

Inaugural - Dissertation

Zur

Erlangung der Doktorwürden

der

Naturwissenschaftlichen-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprechts-Karls-Universität

Heidelberg

Vorgelegt von

Diplom-Biologe Uwe Schirmer

aus: Mühlhausen/Thüringen

Tag der mündlichen Prüfung:.....

*Die transkriptionelle und epigenetische Regulation
des humanen LICAM Gens
im Endometriumkarzinom*

*Gutachter: Prof. Dr. Victor Umansky
Prof. Dr. Peter Altevogt*

Für meine Familie und besten Freunde.

„Der Mensch braucht für sein Seelenheil drei Dinge: das Wissen, woran er glauben soll, das Wissen, was er begehren soll, und das Wissen, was er tun soll.“ - Thomas von Aquin

Danksagung

Auch wenn diese Arbeit durch eine individuelle Leistung angefertigt wurde, so ist es dennoch der Unterstützung zahlreicher Personen zu verdanken, dass ich das große Ziel trotz einiger Höhen und Tiefen erreicht habe. Aus diesem Grund möchte ich die Gelegenheit nutzen, diesen Personen für jeglich erdenkliche Hilfe zu danken.

In erster Linie danke ich Prof. Dr. Peter Altevogt, ohne dessen Vertrauen, fast grenzenlosen Enthusiasmus und bester Anleitung, die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Victor Umansky für die Anfertigung des ersten Gutachtens und die Betreuung meiner Arbeit als TAC-Mitglied.

Außerdem danke ich den Mitgliedern des Prüfungskomitees, dass sie sich bereit erklärt haben an meiner Disputation zum Erreichen der Doktorwürde teilzunehmen.

Nicht zu vergessen ist natürlich die Hilfe von den wahrscheinlich besten Arbeitskollegen der Welt. Deshalb danke ich den folgenden Leuten für großartige Tage im und außerhalb des Labors. Marco, der mich schon zu Beginn der Diplomarbeit in seine Obhut genommen hat und dessen Vermächtnis ich hoffentlich in seinem Sinne weitergeführt habe. Anne und Helena, für die manchmal doch amüsante weibliche Sicht der Dinge und ganz nebenher auch ihre wissenschaftliche Unterstützung. Niko, für seine ehrlichen Worte bei wissenschaftlichen sowie nicht-wissenschaftlichen Fragen und wirklich einprägsame Nächte in der unteren Straße. John, für seinen grenzenlosen Optimismus und einen unvergessenen Spaziergang durch das schöne Glasgow. Natalie, der guten Seele des Labors, für die zahlreichen Anekdoten aus dem Leben und über das DKFZ sowie ihre Hilfe die ich nur all zu oft in Anspruch genommen habe. Sascha, für seine zahlreichen Tipps in allen Lebenslagen und seine unablässige Kooperationsbereitschaft. Dann noch den Kollegen vom legendären 7. Stock Eva, Matthias und Michael für die geliehenen Materialien und gemeinsamen Stunden beim Verzehr der obligatorischen Laborbiere. Nicht zu vergessen sind die ehemaligen Mitglieder der AG Altevogt.

Außerdem danke ich meiner besseren Hälfte Aileen für das nun schon 11,5 Jahre währende Vertrauen in meine Person und für jede Minute in diesen Jahren.

Meiner Schwester Susann, dass sie sich trotz aller Umstände Zeit für meine Fragen und diese Arbeit genommen hat.

Meinem Bruder Jens, der stets ein Vorbild war und mich in meinem Tun bestätigt hat. Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich durch das Leben geleitet haben und die mir in all den Jahren die Möglichkeit gaben, die Freiheiten zu nutzen, die sich boten.

Deklaration

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selber angefertigt habe und das ich bis auf die angegebenen Quellen und Materialien keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe.

Heidelberg den.....

Unterschrift _____

Uwe Schirmer

Abstract

The endometrial carcinoma (EC) is the most frequent gynecological malignancy in the western world. Tumors of that entity are classified into two subtypes, the less aggressive type-I-EC, which is correlated with a good prognosis, and a highly differentiated and more aggressive type-II-EC. Recent studies demonstrated that the L1CAM molecule, which is normally not expressed in the endometrial tissue, plays a central role in the progression of the EC. Aberrant L1CAM expression is exclusively detectable in high grade type-II endometrial carcinomas, namely the serous and clear cell phenotypes. The abnormal L1CAM expression is correlated with a poor prognosis, not only in endometrial carcinomas but also in a variety of other tumor entities. It has been shown that the expression of L1CAM increases tumor cell motility and invasion, as well as tumor growth.

Furthermore it could be shown that in some human carcinomas the L1CAM expression is restricted to the invasive front of the tumor. There is evidence that cells at the invasive front undergo an epithelial mesenchymal transition (EMT). These cells benefit from L1CAM-mediated cell motility when leaving the solid tumor and forming metastasis elsewhere in the body.

Despite the extensive work on L1CAM expression in human tumors the mechanism, which drives the L1CAM upregulation still remains to be unravelled. Along this line, the central aim of this thesis was to identify the mechanisms contributing to the regulation of L1CAM expression in endometrial carcinomas. To address this question we investigated the transcriptional regulation of L1CAM on different levels. First we could show that a TGF- β 1 induced EMT leads to increased L1CAM expression in EC cell lines and this process depends on the transcription factor slug. DNA binding studies revealed a direct interaction of slug with both L1CAM promoter sites. Furthermore a positive correlation between slug and L1CAM levels could be shown in different EC cell lines. Beside the activator slug the repressor REST was identified to contribute to the L1CAM regulation. The regulatory role of REST was described in neuronal cells before and has now been confirmed in EC cell lines as well. However, it is still unclear which mechanism underlies the strict repression of the L1CAM-gene by REST in the EC cell lines.

Two epigenetic mechanisms contributing to the regulation of L1CAM expression, DNA-methylation and histone deacetylation, could be identified. Both mechanisms suppress L1CAM and according to this, inhibition of histone deacetylases and DNA methyl transferases (DNMTs) lead to strongly increased L1CAM-expression in EC cell lines. Furthermore it was shown that L1CAM promoter hypomethylation and L1CAM expression are positively correlated in EC cell lines.

Surprisingly, the treatment of L1CAM positive cell lines with DNMT inhibitors leads to a strong decrease of the L1CAM-mRNA as well as protein level. It might be possible that a deregulation of microRNAs, especially the miR-34a, contribute to the post transcriptional regulation of L1CAM. A reporter assay revealed that miR-34a binds to the L1CAM 3'-UTR and thereby blocks the translation.

In summary, these data suggest a complex regulation of L1CAM on different levels. Epigenetic effects as well as transcriptional and post transcriptional mechanisms keep the L1CAM gene under control in normal cells, but a tumor-driven deregulation enhances aberrant L1CAM expression in high grade carcinomas.

Zusammenfassung

Das Endometriumkarzinom (EK) ist in den Industrieländern die häufigste diagnostizierte invasive Tumorerkrankung des weiblichen Urogenitaltrakts. Bei der Klassifizierung wird zwischen dem meist mit einem positiven Verlauf assoziierten Typ-I EK und dem aggressiven Typ-II EK unterschieden. Ergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass dem Zelladhäsionsmolekül L1CAM, welches von gesundem Endometrium nicht exprimiert wird, eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression zukommt. L1CAM wird dabei hauptsächlich bei hochgradigen Typ-II EKs, die als seröse und klarzellige Adenokarzinome eingestuft werden, detektiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression des L1CAM-Gens die Motilität der Tumorzellen sowie das Tumorstadium fördert. Dabei ist ein charakteristisches Merkmal, dass die L1CAM-Genexpression oft mit der invasiven Front eines Tumors assoziiert ist. Es wird beschrieben, dass Zellen in der invasiven Front eine Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) durchlaufen und anschließend in das umgebende Gewebe invadieren. Dieser Prozess wird durch die L1CAM-Überexpression unterstützt.

Derzeit ist immer noch unklar, wie es zu dieser atypischen L1CAM-Expression an der invasiven Tumorfrente kommt. Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war daher, welchen Regulationsmechanismen das L1CAM-Gen im endometrialen Tumorgewebe unterliegt. Um dies zu klären, wurde die transkriptionelle Regulation von L1CAM auf unterschiedlichen Ebenen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die TGF- β 1 induzierte EMT in EK-Zellen zu einer Aktivierung von L1CAM führt, die durch den EMT assoziierten Transkriptionsfaktor Slug vermittelt wird. Die durchgeführten DNA-Bindungsanalysen bestätigen eine direkte Interaktion des Transkriptionsfaktors Slug mit den zwei alternativen Promotoren des *L1CAM*-Gens. Des Weiteren sind Slug und L1CAM auf mRNA-Ebene in EK-Zelllinien positiv miteinander korreliert. Neben dem EMT-Aktivator Slug konnte mit dem Repressor REST ein weiterer Regulator von L1CAM identifiziert werden. Der Einfluss von REST auf die L1CAM-Expression war zuvor bereits in neuronalen Zellen beschrieben worden. Der direkte Mechanismus, über den REST in die L1CAM-Expression eingreift, bleibt zu klären.

Über der Ebene der transkriptionellen Regulation hinaus, konnte gezeigt werden, dass auch der epigenetischen Regulation eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der L1CAM-Expression zukommt. So konnte nachgewiesen werden, dass sowohl ein Einfluss der Histon-Deacetylierung als auch der DNA-Methylierung bei der Suppression des L1CAM-Gens vorliegt. Dementsprechend führte die Behandlung von EK-Zelllinien mit Inhibitoren der Histon-Deacetylasen und/oder DNA-Methyltransferasen (DNMTs) zu einer Aktivierung des L1CAM-Gens. Darüber hinaus konnte mittels einer Methylierungsanalyse nachgewiesen werden, dass in EK-Zelllinien der Grad der Promoter-Hypomethylierung mit der L1CAM-Expression korreliert.

Entgegen der Erwartungen führte die Behandlung von L1CAM exprimierenden Zelllinien mit DNMT-Inhibitoren, zu einer drastischen Abnahme der L1CAM-Expression. Die nachfolgende Analysen dieses Effekts offenbarten eine Aktivierung von microRNAs, insbesondere der miR-34a, welche sehr wahrscheinlich zu der post-transkriptionellen Regulation von L1CAM beiträgt.

Zusammenfassend belegen die Daten dieser Arbeit eine komplexe Kontrolle des L1CAM-Gens auf mehreren Ebenen. So greifen sowohl epigenetische als auch transkriptionelle und post-transkriptionelle Mechanismen in die Expression von L1CAM ein. Eine Derepression dieser komplexen Repression kann so zu einer fokalen Aktivierung von L1CAM in hochgradigen EKs führen.

Inhalt

A	Einleitung.....	9
1.	<i>Das L1 Zelladhäsionsmolekül CD171 (L1-cell adhesion molecule).....</i>	<i>9</i>
1.1	Die Struktur von L1CAM und dessen proteolytische Spaltung	9
2.	<i>Funktion von L1CAM</i>	<i>11</i>
2.1	Expression und Funktion von L1CAM im zentralen Nervensystem	11
2.2	Expression und Funktion von L1CAM in nicht neuronalen Gewebe	12
2.3	Homo- und heterophile Interaktionen des L1CAM-Moleküls	12
2.4	Intrazelluläre Interaktionen von L1CAM.....	14
2.5	L1CAM-Expression und –Funktion in humanen Tumoren	15
3.	<i>Die Regulation des L1CAM-Gens</i>	<i>17</i>
3.1	Struktur des L1CAM Genlokus	17
3.2	Transkriptionelle Regulation von L1CAM.....	18
4.	<i>Expression von L1CAM in der epithelialen mesenchymalen Transition</i>	<i>21</i>
4.1	Der EMT-Prozess.....	21
4.2	Die Rolle der EMT bei der Tumorgenese und der Metastasenbildung	23
4.3	Die Rolle von L1CAM während der EMT und die Regulation durch Slug ..	23
4.4	Der Transkriptionsfaktor Slug.....	25
5.	<i>Der Transkriptionsfaktor REST</i>	<i>27</i>
5.1	REST in humanen Tumoren.....	28
6.	<i>Endometriumkarzinom.....</i>	<i>30</i>
6.1	Pathologie des Endometriumkarzinoms	30
6.2	Pathogenese.....	32
7.	<i>Epigenetische Regulation.....</i>	<i>34</i>
7.1	Epigenetische Regulation von L1CAM.....	36
8.	<i>Problemstellung.....</i>	<i>37</i>

B	Material	38
1.	<i>Zelllinien</i>	38
2.	<i>Medien und Mediensupplemente</i>	39
3.	<i>Inhibitoren</i>	39
4.	<i>Medienzusammensetzung</i>	39
5.	<i>Zytokine</i>	40
6.	<i>Prokaryotische Zellen und Kulturmedien</i>	40
6.1	Prokaryotischen Stämme	40
6.2	Kulturmedium	40
7.	<i>Antikörper und Farbstoffe</i>	40
7.1	Primäre anti-human Antikörper	40
7.2	Konjugierte sekundäre Antikörper	41
7.3	Isotypkontrollen	41
7.4	Farbstoffe	41
8.	<i>Chemikalien</i>	42
9.	<i>DNA modifizierende Enzyme und Reagenzien</i>	42
10.	<i>Geräte und Materialien</i>	42
11.	<i>Kits</i>	43
12.	<i>Molekulare Marker (DNA, RNA & Protein)</i>	44
13.	<i>Plasmide</i>	44
14.	Primer	45
14.1	Primer zur quantitativen Detektion	45
14.2	Primer zur quantitativen Detektion der Chromatin Immunopräzipitation	46
14.3	Primer zur Amplifizierung von mRNA oder genomischer DNA	48
14.4	Primer und TaqMan-Probe für MethyLight-Reaktion	49
14.5	Primer zur Amplifikation Bisulfitbehandelter DNA	49

15. <i>siRNA Sequenzen</i>	49
16. <i>Software</i>	50
17. <i>Verbrauchsmaterialien</i>	50
18. <i>Versuchstiere</i>	51
19. <i>Lösungen und Puffer</i>	51
C Methoden	53
1. <i>Zellbiologische Methoden</i>	53
1.1 Kultivierung humaner Karzinomzelllinien	53
1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	53
1.3 Kryokonservierung humaner Zellen	53
1.4 Auftauen kryokonservierter Zellen	53
1.5 Cytokinbehandlung von endometriumkarzinom Zellen	54
1.6 Inhibitorbehandlung von Karzinomzelllinien	54
2. <i>Transiente Transfektion</i>	54
2.1 Transiente Transfektion mit JetPei	54
2.2 Transiente Transfektion mit Oligofectamin	55
2.3 Transiente Transfektion mit FuGene[®] Reagenz	56
2.4 siRNA-Transfektion mit INTERFERin[®]	56
3. <i>Immunbiologische Methoden</i>	57
3.1 Durchflusszytometrie	57
3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie	58
3.3 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)	59
3.4 L1CAM-Elisa	59
4. <i>Biochemische Methoden</i>	60
4.1 Herstellung von Zelllysaten	60
4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Protein-Assay	60
4.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	61
4.4 Western Blot	62

5.	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	62
5.1	PCR.....	62
5.2	PCR-Programmprofile	64
5.3	RNA-Isolation	65
5.4	Reverse Transkription von mRNA in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA)	67
5.5	Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)	68
5.6	DNA Isolation aus humanen Zellen.....	70
5.7	Herstellung bisulfitmodifizierter DNA.....	71
5.8	Aufreinigung und Isolation von DNA.....	71
5.9	Ligation von PCR-Fragmenten und den Zielvektoren.....	72
5.10	Plasmidisolation	73
5.11	Enzymatische Restriktion von DNA.....	74
5.12	TaqMan [®] -miRNA-Expressionarray.....	74
D	Ergebnisse	76
1.	<i>Charakterisierung von Zelllinien aus dem EK</i>	77
1.1	L1CAM-Oberflächenexpression bei EK-Zelllinien.....	77
1.2	Charakterisierung der L1CAM-Proteinexpression in EK-Zelllinien.....	78
1.3	Charakterisierung der EK-Zelllinien auf mRNA-Level.....	79
1.4	Korrelation der Expressionsprofile von EK-Zelllinien	81
1.5	EK-Zelllinien weisen unterschiedliche p53-Mutationen auf.....	83
2.	<i>Induktion der L1CAM-Expression durch TGF-β1 ist Slug vermittelt</i>	84
2.1	TGF- β 1 und HGF induzieren EMT und L1CAM-Expression	85
2.2	Überexpression von Slug führt zu einer Induktion der L1CAM-Expression	87
2.3	Spezifische siRNA gegen Slug mRNA blockiert TGF- β 1 induzierte L1CAM-Expression	88
2.4	Der Transkriptionsfaktor Slug bindet an Bindemotive im L1CAM-Promoter	89
3.	<i>Einfluss des Transkriptionsfaktors REST (RE1 silencing transcription factor) auf die L1CAM Expression in EK-Zelllinien</i>	91
3.1	REST-Überexpression reduziert L1CAM-Expression in L1CAM positiven Zelllinien	92

3.2	In L1CAM-defizienten Zelllinien führt der siRNA-vermittelte knockdown von REST zur Induktion der L1CAM-Expression	93
3.3	L1CAM positive und L1CAM-defiziente Zelllinien zeigen die gleiche subzelluläre Lokalisation von REST	94
3.4	Alternatives Splicing von REST spielt nur eine untergeordnete Rolle in EK-Zelllinien	95
3.5	Die Bindungsaffinität zum RE-1 Bindemotiv ist in L1CAM-defizienten Zelllinien höher.....	98
4.	<i>Epigenetische Regulation von L1CAM</i>	100
4.1	Histon-Deacetylase-Inhibitoren führen zu einer erhöhten Expression von L1CAM.....	100
4.2	CT-X-Gene (cancer testis genes) werden in EK-Zelllinien epigenetisch reguliert	102
4.3	DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5'-AzaC induziert L1CAM-Expression in L1CAM-defizienten Zellen	103
4.4	Spezifische siRNA gegen DNMT1 mRNA induziert die L1CAM-Expression	106
4.5	5'-AzaC reduziert die DNA-Methylierung des L1CAM-Promoters.....	107
4.6	Die L1CAM Promotermethylierung unterscheidet sich bei stark und schwach exprimierenden Zellen.....	109
4.7	Die L1CAM-Promotermethylierung variiert im Tumorgewebe und zeigt keine Korrelation mit dem L1CAM-Expressionslevel	111
5.	<i>Repression der L1CAM Expression</i>	113
5.1	Azacytidine inhibiert L1CAM-Expression in L1CAM exprimierenden Zellen	113
5.2	<i>Azacytidin aber nicht TSA führt zu einer Repression der L1CAM-Expression...</i>	114
5.3	Der Effekt der 5'-AzaC-Behandlung ist zeit- und konzentrationsabhängig	116
5.4	Decitabin, ein weiteres Cytosinanalagon, induziert wie Azacytidin L1CAM Repression	117

5.5	Runterregulierung von DNMT1 durch spezifische siRNA führt zu einer Inhibition der L1CAM Expression	119
5.6	Hypomethylierung führt zu keiner geänderten Expression L1CAM regulierender Transkriptionsfaktoren.....	119
5.7	Azacytidin führt zur Änderung des miRNA-Expressionsmusters	120
5.8	miR-34a bindet an die L1CAM-3'-UTR	122
5.9	Endogene mi34-Expression korreliert nicht mit der L1CAM-Expression..	123
6.	<i>Herstellung einer transgenen Maus</i>	125
E Diskussion.....		129
1.	<i>Expression von L1CAM im Endometriumkarzinom</i>	129
2.	<i>Die Expression von L1CAM während der Epithelial-Mesenchymalen-Transition</i>	129
3.	<i>Regulation von L1CAM durch REST und Histonmodifizierungen.....</i>	132
4.	<i>Regulation von L1CAM durch DNA-Methylierung.....</i>	134
5.	<i>Post-transkriptionelle Regulation von L1CAM durch mi34a.....</i>	138
6.	<i>Die transkriptionelle Regulation von L1CAM in neuronalen Zellen und während der Tumorprogression</i>	140
7.	<i>Schlussfolgerung</i>	142
F Anhang.....		144
1.	<i>Liste der Publikationen.....</i>	144
2.	<i>Abkürzungen.....</i>	145
3.	<i>Zusätzliches Material</i>	149
G Bibliographie		156

A Einleitung

1. Das L1 Zelladhäsionsmolekül CD171 (*L1-cell adhesion molecule*)

1.1 Die Struktur von L1CAM und dessen proteolytische Spaltung

Das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1CAM CD171 (*cell adhesion molecule*) ist wie alle L1-ähnlichen Proteine ein Typ-I Membran-Glykoprotein und Mitglied der Immunglobulin Superfamilie (Moos et al., 1988). Die Proteine der L1-Familie sind gekennzeichnet durch den Besitz von Immunglobulindomänen (Ig), gefolgt von Fibronectin-Typ-III-Domänen (FNIII). Innerhalb der Säuger umfasst die gesamte Familie vier Moleküle: L1CAM, CHL1 (*close homologue of L1*), Neurofascin und NrCAM (*NgCAM related cell adhesion molecule*) (Moos et al., 1988). In Vertebraten nimmt L1CAM eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems ein.

Das L1CAM-Molekül ist je nach Glykolisierungsmuster zwischen 200-220 kDa groß und besitzt sechs Immunglobulin- und fünf Fibronectindomänen im extrazellulären Bereich (s. Abb A1). Dem C-Terminus folgen eine kurze Transmembranregion und ein hochkonservierter cytoplasmatischer Teil (Moos et al., 1988; Reid and Hemperly, 1992; Sonderegger and Rathjen, 1992; Hortsch, 1996).

Die gesamte Proteinsequenz ist stark konserviert und in einigen Spezies sind bereits Homologe nachgewiesen worden. Ursprünglich wurde L1CAM in der Maus als Zelloberflächen-Antigen durch monoklonale L1CAM-Antikörper identifiziert. In den folgenden Jahren wurden die Homologe im Menschen (Lindner et al., 1983; Wolff et al., 1988), in der Ratte (NILE) (Lee et al., 1981; Bock et al., 1985), im Huhn (NgCAM) (Grumet et al., 1984), *Drosophila* (neuroglian) (Bieber et al., 1989) und in *c.elegans* (LAD-1 und LAD-2) (Cox et al., 2004) gefunden.

Eine in mehreren Vertebraten auftretende Aminosäuresequenz ist das RGD-Motiv in der sechsten Ig-Domäne vom L1CAM-Protein. Außer im humanen L1CAM konnte diese Sequenz noch im L1CAM-Homolog der Maus (Hlavin and Lemmon, 1991; Reid and Hemperly, 1992) und der Ratte nachgewiesen werden. Das gleiche Motiv wurde auch bei anderen Mitgliedern der L1-Familie in der dritten FN-III-Domäne identifiziert. Noch weiter verbreitet als das RGD-Motiv ist das RSLE-Motiv im hochkonservierten cytoplasmatischen Teil der L1-Familie (Miura et al., 1991; Takeda et al., 1996; Kamiguchi and Lemmon, 1998). Dieses Motiv ist bei fast allen Vertebraten L1-Molekülen vorhanden und es entsteht durch alternatives Spleißen des 27. Exons. Im humanen L1CAM wird außerdem das Exon 2 alternativ gespleißt. Dieses Exon kodiert für ein YEGHH-Motiv welches in der ersten Ig-Domäne im N-terminalen Bereich des L1CAM-Moleküls lokalisiert ist (s. Abb A1) (Jouet et al., 1995a). Das Motiv ermöglicht die Interaktion mit neuronalen Liganden wie Axonin (De Angelis et al., 2001). Das alternative Spleißen von Exon 2 und 27 tritt vorwiegend bei nicht neuronalen Zellen auf, u.a. bei Schwann-Zellen, Astrocyten und Oligodendrocyten (Reid and Hemperly, 1992; Takeda et al., 1996). Während in neuronalen Zellen mRNA mit Exon 2 und 27 vorzufinden sind. Ein weiteres wichtiges Motiv im cytoplasmatischen Teil ist die Aminosäuresequenz 1224SFIGQY1229. Dieses Motiv ermöglicht die intrazelluläre Interaktion von L1CAM mit Ankyrinmolekülen und ist ebenfalls stark konserviert.

Die Phosphorylierung dieses Motivs induziert sogleich die Dissoziation des Ankyrins (Garver et al.,

1997; Gil et al., 2003). Neben den für die Interaktion essentiellen Motiven besitzt das humane L1CAM-Protein weitere Motive, welche eine proteolytische Spaltung ermöglichen. Zurückliegende Arbeiten bestätigen drei unterschiedliche proteolytische Motive, von denen zwei zu der Freisetzung einer extrazellulären löslichen Form führen und eines zur Abspaltung einer intrazellulären Domäne (Faissner et al., 1988; Beer et al., 1999; Maretzky et al., 2005).

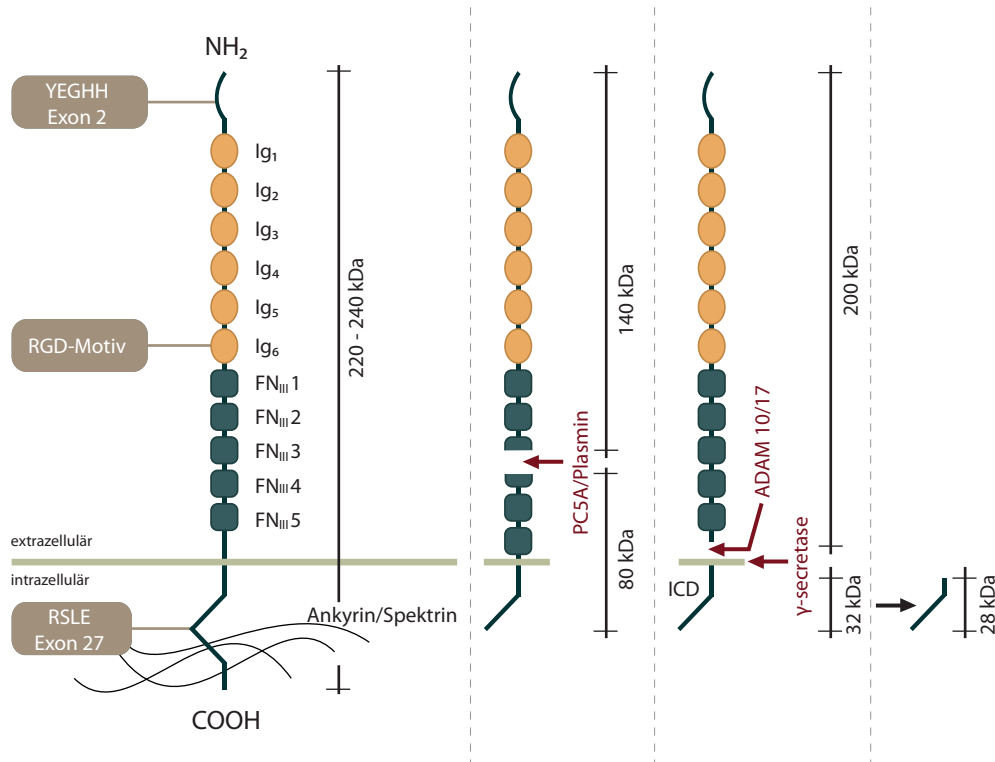


Abbildung A 1 Schematische Darstellung der molekularen Struktur von L1CAM (links) sowie der proteolytischen Motive mit den daraus resultierenden Spaltfragmenten (mittig und rechts). Hervorgehoben sind außerdem die alternativ gespleißten Exons 2 und 27 sowie das RGD-Motiv in der 6. Ig-Domäne. Die Interaktionsmöglichkeit mit dem Ankyrin/Spektrin-Netzwerk ist ebenfalls angedeutet. Eine genauere Beschreibung zu den einzelnen Prozessen ist im Text zu finden.

Es können, abhängig von der Position der Spaltmotive, unterschiedliche L1CAM-Proteinfragmente identifiziert werden. Eine bekannte Spaltstelle wurde innerhalb der dritten FNIII-Domäne lokalisiert. Die dibasische Kernsequenz 839QRKHSKRHHI848 innerhalb dieser Domäne wurde als Motiv für die Proteinasen Trypsin und Plasmin identifiziert. Der proteolytische Prozess resultiert in ein 140 kDa und ein 80 kDa großes Fragment (s. Abb A1)(Faissner et al., 1985; Sadoul et al., 1988; Nayeem et al., 1999). Bei der Spaltung mit Plasmin kommt es dabei zur Freisetzung der 140 kDa-Fragmente. Eine weitere Spaltung ereignet sich auch in der FNIII-Domäne und erfolgt durch die Proprotein Konvertase PC5A. Die Bindesequenz 840RKHSKR für diese Konvertase ist innerhalb der Plasmin-Kernsequenz lokalisiert und entspricht der allgemeinen Erkennungssequenz (R/K)X0 2,4,6,(K/R), der Proprotein-Konvertasen (Kalus et al., 2003).

