16 und 4.17). Allerdings konnte keine L1CAM Spaltung auf den Endothelzellen festgestellt werden (siehe Abschnitt 4.2.7). Diese Daten bestätigen die Befunde von Voura *et al.* (2001), die ebenfalls von einer fehlenden L1CAM Spaltung auf HPMEC *in vitro* berichteten. Ebenso Sebens Muerkoster *et al.* (2007) konnten auf Pankreaskarzinom Zellen keine L1CAM Spaltung *in vitro* nachweisen. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass in Pankreaskarzinomgeweben *in vivo* exprimiertes L1CAM gespalten wird und in löslicher Form als pro-angiogener Faktor wirken könnte.

Zusammenfassend lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen schließen, dass die

Tumorendothelzellen eine selektiv erhöhte Sensitivität gegenüber pro-angiogenen Faktoren zeigen, was u. a. zu einer gesteigerten L1CAM Expression führt. Die Expressionssteigerung könnte Veränderungen der Angiogenese, wie z. B. eine gesteigerte Migration und Bildung tubulärer Fortsätze der Endothelzellen, bewirken.

#### **5.4 Das Expressionsmuster der L1CAM Bindungspartner auf Endothelzellen *in vitro***

Verschiedene physiologische Prozesse wie Migration, Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von Zellen benötigen direkten Zell-Zell bzw. Zell-Matrix Kontakt. Diese Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen werden häufig durch homophilische oder heterophilische Bindungen verschiedener Ig-CAMs mit ihren jeweiligen Bindungspartnern vermittelt. Beispielsweise konnten für PECAM-1 homophilische Bindungen nachgewiesen werden, die während der Extravasation von Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Des Weiteren kann PECAM-1 auch heterophilische Bindung mit dem  $\alpha_v\beta_3$  Integrin eingehen (Jackson, 2003). ICAM-1 und VCAM-1 können beide heterophilische Bindungen eingehen. So stellt LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*, LFA-1) einen Interaktionspartner von ICAM-1 dar. VCAM-1 kann heterophilische Bindungen mit VLA-4 (*very late antigen-4*, VLA-4) eingehen. Sowohl die ICAM-1/LFA-1 als auch die VCAM-1/VLA-4 Bindungen sind als notwendige Ereignisse für die Extravasation verschiedener Zellen beschrieben worden (Engelhardt und Wolburg, 2004; Ley *et al.*, 2007).

L1CAM kann sowohl homophilische als auch heterophilische Bindungen mit einer Reihe verschiedener Bindungspartner eingehen. So wurden Interaktionen u. a. mit verschiedenen Integrinen, EZM Proteinen, wie Laminin, Neurocan und Phosphocan, Neuropilin-1 (NRP-1) und CD24 beschrieben (Blaess *et al.*, 1998; Ebeling *et al.*, 1996; Felding-Habermann *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 2004; Hall und Hubbell, 2004; Kleene *et al.*, 2001; Moos *et al.*, 1988; Oleszewski *et al.*, 1999; Reidy *et al.*, 2006; Ruppert *et al.*, 1995; Voura *et al.*, 2001).

Es sollte das Expressionsmuster von verschiedenen L1CAM Bindungspartnern auf den Endothelzellen *in vitro* untersucht werden. Hierbei wurden die bekanntesten Bindungspartner von L1CAM, also NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin untersucht. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten deutliche NRP-1 Expressionen auf allen drei Zelltypen. Die Zytokin Stimulation der Endothelzellen bewirkte sowohl auf den Kontroll- als auch auf den Tumorendothelzellen keine

Veränderung der NRP-1 Expression im Vergleich zu den nicht aktivierten Endothelzellen (Abbildung 4.18).

Die Bindung von L1CAM an NRP-1 wurde bisher hauptsächlich für neuronale Zellen beschrieben. Weiterhin wurde eine Interaktion von auf Ovarialkarzinomzellen exprimiertem L1CAM mit auf Mesothelzellen exprimiertem NRP-1 nachgewiesen (Stoeck *et al.*, 2006). Auf Neuronen interagiert L1CAM mit NRP-1 und ist damit Teil eines Rezeptorkomplexes, der für die Repulsion von Axonen durch Semaphorin3A (Sema3A) verantwortlich ist. Die Bindung von löslichem L1CAM an NRP-1 kann diese Repulsion umkehren (Castellani *et al.*, 2000; Castellani *et al.*, 2002). NRP-1 wird auch auf Endothelzellen exprimiert. (Staton *et al.*, 2007). Co-exprimiert mit dem VEGF Rezeptor 2 (VEGFR2) verstärkt NRP-1 die Bindung von VEGF-A165 an VEGFR2 auf Endothelzellen. Dabei bildet sich ein Komplex aus VEGFR2, NRP-1 und VEGF-A165, der eine verstärkte Aktivierung des VEGFR2 und dadurch eine VEGF-A165-vermittelte Proliferation und Migration der Endothelzellen bewirkt (Soker *et al.*, 1998). Eine NRP-1 Expression ist darüber hinaus für unterschiedliche Karzinome, u. a. Brust-, Prostata-, Lungen-, Pankreas- und Kolonkarzinom beschrieben worden (Kawakami *et al.*, 2002; Lantuejoul *et al.*, 2003; Latil *et al.*, 2000; Parikh *et al.*, 2004; Parikh *et al.*, 2003; Soker *et al.*, 1998). Die Expression von NRP-1 in Pankreaskarzinomen korreliert dabei mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten (Fukahi *et al.*, 2004; Parikh *et al.*, 2003). Auch auf Tumorzellen fördert NRP-1 die Motilität der Zellen. Die Überexpression von NRP-1 in einer Ratten Prostatakarzinomzelllinie führte zur verstärkten Migration und gleichzeitig zur erhöhten Bindung von VEGF-A165 *in vitro*. Zudem konnte bewiesen werden, dass NRP-1 in Tumorzellen, die keine Expression von VEGFR1 sowie VEGFR2 zeigten, die autokrine Funktion von VEGF und eine dadurch erhöhte Migration der Tumorzellen bewirkte (Bachelder *et al.*, 2001; Bachelder *et al.*, 2003; Soker *et al.*, 1998). Weiterhin konnten Murga *et al.* (2005) nachweisen, dass NRP-1 unabhängig von einer VEGF/VEGFR2-vermittelten Signalweiterleitung die Adhäsion von Endothelzellen an Proteine der EZM fördert. Diese Berichte lassen vermuten, dass eine Bindung von NRP-1 an einen anderen Bindungspartner, wie beispielsweise L1CAM, eine Steigerung der Migration und/oder Adhäsion von Endothelzellen bewirken könnte.

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten ebenfalls eine deutliche  $\beta_1$  Integrin Expression auf allen drei Zelltypen. Die Zytokin Stimulation der Endothelzellen bewirkte sowohl auf den Kontroll- als auch auf den Tumorendothelzellen keine deutliche Veränderung der  $\beta_1$  Integrin Expression im Vergleich zu den nicht aktivierten Endothelzellen (Abbildung 4.19).

Verschiedene Integrine stellen weitere Bindungspartner von L1CAM dar. Die  $\beta_1$  Integrin

Untereinheit bindet an L1CAM in Form von  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$  und  $\alpha_9\beta_1$  Integrin. Durch diese Bindungen kann eine Verstärkung der Zelladhäsion und -migration induziert werden (Silletti *et al.*, 2000). Die Expression von Integrinen auf Endothelzellen ist essentiell wichtig für Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen, welche zur Migration der Endothelzellen während der Angiogenese führen (Polverini, 1996). Endothelzellen exprimieren die Integrine  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_1$  (Rupp und Little, 2001; Stupack und Cheresch, 2002). Dabei wurden die Integrine  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$  und  $\alpha_5\beta_1$  als pro-angiogen identifiziert. Die Funktion der  $\beta_1$  Integrine umfasst die Aktivierung der Endothelzellproliferation und -migration sowie die Lumenformation während der Bildung tubulärer Fortsätze *in vitro* und *in vivo* (Mettouchi und Meneguzzi, 2006).  $\beta_1$  Integrin knock-out Experimente zeigten Defekte bei der Entwicklung des vaskulären Netzwerkes, welches bereits im Embryo zur Letalität führte (Fassler und Meyer, 1995; Stephens *et al.*, 1995; Tanjore *et al.*, 2008). Byzova *et al.* (2000) konnten eine  $\beta_1$  Integrin-vermittelte Migration von Endothelzellen in Abhängigkeit von VEGF nachweisen. Analysen von Integrin Expressionsprofilen konnten eine erhöhte Expression von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin auf Tumorendothelien belegen. Die Inhibition von sowohl  $\alpha_5\beta_1$  als auch  $\alpha_2\beta_1$  Integrin mit einem jeweils spezifischen blockierenden Antikörper bewirkte in beiden Fällen eine Inhibition der Angiogenese *in vivo* (Mettouchi und Meneguzzi, 2006).

Zusammenfassend lässt sich aus den vorliegenden Daten schließen, dass die endotheliale Integrin Interaktion mit der EZM von besonderer Bedeutung für den Stimulationsstatus der Endothelzellen ist. Somit können sowohl die physiologische als auch pathologische endotheliale Proliferation, Migration und Lumenformation, wenigstens zum Teil von der Signaltransduktion durch Integrine abhängen. Weiterhin ist in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Interaktion von  $\beta_1$  Integrin und L1CAM denkbar.

## 5.5 Die Rolle von endotheliale L1CAM für die Angiogenese

Der Prozess der Angiogenese kann in mehrere sequentielle Phasen unterteilt werden. Nach Aktivierung der Endothelzellen durch vom Tumor sezernierte, pro-angiogene Faktoren, erfolgt die Degradation der Basalmembran. Anschließend beginnen die Endothelzellen zu proliferieren und durch die EZM zu migrieren. Durch Polarisation der migrierenden Endothelzellen und Ausbildung der Zell-Zell Kontakte kommt es schließlich zur Bildung tubulärer Fortsätze. Abschließend erfolgt die Generierung der Basalmembran und die Stabilisierung der neu

gebildeten Zell-Zell Kontakte durch Rekrutierung von glatten Muskelzellen und Perizyten (Abbildung 1.2) (Folkman, 1984).

### 5.5.1 Endotheliales L1CAM erhöht die Transmigrationskapazität von Endothelzellen *in vitro*

Die Zellmigration entsteht durch die dynamische Interaktion zwischen einer Zelle und dem umgebenden Substrat, wodurch eine direktionale Bewegung entlang eines Gradienten von löslichen, chemoattraktiven Stoffen erfolgt. Dabei kommt es zur Aktinpolymerisierung und Bildung von Zellausläufern in Migrationsrichtung, die durch Interaktionen von CAMs mit der EZM stabilisiert werden (Huttenlocher *et al.*, 1995). Wie bewiesen werden konnte, zeigte das Pankreas Tumorgewebe eine stärkere Vaskularisierung und die Tumorendothelien exprimierten im Vergleich zu den Kontrollendothelien verstärkt L1CAM *in situ*. Da die Migration einen Teilprozess der Angiogenese darstellt, sollte untersucht werden, ob die stärkere Vaskularisierung im Pankreas Tumorgewebe *in situ* mit einer erhöhten Transmigrationskapazität der Pankreas Tumorendothelzellen *in vitro* korreliert ist. Die Analysen der basalen Transmigrationskapazität, d. h. ohne chemoattraktiven Stimulus, zeigten eine auf das 2fache gesteigerte Transmigrationskapazität der Tumorendothelzellen (PAMEC) im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen (HUVEC) (Abbildung 4.20). Obwohl die PAMEC im Vergleich zu den HUVEC und HPMEC die niedrigste CXCR4 Expression zeigten (Abbildung 4.21), konnte auch bei der SDF-1 $\beta$ -vermittelten, chemotaktischen Migration der stärkste Anstieg der Transmigrationsrate für die PAMEC festgestellt werden. Die Transmigrationsrate der PAMEC war um 129% im Vergleich zu den HUVEC und um 44% im Vergleich zu den HPMEC gesteigert (Abbildung 4.23).

Im Vergleich zu Endothelien in normalen Geweben verhalten sich Tumorendothelien stark abweichend. Tumorendothelzellen zeigen einen veränderten Phänotyp, der dem einer aktivierten Endothelzelle im inflammatorischen Zustand ähnelt. Dies äußert sich u. a. in einer veränderten Motilität des Tumorendothels (Engelhardt und Wolburg, 2004; Kawai *et al.*, 2000). So wurde für Tumorendothelien unterschiedlicher Organherkünfte mehrfach eine erhöhte Migrationskapazität nachgewiesen. Charalambous *et al.* (2005) konnten belegen, dass aus Gehirntumoren isolierte Tumorendothelzellen eine verstärkte basale Migrationskapazität zeigen. Ebenfalls Grange *et al.* (2006) wiesen eine erhöhte Motilität für aus Brusttumoren isolierte Endothelzellen nach.

Die CAM-vermittelten Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionen spielen eine wichtige Rolle bei Migrations- und Proliferationsprozessen von Zellen (Crossin und Krushel, 2000; Juliano, 2002).

L1CAM kann auf verschiedenen Zellen die Migration fördern. Deshalb sollte ein möglicher Effekt von L1CAM auf die Migrationskapazität der Endothelzellen getestet werden. Des Weiteren sollte ein möglicher Einfluss der L1CAM Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin auf die Migrationskapazität der Endothelzellen untersucht werden. Durch Blockade der Transmigration mit L1CAM, NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin spezifischen mAk konnten starke Inhibitionseffekte auf den Tumorendothelzellen bewirkt werden. Dabei bewirkte sowohl die Blockade von L1CAM als auch von den jeweiligen Bindungspartnern ähnlich starke Inhibitionen, die zwischen 41% und 48% lagen (Abbildung 4.24). Wie bereits beschrieben, stellen sowohl L1CAM als auch NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin Proteine dar, die nach selektiver Bindung einen Migrations-fördernden Einfluss auf unterschiedliche Zellen haben (siehe Abschnitt 5.5). Die Daten zeigen, dass ebenfalls für die Transmigrationskapazität von Tumorendothelzellen sowohl L1CAM als auch NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin wenigstens teilweise funktionell notwendig sind, beweisen aber gleichzeitig, dass die Migration auch noch über weitere, hier nicht untersuchte Parameter induziert werden kann.

Sowohl in neuronalen als auch in Tumorzellen ist L1CAM an der Migration beteiligt. Eine erhöhte L1CAM Expression auf Tumorzellen führt zu einer verstärkten Motilität der Zellen auf EZM Proteinen und einer erhöhten Invasivität *in vitro* (Gast *et al.*, 2005; Gavert *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2006; Shtutman *et al.*, 2006). Durch Mutation von zwei zytoplasmatischen Aminosäuren von L1CAM kann die Migration und Invasion von Tumorzellen *in vitro* auf Ebene von L1CAM negativen Zellen reduziert werden. Lösliches L1CAM kann ebenfalls die Zellmigration stimulieren. Die Daten von Mechttersheimer *et al.* (2001) belegen, dass von der Zelloberfläche gespaltenes L1CAM durch autokrine oder parakrine Bindung an  $\alpha_v\beta_5$  Integrin eine Erhöhung der Migration induzieren kann. Des Weiteren konnten Gutwein *et al.* (2005) eine Stimulation der Zellmigration durch Inkubation mit aus Aszitesflüssigkeit isoliertem löslichem L1CAM nachweisen.

Andere Ig-CAMs konnten ebenfalls mit einer Migrations-fördernden Funktion in Verbindung gebracht werden. So ist NCAM funktionell wichtig für die Zellmigration von Neuronen während der Entwicklung des Nervensystems (Kiss *et al.*, 2001; Povlsen *et al.*, 2003; Walsh und Doherty, 1997). Ebenfalls moduliert endothelial exprimiertes PECAM-1 die Endothelzellmigration. Verschiedene Autoren belegen eine Inhibition der Migration von PECAM-1 auf Endothelzellen *in vitro* (Schimmenti *et al.*, 1992; Sheibani und Frazier, 1998). Allerdings konnten Gratzinger *et al.* (2003) nachweisen, dass PECAM-1 zwar die Einzelzellmigration *in vitro* blockiert, jedoch für die Migration von Endothelzellen während der Wundheilung *in vivo* notwendig ist.

Für NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin konnte ebenfalls ein Migrations-fördernder Einfluss nachgewiesen

werden. Wie zuvor beschrieben, fördert NRP-1 die Motilität von Tumorzellen. Es konnte bewiesen werden, dass NRP-1 in Tumorzellen, die keine Expression von VEGFR1 sowie VEGFR2 zeigten, die autokrine Funktion von VEGF und eine dadurch erhöhte Migration der Tumorzellen bewirkte (Bachelder *et al.*, 2001; Bachelder *et al.*, 2003; Soker *et al.*, 1998).