Ein weiterer Spaltprozess führt zu der Freisetzung eines wasserlöslichen Fragments und wird als Ektodo-

mänen-Spaltung bezeichnet. Es kommt dabei zur Abspaltung der vollständigen funktionellen extrazellulären Domäne mit einer Größe von 200 kDa, während ein 32 kDa großer cytoplasmatischer Teil in der Membran verbleibt (Mechtersheimer et al., 2001). Das C-terminale Fragment (L1-CTF) kann wiederum sequentiell durch die γ -Secretase zu einer im Cytoplasma löslichen intrazellulären Domäne (L1-ICD) gespalten werden (Maretzky et al., 2005; Riedle et al., 2009). Die membranproximale Spaltung ist von Disintegrinen und Metalloproteinasen abhängig und ereignet sich sowohl in Tumorzelllinien als auch während der Entwicklung des Maushirns (Beer et al., 1999; Gutwein et al., 2000; Mechtersheimer et al., 2001). Für eine Freisetzung des löslichen L1CAM von Tumorzellen oder von Tumorzellen gebildeten Exosomen ist hierbei die Aktivität der Metalloproteinase ADAM10 notwendig (Gutwein et al., 2005; Stoeck et al., 2006). Die Phorboloster PMA induzierte L1CAM-Ektodomänenspaltung wird dagegen durch Disintegrine und die Metalloproteinase ADAM17 vermittelt (Maretzky et al., 2005; Stoeck et al., 2006). Eine gemeinsame Erkennungssequenz für Metalloproteinasen innerhalb des L1CAM-Moleküls konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht ermittelt werden. Die Größen der resultierenden Fragmente lassen jedoch auf eine Kernsequenz proximal zur Transmembrandomäne schließen.

2. Funktion von L1CAM

2.1 Expression und Funktion von L1CAM im zentralen Nervensystem

Durch die Beeinflussung der Migration von Neuronen mit Hilfe von monoklonalen L1-Antikörpern konnte bereits 1983 L1CAM als Zelloberflächenmolekül im Nervensystem der Maus nachgewiesen werden. Neben der Migration ist L1CAM auch in zahlreiche andere Prozesse während der Entwicklung involviert. Es konnte gezeigt werden, dass L1CAM für die Migration der neuronalen Vorläuferzellen, die Adhäsion, die Faskzikulierung und Myelinisierung von Neuriten, sowie für das Neuritenwachstum bei Axonen und Schwanzzellen von Bedeutung ist. Ein Einfluss von L1CAM auf die Dendritenbündelung wurde außerdem durch Dahme und Demyanenko bewiesen (Dahme et al., 1997; Demyanenko et al., 2004). Zahlreiche Mausmodelle unterstreichen die Bedeutung von L1CAM für die Entwicklung des zentralen Nervensystems. Knockout-Mäuse mit mutierten L1CAM zeigen auffällige Veränderungen der corticonalen, retino-collicularen, thalamocorticalen und colossal Axone.

Mutationen im Genlocus des humanen L1CAM resultieren dementsprechend in zahlreiche neuropathologische Fehlfunktionen und bestätigen die zentrale Rolle von L1CAM. Bis heute konnten mehr als 200 Mutationen von L1CAM identifiziert werden, die im Zusammenhang mit Missbildungen oder neurologischen Störungen stehen (Vos et al., 2010). Der Großteil der neurologischen Fehlentwicklungen geht auf Punktmutationen in der extrazellulären Domäne zurück, welche wiederum veränderte Adhäsionseigenschaften des L1CAM-Moleküls verursachen (Brummendorf et al., 1998; De Angelis et al., 2002). Im Vergleich dazu haben Mutationen in der intrazellulären Domäne seltener einen Einfluss auf die neuropathologische Situation (Yamasaki et al., 1997; Kenwrick et al., 2000). Fehlbildungen, welche mit einer L1CAM-Mutationen assoziiert sind der Hydrozephalus, das MASA-Syndrom (*mental retardation, aphasia, shuffling gait, adducted thumbs*), ACC (*agenesis of the corpus callosum*) und SPG1 (*spastic paraplegia type 1*) (Jouet et al., 1994; Vits et al., 1994; Fransen et al., 1995). Diese durch L1CAM-Mutationen verursachten neurologischen Fehlentwicklungen werden zu-

sammenfassend als CRASH-Syndrom bezeichnet (*corpus collasum hyperblasia, mental retardation, adducted thumbs, spastic paraplegia, x-linked hydrocephalus*) (Fransen et al., 1995). Eine weitere neurologische Fehlentwicklung bei der mit signifikanter Häufigkeit L1CAM-Mutationen auftreten ist die Hirschsprung-Krankheit (Okamoto et al., 1997; Parisi et al., 2002; Basel-Vanagaite et al., 2006; Nakakimura et al., 2008; Jackson et al., 2009). Die Erkrankung tritt in den meisten Fällen in Verbindung mit dem Symptom des Hydrozephalus auf und es ist unklar, inwiefern die L1CAM-Mutation mit zum Erkrankungsbild beiträgt.

2.2 Expression und Funktion von L1CAM in nicht neuronalen Gewebe

L1CAM wird neben neuronalen Zellen auch von einigen anderen Zelltypen exprimiert. In der Maus konnte L1CAM an der Oberfläche von hematopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark und bei B- und T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Kowitz et al., 1992). Beim Menschen wurde L1CAM auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Lymphozyten, Monozyten, B-Lymphozyten und dendritischen Vorläuferzellen detektiert (Ebeling et al., 1996; Pancook et al., 1997). In B-Zellen wurde eine alternativ gespleißte Variante von L1CAM ohne Exon 2 nachgewiesen (Jouet et al., 1995b). Der funktionelle Aspekt der L1CAM-Expression von diesen Zellen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Wie bei neuronalen Zellen wurde jedoch auch bei humanen und murinen Lymphozyten ein Einfluss auf die Migrations- und Adhäsionseigenschaften durch L1CAM beschrieben (Hubbe et al., 1993; Ebeling et al., 1996; Duczmal et al., 1997). Zusätzlich wirkt L1CAM in Mäusen als Co-Stimulationsfaktor bei der T-Zellaktivierung und es konnte belegt werden, dass ein Antikörper gegen L1CAM die T-Zellproliferation blockiert. Entsprechend führt die Überexpression von L1CAM in murinen Myeloma-Zellen zu einer Erhöhung der T-Zell-Antwort (Balaian et al., 2000). Ein weiteres Antikörperexperiment in der Maus offenbarte eine Störung der Lymphknotenreorganisation durch die Blockierung von L1CAM (Di Sciuillo et al., 1998). Nicht zuletzt scheint L1CAM auch für die normale Entwicklung der Milz essentiell zu sein. Das offenbaren Untersuchungen an L1CAM-defizienten Mäusen bei denen Tiere ohne L1CAM Missbildungen der weißen Pulpa aufwiesen (Wang et al., 2000). Weitere Gewebe, in denen L1CAM-Expression identifiziert werden konnte, waren epitheliale Zellen des urogenitalen Trakts bei männlichen Mäusen und Zellen im Darm von Mäusen (Kujat et al., 1995). Außerdem wurde eine erhöhte Expression von L1CAM in der basolateralen und lateralen Membran von epithelialen Zellen des Sammelkanals der Niere festgestellt. Während einer tubulären Nekrose verlieren die Zelle die beschriebene polarisierte Verteilung von L1CAM (Allory et al., 2008). Eine funktionelle Analyse der L1CAM-Expression in epithelialen Zellen hat hier noch nicht stattgefunden.

2.3 Homo- und heterophile Interaktionen des L1CAM-Moleküls

Über die extrazelluläre Domäne kann L1CAM sowohl homophil an ein weiteres L1CAM-Molekül als auch heterophil mit anderen Ligandenmolekülen interagieren. Die Interaktionen sind dabei *cis*- und *trans* gerichtet. Können also auf der Oberfläche der gleichen Zelle oder einer benachbarten Zelle erfolgen. Als heterophile Liganden von L1CAM sind bekannt:

- a.) neuronale Zelladhäsionsmolekülen der Ig-Superfamilie inklusive Nr-CAM, F3/II/Kontaktin; (Kuhn et al., 1991; Brummendorf and Rathjen, 1993; Treubert and Brummendorf, 1998)
- b.) andere Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) wie Intergrine oder CD24 (Yip et al., 1998; Kleene et al., 2001; Yip and Siu, 2001);
- c.) Moleküle der Extrazellulären Matrix (ECM) wie Laminin, das Chondroitinsulfat-Proteoglykan Phospho-

can und Neurocan (Grumet et al., 1996); d.) Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) wie EGFR, der Fibroblasten Wachstumsfaktorrezeptor (FGFR) (Kulahin et al., 2008; Kulahin et al., 2009); e.) der Semaphorin (Sema) Co-Rezeptor Neuropilin-1 (NP-1) (Castellani et al., 2000; Castellani et al., 2002).

Im zentralen Nervensystem ist die homophilische Bindung von entscheidender Rolle. Exprimiert auf der Oberfläche von Axonen, vermittelt L1CAM dabei die Zelladhäsion, die Migration von Neuronen, das Neuritenwachstum und die Faszikulierung der Axone (Miura et al., 1992; Zhao and Siu, 1995; Lemmon and Schlessinger, 1998; Haspel et al., 2000). Als minimale Sequenz zur Aufrechterhaltung der homophilen Bindung wurden hierbei die Ig-Domänen Ig-1 bis Ig-4 identifiziert (Haspel et al., 2000; Gouveia et al., 2008). Die Prozesse während der Entwicklung des zentralen Nervensystems werden zusätzlich durch heterophile Bindungen gesteuert. Das Neuritenwachstum und die Faszikulierung werden so zum Beispiel auch durch die Wechselwirkungen mit Axonin/Tag-1/TAX-1 oder F3/F11/Kontaktin vermittelt (Kuhn et al., 1991; Brummendorf and Rathjen, 1993; Morales et al., 1993; Felsenfeld et al., 1994). Das YEGHH-Motiv im zweiten Exon scheint essentiell für die Axonin-1/Contactin Bindung (De Angelis et al., 2001). Für die Sema3a induzierte Repulsion der corticalen Axone ist die Interaktion mit NP-1 entscheidend (Castellani et al., 2000; Castellani et al., 2002). Die Wechselwirkung zwischen L1CAM und NP-1 wird dabei durch die erste Ig-Domäne vermittelt (Oleszewski et al., 1999; Castellani, 2002). Mit Neurocan wurde ein weiteres Molekül identifiziert, das mit der ersten Ig-Domäne interagiert.

Das Interaktionspotential der Ig-Domänen ist ein zentraler Mechanismus für die homo- und heterophile Bindung und umfasst vorwiegend die ersten vier Ig-Domänen Ig1-Ig4. *In vitro* Versuche belegten eine equipotente Funktion der Ig-Domänen im Vergleich zur kompletten Ektodomäne beim Neuritenwachstum (Haspel et al., 2000; Schurmann et al., 2001). Die Wechselwirkungen der Ig-Domänen erfordert eine Hufeisenkonformation der ersten vier Ig-Domänen. Ermöglicht wird die Konformation durch sieben Aminosäuren in der Linkerregion der Ig-Domänen zwei und drei. Es kommt zu einer Interaktion zwischen den Ig-Domänen eins und vier sowie zwei und drei (Schurmann et al., 2001).

Ein weiterer Bindungsmechanismus umfasst das RGD-Motiv in der sechsten Ig-Domäne. Verschiedene Arbeiten bewiesen die essentielle Rolle dieses Motivs bei der Interaktion mit verschiedenen Integrinen (Montgomery et al., 1996; Oleszewski et al., 1999). Die Aminosäurefolge RGD vermittelt die Bindung mit den Integrinen $\alpha v \beta 5$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$ und dem Thrombozyten spezifischen $\alpha II \beta 3$ (Ruppert et al., 1995; Ebeling et al., 1996; Felding-Habermann et al., 1997; Blaess et al., 1998; Oleszewski et al., 1999; Mechttersheimer et al., 2001).

Die Ig6-Domäne ermöglicht durch die Bindung von $\alpha v \beta 3$ -Integrin eine Stimulation der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) ERK1 und ERK2 in HUVEC-Zellen (human umbilical vein endothelial cells). Die Wechselwirkung vermittelt ein Überlebenssignal in den Zellen durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Hall et al., 2004; Reidy et al., 2006). Die Fibronectin-Domänen ermöglichen zusätzlich eine Interaktion mit dem Integrin $\alpha 9 \beta 1$ -Integrin (Silletti et al., 2000). Neben der Integrinbindung vermitteln die FN-Domänen außerdem eine Wechselwirkung mit dem Fibroblasten Wachstumsfaktorrezeptor FGFR. In diesem Zusammenhang belegten Kulahin und Kollegen eine direkte Interaktion des FGFR-Moleküls mit der FN-III-Domäne von L1CAM (Kulahin et al., 2008; Kulahin et al., 2009). Die Aktivierung des FGFR wurde dabei bereits zuvor als zentraler Mechanismus bei dem L1CAM vermittelten Neuritenwachstum beschrieben (Doherty and Walsh, 1996). In Ovarial Karzinomzelllinien wurde außerdem gezeigt, dass der mit Hilfe von L1CAM FGFR stimulierte Signalweg eine verminderte Apoptose, eine erhöhte Migration

und Invasion induziert (Zecchini et al., 2008). Die Effekte der FGFR-Aktivierung waren teilweise ERK1/2 vermittelt. Für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR wurde eine *cis*- und *trans*-Interaktion mit L1CAM beschrieben. Die Stimulation des EGFRs führt zu einer Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und ist abhängig von der homophilen L1CAM-Interaktion auf der Zelloberfläche (Islam et al., 2004).

In Ovarialkarzinomzelllinien wurde ein Einfluss der Wachstumsfaktoren HGF und EGF auf die L1CAM vermittelte Invasion und Migration nachgewiesen (Novak-Hofer et al., 2008). Eine Interaktion und bindungsabhängige Funktion konnte zusätzlich für die proteolytisch gespaltene L1CAM Ektodomäne gezeigt werden. Das lösliche Fragment induziert eine integrinabhängige Migration bei Tumorzellen (Montgomery et al., 1996; Mechtersheimer et al., 2001). Es wurde außerdem in der Aszitesflüssigkeit von Ovarialkarzinompatienten nachgewiesen (Fogel et al., 2003a; Gutwein et al., 2005; Bondong et al., 2012). Eine erhöhte Konzentration des löslichen L1CAM korreliert mit einer schlechten Prognose und einer Zunahme der Chemoresistenz (Bondong et al., 2012). Ein Nachweis des löslichen L1CAM war auch in den Mediumüberständen von Melanom-, Kolonkarzinom- und Ovarialkarzinomzelllinien möglich. Die gespaltene ektodermale Domäne wird dabei in die extrazelluläre Matrix freigesetzt und kann als ein Aktivator für die $\alpha\beta 3$ -vermittelte Migration bei Tumorzellen und aktivierten T-Lymphozyten dienen (Ebeling et al., 1996; Montgomery et al., 1996; Duczmal et al., 1997).

2.4 Intrazelluläre Interaktionen von L1CAM

Die Funktion von L1CAM als Zelladhäsionsmolekül wird auch durch die cytoplasmatische Domäne vermittelt (Herron et al., 2009). Ein zentrales Motiv für die Funktion dieser Domäne ist die Aminosäuresequenz RSLE im C-terminalen Bereich des Moleküls, welche durch das Exon 27 kodiert wird (s. Abb A1) (Kamiguchi and Lemmon, 1998). Neben dem Exon 2 wird von nicht neuronalen Zellen auch das Exon 27 alternativ gespleißt. Der cytoplasmatische Teil ist verantwortlich für die Interaktion von L1CAM mit Bestandteilen des submembranösen Zytoskeletts, mit Endozytose vermittelnden Molekülen und verschiedenen Kinasen. Die Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett erfolgt unter anderem durch die Bindung von Mitgliedern der Ankyrin-Familie (Davis and Bennett, 1994). Im Detail erfolgt die Interaktion über eine hoch konservierte 25 bp große Aminosäuresequenz, und umfasst das Sequenzmotiv ${}_{1224}\text{SFIGQY}^{1229}$ mit der Phosphorylierungsstelle Y^{1229} . Eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes inhibiert eine Ankyrin Bindung an den cytoplasmatischen Teil von L1CAM (Garver et al., 1997; Gil et al., 2003) und reguliert das Axonwachstum von kultivierten Neuronen (Gil et al., 2003). Die Phosphorylierung des Tyrosinrestes ist wichtig für die Entwicklung und das Wachstum des zentralen Nervensystems (Garver et al., 1997; Jenkins and Bennett, 2001).

Eine zusätzliche Möglichkeit einer Interaktion mit dem Zytoskelett besteht auch durch die Bindung von Ezrin/Radixin/Moesin-Domänen-Proteinen (ERM). ERMs binden an eine juxtamembrane Region von L1CAM, welche das RSLE-Motiv umfasst (Nagaraj and Hortsch, 2006; Whittard et al., 2006). Eine zusätzliche Möglichkeit einer Interaktion mit dem Zytoskelett besteht auch durch die Bindung von Ezrin/Radixin/Moesin-Domänen-Proteinen (ERM). ERMs binden an eine juxtamembrane Region von L1CAM, welche das RSLE-Motiv umfasst (Cheng et al., 2005a) und die Lokalisation von L1CAM in den Wachstumskegeln der Axone reguliert. Das RSLE-Motiv reguliert auch die Clathrin vermittelte Endozytose von L1CAM. Innerhalb dieser Region bindet das Adapter Protein 2 (AP2) an die Erkennungssequenz YRSLE. Die In-

teraktion von AP2 mit L1CAM wird über die Phosphorylierung des Tyrosinrestes innerhalb des Motivs reguliert. Als Kinase wurde die Nicht-Rezeptor Tyrosin Kinase p 60src identifiziert (Kamiguchi et al., 1998; Cheng et al., 2005b).

Eine Interaktion von L1CAM mit unterschiedlichen Kinasen ist essentiell für die Funktion von L1CAM. Es ist bekannt, dass die erhöhte Expression von L1CAM in einer erhöhten ERK-Aktivität resultiert und die Transkription von ERK-regulierten Genen induziert. Die ERK-Stimulation führt zu einer Erhöhten Migration und Invasion vermittelt, durch die Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen wie $\alpha v\beta 3$ -Integrin (Silletti et al., 2000). L1CAM wird durch ERK2 an zwei Serinresten des cytoplasmatischen Teils phosphoryliert, Ser¹²⁰⁴ und dem Ser¹²⁴⁸. Die Phosphorylierung der zwei Reste ist mit der Endozytose von L1CAM verbunden (Schäfer et al., 1999). Eine Mutation von zwei Phosphorylierungsstellen (T1247A und S1248A) im L1CAM-Molekül inhibiert die ERK2 vermittelte Phosphorylierung und führt zu einer verminderten Migration und Invasion im Vergleich zur nichtmutierten L1CAM Form (Gast et al., 2008). Arbeiten von Schmid und Cheng belegen, dass die ERK-Aktivierung durch L1CAM auch in eine Interaktion mit der Src-Kinase, bzw. den Ran bindenden Protein (RanBPM) involviert ist. (Schmid et al., 2000; Cheng et al., 2005b). Die Aktivierung der Src-Kinase reguliert die Dynamin vermittelt Endozytose von L1CAM und ist ein essentieller Schritt bei dem L1CAM/ERK-abhängigen Neuritenwachstum (Schmid et al., 2000). RanBPM wird als ein potielles Adaptermolekül zwischen L1CAM und dem ERK-Signalweg beschrieben.

Unabhängig von einer Kinaseaktivität wurde ein zusätzlicher Mechanismus der intrazellulären Regulation durch L1CAM offenbart. Der Signalweg beruht auf der Freisetzung der cytoplasmatischen Domäne durch die regulierte intramembran Proteolyse. Das entstehende Fragment im Zytoplasma ist 32 kDa groß und wird als L1-ICD (*intra cellular domain*) bezeichnet (Maretzky et al., 2005; Riedle et al., 2009). Es konnte eine Translokation des Fragments in den Nukleus nachgewiesen werden, wo die L1-ICD voraussichtlich zu einer L1CAM abhängigen Genregulation führt. In Glioblastomzellen induzierte die L1CAM-ICD eine NBS₁ vermittelte Aktivierung des DNA-Reparatur-Mechanismus und einer verminderten Radioresistenz (Cheng et al., 2011). Eine weitere Arbeit berichtet von der nukleären Translokation eines 70 kDa Transmembranfragments. Die Autoren vermuten einen weiteren Mechanismus bei den L1CAM induzierten Funktionen in der Entwicklung, Regeneration, Neurodegeneration und Tumorprogression im zentralen Nervensystem (Lutz et al., 2012).

2.5 L1CAM-Expression und –Funktion in humanen Tumoren

Zahlreiche Arbeiten berichten von einer erhöhten oder stark veränderten L1CAM-Expression in humanen Tumoren. L1CAM wurde demnach bei Zellen von Melanomen, Neuroblastomen, Kleinzelllungenkarzinomen (SCLC *small cell lung carcinoma*), Nicht-Kleinzellkarzinomen (NSCLC), Brustkarzinomen, Endometrialkarzinomen, Ovarialkarzinomen, Pankreaskarzinomen, Nierenkarzinomen, Gliom und Colonkarzinomen detektiert (Tsuzuki et al., 1998; Miyahara et al., 2001; Thies et al., 2002; Fogel et al., 2003b; Fogel et al., 2004; Allory et al., 2005; Gavert et al., 2005; Boo et al., 2007; Sebens Muerkoster et al., 2007; Wachowiak et al., 2007; Schroder et al., 2009; Bergmann et al., 2010; Tischler et al., 2011; Tsutsumi et al., 2011). Bei einigen Tumoren korreliert die L1CAM-Expression mit einer schlechten Prognose. Neben der veränderten Expression wurde der Einfluss auf die Tumorprogression für das Melanom, Brustkarzinom, Kolonkarzinom, Endometrialkarzinom, Ovarialkarzinom und das Pankreaskarzinom gezeigt (Thies et al., 2002; Fogel et al.,

2003a; Boo et al., 2007; Kaifi et al., 2007; Schroder et al., 2009; Ben et al., 2010; Huszar et al., 2010). In Neuroblastomen ist die L1CAM-Expression auch mit einer aggressiven Tumorprogression assoziiert, führt jedoch zu einem inversen Verhalten bei Neuroblastomen von Kindern (Wachowiak et al., 2007).

Aus dem Zusammenhang der auftretenden L1CAM-Expression während der Tumorentwicklung wurde auch die Funktion von L1CAM in humanen Tumoren untersucht. *In vivo*- und *in vitro*-Experimente belegen den Einfluss von L1CAM in den unterschiedlichen Phasen der Tumorprogression und die dafür verantwortlichen zellulären Mechanismen. Die L1CAM-Expression hat dabei entscheidende Auswirkungen bei der Verbreitung der Tumorzellen und den Prozessen der Migration und Adhäsion. Es wurde belegt, dass eine Überexpression von L1CAM eine erhöhte Migration induziert (Gast et al., 2005). Diese funktionellen Eigenschaften konnten unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen L1CAM oder einer Herunterregulation der L1CAM-Expression mit spezifischer siRNA blockiert werden (Mechtersheimer et al., 2001; Doberstein et al., 2011; Jung et al., 2011; Hai et al., 2012; Schafer et al., 2012a). Ähnliche Effekte wurden ebenfalls für die Adhäsion der behandelten Zellen beobachtet (Zecchini et al., 2008; Jung et al., 2011). Ein weiterer Beitrag zur Tumorprogression ist die Zellmigration durch endotheliale Zellschichten und die Invasion der einzelnen Zellen. Beide Prozesse sind Grundvoraussetzung für die Metastasenbildung und werden durch L1CAM-Expression unterstützt (Meier et al., 2006; Zecchini et al., 2008; Issa et al., 2009; Yang et al., 2009; Jung et al., 2011; Hai et al., 2012). Die Resultate der *in vitro* Invasionsexperimente werden durch die Tatsache gestützt, dass L1CAM verstärkt bei Zellen innerhalb der invasiven Front unterschiedlicher Tumore detektiert wurde (Fogel et al., 2004; Gavert et al., 2005; Zecchini et al., 2008; Min et al., 2010). Als Folge der gesteigerten Zellmotilität, konnte in einigen Mausmodellen auch ein erhöhtes Metastasierungspotential von L1CAM exprimierenden Zellen gegenüber Zellen ohne L1CAM festgestellt werden (Gavert et al., 2010; Hung et al., 2010; Hai et al., 2012; Schafer et al., 2012b).

Zusätzlich zeigte das Tumorwachstum in *Xenograft*-Modellen einen besseren Verlauf bei L1CAM negativen Tumoren (Min et al., 2010; Jung et al., 2011). Neben seinen migrationsfördernden Eigenschaften besitzt L1CAM nach neueren Studien auch die Fähigkeit, die Apoptoseinduktion in Folge von Nährstoffmangel oder Chemotherapeutikumbehandlung zu vermindern (Gavert et al., 2005; Stoeck et al., 2007; Doberstein et al., 2011). Die Experimente zeigten eine durch Chemotherapeutika induzierte L1CAM-Expression und eine daraus folgende Hochregulation des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 oder eine gesteigerte Expression von Interleukin-1 β sowie eine erhöhte Synthese von Stickstoffmonoxid (Sebens Muerkoster et al., 2007; Stoeck et al., 2007). In Glioblastomzellen ist die L1CAM-Expression und die damit verbundene Inhibition der Apoptose abhängig vom LGR5-Expressionslevel. In der Pankreaskarzinomzelllinie PT45 ist die L1CAM vermittelte Chemoresistenz nur bei α 5-Integrin-Interaktion nachweisbar (Sebens Muerkoster et al., 2009).

Auf Grund des Einflusses von L1CAM auf die zellulären Funktionen wie Migration, Adhäsion, Invasion und Chemoresistenz und deren Auswirkungen auf die Tumorprogression, stellt L1CAM ein zentrales Ziel bei Behandlungsstrategien dar. Zahlreiche Antikörperbehandlungen mit L1CAM-Antikörpern in xenograft Mausmodelle belegen eine Blockierung der L1CAM-vermittelten Funktionen und eine Verbesserung der Tumorprogression (Mechtersheimer et al., 2001; Primiano et al., 2003; Arlt et al., 2006; Meier et al., 2006; Gast et al., 2008; Novak-Hofer et al., 2008; Wolterink et al., 2010; Schafer et al., 2012a). In einem Modell konnte eine L1CAM abhängige Expression von Genen gezeigt werden, welche durch die extrazellulär signalgesteuerte Kinase (ERK-Gene) reguliert werden. Außerdem wurde eine Beteiligung von α v β 3-Integrin bei L1CAM vermittelter Migration beschrieben. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Inhibition der L1CAM-

Funktionen eine denkbare Möglichkeit bei der Therapie von L1CAM positiven Tumoren darstellt. Außer bei Zellen von primären Tumoren oder Metastasen, konnte L1CAM bei weiteren Untersuchungen auch auf der Oberfläche von Glioblastomstammzellen (*cancer stem cells*, csc) detektiert werden (Bao et al., 2008).

3. Die Regulation des L1CAM-Gens

3.1 Struktur des L1CAM Genlokus

Das humane und murine L1CAM-Gen ist innerhalb einer konservierten Region des Xq28-Chromosoms lokalisiert (Djabali et al., 1990). Es umfasst ca. 26 kbp und besteht aus 29 Exons. 28 der 29 Exons sind codierende Exons (Kallunki et al., 1997). Der offene Leseramen besteht aus 3825 bp und kodiert für 1257 Aminosäuren (Kallunki et al., 1997) (GenBank Z29373; M77640). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden 16 alternative Transkripte nachgewiesen, von denen sieben für kein Protein codieren. Die bekanntesten alternativen Spleißvarianten umfassen das Exon zwei und Exon 27. Beide Exons wurden in der neuronalen vollen Länge Isoform detektiert und fehlen in der Tumor-Isoform. Das Exon 2 kodiert für ein sechs Aminosäure großes Motiv innerhalb der Ig-Domäne 1 und ist essentiell für die Ligandenbindung und das Neuritenwachstum (De Angelis et al., 2001; Jacob et al., 2002). Exon 27 kodiert für das RSLE-Motiv und ist notwendig für die Clathrin-vermittelte Endocytose von L1CAM (Kamiguchi et al., 1998). In einer neueren Arbeit konnte gezeigt werden, dass es auch in Tumoren zu einer Expression der neuronalen Form kommt. Hierbei belegten Hauser et al., dass nur die Expression der neuronalen Isoform eine erhöhte Gelatinase-Expression in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3ip induziert und die Metastasenbildung fördert (Hauser et al., 2011).

Erste Erkenntnisse über die Regulation von L1CAM und die Organisation des Genlokus erhielt man durch die Experimente in der Neurobiologie. Kohl und Kollegen identifizierten bei einer Analyse des 5'-Endes auf Promoteraktivität ein Transkriptionsstart-Motiv proximal zum Exon 1. Innerhalb des Exon 1 ist auch das ATG Startcodon lokalisiert. Die Region um das Startcodon zeigte nur in der neuronalen Zelllinie N2A eine erhöhte transkriptionelle Aktivität. In der Zelllinie CHO, aus den Ovarien eines Hamsters, konnte dagegen keine Aktivität festgestellt werden. Basierend auf diesen Daten vermutete man eine neuronal spezifische Aktivität des Promoters. Bereits zu diesem Zeitpunkt vermuteten die Autoren ein weiteres regulatives Element ≥ 5 kbp vor dem Transkriptionsstart (Kohl et al., 1992). Nachfolgende Arbeiten konnten die Existenz des zweiten regulativen Elements nachweisen. Der zweite Promoter ist mehr als 10 kbp vor dem ATG Startcodon lokalisiert, proximal zum nicht translatierenden Exon 0 (Kallunki et al., 1997). Innerhalb des zweiten Promoters wurde außerdem ein weiterer Transkriptionsstart identifiziert (Pfeifer et al., 2010). Die größte Homologie des L1CAM Genlokus wurde zwischen dem humanen und dem murinen L1CAM festgestellt. In beiden Spezies konnte das distale nicht-translatierende Exon 0 nachgewiesen werden (Djabali et al., 1990; Kallunki et al., 1997). Untersuchungen bei weiteren Spezies konnten keine Sequenzhomologien in diesem Bereich feststellen. Bei späteren Analysen wurden außerdem CpG-Inseln innerhalb der Promoterregionen identifiziert (Kato et al., 2009).

3.2 Transkriptionelle Regulation von L1CAM

Die meisten Untersuchungen über L1CAM legten den Fokus auf die Funktion von L1CAM. Insbesondere wurden die Auswirkungen der L1CAM-Expression bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems und der Tumorprogression untersucht. Einige Arbeiten befassten sich ebenfalls mit der transkriptionellen Regulation von L1CAM. Dabei offenbarte sich ein komplexes Wechselspiel zwischen unterschiedlichen Cytokin aktivierten Signalwegen. Trotz dieser Erkenntnisse ist bis zum heutigen Zeitpunkt wenig über die Regulation bekannt. Gerade die L1CAM-Expression während der Tumorprogression ist noch nicht ausreichend untersucht und die häufigsten Ergebnisse zur L1CAM-Regulation erhielt man durch Experimente in der Neurobiologie.

Wie bereits erwähnt, führen einzelne Cytokine zu einer erhöhten Expression von L1CAM. Einer der ersten identifizierten Wachstumsfaktoren war der Nerven-Wachstumsfaktor NGF. Richter-Landsberg und Kollegen bewiesen eine Hochregulation von L1CAM nach der Zugabe von NGF bei PC12-Zellen (Lee et al., 1981; Bock et al., 1985; Seilheimer and Schachner, 1987). Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion durch NGF in PC12-Zellen abhängig von der Zelldichte ist (Itoh et al., 1995). Eine Stimulation der L1CAM-Expression durch NGF wurde auch bei weiteren Zelltypen beobachtet. So wurde bei Schwann-Zellen eine Induktion der L1CAM-Expression durch einen autokrinen Mechanismus festgestellt. Außerdem war der erste Nachweis für eine Regulation von L1CAM durch NGF auch bei nicht neuronalen Zellen erbracht wurden. Das Experiment gab gleichfalls Aufschluss über die physiologische Rolle der L1CAM-Expression auf der Oberfläche von Schwanzzellen und dem Neuritenwachstum (Seilheimer and Schachner, 1987). Den physiologischen Einfluss von NGF und L1CAM bestätigten Arbeiten von Weidner und Kollegen (NGF-Signalweg s. Abb. A2)(Weidner et al., 1999). Auf der Oberfläche von reifen Astrozyten wurden erhöhte L1CAM-Level nach NGF-Behandlung detektiert (Saad et al., 1991). Moleküle der TGF-Superfamilie konnten als weitere Stimulatoren der L1CAM-Expression identifiziert werden. Sowohl bei neuronalen als auch bei nicht neuronalen Zellen beobachtete man eine Hochregulation von L1CAM.

In Neuroblastoma-Glioma Hybridzellen NG108-15 induzierten Knochenmorphogenetische Proteine (bone morphogenetic proteins BMP) die Expression von NCAM und L1CAM. Es wurde demonstriert, dass NCAM durch die Mitglieder einer Subfamilie, BMP2 und BMP4 stärker reguliert wird als durch die BMP einer weiteren Subfamilie, BMP5, BMP6, BMP7 (OP-1). Alle Moleküle gehören zur ersten Gruppe von BMPs und offenbarten bei L1CAM einen gleich starken Effekt auf die Regulation (Perides et al., 1994). Die Bindestelle für Pax6, einen durch BMPs stimulierten Transkriptionsfaktor, konnte proximal zum Startcodon nachgewiesen werden. Die Sequenz offenbarte eine Homeodomänen- und Pairedomänen-Bindestelle (HPD). Ein Luziferase-L1CAM-Promoter-Plasmid wies nach Pax6 Überexpression oder BMP2/BMP4-Stimulation eine deutlich erhöhte Aktivität auf (BMP-Signalweg s. Abb. A2)(Meech et al., 1999).

Aus der TGF-Superfamilie ist TGF- β 1 neben den BMPs ebenfalls in der Lage die L1CAM-Expression zu induzieren. Die L1CAM-Hochregulation durch TGF- β 1 wurde unabhängig in mehreren Tumorentitäten bestätigt. In der duktal epithelialen Pankreas Zelllinie H6c7 resultiert die Co-Kultivierung mit TGF- β 1 sekretierenden pankreatischen Myofibroblasten in einen Anstieg der L1CAM-Expression (Geismann et al., 2009). Die TGF- β 1 abhängige L1CAM-Expression erforderte die Aktivierung der c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und war nicht Smad-Protein vermittelt. Die Aktivierung der c-Jun Kinase vermittelte eine erhöhte Expression von Slug, einen EMT-induzierenden Transkriptionsfaktor. Die Ergebnisse der c-Jun

Kinase regulierten L1CAM-Expression wurden in einer weiteren Arbeit mit der epithelialen Kolonzelllinie NCM460 bestätigt. (Schafer et al., 2012c). Geismann und Kollegen konnten zusätzlich die Bindung von Slug an E-Box-Bindemotive innerhalb des L1CAM-Promoters nachweisen (Geismann et al., 2011). Eine Slug vermittelte L1CAM Expression nach TGF- β 1-Behandlung wurde auch in Endometriumkarzinom-Zelllinien beobachtet (Pfeifer et al., 2010). Bei der Behandlung der Brustkarzinom-Zelllinie MDA-MB321 und der Pankreaskarzinom-Zelllinie BxPC3 mit TGF- β 1, wurde eine EMT-assoziierte L1CAM Regulation festgestellt (TGF-Signalweg s. Abb. A2). Die Hochregulation von L1CAM führte zu einem Anstieg der IL- β - und NF- κ b-Expression (Kiefel et al., 2012).

Nach bioinformatischen Expressionsanalysen von humanen multiformen Glioblastomgewebe und normalen Gewebe aus dem Gehirn wurde eine veränderte Expression von SOX4 (sex determining region Y-box 4) und TGFBI (transforming growth factor β induced transcript) entdeckt (Lin et al., 2010). TGFBI und SOX4 gehören zu den kanonischen TGF- β -Signalmolekülen. Beide Moleküle sind in unterschiedliche SMAD-unabhängige TGF- β -Signalwege involviert und werden durch TGF- β reguliert. Die Analyse durch MPSS (massive parallel signature sequencing) offenbarte außerdem eine erhöhte Expression von L1CAM in Glioblastomen (Lin et al., 2010). Eine TGF- β abhängige L1CAM-Regulation in Glioblastomen ist demnach ebenfalls möglich. Mit dem Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) entdeckte man 2004 ein weiteres Zytokin, das zu einem Anstieg der L1CAM-Expression und L1CAM-Proteolyse führt. Die Durchführung der Experimente fand mit unterschiedlichen Nierenkarzinom-Zelllinien statt (HGF-Signalweg s. Abb. A2) (Heiz et al., 2004).

Der Wnt/ β -catenin/TCF-Lef Signalweg wurde 2005 als zusätzlicher Regulator der L1CAM-Expression in Betracht gezogen. In zwei Kolonkarzinom-Zelllinien, SW480 und HCT116, wurde ein Luziferase-L1CAM-Promoter-Plasmid transfiziert und anschließend eine erhöhte Aktivität nach β -catenin Überexpression detektiert. An der invasiven Front von Kolonkarzinomen wurde außerdem vermehrt L1CAM zusammen mit nukleären β -catenin lokalisiert. Innerhalb der invasiven Front diskutierten die Autoren eine Regulation von Slug durch β -catenin und eine Initiation des EMT-Prozesses (Gavert et al., 2005) zusammen mit der L1CAM-Expression (Wnt/ β -catenin-Signalweg s. Abb. A2). Die Kernlokalisation von β -catenin wird als Ereignis zu Induktion der EMT beschrieben (Conacci-Sorrell et al., 2003). Einige Arbeiten weisen zudem auf eine Interaktion zwischen Wnt/ β -catenin und Slug hin. In den humanen dukta len Pankreaszellen H6c7 konnte kein Einfluss von β -catenin auf die L1CAM-Expression nachgewiesen werden (Geismann et al., 2009). Allerdings belegten neueste Arbeiten eine Wnt/ β -catenin-Slug-Interaktion. Daher gelten die Wechselwirkungen zwischen Slug und β -catenin als potentieller L1CAM-Regulationsmechanismus. In Nierenkarzinom-Zelllinien beobachteten Doberstein und Kollegen eine Regulation des L1CAM-Gens durch Pax8 (Doberstein et al., 2011). Eine Runterregulierung von Pax8 durch spezifische siRNA resultierte in einer erhöhten L1CAM-Expression. Bei der Analyse der Tumorproben zeigten 50 % einen Verlust der Pax8-Expression und eine Induktion von L1CAM. Außerdem offenbarten weitere Experimente eine Regulation von Pax8 durch das Von Hippel-Lindau-Protein (VHL). Ein verändertes VHL-Level führte demnach auch zu einer geänderten L1CAM-Expression (Doberstein et al., 2011).

Schneegans und Kollegen entdeckten 2009 eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor-I-A (NFI-A) an der Repression von L1CAM. NFI-A gehört zu der Nuclear Factor I Familie und kontrolliert die Expression von L1CAM in der Neuroblastom-Zelllinie N2A. Die Aktivität von NFI-A wird durch Phosphorylierung moduliert (Bisgrove et al., 2000). Wird der Transkriptionsfaktor phosphoryliert, kommt

es zu einer Inaktivierung von NFI-A und zu einem Anstieg der L1CAM-Expression.

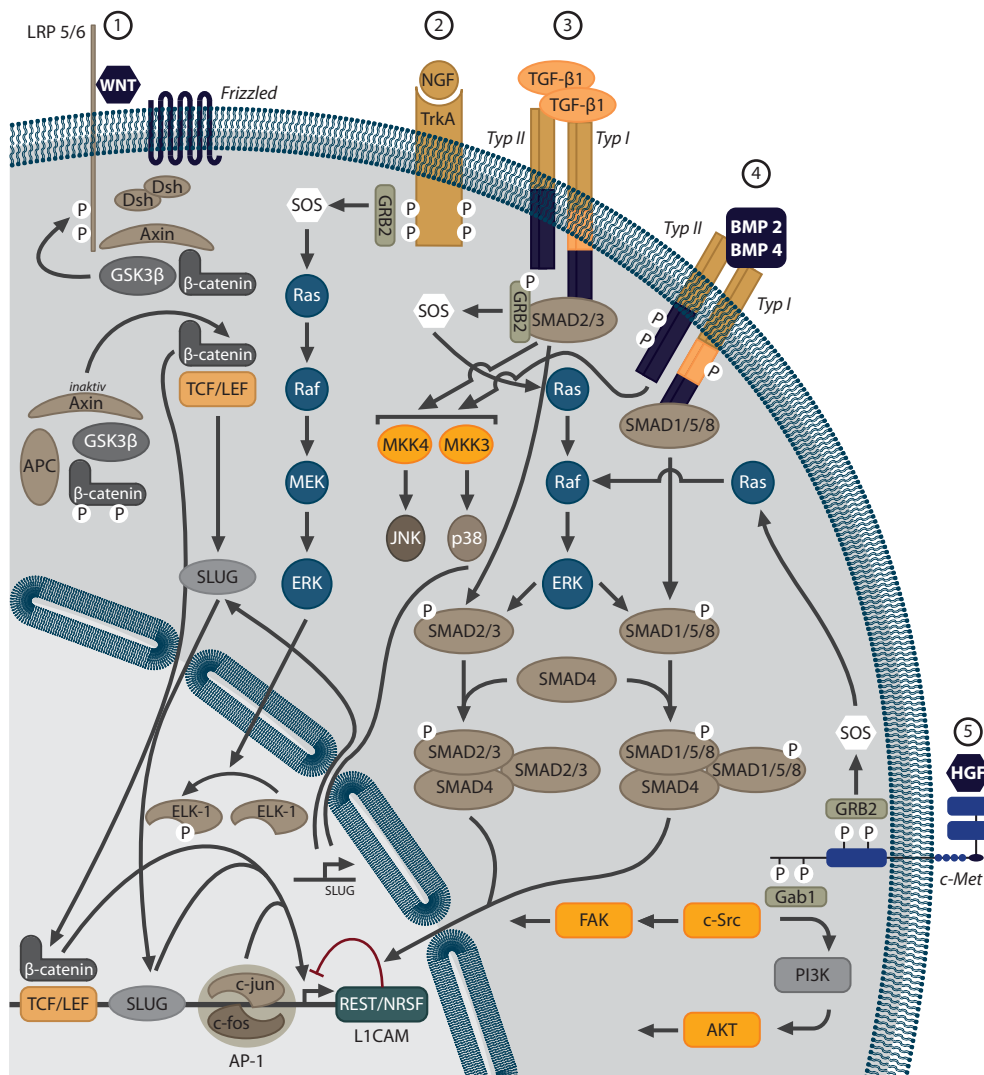


Abbildung A 2 Signalwege, welche zur transkriptionellen Regulation von L1CAM beitragen. 1) Die Aktivierung des Wnt/ β -catenin/TCF-Lef Signalweges führt zu der Bildung eines β -catenin/TCF-Lef Komplexes, welcher anschließend in den Nucleus transportiert wird. 2) Die Stimulation durch den nerve growth factor (NGF) resultiert in einer heterodimeren Bindung von c-jun und c-fos bzw. der AP-1-Komplexbildung. 3) Der TGF- β -Signalweg führt über MKK3/4 und JNK/p38 zu einer Aktivierung der transkriptionellen Regulation, wodurch auch das Slug-Gen aktiviert wird. Ein Anstieg von Slug hat wiederum einen direkten Einfluss auf die L1CAM-Expression. 4) Die bone morphogenic proteins (BMPs) induzieren ebenfalls die Aktivierung des L1CAM-Gens. Der Signalweg gleicht teilweise dem von TGF- β 1. 5) Die Signalinduktion des Hepatocyte growth factor wird durch den c-Met-Rezeptor vermittelt. In der Folge kommt es zur Aktivierung von zahlreichen Kinasen, u.a. von FAK, AKT und c-Src.

Neben L1CAM reguliert NFI-A die Expression von weiteren neuronalen Genen (Schneegans et al., 2009). Die Bindestelle des Transkriptionsfaktors ist ca. 1000 bp vor dem Startcodon im L1CAM-Promoter

lokalisiert. Ein weiterer Repressor von L1CAM wurde ebenfalls in neuronalen Zellen entdeckt. Der Transkriptionsfaktor *repressor element 1 silencing transcription factor/neuron restrictive silencer factor* (REST/NRSF) bindet an eine Bindestelle zwischen dem Exon 1 und Exon 2 des L1CAM-Gens (Kallunki et al., 1997).

Der Transkriptionsfaktor ist verantwortlich für die Eingrenzung der Expression von L1CAM auf das zentrale Nervensystem (Kallunki et al., 1998). Die Bindung von REST innerhalb des L1CAM-Promoters wurde später durch eine globale *in silico* Analyse und eine anschließende Validierung durch ChIP-Analyse bestätigt (Bruce et al., 2004). Eine weitere Arbeit untersuchte die Regulation von REST durch DNA-Methylierung des REST-Promoters und beschrieb einen Zusammenhang zwischen der Promotermethylierung von REST, der REST-Expression und L1CAM-Repression. Die Autoren zeigten bei SCLC Zelllinien eine Korrelation zwischen der REST-Promotermethylierung und L1CAM-Expression (Kreisler et al., 2010). Die Gruppe um Lepagnol-Bestel belegte in einem neuronalen Down-Syndrom-Modell die Beteiligung des Co-Faktors DYRK1 bei der Regulation von L1CAM. Das Molekül interagiert mit REST über den Proteinkomplex SWI/SNF. In dem Modell induzierte eine DYRK1-Überexpression eine Repression von L1CAM in Abhängigkeit von REST (Lepagnol-Bestel et al., 2009). Außer der Regulation von L1CAM ist REST ebenfalls in der Lage das alternative Splicing von L1CAM indirekt zu beeinflussen. Nova2, ein Neuronen spezifischer Splicingfaktor wird durch REST reguliert und blockiert das alternative Splicing von L1CAM in den Neuronen. In Abwesenheit von REST in den Neuronen, kommt es daher zu einer Expression der vollen Länge von L1CAM (Mikulak et al., 2012).

In neuronalen Zellen kann die L1-Expression außerdem durch erhöhte K^+ -Konzentrationen und den Glutamat Agonisten N-Methyl-d-Aspartat (NMDA) ansteigen (Scherer et al., 1992).

Neben neuronalen Zellen und Tumorzellen wird L1CAM auch von $CD4^+$ peripheren Blutlymphozyten, Monozyten und B-Lymphozyten exprimiert (Ebeling et al., 1996). Auf nicht aktivierten Monozyten nimmt die L1CAM-Expression durch eine Aktivierung zu und kann durch Interferon γ (IFN- γ) induziert werden (Pancook et al., 1997). In derselben Arbeit wurde bei dentritischen Zellen die L1CAM Oberflächenexpression durch die Behandlung mit Lipopolysacchariden, *phaseolus vulgaris* agglutinin (PHA) und den Tumornekrosefaktor α (TNF- α) stimuliert. Bei unbehandelten dentritischen Zellen detektierten Pancook und Kollegen dagegen kein L1CAM.

4. *Expression von L1CAM in der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT)*

4.1 Der EMT-Prozess

Die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) beschreibt den morphologischen und molekularen Prozess einer Zelle beim Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp. Ein Hauptmerkmal ist hierbei der Verlust der Zellpolarität. Epitheliale Zellen sind durch eine klare Polarität entlang der apikobasalen-Achse gekennzeichnet, perpendicular zum entsprechenden Epithel. Die einzelnen Zellen sind in der apikalen Region durch Zell-Zell-Verbindungen und Adhäsionsverbindungen miteinander verknüpft. Diese Verbindungen sind essentiell für die mechanische Funktionalität des Epithels und sichern die Semipermeabilität. Dadurch ist das Epithel in der Lage benachbarte Gewebe und Organe voneinander zu separieren

und deren Homöostase zu gewährleisten (Bilder, 2004; Baum et al., 2008). Auf zellulärer Ebene unterteilen die Verbindungen die Membranbereiche in eine apikale- und eine basolaterale Domäne. In der basolateralen Domäne sind die epithelialen Zellen durch Desmosomen und Zellkanäle charakterisiert. Die Expression der Moleküle die zu den unterschiedlichen Zell-Zell-Verbindungen beitragen, kennzeichnet ebenfalls den molekularen Charakter einer epithelialen Zelle. Die Expression dieser Moleküle verhindert eine Motilität einzelner epithelialen Zellen und deren Migration aus dem Epithel. Nach der EMT entwickelt eine Zelle hingegen nur transiente Kontakte zu benachbarten Zellen und es erfolgt die Migration aus dem Epithel in das benachbarte Gewebe (Hay, 2005; Thiery and Sleeman, 2006).

Molekular ist die EMT vor allem durch den Verlust von Proteinen gekennzeichnet, die essentiell für den Zell-Zell-Kontakt sind oder der Organisation des Zytoskeletts einer epithelialen Zelle sind. Charakteristische Marker sind E-cadherin, Laminin-1, Desmoplakin, Cytokeratin $\alpha 1$ (IV) Kollagen und ZO-1. Während es im Verlauf des Prozesses zu einer verminderten Expression der genannten epithelialen Marker kommt, steigt dagegen die Expression der mesenchymalen Proteine. Zu diesem zählen U.a. N-cadherin, Vimentin, Fibronectin und β -catenin verwendet (Kalluri and Weinberg, 2009). Eine veränderte Expression der phänotypischen Marker erhöht das Migrations- und Invasionspotential einer Zelle, und schützt zudem vor Apoptose.

Eine zentrale Rolle während der EMT spielt die Regulation von E-cadherin. Während des Prozesses korreliert die Expression von E-cadherin invers mit der Expression diverser Transkriptionsfaktoren. Zu den bekanntesten Regulatoren gehören SNAIL (Snail1), Slug (Snail2), Twist, E1/ZEB1, SIP1/ZEB2 und E47 (Peinado et al., 2007). Die Expression der Regulatoren wird vor Beginn der EMT induziert und führt durch eine Repression von der E-cadherin zu einer erhöhten Migration der Zelle (Onder et al., 2008).

Der Vorgang der E-cadherin-Repression durch die genannten Transkriptionsfaktoren und die folgende Induktion der EMT ist während der Entwicklung des Organismus von zentraler Bedeutung. Durch die EMT kommt es zur Neustrukturierung der Gewebeanlagen bei der Embryonalentwicklung. Der früheste Prozess, bei der EMT eine Rolle spielt, ist die Bildung mesenchymaler Zellen und des Mesoderms (Viebahn, 1995) während der Gastrulation. Die Formation der Plazenta, der Somiten, der Herzklappen (Person et al., 2005), der Neuralleiste (Duband et al., 1995) und des Urogenitaltrakts sind gleichfalls EMT-abhängig. Einige zentrale Prozesse, wie die Neuralleistenbildung oder die Formation des Mesoderms, werden durch die Transkriptionsfaktoren SNAIL und Slug induziert. Beide Transkriptionsfaktoren sind daher von zentraler Bedeutung bei der embryonalen Entwicklung. Die Expression der Transkriptionsfaktoren wird bei der Reorganisation einzelner Gewebe wiederum durch das Mikromilieu der umgebenden Zellen bestimmt. So können Fibroblasten Wachstumsfaktoren produzieren, eine erhöhte Expression von E-cadherin regulierenden Transkriptionsfaktoren induzieren und den EMT-Prozess einleiten. Bekannte EMT induzierende Cytokine sind der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) (Boyer et al., 1996), der Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) (Boyer et al., 1996), der Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) (Rosario and Birchmeier, 2003), die Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF- β) (Boyer et al., 1999), die knochenmorphogenetischen Proteine (BMPs) (Correia et al., 2007) und die Mitglieder der Wnt-Familie (Wu et al., 2005).

Eine besondere Bedeutung bei der Induktion der EMT haben die Zytokine der TGF- β Superfamilie. Sie sind verantwortlich für die Bildung des Mesoderms (Kimelman, 2006), der Neuralleiste (Raible, 2006; Correia et al., 2007) und der Herzklappe (Boyer et al., 1996). Der Einfluss von TGF- $\beta 1$ auf die Entwicklung wurde außerdem in Mausexperimenten untersucht. Die Knock-out Mäuse besaßen Störungen in der Herz-

entwicklung (Mercado-Pimentel and Runyan, 2007). TGF- β 1 ist zusätzlich ein Induktionssignal von SNAIL und Slug und reguliert die Expression dieser zwei zentralen Transkriptionsfaktoren im EMT Prozess (Romano and Runyan, 2000; Spagnoli et al., 2000; Peinado et al., 2003).

4.2 Die Rolle der EMT bei der Tumorgenese und der Metastasenbildung

Wachstumsfaktoren aus dem Mikromilieu sind auch bei der Tumordinvasion und der Metastasenbildung von Bedeutung und führen bei Tumorzellen zu einem EMT-ähnlichen Prozess. Arbeiten über TGF- β 1 offenbaren eine zur Embryonalentwicklung vergleichbare EMT-Induktion in Tumorzellen. Es konnte durch die Behandlung von Tumorzellen mit TGF- β 1 eine Expression von mesenchymalen und eine Repression von epithelialen Markern induziert werden (Huszar et al., 2010; Nishioka et al., 2010; Chen et al., 2012; Kiefel et al., 2012). In weiteren Versuchen wurde belegt, dass der TGF- β Signalweg das Invasionspotential und die Metastasierung erhöhen (Oft et al., 1998; Janda et al., 2002).

Wie bei der Migration einer normalen Zelle aus einem intakten Epithel, ist bei einer Tumorzelle die Transition zu einem mesenchymalen Phänotyp notwendig, um in das benachbarte Gewebe zu invadieren. Die Regulation von E-cadherin nimmt daher auch bei der EMT von Tumorzellen einen zentralen Platz ein. *In vitro* und *in vivo* Experimente zeigten, dass der Verlust von E-cadherin zu einer erhöhten Migration und vermehrten Metastasierung führt (Onder et al., 2008; von Burstin et al., 2009; Putzke et al., 2011). Die Ergebnisse der Versuche werden durch klinische Daten bestätigt. Bei einigen Tumorentitäten korreliert die verminderte Expression von E-cadherin mit einer schlechten Prognose (Sarrío et al., 2008).

E-cadherin wird auch in invasiven Tumorzellen durch die Transkriptionsfaktoren SNAIL und Slug reguliert. In Brust- oder Ovarial-Karzinomen ist die Expression der Transkriptionsfaktoren mit einer E-cadherin-Repression und einer schlechten Prognose (Blanco et al., 2002; Zhou et al., 2004; Elloul et al., 2005; Gallo et al., 2010). Die Daten belegen, dass die EMT bei Tumorzellen für den Verlauf der Tumorphoresis entscheidend ist. Die EMT bei Tumorzellen und die daraus resultierende Zellmotilität ist vergleichbar mit den Ereignissen während der Embryonalentwicklung. Im Tumor finden diese Prozesse innerhalb der invasiven Front statt und ermöglichen einzelnen Zellen die Intravasation, also das Eindringen in Lymph- oder Blutgefäße. Der Transport der Zellen über den Blut- oder Lymphstrom vereinfacht die Verbreitung und Absiedelung von Tumorzellen in entfernten Organen. Der Prozess trägt somit zur Bildung von Metastasen bei.

4.3 Die Rolle von L1CAM während der EMT und die Regulation durch Slug

L1CAM wird von diversen Tumorentitäten an der invasiven Front überexprimiert (Gavert et al., 2005; Zecchini et al., 2008; Huszar et al., 2010; Min et al., 2010). Als Zelladhäsionsmolekül unterstützt L1CAM auch die Migration und Invasion einzelner Tumorzellen. Die Lokalisation und die Funktion von L1CAM deuten auf eine EMT assoziierte Expression hin. In der Brusttumorzelllinie MCF-7 konnte zusätzlich eine EMT induzierende Funktion von L1CAM nachgewiesen werden. In diesen Zellen wurde durch die L1CAM-Überexpression die Formation von Zelladhäsionskomplexen blockiert. Als Folge dieses Prozesses wurde E-cadherin und β -catenin vermehrt im Zytoplasma bzw. im Nukleus detektiert. Die Degradation der Adhäsionsverbindungen führte auch zu einer gesteigerten Zellmotilität (Shtutman et al., 2006). Eine erhöhte nukleäre Lokalisation von β -catenin wurde auch in der invasiven Front von Kolon-Adenokarzinomen nachgewiesen. Die nukleäre Lokalisation von β -catenin ist oft mit der EMT assoziiert (Brabletz et al., 2005).