Das  $\alpha_2\beta_1$  und das  $\alpha_5\beta_1$  Integrin bewirken eine Migration von Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* (Kim *et al.*, 2000; Leavesley *et al.*, 1993).

Zusammenfassend lassen die Daten darauf schließen, dass L1CAM eine wichtige Rolle in Migrationsprozessen spielt, wie beispielsweise bei der Angiogenese durch Endothelzellen, sowie der Metastasierung und der Neovaskularisierung im Zuge des inflammatorischen peritumoralen Mikromilieus.

### 5.5.2 Interaktion von endotheliale L1CAM mit den Bindungspartnern NRP-1 und $\beta_1$ Integrin *in vitro*

Interaktionen von Bindungspartnern können verschiedene Prozesse in Zellen, wie beispielsweise Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Zellzyklus sowie Adhäsion und Migration, modulieren. Die Interaktionen können dabei in *cis*, d. h. durch Ligation der Bindungspartner innerhalb der gleichen Zellmembran, oder in *trans*, d. h. durch Interaktion der Bindungspartner zwischen benachbarten Zellen bzw. Bindung eines löslichen Liganden, stattfinden. Diese Interaktionen können z. B. eine Konformationsänderung oder Aktivierung der bindenden Proteine bewirken, welches im Anschluss meist eine ins Zellinnere weitergeleitete Signalkaskade auslöst. Eine *cis*-Interaktion konnte beispielsweise zwischen dem karzinoembryonalen Antigen Zelladhäsionsmolekül 1 (*carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1*, CEACAM1) und  $\beta_3$  Integrin in der invasiven Front maligner Melanome nachgewiesen werden. Da eine erhöhte Migration eine notwendige Voraussetzung für Invasionsprozesse darstellt, spekulieren die Autoren auf eine Migrations-fördernde Rolle der *cis*-Bindung von CEACAM1 und  $\beta_3$  Integrin (Brummer *et al.*, 2001). Um mögliche L1CAM Interaktionen mit den untersuchten Bindungspartnern festzustellen, wurde der Effekt einer additiven Inhibition der Transmigration von Endothelzellen untersucht. Eine nicht-additive Inhibition der Transmigration würde einen Hinweis für eine Interaktion zwischen L1CAM und dem jeweiligen Bindungspartner darstellen. Die Untersuchungen zeigten bei gleichzeitiger Inhibition von L1CAM und NRP-1 sowie L1CAM und  $\beta_1$  Integrin auf den Endothelzellen keine signifikante Erhöhung der Transmigrationsblockade (Abbildung 4.25 und 4.26).

Eine *cis*-Bindung von L1CAM und NRP-1 konnte bereits auf neuronalen Zellen nachgewiesen werden. Dabei kommt es zu einer Komplexbildung mit Plexin-A1 als dritte Komponente auf der Zelloberfläche in Wachstumskegeln von Axonen (Castellani *et al.*, 2002). Des Weiteren konnten auch Thelen *et al.* (2002) nachweisen, dass eine Interaktion von L1CAM mit  $\alpha_5\beta_1$  Integrin zu einer erhöhten Migration von neuronalen Zellen *in vitro* führt.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Bindung von L1CAM an NRP-1 und/oder an  $\beta_1$  Integrin ebenfalls eine Rolle bei Transmigrationsprozessen von Endothelzellen spielen könnte. Da es sich bei den Experimenten um eine Migration einzelner Zellen handelt, ist zu vermuten, dass die möglichen Interaktionen zwischen L1CAM und dem Bindungspartner in *cis* erfolgen. Durch die Inhibition von L1CAM und dem Bindungspartner konnte jedoch keine vollständige Blockade der Transmigration bewirkt werden. Deshalb ist anzunehmen, dass die Migration zusätzlich über weitere, hier nicht untersuchte Parameter induziert werden kann, die als weitere Komponente in einem L1CAM/NRP-1 bzw. L1CAM/ $\beta_1$  Integrin Komplex oder unabhängig von diesen Komplexen wirken könnte.

### 5.5.3 Endotheliales L1CAM erhöht die Angiogenesekapazität von Endothelzellen *in vitro*

Ein weiterer wichtiger Prozess der Angiogenese ist die Bildung einer dreidimensionalen Gefäßstruktur, die im Anschluss an die Migration der Endothelzellen erfolgt. Endothelzellen sind in der Lage, Gefäß-ähnliche Strukturen *in vitro* auf unterschiedlichen Matrices spontan auszubilden. Querschnitt-Analysen von diesen *in vitro* gebildeten tubulären Fortsätzen ergaben eine dreidimensionale Struktur der Fortsätze. Es bildete sich ein von Endothelzellen umgebenes Lumen aus. Die Interaktion der Endothelzellen erfolgt dabei über die Ausbildung von Protein-Komplexen, vermittelt u. a. durch homophile PECAM-1 Bindung, an den Zell-Zell Kontakten (*cell-cell junctions*) (Auerbach *et al.*, 2003; Folkman und Haudenschild, 1980).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Tumorendothelzellen eine erhöhte Migrationskapazität aufweisen und dass sowohl L1CAM als auch dessen Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin für die Transmigrationskapazität der Tumorendothelzellen funktionell notwendig sind, sollte geklärt werden, ob die Tumorendothelzellen auch eine erhöhte angiogenetische Kapazität aufweisen. Weiterhin sollte ein funktioneller Einfluss von L1CAM und dessen Bindungspartnern auf die angiogenetische Kapazität der Endothelzellen festgestellt werden.

Die Untersuchungen ergaben eine selektive Erhöhung der Angiogenesekapazität der PAMEC um 30% im Vergleich zu den HUVEC bzw. um 40% im Vergleich zu den HPMEC (Abbildung 4.27



A und B). Die Blockaden der Bildung tubulärer Fortsätze mittels L1CAM, NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin spezifischer mAk zeigten sowohl für L1CAM als auch für dessen Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin starke Inhibitionseffekte auf den Tumorendothelzellen. Dabei bewirkte die Blockade von L1CAM (72% Inhibition) die stärksten Effekte auf den Tumorendothelzellen (Abbildung 4.28 und 4.29).

Bereits mehrere Autoren konnten für verschiedene Tumorendothelzellen eine erhöhte Angiogenese *in vitro* bestätigen. So zeigten Bussolati *et al.* (2003) eine erhöhte Angiogenesekapazität für Nieren Tumorendothelzellen *in vitro*. Auch Versuche mit aus Brustkarzinomen isolierten Tumorendothelzellen konnten diese Befunde bestätigen (Grange *et al.*, 2006).

Sowohl NRP-1 als auch  $\beta_1$  Integrin konnten als notwendige Faktoren für die Bildung tubulärer Fortsätze *in vitro* identifiziert werden. Murga *et al.* (2005) konnten durch siRNA knock-out von NRP-1 zeigen, dass NRP-1 essentiell notwendig für die Bildung tubulärer Fortsätze von HUVEC *in vitro* ist. Ebenso erwies sich  $\alpha_5\beta_1$  Integrin als ein notwendiger Faktor für die Bildung tubulärer Fortsätze *in vitro* (Bayless *et al.*, 2000). Dabei könnten homophilische L1CAM Bindungen an den Kontaktstellen benachbarten Zellen wichtig sein, welche die Interaktionen der Endothelzellen bei der Ausbildung der dreidimensionalen Lumenstruktur verstärken. Aber auch heterophilische Bindungen von L1CAM mit einem der potentiellen Bindungspartner NRP-1 und/oder  $\beta_1$  Integrin könnten für die Ausbildung der dreidimensionalen Lumenstruktur eine Rolle spielen. Andere Ig-CAMs wurden bereits mit einer funktionellen Rolle für die Bildung tubulärer Fortsätze in Verbindung gebracht. Sowohl PECAM-1 als auch ICAM-2 sind essentiell notwendig für die Bildung tubulärer Fortsätze von Endothelzellen *in vitro*. Dabei stellen die homophilen PECAM-1 Bindungen an den Zellkontaktstellen einen wichtigen Faktor zur Stabilität der Lumenstruktur dar (Yang *et al.*, 1999).

Nachdem der Hinweis einer möglichen Interaktionen von endotheliale L1CAM mit NRP-1 bzw.  $\beta_1$  Integrin während der Transmigration von Endothelzellen festgestellt wurde, sollte die Relevanz einer möglichen L1CAM Interaktion mit diesen potentiellen Bindungspartnern für die Angiogenesekapazität der Endothelzellen untersucht werden.

Die gleichzeitige Inhibition von L1CAM und NRP-1 sowie L1CAM und  $\beta_1$  Integrin auf den Endothelzellen bewirkte keine signifikante Erhöhung der Bildung tubulärer Fortsätze *in vitro*. Auch hier wurden die stärksten Inhibitionen auf den Tumorendothelzellen detektiert (Abbildung 4.30 – 4.31). Ähnlich wie bei der Transmigration deuten diese Ergebnisse auf eine L1CAM/NRP-1 und/oder L1CAM/ $\beta_1$  Integrin Interaktion hin. Da auch in diesem System keine

vollständige Inhibition detektiert werden konnte, ist anzunehmen, dass ebenfalls die Bildung tubulärer Fortsätze über weitere, hier nicht untersuchte Parameter induziert werden kann, die als zusätzliche Komponente in einem L1CAM/NRP-1 bzw. L1CAM/ $\beta_1$  Integrin Komplex oder unabhängig von diesen Komplexen wirken könnte.

Wie gezeigt werden konnte, induziert die Stimulation der Endothelzellen mit immunmodulatorischen Zytokinen eine Expressionssteigerung von L1CAM mit der stärksten L1CAM Expression auf den Tumorendothelzellen. Durch die dadurch erhöhte L1CAM Menge auf der Zelloberfläche kommt es zu einer Verdichtung der Zelloberflächenproteine. Es erhöht sich demnach die Wahrscheinlichkeit, dass L1CAM und die potentiellen Bindungspartner, d. h. NRP-1 und/oder  $\beta_1$  Integrin, in räumliche Nähe zueinander gelangen, wodurch eine spontane Interaktion zwischen L1CAM und den jeweiligen Bindungspartnern wahrscheinlicher wird. Diese Mechanismen könnten für eine L1CAM-vermittelte Verstärkung der Transmigrations- und Angiogenesekapazität der Tumorendothelzellen *in vitro* sprechen.

Durch Imitation der Tumormikromilieus mit allogenen Pankreas Tumorgewebe-Lysat oder Panc1 Tumorzelllinien-Lysat konnte eine L1CAM Expressionssteigerung auf den Kontrollendothelzellen *in vitro* nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten die Tumorendothelien eine hohe Transmigrations- und Angiogeneserate, welche deutlich über der Rate der Kontrollendothelien lag. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Expressionssteigerung von L1CAM auf den Tumorendothelzellen einen wichtigen Faktor für die Transmigrations- und Angiogenesekapazität *in vitro* darstellt. Die Imitation des Tumormikromilieus durch Zugabe von Tumorzelllinien-Lysat steigerte die Angiogeneserate von HUVEC um 40% (Abbildung 4.32). Eine Blockade von L1CAM und NRP-1 auf diesen Zellen bewirkte eine verstärkte Inhibitionen der Bildung tubulärer Fortsätze (Abbildung 4.33). Diese Ergebnisse bestätigen den Einfluss des Tumormikromilieus auf die Endothelzellen. Das Tumormikromilieu bewirkt eine Erhöhung der L1CAM Expression und zusätzlich der Angiogenesekapazität der Endothelzellen *in vitro*.

### **5.6 Die Rolle von endotheliale L1CAM für Metastasierungsprozesse**

Wie nachgewiesen werden konnte, zeigte das Pankreas Tumorgewebe eine stärkere Vaskularisierung *in situ*. Die Tumorendothelzellen exprimierten im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen verstärkt L1CAM *in situ* und *in vitro*. Weiterhin konnte belegt werden, dass die L1CAM Expressionssteigerung der HUVEC, HPMEC und PAMEC *in vitro* durch

Imitation des Tumormikromilieus mittels Tumorgewebe- bzw. Tumorzelllinien-Lysate induziert werden kann. Ebenso konnte die Hochregulation von endotheliale L1CAM *in vitro* durch Stimulation mit immunmodulatorischen Zytokinen induziert werden. Dabei zeigten die Tumorendothelzellen im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen eine selektiv erhöhte Sensitivität gegenüber der Zytokinstimulation, was sich in einer deutlich stärkeren Expressionssteigerung von L1CAM äußerte. Die Tumorendothelzellen zeigten weiterhin eine selektiv erhöhte Migrations- und Angiogenesekapazität *in vitro*, welche deutlich über der Rate der Kontrollendothelzellen lag. Die Inhibition von L1CAM und dessen Bindungspartnern NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin verringerte die Migrations- und Angiogeneserate der Tumorendothelzellen *in vitro*.

Das Wachstum eines Primärtumors ist aufgrund der Diffusionsgrenze auf eine Größe von 1-2mm<sup>3</sup> beschränkt. Ein weiteres Wachstum des Tumors geht mit einer Vaskularisierung des Tumorgewebes einher. Die dadurch lokal erhöhte Gefäßdichte des Gewebes bildet die Basis für die Infiltration der Tumorzellen in das Blut- bzw. Lymphgefäßsystem. Angiogenese ist somit eine notwendige Voraussetzung für die Metastasierung von Primärtumoren.

Eine L1CAM Expression von Tumorzellen ist mehrfach als ein relevanter Faktor für die Metastasierung der jeweiligen Tumorentitäten beschrieben worden. Dabei fördert eine erhöhte L1CAM Expression die Invasions- und Migrationskapazität von Tumorzellen und begünstigt dadurch die Metastasierung (Gast *et al.*, 2005; Gavert *et al.*, 2005; Gavert *et al.*, 2007; Ohnishi *et al.*, 1998). Weiterhin konnte durch histologische Untersuchungen von Brust-, Leber- und Lymphknotenmetastasen von Ovarial- und Kolonkarzinomen eine L1CAM Expression *in situ* nachgewiesen werden (Huszar *et al.*, 2006). Bisher wurde jedoch nicht geklärt, welche Rolle endotheliales L1CAM bei der Metastasierung von Tumoren spielt.