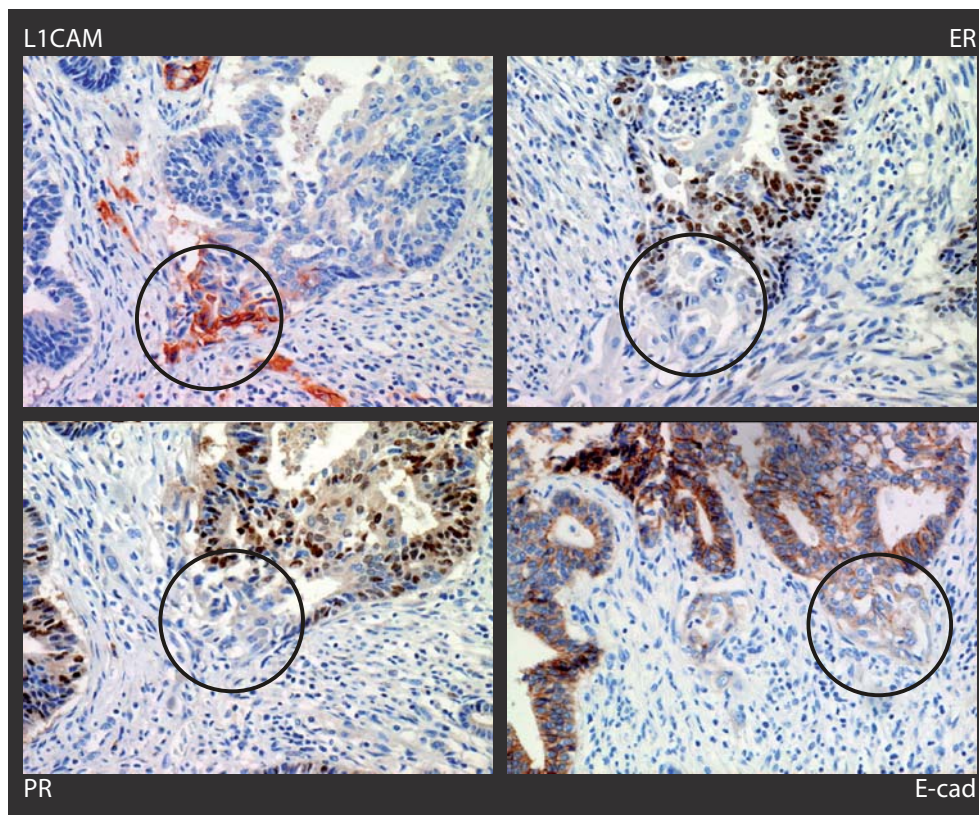


Abbildung A 3 Sequenzielle Gewebeschnitte eines Typ-II Endometriumkarzinoms. Durch IHC wurde die Expression von L1CAM, ER, PR und E-cadherin bestimmt. Die Detektion des Proteins ist durch die dunkle Färbung zu erkennen. Demnach ist der Typ-II-EK positiv für L1CAM aber negativ für ER, PR und E-cadherin. Die Zellen innerhalb der Markierung weisen eine inverse Expression zwischen L1CAM und E-cadherin, ER sowie PR auf. Der Bereich markiert außerdem die invasive Front des Tumors. Die Schnitte wurden freundlicherweise von M.Fogel, Rehovet, Israel zur Verfügung gestellt.

Bei dem Prozess werden EMT assoziierte Gene in Tumoren transient hochreguliert, während E-cadherin herunterreguliert wird. Ein ähnlicher Mechanismus konnte bei Endometrium-Karzinomen beobachtet werden (Bsp. s. Abb. A3). Es wurde eine inverse Expression von L1CAM mit E-cadherin, dem Oestrogen-Rezeptor und dem Progesteron-Rezeptor detektiert. Dieses Ergebnis war ein Hinweis darauf, dass L1CAM in den Ablauf der EMT involviert ist. In EK-Zelllinien konnte außerdem gezeigt werden, dass die TGF- β 1 induzierte Expression von L1CAM, durch Slug vermittelt ist und die Zellinvasion erhöht. Demnach blockierte ein Suppression von Slug die Effekte von TGF- β 1 (Huszar et al., 2010). In der PDAC Zelllinie PxBC3 und der Brusttumor Zelllinie MDA-MB231 kam es nach der Behandlung mit TGF- β 1 auch zu einer EMT-assoziierten L1CAM Expression (Kiefel et al., 2012). Bei einer weiteren Pankreaskarzinomzelllinie namens Panc1 konnte zudem gezeigt werden, dass die TGF- β 1 induzierte Hochregulation von L1CAM durch Slug vermittelt, jedoch unabhängig von SNAIL ist (Geismann et al., 2009). Außerdem korreliert bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSGLC) die Expression von L1CAM, Vimentin und Slug invers mit der Expression von E-cadherin. Bei der L1CAM negativen NSGLC Zelllinie A549 konnte zusätzlich

eine erhöhte Invasion nach TGF- β 1-Behandlung festgestellt werden. Aus den Ergebnissen schlussfolgerten die Autoren, dass L1CAM durch eine EMT-Induktion, im Tumor exprimiert wird und die Zellinvasion fördert (Tischler et al., 2011).

Die Regulation von L1CAM durch den Transkriptionsfaktor Slug ist eine entscheidende Verbindung zum EMT-Prozess in Tumorzellen.

4.4 Der Transkriptionsfaktor Slug

Slug gehört zu der Familie der SNAI Transkriptionsfaktoren. Dazu gehören die Moleküle SNAI1 (SNAI1), Slug (SNAI2) und SNAI3 (Hemavathy et al., 2000; Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005). Die Mitglieder der SNAI-Familie sind Zinkfinger-Motiv Transkriptionsfaktoren und durch eine gemeinsame Organisation gekennzeichnet. Sie bestehen aus einer hochkonservierten C-terminalen Region mit vier bis sechs Zinkfinger-Motiven (C_2H_2) und einer divergenten N-terminalen Region. Die Zinkfinger interagieren als DNA-Bindemotive mit einer DNA-Kernsequenz von sechs Basenpaaren C/A(CAGGTG) (Mauhin et al., 1993; Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). Das Bindemotiv ist identisch mit der E-Box, dem Bindemotiv der basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren. In den Promoterregionen von L1CAM wurden ebenfalls mehrere E-Box-Motive identifiziert (Slug-Struktur s. Abb. A4)(Geismann et al., 2009; Pfeifer et al., 2010).

Im allgemeinen agieren die SNAI-Transkriptionsfaktoren als Repressoren (Cano et al., 2000; Hemavathy et al., 2000; Kataoka et al., 2000). Neben den Zinkfingern beruht die Repressorfunktion der SNAI-Familienmitglieder auf der hochkonservierten SNAG-Domäne (Peinado et al., 2004). Die SNAG-Domäne ist im N-terminalen Bereich des Moleküls lokalisiert und wurde zuerst bei den *growth factor independence* (Gfi) Proteinen identifiziert. In der zentralen Region besitzt das Slug-Protein zudem eine molekülspezifische Slug-Domäne, deren Funktion noch weitestgehend unklar ist (Manzanares et al., 2001; Sefton et al., 1998) (Sefton et al., 1998; Manzanares et al., 2001).

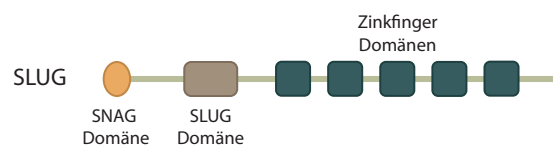


Abbildung A 4 Schematische Illustration des Slug-Moleküls mit unterschiedlichen Bindedomänen. Die Funktion der einzelnen Domänen ist im Text beschrieben.

Die Repressorfunktionen von Slug beruhen außerdem auf den Interaktionen von Slug mit weiteren Transkriptionsfaktoren oder anderen Chromatin modifizierenden Molekülen (Peinado et al., 2004). So interagiert Slug beispielsweise mit einer Reihe unterschiedlicher Histondeactylasen (HDACs), der HDAC1 und HDAC3 (Peinado et al., 2004; Tripathi et al., 2005a). In Brusttumorzelllinien wurde außerdem eine indirekte Wechselwirkung mit dem *C-terminal binding protein 1* CTBP1 nachgewiesen. Die Interaktion resultiert in einer Repression des Proteins *breast cancer type-2 susceptibility* BRCA2 (Tripathi et al., 2005a). Das BRCA2 Molekül ist ein entscheidende Untereinheit von DNA-Reparaturkomplexen (Hay and Clarke, 2005). Ein weiterer Co-

Repressor, mit dem Slug über die SNAG-Domäne interagiert, ist das Molekül mSin3a, Komponente eines Repressor-Komplexes.

Die Mitglieder der SNAI-Familie sind hoch instabile Proteine. Im Gegensatz zu SNAIL, wird die Slug-Stabilität nicht über den GSK-3 β -Signalweg reguliert sondern über den Ubiquitin vermittelten Proteosom abhängigen Mechanismus reguliert. In Lungenkarzinomzelllinien wurde nachgewiesen, dass die E3-Ligase MDM2 in die Slug Degradation involviert ist (Wang et al., 2009).

Die Hauptfunktion von Slug ist die Herunterregulation von E-cadherin während der EMT in der Entwicklung (Battle et al., 2000; Peinado et al., 2004). Weitere Zielgene umfassen ebenfalls Moleküle zur Aufrechterhaltung der Zelladhäsion. Verschiedene Arbeitsgruppen bewiesen beispielsweise eine Bindung von Slug innerhalb der Promotoren von Occludin, Claudin 1, Integrin $\alpha 3$, Kollagen 2 $\alpha 1$ und den Zytokeratinen 8 und 19 (Seki et al., 2003; Tripathi et al., 2005b; Turner et al., 2006; Wang et al., 2007). Allerdings konnte auch bei Nicht-EMT-assoziierten Genen eine Regulation durch Slug festgestellt werden. Abhängig vom Zellkontext bindet Slug unter anderem an den Promoter von BRCA2 und p53 (Kajita et al., 2004; Tripathi et al., 2005b; Wu et al., 2005). Während der Entwicklung wird Slug verstärkt von mesodermalen und Neuralleistenzellen exprimiert. Außerdem konnte Slug bei der Dekondensation von Somiten und der Formation des Endoderms nachgewiesen werden (Sefton et al., 1998).

Allerdings tritt eine Expression von Slug auch bei unterschiedlichen Tumorentitäten auf. Als EMT induzierendes Molekül agiert Slug dabei als ein Onkogen. So korreliert in Brustkarzinomen eine erhöhte Slug-Expression mit einer schlechten Prognose, einer erhöhten Zellmotilität und Metastasierung (Martin et al., 2005; Bonnomet et al., 2012; Liu et al., 2012). In Ovarialkarzinomen führte eine erhöhte Slug Expression weiterhin zu einer Reduzierung der Gesamtüberlebenszeit und einer erhöhten Zellinvasion (Eloul et al., 2005; Dhasarathy et al., 2011). Dass Slug die Tumorprogression beeinflusst, belegte zusätzlich ein *in vivo* Experiment mit nicht invasiven DLD1 Zelle. Nach einer stabilen Transfektion von DLD1-Zellen mit Slug bildeten 90 % der Versuchstiere einen soliden Tumor, wohingegen nur 10 % der Tiere mit nicht transfizierten Zellen einen Tumor etablierten (Camp et al., 2011). Bei weiteren Tumorentitäten wie dem Lungenadenokarzinom, dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom oder dem Plattenepithelkarzinom assoziiert die Expression von Slug ebenfalls mit einer schlechten Prognose und kürzeren Überlebenszeit (Shih et al., 2005; Uchikado et al., 2005; Jiang et al., 2012). Slug erhält jedoch nicht nur durch die Repression von E-cadherin und weiteren Adhärenzmolekülen einen onkogenetischen Charakter. Es konnte außerdem eine Apoptose inhibierende Funktion von Slug nachgewiesen werden. In humanen Karzinomzelllinien induziert Slug eine Resistenz gegen genotoxischen Stress und Chemotherapeutika wie Doxorubicin oder Cisplatin (Kajita et al., 2004; Mancini et al., 2010; Zhang et al., 2011c). Als mögliche Mechanismen werden eine Inaktivierung der p53 vermittelten Apoptose oder eine direkte Repression von PUMA beschrieben (Kurrey et al., 2009; Zhang et al., 2011a; Zhang et al., 2011b).

Der Slug Transkriptionsfaktor ist ein zentraler Regulator der EMT und beeinflusst bei einer erhöhten Expression auch die Tumorprogression. Die Hochregulation von L1CAM in epithelialen Zellen resultiert ebenfalls aus einer Induktion der EMT einhergehend mit einer erhöhten Migration, Invasion und Chemo-resistenz.

5. Der Transkriptionsfaktor REST

Der *repressor element 1 silencer transcription factor* (REST), auch bekannt als neuronal restricted silencer factor (NRSF) wurde ursprünglich als ein Repressor von zahlreichen primären neuronalen Differenzierungsgenen beschrieben. REST wird von nicht-neuronalen Zellen und neuronalen Stammzellen exprimiert (Ballas et al., 2005; Ballas and Mandel, 2005). Gewebe, die eine starke Akkumulation von REST zeigen, sind lymphatische Organe, wie z.B. die Milz oder die Niere, Lymphozyten aus dem peripheren Blut oder auch dem Ovar. In seltenen Fällen ist REST in vivo auch bei Neuronen zu finden. Entdeckt wurde das Protein 1995 von den Gruppen um Gail Mandel und David Anderson (Chong et al., 1995; Schoenherr and Anderson, 1995).

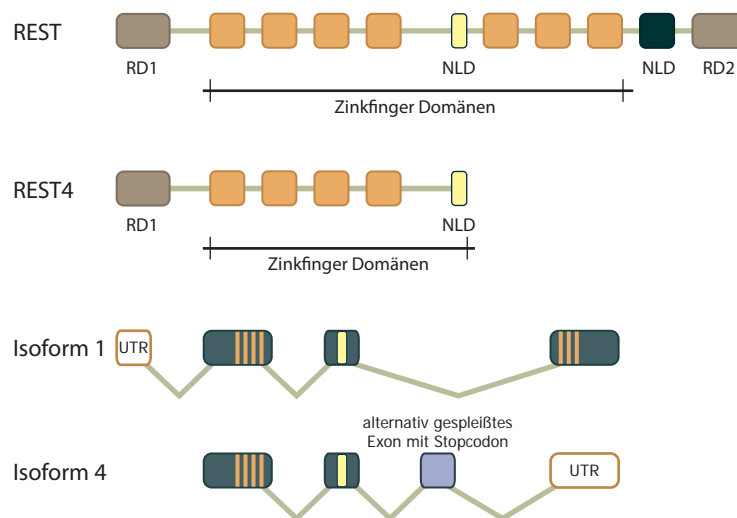


Abbildung A 5 Schematische Darstellung der REST-Proteine (REST, REST4) mit funktionellen Domänen und den entsprechenden mRNA-Isoformen. Die Isoform 1 codiert dabei für das normale REST-Protein, während die Isoform 4 für die dominant negative Form codiert. Die Isoform 4 beinhaltet im Gegensatz zur normalen Variante ein zusätzliches Exon mit einem Stoppcodon. Die genaue Funktionen der einzelnen Proteindomänen ist im Text beschrieben.

REST ist ein 116 kDa großer Zinkfinger-Motiv Transkriptionsfaktor. Das Protein besitzt eine DNA-Bindedomäne und zwei Repressordomänen. Die DNA-Bindedomäne bindet an eine 21 bp große Kernsequenz, die RE-1 Bindestelle, innerhalb der regulatorischen Elemente der Zielgene (s. Abb. A5). Mehrere unabhängige globale Expressionsanalysen oder Chromatin-Bindeanalysen offenbarten, dass REST mit mehreren tausend RE1-Bindemotiven innerhalb einer Zelle interagiert und das Potential besitzt mehrere hundert Zielgene zu regulieren (Bruce et al., 2004; Johnson et al., 2007; Otto et al., 2007). Die Vielzahl der Zielgene in unterschiedlichen Geweben werden durch die zahlreichen Interaktionspartner von REST erklärt. Eine Interaktion mit anderen Molekülen erfolgt dabei über die beiden Repressordomänen (RD1 und RD2). Die RD1 ist im N-terminalen Bereich lokalisiert und umfasst die Aminosäuren 32 bis 122, während die RD2 im C-terminalen Bereich lokalisiert ist und durch die Aminosäuresequenz 1030-1092 gebildet wird. An die RD1 können mSin3A/Histon-Deacetylase-Komplex (HDAC) und N-CoR binden (Huang et al., 1999). Die RD2 interagiert dagegen mit CoRest, mSin3A-HDAC-Komplex, der H3-K9-Histon Methyltransferase G9a, der Histon H3-K4 Demethylase LSD (Andres et al., 1999; Shi et al., 2003; Shi et al., 2004). Der gesam-

te REST-Komplex kann zusätzlich mit weiteren DNA-bindenden Molekülen interagieren, wie der DNA-Methyltransferase 1, dem DNA-CpG bindenden Protein 2 oder dem Chromatin Remodelierungskomplex SWI/RNF (Majumder, 2006; Watanabe et al., 2006). Eine Repression der Zielgene erfolgt demnach über eine Änderung des epigenetischen Musters innerhalb der Zielregion. Durch die Vielzahl der möglichen Interaktionspartner ist die Aktivität von REST abhängig vom Zellkontext. Die nukleäre Translokation erfolgt über eine Wechselwirkung der Kernlokalisierungssequenz (NLS) mit dem Protein RILP.

REST interagiert außerdem mit weiteren Kerntransportproteinen wie HTT oder DCTN1 (Zuccato et al., 2003). Des Weiteren wird die REST-Aktivität/Funktion durch die proteosomale Degradation reguliert. So kommt es während der Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu einer Interaktion mit der β -TRCP E3 Ubiquitin Ligase, welche eine Degradation von REST in den Zellen induziert (Westbrook et al., 2008).

Ein der Hauptfunktion von REST ist die Inhibition der Neurogenese während der Entwicklung. So konnte in REST Knock-out Mäusen gezeigt werden, dass REST für die Repression von neuronalen Genen in der Embryogenese verantwortlich ist. Es zeigten sich Fehlentwicklungen in neuronalen und nicht-neuronalen Gewebe, verbunden mit einer Letalität der Embryonen (Chen et al., 1998). Deutlich wird dieser reprimierende Effekt auch bei der Differenzierung von neuronalen Stammzellen (NSC), wo es zu Beginn der Differenzierung zu einer Inhibition der REST-Expression kommt (Su et al., 2004). Ein weiteres Experiment bestätigte die Funktion von REST in nicht-neuronalen Zellen. Hier induzierte die Änderung der Repressorfunktion von REST einen Wechsel des myoblasten Phänotyps zu einem neuronalen Phänotyp (Watanabe et al., 2004). Die zentrale Rolle von REST als Repressor von neuronalen Genen offenbart sich unter anderem auch im Erkrankungsbild der „Huntington Krankheit“. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer zellulären Translokation des Transkriptionsfaktors vom Zytoplasma in den Nucleus von Neuronen. Hier resultiert die zunehmende Akkumulation im Kern in einer Repression von neuronalen Genen wie zum Beispiel dem des Wachstumsfaktors BDNF (brain derived neurotrophic factor) oder miRNAs. Die Translokation wird durch eine Mutation des htt-Proteins (Zuccato et al., 2003) oder eine Überexpression in neuronalen Zellen durch eine veränderte REST-Regulation verursacht (Packer et al., 2008).

5.1 REST in humanen Tumoren

Die Funktion von REST als Tumor-Suppressor-Gen oder als Onkogen ist abhängig vom zellulären Kontext. In kleinzelligen Lungenkarzinomen zum Beispiel, bewiesen unterschiedliche Arbeiten eine Tumorsuppressorfunktion von REST. Hier induziert eine verminderte REST-Expression eine Aktivierung von Zielgenen wie der Glycin-Rezeptor Untereinheit $\alpha 1$ und eine damit verbundene erhöhte Zellproliferation und verminderte Apoptose (Neumann et al., 2004; Kreisler et al., 2010). In nicht Kleinzell Lungenkarzinomen bedeutete dagegen die verminderte Expression des Interaktionspartners BRM/BRG1 eine reduzierte Funktionalität von REST (Fukuoka et al., 2004). Dementsprechend korreliert der Verlust von BRM/BRG1 in nicht-Kleinzell Lungenkarzinom Patienten mit einer schlechten Prognose (Reisman et al., 2003; Fukuoka et al., 2004). Als prognostischen Marker für den Verlust der REST-Funktionalität bei SCLC, schlugen Moss und Kollegen 2009 das Transkript des Gens SCG3 vor. Bei den Untersuchungen offenbarten die Expressionsprofile von Zellen aus dem peripheren Blut ein erhöhtes Level von SCG3 bei einem Verlust von REST im Tumor. Außerdem korrelierte die Expression von SCG3 mit einer schlechten Prognose (Moss

et al., 2009). Schumacher und Kollegen offenbarten, dass die REST-Promotermethylierung in Verbindung mit dem CREB-Protein zu einer unterschiedlichen REST-Expression in kleinzelligen Lungenkarzinom-Zellen führt. Eine Promoterdemethylierung und erhöhte Expression von CREB korreliert in untersuchten Zelllinien direkt mit einer erhöhten REST-Expression. In Folge dessen kommt es zu einer Repression des Onkogens Akt2. Ebenfalls gezeigt wurde die REST-abhängige L1CAM-Expression in den SCLC-Zelllinien (Kreisler et al., 2010). Die Tumorsuppressorfunktion von REST bestätigte zusätzlich ein RNAi basierender Screen in epithelialen Brustzellen und eine Mutationsanalyse durch plattenbasierende genomische Hybridisierung in humanen Kolonkarzinomproben. Dabei induzierte die Herunterregulation von REST in epithelialen Zellen eine Änderung des Phänotyps zu einem adhäsionsfreien Zelltyp. Eine vorher durchgeführte Mutationsanalyse ergab eine erhöhte Mutationsrate im REST Genlokus und eine erhöhte PI(3)K-Aktivierung bei dominant negativen Formen (Westbrook et al., 2005). Eine weitere Expressionsanalyse belegte eine verminderte REST-Expression bei malignen Brusttumoren im Vergleich zur Expression bei benignen Tumoren oder gesunden Gewebe (Lv et al., 2010). Ergänzend dazu führte die Transfektion der Brusttumorzelllinie MCF-7 mit spezifischer REST-siRNA zu einer erhöhten Zellproliferation, Chemoresistenz und Apoptose-Inhibition (Lv et al., 2010).

Weitere Versuche identifizierten außerdem das Gen Tac1 als Zielgen von REST in den Brusttumorzelllinien T47D und MCF12A. Das Gen transkribiert für ein Onkogen und induziert eine erhöhte Invasion und Migration der Zellen (Reddy et al., 2009). Wagoner und Kollegen bestätigten die Funktion von REST bei der Brusttumprogression. Allerdings stellten sie bei den untersuchten Proben eine erhöhte Expression der dominant negativen Form REST4 fest (Wagoner et al., 2010). Die bekannte Isoform ist durch ein Fehlen des C-terminalen Teils des Proteins gekennzeichnet und besitzt keine Kernlokalisationsdomäne und Repressordomäne 2 (Palm et al., 1999; Coulson et al., 2000). Bei der statistischen Auswertung assoziierte die Expression von REST4 mit einem Abfall beim krankheitsfreien Überleben (Wagoner et al., 2010). Die Isoform von REST4 wurde ursprünglich in neuronalen Zellen und Neuroblastomzelllinien nachgewiesen (Palm et al., 1998).

Im Kontrast zur Tumorsuppressorfunktion von REST in diversen Tumorentitäten besitzt REST bei neuronalen Tumoren eine onkogenetische Funktion. Lawinger und Kollegen zeigten eine erhöhte REST-Expression in 80% aller untersuchten humanen Medullablastom Tumoren relativ zu dem Gewebe aus gesundem Cerebellum. Eine Inhibition der REST-Funktion bei *in vivo*- und *in vitro*-Medullablastommodellen blockierte das Tumorstadium bzw. induzierte Apoptose (Lawinger et al., 2000; Fuller et al., 2005). Einen möglichen Mechanismus zur Funktion von REST als Onkogen hat eine Arbeitsgruppe um Das beschrieben. Sie konnten zeigen, dass REST-Protein reziprok zu der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK)NIB/p27 exprimiert wird und zu einer verstärkten Proliferation bei den Zelllinien DAOY und D283 führt. Die Degradation von p27 wird durch die REST-abhängige Repression der Deubiquitylase USP37 vermittelt. In normalen Zellen wird das p27 Molekül mittels der Deubiquitination durch USP37 stabilisiert und blockiert die Proliferation der Zelle (Das et al., 2012).

Ein direkter Zusammenhang zwischen einer eingeschränkten REST-Funktion und einer erhöhten L1CAM-Expression in einem humanen Tumor wurde bis zum heutigen Zeitpunkt nicht analysiert.

6. Endometriumkarzinom

Das Endometriumkarzinom ist der am meisten diagnostizierte invasive Tumor des weiblichen Urogenitaltrakts. Im Jahr 2011 wurden in der USA 46.470 neue Fälle diagnostiziert, von denen 8.120 einen tödlichen Verlauf hatten (Cancer Statistics 2011). Weltweit werden jedes Jahr mehr als 200.000 Fälle von Endometriumkarzinomen gemeldet und ist damit die siebt häufigste Tumorart auf der Welt (Parkin et al., 2005). In Deutschland wurde bei ca. 11.000 Frauen ein Endometriumkarzinom festgestellt und die 5-jährige Überlebensrate lag beispielsweise im Jahr 2006 bei 83 %. Vor dem 45. Lebensjahr liegt die Diagnoserate eines Endometrium-Adenokarzinoms in Deutschland nur bei bis zu 5 % der Gesamtfälle. Die Inzidenz steigt jedoch enorm mit zunehmendem Alter und die meisten Fälle werden in einem Alter zwischen 65-85 Jahren diagnostiziert (RKI, Krebs in Deutschland 2005/2006).

6.1 Pathologie des Endometriumkarzinoms

In der Pathologie unterscheidet man zwischen Typ-I- und Typ-II-Endometriumkarzinomen. Die pathologische Bestimmung erfolgt durch das lichtmikroskopische Erscheinende, klinische Auffälligkeiten und die Epidemiologie (Übersicht s. Abb. A6) (Bokhman, 1983).

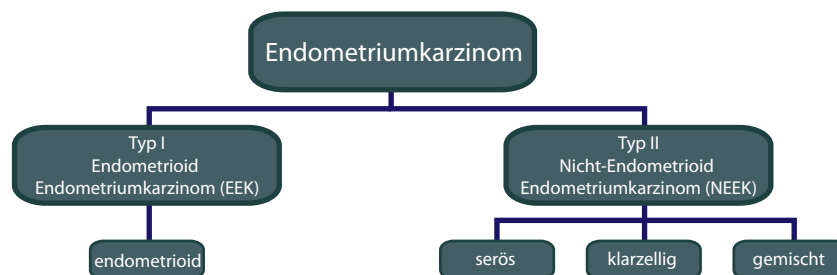


Abbildung A 6 *Histologische Klassifikation des Endometriumkarzinoms. Die Histologische Einordnung erfolgt nach dem mikroskopischen Erscheinungsbild des Tumors, klinischen Auffälligkeiten und der Epidemiologie. Grundsätzlich unterscheidet man beim EK zwei pathologische Sub-Typen und den dazugehörigen Phenotypen.*

Mit 75 bis 80 % ist der am häufigsten diagnostizierte Tumor, der als Typ I klassifizierte Endometriumkarzinom. Dieser Typ wird histologisch als endometrioid Adenoendometriumkarzinom (EEC), teilweise mit Komponenten eines Plattenepithels, oder als mucinös beschrieben. Diese Tumore korrelieren mit einer relativ guten Prognose und sind mit einer übermäßigen endogenen oder exogenen Oestrogenkonzentration assoziiert. Als histologischer Vorläufer für den Tumor gilt die endometriale Hyperplasia. Die Großzahl der Typ I-Tumore weist demnach einen niedrigen Entwicklungsgrad auf und ist noch stark differenziert (Bokhman, 1983; Amant et al., 2005) (s. Abb. A7).

Im Gegensatz zum Typ I- sind Typ II-Endometriumkarzinome histologisch durch einen serösen oder klarzelligen Phänotyp charakterisiert und werden in meisten Fällen als schlecht differenziert klassifiziert. Die Tumore gehen aus dem atrophischen endometrialen Gewebe hervor und sind Oestrogen unabhängig. Der Typ II Tumor wird oft mit disseminierten Krankheiten und einer schlechten Prognose diagnostiziert (Lax et al., 2000; Bansal et al., 2009).

Diese Tumore bilden vermehrt Metastasen und werden häufiger nach einer abgeschlossenen klinischen Behandlung erneut diagnostiziert (Shang, 2006) (s.Abb. A8).

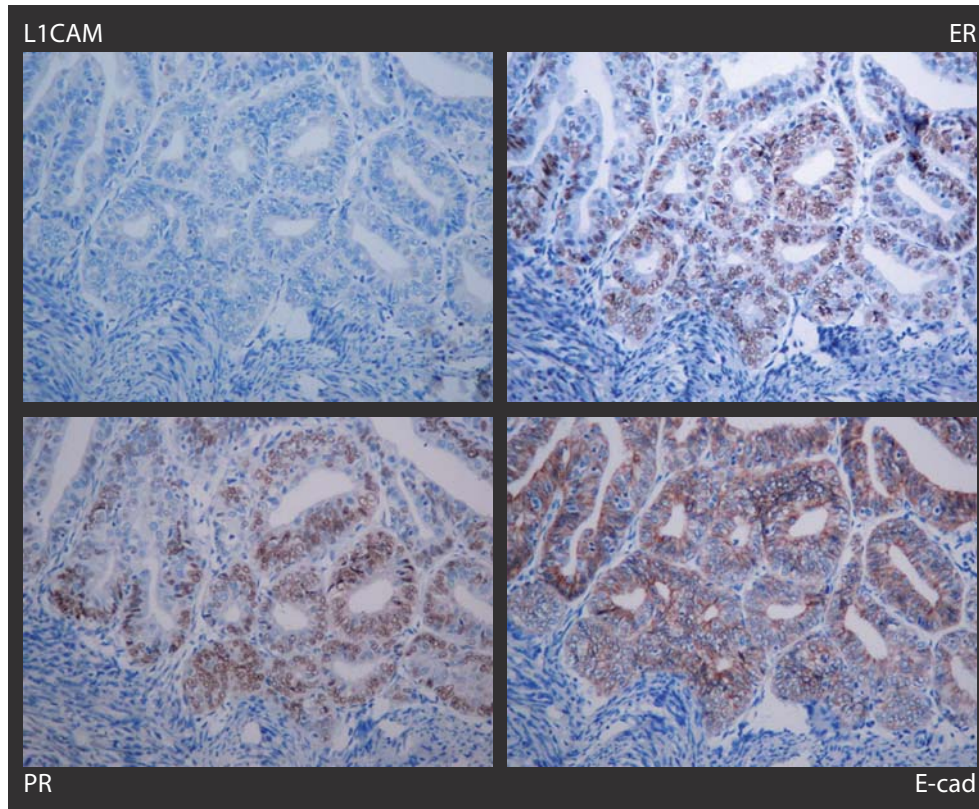


Abbildung A 7 *Sequenzielle Gewebeschnitte eines Typ-I Endometriumkarzinoms. Durch IHC wurde die Expression von L1CAM, ER, PR und E-cadherin bestimmt. Die Detektion des Proteins ist durch die dunkle Färbung zu erkennen. Demnach ist der Typ-I-EK negativ für L1CAM. Die Schnitte wurden freundlicherweise von M.Fogel, Rehovet, Israel zur Verfügung gestellt.*

Typ I EEC haben ihren Ursprung in den endometrialen Drüsengewebe von unterschiedlicher Differenzierung und sind mikroskopisch leicht identifizierbar. Zusätzlich zu dem bekannten Phänotyp zählen noch weitere Subtypen wie das sekretorische oder villoglanduläre Karzinom zu den Typ-I EECs (Amant et al., 2006). Die Histologische Einordnung erfolgt nach dem System der Internationalen Föderation der Gynäkologie und der Obstretik, wonach es nur auf den endometrioid Karzinom angewendet wird. Von allen Endometriumkarzinomfällen werden 55 % dem endometrioid Karzinom G1 mit niedrigen Entwicklungsgrad zugeordnet, 20 % als hochgradig G2/3 eingestuft. Für den serösen, papillären und klarzelligen Phänotyp wird die allgemeine Einordnung nach dem FIGO-Grad nicht angewandt. Beide Phänotypen werden zusammen mit den nicht-endometrioid-Typen als hochgradiges Karzinom G2/3 eingestuft und besitzen einen invasiven Tumor mit erhöhtem Metastasierungspotential (Sivridis and Giatromanolaki, 2011).

Die histologische Diagnose wird bestimmt durch das solide Wachstum des Tumors, dem Status der Invasion, der Tumorzellnekrose und der mitotischen Aktivität der Zellen im Tumor. Der seröse Phänotyp wird danach als aggressivster Tumor eingestuft (Hendrickson et al., 1982). Der klarzellige Phänotyp ist ebenfalls ein aggressiver Tumor und ist durch ein klares Zytoplasma (Glykogen) der Zellen charakterisiert. Die Tu-

mororganisation ist bei diesen Phänotypen sehr diffus und reicht von soliden weiter zu glandulären bis hin zu papillären Strukturen (Mendivil et al., 2009). Bis zu 40 % der nicht-endometrioid Endometriumkarzinome haben eine gemischten Phänotyp mit einem endometrioid Charakter (Slomovitz et al., 2003).

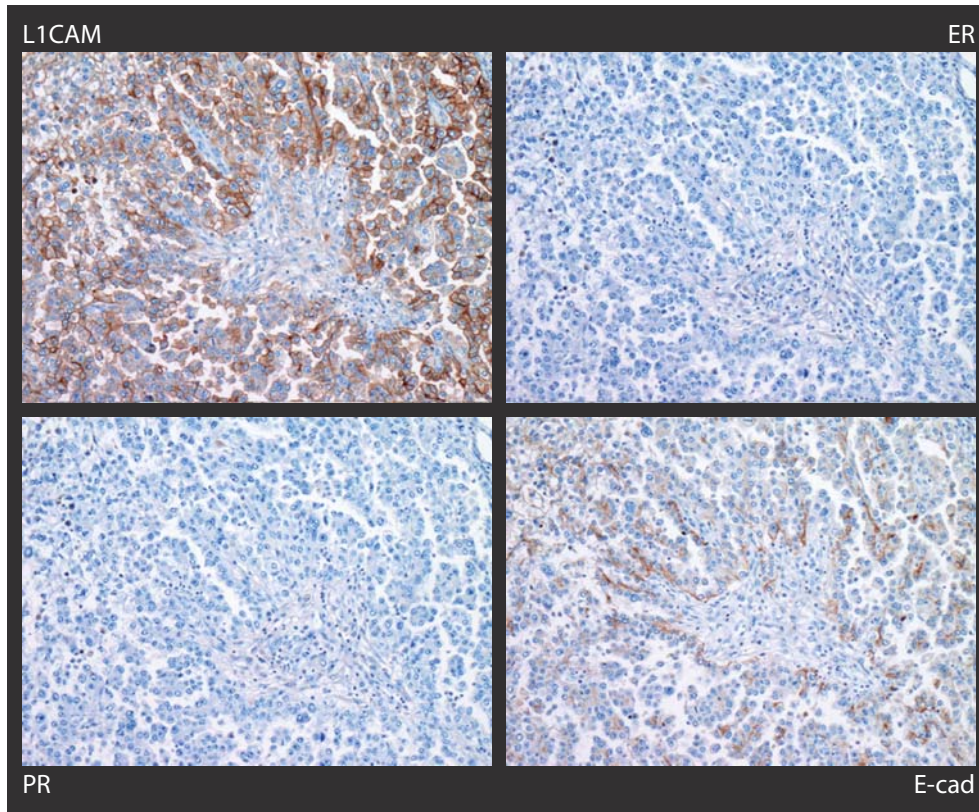


Abbildung A 8 Sequenzielle Gewebeschnitte eines Typ-II Endometriumkarzinoms. Durch IHC wurde die Expression von L1CAM, ER, PR und E-cadherin bestimmt. Die Detektion des Proteins ist durch die dunkle Färbung zu erkennen. Demnach ist der Typ-II-EK positiv für L1CAM, aber negativ für ER, PR und E-cadherin. Die Schnitte wurden freundlicherweise von M.Fogel, Rehovet, Israel zur Verfügung gestellt.

6.2 Pathogenese

Die molekularen Mechanismen des Endometriumkarzinoms sind bis heute unklar. Ähnlich wie bei anderen Tumorerkrankungen vermutet man auch beim Endometriumkarzinom bei dem Übergang vom normalen zum malignen Gewebe eine Akkumulation von genetischen Anomalitäten und epigenetischen Veränderungen. Eine Anreicherung der Ereignisse induziert Änderungen innerhalb zellulärer Signalwege, welche Zellprozesse wie die Apoptose, Proliferation und die Angiogenese beeinflussen (Shang, 2006). Ein spezifischer Marker zur Definition der Typ I- und Typ II- Endometriumkarzinom konnte bis heute nicht identifiziert werden.

Nichtsdestotrotz existiert die Möglichkeit zur Differenzierung zwischen Grad 1 endometrioid Adenokarzinom und Grad 2/3 nicht endometrioid Tumoren. Die Charakterisierung umfasst bekannte Onkogene und Tumorsuppressorgene. Bei Grad 1 Endometrioid Adenokarzinomen wurde eine erhöhte Inzidenz an Mutationen in den Tumorsuppressorgenen K-ras und PTEN festgestellt (Mutter et al., 2000; Lagarda et

al., 2001). Daneben sind ebenso vermehrte Veränderungen innerhalb des APC/ β -catenin Signalwegs bei Typ-I-Karzinomen nachweisbar (Moreno-Bueno et al., 2002). Außerdem beinhalten die Tumore vermehrte Mikrosatelliten-Instabilität und diploide Karyotypen (Lax et al., 2000; Maxwell et al., 2001). Im Gegensatz dazu weisen serös papillare Endometriumkarzinome nur wenige Mutationen des PTEN- oder K-ras-Gens auf. Die Tumore besitzen dafür vermehrt Mutationen des p53-Gens und einen aneuploiden Karyotypen (Lax, 2004). Das Tumorsuppressorgen E-cadherin ist ebenfalls vermehrt in serösen Typ II Karzinomen mutiert (Singh et al., 2008). Außerdem wurde eine erhöhte genetische Veränderung im Lokus von p16 und Her2/neu nachgewiesen (Lax, 2004).

Expressionsprofile von endometroiden und serös papillaren EKs		
	endometroide Karzinome (%)	serös papillare Karzinome (%)
PTEN Mutation	37-83	0-5
K-ras Mutationen	10-26	0-2
Microsatelliten Instabilität	15-28	0
β -catenin	14-44	0-5
p53 Mutation	14-20	53-96
Aneuploidie	10-18	85-95
E-cadherin red. Expr.	10-20	80-90

Tabelle A 9 Genetische Expressionsprofile von endometroiden und serös papillaren Endometriumkarzinomen. Das Auftreten der Ereignisse ist in % angegeben

Die Verteilung einzelner Marker ist in manchen Fällen jedoch nicht eindeutig und geben keine Auskunft über den Verlauf der Krankheit. Daher rückt L1CAM bei der pathologischen Diagnose des Endometriumkarzinoms vermehrt in den Fokus der Wissenschaft. Eine L1CAM-Expression ist im normalen Endometrium und dem Großteil der endometrioid EK Typ I nicht detektierbar. Eine starke Expression wurde dagegen in den serösen und klarzelligen EK Typ II nachgewiesen (Huszar et al., 2010). Ergänzend dazu belegt eine weitere Arbeit von Fogel, dass die L1CAM-Expression mit einer schlechten Prognose korreliert (Fogel et al., 2003a). Außerdem wurde eine inverse Expression von ER/PR/E-cadherin zu L1CAM nachgewiesen (Huszar et al., 2010). Das Expressionsmuster wurde auch in den EK mit einem gemischten Phänotyp und der Invasionsfront des Tumors festgestellt.

Eine L1CAM-Detektion in Endometriumkarzinomen wäre somit eine potentieller Marker zur Identifikation von Typ II ähnlichen Tumoren, welche ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert sind.

7. *Epigenetische Regulation*

Conrad Waddington prägte in den 1940er das Wort Epigenetik. Der Begriff sollte erklären, warum genetische Veränderungen nicht immer zu einer Änderung des Phänotyps führen und wie die Gene, zur Etablierung des Phänotyps mit der Umwelt interagieren können (Waddington, 1942). Heute wird die Epigenetik als mitotisch/meiotische, erblich veränderte Genexpression definiert, die nicht auf eine Änderung der Gensequenz zurückzuführen ist (Berger et al., 2009) (Berger, 2008). Das Epigenom, die Prozesse der Epigenetik, wird durch die DNA-Methylierung, post-translationelle Histonmodifizierungen, Nukleosompositionierung und nicht codierende RNA bestimmt. Die Beeinflussung oder Änderung der Prozesse resultiert in zahlreiche pathologischen Ereignisse, inklusive der Tumorprogression (Ballestar and Esteller, 2008). Eine weitere Eigenschaft der genetischen Modifikationen ist die Vererbung zwischen Mutter- und Tochterzelle (Mitose) oder zwischen den Generationen (Meiose). Das epigenetische Muster ist somit auf der einen Seite somatisch vererbbar, auf der anderen Seite aber auch hoch dynamisch. Es ist in die embryonale Entwicklung, das Imprinting und die X-chromosomale Inaktivierung involviert.

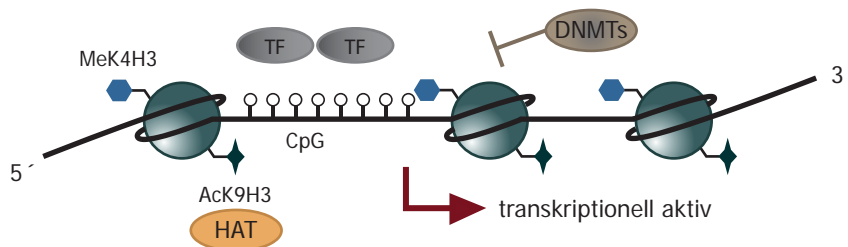
Der am besten untersuchte Mechanismus der Epigenetik ist die DNA-Methylierung. Die Modifizierung der DNA beeinflusst sowohl die Genaktivität als auch die Struktur des Nukleus einer Zelle. In humanen Zellen erfolgt die kovalente Addition/Subtraktion der Methylgruppe an ein zum Guanin benachbartes Cytosin. Die Dinukleotidfolge wird auch als CpGs bezeichnet. CpG-Motive sind nicht zufällig im Genom verteilt sondern in CpG reichen Regionen, sog. CpG-Inseln, angereichert. Diese CpG-Inseln sind in ca. 60 % der humanen Genpromoter lokalisiert oder in Regionen mit großen Bereichen von repetitiven Elementen (Bird, 2002; Weber and Schubeler, 2007). Bioinformatische Studien identifizierten ca. 29000 CpG-Inseln im humanen Genom (Lander et al., 2001). Ein Großteil der CpGs im Genom ist methyliert, um einer chromosomale Instabilität vorzubeugen. Die Cytosine der CpG-Inseln innerhalb der Genpromotoren sind dagegen während der Entwicklung oder im differenzierten Gewebe unmethyliert (Suzuki et al., 2007). Die DNA-Methylierung spielt eine entscheidende Rolle bei X-chromosomaler Inaktivierung und dem genomischen Imprinting (Bird, 2002).

Für die Etablierung und Aufrechterhaltung des DNA-Methylierungsmusters sind DNA-Methyltransferasen (DNMTs) DNMT1, DNMT3a und DNMT3b notwendig. Die DNMT1 ist für die Aufrechterhaltung des DNA-Methylierungsmusters verantwortlich. Der Mechanismus beruht auf dem semikonservativen Kopieren des Methylierungsmusters vom paternalen DNA-Strang auf den Folgestrang (Holliday and Pugh, 1975). Die DNMT1 hat unter den Methyltransferasen die höchste Affinität zur DNA und besitzt eine 7 bis 100-fache höhere Aktivität bei hemimethylierter DNA. Durch diese Selektivität werden verstärkt die CpGs methyliert, wo der parentale Strang an gleicher Stelle bereits methyliert ist (Bestor, 1992; Pradhan et al., 1999). In den letzten Jahren wurde jedoch deutlich, dass neben der DNMT1 noch weitere Komponenten zur Aufrechterhaltung des DNA-Methylierungsmusters notwendig sind (Jaenisch, 1997; Rhee et al., 2000). Für die *de novo* DNA-Methylierung sind die Enzyme DNMT3a und DNMT3b verantwortlich. Beide Moleküle werden verstärkt in embryonalen Zellen exprimiert (Okano et al., 1999a; Okano et al., 1999b). Eine genaue Beschreibung von einem Mechanismus zur Etablierung des Methylierungsmusters existiert nicht. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass für die *de novo* Methylierung bestimmter genomischer Regionen die DNMT3b erforderlich ist. Unterschiedliche Experimente in humanen und murinen Modellen offenbarten eine essentielle Funktion für die Methylierung von perizentromerischen repetitiven DNA-Sequenzen und

den CpG-Inseln auf dem X-Chromosom (Miniou et al., 1994; Okano et al., 1998b; Hansen et al., 2000; Kondo et al., 2000) (Miniou et al., 1994; Okano et al., 1999a; Kondo et al., 2000).

Ein zweiter zentraler Mechanismus der epigenetischen Regulation ist die post-translationelle kovalente Modifikation der vier Histonmoleküle H2A, H2B, H3 und H4 (Workman and Kingston, 1998). Die Modifikationen erfolgen hauptsächlich entlang des N-terminalen Restes der Proteine und führen entweder zu einer Aktivierung oder Repression. Die Auswirkungen sind davon abhängig, welche Aminosäure modifiziert wird und welche Art der Modifikation in welcher Anzahl vorliegt (Kouzarides, 2007). Die Addition oder Subtraktion von Acetylgruppen erfolgt an einem Lysin und die von Methylgruppen an Lysin oder Arginin. Eine weitere Modifizierung ist die Phosphorylierung oder Ubiquitinylierung eines Serinrestes. Bestimmte Histonmodifizierungen bilden eine sogenannten „Histon Code“ (Jenuwein and Allis, 2001). Es ist belegt, dass die Histonacetylierung generell mit einer transkriptionellen Aktivierung assoziiert ist (Bernstein et al., 2007). Die Addition der Acetylgruppe am Lysinrest resultiert in einer Neutralisation der positiven Ladung des Lysins und reduziert die Interaktion mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Das Histon H3 wird vorwiegend an den Positionen K9, 14, 18, 23, 27 und 56 acetyliert (Strahl and Allis, 2000). Im Gegensatz dazu ist die funktionelle Konsequenz der Methylierung von der Art des modifizierten Aminosäurerestes, Lysin oder Arginin, und der Position der AS abhängig (Bernstein et al., 2007). Die Methylierung von H3 an der Position K4 führt in den meisten Fällen zu einer transkriptionellen Aktivierung. Wohingegen die Methylierung von H3 an der Position K9 oder K27 und die von H4 an Position K20 mit einer Repression assoziiert ist (Karpf et al., 2005).

a aktives Chromatin



b inaktives Chromatin

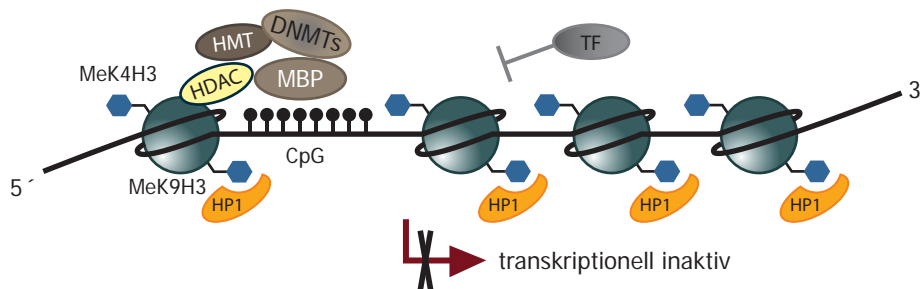


Abbildung A 10 Schematische Darstellung der epigenetischen Regulation und der daran beteiligten Moleküle.

7.1 Epigenetische Regulation von L1CAM

Vorhergehende Arbeiten belegen, dass auch L1CAM durch epigenetische Mechanismen reguliert wird. Kuwajima und Kollegen belegten eine erhöhte Expression von L1CAM in B16-B16 Melanomzelllinien nach der Behandlung mit Trichostatin A (TSA) oder Butyrat. TSA und Butyrat sind bekannte Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) und induzierten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine L1CAM-Expression (Kuwajima et al., 2007).

Die Arbeit von Kato belegte eine Induktion der L1CAM-Expression durch den DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5'-AzaC in Kolonkarzinomzelllinien (Kato et al., 2009). Durch diese Behandlung konnte bei zwei L1CAM negativen Kolonkarzinomzelllinien ein Anstieg von L1CAM auf mRNA- und Proteinlevel nachgewiesen werden. Bei den zwei positiven Zelllinien beobachtete man keinen Effekt durch die Behandlung. Die analysierten Patientenproben wiesen außerdem eine inverse Korrelation der Promotermethylierung mit der mRNA- und Protein-Expression auf (Kato et al., 2009). In anderen Tumorentitäten wurde der Einfluss der Epigenetik auf die L1CAM-Expression bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht untersucht.

8. Problemstellung

Die erlangten Erkenntnissen der letzten Jahre bestätigen die zentrale Rolle von L1CAM bei der Tumorprogression in unterschiedlichen Entitäten. Es wurde gezeigt, dass L1CAM entscheidende zellbiologische Funktionen beeinflusst und eine tumorfördernde Eigenschaft besitzt. So erhöht L1CAM die Zellmotilität und Chemoresistenz von Tumorzellen sowie das Tumorstadium in der Maus (Sebens-Muerkoster et al., 2008; Doberstein et al., 2011). Des Weiteren ist die L1CAM-Expression bei einigen Tumoren auf die invasive Front beschränkt. In diesem Bereich durchlaufen invadierende Zellen einen EMT ähnlichen Prozess (Fogel et al., 2003; Huszar et al., 2010). Trotz der zahlreichen Untersuchungen zu den biologischen Funktionen des L1CAM-Moleküls, gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt keine befriedigende Erklärung für die starke Expression von L1CAM in entarteten Zellen. Die bisherigen Erkenntnisse zur Regulation von L1CAM stammen zum größten Teil aus Versuchen neurobiologischen Untersuchungen. Dort wurde gezeigt, dass verschiedene Zytokin induzierte Signalwege zu eine Änderung der L1CAM-Expression beitragen. Im EK wird L1CAM hauptsächlich von den mit einer schlechten Prognose verbundenen Typ-II Karzinomen exprimiert. Die Ursache für die Expression ist jedoch noch unklar.

Durch diese Arbeit sollten Mechanismen identifiziert werden, welche zu der Überexpression in Tumorzellen beitragen. So sollte der Einfluss der Zytokine TGF- β 1 und HGF auf die L1CAM-Regulation untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde insbesondere auf die Beteiligung von EMT assoziierten Transkriptionsfaktoren geachtet, deren Expression von dem EMT induzierenden Zytokin TGF- β 1 abhängen. Desweiteren ist es notwendig zu klären wie stark der Transkriptionsfaktor REST in die Regulation von L1CAM involviert ist. REST ist ein bekannter Repressor von neuronalen Differenzierungsgenen und ist während der Entwicklung an der Regulation von L1CAM beteiligt (Kallunki et al., 1997). In nicht neuronalen Zellen ist REST zudem als Tumorsuppressor beschrieben. Ein direkter Einfluss von REST auf die L1CAM-Expression in Tumorzellen konnte allerdings bis heute nicht belegt werden.

Die epigenetischen Effekte sind ein weiterer wichtiger Aspekt in der Regulation von L1CAM. Sowohl Histonmodifikationen als auch DNA-Methylierung spielen eine entscheidende Rolle bei der Genregulation und beide Prozesse sind mit der Tumorstadium verbunden. Dabei sind die Histonmodifikationen in einer Zelle veränderbar und ermöglichen eine dynamische Regulation des Zielgens, während die DNA-Modifikation eine stabile vererbte Repression über mehrere Zellgenerationen darstellt. Auch in EK wurde ein Zusammenhang zwischen geänderten DNA-Methylierungsmuster und Tumorstadium beschrieben.

Genauere Erkenntnisse über die Ursachen der geänderten L1CAM-Expression in EK sind gegebenenfalls die Grundlage für eine gezielte Entwicklung pharmazeutischer Reagenzien zur spezifischen Behandlung von L1CAM positiven Tumoren.

B Material

1. Zelllinien

Name	Charakterisierung und Ursprung	Medium
AG6000 L1+	Peter Altevogt, Heidelberg, D; humane Ovarialkarzinomzelllinie mit humanen L1CAM transduziert	DMEM
AN3CA	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	RPMI-1640
ARK1	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	RPMI-1640
ECC1	Blook L, Rotterdam NL; humane Endometrialkarzinomzelllinie	DMEM/F12
EN1	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	DMEM
Hec155	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	RPMI-1640
Hec1A	Blook L, Rotterdam NL; humane Endometrialkarzinomzelllinie	MyCoy's 5a
Hec1B	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	RPMI-1640
Ishikawa	humane Endometrialkarzinomzelllinie, exprimieren ER, epithelialer Charakter	DMEM
IK ER-	humane Endometrialkarzinomzelllinie, von 39-jähriger Frau, exprimieren keinen ER, epithelialer Charakter	DMEM/HAM-F12
MFE296	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	DMEM
MFE319	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	DMEM
OVMz	Altevogt P, Heidelberg; D humane Ovarialkarzinomzelllinie	DMEM
RL 95-2	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	RPMI-1640
SNG 11	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	DMEM-F12
SNGM	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	DMEM-F12
SPAC1L	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	RPMI-1640
SPAC1S	Konecney GE, UCLA, Kalifornien, USA; humane Endometrialkarzinomzelllinie	RPMI-1640

2. Medien und Mediensupplemente

Medium/Mediumsupplement	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories, Pasching; A
DMEM/F12	PAA Laboratories, Pasching; A
MyCoy's 5A Medium mit Glutamin	PAA Laboratories, Pasching; A
OPTI-MEM I	Invitrogen, Karlsruhe; D
Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640)	PAA Laboratories, Pasching; A
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin; D
Natrium-Pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe; D

3. Inhibitoren

Inhibitor	Zielmolekül	Hersteller
5'-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabin)	Cytidinanalogon, inhibiert DNA-methyltransferasen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen; D
5'-Azacytidin	Cytidinanalogon, inhibiert DNA-methyltransferasen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen; D
Trichostatin A (TSA)	inhibiert Klasse I und II Histondeacetylasen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen; D
Valproinsäure (VA)	Inhibitor der Histondeacetylase 1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen; D

4. Medienzusammensetzung

Medium	Zusätze
DMEM	10 % FCS
DMEM/F12	10 % FCS
McCoy's 5A	10 % FCS 5 mM Glutamin 5 mM Natrium-Pyruvat 10 mM HEPES
OPTI-MEM	ohne
RPMI-1640	10 % FCS

5. Zytokine

Zytokin	Hersteller
HGF(rekombinant human)	Promokine, Heidelberg; D
TGF- β 1(rekombinant human)	Promokine, Heidelberg; D

6. Prokaryotische Zellen und Kulturmedien

6.1 Prokaryotischen Stämme

E.coli-Stamm	Hersteller
E.coli XL1-blue	U, Schirmer., DKFZ; Heidelberg
E.coli TOP 10	Invitrogen, Karlsruhe; D
QIAGEN EZ Competent Cells	Qiagen, Hilden; D

6.2 Kulturmedium

Kulturmedium	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB) Medium	1,0 % Bactotrypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 NaCl 15 g Bactoagar / 1 l LB-Medium
Super Optimal Broth (S.O.C)	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM Natriumchlorit 2,5 mM Kaliumchlorit 10 mM Magnesiumchlorit 20 mM Glukose

7. Antikörper und Farbstoffe

7.1 Primäre anti-human Antikörper

Name	Spezies	Isotyp	Hersteller
β -Aktin	Maus	IgG1	Sigma Aldrich, München; D
β -Catenin	Kaninchen	polyklonal	Sigma Aldrich Schnellendorf; D

Name	Spezies	Isotyp	Hersteller
E-cadherin	Maus	polyklonal	BD; Heidelberg; D
GAP-DH	Maus	IgG1	Santa Cruz; USA
HA	Kaninchen	polyklonal	AbCam, Cambridge; UK
Histon-H3	Kaninchen	IgG	Cell Signaling, Frankfurt; D
Histon-H3 acetyl (Lys18)	Kaninchen	IgG	Cell Signaling, Frankfurt; D
L1CAM (L1-11A)	Maus	IgG1	Peter Aletvogt, Heidelberg; D
L1CAM (huL1-9.3-Alexa488)	Maus	IgG2a	Peter Altevogt, Heidelberg; D
Mage 3A	Kaninchen	polyklonal	Novus Biologicals, Littleton; USA
Mage 4A	Maus	IgG2b	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ny-Eso-1	Maus	IgG1	Invitrogen, Karlsruhe; D
REST	Kaninchen	polyklonal	Millipore, Schwalbach; D
Slug	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Frankfurt; D
Vimentin	Maus	monoklonal	Invitrogen, Carlsbad; USA

7.2 Konjugierte sekundäre Antikörper

7.3 Isotypkontrollen

Isotyp	Spezies	Beschreibung	Hersteller
IgG	Kaninchen		Cell Signaling, Frankfurt; D
IgG1	Maus	APH 266.3	Gerd Moldenhauer, DKFZ; D
IgG2a	Maus	CL 18	Gerd Moldenhauer, DKFZ; D