Der Prozess der Metastasierung lässt sich in eine Reihe sequentieller Schritte unterteilen. Initiiert wird die Metastasierung durch eine Invasion der Tumorzellen in das anliegende, nicht-maligne Gewebe. Dabei kommt es zu Veränderungen der CAM-vermittelten Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsion der Tumorzellen, zur proteolytischen Degradation des umliegenden Gewebes sowie zur erhöhten Motilität der Tumorzellen. Die Intravasation der Blut- bzw. Lymphgefäße durch Tumorzellen erfolgt meist in dünnwandigen Kapillaren, die den eindringenden Tumorzellen einen relativ geringen Widerstand bieten. Die Intravasation kann über eine CAM-vermittelte transendotheliale Migration erfolgen. Die meisten zirkulierenden Tumorzellen werden anschließend durch das Immunsystem detektiert und zerstört. Einige wenige Tumorzellen können jedoch an Gefäßwände von entfernt liegenden, sekundären Organen adhären und durch eine CAM-vermittelte Extravasation ins anliegende Gewebe gelangen. Durch Bildung eines

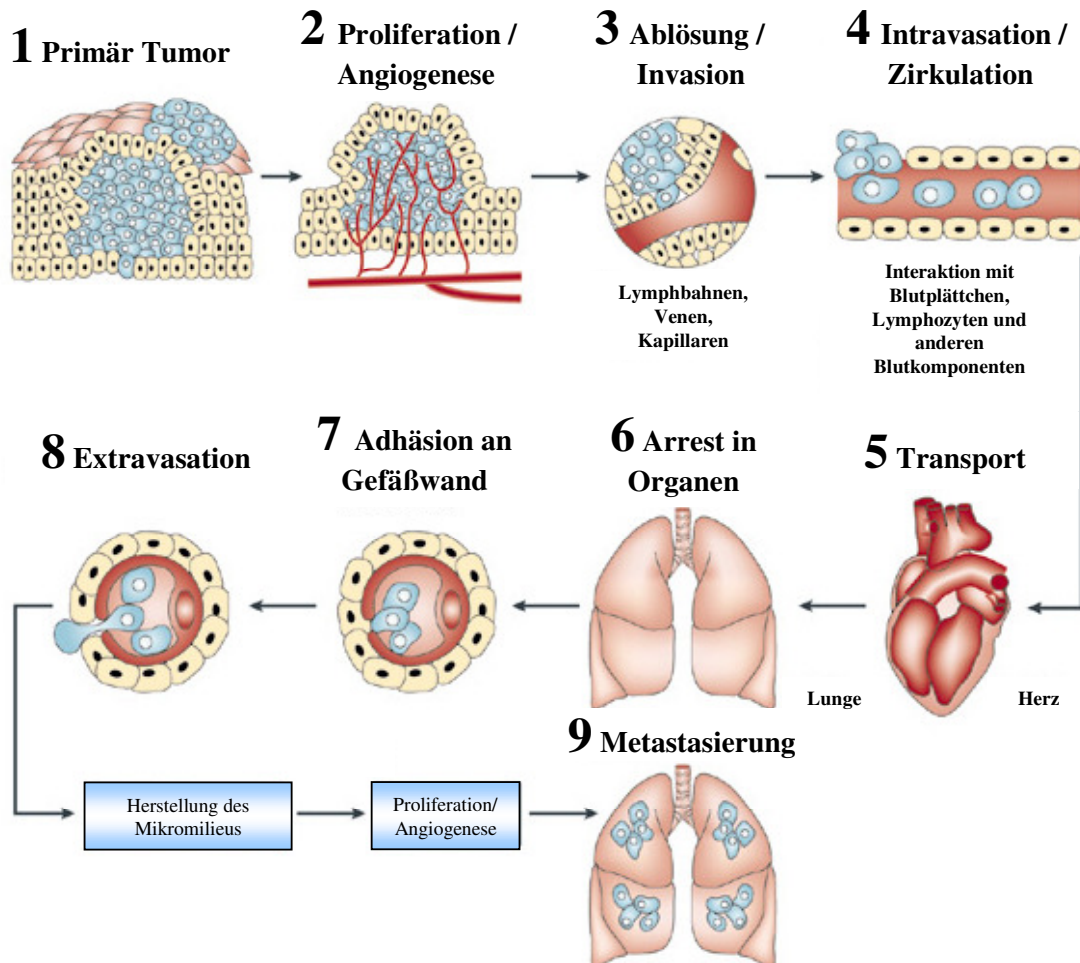
Wachstums-fördernden Mikromilieus entstehen dort Mikrometastasen. Für ein weiteres Wachstum der Mikrometastasen wird die Ausbildung eines vaskulären Netzwerkes benötigt. Diese Vaskularisierung schafft die Grundlage für eine weitere Sub-Metastasierung ausgehend von den Metastasen in sekundären Organen. Von Metastasen abgelöste Tumorzellen können dann wiederum erneut in das Blut- bzw. Lymphgefäßsystem infiltrieren und weitere Metastasen bilden (Abbildung 5.1) (Fidler, 2003; Mehlen und Puisieux, 2006; Steeg, 2006).

Die Metastasierung in sekundäre Organe stellt kein zufälliges Muster dar, sondern scheint auf bestimmte sekundäre Organe gerichtet zu sein. Bereits 1889 formulierte Stephen Paget die „*Seed and Soil*“ Hypothese. Dabei stellt das Mikromilieu von unterschiedlichen Organen („*soil*“) einen wichtigen Unterscheidungsfaktor dar, der für eine selektive Bindung der metastasierenden Tumorzellen („*seed*“) an bestimmte Organe verantwortlich ist und weiterhin den Phänotyp der sich entwickelnden Metastasen beeinflusst. Beispielsweise zeigen Endothelzellen in unterschiedlichen Organen ein unterschiedliches Expressionsmuster an Zelloberflächenproteinen, wodurch es durch sequentielle Interaktionen der endothelialen Zelloberflächenproteine mit den jeweiligen Liganden von interagierenden Zellen zu gewebsspezifischen Adhäsionen und Transmigrationen kommen kann. Auch die Zusammensetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen kann von Organ zu Organ unterschiedlich sein (Fidler, 2003).

Die Adhäsion von Tumorzellen an mikrovaskuläre Gefäße und die anschließende Transmigration der Tumorzellen durch das Endothelzell-Monolayer sind wichtige sequentielle Schritte, die sowohl für die Intravasation der Tumorzellen in das Blut- bzw. Lymphgefäßsystem als auch für die Extravasation der zirkulierenden Tumorzellen in das angrenzende Gewebe des Zielorgans während der Metastasierung eine wichtige Rolle spielen. Dabei stellen die Adhäsion und die Transmigration der Tumorzellen spezifische und hoch selektive Prozesse dar, die hauptsächlich durch Selektine, Integrine und Ig-CAMs reguliert werden.

Aufgrund ähnlicher CAM Expressionsprofile von Tumorzellen und Leukozyten postulieren verschiedene Autoren, dass die Mechanismen der Extravasation von Leukozyten auch als Model für die Extravasation von Tumorzellen angenommen werden kann (Bockhorn *et al.*, 2007; Miles *et al.*, 2008). Bei der Extravasation von im Blutgefäßsystem zirkulierenden Zellen spielen CAMs eine wichtige Rolle. Die Vorgänge der Extravasation können in einzelne sequentielle Schritte unterteilt werden. Nach der ersten Annäherung der Zelle erfolgt ein Selektin-vermitteltes Rollen der Zelle auf dem Zytokin-aktivierten Endothel, wodurch eine Verlangsamung der Zelle am Endothel bewirkt wird. Die Rollphase sorgt dabei mit den stark ausgeprägten Interaktionsmöglichkeiten für eine durch Chemokine ausgelöste Aktivierung beider Interaktionspartner. Durch eine verstärkte Bindung von Integrinen an die korrespondierenden

endothelialen Liganden wird schließlich der Arrest der Zelle am Endothel bewirkt (siehe Abschnitt 1.3).



**Abbildung 5.1:** Der Prozess der Metastasierung besteht aus mehreren Phasen. Das Wachstum des Primärtumors erfolgt bis zu einer Größe von 1-2mm<sup>3</sup>. Ein weiteres Wachstum des Tumors geht einher mit einer starken Vaskularisierung des Tumorgewebes. Eine lokale Invasion von Tumorzellen in das umgebende Stroma führt zur Intravasation der Tumorzellen in das Blut- bzw. Lymphgefäßsystem. Die zirkulierenden Tumorzellen adhäreren an die Gefäßwände von entfernt liegenden Organen und gelangen durch Extravasation ins anliegende Gewebe. Durch Bildung eines Wachstums-fördernden Mikromilieus entstehen dort Mikrometastasen, die weiter proliferieren können und Angiogenese induzieren. Abgelöste Tumorzellen der Metastasen können dann erneut in das Blut- bzw. Lymphgefäßsystem infiltrieren und weitere Metastasen bilden (geändert nach Fidler, 2003).

Die Adhäsionskapazität von Panc1 Tumorzellen an Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro* (Abbildung 4.35 A und B) war im Vergleich zur Adhäsion an Kontrollendothelzellen signifikant gesteigert (HUVEC + 300%; HPMEC + 170%).

Der veränderte Phänotyp von Tumorendothelzellen äußert sich nicht nur in einer veränderten Motilität des Tumorendothels, sondern auch in veränderten Adhäsionseigenschaften. So konnten mehrere Autoren eine selektiv erhöhte Bindung von Lymphozyten und Natürlichen Killer (NK-) Zellen an Tumorendothelzellen nachweisen (Melder *et al.*, 1996; Nummer *et al.*, 2007; Salmi *et al.*, 1995). Ebenso konnte eine selektiv erhöhte Adhäsion von Tumorzellen an Nieren Tumorendothelzellen nachgewiesen werden (Bussolati *et al.*, 2003; Fonsato *et al.*, 2006). Die nachgewiesene selektiv erhöhte Adhäsion der Panc1 Tumorzellen an das Pankreas Tumorendothel belegt eine selektiv verstärkte Interaktion der Tumorzellen mit dem Tumorendothel im Vergleich zum Kontrollendothel. Da die Adhäsion die erste Phase der Extravasation durch das Endothel darstellt, könnte diese selektiv erhöhte Adhäsion an das Tumorendothel die Wahrscheinlichkeit der Intravasation der Tumorzellen ins Blutgefäßsystem und der Extravasation der Tumorzellen in ein sekundäres Organ erhöhen.

Die u. a. durch Zytokine hervorgerufene physiologische Expressionssteigerung von Ig-CAMs während einer Inflammation führt zu einem Tumorendothel-ähnlichen Phänotyp. Beispielsweise konnte eine erhöhte ICAM-1 und VCAM-1 Expression sowohl auf Tumorendothel, als auch auf inflammatorischem Endothel nachgewiesen werden. Demnach könnte die Adhäsion und Transmigration von Tumorzellen bevorzugt an Zytokin-aktivierte Endothelien stattfinden. Die *in vitro* durch TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 bewirkte Expressionssteigerung von L1CAM auf den unterschiedlichen Endothelien (HUVEC, HPMEC und PAMEC) könnte folglich eine organspezifische Tumorzelladhäsion sowie -transmigration erleichtern, ähnlich wie unter inflammatorischen Bedingungen. Die Expressionsmuster der Ig-CAMs auf den Endothelzellen und den korrespondierenden Bindungspartnern auf den Tumorzellen könnten demzufolge u. a. regulatorische Funktionen für die organspezifische Tumorzelladhäsion und -transmigration besitzen.

Um eine funktionelle Bedeutung des endothelialen L1CAM, bzw. seiner jeweiligen Bindungspartner nachzuweisen, wurden die jeweiligen Proteine selektiv mit einem mAk blockiert, bevor die Adhäsionskapazität erneut quantifiziert wurde.

Die Adhäsion von Panc1 Tumorzellen an Endothelzell-Monolayer wurde sowohl durch L1CAM spezifische mAk als auch durch NRP-1 und  $\beta$ <sub>1</sub> Integrin spezifische mAk inhibiert. Dabei wurde die Adhäsionskapazität an Tumorendothel im Vergleich zu Kontrollendothel deutlich stärker inhibiert. Die Antikörper induzierte Inhibition von L1CAM resultierte dabei in einer um 82% verminderten Adhäsionskapazität der Tumorzellen an Tumorendothelzellen (Abbildung 4.36 und 4.37).

Verschiedene CAMs wurden bereits mit einer funktionellen Rolle für die Adhäsion von unterschiedlichen Zellen ans Endothel in Verbindung gebracht. Dabei wird die Adhäsion verschiedener Zellen ans Tumorendothel durch erhöhte Expressionsmengen von verschiedenen Ig-CAMs, hauptsächlich ICAM-1 und VCAM-1, vermittelt (Campbell und Butcher, 2000; Jain *et al.*, 1996).

L1CAM konnte ebenfalls als notwendiges Protein für die Adhäsion identifiziert werden. So konnte eine essentielle Rolle von L1CAM bei der Zell-Zell Adhäsion von Neuronen nachgewiesen werden (Rathjen und Rutishauser, 1984). Stoeck *et al.* (2006) konnten weiterhin eine L1CAM-vermittelte Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen an immobilisierte Mesothelzellen zeigen. Die Autoren konnten nachweisen, dass diese L1CAM-vermittelte Adhäsion über eine *trans* Bindung an NRP-1 erfolgt. Die Expression von L1CAM in verschiedenen Karzinomen korreliert mit der Tumorprogression und Metastasierung (Fogel *et al.*, 2003b), was u. a. durch eine L1CAM-vermittelte Adhäsion und Migration der Tumorzellen induziert wird (Beer *et al.*, 1999; Felding-Habermann *et al.*, 1997; Montgomery *et al.*, 1996).

Die Bindungspartner von L1CAM (NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin) konnten zusätzlich als notwendige Faktoren für die Adhäsion von Zellen identifiziert werden. Murga *et al.* (2005) belegten, dass NRP-1 die Adhäsion von Endothelzellen an Proteine der EZM fördert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NRP-1 für die Bindung von dendritischen Zellen an T-Zellen notwendig ist (Tordjman *et al.*, 2002).

Wie zuvor beschrieben, spielt  $\beta_1$  Integrin, eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Leukozyten an aktiviertes Endothel. Dabei stellt es, exprimiert auf der adhärierenden Zelle, den Hauptbindungspartner von endotheliale VCAM-1 dar. Allerdings konnten Price *et al.* (1996) nachweisen, dass die Expression von  $\beta_1$  Integrin auf Tumorzellen und Endothelzellen funktionell notwendig für die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen *in vitro* ist.

Durch Vorinkubation der Tumor- bzw. Endothelzellen konnte weiterhin analysiert werden, auf welchen Zellen die Expression von L1CAM und dessen Bindungspartnern eine funktionelle Wirkung für die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen *in vitro* hat. Die Ergebnisse belegen eine selektiv erhöhte funktionelle Wirkung von L1CAM und  $\beta_1$  Integrin auf den Tumorendothelzellen und von NRP-1 sowohl auf den Tumorendothelzellen als auch auf den Panc1 Tumorzellen (Abbildung 4.38 und 4.39).

Die Daten zeigen, dass auch für die Adhäsionskapazität von Tumorendothelzellen an Endothelzellen sowohl L1CAM als auch NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin auf den Endothelzellen wenigstens teilweise funktionell notwendig sind, beweisen aber gleichzeitig, dass die Adhäsion auch noch über weitere, hier nicht untersuchte Parameter induziert werden kann. Weiterhin

lassen die Ergebnisse vermuten, dass eine *trans* Interaktion von endotheliale L1CAM an NRP-1, exprimiert auf den Tumorzellen, eine Rolle bei der Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen *in vitro* spielen könnte.

Bei der Transmigration durch das Endothel beginnt die adhärierende Zelle zunächst Ausläufer zu bilden, die zwischen die Zell-Zell Kontakte der Endothelzellen hineinragen und durch Bindung von endotheliale ICAM-1 an das Makrophagen Antigen 1 (*macrophage antigen*, MAC1) stabilisiert werden. Diese ICAM-1/MAC1 Bindung löst eine Signalkaskade in den Endothelzellen aus, die letztlich zu einer Kontraktion der Endothelzellen führt. Dadurch öffnen sich die Zell-Zell Kontakte der Endothelzellen und die adhärierende Zelle kann parazellulär, d. h. zwischen den zwei benachbarten Endothelzellen, transmigrieren. Eine weitere Voraussetzung für eine erfolgreiche Transmigration ist eine Umverteilung von endothelialen Adhäsionsproteinen der Zell-Zell Kontakte. Migrations-hemmende Proteine, wie beispielsweise das vaskuläre endotheliale Cadherin (*vascular endothelia cadherin*, VE-Cadherin), werden aus den Zell-Zell Kontakten entfernt. Gleichzeitig werden Migrations-fördernde endotheliale Ig-CAMs, wie beispielsweise PECAM-1, JAM-A (*junctional adhesion molecule-A*), ICAM-1 und ICAM-2, vermehrt an die luminale Oberfläche der Endothelzellen rekrutiert. Durch Bindung dieser Proteine mit den korrespondierenden Bindungspartnern der transmigrierenden Zelle kommt es schließlich zu einer parazellulären Transmigration (Ley *et al.*, 2007).

Es wurde die basale transendotheliale Migrationskapazität von Panc1 Tumorzellen getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass die basale transendotheliale Migration von Panc1 Tumorzellen durch Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro* (Abbildung 4.45) im Vergleich zur transendothelialen Migration durch Kontrollendothelzellen signifikant gesteigert war (HUVEC + 65%; HPMEC + 35%). Die nachgewiesene, selektiv erhöhte transendotheliale Migration der Panc1 Tumorzellen durch das Pankreas Tumorendothel könnte, neben der selektiv erhöhten Adhäsion von Panc1 Tumorzellen an Tumorendothel, ebenfalls zu einer erhöhten Intravasation der Tumorzellen ins Blutgefäßsystem sowie einer erhöhten Extravasation der Tumorzellen in ein sekundäres Organ führen.

Um die funktionelle Relevanz von L1CAM und dessen Bindungspartnern für die transendotheliale Migration von Tumorzellen zu testen, wurden Transmigrationstests durch Tumor- und Kontrollendothel durchgeführt, bei denen L1CAM und dessen Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin durch spezifische mAk in ihrer Bindungskapazität inhibiert wurden. Durch Vorinkubation der Tumor- bzw. Endothelzellen konnte analysiert werden, auf welchen Zellen die Expression von L1CAM und dessen Bindungspartnern eine funktionelle Wirkung für die transendotheliale Migration von Tumorzellen durch Endothelzell-Monolayer *in vitro* hat. Die



Ergebnisse belegen eine selektiv erhöhte funktionelle Wirkung von L1CAM, NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin auf den Tumorendothelzellen. Dabei resultierte die Antikörperblockade von L1CAM in einer um 63% verminderten transendothelialen Migration der Tumorzellen durch PAMEC-Monolayer (Abbildung 4.43). Die Vorinkubation der Tumorzellen mit den L1CAM, NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin spezifischen mAk zeigte nur für  $\beta_1$  Integrin eine signifikante Inhibition der transendothelialen Migration durch HUVEC-Monolayer (Abbildung 4.44).