7.4 Farbstoffe

Farbstoff	Hersteller
DAPI (bisBENZIMIDE)	Hoechst, Darmstadt; DE

8. Chemikalien

Säuren, Basen sowie organische und inorganische Lösungsmittel wurden in analytischer Qualität von Applichem, Becton Dickinson, Bio-Rad, Calbiochem, Fluka, Gerbu, Baker, Merck, Pharmacia Biotech., Reidel-de Haen, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-/Methylbisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe; D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen; D
CASYton isotonische Lösung	Roche, Mannheim; D
Complete Mini Protease Inhibitoren	Roche, Mannheim; D
Chemilumineszenz Substrat	Amersham, Braunschweig; D
GelRed	Genaxxon Bioscience, Ulm; D
Heparin	Initrogen, Karlsruhe; D
Milchpulver	Merck, Darmstadt; D
Mowiol 4-88	Merck, Darmstadt; D
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St.Louis; USA
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	Invitrogen, Karlsruhe; D
NuPage® LDS 4 x Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe; D
SDS Probenpuffer (NuPAGE)	Invitrogen, Karlsruhe; D
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe; D
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen; D

9. DNA modifizierende Enzyme und Reagenzien

Enzym	Hersteller
dNTPs (10mM pro)	Fermentas, St.Leon-Rot; D
Hind III	Fermentas, St.Leon-Rot; D
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden; D
Kapa Hifi DNA Polymerase	Kapa Biosystems Inc., Woborn; USA
Kpn I	Fermentas, St.Leon-Rot; D
Mlu I	Fermentas, St.Leon-Rot; D
2x RedTaq Polymerase Mastermix	Sigma-Aldrich, St.Louis; USA
Sgf I	Fermentas, St.Leon-Rot; D
T4 DNA Ligase	Fermentas, St.Leon-Rot; D
Taq-Polymerase	Bio & Sell, Feucht bei Nürnberg; D

10. Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller
Bakterienschüttler	New Brunswick, Enfield; USA

Gerät	Hersteller
Blotkammer	CTI GmbH, Idstein; D
Brutschrank	Heraeus, Hanau; D
Durchflusszytometer FACSCanto II®	Becton Dickinson, Heidelberg; D
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München; D
Feinwaage	Mettler-Toledo, Giessen; D
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen; D
Gefrierschrank -70°C BioFreeze	Sanyo, Südkorea
Gel Glasplatten	Bio-Rad, München; D
Geldokumentation Infinity 3000	Vilber Lourmat, Eberhardzell; D
Glashomogenisator	10 ml Wheaton, Millville; USA
Heizblock „Thermomix“	Eppendorf ,Hamburg; D
Homogenisator MP Fast-Prep® 24	MP-Biomedicals, Heidelberg; D
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen; D
Magnetheizrührer	Heidolph, Heidelberg; D
Messzylinder	Vitlab, Grobostheim; D
Mikroskop	Leitz, Wetzlar; D
Mikroskop LSM300	Zeiss, Jena; D
Mikrowelle	Sharp, Hamburg; D
Milli-Q-Wassereinigungssystem	Millipore ,Eschborn; D
Nano-Drop	Technologies ,Wilmington; USA
PCR Thermal Cycler DNA-Engine PTC-200	MJ Research ,Waltham; USA
Plattenluminometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
Plattenphotometer ELX800 (Elisa-Meßgerät)	Tecan, Crailsheim; D
Probenkamm	Bio-Rad, München; D
RT-PCR-Cycler 7300 RT-PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt; D
Scanner Perfection 3200 Photo	Epson, Tokio, Japan
Sonifier® S-450 A (Ultraschallsonifizierer)	Branson, Danbury; USA
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau; D
Vortex Reax	2000 Heidolph, Heidelberg; D
Western-Blot-Tank	Bio-Rad, München; D
Zellzählgerät CASY1	Schärfe-System, Reutlingen; D

11. Kits

Kit	Hersteller
AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit	Qiagen, Hilden; D
EZ DNA-Methylation-Gold Kit	Zymo Research, Orange; USA
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden; D
Dual Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Madison; USA
First Strand cDNA Synthesis RevertAid™ H Minus Kit	Fermentas, St. Leon-Rot; D

Kit	Hersteller
Illustra MicroSpin G50 Columns	GE Healthcare, Buckinghamshire; UK
miRNeasy Kit	Qiagen, Hilden; D
Megaplex™ PreAmp Primer	Applied Biosystems, Darmstadt; D
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden; D
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden; D
FastQuick MiniPrep Kit	Qiagen, Hilden; D
PCR Cloning Kit	Qiagen, Hilden; D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden; D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden; D
QIAshredder	Qiagen, Hilden; D
REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, München; D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden; D
Simple ChIP Enzymatic Chromatin IP Kit	Cell signaling Technology, Beverly; USA
SYBR Green I PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt; D
TaqMan® Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0	Applied Biosystems, Darmstadt; D
TaqMan® Universal MM II	Applied Biosystems, Darmstadt; D
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt; D

12. Molekulare Marker (DNA, RNA & Protein)

Marker	Hersteller
DNA Größenmarker (Fast Ruler™ low range)	Fermentas, St.Leon-Rot; D
DNA Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp ladder)	Fermentas, St.Leon-Rot; D
DNA Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb ladder)	Fermentas, St.Leon-Rot; D
DNA Ladepuffer (6x)	Fermentas, St.Leon-Rot; D
Molekulargewichtsmarker (Multicolor Broad Range)	Fermentas, St.Leon-Rot; D
RiboRuler™ low range RNA ladder	Fermentas, St.Leon-Rot; D
RNA Ladepuffer (2x)	Fermentas, St.Leon-Rot; D

13. Plasmide

Name	Charakterisierung	Ursprung
pcDNA3	Mammalia Expressionsvektor mit CMV-Promoter	Invitrogen, Karlsruhe; D
psDNA3.1 (+/-)	Mammalia Expressionsvektor mit CMV-Promoter	Invitrogen, Karlsruhe; D
pcDNA3-Slug	Mammalia Expressionsvektor, beinhaltet codierenden Bereich der Slug-mRNA	Schäfer H, Kiel; D
pcDNA3-Slug-HA	Mammalia Expressionsvektor, beinhaltet codierenden Bereich der Slug-mRNA mit HA-Tag	de Herreros, g., Barcelone; E

Name	Charakterisierung	Ursprung
pCMV6-XL4	Mammalia Expressionsvektor mit CMV-Promoter	P. Rameshwar, New Jersey; USA
pCMV6-RX4	Mammalia Expressionsvektor, beinhaltet codierenden Bereich der REST-mRNA	P. Rameshwar, New Jersey; USA
pCMV-MIR	Mammalia GFP-Expressionsvektor mit CMV-Promoter	OriGene, Rockville; USA
pCMV-MIR-miRNA Genlokus	Mammalia GFP-Expressionsvektor mit CMV-Promoter, beinhaltet genomische Sequenz der entsprechenden miRNAs; miR-519; miR-1271; miR-512; miR-34a; miR-589; miR-625; miR-1293; miR-222*	Schirmer U., DKFZ, Heidelberg; D
pLightSwitch_3'UTR	Mammalia Expressionsvektor mit konstitutiven Promoter, beinhaltet den codierenden Bereich der Renilla-mRNA	SwitchGear Genomics, Menlo Park; USA
pLightSwitch_L1CAM-3'UTR	Mammalia Expressionsvektor mit konstitutiven Promoter, beinhaltet codierenden Bereich der Renilla-mRNA mit 3'-UTR von L1CAM-mRNA	SwitchGear Genomics, Menlo Park; USA
pGL3-basic	Vektor ohne Promoter- oder Enhancersequenzen, beinhaltet den codierende Bereich der Firefly-Luziferase-mRNA	Promega, Mannheim; D
pGl3-SV40	Mammalia Expressionsvektor mit SV40-Promoter, beinhaltet den codierende Bereich der Firefly-Luziferase-mRNA	Promega, Mannheim; D
pDrive clonig vector	Mammalia Expressionsvektor mit konstitutiven Promoter und LacZ-Gen	Qiagen, Hilden; D

14. Primer

14.1 Primer zur quantitativen Detektion

Alle humanen Primer wurden soweit nicht anders angegeben von dem Hersteller Sigma-Aldrich bezogen.

Primer		Sequenz (5'-3')
DNMT1	forward	5'-AAGAACGGCATCCTGTACGGAGTT-3'
	reverse	5'-TGCTGCCTTTGATGTAGTCGGAGT-3'
E-cadherin	forward	5'-ATGCTGAGGATGATTGAGGTGGGT-3'
	reverse	5'-CAAATGTGTTTCAGCTCAGCCAGCA-3'

Primer		Sequenz (5'-3')
GAPDH	forward	5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3'
	reverse	5'-TTCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'
L1CAM	forward	5'-ATCGTACGGGAAGGAGGCACTATG-3'
	reverse	5'-CTTGATGTCCCCGTGAGCGAT-3'
Mage 3A	forward	5'-AGCAAAGCTTCCAGTTCCTTGCAG-3'
	reverse	5'-ACAGTCGCCCTCTCTTGCATTAT-3'
Mage 4A	forward	5'-TAATCCTGCGCGCTATGAGTTCCT-3'
	reverse	5'-TGACCACATGCTCCAGGACTTTCA-3'
NY-Eso-1	forward	5'-TGAGTTCTACCTCGCCATGCCTTT-3'
	reverse	5'-TCGGATAGTCAGTATGTTGCCGGA-3'
REST	forward	5'-CGCCATGCAAGACAGGTTTCAAT-3'
	reverse	5'-AGCTGCATAGTCACATACAGGGCA-3'
Slug	forward	5'-ATA TTC GGA CCC ACA CAT TAC CT 3'
	reverse	5' GCA AAT GCT CTG TTG CAG TGA 3'
Vimentin	forward	5'-AGAACCCTGCAGGAGGCAGAAGAAT-3'
	reverse	5'-TTCCATTTACGCATCTGGCGTTC-3'

14.2 Primer zur quantitativen Detektion der Chromatin Immunopräzipitation

Alle humanen Primer wurden soweit nicht anders angegeben von dem Hersteller Sigma-Aldrich bezogen. Die E-Box-Primer sind entsprechend ihrer chromosomalen Lokalisation zum Startcodon des L1CAM-Gens aufgelistet. Der E-Box 1-Primer ist demnach der am nächsten gelegene Primer.

Primer		Sequenz (5'-3')
E-Box 1	forward	5'-CCCAGAGAAGACACACCACA-3'
	reverse	5'-CAACTTGTGCCCCATCA-3'
E-Box 2	forward	5'-GCCCAGCCCTAATTTTGTATT-3'
	reverse	5'-AAAATAAAAAGGCCAGGCACA-3'

Primer		Sequenz (5'-3')
E-Box 3	forward	5'-CCCCCTCTTTTCAGACCCCTTA-3'
	reverse	5'-GGGACATTTTCCGTGACAGT-3'
E-Box 4	forward	5'-TGGGATTTTCTGGGTGCTT-3'
	reverse	5'-ACGCAACAGAGCATCAAGG-3'
E-Box 5	forward	5'-GTCCACTCAGTGCATGGTCA-3'
	reverse	5'-GATTCCTGCTGCGGGTAG-3'
E-Box 6	forward	5'-AACACGCTGAGGACGAAG-3'
	reverse	5'-GAAGGGGATGCTCCCTTAG-3'
E-Box 7	forward	5'-GTTTCCTCTGCTGTCACCTG-3'
	reverse	5'-CCATAGTGCCAGCTTCAGTT-3'
E-Box 8	forward	5'-GCTGTGCTCAGGAAATGTGA-3'
	reverse	5'-CCCAACTTCTGCAAATCCTT-3'
E-Box 9	forward	5'-GTAACACTCACCGCGAAGGT-3'
	reverse	5'-TTGAACTCCTGGGCTCAAGT-3'
RE-1/L1CAM	forward	5'-TCCTCACCTTCTCCCTGTTC-3'
	reverse	5'-TACCCAACGTCCTGGCTATC-3'
RE-1/SNAP25	forward	5'-GGGTGCTATTATCCAGGGAAG-3'
	reverse	5'-CAGGCGGCATAAATCAAGTC-3'
RE1/Synaptophysin	forward	5'-CGACTCTGGGAGGTGGTG-3'
	reverse	AGCGCACTCCTTTTCTCCA

Primer		Sequenz (5'-3')
neg+7000 bp	forward	5'-GGGACTTTATGTCTCCCCTCTT-3'
	reverse	5'-TCAGTTCGAAGCCTTCTTGC-3'

14.3 Primer zur Amplifizierung von mRNA oder genomischer DNA

Primer		Sequenz (5'-3')	Modifikation
NRSF	forward	5'-GAGCGAGTATCACTGGAGGAAACATTT-3'	
	reverse	5'-ATAGTCACATACAGGGCAATTGAACTGC-3'	
sNRSF	reverse	5'-CATTTCAGTGGGGTATGGATACC-3'	
insert miR34a	forward	5'-GAGGCGATCGCCCCTCCCTGCAGCCCAACC-3'	Sgf I-Motiv
	reverse	5'-GCGACGCGTGACAGGCCTTCCTGCATAGT-3'	Mlu I-Motiv
insert 1293	forward	5'-GAGGCGATCGCCCTCTCAGCAGTTTGAGAGACCAA-3'	Sgf I-Motiv
	reverse	5'-GCGACGCGTTGTTTGGCATTTAAGGAAAAAT-3'	Mlu I-Motiv
insert 512-3p	forward	5'-GAGGCGATCGCCCTGGGCAACAGAGCAAGACTA-3'	Sgf I-Motiv
	reverse	5'-GCGACGCGTAGATCCAAGAACCCGCTTTT-3'	Mlu I-Motiv
insert 1271	forward	5'-GAGGCGATCGCCACACTTCCAGCATGCTCTCC-3'	Sgf I-Motiv
	reverse	5'-GCGACGCGTCACAGCCATTCTCCATTCAG-3'	Mlu I-Motiv
insert 629	forward	5'-GAGGCGATCGCCCTAAGCCAGCTTTCCATTTCC-3'	Sgf I-Motiv
	reverse	5'-GCGACGCGTCAGGGCAAGTCTCTCTCAT-3'	Mlu I-Motiv
insert 589	forward	5'-GAGGCGATCGCCCCTAGGTCACATGGCTGCTT-3'	Sgf I-Motiv
	reverse	5'-GCGACGCGTGAGCGACTCCTTCCTGCAC-3'	Mlu I-Motiv
insert 519d	forward	5'-GAGGCGATCGCCCAGCTCAAAGTCCATTTGCTG-3'	Sgf I-Motiv
	reverse	5'-GCGACGCGTTGGGTACAGAGCAAGACTG-3'	Mlu I-Motiv
insert 222*	forward	5'-GAGGCGATCGCCCTTGTGTTGCTGCTGGATCTC-3'	Sgf I-Motiv
	reverse	5'-GCGACGCGTTTGTGTTGCTGCTGGATCTC-3'	Mlu I-Motiv

Primer		Sequenz (5'-3')	Modifikation
insert 625	forward	5'-GAGGCGATCGCCCTGCTCTCTGCTTGACTGTGC-3'	Sgf I-Motiv
	reverse	5'-GCGACGCGTAGGAGCCCTACCAGGTTCTC-3'	Mlu I-Motiv
insert 1285-1	forward	5'-GAGGCGATCGCCACCTTGCTTTTGGGTCATT-3'	Sgf I-Motiv
	reverse	5'-GCGACGCGTGGGGCATTTCCTTCATT-3'	Mlu I-Motiv

14.4 Primer und TaqMan-Probe für MethyLight-Reaktion

Die Primer und Proben gegen die entsprechende Sequenz wurden mit Hilfe des Programms Primer Express 2.0 von Applied Biosystems ausgewählt.

Primer/Probe		Sequenz (5'-3')
L1CAM-ML	forward	5'-AATACTCCCTTAACCTCGACCTAACC-3'
	reverse	5'-GGCGTTGCGTGTAGGTGTT-3'
	Hybridisierungsprobe	5'-TCGACGACGCCGACCAACGAT-3'

14.5 Primer zur Amplifikation Bisulfitbehandelter DNA

Primer		Sequenz (5'-3')
L1CAM-CpGI-1.1	forward	5'-TTAGAGAGTTGGAGGAAAATTTG-3'
	reverse	5'-ACACACACACACAAAACAAAAC-3'
L1CAM-CpGI-1.2	forward	5'-GAGTTTGTGTTTGTGTGTGTGTG-3'
L1CAM-CpGI-1.2	reverse	5'-CACCTAACCCTAATACCAAC-3'
L1CAM-CpGI-2.1	forward	5'-AGTAGTTGAAGGGAGTTTGG-3'
L1CAM-CpGI-2.1	reverse	5'-TAAAAAAAACCCAAAACCTC-3'

15. siRNA Sequenzen

Alle humanen small interfering RNAs (siRNA) wurden soweit nicht anders angegeben von dem Hersteller Eurofins MWG Operon in Ebersberg, Deutschland bezogen.

Name		Sequenz
siDNMT1	sense	5'-AGA-CCA-GGA-UGA-GAA-GAG-A-3'
siGFP	sense	5'-GGC-UAC-GUC-CAG-GAG-CGC-ACC-3'
siREST	sense	5'-AGA-GAU-GGA-UGU-GCA-UAC-ATT-3'

Name	Sequenz
siSlug	sense 5'-GCA-UUU-GCA-GAC-AGG-UCA-ATT-3'

16. Software

Name	Hersteller
Adobe® Illustrator CS5	Adobe Systems Inc., San Jose; USA
Adobe® Photoshop CS5	Adobe Systems Inc., San Jose; USA
Alibaba 2.1	Biobase, Wolfenbüttel; D
BiQ Analyzer	Bock, M., MPI Freiburg; D
CpG island searcher	WWW.uscnorris.com/cpgislands/cpg.cgi
FlowJo™ 4.3	TreeStar, San Carlo; USA
GraphPadPrism™ 5.0	GraphPad, Software Inc.; USA
Microsoft® Office	Microsoft Corporation, Redmond; USA
Microsoft® Excel	Microsoft Corporation, Redmond; USA
Sequence Detection Software	Applied Biosystems, Darmstadt; D
Zen Mikroskop Imaging Software	Zeiss, Jena; D

17. Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	Herstelle
96-Well Plate für Real-Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt; D
Biodyne® B-Membran	Pall, New York; USA
Blotfilter Whatman®	Carl Roth, Karlsruhe; D
Deckgläschen rechteckig	VWR, Darmstadt; D
Deckgläschen rund	Carl Roth ,Karlsruhe; D
Einmalspritzen ohne Nadel 5-50 ml	Terumo ,Eschborn; D
FACS-Röhrchen	BD Bioscience, New Jersey; USA
Filterpipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg; D
Flachbodenplatten 6- und 96-Well	TPP, Trasading; CH
Glasobjektträger 76 x 26 mm Mattrand	Langenbrink, Emmendingen; D
Glaspasteurpipetten 150 mm	WU, Mainz; D
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire; UK
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg; D
PVDF-Membran	Millipore, Eschborn; D
Reaktiongefäße 0,5 1,5 und 2 ml	Eppendorf; D, Hamburg; D
Sterilfilter 0,22 µm	Millipore, Eschborn; D
Zellkulturflaschen 25, 75, und 150 cm ²	TPP, Trasadingen; CH
Zellkulturschalen 100 x 15 mm ²	TPP, Trasadingen; CH
Zellkulturschalen 150 x 20 mm ²	TPP, Trasadingen; CH
Zellkulturschalen 6 x 15 mm ²	TPP, Trasadingen; CH

Zellschaber	TPP, Trasadingen; CH
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	TPP, Trasadingen; CH

18. Versuchstiere

Von adulten transgenen C57BL/6 Mäusen wurden Gewebeproben oder Blut für weitere Experimente entnommen.

19. Lösungen und Puffer

Puffer		
5x Blot Transferbuffer	Glycine	190 mM
	Tris-HCl, pH8	50 mM
1x Blot Transferbuffer	5x Blot transfer buffer	100 ml
	Methanol	100 ml
	ddH ₂ O	300 ml
50x TAE	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	0,5 M EDTA, pH 8,0	100 ml
	ad 1 l H ₂ O, pH 8,5	
Blockpuffer	Milchpulver	4,5 g
	BSA	0,5 g
	TBS	add 100 ml
FACS-Puffer	1 x PBS	50 ml
	BSA	3% (m/v)
Lysepuffer	TBS	7,5 ml
	Probenpuffer NuPage	2,5 ml
	1 Tablette Boeringer complete	

Puffer		
PBS (pH 7,4)	NaCl	140 mM
	KCl	2,6 mM
	KH_2PO_4	8 mM
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	1,5 mM
	in ddH ₂ O	
PBS/EDTA	EDTA	5 mM
	in PBS	
SDS-Page Laufpuffer	Tris-HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycin	190 mM
	SDS	0,1 %
	in dd H ₂ O	
TAE-Puffer pH 7,4	Tris	2,0 M
	NaAcetat	1,0 M
	EDTA	50 mM
TBS	Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
	NaCl	150 mM
	in ddH ₂ O	
TBS/Tween-Waschpuffer	0,05 % Tween 20 in TBS (v/v)	
TE-Puffer	Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
Tail-Puffer	Tris-HCl pH 8,5	100 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	5 mM
	SDS	0,2 %

C Methoden

1. Zellbiologische Methoden

1.1 Kultivierung humaner Karzinomzelllinien

Die Endometrial- und Ovarialkarzinomzelllinien wurden in sterilen 75 cm² oder 175 cm²-Kulturflaschen, bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in entsprechendem Medium kultiviert.

Zur Subkultivierung wurde zunächst der Zellkulturüberstand des Monolayers abgenommen, die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml 5mM PBS/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Hierfür wurden die Flaschen mit den Zellen für 10 min in den Zellinkubator gestellt. Danach wurden die Zellen bei 1200 rpm abzentrifugiert und in neuem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und je nach Zellmenge im Verhältnis 1:5 oder 1:7 gesplittet. Anschließend wurden die Zellen in eine Kulturflasche mit 20 ml frischen Medium gegeben.

1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahlbestimmung einer Zellsuspension erfolgte mit Hilfe des CASY® Zellzahlgerätes. In diesem System erfolgt die Messung der Zellzahl, -größe und Viabilität über ein Spannungsfeld. Durch die zugeordnete Zellgröße konnten später die Zellbestandteile und toten Zellen aussortiert werden. Zur Herstellung einer Zellsuspension wurden die Zellen wie oben beschrieben mit 5 mM PBS/EDTA abgelöst und in Medium aufgenommen. Dann wurden 10 µl der Zellsuspension in 10 ml CASYton-Puffer (Innovatis, Reutling) verdünnt. Anschließend erfolgte die Messung.

1.3 Kryokonservierung humaner Zellen

Die Zellen einer 75 cm²-Kulturflasche wurden abgelöst, wie unter 4.1.2 beschrieben, zentrifugiert und das Zellpellet in 5 ml Kryokonservierungs-Medium (Kulturmedium mit 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen. Die 5 ml Zellsuspension wurden auf drei 1,8 ml Kryokonservierungsröhrchen verteilt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen über Nacht in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox bei -80°C gestellt, was ein langsames Abkühlen der Zellen (1°C/Minute) ermöglichte. Dieses schonende Verfahren erhöht die Zahl der überlebenden Zellen nach dem Auftauen. Am folgenden Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

1.4 Auftauen kryokonservierter Zellen

Zunächst wurde das entsprechende Kulturmedium bei 37°C vorgewärmt. Die kryokonservierten Zellen in 1,8 ml Kryokonservierungs-Röhrchen wurden in der Hand langsam aufgewärmt und anschließend in ein 15ml Schraubdeckelröhrchen mit 10 ml vorgelegtem Kulturmedium überführt. Anschließend wurden sie gut resuspendiert und die Zellsuspension bei 1200 Upm für 5min abzentrifugiert, um das cytotoxische DMSO zu entfernen. Das resultierende Zellpellet wurde in 15 ml frischen Mediums aufgenommen und in eine 75 cm²-Kulturflasche überführt.

1.5 Cytokinbehandlung von endometriumkarzinom Zellen

Für die Behandlung mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren wurden von jeder Zelllinie 5×10^4 Zellen in einem Ansatz einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden in 2 ml Medium unter den angegebenen Bedingungen (s. 2.1.a) kultiviert. 24 h nach dem Aussäen wurde die Behandlung begonnen. Die Cytokin-Endkonzentration in jedem Ansatz betrug 10 ng/ml. Die Behandlung wurde für 10 Tage durchgeführt, wobei die Cytokine alle 24 h frisch zum Medium gegeben wurden. Alle 3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen bei Bedarf subkultiviert.

1.6 Inhibitorbehandlung von Karzinomzelllinien

Die ausgesäte Zellzahl zu Beginn der Behandlung war abhängig von der Zelllinie, Kultivierungsgefäß und verwendetem Inhibitor. Alle Zelllinien wurden in der Regel so ausgesät, dass sie vor Beginn der Behandlung eine Konfluenz zwischen 60-70 % erreichten. Der Behandlungszeitraum variierte je nach verwendetem Reagenz. Die Behandlungen mit den DNA-Methyltransferaseinhibitoren erstreckte sich über einen Zeitraum von 5 Tagen und die Zugabe der Inhibitoren erfolgte täglich. Die normale Endkonzentration im Mediumvolumen betrug sowohl bei 5'-Azacytidin (AZA) als auch bei 5'-Aza-2'-Deoxycytidin (Decitabin, Dec) 5 μ M. AZA wurde in serumfreien Medium (OpitMEM) und Decitabin in DMSO gelöst. Die Histondeacetylase-Inhibitoren Trichostatin A (TSA) und Valproinsäure (VA) wurden beide in DMSO gelöst und die Behandlungsdauer mit den Inhibitoren betrug jeweils 24 h. Die Endkonzentration von TSA betrug 500 nM während die der VA variierte. Über die Behandlungsdauer mit dem entsprechenden Inhibitor wurden die Zelllinien unter den angegebenen Bedingungen inkubiert (s. 2.1.a)

2. *Transiente Transfektion*

2.1 Transiente Transfektion mit JetPei

JetPei™ (PolyPlus-Transfektion, Hamburg) ist ein lineares Polyethylenimin, welches DNA in positiv geladene Partikel komplexiert. Die so gebildeten Partikel binden an die negativ geladenen Proteoglykane und können endozytiert werden.

Für die Transfektion wurden je nach Kulturgefäß eine entsprechende Zellzahl ausgesät und für 24 h inkubiert, um die Zellen adherieren zu lassen. Je nach Zellmenge wurde ein entsprechendes Volumen der DNA-Lösung (1 μ g/ μ l) und des JetPei-Reagenz in einer 150 mM NaCl-Lösung verdünnt. Danach wurde die Jet-Pei-Verdünnung zu der DNA-Verdünnung gegeben, gemischt und kurz abzentrifugiert. Der Ansatz wurde daraufhin für 30 min bei RT inkubiert. Während des Inkubationszeitraums wurde in den Kulturgefäßen das Medium gewechselt. Der Transfektionsansatz wurde nach der Inkubationszeit tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und die Zellen für 48 h inkubiert.

Kulturschalen-durchmesser (Zellzahl)	DNA Menge [μl], (NaCl-Lösung in μl)	Volumen JetPei [μl], (NaCl-Lösung in μl)	Gesamtvolumen Transfektionsansatz (μl)	Volumen Kulturmedium (ml)
6 Well (1×10^5)	3 (97)	7 (93)	200	1,8
10 cm (5×10^5)	7 (493)	15 (485)	1000	9,0
10 cm (3×10^6)	18 (982)	40 (960)	2000	18,0

Tabelle C 1 Ansatz für die Transfektion mit JetPei-Transfektionsreagenz

2.2 Transiente Transfektion mit Oligofectamin

Oligofectamin wurde zur Transfektion von Zellen mit siRNA eingesetzt. RNA Interferenz ist eine gängige Methode zum knock-down von spezifischen Genprodukten. Der Mechanismus welcher zu kleinen doppelsträngigen RNAs, den so genannten *short interfering RNAs* (siRNAs) führt, wird als *RNA interference* (RNAi) bezeichnet. Bei dieser Methode werden direkt siRNAs in die Zelle gebracht und über einen Enzymkomplex einzelsträngige RNA gebildet. Entsprechend ihrer Sequenz wird über einen weiteren Enzymkomplex die Bindung der einzelsträngigen RNA an eine komplementäre mRNA vermittelt. Auf diesen Weg werden Gene „abgeschaltet“, indem die spezifische mRNA markiert und degradiert wird. Dies dient einerseits als Schutz vor Fremd-RNA, z.B. bei viraler Infektion, und andererseits der zellinternen Regulierung.

Das Oligofectamin-Reagenz ist ein positiv geladenes Lipid, welches stabile Komplexe mit Oligonukleotiden bildet. Es kommt zu einer stabilen, nicht toxischen Transfektion mit den Oligonukleotiden über Endocytose.

siRNA-Transfektionen wurden sowohl in 6-Well-Platten als auch in 10 cm Schalen durchgeführt. 24 h vor der Transfektion wurden 1×10^5 pro 6-Well und 5×10^5 Zellen pro 10 cm Schale ausgesät. Für die Transfektion wurde eine Verdünnung der siRNA in Oligofectamin hergestellt. Pro 6 Well wurden $2 \mu\text{l}$ siRNA mit $183 \mu\text{l}$ OptiMem Medium und pro 10 cm Schale wurden $18 \mu\text{l}$ siRNA mit $1650 \mu\text{l}$ OptiMem gemischt. Das Oligofectamin wurde ebenfalls in OptiMem Medium verdünnt. $3 \mu\text{l}$ Oligofectamin in $12 \mu\text{l}$ OptiMem pro 6 Well und $27 \mu\text{l}$ Oligofectamin in $108 \mu\text{l}$ OptiMem pro 10 cm Schale. Die Oligofectaminverdünnung wurde anschließend für 5 min bei RT inkubiert, anschließend zur siRNA-Verdünnung gegeben, gemischt und abzentrifugiert. Nach dem Mischen wurde der Ansatz zur Komplexbildung für 25 min bei RT inkubiert. Während der Komplexbildung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit OptiMem-Medium versetzt. $800 \mu\text{l}$ Medium wurden in ein 6 Well pipettiert und $7,2 \text{ ml}$ in eine 10 cm Schale. Nach der Inkubation wurde der siRNA-Oligofectamin-Ansatz auf die Zellen gegeben und anschließend für 4 h unter Zellkultur-Standardbedingungen inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit $500 \mu\text{l}$ 30% FKS OptiMEM pro 6 Well und $4,5 \text{ ml}$ 30% FKS OptiMem pro 10 cm Schale.

2.3 Transiente Transfektion mit FuGene® Reagenz

FuGene® ist ein nicht-liposomales Reagenz für die Transfektion von eukaryotischen Zellen mit DNA.

Das Aussäen der Zellen erfolgte im entsprechenden Kulturgefäß so, dass nach 24 h Inkubation eine 80 %-ige Konfluenz erreicht wurde. Der Transfektionsansatz setzte sich aus serumfreiem Medium (OptiMEM), dem FuGene®-Reagenz und der DNA zusammen. Das optimale DNA/Reagenz m/v-Verhältnis betrug 1:3 und das Ansatzvolumen war vom Mediumvolumen abhängig. Vor dem Zusammenpipettieren mussten sowohl das serumfreie Medium als auch das FuGene®-Reagenz auf Raumtemperatur vorgewärmt werden. Nach dem Erreichen der nötigen Temperatur wurde zunächst das OptiMEM-Medium in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend die DNA zum Medium pipettiert. Der OptiMEM/DNA-Mix wurde leicht gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Transfektionsreagenz. Hier war darauf zu achten, dass die Pipettenspitze nicht den Rand des Reaktionsgefäßes berührte und das Reagenz direkt in die Flüssigkeit gegeben wird. Der DNA/OptiMEM/FuGene®-Mix wurde resuspendiert und für 5-15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und die Zellen für 48 h inkubiert.

Das FuGene®-Reagenz wurde bei der transienten Transfektion der miRNA-Überexpressionsvektoren zusammen mit den Luziferase-Reportervektoren eingesetzt

Kulturschalen- durchmesser (Zellzahl)	miRNA-GFP- Vektor 1 µg/µl	Renilla-Plasmid (LightSwitch) 1 µg/µl	Luziferase-Plas- mid (pGL3-basic) 100 ng/µl	Volumen FuGene	Gesamt- volumen	Medi- umvolu- men
12 Well (1,5 x 10 ⁵)	0,83 µl	0,5 µl	0,1 µl	4 µl	75 µl	1,0
6 Well (3 x 10 ⁵)	1,66 µl	1,0 µl	0,2 µl	6 µl	200 µl	2,0

Tabelle C 2 Ansatz zur Transfektion mit dem FuGene® Transfektionsreagenz

2.4 siRNA-Transfektion mit INTERFERin®

INTERFERin® ist ein Transfektionsreagenz zur transienten Transfektion von siRNAs. Für eine siRNA-Transfektion wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion in einem entsprechenden Kulturgefäß so ausgesät, dass sie eine Konfluenz von 50 % erreichten. Die Endkonzentration der siRNA betrug pro Ansatz 10 nm. Je nach Zell- und Mediummenge wurde ein entsprechendes Volumen serumfreies Medium (OptiMEM) in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe der siRNA und ein sofortiges resuspendieren des Ansatzes. Danach wurde das Transfektionsreagenz zu dem OptiMEM/siRNA-Ansatz pipettiert und erneut resuspendiert. Der Medium/siRNA/Interferin-Mix wurde anschließend für mindestens zehn und maximal 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel bei den zu transfizierenden Zellen. Nach der Inkubation wurde das entsprechende Volumen des Transfektionsansatzes tröpfchenweise in das Medium pipettiert und für 72 h unter den angegebenen Bedingungen

(s.2.1.a). Im Falle der DNMT1-siRNA wurde die Transfektion nach 48 h unter den gleichen Bedingungen bei bereits transfizierten Zellen wiederholt. Die Inkubation nach der zweiten Transfektion erfolgte wieder über einen Zeitraum von 72 h.

Kulturschalendurchmesser (Zellzahl)	siRNA sense-antisense (pmol)	Volumen IN-TERFERin®	Volumen Transfektionsansatz	Mediumvolumen
6-Well (1,25 x 10 ⁵)	22	4 µl	200 µl	2 ml
6 cm (3 x 10 ⁵)	44	8 µl	400 µl	4 ml
10 cm (1 x 10 ⁶)	132	24 µl	1 ml	10 ml

Tabelle C 3 *Ansatz zur Transfektion mit dem Interferin®-Reagenz*

3. Immunbiologische Methoden

3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung von mikroskopischen Partikeln (Coons et al, 1995) in einem Flüssigkeitsstrom. Ein weiter entwickeltes Verfahren ist die so genannte Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (fluorescenc activated cell sorting), welche zuerst durch Park und Herzenberg 1984 (Park et al, 1984) beschrieben wurde. In diesem Fall wurden die Zellen auf Grund ihrer spezifischen Lichtbrechung und Fluoreszenzcharakteristik voneinander getrennt. Die unterschiedliche Lichtbeugung und Lichtstreuung geben dabei Auskunft über Größe und Granularität der Zellen. Durch Verwendung von Fluorochrom-markierten Antikörpern können die Zellen ebenfalls auf spezifische Expressionsmuster von Oberflächen- oder intrazellulären Proteinen untersucht werden. Bei dieser Methode werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einen Laser vorbeigeleitet, die Fluorochrome durch den Laser angeregt und diese emittieren dann Licht einer bestimmten Wellenlänge. Je höher die Expression des Antigens, desto höher die Anzahl der detektierten Photonen durch den Photomultiplier. Die durchflusszytometrische Untersuchung wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCantoII gemessen. Pro Experiment wurden 10⁵ Ereignisse aufgenommen und anschließend mittels FlowJo 8.6.1-Software analysiert. Pro Ansatz wurden 2x10⁶ Zellen zweimal mit gekühltem FACS-Puffer (je 500 µl) gewaschen und bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 100 µl Endobolin (2,5 mg/ml) aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Endobolin enthält humanes IgG, welches an Fc-Rezeptoren bindet und somit alle unspezifischen Bindestellen für die Fluorophor-konjugierten Sekundäntikörper blockiert. Die Zellen wurden anschließend mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und in 50-100 µl Antikörperverdünnung (in FACS-Puffer) für 30 min auf Eis inkubiert. Bei einer indirekten Färbung wurden die Zellen noch zweimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen, um überschüssigen Primäntikörper zu entfernen. Danach wurden 100 µl der entsprechenden Sekundäntikörper-Lösung zugegeben und es erfolgte erneut eine Inkubation für 30 min auf Eis. Die nicht gebundenen sekundären Antikörper wurden erneut durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt. Bei direkter Färbung erfolgte nach der Antikörperinkubation das zweimalige Waschen. Die gewaschenen

Zellen wurden nach direkter oder indirekter Färbung in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die sekundären Ziegen-anti-Maus Antikörper mit Phycoerythrin konjugiert wurden abschließend 1:300 verdünnt.

3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde zur nukleären Translokation von REST verwendet. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden zunächst eine 12-Well-Platte und die benötigte Anzahl runder Deckgläschen unter Verwendung von UV-Licht für 20-30 min sterilisiert. Während der Sterilisation erfolgte das Auszählen der Zellen und es wurden pro Well 5×10^4 Zellen pro Well auf das Deckgläschen pipettiert. Um Zentralisierungseffekte zu vermeiden wurde das Medium danach auf die Zellsuspension pipettiert. Dabei war darauf zu achten das das Deckgläschen im Well nicht aufschwimmt. Anschließend wurden die Zellen für 24 h unter den angegebenen Bedingungen inkubiert (s. 2.1.a).

Nach der Inkubation konnten die adherenten Zellen für die Färbung verwendet werden. Zum Waschen der Zellen wurde das Medium abgesaugt und 500 µl PBS in das Well pipettiert. Danach wurden die Zellen mit einer 3 %-igen Paraformaldehyd/PBS-Lösung für 15 min bei RT fixiert. Durch zweimaliges waschen wurden die restlichen Bestandteile der Fixierlösung entfernt und es erfolgte die Permeabilisation der Zellen. Dazu wurden 300 µl einer 1 %-igen Triton-X-100/TBS-Lösung in jedes Well pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff und das Blockieren für 20 min bei RT mit einer 3 %-igen BSA/TBS-Lösung. Nach dem Blockieren wurden die Zellen für 1 h bei RT mit dem Erstantikörper (1:300) inkubiert. Dazu wurden die Deckgläschen aus den Kammern der 12-Well-Platte entnommen und mit der Seite der adherenten Zellen nach unten auf Parafilm positioniert. Auf den Parafilm wurden 50 µl Antikörpersuspension/Deckgläschen vorgelegt. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper folgten drei Waschschriffe für 5 min mit BSA/PBS in der 12-Wellplatte. Die Proben wurden anschließend mit dem Fluoreszenz-Zweitantikörper für 45 min im dunkeln inkubiert. Dazu wurden erneut 50 µl Antikörpersuspension (1:300) auf Parafilm vorgelegt. Es folgten wiederum drei Waschschriffe und die Färbung der Zellkerne mit DAPI (1:2000) für 5 min. Nach der DAPI-Färbung wurden die Deckgläschen dreimal für 10 min bei RT im Dunkeln gewaschen. Zur Entfernung der restlichen Salze wurden die Deckgläschen außerdem kurz in ddH₂O gespült, anschließend getrocknet und mit Mowiol 4-88 auf Objektträgern fixiert. Die Proben wurden bis zur Nutzung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.3 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) ist eine Methode zum Nachweis einer direkten oder indirekten Bindung eines Proteins an die chromosomale DNA *in vivo*. Um die spezifische Bindung nachzuweisen wird anschließend eine PCR durchgeführt. Die ChIP vereint somit zwei sehr spezifische Methoden. Die Immunopräzipitation und die PCR. Um das Chromatin mit den gebundenen Transkriptionsfaktoren präzipitieren zu können, werden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Dadurch entsteht eine kovalente Bindung zwischen DNA und Proteinen (Histon und Nicht-Histon). Das Chromatin wird anschließend aus den Zellen isoliert. Durch Scheren wird die DNA in kleine Fragmente zerlegt. Optimal sind Fragmente zwischen 250-1000 bp. Die hier angewandte Methode beruht auf der enzymatischen Restriktion des Chromatins durch *Micrococcus* Endonuklease. Die chromosomale DNA wird an der Linker-DNA zwischen den Nukleosomen verdaut und man erhält so definierte Fragmente zwischen 200-900 bp. Anschließend erfolgt die Aufreinigung der Protein-DNA-Komplexe durch Immunopräzipitation. Wie bei der Immunopräzipitation bereits beschrieben, bindet ein spezifischer Antikörper an den Protein-DNA-Komplex, wodurch man einen Protein-DNA-Antikörper-Komplex erhält. Dieser Komplex kann mit Protein-A gekoppelten magnetischen Kügelchen aus der Lösung isoliert werden. Anschließend wird die kovalente Bindung zwischen Protein und DNA durch Erhitzen auf 95°C erneut gelöst. Dadurch können die DNA-Fragmente aus dem Komplex aufgereinigt werden. Die Analyse, ob eine Protein-DNA-Interaktion im erwarteten Chromatinbereich stattgefunden hat, erfolgt über eine abschließende PCR.

Hier erfolgte die Durchführung der ChIP unter Anwendung des Simple ChIP® Enzymatic Chromatin IP Kits. Die Durchführung folgte mit Abwandlungen nach dem zugehörigen Protokoll. Änderungen gab es unter anderem bei der eingesetzten Zellzahl. Es wurden lediglich zwischen $2,5-3,0 \times 10^7$ statt 4×10^7 Zellen eingesetzt, da die Lyse-Effizienz bei geringerer Zellzahl deutlich höher war. Außerdem wurden die Waschschritte nach der Immunopräzipitation geändert. So erfolgte das Waschen mit *low-* und *high-salt-solution* in einem Volumen von 1,5 ml über einen Zeitraum von 15 min. Zur Quantifizierung der DNA wurde ein qPCR unter den angegebenen Bedingungen von 3.3.9 durchgeführt. Pro PCR-Ansatz wurden wie angegeben 2 µl DNA eingesetzt.

Zur Kontrolle der Restriktion mit der *Micrococcus* Endonuklease, wurde ebenfalls eine Optimierung des Verdauens, wie im Protokoll vorgeschrieben, durchgeführt. Von allen durchgeführten Restriktionen wurde eine Kontrolle entnommen und über die mitgelieferten Spin Columns aufgereinigt. Jeweils 20 µl des verdauten Chromatins wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und somit die Fragmentgrößen überprüft. Als Fragmentgrößen-Standard wurde eine GeneRuler™ 100 bp ladder (Fermentas, St.Leon-Rot, D) mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 90 V durchgeführt. Das aufgereinigte Chromatin wurde am NanoDrop (Wilmington, USA) vermessen, um die Konzentration des verdauten Chromatins zu ermitteln.

3.4 L1CAM-Elisa

Zur Detektion von humanen oder murinen L1CAM in Gewebelysaten wurde ein spezifischer Enzym-linked Immunosorbent-Assay durchgeführt. Dazu wurde zunächst der entsprechende Antikörper an die Oberfläche einer 96-Well-Lochplatte gekoppelt (capture-Antikörper) und zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen für 45 min mit 3 %BSA in 0,05 %Tween-20/TBS inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Lysate in ein Well mit Capture-Antikörper pipettiert. Zur Immobilisierung des L1CAM-Proteins

wurde die Platte mit den Lysaten bei 4°C für eine Stunde inkubiert und anschließend dreimal mit 200 µl 0,05 %Tween-20/TBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl des L1CAM-Pox gekoppelten Detektionsantikörpers und eine erneute Inkubation bei 4°C für eine Stunde. Nach den folgenden drei Waschschrritten mit 0,05 %Tween-20/TBS wurden 100 µl Substratlösung mit dem Chromophor Tetramethylbenzidin in jedes Well pipettiert. Nach 5 minütiger Inkubationszeit wurden zum abstoppen der Reaktion 100 µl 1 N Schwefelsäure zugegeben. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit der Hilfe eines Mikroplattenphotometers bestimmt. Die gemessene Absorptionsintensität ist dabei direkt proportional zur L1CAM-Konzentration in der Lösung.

4. *Biochemische Methoden*

4.1 Herstellung von Zelllysaten

Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe von 1-fach NuPage SDS Laefepuffer in TBS verdünnt. Das SDS führt zur Destabilisierung der Membran und somit zur Lyse der Zellen. Zuerst wurden die kultivierten Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend 250 µl Lysepuffer direkt auf die Zellen pipettiert und für 10 min bei 4°C inkubiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber gesammelt in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Zur weiteren Homogenisierung wurde das Lysat via Ultraschall 15 mal in zwei Durchgängen sonifiziert. Die Ausstosskontrolle des Sonifizierers war auf 90 % und die Zykluskontrolle auf 80 % eingestellt. Die Lysate wurden vor und nach dem Sonifizieren auf Eis gekühlt und zwischen den Durchgängen für min. 30 sec abgekühlt. Nach der Fertigstellung der Lysate erfolgte die Proteinbestimmung mit dem BCA-Protein-Assay und anschließend das Aufkochen der Proben für 5 min bei 95°C.

4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Protein-Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des BCA-Protein-Assays. Der Assay basiert auf einer photometrischen Messung des Farbumschlags auf Grund der Komplexierung einfach reduzierter Kupferionen durch die Bicinchoninsäure in alkalischen Medium. Durch die Proteine in der Lösung kommt es zuvor zu einer Reduzierung der Cu²⁺-Ionen. Um eine Proteinkonzentration der Lysate zu erhalten, wurden standardisierte Proteinlösungen (0-2 mg/ml) mit bekannter Konzentration von Rinderserumalbumin angefertigt. Aus den einzelnen Messungen der Standardlösungen wurde eine Eichgerade erstellt. Mit Hilfe der erhaltenen linearen Funktion der Eichgerade konnten nun die unbekanntenen Proteinkonzentrationen der Lysate ermittelt werden. Für die Absorptionsmessungen wurde zuerst eine 1:50 Verdünnung der BCA-Lösung B in der BCA-Lösung A hergestellt. Für die Messung wurden 2 µl von jedem Standard oder 0,5 µl von der Probe in Triplikaten in ein Well einer 96-Wellplatte pipettiert und 200 µl der BCA-Lösung in das entsprechende Well gegeben. Die Platte wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und danach auf RT abgekühlt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 570 nm im Plattenphotometer. Jede Standardlösung und Lysatverdünnung wurde in Triplikaten gemessen. Die Erstellung der Eichgerade und Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der Software Gen 5.1.

4.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) kann das Molekulargewicht und der Reinheitsgrad von Proteinen bestimmt werden. Dabei werden bei der Gelelektrophorese die Proteine entsprechend ihrer Mobilität in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Im Fall der SDS-Page erfolgt die Auftrennung allein nach dem Molekulargewicht (Shapiro 1967). Proteine besitzen unter nativen Bedingungen je nach Aminosäurekette eine spezifische Eigenladung. SDS kann durch Anlagerung an das Protein diese Eigenladung überdecken und verleiht dem Protein so eine massenabhängige Ladung. Zusätzlich führt SDS zu einer Proteinentfaltung und damit zur Auflösung der Proteinaggregate. Um mögliche Disulfidbrücken zu entfernen, wurde optional während des Denaturierungsvorgang 8% v/v β -Mercaptoethanol zur Probe gegeben. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins, kann sein Laufverhalten durch die Porengröße des Trenngels beeinflusst werden.

Das finale Gel besteht aus zwei Teilen, dem oberen Sammelgel und dem unteren Trenngel. Die Gelteile unterscheiden sich nicht nur im Acrylamidanteil, sondern auch im pH-Wert. Durch die Unterschiede bilden die Proteine beim Übertritt vom Sammelgel ins Trenngel eine scharfe Bande. Im Trenngel erfolgt dann die eigentliche Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Um eine höhere Auftrennung zwischen den Proteinen zu erreichen, muss der Acrylamidanteil entsprechend angepasst werden. Während den Untersuchungen wurden ausschließlich 10%-ige Polyacrylamid Gele verwendet. Die Anleitungen für die Durchführung und das verwendete Puffersystem entstammen dem Protokoll von Laemmli (Laemmli, 1970).

Bestandteile	SDS-Polyacrylamidgel		
	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Sammelgel
Acrylamide/Bisacrylamide mix	5,0 ml	6,7 ml	1,35 ml
3 M Tris-HCl, pH 8.0	2,65	2,65 ml	
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8			2,5 ml
ddH ₂ O	11,3 ml	9,63 ml	6 ml
10 % SDS	200 μ l	200 μ l	100 μ l
10 % APS	65 μ l	65 μ l	100 μ l
TEMED	12 μ l	12 μ l	10 μ l

Tabelle C 4 Volumina der Reagenzien zum Erstellen eines SDS-Polyacrylamidgels.

Für das Trenngel wurden die oben beschriebenen Komponenten gemischt. Dabei erfolgte zuletzt die Zugabe von APS und Temed. Nach kurzzeitigem Mischen wurde der Reaktionsansatz in die vorbereitete Gel-Glasapparatur (BioRad, München, D) überführt. Um einen scharfen Gelabschluss zu erhalten, wurde das noch flüssige Gel sofort mit wassergesättigten Isobutanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde der Alkohol durch mehrmaliges Waschen mit H₂O entfernt. Anschließend wurden die Komponenten des Sammelgels analog zum Trenngel gemischt und das Sammelgel gegossen. In das noch flüssige Sammelgel wurde der Probenkamm eingesetzt. Der Kamm wurde nach der Polymerisation des Sammelgels entfernt und die Taschen mit H₂O ausgewaschen. Das fertige Gel wurde entweder sofort zur Gelelektrophorese verwendet oder mit feuchten Papiertüchern in Folie eingewickelt und bei 4°C gelagert. Für eine Gelelektrophorese wurde das SDS-Gel nach Vorschrift in die Page-Gellapparatur (BioRad, München, D) eingespannt. Die Apparatur wurde mit 1x Laufpuffer befüllt. Zusammen mit den Proben wurden

jeweils 10 µl Molekulargewichtsmarker (Fermentas, Karlsruhe, D) in einer extra Tasche aufgetragen. Pro Proteinprobe wurden je nach Konzentration 20-100 µl Gesamtproteinmenge aufgetragen. Vorher wurden die Proben wie oben beschrieben (s. 2.1.a) mit 4xNuPage Probenpuffer versetzt und aufgekocht. In den ersten 25 min erfolgte die Gelelektrophorese bei konstant 80 V. Bis zum Ende der Auftrennung wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Die Gelelektrophorese wurde beendet, bevor die Lauffront des Bromphenol-Farbstoffs das Gelende erreicht hatte.

4.4 Western Blot

Vor der Detektion von einzelnen Proteinen in Polyacrylamid-Gelen mit spezifischen Antikörpern, müssen die Proteine auf eine Membran transferiert werden, eine Polyvenyldifluorid-Membran. Für den Elektrottransfer von aufgetrennten Proteinen auf die Membran, wurde eine Semi-Dry-Blot-Vorrichtung verwendet. Die Membran wurde zuvor mit Methanol aktiviert und anschließend mit den Filterpapieren in Blotpuffer äquilibriert. Die Blotapparatur wurde in folgender Reihenfolge aufgebaut: Anode - 3 x Whatman Filterpapier – PVDF-Membran – Gel – 3 x Whatman Filterpapier – Kathode.

Der Transfer wurde bei konstant 60 mA pro Blot für 90 min durchgeführt. Nach der Beendigung des Transfers wurde die Apparatur auseinander gebaut und die Membran für 30 min in Blockpuffer bei RT blockiert. Anschließend wurde die Membran mit der Primärantikörper-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die meisten Antikörper wurden in einer Konzentration zwischen 0,5 und 2,0 µg/ml eingesetzt und in Blockmilch verdünnt. Der L1-11A Hybridom-Überstand wurde dagegen 1:1 mit Blockmilch gemischt. Um die überschüssigen nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran 3x für jeweils 15 min in TTBS gewaschen. Nach den Waschschritten wurde die Membran für 30 min bei RT mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Alle Sekundärantikörper wurden in einem 1:1 Gemisch von TBS und Blockpuffer 1:50000 verdünnt. Durch die Wiederholung der Waschschriffe von 3 x 15 min mit TTBS bei RT wurden überschüssige Sekundärantikörper entfernt. Direkt danach erfolgte die Inkubation der Membran mit der Entwicklerlösung. Pro Membran wurde dazu jeweils 1 ml der beiden Detektionslösungen gemischt und die Membran für 5 min bei RT inkubiert. Die Expositionszeit des Röntgenfilms war von der erwarteten Signalstärke abhängig. Für eine quantitative Analyse wurden die entwickelten Röntgenfilme mit der Software TINA 2.09 densitometrisch ausgewertet.

5. *Molekularbiologische Methoden*

5.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist mittlerweile eine Standardreaktion zum Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen oder zur Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente. Da die Amplifikationsrate für die zu bestimmenden Produkte in der exponentiellen Phase vergleichbar ist, kann sie auch für quantitative Zwecke verwendet werden. Die Standard PCR besteht aus 3 Phasen pro Zyklus: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Anlagerung der Primer an die zu amplifizierende DNA und die Elongation der Fragmente. Für die hier durchgeführten Versuche wurde die PCR zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente angewendet.

Für die Standard-PCR wurden deckelbeheizte Thermal Cycler von MJ Research verwendet. PCR-Reakti-

onsansätze wurden mit dem RedTaq™ ReadyMix™ angefertigt. Dieser PCR-Mix enthält außer der Template-DNA bereits alle Komponenten für die PCR. Der Mix ist 2-fach konzentriert und als Matrizen dienten unterschiedliche DNA-Fragmente. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 25 µl und je nach eingesetzter DNA-Menge wurde das entsprechende Volumen H₂O addiert. Die RedTaq-Polymerase wurde zur Amplifikation der alternativen Splicevarianten des REST-Gens verwendet. Eine weitere benutzte Taq-Polymerase war von dem Hersteller Bio&Sell. Der entsprechende PCR-Reaktionsansatz ist ebenfalls dargestellt. Diese Polymerase wurde zur Genotypisierung der transienten Mäuse und Klonierung der miRNA-Genloci.

RedTaq™-Polymerase 1x PCR-Reaktionsansatz

Reagenzien	Volumen
REDTaq™ ReadyMix™	12,5 µl
forward Primer 100 pM	1 µl
reverse Primer 100 pM	1 µl
DNA (100 ng)	x µl
H ₂ O	add 25 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle C 5 Volumina und Reagenzien für einen 1x PCR-Reaktionsansatz mit RedTaq™-Polymerase

Taq-Polymerase von Bio & Sell

Reagenzien	Volumen
Polmerase	0,1 µl
Puffer BD	2,5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
Forward Primer (10 pmol)	2,0 µl
Reverse Primer (10 pmol)	2,0 µl
Template-DNA	0,5 µl
dNTP (je 10 mM)	0,5 µl
H ₂ O	add 25 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle C 6 Volumina und Reagenzien für einen 1x PCR-Reaktionsansatz mit der Taq-Polymerase von Bio & Sell

HotStarTaq DNA Polymerase 1 x PCR-Reaktionsansatz	
Reagenzien	Volumen
HotStarTaq DNA Polymerase	2 U
forward Primer	250 nM
reverse Primer	250 nM
DNA	150 ng
Puffer	1x
H ₂ O	add 50 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle C 7 Volumina und Reagenzien für einen 1x PCR-Reaktionsansatz mit HotStarTaq DNA-Polymerase

5.2 PCR-Programmprofile

PCR-Programm zur Amplifizierung der REST-Splicevarianten

Die PCR wurde mit der RedTaqTM-Polymerase durchgeführt und es wurden die unter B 14.3 angegebenen Primer verwendet. Der PCR-Reaktionsansatz ist in Abschnitt C 5.1 aufgeführt.

Initiationsschritt		35 Zyklen		Extensionsschritt
95°C	95°C	56°C	72°C	72°C
5 min	1 min	30 sec	1 min	10 min

Zur Analyse wurden die PCR-Reaktionsansatz auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese bei 90 V durchgeführt. Anschließend erfolgte die Dokumentation und ggf. die Isolation der PCR-Fragmente aus dem Agarosegel.

PCR-Programm zur Amplifikation der miRNA-Genloci und Genotypisierung

Zur Amplifikation der miRNA-Loci und Genotypisierung wurde eine normale Taq-Polymerase von Bio&Sell eingesetzt. Der PCR-Reaktionsansatz ist in Abschnitt C 5.1 aufgeführt.

Initiationsschritt		30 Zyklen		Extensionsschritt
95°C	95°C	56°C	72°C	72°C
10 min	1 min	30 sec	1 min	10 min

Zur Analyse wurden die PCR-Reaktionsansatz auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese bei 90 V durchgeführt. Anschließend erfolgte die Dokumentation und ggf. die Isolation der PCR-Fragmente aus dem Agarosegel.

Gradienten-PCR zur Bestimmung der Effizienz der ChIP-Primer

Für die Amplifikation der Bindestellenregion in der L1-CAM Promotorregion wurden die unter 1.14.b aufgeführten Primerpaare verwendet. Als Matrizen-DNA wurde ein BAC-Klon mit der vollständigen L1-CAM-Promotorregion benutzt. Zunächst wurde zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur eine Gradienten-PCR mit folgenden Temperaturschritten in °C durchgeführt: 52 - 52,8 - 54,1 - 55,7 - 57,6 - 59,2 - 60,3 - 61,2.

Initiationsschritt		32 Zyklen		Extensionsschritt
95°C	95°C	xx°C	72°C	72°C
3 min	30 sec	1 min	30 sec	5 min

Alle Bindestellenprimer wurden erneut bei einer Primer-Hybridisierungstemperatur von 58°C getestet. Das oben beschriebene Programm blieb dabei unverändert. Die Auswertung erfolgte über eine Gelelektrophorese mit 2%-igem Agarosegel bei 90 V.