Wie zuvor beschrieben, spielen eine Reihe verschiedener Ig-CAMs eine funktionell wichtige Rolle bei der parazellulären Transmigration von Zellen durch Endothel. Die Ig-CAMs PECAM-1, JAM-A, ICAM-1 und ICAM-2 werden vermehrt an die luminale Oberfläche der Endothelzellen rekrutiert, um dort mit den jeweils korrespondierenden Bindungspartnern der transmigrierenden Zelle interagieren zu können.

Mehrere Autoren konnten beweisen, dass L1CAM ebenfalls funktionell wichtig für die transendotheliale Migration von Tumorzellen ist. So konnten Voura *et al.* (2001) nachweisen, dass L1CAM eine wichtige Rolle bei der transendothelialen Migration von Melanom Zellen durch HPMEC-Monolayer *in vitro* spielt. Die Autoren konnten belegen, dass L1CAM dabei auf den Endothelzellen exprimiert sein muss. Weiterhin konnten sie eine Bindungsinteraktion von endotheliale L1CAM mit  $\alpha_v\beta_3$  Integrin während der transendothelialen Migration nachweisen. Ebenfalls Zecchini *et al.* (2008) konnten belegen, dass L1CAM bei der transendothelialen Migration von Ovarialkarzinomzellen durch HUVEC-Monolayer *in vitro* notwendig ist.

Das  $\beta_1$  Integrin konnte als notwendiger Faktor für die transendotheliale Migration von Neutrophilen durch Endothelzell-Monolayer *in vitro* identifiziert werden (Scholz *et al.*, 2004). Für NRP-1 konnte in dieser Arbeit erstmalig eine funktionelle Rolle für die transendotheliale Migration *in vitro* nachgewiesen werden. Da durch die Inhibitionen von L1CAM und NRP-1 jedoch keine komplette Inhibition der transendothelialen Migration *in vitro* bewirkt werden konnte, ist anzunehmen, dass die transendothelialen Migration *in vitro* zusätzlich von weiteren, hier nicht untersuchten Parametern abhängig ist.

Zusammenfassend lassen die Daten darauf schließen, dass L1CAM eine wichtige Rolle während der Adhäsion und transendothelialen Migration spielt. Dies könnte sowohl verschiedene Prozesse der Metastasierung, als auch eine Infiltration immunologischer Zellen in Tumorgewebe fördern. Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass die möglichen Rolle von L1CAM für sequentielle Prozesse der Metastasierung nur *in vitro* analysiert wurde. Zusätzliche *in vivo* Untersuchungen zur Bestätigung dieser Befunde stehen noch aus.

## 5.7 Die L1CAM Expression auf regulatorischen T-Zellen

Wie Tregs funktionieren, wie sie migrieren und in vielen Tumorgeweben akkumulieren, wurde bisher kaum untersucht (Curiel *et al.*, 2004; Huehn *et al.*, 2004). Einige Autoren beschreiben die Expression von Chemokinrezeptoren und CAMs auf Tregs als Möglichkeit, direkt in induziertes Gewebe durch aktiviertes Endothel zu migrieren (Annunziato *et al.*, 2002; Belkaid *et al.*, 2002; Bystry *et al.*, 2001; Iellem *et al.*, 2003; Sakaguchi, 2002). Das CAM-Expressionsmuster der Tregs ist dabei ein wichtiger Faktor, so dass es durch erhöhte Interaktionen der Tregs mit dem Tumorendothel zu einer Anreicherung der Tregs im Tumorgewebe kommt (Nummer *et al.*, 2007; Wildbaum *et al.*, 2000). Nummer *et al.* (2007) berichten von einer erhöhten Treg Infiltration in Pankreas Tumorgewebe *in situ*. Dabei konnten die Autoren die erhöhte Infiltration der Tregs in Pankreas Tumorgewebe mit einer erhöhte CAM Expression der Tregs korrelieren. Gleichzeitig zeigte auch das Tumorendothel eine Expressionssteigerung der jeweiligen korrespondierenden Bindungspartner, wie beispielsweise ICAM-1 und VCAM-1.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen von aus humanem peripheren Blut isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Tkon (Kontroll T-Zellen) Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg (regulatorische T-Zellen) Zellen *in vitro* zeigten, dass 46,3% der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> identifizierten Tregs auch L1CAM exprimierten (Abbildung 4.47 A).

Eine L1CAM Expression auf murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte bereits nachgewiesen werden (Kowitz *et al.*, 1992). Die Expression von L1CAM auf regulatorischen T-Zellen ist bisher noch nicht beschrieben worden. Die Expression von L1CAM auf Tregs könnte mit auf Tumorendothel exprimiertem L1CAM über eine homophilische Bindung interagieren. Diese möglichen Interaktionen könnten zu einer selektiv verstärkten Adhäsion und anschließenden Transmigration der Tregs und somit zu einer verstärkten Infiltration ins Tumorgewebe führen.

Die Expressionsstärken der L1CAM Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin wurden in dieser Arbeit nicht getestet. Eine NRP-1 Expression auf Tregs wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Battaglia *et al.*, 2008; Sarris *et al.*, 2008). Dabei konnten Sarris *et al.* (2008) zeigen, dass die NRP-1 Expression auf Tregs die Interaktion von Tregs mit ungereiften dendritischen Zellen verstärkt. Die erhöhte L1CAM Expression des Tumorendothels könnte demnach zu einer L1CAM/NRP-1 Interaktion führen. Dies könnte eine selektiv verstärkte Adhäsion und anschließende Transmigration von Tregs fördern, was letztlich eine selektive Rekrutierung von Tregs an das Pankreas Tumorendothel und damit in das Pankreas Tumorgewebe bewirken könnte.

Auf T-Zellen wird ebenfalls  $\beta_1$  Integrin exprimiert (Groux *et al.*, 1989; Hollsberg *et al.*, 1993). Weiterhin konnte eine  $\beta_1$  Integrin Expression auch auf Tregs nachgewiesen werden (Hiura *et al.*, 2005; Stassen *et al.*, 2004). Die  $\beta_1$  Integrin Expression von Tregs könnte ebenfalls zu einer selektiv verstärkten Adhäsion und anschließenden Transmigration der Tregs und somit zu einer verstärkten Infiltration ins Tumorgewebe führen. Dabei könnte die Interaktion über die zuvor beschriebene VLA-4/VCAM-1 Interaktion zu einer selektiven Rekrutierung der Tregs zum Tumorendothel führen. Weiterhin könnte diese Rekrutierung auch durch eine L1CAM/ $\beta_1$  Integrin Interaktion unterstützt werden.

## 5.8 Die selektive Adhäsion von Tregs an Tumorendothel *in vitro*

Die veränderten Mechanismen der CAM-, Zytokin- und Chemokinregulation resultieren in geänderten Adhäsionseigenschaften von T-Zellen (Loetscher *et al.*, 2000). Dabei wird die Adhäsion durch Aktivierung verschiedener CAMs und deren Bindung an die korrespondierenden Bindungspartner vermittelt (Roth *et al.*, 1995).

Die quantitative Adhäsionskapazität von Tregs an Tumorendothelzellen (PAMEC) *in vitro* (Abbildung 4.48) war im Vergleich zur Adhäsion an Kontrollendothelzellen (HUVEC) um 90% gesteigert. Wie zuvor beschrieben, konnten bereits mehrere Autoren eine selektiv erhöhte Bindung von Lymphozyten an Tumorendothel nachweisen (Melder *et al.*, 1996; Nummer *et al.*, 2007; Salmi *et al.*, 1995). Die nachgewiesene selektiv erhöhte Adhäsion von Tregs an das Pankreas Tumorendothel belegt eine selektiv verstärkte Interaktion der Tregs mit dem Tumorendothel im Vergleich zum Kontrollendothel. Da die Adhäsion die erste Phase der Extravasation durch das Endothel darstellt, könnte diese selektiv erhöhte Adhäsion an das Tumorendothel die Wahrscheinlichkeit der Extravasation der Tregs ins Tumorgewebe erhöhen.

Da sich die Tumorendothelzellen im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen durch eine verstärkte Expression von L1CAM auszeichneten, ist anzunehmen, dass die Expression der jeweiligen Bindungspartner NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin auf den Tregs eine Rolle bei der Vermittlung dieser Adhäsionssteigerung spielen. Die L1CAM Expression der Tregs könnte ebenfalls zu der Adhäsionssteigerung durch homophilische Interaktionen mit endotheliale L1CAM beitragen. Um die funktionelle Relevanz von L1CAM und dessen Bindungspartnern NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin bei der transendothelialen Migration von Tregs durch Endothel zu untersuchen, wurden Transmigrationstests durchgeführt, bei denen die jeweiligen Proteine durch spezifische

blockierende mAk in ihrer Bindungskapazität *in vitro* inhibiert wurden.

Die Adhäsion von Tregs an Tumorendothel *in vitro* wurde sowohl durch L1CAM spezifische mAk als auch durch NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin spezifische mAk inhibiert. Die Adhäsion von Tregs an Kontrollendothel zeigte keine Inhibition durch den L1CAM spezifischen mAk, als auch durch NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin spezifische mAk. Dabei resultierte die Antikörper induzierte Inhibition von L1CAM in einer um 38% verminderten Adhäsionskapazität der Tumorzellen an Tumorendothelzellen im Vergleich zur Isotyp Kontrolle (Abbildung 4.49).

Bereits Nummer *et al.* (2007) konnten beweisen, dass Tregs eine selektive Verstärkung der Adhäsion an Pankreas Tumorendothel im Vergleich zu Bindung an Kontrollendothel zeigen. Die Autoren konnten weiterhin eine verstärkte Expression von ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 und CD166 auf den Tumorendothelien nachweisen. Gleichzeitig waren die jeweiligen korrespondierenden Liganden, LFA-1,  $\beta_7$  Integrin, CD166 und CD6, auf den Tregs verstärkt exprimiert. Die Daten von Nummer *et al.* (2007) sowie die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass für die Adhäsionskapazität von Tregs an Tumorendothelzellen *in vitro* sowohl L1CAM als auch NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin auf den Endothelzellen wenigstens teilweise funktionell notwendig sind. Weiterhin ist jedoch anzunehmen, dass die Adhäsion auch noch über weitere, hier nicht untersuchte Parameter induziert werden kann.

### **5.9 Die selektive transendotheliale Migration von Tregs durch Tumorendothel *in vitro***

Die Adhäsion der Tregs an das Tumorendothel bestimmt nur die erste Phase der Transmigration. Sie ist notwendig, aber nicht hinreichend für die nachfolgende transendotheliale Migration. Nicht alle am Endothel adhärierenden Zellen werden ausreichend aktiviert, um eine transendotheliale Migration durchzuführen. Um das Migrationsverhalten der Tregs zu untersuchen, wurden transendotheliale Migrationstests durchgeführt. Zunächst benötigen die migrierenden Zellen in einem *in vitro* Ansatz einen chemotaktischen Gradienten, der es den Zellen ermöglicht, durch Aktivierung die endotheliale Barriere zu überwinden. Dabei bietet sich SDF-1 $\beta$  (*stromal derived factor-1 $\beta$* ) als physiologisch vorkommendes chemotaktisches Molekül an. Die *in vitro* transendothelialen Migrationsversuche zeigten zunächst, dass die basale Transmigration von Endothelzellen (Kontrolle) sehr gering war. Somit konnten spätere Effekte nahezu selektiv auf die T-Zell Migration zurückgeführt werden.

Die quantitative transendotheliale Migrationskapazität von Tregs durch Tumorendothel (PAMEC) *in vitro* war im Vergleich zur transendothelialen Migrationskapazität von Tregs durch Kontrollendothel (HUVEC) um 65% gesteigert (Abbildung 4.50). Die nachgewiesene, selektiv erhöhte transendotheliale Migration der Tregs durch das Pankreas Tumorendothel im Vergleich zum Kontrollendothel könnte, neben der selektiv erhöhten Adhäsion von Tregs an Tumorendothel, ebenfalls zu einer selektiv erhöhten Extravasation der Tregs ins Pankreas Tumorgewebe führen.

Da die Endothelien zuvor mit TNF- $\alpha$  aktiviert wurden, ist es wahrscheinlich, dass die TNF- $\alpha$  Stimulation eine Aktivierung der Ig-CAM Expression der Tumorendothelzellen bewirkt (Galkina *et al.*, 2003). Wie zuvor gezeigt werden konnte, bewirkte die TNF- $\alpha$  Aktivierung der Endothelzellen auch eine Expressionssteigerung von L1CAM. Die regulatorischen T-Zellen könnten durch die gesteigerte Expressionsdichte besser mit den Endothelien interagieren, was zu einer gesteigerten transendothelialen Migration führen könnte und auch die gesteigerte Adhäsion erklären würde.

Um die funktionelle Relevanz von L1CAM bei der transendothelialen Migration von Tregs durch Endothel *in vitro* zu testen, wurden Transmigrationstests durchgeführt, bei denen L1CAM durch einen spezifischen blockierenden mAk in der Bindungskapazität inhibiert wurde. Dabei resultierte die Antikörper induzierte Inhibition von L1CAM in einer signifikant verminderten transendothelialen Migration der Tregs durch Tumorendothel (Abbildung 4.51).

Wie zuvor beschrieben, spielen eine Reihe verschiedener Ig-CAMs eine funktionell wichtige Rolle bei der parazellulären Transmigration von Zellen durch Endothel. Ebenfalls wurde zuvor erläutert, dass L1CAM eine funktionelle Rolle für die transendotheliale Migration von Tumorzellen zugewiesen werden konnte. Da durch die Inhibitionen von L1CAM jedoch keine komplette Inhibition der transendothelialen Migration *in vitro* bewirkt werden konnte, ist anzunehmen, dass die transendotheliale Migration *in vitro* zusätzlich über von weiteren, hier nicht untersuchten Parametern, abhängig ist. Mit der Blockade von L1CAM könnte eine selektive Treg-Infiltrationsinhibition bei der Infiltration in Tumorgewebe erreicht werden.

Wie Nummer *et al.* (2007) zeigen konnten, erfolgt eine selektive Infiltration regulatorischer T-Zellen in humanes Pankreaskarzinomgewebe *in vivo*. Neben der Suppression von T-Zellen (Miyara und Sakaguchi, 2007), ist die Expression und Sezernierung von verschiedenen Zytokinen eine weitere funktionelle Aufgabe von Tregs. Dabei sind TGF- $\beta$  und IL-10 die beiden wichtigsten Zytokine die von Tregs exprimiert und sezerniert werden. Die erhöhte Infiltration von Tregs ins Tumorgewebe sowie die anschließende mögliche Sezernierung verschiedener

Zytokine durch Tregs stellen weitere Faktoren dar, durch die das Tumormikromilieu verändert wird.

Es wurden transendotheliale Migrationstests durchgeführt, bei denen anstelle des chemoattraktiven Moleküls SDF-1 $\beta$  unterschiedliche Konzentrationen von Tkon und Treg Zellen in die untere Transmigrationskammer hinzugefügt wurden. Die sekretierten Zytokine der Tkon und Treg Zellen sollten hierbei die Transmigration stimulieren. Die Zugabe von Tregs bewirkte eine signifikante Erhöhung der transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen durch HUVEC-Monolayer im Vergleich zur Stimulation der transendothelialen Migration mit Tkon (Abbildung 4.52). Um zu analysieren, ob in diesem System TGF- $\beta$ 1, als möglicher sezernierter Faktor der Tregs, einen stimulierenden Einfluss auf die transendotheliale Migrationskapazität der Panc1 Tumorzellen hat, wurde in einem weiteren Experiment TGF- $\beta$ 1 als Stimulus in die untere Transmigrationskammer hinzugefügt. Die Ergebnisse belegen eine signifikante Erhöhung der transendothelialen Migration von Panc1 Tumorzellen bei Verwendung von TGF- $\beta$ 1 als singulären Stimulus (Abbildung 4.53). Durch Verwendung von TGF- $\beta$ 1 als Stimulus auf die Transmigration von Panc1 Tumorzellen durch Gelatine, konnte ein direkter Einfluss des Zytokins auf die Panc1 Tumorzellen ausgeschlossen werden (Abbildung 4.54).

Die Aktivierung von Endothelzellen durch TGF- $\beta$ 1 hat eine Veränderung der Ig-CAM Expression zur Folge (Enestein *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1991; Szekanecz *et al.*, 1995). Wie zuvor in dieser Arbeit erläutert wurde, bewirkt die Stimulation von Endothelzellen mit TGF- $\beta$ 1 auch eine Erhöhung der L1CAM Expression *in vitro*. Dabei zeigten die mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten Tumorendothelzellen eine selektiv verstärkte L1CAM Expression *in vitro*. Demnach könnten infiltrierende regulatorischen T-Zellen durch die Sezernierung von TGF- $\beta$ 1 einen weiteren Stimulus im Tumorgewebe freisetzen, der zu einer verstärkten Aktivierung des Tumorendothels und damit als Folge zu einer L1CAM-vermittelten erhöhten transendothelialen Migration von Tumorzellen führen könnte. Diese Daten liefern erste Hinweise darauf, dass eine direkte Stimulation der Endothelzellen und nicht der Tumorzellen durch Treg-sezerniertes TGF- $\beta$ 1 eine erhöhte transendotheliale Migration der Panc1 Tumorzellen bewirkt. Diese Mechanismen könnten ebenfalls zu einer erhöhten Intravasation von Tumorzellen ins Blut- bzw. Lymphgefäßsystem beitragen.

## 5.10 Ausblick

Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM wird neben Neuronen und verschiedenen hämatopoetischen Zellen auch von Endothelzellen exprimiert. In einigen Tumoren korreliert die Expression von L1CAM mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Pankreas Tumorgewebe sich im Vergleich zu peritumoralem nicht-malignen Pankreasgewebe durch erhöhte Vaskularisierung sowie durch eine selektiv erhöhte endotheliale L1CAM Expression unterscheidet. Neben dem nachweislich pro-angiogenen Mikromilieu des Pankreas Tumorgewebes könnten immunmodulatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1, als mögliche Induktoren der gesteigerten L1CAM Expression funktionell wichtig sein.

Die erhöhte L1CAM Expression korrelierte mit der endothelialen Ausbildung tubulärer Fortsätze und mit verstärkten Adhäsions- und Migrationskapazitäten der Endothelzellen, welche funktionell durch L1CAM spezifische mAk blockiert werden konnten.

Die spezifische Blockade von L1CAM auf Kontroll- und Tumorendothel bestätigte eine funktionelle Rolle von L1CAM an der selektiv gesteigerten Tumorzelladhäsion und -transmigration durch Tumorendothel. Die gesteigerte transendotheliale Migration der Tumorzellen ging mit der selektiv bei Tumorendothel gesteigerten Treg Transmigration einher. Innerhalb der genannten Prozesse konnten die heterophilischen L1CAM Liganden NRP-1 und  $\beta$ 1 Integrin als notwendige Bindungspartner identifiziert werden. Das durch initiiertes Tumormikromilieu geänderte Expressionsmuster des Tumorendothels induziert einen selektiven Transmigrationsvorteil für singuläre Tumorzellen und funktionell aktive regulatorische T-Zellen, welche im Pankreas Tumorgewebe *in situ* stark angereichert vorzufinden waren.

Folglich könnte L1CAM eine essentielle Rolle bei der Etablierung einer Frühmetastase, sowie der zellulären Komposition des Tumorgewebes zukommen.

Durch gezielte Blockade von L1CAM und dessen Bindungspartnern NRP-1 und  $\beta$ 1 Integrin mittels blockierender mAk könnte eine Tumorendothel-spezifische Inhibition der Migration und Bildung tubulärer Fortsätze erzielt werden. Ebenso die Zelladhäsion und -transmigration von Tumorzellen und regulatorischen T-Zellen durch Tumorendothel könnte durch gezielte Blockade von L1CAM und dessen Bindungspartnern NRP-1 und  $\beta$ 1 Integrin inhibiert werden. Dieser therapeutische Ansatz könnte zukünftig im Tumorgewebe zu einer Inhibition der Vaskularisierung, einer Blockade von Metastasierungsprozessen sowie einer Inhibition einer Treg-selektiven Infiltration ins Pankreas Tumorgewebe verwendet werden. Allerdings ist zu bedenken, dass die in dieser Arbeit getesteten funktionellen Eigenschaften von L1CAM und

## DISKUSSION

---

dessen Bindungspartnern NRP-1 und  $\beta_1$  Integrin nur mittels blockierender mAk analysiert wurde. Die Wirkungsweise dieser blockierenden mAk ist bislang noch nicht geklärt. Zusätzliche *in vitro* Untersuchungen mit Hilfe anderer Methodiken, wie beispielsweise siRNA knock-out Experimente, zur Bestätigung dieser Befunde stehen noch aus.



## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ADAM	Disintegrin und Metalloprotease ( <i>a disintegrin and metalloproteinase</i> )
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bFGF	basaler Fibroblasten Wachstumsfaktor ( <i>basic fibroblast growth factor</i> )
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CAM	Zelladhäsionsmolekül ( <i>cell adhesion molecule</i> )
CD	Differenzierungsgruppe ( <i>cluster of differentiation</i> )
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidylester
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	<i>counts per minute</i>
Cy	Cyanin
Cy3	Cyanin-3-gekoppelt
Cy5	Cyanin-5-gekoppelt
d	Tage ( <i>days</i> )
d. h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECBM	Endothelzell Basal Medium ( <i>endothelial cell basal medium</i> )

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

ECGS	Endothelzell Wachstumssupplement ( <i>endothelial cell growth supplement</i> )
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESA <i>et al.</i>	Epithel Oberflächenantigen ( <i>epithelial surface antigen</i> ) <i>et alii</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
EZBM	Endothelzell Basal Medium
FACS™	Fluoreszenz-aktivierte Zellseparation ( <i>fluorescence-activated cell sorter</i> )
Fc	<i>Fragment crystallisable</i>
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Eisen(III)-oxid
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Eisen(II, III)-oxid
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor ( <i>fibroblast growth factor receptor</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
GITC	Guanidinisothiocyanat
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunden ( <i>hours</i> )
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen ( <i>human embryonic kidney cells</i> )
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor ( <i>hepatocyte growth factor</i> )
HPMEC	humane mikrovaskuläre Lungen Endothelzellen ( <i>human pulmonary microvascular endothelial cells</i> )
HUVEC	humane makrovaskuläre Nabelschnur Endothelzellen ( <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin Ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen ( <i>human leukocyte antigen</i> )
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN-γ	Interferon-γ

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 ( <i>insulin-like growth factor-1</i> )
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogenkarbonat
L	Liter
M	Mol
mA	Milliampere
MAC1	Makrophagen Antigen 1 ( <i>macrophage antigen1</i> )
MACS	<i>Magnetic activated cell sorter</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MPC	<i>magnetic particle concentrator</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleinacid</i> )
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
MVB	<i>multivesicular body</i>
n	Anzahl der durchgeführten Versuche
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
NRP-1	Neuropilin-1
OD	Optische Dichte
PB	peripheres Blut

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PBMZ	periphere Blut mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor ( <i>platelet derived growth factor</i> )
PIGF	Plazenta Wachstumsfaktor ( <i>placental growth factor</i> )
PVDF	Polyvinylidene Difluorid
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
RIP	regulierte intramembrane Proteolyse ( <i>regulated intramembrane proteolysis</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Kettenreaktion ( <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> )
sec	Sekunden
SDF-1 $\beta$	Stromazellen Faktor-1 $\beta$ ( <i>stromal cell-derived factor-1<math>\beta</math></i> )
SDS	Natriumdodezylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SSC	<i>side scatter</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>tris buffered saline</i> )
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$ 1	Transformations-Wachstumsfaktor- $\beta$ 1 ( <i>transforming growth factor-<math>\beta</math>1</i> )
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factors-<math>\alpha</math></i> )
U	Einheiten ( <i>unit</i> )
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VEGFR2	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 2 ( <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> )
z. B.	zum Beispiel

---

---

## Literaturverzeichnis

- Aggarwal BB, Natarajan K (1996). Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* 7: 93-124.
- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 72: 1605-21.
- Aird WC (2003). Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* 31: S221-30.
- Albelda FW, van der Meer J, Vellenga E (1991). Vascular proliferation as an unusual cause of hemorrhagic diathesis in myelofibrosis. *Am J Clin Pathol* 95: 564-6.
- Albelda SM, Buck CA (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4: 2868-80.
- Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Kremmyda A, Bramis I et al (2001). Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer* 37: 2392-7.
- Ali S, Kaur J, Patel KD (2000). Intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and regulated on activation normal T cell expressed and secreted are expressed by human breast carcinoma cells and support eosinophil adhesion and activation. *Am J Pathol* 157: 313-21.
- Allory Y, Matsuoka Y, Bazille C, Christensen EI, Ronco P, Debiec H (2005). The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 11: 1190-7.
- Alterman LA, Crispe IN, Kinnon C (1990). Characterization of the murine heat-stable antigen: an hematolymphoid differentiation antigen defined by the J11d, M1/69 and B2A2 antibodies. *Eur J Immunol* 20: 1597-602.
- Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A (2001). CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 166: 3008-18.
- Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V et al (2002). Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* 196: 379-87.
- Arlt MJ, Novak-Hofer I, Gast D, Gschwend V, Moldenhauer G, Grunberg J et al (2006). Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment. *Cancer Res* 66: 936-43.
- Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190: 995-1004.

- Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N (2003). Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 49: 32-40.
- Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G et al (2001). Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 61: 5736-40.
- Bachelder RE, Lipscomb EA, Lin X, Wendt MA, Chadborn NH, Eickholt BJ et al (2003). Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells. *Cancer Res* 63: 5230-3.
- Bai L, Huang CW, Gao L, Jiang B, Nan QZ (2002). [Expression of tumor necrosis factor receptor on peripheral blood mononuclear cells from patients with primary hepatocellular carcinoma and effects of treatment on the expression]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 22: 1099-100.
- Balaian LB, Moehler T, Montgomery AM (2000). The human neural cell adhesion molecule L1 functions as a costimulatory molecule in T cell activation. *Eur J Immunol* 30: 938-43.
- Barthlott T, Kassiotis G, Stockinger B (2003). T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J Exp Med* 197: 451-60.
- Bassenge E, Heusch G (1990). Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 116: 77-165.
- Battaglia A, Buzzonetti A, Monego G, Peri L, Ferrandina G, Fanfani F et al (2008). Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. *Immunology* 123: 129-38.
- Bayless KJ, Salazar R, Davis GE (2000). RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the  $\alpha(v)\beta(3)$  and  $\alpha(5)\beta(1)$  integrins. *Am J Pathol* 156: 1673-83.
- Beer S, Oleszewski M, Gutwein P, Geiger C, Altevogt P (1999). Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J Cell Sci* 112 ( Pt 16): 2667-75.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420: 502-7.
- Bergers G, Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3: 401-10.
- Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P (2005). Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* 128: 585S-590S.
- Bieber AJ, Snow PM, Hortsch M, Patel NH, Jacobs JR, Traquina ZR et al (1989). Drosophila neuroglian: a member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to

- the vertebrate neural adhesion molecule L1. *Cell* 59: 447-60.
- Biernacki K, Prat A, Blain M, Antel JP (2001). Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 1127-36.
- Bilchik A, Miyashiro M, Kelley M, Kuo C, Fujiwara Y, Nakamori S et al (2000). Molecular detection of metastatic pancreatic carcinoma cells using a multimarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 88: 1037-44.
- Billiau A (1996). Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* 62: 61-130.
- Blaess S, Kammerer RA, Hall H (1998). Structural analysis of the sixth immunoglobulin-like domain of mouse neural cell adhesion molecule L1 and its interactions with alpha(v)beta3, alpha(IIb)beta3, and alpha5beta1 integrins. *J Neurochem* 71: 2615-25.
- Blankenstein T (2005). The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Curr Opin Immunol* 17: 180-6.
- Bloch W, Forsberg E, Lentini S, Brakebusch C, Martin K, Krell HW et al (1997). Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J Cell Biol* 139: 265-78.
- Blue ML, Conrad P, Webb DL, Sarr T, Macaro M (1993). Interacting monocytes and synoviocytes induce adhesion molecules by a cytokine-regulated process. *Lymphokine Cytokine Res* 12: 213-8.
- Bockhorn M, Jain RK, Munn LL (2007). Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncol* 8: 444-8.
- Bommireddy R, Doetschman T (2007). TGFbeta1 and Treg cells: alliance for tolerance. *Trends Mol Med* 13: 492-501.
- Boo YJ, Park JM, Kim J, Chae YS, Min BW, Um JW et al (2007). L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 14: 1703-11.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brakebusch C, Fassler R (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J* 22: 2324-33.
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264: 569-71.
- Brown NS, Bicknell R (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 3: 323-7.

- Brummendorf T, Kenwrick S, Rathjen FG (1998). Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr Opin Neurobiol* 8: 87-97.
- Brummendorf T, Rathjen FG (1993). Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem* 61: 1207-19.
- Brummer J, Ebrahimnejad A, Flayeh R, Schumacher U, Loning T, Bamberger AM et al (2001). cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3). *Am J Pathol* 159: 537-46.
- Bussolati B, Deambrosis I, Russo S, Deregibus MC, Camussi G (2003). Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells. *FASEB J* 17: 1159-61.
- Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG (2001). B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2: 1126-32.
- Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ et al (2000). A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell* 6: 851-60.
- Cackowski FC, Xu L, Hu B, Cheng SY (2004). Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms. *Genomics* 84: 82-94.
- Campbell JJ, Butcher EC (2000). Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 12: 336-41.
- Campbell SC, Tanabe K, Alexander JP, Edinger M, Tubbs RR, Klein EA (1994). Intercellular adhesion molecule-1 expression by bladder cancer cells: functional effects. *J Urol* 151: 1385-90.
- Cao Y, Hong A, Schulten H, Post MJ (2005). Update on therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Res* 65: 639-48.
- Carmeliet P (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-6.
- Carmeliet P, Jain RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-57.
- Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G (2000). Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27: 237-49.
- Castellani V, De Angelis E, Kenwrick S, Rougon G (2002). Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J* 21: 6348-57.
- Castellani V, Falk J, Rougon G (2004). Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Mol Cell Neurosci* 26: 89-100.
- Chandrachud LM, Pendleton N, Chisholm DM, Horan MA, Schor AM (1997). Relationship between vascularity, age and survival in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 76: 1367-75.



- Chang S, Rathjen FG, Raper JA (1987). Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. *J Cell Biol* 104: 355-62.
- Charalambous C, Pen LB, Su YS, Milan J, Chen TC, Hofman FM (2005). Interleukin-8 differentially regulates migration of tumor-associated and normal human brain endothelial cells. *Cancer Res* 65: 10347-54.
- Chen C, Li M, Chai H, Yang H, Fisher WE, Yao Q (2005). Roles of neuropilins in neuronal development, angiogenesis, and cancers. *World J Surg* 29: 271-5.
- Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19: 547-59.
- Chen S, Mantei N, Dong L, Schachner M (1999). Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J Neurobiol* 38: 428-39.
- Cheng L, Lemmon S, Lemmon V (2005). RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 94: 1102-10.
- Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS et al (2003). Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10623-8.
- Christofori G (2006). New signals from the invasive front. *Nature* 441: 444-50.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP et al (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-61.
- Coons SW, Johnson PC, Shapiro JR (1995). Cytogenetic and flow cytometry DNA analysis of regional heterogeneity in a low grade human glioma. *Cancer Res* 55: 1569-77.
- Couvelard A, O'Toole D, Turley H, Leek R, Sauvanet A, Degott C et al (2005). Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression. *Br J Cancer* 92: 94-101.
- Crossin KL, Krushel LA (2000). Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 218: 260-79.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P et al (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10: 942-9.
- Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, Mantei N (1997). Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat Genet* 17: 346-9.
- Davies MG, Hagen PO (1993). The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg* 218: 593-609.

- De Angelis E, Watkins A, Schafer M, Brummendorf T, Kenwrick S (2002). Disease-associated mutations in L1 CAM interfere with ligand interactions and cell-surface expression. *Hum Mol Genet* 11: 1-12.
- Debiec H, Christensen EI, Ronco PM (1998). The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *J Cell Biol* 143: 2067-79.
- DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS et al (1997). Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 151: 671-7.
- Demyanenko GP, Tsai AY, Maness PF (1999). Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *J Neurosci* 19: 4907-20.
- Denekamp J, Hobson B (1982). Endothelial-cell proliferation in experimental tumours. *Br J Cancer* 46: 711-20.
- Denko NC, Fontana LA, Hudson KM, Sutphin PD, Raychaudhuri S, Altman R et al (2003). Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns. *Oncogene* 22: 5907-14.
- Dhodapkar KM, Friedlander D, Scholes J, Grumet M (2001). Differential expression of the cell-adhesion molecule Nr-CAM in hyperplastic and neoplastic human pancreatic tissue. *Hum Pathol* 32: 396-400.
- Di Sciuillo G, Donahue T, Schachner M, Bogen SA (1998). L1 antibodies block lymph node fibroblastic reticular matrix remodeling in vivo. *J Exp Med* 187: 1953-63.
- Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L (2003). Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 9: 1409-14.
- Dippold W, Wittig B, Schwaeble W, Mayet W, Meyer zum Buschenfelde KH (1993). Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in colonic epithelial cells. *Gut* 34: 1593-7.
- Djabali M, Mattei MG, Nguyen C, Roux D, Demengeot J, Denizot F et al (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, Walsh FS (1996). CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol Cell Neurosci* 8: 99-111.
- Doherty P, Williams E, Walsh FS (1995). A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron* 14: 57-66.
- Dor Y, Porat R, Keshet E (2001). Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:

C1367-74.

- Dorf ME, Benacerraf B (1984). Suppressor cells and immunoregulation. *Annu Rev Immunol* 2: 127-57.
- Drillenburg P, Pals ST (2000). Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood* 95: 1900-10.
- Duczmal A, Schollhammer S, Katich S, Ebeling O, Schwartz-Albiez R, 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: 236-9.
- Ebeling O, Duczmal A, Aigner S, Geiger C, Schollhammer S, Kemshead JT et al (1996). L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur J Immunol* 26: 2508-16.
- Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 60: 1388-93.
- Eichmann A, Makinen T, Alitalo K (2005). Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes Dev* 19: 1013-21.
- Ellis LM, Takahashi Y, Fenoglio CJ, Cleary KR, Bucana CD, Evans DB (1998). Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 34: 337-40.
- Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* 101: 47-56.
- Enestein J, Waleh NS, Kramer RH (1992). Basic FGF and TGF-beta differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 203: 499-503.
- Engelhardt B, Wolburg H (2004). Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 34: 2955-63.
- Fajardo LF (1989). The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol* 92: 241-50.
- Fassler R, Meyer M (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* 9: 1896-908.
- Feiner L, Koppel AM, Kobayashi H, Raper JA (1997). Secreted chick semaphorins bind recombinant neuropilin with similar affinities but bind different subsets of neurons in situ. *Neuron* 19: 539-45.
- Feizi T (1994). Evidence for carbohydrate-mediated interactions between the neural-cell-adhesion molecules NCAM and L1. *Trends Biochem Sci* 19: 233-4.
- Felding-Habermann B, Silletti S, Mei F, Siu CH, Yip PM, Brooks PC et al (1997). A single

- immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *J Cell Biol* 139: 1567-81.
- Ferrara N, Kerbel RS (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438: 967-74.
- Fidler IJ (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3: 453-8.
- Finas D, Huszar M, Agic A, Dogan S, Kiefel H, Riedle S et al (2008). L1 cell adhesion molecule (L1CAM) as a pathogenetic factor in endometriosis. *Hum Reprod* 23: 1053-62.
- Fischer G, Kunemund V, Schachner M (1986). Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J Neurosci* 6: 605-12.
- Fogar P, Basso D, Pasquali C, De Paoli M, Sperti C, Roveroni G et al (1997). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res* 17: 1227-30.
- Fogel M, Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A et al (2003a). L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362: 869-75.
- Fogel M, Mechtersheimer S, Huszar M, Smirnov A, Abu-Dahi A, Tilgen W et al (2003b). L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett* 189: 237-47.
- Folkman J (1984). What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 51: 601-4.
- Folkman J, Haudenschild C (1980). Angiogenesis by capillary endothelial cells in culture. *Trans Ophthalmol Soc U K* 100: 346-53.
- Fonsato V, Buttiglieri S, Deregibus MC, Puntorieri V, Bussolati B, Camussi G (2006). Expression of Pax2 in human renal tumor-derived endothelial cells sustains apoptosis resistance and angiogenesis. *Am J Pathol* 168: 706-13.
- Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M (2003). Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* 22: 6557-63.
- Fransen E, Schrandt-Stumpel C, Vits L, Coucke P, Van Camp G, Willems PJ (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: 2255-6.
- Fransen E, Van Camp G, Vits L, Willems PJ (1997). L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Hum Mol Genet* 6: 1625-32.
- Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P (1987). Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5277-81.

- Freigang J, Proba K, Leder L, Diederichs K, Sonderegger P, 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: 425-33.
- Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol* 125: 669-80.
- Friess H, Guo XZ, Nan BC, Kleeff O, Buchler MW (1999). Growth factors and cytokines in pancreatic carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 880: 110-21.
- Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI et al (1993). Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 105: 1846-56.
- Fujioka S, Yoshida K, Yanagisawa S, Kawakami M, Aoki T, Yamazaki Y (2001). Angiogenesis in pancreatic carcinoma: thymidine phosphorylase expression in stromal cells and intratumoral microvessel density as independent predictors of overall and relapse-free survival. *Cancer* 92: 1788-97.
- Fukahi K, Fukasawa M, Neufeld G, Itakura J, Korc M (2004). Aberrant expression of neuropilin-1 and -2 in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 10: 581-90.
- Fukushima T, Tezuka T, Shimomura T, Nakano S, Kataoka H (2007). Silencing of insulin-like growth factor-binding protein-2 in human glioblastoma cells reduces both invasiveness and expression of progression-associated gene CD24. *J Biol Chem* 282: 18634-44.
- Gagnon ML, Bielenberg DR, Gechtman Z, Miao HQ, Takashima S, Soker S et al (2000). Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2573-8.
- Galkina E, Tanousis K, Preece G, Tolaini M, Kioussis D, Florey O et al (2003). L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes. *J Exp Med* 198: 1323-35.
- Garver TD, Ren Q, Tuvia S, Bennett V (1997). Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J Cell Biol* 137: 703-14.
- Gast D, Riedle S, Issa Y, Pfeifer M, Beckhove P, Sanderson MP et al (2008). The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies. *Oncogene* 27: 1281-9.
- Gast D, Riedle S, Schabath H, Schlich S, Schneider A, Issa Y et al (2005). L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 115: 658-65.

- Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T et al (2005). L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* 168: 633-42.
- Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T et al (2007). Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res* 67: 7703-12.
- Giger RJ, Urquhart ER, Gillespie SK, Levensgood DV, Ginty DD, Kolodkin AL (1998). Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 21: 1079-92.
- Gil OD, Sakurai T, Bradley AE, Fink MY, Cassella MR, Kuo JA et al (2003). Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. *J Cell Biol* 162: 719-30.
- Gilcrease MZ (2007). Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett* 247: 1-25.
- Grace PA, Pitt HA, Longmire WP (1990). Pylorus preserving pancreatoduodenectomy: an overview. *Br J Surg* 77: 968-74.
- Grange C, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Sapino A, Camussi G (2006). Isolation and characterization of human breast tumor-derived endothelial cells. *Oncol Rep* 15: 381-6.
- Grant DS, Kleinman HK (1997). Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS* 79: 317-33.
- Gratzinger D, Canosa S, Engelhardt B, Madri JA (2003). Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 modulates endothelial cell motility through the small G-protein Rho. *FASEB J* 17: 1458-69.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21: 589-601.
- Groux H, Huet S, Valentin H, Pham D, Bernard A (1989). Suppressor effects and cyclic AMP accumulation by the CD29 molecule of CD4+ lymphocytes. *Nature* 339: 152-4.
- Grumet M, Hoffman S, Edelman GM (1984). Two antigenically related neuronal cell adhesion molecules of different specificities mediate neuron-neuron and neuron-glia adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 267-71.
- Gudjonsson B (1987). Cancer of the pancreas. 50 years of surgery. *Cancer* 60: 2284-303.
- Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Gast D, Joumaa S et al (2003). ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J* 17: 292-4.
- Gutwein P, Oleszewski M, Mechtersheimer S, Agmon-Levin N, Krauss K, Altevogt P (2000). Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from

- human tumor cells. *J Biol Chem* 275: 15490-7.
- Gutwein P, Stoeck A, Riedle S, Gast D, Runz S, Condon TP et al (2005). Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 11: 2492-501.
- Hall H, Djonov V, Ehrbar M, Hoechli M, Hubbell JA (2004). Heterophilic interactions between cell adhesion molecule L1 and alphavbeta3-integrin induce HUVEC process extension in vitro and angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 7: 213-23.
- Hall H, Hubbell JA (2004). Matrix-bound sixth Ig-like domain of cell adhesion molecule L1 acts as an angiogenic factor by ligating alphavbeta3-integrin and activating VEGF-R2. *Microvasc Res* 68: 169-78.
- Haney CA, Sahenk Z, Li C, Lemmon VP, Roder J, Trapp BD (1999). Heterophilic binding of L1 on unmyelinated sensory axons mediates Schwann cell adhesion and is required for axonal survival. *J Cell Biol* 146: 1173-84.
- Harper J, Gerstenfeld LC, Klagsbrun M (2001a). Neuropilin-1 expression in osteogenic cells: down-regulation during differentiation of osteoblasts into osteocytes. *J Cell Biochem* 81: 82-92.
- Harper SJ, Xing CY, Whittle C, Parry R, Gillatt D, Peat D et al (2001b). Expression of neuropilin-1 by human glomerular epithelial cells in vitro and in vivo. *Clin Sci (Lond)* 101: 439-46.
- Haspel J, Grumet M (2003). The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes. *Front Biosci* 8: s1210-25.
- He Z, Tessier-Lavigne M (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90: 739-51.
- Heba G, Krzeminski T, Porc M, Grzyb J, Ratajska A, Dembinska-Kiec A (2001). The time course of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor expression in an experimental model of chronic myocardial infarction in rats. *J Vasc Res* 38: 288-300.
- Heiland PC, Griffith LS, Lange R, Schachner M, Hertlein B, Traub O et al (1998). Tyrosine and serine phosphorylation of the neural cell adhesion molecule L1 is implicated in its oligomannosidic glycan dependent association with NCAM and neurite outgrowth. *Eur J Cell Biol* 75: 97-106.
- Heiz M, Grunberg J, Schubiger PA, Novak-Hofer I (2004). Hepatocyte growth factor-induced ectodomain shedding of cell adhesion molecule L1: role of the L1 cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 279: 31149-56.
- Helmlinger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, Jain RK (1997). Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat Biotechnol* 15: 778-83.
- Hemmerlein B, Scherbening J, Kugler A, Radzun HJ (2000). Expression of VCAM-1, ICAM-1, E- and P-selectin and tumour-associated macrophages in renal cell carcinoma.

- Histopathology 37: 78-83.
- Herfarth C (1996). [Oncologic surgery--scope and status in surgery]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 113: 49-55.
- Herzog Y, Kalcheim C, Kahane N, Reshef R, Neufeld G (2001). Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev* 109: 115-9.
- Heusch G (1990). Alpha-adrenergic mechanisms in myocardial ischemia. *Circulation* 81: 1-13.
- Hillen F, Griffioen AW (2007). Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 26: 489-502.
- Hirata T, Furie BC, Furie B (2002). P-, E-, and L-selectin mediate migration of activated CD8+ T lymphocytes into inflamed skin. *J Immunol* 169: 4307-13.
- Hiura T, Kagamu H, Miura S, Ishida A, Tanaka H, Tanaka J et al (2005). Both regulatory T cells and antitumor effector T cells are primed in the same draining lymph nodes during tumor progression. *J Immunol* 175: 5058-66.
- Hollsberg P, Melinek J, Benjamin D, Hafler DA (1993). Increased protein kinase C activity in human memory T cells. *Cell Immunol* 149: 170-9.
- Horstkorte R, Schachner M, Magyar JP, Vorherr T, Schmitz B (1993). The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J Cell Biol* 121: 1409-21.
- Hortsch M (1996). The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 17: 587-93.
- Hortsch M (2000). Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci* 15: 1-10.
- Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M et al (2004). Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med* 199: 303-13.
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 119: 3901-3.
- Huszar M, Moldenhauer G, Gschwend V, Ben-Arie A, Altevogt P, Fogel M (2006). Expression profile analysis in multiple human tumors identifies L1 (CD171) as a molecular marker for differential diagnosis and targeted therapy. *Hum Pathol* 37: 1000-8.
- Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF (1995). Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 7: 697-706.
- Hynes RO (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-87.



- Iellem A, Colantonio L, D'Ambrosio D (2003). Skin-versus gut-skewed homing receptor expression and intrinsic CCR4 expression on human peripheral blood CD4+CD25+ suppressor T cells. *Eur J Immunol* 33: 1488-96.
- Ikeda N, Adachi M, Taki T, Huang C, Hashida H, Takabayashi A et al (1999). Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 79: 1553-63.
- Iruela-Arispe ML, Sage EH (1993). Endothelial cells exhibiting angiogenesis in vitro proliferate in response to TGF-beta 1. *J Cell Biochem* 52: 414-30.
- Islam R, Kristiansen LV, Romani S, Garcia-Alonso L, Hortsch M (2004). Activation of EGF receptor kinase by L1-mediated homophilic cell interactions. *Mol Biol Cell* 15: 2003-12.
- Ito M, Watanabe M, Kamiya H, Sakurai M (1995). Changes of adhesion molecule (LFA-1, ICAM-1) expression on memory T cells activated with cytomegalovirus antigen. *Cell Immunol* 160: 8-13.
- Izumoto S, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Taki T, 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: 1440-4.
- Jackson DE (2003). The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett* 540: 7-14.
- Jain RK, Koenig GC, Dellian M, Fukumura D, Munn LL, Melder RJ (1996). Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Cancer Metastasis Rev* 15: 195-204.
- Jakob C, Sterz J, Zavrski I, Heider U, Kleeberg L, Fleissner C et al (2006). Angiogenesis in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 42: 1581-90.
- Johnson JP (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18: 345-57.
- Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwable W, Riethmuller G (1989). De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 641-4.
- Johnson-Leger C, Aurrand-Lions M, Imhof BA (2000). The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci* 113 ( Pt 6): 921-33.
- Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G, MacFarlane J, Stevenson R, Paterson J et al (1994). X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat Genet* 7: 402-7.
- Jouet M, Rosenthal A, Kenwick 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: 378-80.
- Juliano RL (2002). Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 283-323.

- Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M (1990). Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J Cell Biol* 110: 209-18.
- Kaifi JT, Reichelt U, Quaas A, Schurr PG, Wachowiak R, Yekebas EF et al (2007). L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer. *Mod Pathol* 20: 1183-90.
- Kaifi JT, Strelow A, Schurr PG, Reichelt U, Yekebas EF, Wachowiak R et al (2006a). L1 (CD171) is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 19: 399-406.
- Kaifi JT, Zinnkann U, Yekebas EF, Schurr PG, Reichelt U, Wachowiak R et al (2006b). L1 is a potential marker for poorly-differentiated pancreatic neuroendocrine carcinoma. *World J Gastroenterol* 12: 94-8.
- Kaiser GC, Polk DB (1997). Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. *Gastroenterology* 112: 1231-40.
- Kalus I, Schnegelsberg B, Seidah NG, Kleene R, Schachner M (2003). The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 278: 10381-8.
- Kamiguchi H, Long KE, Pendergast M, Schaefer AW, Rapoport I, Kirchhausen T et al (1998). The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci* 18: 5311-21.
- Karademir S, Sokmen S, Terzi C, Sagol O, Ozer E, Astarcioglu H et al (2000). Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 7: 489-95.
- Kawaguchi S, Kikuchi K, Ishii S, Takada Y, Kobayashi S, Uede T (1992). VLA-4 molecules on tumor cells initiate an adhesive interaction with VCAM-1 molecules on endothelial cell surface. *Jpn J Cancer Res* 83: 1304-16.
- Kawai T, Seki M, Watanabe H, Eastcott JW, Smith DJ, Taubman MA (2000). T(h)1 transmigration anergy: a new concept of endothelial cell-T cell regulatory interaction. *Int Immunol* 12: 937-48.
- Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Abe Y et al (2002). Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 95: 2196-201.
- Keilhauer G, Faissner A, Schachner M (1985). Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* 316: 728-30.
- Keleg S, Buchler P, Ludwig R, Buchler MW, Friess H (2003). Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2: 14.

- Khan AW, Dhillon AP, Hutchins R, Abraham A, Shah SR, Snooks S et al (2002). Prognostic significance of intratumoural microvessel density (IMD) in resected pancreatic and ampullary cancers to standard histopathological variables and survival. *Eur J Surg Oncol* 28: 637-44.
- Kim S, Harris M, Varner JA (2000). Regulation of integrin alpha vbeta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A. *J Biol Chem* 275: 33920-8.
- Kiss JZ, Troncoso E, Djebbara Z, Vutskits L, Muller D (2001). The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain Res Brain Res Rev* 36: 175-84.
- Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 121: 4309-18.
- Klagsbrun M, Eichmann A (2005). A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 535-48.
- Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R (2002). The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol* 515: 33-48.
- Kleeff J, Beckhove P, Esposito I, Herzig S, Huber PE, Lohr JM et al (2007). Pancreatic cancer microenvironment. *Int J Cancer* 121: 699-705.
- Kleene R, Yang H, Kutsche M, Schachner M (2001). The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J Biol Chem* 276: 21656-63.
- Klein L, Khazaie K, von Boehmer H (2003). In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8886-91.
- Knogler K, Grunberg J, Zimmermann K, Cohrs S, Honer M, Ametamey S et al (2007). Copper-67 radioimmunotherapy and growth inhibition by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibodies in a therapy model of ovarian cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 13: 603-11.
- Koch AE (1998). Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41: 951-62.
- Koch AE, Burrows JC, Haines GK, Carlos TM, Harlan JM, Leibovich SJ (1991). Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues. *Lab Invest* 64: 313-20.
- Koch AE, Shah MR, Harlow LA, Lovis RM, Pope RM (1994). Soluble intercellular adhesion molecule-1 in arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 71: 208-15.
- Konerding MA, Fait E, Gaumann A (2001). 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *Br J Cancer* 84: 1354-62.
- Korc M (2003). Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2: 8.

- Kowitz A, Kadmon G, Eckert M, Schirrmacher V, Schachner M, Altevogt P (1992). Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur J Immunol* 22: 1199-205.
- Kowitz A, Kadmon G, Verschuere H, Remels L, De Baetselier P, Hubbe M et al (1993). Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 11: 419-29.
- Kuehn R, Lelkes PI, Bloechle C, Niendorf A, Izbicki JR (1999). Angiogenesis, angiogenic growth factors, and cell adhesion molecules are upregulated in chronic pancreatic diseases: angiogenesis in chronic pancreatitis and in pancreatic cancer. *Pancreas* 18: 96-103.
- Kuhn TB, Stoeckli ET, Condrau MA, Rathjen FG, Sonderegger P (1991). Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol* 115: 1113-26.
- Kuwahara K, Sasaki T, Kuwada Y, Murakami M, Yamasaki S, Chayama K (2003). Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival. *Pancreas* 26: 344-9.
- Kuzu I, Bicknell R, Fletcher CD, Gatter KC (1993). Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors. *Lab Invest* 69: 322-8.
- Lackner C, Jukic Z, Tsybrovskyy O, Jatzko G, Wette V, Hoefler G et al (2004). Prognostic relevance of tumour-associated macrophages and von Willebrand factor-positive microvessels in colorectal cancer. *Virchows Arch* 445: 160-7.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lantuejoul S, Constantin B, Drabkin H, Brambilla C, Roche J, Brambilla E (2003). Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol* 200: 336-47.
- Latil A, Bieche I, Pesche S, Valeri A, Fournier G, Cussenot O et al (2000). VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int J Cancer* 89: 167-71.
- Le X, Shi Q, Wang B, Xiong Q, Qian C, Peng Z et al (2000). Molecular regulation of constitutive expression of interleukin-8 in human pancreatic adenocarcinoma. *J Interferon Cytokine Res* 20: 935-46.
- Leavesley DI, Schwartz MA, Rosenfeld M, Cheresh DA (1993). Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J Cell Biol* 121: 163-70.
- Lee SJ, Benveniste EN (1999). Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 98: 77-88.

- Lee VM, Greene L, Shelanski ML (1981). Identification of neural and adrenal medullary surface membrane glycoproteins recognized by antisera to cultured rat sympathetic neurons and PC12 pheochromocytoma cells. *Neuroscience* 6: 2773-86.
- Lepault F, Gagnerault MC (2000). Characterization of peripheral regulatory CD4+ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 164: 240-7.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678-89.
- Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL (2004). Pancreatic cancer. *Lancet* 363: 1049-57.
- Lin YC, Shun CT, Wu MS, Chen CC (2006). A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-kappaB. *Clin Cancer Res* 12: 7165-73.
- Linder S, Blasjo M, von Rosen A, Parrado C, Falkmer UG, Falkmer S (2001). Pattern of distribution and prognostic value of angiogenesis in pancreatic duct carcinoma: a semiquantitative immunohistochemical study of 45 patients. *Pancreas* 22: 240-7.
- Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C, Pahlman L, Bergstrom R, Glimelius B (1996). Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 14: 461-6.
- Lindner J, Rathjen FG, Schachner M (1983). L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305: 427-30.
- Lockhart AC, Rothenberg ML, Berlin JD (2005). Treatment for pancreatic cancer: current therapy and continued progress. *Gastroenterology* 128: 1642-54.
- Loetscher P, Moser B, Baggiolini M (2000). Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol* 74: 127-80.
- Long KE, Asou H, Snider MD, Lemmon V (2001). The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J Biol Chem* 276: 1285-90.
- Longhurst CM, Jennings LK (1998). Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 54: 514-26.
- Luscher TF, Barton M (1997). Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 20: II-3-10.
- Luscinskas FW, Lawler J (1994). Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J* 8: 929-38.
- Madge LA, Pober JS (2001). TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 70: 317-25.
- Madri JA, Bell L, Merwin JR (1992). Modulation of vascular cell behavior by transforming growth factors beta. *Mol Reprod Dev* 32: 121-6.

- Makinen T, Olofsson B, Karpanen T, Hellman U, Soker S, Klagsbrun M et al (1999). Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem* 274: 21217-22.
- Mantovani A (1999). Chemokines. Introduction and overview. *Chem Immunol* 72: 1-6.
- Marelli-Berg FM, Frasca L, Weng L, Lombardi G, Lechler RI (1999). Antigen recognition influences transendothelial migration of CD4+ T cells. *J Immunol* 162: 696-703.
- Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D et al (2005). L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol* 25: 9040-53.
- Martin A, Komada MR, Sane DC (2003). Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev* 23: 117-45.
- Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, Wildi S, Muller C, Graber H et al (1998). Overexpression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 might influence tumor progression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 79: 76-81.
- McCawley LJ, Matrisian LM (2001). Tumor progression: defining the soil round the tumor seed. *Curr Biol* 11: R25-7.
- Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S et al (2001). Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 155: 661-73.
- Mehlen P, Puisieux A (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 6: 449-58.
- Meier F, Busch S, Gast D, Goppert A, Altevogt P, Maczey E et al (2006). The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression. *Int J Cancer* 119: 549-55.
- Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK (1996). During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med* 2: 992-7.
- Meli ML, Carrel F, Waibel R, Amstutz H, Crompton N, Jaussi R et al (1999). Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer* 83: 401-8.
- Mettouchi A, Meneguzzi G (2006). Distinct roles of beta1 integrins during angiogenesis. *Eur J Cell Biol* 85: 243-7.
- Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R et al (1998). Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem* 273: 22272-8.
- Miles FL, Pruitt FL, van Golen KL, Cooper CR (2008). Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 25: 305-24.

- Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK et al (1994). Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 127: 1703-15.
- Mirecka J, Libura J, Libura M, Koprowski M, Nowak D, Kedra B et al (2001). Morphological parameters of the angiogenic response in pancreatic ductal adenocarcinoma--correlation with histological grading and clinical data. *Folia Histochem Cytobiol* 39: 335-40.
- Miura M, Kobayashi M, Asou H, 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: 91-5.
- Miyara M, Sakaguchi S (2007). Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13: 108-16.
- Montgomery AM, Becker JC, Siu CH, Lemmon VP, Cheresh DA, Pancook JD et al (1996). Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol* 132: 475-85.
- Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Fruh K, Schachner M (1988). Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334: 701-3.
- Morales G, Hubert M, Brummendorf T, Treubert U, Tarnok A, Schwarz U et al (1993). Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. *Neuron* 11: 1113-22.
- Mousa SA (2008). Cell adhesion molecules: potential therapeutic & diagnostic implications. *Mol Biotechnol* 38: 33-40.
- Mueller MM, Fusenig NE (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 839-49.
- Munro JM, Pober JS, Cotran RS (1989). Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *Am J Pathol* 135: 121-33.
- 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: 1992-9.
- Nagai H, Kuroda A, Morioka Y (1986). Lymphatic and local spread of T1 and T2 pancreatic cancer. A study of autopsy material. *Ann Surg* 204: 65-71.
- Nagy JA, Brown LF, Senger DR, Lanir N, Van de Water L, Dvorak AM et al (1989). Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochim Biophys Acta* 948: 305-26.
- Nakao A, Harada A, Nonami T, Kaneko T, Takagi H (1996). Clinical significance of

- carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer. *Pancreas* 12: 357-61.
- Nakata A, Kamiguchi H (2007). Serine phosphorylation by casein kinase II controls endocytic L1 trafficking and axon growth. *J Neurosci Res* 85: 723-34.
- Nanda A, St Croix B (2004). Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 16: 44-9.
- Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di Filippo F et al (1997). Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res* 57: 1554-60.
- Nayeem N, Silletti S, Yang X, Lemmon VP, Reisfeld RA, Stallcup WB et al (1999). A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J Cell Sci* 112 ( Pt 24): 4739-49.
- Needham LK, Thelen K, Maness PF (2001). Cytoplasmic domain mutations of the L1 cell adhesion molecule reduce L1-ankyrin interactions. *J Neurosci* 21: 1490-500.
- Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H et al (2004). A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 350: 1200-10.
- Niedergethmann M, Hildenbrand R, Wostbrock B, Hartel M, Sturm JW, Richter A et al (2002). High expression of vascular endothelial growth factor predicts early recurrence and poor prognosis after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Pancreas* 25: 122-9.
- Nishimura K, Yoshihara F, Tojima T, Ooashi N, Yoon W, Mikoshiba K et al (2003). L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. *J Cell Biol* 163: 1077-88.
- Nitecki SS, Sarr MG, Colby TV, van Heerden JA (1995). Long-term survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. Is it really improving? *Ann Surg* 221: 59-66.
- Novak-Hofer I, Cohrs S, Grunberg J, Friedli A, Schlatter MC, Pfeifer M et al (2008). Antibodies directed against L1-CAM synergize with Genistein in inhibiting growth and survival pathways in SKOV3ip human ovarian cancer cells. *Cancer Lett* 261: 193-204.
- Nummer D, Suri-Payer E, Schmitz-Winnenthal H, Bonertz A, Galindo L, Antolovich D et al (2007). Role of tumor endothelium in CD4+ CD25+ regulatory T cell infiltration of human pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 99: 1188-99.
- Ohnishi T, Matsumura H, Izumoto S, Hiraga S, Hayakawa T (1998). A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. *Cancer Res* 58: 2935-40.
- Oleszewski M, Beer S, Katich S, Geiger C, Zeller Y, Rauch U et al (1999). Integrin and



- neurocan binding to L1 involves distinct Ig domains. *J Biol Chem* 274: 24602-10.
- Oleszewski M, Gutwein P, von der Lieth W, Rauch U, Altevogt P (2000). Characterization of the L1-neurocan-binding site. Implications for L1-L1 homophilic binding. *J Biol Chem* 275: 34478-85.
- Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H et al (2002). Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 193: 299-318.
- Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI (2007). Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis* 39: 212-20.
- Ozawa F, Friess H, Kunzli B, Shrikhande SV, Otani T, Makuuchi M et al (2001). Treatment of pancreatic cancer: the role of surgery. *Dig Dis* 19: 47-56.
- Pancook JD, Reisfeld RA, Varki N, Vitiello A, Fox RI, Montgomery AM (1997). Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J Immunol* 158: 4413-21.
- Papetti M, Herman IM (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947-70.
- Parikh AA, Fan F, Liu WB, Ahmad SA, Stoeltzing O, Reinmuth N et al (2004). Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am J Pathol* 164: 2139-51.
- Parikh AA, Liu WB, Fan F, Stoeltzing O, Reinmuth N, Bruns CJ et al (2003). Expression and regulation of the novel vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 by epidermal growth factor in human pancreatic carcinoma. *Cancer* 98: 720-9.
- Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H (2004). Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10398-403.
- Pepper MS, Vassalli JD, Orci L, Montesano R (1993). Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on in vitro angiogenesis. *Exp Cell Res* 204: 356-63.
- Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM (1991). GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 65: 359-62.
- Plouet J, Gospodarowicz D (1989). Transforming growth factor beta-1 positively modulates the bioactivity of fibroblast growth factor on corneal endothelial cells. *J Cell Physiol* 141: 392-9.
- Pober JS (1988). TNF as an activator of vascular endothelium. *Ann Inst Pasteur Immunol* 139: 317-23.
- Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R et al (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor

- necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 137: 1893-6.
- Polverini PJ (1996). Cellular adhesion molecules. Newly identified mediators of angiogenesis. *Am J Pathol* 148: 1023-9.
- Povlsen GK, Ditlevsen DK, Berezin V, Bock E (2003). Intracellular signaling by the neural cell adhesion molecule. *Neurochem Res* 28: 127-41.
- Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP (2001). Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 36: 145-55.
- Prevost N, Woulfe D, Tanaka T, Brass LF (2002). Interactions between Eph kinases and ephrins provide a mechanism to support platelet aggregation once cell-to-cell contact has occurred. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9219-24.
- Price EA, Coombe DR, Murray JC (1996). beta-1 Integrins mediate tumour cell adhesion to quiescent endothelial cells in vitro. *Br J Cancer* 74: 1762-6.
- Primiano T, Baig M, Maliyekkel A, Chang BD, Fellars S, Sadhu J et al (2003). Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements. *Cancer Cell* 4: 41-53.
- Quigley JP, Armstrong PB (1998). Tumor cell intravasation elucidated: the chick embryo opens the window. *Cell* 94: 281-4.
- Rathjen FG, Rutishauser U (1984). Comparison of two cell surface molecules involved in neural cell adhesion. *EMBO J* 3: 461-5.
- Rauch U, Feng K, Zhou XH (2001). Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan. *Cell Mol Life Sci* 58: 1842-56.
- Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R, Powrie F (1998). CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur J Immunol* 28: 3435-47.
- Reid RA, Hemperly JJ (1992). Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of RNA. *J Mol Neurosci* 3: 127-35.
- Reidy M, Zihlmann P, Hubbell JA, Hall H (2006). Activation of cell-survival transcription factor NFkappaB in L1Ig6-stimulated endothelial cells. *J Biomed Mater Res A* 77: 542-50.
- Renzi MJ, Feiner L, Koppel AM, Raper JA (1999). A dominant negative receptor for specific secreted semaphorins is generated by deleting an extracellular domain from neuropilin-1. *J Neurosci* 19: 7870-80.
- Risau W, Drexler H, Mironov V, Smits A, Siegbahn A, Funa K et al (1992). Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors* 7: 261-6.
- Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K (1998). Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth

- factor-C. *J Biol Chem* 273: 8413-8.
- Rodig N, Ryan T, Allen JA, Pang H, Grabie N, Chernova T et al (2003). Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *Eur J Immunol* 33: 3117-26.
- Roonprapant C, Huang W, Grill R, Friedlander D, Grumet M, Chen S et al (2003). Soluble cell adhesion molecule L1-Fc promotes locomotor recovery in rats after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 20: 871-82.
- Rosenthal A, Jouet M, Kenwrick S (1992). Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus. *Nat Genet* 2: 107-12.
- Roth SJ, Carr MW, Rose SS, Springer TA (1995). Characterization of transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *J Immunol Methods* 188: 97-116.
- Ruegg C, Dormond O, Foletti A (2002). Suppression of tumor angiogenesis through the inhibition of integrin function and signaling in endothelial cells: which side to target? *Endothelium* 9: 151-60.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238: 491-7.
- Rupp PA, Little CD (2001). Integrins in vascular development. *Circ Res* 89: 566-72.
- Ruppert M, Aigner S, Hubbe M, Yagita H, Altevogt P (1995). The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J Cell Biol* 131: 1881-91.
- Sadoul K, Sadoul R, Faissner A, Schachner M (1988). Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 50: 510-21.
- Saffell JL, Williams EJ, Mason IJ, Walsh FS, Doherty P (1997). Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* 18: 231-42.
- Sakaguchi S (2002). Immunologic tolerance maintained by regulatory T cells: implications for autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. *Vox Sang* 83 Suppl 1: 151-3.
- Salmi M, Grenman R, Grenman S, Nordman E, Jalkanen S (1995). Tumor endothelium selectively supports binding of IL-2-propagated tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 154: 6002-12.
- Salvucci O, Basik M, Yao L, Bianchi R, Tosato G (2004). Evidence for the involvement of SDF-1 and CXCR4 in the disruption of endothelial cell-branching morphogenesis and angiogenesis by TNF-alpha and IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 76: 217-26.
- Sammar M, Aigner S, Hubbe M, Schirmacher V, Schachner M, Vestweber D et al (1994). Heat-stable antigen (CD24) as ligand for mouse P-selectin. *Int Immunol* 6: 1027-36.

- Sana TR, Janatpour MJ, Sathe M, McEvoy LM, McClanahan TK (2005). Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. *Cytokine* 29: 256-69.
- Sarma V, Wolf FW, Marks RM, Shows TB, Dixit VM (1992). Cloning of a novel tumor necrosis factor-alpha-inducible primary response gene that is differentially expressed in development and capillary tube-like formation in vitro. *J Immunol* 148: 3302-12.
- Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG (2008). Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28: 402-13.
- Saugier-Verber P, Martin C, Le Meur N, Lyonnet S, Munnich A, David A et al (1998). Identification of novel L1CAM mutations using fluorescence-assisted mismatch analysis. *Hum Mutat* 12: 259-66.
- Schaefer AW, Kamei Y, Kamiguchi H, Wong EV, Rapoport I, Kirchhausen T et al (2002). L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J Cell Biol* 157: 1223-32.
- Schardt C, Heymanns J, Rotsch M, Havemann K (1993). Differential expression of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in lung cancer cell lines of various histological types. *Eur J Cancer* 29A: 2250-5.
- Schimmenti LA, Yan HC, Madri JA, Albelda SM (1992). Platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1, modulates cell migration. *J Cell Physiol* 153: 417-28.
- Schmidt C, Kunemund V, Wintergerst ES, Schmitz B, Schachner M (1996). CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J Neurosci Res* 43: 12-31.
- Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM (2005). Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* 128: 1606-25.
- Schoenberg MH, Gansauge F, Kunz R (1997). [Value of pylorus preserving partial duodenopancreatectomy in ductal pancreatic carcinoma]. *Chirurg* 68: 1262-7.
- Scholz M, Nowak P, Schuller A, Margraf S, Blaheta R, Cinatl J et al (2004). Cardiac surgery with extracorporeal circulation: neutrophil transendothelial migration is mediated by beta1 integrin (CD29) in the presence of TNF-alpha. *J Invest Surg* 17: 239-47.
- Schwaeble W, Kerlin M, Meyer zum Buschenfelde KH, Dippold W (1993). De novo expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in pancreas cancer. *Int J Cancer* 53: 328-33.
- Schwartz MA, Assoian RK (2001). Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 114: 2553-60.
- Scotland P, Zhou D, Benveniste H, Bennett V (1998). Nervous system defects of AnkyrinB (-

- /-) mice suggest functional overlap between the cell adhesion molecule L1 and 440-kD AnkyrinB in premyelinated axons. *J Cell Biol* 143: 1305-15.
- Sebens Muerkoster S, Werbing V, Sipos B, Debus MA, Witt M, Grossmann M et al (2007). Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Oncogene* 26: 2759-68.
- Senner V, Kismann E, Puttmann S, Hoess N, Baur I, Paulus W (2002). L1 expressed by glioma cells promotes adhesion but not migration. *Glia* 38: 146-54.
- Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K (2000). High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 88: 2239-45.
- Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28: 815-20.
- Sheibani N, Frazier WA (1998). Down-regulation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 results in thrombospondin-1 expression and concerted regulation of endothelial cell phenotype. *Mol Biol Cell* 9: 701-13.
- Shevach EM (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2: 389-400.
- Shi Q, Le X, Wang B, Abbruzzese JL, Xiong Q, He Y et al (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene* 20: 3751-6.
- Shi Q, Le X, Wang B, Xiong Q, Abbruzzese JL, Xie K (2000). Regulation of interleukin-8 expression by cellular pH in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J Interferon Cytokine Res* 20: 1023-8.
- Shtutman M, Levina E, Ohouo P, Baig M, Roninson IB (2006). Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res* 66: 11370-80.
- Silletti S, Mei F, Sheppard D, Montgomery AM (2000). Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J Cell Biol* 149: 1485-502.
- Silletti S, Yebra M, Perez B, Cirulli V, McMahon M, Montgomery AM (2004). Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. *J Biol Chem* 279: 28880-8.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, 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: 735-45.

- Solomayer EF, Feuerer M, Bai L, Umansky V, Beckhove P, Meyberg GC et al (2003). Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analysed in the bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 9: 174-80.
- Sonderegger P, Rathjen FG (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: 1387-94.
- Springer TA (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-14.
- Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Muller C, Kubach J et al (2004). Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol* 34: 1303-11.
- Staton CA, Kumar I, Reed MW, Brown NJ (2007). Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis. *J Pathol* 212: 237-48.
- Steeg PS (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 12: 895-904.
- Stephens LE, Sutherland AE, Klimanskaya IV, Andrieux A, Meneses J, Pedersen RA et al (1995). Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev* 9: 1883-95.
- Stipa F, Lucandri G, Limiti MR, Bartolucci P, Cavallini M, Di Carlo V et al (2002). Angiogenesis as a prognostic indicator in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 22: 445-9.
- Stoeck A, Gast D, Sanderson MP, Issa Y, Gutwein P, Altevogt P (2007). L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 104: 461-9.
- Stoeck A, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F et al (2006a). A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 393: 609-18.
- Stoeck A, Schlich S, Issa Y, Gschwend V, Wenger T, Herr I et al (2006b). L1 on ovarian carcinoma cells is a binding partner for Neuropilin-1 on mesothelial cells. *Cancer Lett* 239: 212-26.
- Stupack DG, Cheresh DA (2002). ECM remodeling regulates angiogenesis: endothelial integrins look for new ligands. *Sci STKE* 2002: PE7.
- Su XD, Gastinel LN, Vaughn DE, Faye I, Poon P, Bjorkman PJ (1998). Crystal structure of hemolin: a horseshoe shape with implications for homophilic adhesion. *Science* 281: 991-5.
- Sutton AB, Canfield AE, Schor SL, Grant ME, Schor AM (1991). The response of endothelial

- cells to TGF beta-1 is dependent upon cell shape, proliferative state and the nature of the substratum. *J Cell Sci* 99 ( Pt 4): 777-87.
- Suzuki T, Kiyokawa N, Taguchi T, Sekino T, Katagiri YU, Fujimoto J (2001). CD24 induces apoptosis in human B cells via the glycolipid-enriched membrane domains/rafts-mediated signaling system. *J Immunol* 166: 5567-77.
- Szekanecz Z, Haines GK, Harlow LA, Shah MR, Fong TW, Fu R et al (1995). Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)-beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease. *Clin Immunol Immunopathol* 76: 187-94.
- Szekanecz Z, Szegedi G (1992). [Cell surface adhesion molecules: structure, function, clinical aspects]. *Orv Hetil* 133: 135-42.
- Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H et al (2003). Pre-B cell antigen receptor-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. *J Immunol* 170: 252-60.
- Takagi K, Takada T, Amano H (2005). A high peripheral microvessel density count correlates with a poor prognosis in pancreatic cancer. *J Gastroenterol* 40: 402-8.
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M et al (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10: 1969-80.
- Takahashi T, Nakamura F, Jin Z, Kalb RG, Strittmatter SM (1998). Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat Neurosci* 1: 487-93.
- Takeda Y, Asou H, Murakami Y, Miura M, Kobayashi M, Uyemura K (1996). A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. *J Neurochem* 66: 2338-49.
- Tang DG, Honn KV (1994). Adhesion molecules and tumor metastasis: an update. *Invasion Metastasis* 14: 109-22.
- Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA (2004). Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34: 2996-3005.
- Tang Q, Hendricks RL (1996). Interferon gamma regulates platelet endothelial cell adhesion molecule 1 expression and neutrophil infiltration into herpes simplex virus-infected mouse corneas. *J Exp Med* 184: 1435-47.
- Tanjore H, Zeisberg EM, Gerami-Naini B, Kalluri R (2008). Beta1 integrin expression on endothelial cells is required for angiogenesis but not for vasculogenesis. *Dev Dyn* 237: 75-82.
- Teicher BA (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant

- disease. *Clin Cancer Res* 13: 6247-51.
- ten Kate M, Hofland LJ, van Koetsveld PM, Jeekel J, van Eijck CH (2006). Pro-inflammatory cytokines affect pancreatic carcinoma cell. Endothelial cell interactions. *JOP* 7: 454-64.
- Thelen K, Kedar V, Panicker AK, Schmid RS, Midkiff BR, Maness PF (2002). The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J Neurosci* 22: 4918-31.
- Thies A, Berlin A, Brunner G, Schulze HJ, Moll I, Pfüller U et al (2007). Glycoconjugate profiling of primary melanoma and its sentinel node and distant metastases: implications for diagnosis and pathophysiology of metastases. *Cancer Lett* 248: 68-80.
- Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G et al (2002). Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* 38: 1708-16.
- Thornton AM, Shevach EM (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188: 287-96.
- Tomita Y, Watanabe H, Kobayashi H, Nishiyama T, Tsuji S, Imai K et al (1993). Expression of intercellular adhesion molecule-1 on transitional cell cancer. Possible significance in immunity against tumor cells. *Am J Pathol* 143: 191-8.
- Tononi G, Sporns O, Edelman GM (1999). Measures of degeneracy and redundancy in biological networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3257-62.
- Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, Cambot M, Gaulard P, Hermine O et al (2002). A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 3: 477-82.
- Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 358: 1-3.
- Tozer GM, Ameer-Beg SM, Baker J, Barber PR, Hill SA, Hodgkiss RJ et al (2005). Intravital imaging of tumour vascular networks using multi-photon fluorescence microscopy. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 135-52.
- Tozer GM, Morris CC (1990). Blood flow and blood volume in a transplanted rat fibrosarcoma: comparison with various normal tissues. *Radiother Oncol* 17: 153-65.
- Trede M (1996). Quality of life--quality of surgery. *World J Surg* 20: 941-9.
- Tudor KS, Hess KL, Cook-Mills JM (2001). Cytokines modulate endothelial cell intracellular signal transduction required for VCAM-1-dependent lymphocyte transendothelial migration. *Cytokine* 15: 196-211.
- Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD, Rowley DR (2002). Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive



- stroma xenograft model. *Cancer Res* 62: 6021-5.
- Van Camp G, Vits L, Coucke P, Lyonnet S, Schrandt-Stumpel C, Darby J et al (1993). A duplication in the L1CAM gene associated with X-linked hydrocephalus. *Nat Genet* 4: 421-5.
- van Kilsdonk JW, Wilting RH, Bergers M, van Muijen GN, Schalkwijk J, van Kempen LC et al (2008). Attenuation of melanoma invasion by a secreted variant of activated leukocyte cell adhesion molecule. *Cancer Res* 68: 3671-9.
- Vits L, Van Camp G, Coucke P, Franssen E, De Boulle K, Reyniers E et al (1994). MASA syndrome is due to mutations in the neural cell adhesion gene L1CAM. *Nat Genet* 7: 408-13.
- Voura EB, Ramjeesingh RA, Montgomery AM, Siu CH (2001). Involvement of integrin alpha(v)beta(3) and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell* 12: 2699-710.
- Waite KA, Eng C (2003). From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* 4: 763-73.
- Walsh FS, Doherty P (1997). Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 425-56.
- Wang L, Lin S, Rammohan KW, Liu Z, Liu JQ, Liu RH et al (2007). A dinucleotide deletion in CD24 confers protection against autoimmune diseases. *PLoS Genet* 3: e49.
- Wang SL, Kutsche M, DiSciullo G, Schachner M, Bogen SA (2000). Selective malformation of the splenic white pulp border in L1-deficient mice. *J Immunol* 165: 2465-73.
- Watt FM (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J* 21: 3919-26.
- Weidner N (1993). Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol* 10: 302-13.
- Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J (1993). Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 143: 401-9.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8.
- Wildbaum G, Westermann J, Maor G, Karin N (2000). A targeted DNA vaccine encoding fas ligand defines its dual role in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 106: 671-9.
- Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P (1994). Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 13: 583-94.
- Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C et al (1999). Vascular

- endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3071-6.
- Wolff JM, Frank R, Mujoo K, Spiro RC, Reisfeld RA, Rathjen FG (1988). A human brain glycoprotein related to the mouse cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 263: 11943-7.
- Wolman MA, Regnery AM, Becker T, Becker CG, Halloran MC (2007). Semaphorin3D regulates axon axon interactions by modulating levels of L1 cell adhesion molecule. *J Neurosci* 27: 9653-63.
- Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K (1999). In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 138-52.
- Wood PM, Schachner M, Bunge RP (1990). Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J Neurosci* 10: 3635-45.
- Wu LQ, Zhang WJ, Niu JX, Ye LY, Yang ZH, Grau GE et al (2008). Phenotypic and functional differences between human liver cancer endothelial cells and liver sinusoidal endothelial cells. *J Vasc Res* 45: 78-86.
- Xie K (2001). Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 12: 375-91.
- Xie K, Huang S (2003). Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. *Free Radic Biol Med* 34: 969-86.
- Xie K, Huang S (2003). Regulation of cancer metastasis by stress pathways. *Clin Exp Metastasis* 20: 31-43.
- Xie K, Wei D, Shi Q, Huang S (2004). Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 297-324.
- Yamada Y, Takakura N, Yasue H, Ogawa H, Fujisawa H, Suda T (2001). Exogenous clustered neuropilin 1 enhances vasculogenesis and angiogenesis. *Blood* 97: 1671-8.
- Yang S, Graham J, Kahn JW, Schwartz EA, Gerritsen ME (1999). Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am J Pathol* 155: 887-95.
- Yip PM, Siu CH (2001). PC12 cells utilize the homophilic binding site of L1 for cell-cell adhesion but L1-alpha3 interaction for neurite outgrowth. *J Neurochem* 76: 1552-64.
- Yip PM, Zhao X, Montgomery AM, Siu CH (1998). The Arg-Gly-Asp motif in the cell adhesion molecule L1 promotes neurite outgrowth via interaction with the alpha3 integrin. *Mol Biol Cell* 9: 277-90.
- Yoong KF, McNab G, Hubscher SG, Adams DH (1998). Vascular adhesion protein-1 and

## LITERATURVERZEICHNIS

---

ICAM-1 support the adhesion of tumor-infiltrating lymphocytes to tumor endothelium in human hepatocellular carcinoma. *J Immunol* 160: 3978-88.

Zahir N, Lakins JN, Russell A, Ming W, Chatterjee C, Rozenberg GI et al (2003). Autocrine laminin-5 ligates alpha6beta4 integrin and activates RAC and NFkappaB to mediate anchorage-independent survival of mammary tumors. *J Cell Biol* 163: 1397-407.

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

### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt *Herrn Prof. Dr. Peter Altevogt* für die Bereitstellung des Themas, die sehr gute Betreuung der Arbeit sowie seine stete Diskussionsbereitschaft.

*Herrn Prof. Dr. Ulrich Hilgenfeldt* danke ich für die bereitwillige Übernahme des Erstgutachtens.

Danken möchte ich ebenfalls *Herrn Prof. Dr. Volker Schirrmacher*, dass er mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit in der Abteilung Zelluläre Immunologie anfertigen zu können. Weiterhin bedanke ich mich auch für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Ratschläge.

*Herrn Prof. Dr. Michael Eisenhut* und *Herrn PD Dr. Rainer Zawatzky* möchte ich für die bereitwillige Übernahme der Prüfung danken.

*Frau Natalie Erbe-Hofmann* möchte ich ein sehr herzliches Dankeschön zukommen lassen. Durch ihre Hilfsbereitschaft, ihre wertvollen technischen Fähigkeiten und ihre Schneckennothilfe war sie mir stets eine größte Stütze im und nach dem täglichen Laborbetrieb.

Mein besonderer Dank gilt *Helena*, die mir durch hilfreiche wissenschaftliche Diskussion, entspannende, kurzweilige Kaffeepausen und ein bequemes Schlafplätzchen eine große Stütze gewesen ist.

*Svenja, Silke, Marco* und *Sascha* danke ich für diverse Feierabendbierchen, bayerische Filmabende und einen unvergesslichen Rosenmontagsumzug. Sie haben dazu beigetragen, den Laboralltag nicht ganz so trüb aussehen zu lassen.

*Anne* und *Nico* danke ich für einige, leider zu wenige, unterhaltsame Labortage und Zugfahrten.

Dem *ABC-Team* danke ich für lustige Abendstunden in Weil der Stadt und Affhöllerbach

## DANKSAGUNG

---

sowie für das Montags-Quiz im Mohr'n. *Tobias* möchte ich besonders für die stete Versorgung mit Tumorendothel danken, auch wenn das Material oft knapp war. *Kim* und *Andreas* gilt besonderer Dank für eine tatkräftige Unterstützung bei diversen Umzügen, Frisbee-Spielen am Neckar und mehr als einen unvergesslichen Spieleabend.

Mein besonderer Dank gilt *Daniel*, für seine unermüdliche Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen auch nach Feierabend, für die liebevolle und geduldige Unterstützung an so manchen schwierigen Punkten und für seine Stärke und sein Vertrauen. Ohne ihn hätte ich die Arbeit nie so weit gebracht. ... aber Äppler ist auf jeden Fall entschieden besser als Viez!

Ganz besonders herzlich möchte ich *meinen Eltern* für die bedingungslose Unterstützung in allen Lebenssituation danken