PCR-Programm zur Bisulfitsequenzierung

Zur Amplifikation der L1CAM Promoterbereiche von genomischer DNA nach Bisulfitbehandlung wurde die HotStarTaq DNA Polymerase verwendet. Der 1 x PCR Ansatz ist in Abschnitt Die Annealingtemperaturen wurden entsprechend den verwendeten Primerpaaren angewendet: 55°C bei PP1; 58°C bei PP2; 54°C bei PP3.

Initiationsschritt		30 Zyklen		Extensionsschritt
95°C	94°C	55°C, 54°C, 58°C	72°C	72°C
15 min	1 min	45 sec	1 min	10 min

Die Produkte der einzelnen PCR-Reaktionsansätze wurden zur Analyse auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Dokumentation erfolgte die Isolation der einzelnen PCR-Produkte. Um eine höhere Ausbeute zu gewährleisten wurden vor dem Auftrag drei PCR-Reaktionsansätze mit dem entsprechenden Primerpaar und DNA-Template fusioniert.

5.3 RNA-Isolation

RNA-Isolation aus humanen Zellen

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert. Dazu wurden zwischen 1×10^6 – 1×10^7 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden jeweils mit 600 µl RLT-Puffer lysiert. Vorher wurden auf 600 µl RLT-Puffer noch 10 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Um ein sauberes Homogenisat ohne Zellbestandteile zu erhalten wurden QIAshredder-Säulchen verwendet. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die gewonnene RNA wurde hinsichtlich ihrer Reinheit und der Konzentration mit

Hilfe des NanoDrop kontrolliert. Die Reinheit der RNA-Lösung lässt sich aus dem gebildeten Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm berechnen. Bei reinen Lösungen liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0.

RNA-Isolation aus gefrorenem Tumorgewebe

Die isolierten Maustumore wurden mit Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Von dem gesamten Tumor wurde jeweils ein 20-30 mg schweres Stück homogenisiert. Dazu wurde das Tumorstück in MiniSpin-Homogenisationsgefäß mit Metallkugel überführt und 600 μl RLT-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit dazu pipettiert. Anschließend folgten drei Zyklen im Homogenisator. Zwischen jedem Zyklus wurden die Homogenisationsgefäße für 2 min auf Eis gekühlt. Die Aufreinigung der RNA erfolgte wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

Überprüfung der Qualität der aufgereinigten RNA

Um eine Kontamination der Proben mit RNasen auszuschließen und die Qualität der aufgereinigten RNA zu überprüfen, wurde diese in einer Gelelektrophorese qualitativ untersucht. Dazu wurde folgender Ansatz angefertigt:

1x Ansatz für RNA Gelelektrophorese	
	Volumen
2x RNA Ladepuffer	5 μl
RNA	1 μl
H ₂ O	4 μl
Gesamtvolumen	10 μl

Tabelle C 8 Reagenzien und Volumina zur Erstellung eines RNA Gelelektrophoresegels

Der Ansatz wurde für 10 min bei 70°C aufgeköcht. Durch die Denaturierung kommt es zur Separation der einzelnen ribosomalen RNAs. Im Gel sind hauptsächlich die 18S und 28S rRNAs sichtbar. Neben dem kompletten Probenansatz wurde noch ein RNA-Marker auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für 30 min bei 90 V in einem 2%-igem Agarosegel durchgeführt. Die RNA wurde mit Hilfe von Ethidiumbromid angefärbt und zur Auswertung das Gel unter UV-Licht in der Geldokumentation betrachtet. Zur Bestimmung der Konzentration erfolgte UV-Spektroskopische Vermessung bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem NanoDrop.

miRNA-Isolation aus humanen Zellen

Die Isolation von small-RNAs inklusive miRNAs erfolgte nach dem Protokoll des miRNeasy-Mini Kit von Qiagen. Für eine Isolation wurden zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen im 6-Well eingesetzt und die Zellen direkt im Well mit dem QIAzol Lyse Reagenz lysiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben und die Proben wurden bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

5.4 Reverse Transkription von mRNA in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA)

Als Grundlage für spätere quantitative-realttime-PCR-Analysen wurden für alle RNA-Proben zunächst einzelsträngige cDNA (engl.: *complementary*) aus mRNA synthetisiert. Hierzu wurden die Reagenzien aus dem ReverAid™ H Minus Kit von Fermentas eingesetzt. Die verwendeten OligodT-Primer lagern sich komplementär an Poly(A)-Enden von mRNAs an. Somit wurden spezifisch mRNAs in cDNA umgeschrieben. Pro Syntheseansatz wurden 3 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Der erste Master-Mix setzte sich wie folgt zusammen.

1x mRNA-Mix für Reverse-Transkription-PCR	
	Volumen
3 µg RNA	x µl
Oligo dT Primer	1 µl
RNase freies H ₂ O	add 12 µl

Tabelle C 9 Reagenzien und Volumina für einen 1x RT-PCR-Ansatz

Der Ansatz wurde gemischt, kurz an zentrifugiert und für 5 min bei 70°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Mix 1 min auf Eis gestellt und nochmals kurz an zentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe des folgenden Mastermixes.

1x RT- und dNTP-Mastermix	
	Volumen
5x Reaktionspuffer	4 µl
Ribonuclease Inhibitor	1 µl
10 mM dNTPs	2 µl
Gesamtvolumen	7 µl

Tabelle C 10 Reagenzien und Volumina für einen 1x RT-PCR-Ansatz

Zu jedem Ansatz wurden 7 µl des aufgeführten Mastermix gegeben und gut gemischt. Der Reaktionsansatz wurde erneut kurz an zentrifugiert und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe 1 µl Reverse Transkriptase pipettiert. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C über einen Zeitraum von 1 h. Final wurde jeder Probenansatz für 10 min bei 70°C inkubiert, um die Aktivität der Reverse Transkriptase zu stoppen.

Aufreinigung der cDNA über Sephadexsäulchen

Um die synthetisierte cDNA von anderen Komponenten zu trennen (Nukleotide, reverse Transkriptase), wurde der komplette Syntheseansatz über Sephadexsäulchen aufgereinigt. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf der Gel-Filtrationschromatographie. Vor dem Gebrauch wurden die Chromatographiesäulchen für 2 min bei 6.000 U/min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde die komplette Probe aufgetragen und erneut für 1 min bei 6.000 U/min eluiert. Das Säulchen wurde vorher in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und anschließend erfolgte die Bestimmung der Konzentration am NanoDrop™.

5.5 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR ähnelt im Prinzip der normalen Endpunkt-PCR. Der einzige und entscheidende Unterschied ist jedoch, dass hier nach jedem Zyklus eine Messung der Menge der Amplifikationsprodukte erfolgt. Gemessen wird in diesem Fall die Fluoreszenz eines interkalierenden Farbstoffs, SYBR®-Green I. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA. Da nach jeder Amplifikationsrunde die Zahl der doppelsträngigen DNA-Moleküle steigt, nimmt nach jeder Runde die Fluoreszenz proportional zur Produktmenge zu. Eine Unterscheidung zwischen dem spezifischen Produkt und den nicht erwünschten Produkten ist durch Schmelzkurvenanalyse möglich. Während der Schmelzkurvenanalyse werden doppelsträngige Produkte über einen bestimmten Temperaturbereich so lange aufgeheizt bis sie den Schmelzpunkt T_M erreicht haben. Danach liegen sie als Einzelstränge vor und die Fluoreszenz nimmt ab. Die resultierende Fluoreszenzabnahme wird detektiert und die Produkte können durch eine eindeutige Schmelztemperatur identifiziert werden. Es wurden die Primerpaare ausgewählt, bei denen nur ein Produkt entsteht.

Die Quantifizierung der PCR beruht auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwerts, dem sogenannten Threshold-Cycle oder C_T -Wert. Der C_T -Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Parallel zum C_T -Wert wird zur Bestimmung der Template-Ausgangsmenge ein so genannter externer oder interner Standard festgelegt. Für einen externen Standard werden bei jeder PCR bekannte Template-Ausgangsmengen amplifiziert und eine Standardkurve erstellt. Anhand derer kann durch einen bestimmten C_T -Wert auf die DNA-Ausgangsmenge geschlossen werden. Bei dieser Arbeit wurde ein interner Standard zur Quantifizierung verwendet. Als interne Standards gelten unterschiedliche sogenannte Haushaltsgene wie β -Aktin, GAP-DH (Glycerinaldehyd-Phosphat Dehydrogenase) oder auch α -Tubulin. Bei den Haushaltsgenen geht man von einem konstanten Expressionslevel in einer Zelllinie aus. Für diese Arbeit wurde β -Aktin als interner Standard verwendet.

Für die relative Quantifizierung wurde zunächst der ΔC_T -Wert aus den Mittelwerten der C_T Werte des zu quantifizierenden Gens und β -Aktin bestimmt:

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

Der Standard Fehler des ΔC_T -Wertes berechnet sich aus den jeweiligen Standard Fehlern von β -Aktin

und des zu quantifizierenden Gens: $STABW_{\Delta C_T} = \sqrt{(STABW_{\beta\text{-Aktin}})^2 + (STABW_{\text{Gen}})^2}$

Die Menge des zu quantifizierenden Gens wurde im Bezug zu einer endogenen Referenz, (z.B. Wildtyp Zellen, Kontrollpatient) normalisiert: $2^{-\Delta C_T}$ wobei $\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{wildtyp})} - \Delta C_{T(\text{behandelte Zellen})}$

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

Der Gesamtfehler ergibt sich durch folgende Rechnung

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

Ein qRT-PCR-Ansatz bestand aus folgende Komponenten:

1x qRT-PCR-Ansatz	
	Volumen
2x SYBR [®] -Green PCR Master Mix	12,5 µl
cDNA (10 ng)	x µl
forward Primer	1 µl
reverse Primer	1 µl
H2O	add 25 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle C 11 Reagenzien und Volumina für einen 1x qRT-PCR-Ansatz mit 2x SYBR[®]-Green PCR Master Mix

Die MethyLight-Reaktion erfordert die Verwendung einer TaqMan[®]-Sonde und unterscheidet sich demnach von einem qRT-PCR-Reaktionsansatz mit SYBR[®]-Green. Als Template-DNA wurde in allen Ansätzen bisulfitmodifizierte DNA eingesetzt. Unmodifizierte DNA diente lediglich als Negativkontrolle für die verwendeten Primer und Hybridisierungssonde. Ein einfacher qRT-PCR-Reaktionsansatz ist hier dargestellt.

1x TaqMan [®] qRT-PCR-Ansatz		
	Volumen	Endkonzentration
2x TaqMan [®] PCR Master Mix	15 µl	1x
Bisulfit-DNA	10 µl	50 ng
forward Primer	4,5 µl Von Mix aus beiden Primern	300 nm
reverse Primer	und Sonde	300 nm
TaqMan [®] -Sonde		100 nm
H2O	add 30µl	
Gesamtvolumen	30 µl	

Tabelle C 12 Reagenzien und Volumina für einen 1x qRT-PCR-Ansatz mit 2x TaqMan[®]-Green PCR Master Mix

Das verwendete Programm zur qRT-PCR von SYBR[®]-Green oder TaqMan[®]-basierender Assays ist hier abgebildet

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

5.6 DNA Isolation aus humanen Zellen

Isolation der genomischen DNA zur Amplifikation der miRNA-Loci

Die Isolation der genomischen DNA aus der humanen EK-Zelllinie ECC1 erfolgte nach dem Protokoll des AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit. Pro Ansatz wurden zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden direkt im Well mit 350 μ l RLT-Puffer lysiert und das Lysat anschließend in eine QIAshredder Zentrifugationsröhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 U/min für eine Minute in einer Tischzentrifuge. Das homogenisierte Lysat wurde anschließend in AllPrep DNA Zentrifugationsröhrchen transferiert und erneut bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Ab diesem Schritt wurde entsprechend dem Protokoll mit der gebundenen genomischen DNA im AllPrep DNA Röhrchen weiter gearbeitet. Zunächst wurden 500 μ l AW1 Waschpuffer in das Röhrchen pipettiert und für 1 min bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem AW2 Waschpuffer wiederholt. Zur Elution der genomischen DNA wurde das Zentrifugationsröhrchen in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 50 μ l Elutionspuffer direkt auf die Membran pipettiert und alles für zwei Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde ein Zentrifugationsschritt durchgeführt und der ganze Elutionsvorgang ein zweites Mal wiederholt. Die Konzentration der genomische DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop bestimmt und bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert.

Isolation der genomischen DNA zur Bisulfitbehandlung

Die benötigten Zellen wurden zunächst wie bereits beschrieben (s. 2.1.a) mit PBS/EDTA vom Boden Des Zellkulturgefäßes abgelöst und durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde umgehend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Die Aufreinigung der DNA erfolgte durch die Kollegen um Heidi Fiegl in Innsbruck und wurde nach dem Protokoll Des DNeasy blood & tissue Kit durchgeführt. Danach wird das Zellpellet in 200 μ l PBS und 20 μ l Proteinase K resuspendiert und gevortext. Anschließend weitere 200 μ l Puffer AL zu dem Ansatz pipettiert und resuspendierten Zellen wurden anschließend für 10 Min bei 56°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 μ l 100 %-igen Ethanol und ein kurzes Vortexen des Ansatzes. Die komplette Suspension wurde in DNeasy Mini Zentrifugationsröhrchen überführt und für 1 Min bei 8.000 U/min abzentrifugiert. Es erfolgten zwei aufeinanderfolgende Waschstschritte mit den Puffern AW1 und AW2 und ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt zum Trocknen des Röhrchens. Der Durchfluss nach jeder Zentrifugation wurde verworfen. Zum Eluieren wurde das Zentrifugationsröhrchen in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 100 μ l AE-Puffer direkt auf die Membran pipettiert und alles für zwei Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde ein Zentrifugationsschritt durchgeführt und der ganze Elutionsvorgang ein zweites Mal wiederholt. Die Konzentration der genomische DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop bestimmt und bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert.

Zur Isolation aus Tumorgewebe wurde eine Mikrosektion durchgeführt und die genomische DNA wurde nach dem gleichen Protokoll für Gewebe isoliert.

Vorbereitung der Mausgewebeproben zur Genotypisierung

Zu der Gewebeprobe im Reaktionsgefäß wurden 45 µl Tail-Puffer und 5 µl Proteinase K (10 µg/µl) pipettiert. Der Ansatz wurde ÜN bei 56°C im Inkubator inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abzentrifugiert, nochmals 300 µl H₂O dazu pipettiert und die Probe bei 95°C denaturiert. Die DNA wurde direkt in einer PCR eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

5.7 Herstellung bisulfitmodifizierter DNA

Die Behandlung der genomischen DNA erfolgte nach der Anleitung des EZ DNA-Methylation-Gold Kits und wurde ebenfalls durch den Kooperationspartner Heidi Fiegl durchgeführt. Von der isolierten DNA wurden 20 µl (200-500 ng) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 130 µl CT-conversion-reagent zu der Probe pipettiert. Nach resuspendieren der Probe erfolgten mehrere Erwärmungszyklen.

Temperatur	Dauer
98°C	10 min
64°C	2,5 h
4°C	Bis 20 h

Tabelle C 13 *Erwärmungszyklen zur Ertsellung bisulfit modifizierter DNA.*

Im nächsten Schritt wurden 600 µl M-Binding-Buffer in ein Zymo-Spin-IC Röhrchen vorgelegt, die Probe dazu pipettiert und resuspendiert. Anschließend erfolgte das durchzentrifugieren der Flüssigkeit bei 13000 U/min für 30 sec. Der Durchfluss wurde verworfen und das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In das Säulchen wurden 100 µl M-Waschpuffer pipettiert, abzentrifugiert und danach 200 µl M-Desulphonationspuffer dazugegeben. Das Säulchen wurde für 15-20 Min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Desulphonationspuffer aus dem Säulchen abzentrifugiert (13000 U/min, 30 sec) und zweimal mit dem M-Waschpuffer gewaschen. Danach wurde das Säulchen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA eluiert. Zur Elution wurden 20 µl M-Elutionspuffer direkt auf die Membran in der Säule pipettiert, für 5 Min bei RT inkubiert und danach für 30 sec bei 13000 U/min abzentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wurde entsprechend der nächsten Verwendung verdünnt und bei -80°C eingefroren.

5.8 Aufreinigung und Isolation von DNA

Zur Extraktion und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Im ersten Schritt wurde das DNA-Fragment mit Hilfe von UV-Licht ausgeschnitten und das Gelstück in ein steriles 1,5-2,0 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das dreifache Volumen des Gelstückgewichts QG-Puffer in das Reaktionsgefäß pipettiert (100 mg - 100 µl) und das Gelstück bei 50°C über einen Zeitraum von 10 min gelöst. Um die DNA zu isolieren wurde die Probe in eine QIAquick Zentrifugationsröhrchen überführt und für eine Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert. Die gebundene DNA wurde anschließend mit 500 µl QG-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen. Zur Entfernung der restlichen Flüssigkeit wurde das Röhrchen erneut zentrifugiert und in ein neues steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution d.er DNA wurden 30-50 µl ddH₂O direkt auf die Membran pipettiert, das Röhr-

chen für eine Minute bei RT inkubiert und anschließend für eine Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert.

5.9 Ligation von PCR-Fragmenten und den Zielvektoren

3'-Überhang-Ligation

Die 3'-Überhang-Ligation erfolgte nach dem Protokoll des Qiagen® PCR Cloning Kit und wurde bei der Bisulfitequenzierung eingesetzt. Die aufgereinigten PCR-Produkte aus den entsprechenden PCR-Reaktionsansätzen wurden mit dem pDrive Cloning Vector ligiert. Für die Ligation wurden 25 ng PCR-Produkt eingesetzt. Der gesamte Ligationsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen.

Komponente	Volumen/Reaktion
pDrive Cloning Vector (50 ng/μl)	1,0 μl
PCR-Produkt (25 ng)	X μl
Ligation Master Mix, 2x	5 μl
dH ₂ O	x μl
Gesamtvolumen	10 μl

Tabelle C 14 1x Ligationsansatz für eine 3'-Überhang-Ligation mit dem pDrive Cloning Vektor.

Nach dem Zusammenpipettieren wurde der Ansatz kurz anzentrifugiert und für zwei Stunden 16°C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz direkt zur Transformation von Kompetenten *E.coli*-Zellen eingesetzt oder bis zu weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

sticky-End-Ligation

Sticky-End-Ligation wurde bei der Klonierung der miRNA-Gene verwendet. Die aufgereinigten und enzymatisch verdauten PCR-Produkte wurden mit dem ebenfalls verdauten pCMV-MIR Vektor ligiert. Die PCR-Produkte und der Zielvektor wurden in einem molekularen Verhältnis drei zu eins eingesetzt. Vor dem Pipettieren des Reaktionsansatzes wurde die Plasmid Stocklösung auf 50 ng/μl verdünnt. Ein typischer Ligationsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen.

Komponente	Volumen/Reaktion
pCMV-MIR (50 ng)	1,0 μl
PCR-Produkt	x μl
T4-DNA-Ligase	0,5 μl
Ligationspuffer, 10x	1 μl
dH ₂ O	x μl
Gesamtvolumen	10 μl

Tabelle C 15 1x Ligationsansatz für eine sticky-end Ligation mit T4-DNA-Ligase.

5.10 Plasmidisolation

Abhängig von der benötigten DNA-Menge wurde entweder eine Mini-Preparation (ca. 20 µg Plasmid-DNA) oder eine Maxi-Preparation durchgeführt (ca 800-1000 µg Plasmid). Für die Preparation wurden Bakterien einer einzelne Kolonie von der Kultivierungsplatte in ein entsprechendes Volumen LB-Medium mit Antibiotikum überführt und ÜN bei 37°C geschüttelt.

Mini-Preparation von Plasmid-DNA

Für die Isolation geringer Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Vor der Aufreinigung wurden 5 ml Bakterienkultur abzentrifugiert und das Pellet entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Das QIAprep Miniprep Protokoll basiert auf einer alkalischen Lyse von Bakterienzellen, gefolgt von einer Adsorption der DNA durch eine Silikatmembran bei hohen Salzkonzentrationen. Die Bedingungen während der Lyse stellen sicher das nur DNA adsorbiert wird und andere Bestandteile wie RNA, zelluläre Protein und Metabolite ausgewaschen werden. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl ddH₂O eluiert.

Maxi-Prep von Plasmid-DNA

Zur Isolation von größeren Plasmid-DNA-Mengen wurde eine Qiagen Maxi-Prep-Kit verwendet. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde vorwiegend zu Transfektionen eingesetzt.

Das Plasmid-Aufreinigungsprotokoll basiert auf einer modifizierten alkalischen SDS-Lyse, gefolgt von einer Anionen-Austausch-Chromatographie bei niedrigen Salzkonzentrationen und einem pH-Wert zwischen 7,0-8,5. Andere Moleküle wie RNA, Proteine, Farbstoffe oder niedrig molekulare Komponenten werden durch einen Waschschrift mit mittleren Salzkonzentrationen entfernt. Durch einen Zentrifugations-schritt bei 5.000 U/min (JLA 10.500 Rotor) für 15 min und 4°C wurden die Bakterien zunächst pelletiert. Das Pellet wurde 10 ml P1 Puffer resuspendiert und zur Zellyse anschließend 10 ml P2 versetzt. Die Zellsuspension wurde zur vollständigen Lyse vier bis sechsmal invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Zur Neutralisation wurden 10 ml P3-Puffer zum Lysat pipettiert, durch erneutes invertieren gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat bei 9000 U/min (JA 25.50 Rotor) für 45 min und 4°C zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde parallel die Chromatographiesäule vorbereitet (aus dem Kit) und mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand über einen Faltenfilter auf die Säule überführt. Der Durchfluss erfolgt allein durch Gravitation und es kommt zu Bindung der DNA an die Membran. Die gebundene DNA wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen und wurde mit QF-Puffer mit einer hohen Salzkonzentration eluiert. Zur Präzipitation der DNA wurden 0,7 Volumen Isopropanol bei RT dazugegeben und das Gemisch bei 11.000 U/min (JA 25.50 Rotor) bei 10 min und 4°C zentrifugiert. Zum Auswaschen von überschüssigen Salzen wurde das DNA-Pellet mit 5 ml 70 %-igen Ethanol gewaschen und wie vorher beschrieben sedimentiert. Das Pellet wurde danach luftgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst. Anschließend erfolgte die Vermessung der Plasmid-DNA am NanoDrop bei 260 nm.

5.11 Enzymatische Restriktion von DNA

Der Sequenzspezifische Verdau von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten erfolgte durch die Verwendung von Restriktionsenzymen. Pro μg DNA wurden 2 Einheiten Enzym eingesetzt und der entsprechende Puffer in einem Gesamtvolumen von 25 μl eingesetzt. Je nach analytischen oder preparativen Verdau wurde der Ansatz für 1,5 h bzw. 2,5 h bei 37°C inkubiert. Es wurde darauf geachtet das das Volumen der Restriktionsenzyme nicht mehr als 1/10 des Reaktionsvolumens ausgemacht, um inhibierende Effekte des Glycerols zu verhindern. Die verdaute DNA wurde anschließend über ein 1 %-iges Agarosegel in einer Gelelektrophorese aufgetrennt.

5.12 TaqMan[®]-miRNA-Expressionarray

Mit Hilfe des 384-Well miRNA TaqMan[®] konnte die Expression von 381 miRNAs inklusive Kontrollen nachgewiesen werden. Der Assay basiert auf der TaqMan[®]-qRT-PCR-Reaktion und in jedem Well befinden sich das entsprechende spezifische Primerpaar mit Hybridisierungssonde. Dadurch ist es möglich die Expression einer miRNA in einem einzelnen Well zu detektieren. Im ersten Schritt erfolgte eine reverse Transkription der 384 miRNAs unter der Verwendung des Megaplex[™]-Primerpools. Dazu wurden folgende Komponenten zunächst zu einem Mastermix zusammenpipettiert.

Reaktionskomponenten	Volumen/Reaktion
Megaplex [™] RT Primer 10 x	0,8 μl
dNTPs mit dTTP (100 mM)	0,2 μl
MultiScribe [™] Reverse Transkriptase	1,5 μl
10x RT Puffer	0,8 μl
MgCl ₂ (25 mM)	0,9 μl
RNase Inhibitor (20 U/ μl)	0,1 μl
Nuklease freies Wasser	0,2 μl
Gesamtvolumen	4,5 μl

Tabelle C 16 Reagenzien und Volumina für eine 1x Reverse Transkriptase Reaktion

Die Komponenten wurden invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und 4,5 μl MasterMix in ein PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurden 350 ng miRNA dazugegeben ,der Ansatz mit H₂O auf 7,5 μl aufgefüllt und die Reverse Transkription unter folgenden Bedingungen.

	40 Zyklen		Inaktivierung
	16°C	42°C	50°C
	2 min	1 min	1 sec
			85°C
			5 min

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren oder umgehend in dem Preamplifikations-Reaktion eingesetzt. Für die Preamplifikation wurden 2,5 μl Der cDNA und 22,5 μl des PreAmp Reaktions-Mix in ein neues 1,5 ml Reaktuinsgefäß pipettiert. Der Preamplifikations Reaktionsmix setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen.

Reaktionskomponenten	Volumen/Probe
TaqMan® PreAmp MM 2x	12,5 µl
Megaplex™ Preamp Primer 10x	2,5 µl
nukleasefreies H ₂ O	7,5 µ
Gesamtvolumen	22,5 µl

Tabelle C 17 Reagenzien und Volumina für einen 1x Preamplifikationsansatz.

Zum Durchmischen wurde das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Danach wurden jeweils 22,5 µl des PreAmp-MM in ein PCR-Tube vorgelegt und 2,5 µl cDNA der entsprechenden Probe dazupipettiert. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min auf Eis inkubiert und die Preamplifikation durchgeführt.

Halten	Halten	Halten	12 Zyklen	Halten
95°C	55°C	72°C	95°C	99°C
10 min	2 min	2min	15 sec	4 min
				10 min

Nach der Preamplifikation wurden die Proben bis zur weiteren Nutzung bei -80°C eingefroren und unmittelbar vor der Analyse via 384-Well-Expressionarray mit TE-Puffer verdünnt und eingestellt. Zur Durchführung des Assays wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert.

Reaktionskomponenten	Volumen/Platte
TaqMan® Universal MM 2x	450 µl
Megaplex™ RT-Produkt	6 µl
nukleasefreies Wasser	444 µl
Gesamtvolumen	900 µl

Tabelle C 18 Reagenzien und Volumina für eine 384-Lochplatten basierende TaqMan®-qRT-PCR zur Detektion von *microRNAs*

Von dem Mix wurden jeweils 100 µl in jede Öffnung der Platte pipettiert und die Platte anzentrifugiert. Die RT-PCR wurde anschließend unter den vorprogrammierten Einstellungen durchgeführt.

D Ergebnisse

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass das Zelladhäsionsmolekül L1CAM von verschiedenen epithelialen Tumoren überexprimiert wird (Gavert et al., 2005; Fogel et al., 2003; Boo et al., 2007; Ben et al., 2010). Ursprünglich wurde das Molekül als ein neuronales Zelladhäsionsmolekül identifiziert und heute ist bekannt, dass es dort eine fundamentale Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems spielt (Hlavin et al 1991).

In adulten somatischen, nicht neuronalen Gewebe kann L1CAM nur sehr schwer oder gar nicht nachgewiesen werden. Eine Veränderung des L1CAM Expressionsmusters ist bei der Bildung einer Neoplasie, der sog. neoplastischen Transformation, und der Weiterentwicklung zu einem Tumor zu beobachten. Neben Gewebe neuronalen Ursprungs konnten in den letzten Jahren so auch einige Tumorentitäten identifiziert werden, welche eine starke L1CAM Überexpression zeigen (Fogel et al., 2003b; Fogel et al., 2004; Allorry et al., 2005; Gavert et al., 2005; Boo et al., 2007; Sebens Muerkoster et al., 2007). Die entartete L1CAM-Expression, welche auf einzelne Areale des Tumors beschränkt ist oder sich über den vollständigen Tumor erstrecken kann, ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Offen bleibt die Frage, durch welche Prozesse L1CAM reguliert wird und ob die zellulären Ereignisse zu einer gezielten Induktion der L1CAM-Expression und somit zu einer schlechteren Prognose führen.

Das L1CAM Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert, umfasst ca. 25 kb und setzt sich aus 28 Exons zusammen. In humanen Zellen existieren alternative Spleißformen des L1CAM-Transkripts. Die bekannteste Form, neben der Volllänge-Variante, ist dabei die sogenannte Tumorvariante. Dieser Variante fehlen die zwei Miniexons 2 und 27. Welche Rolle diese Form bei der Tumorprogression spielt konnte bisher nicht geklärt werden. Krüger et al. konnten jedoch in ersten Experimenten nachweisen, dass die Expression der vollständigen Spleißvariante zu einer erhöhten Zellmigration führt (Hauser et al 2011).

Neueste Untersuchungen der Regulation von L1CAM bestätigten, dass L1CAM durch zwei funktionelle Promotoren reguliert werden kann (Pfeifer et al., 2011). Wie bereits in frühen Arbeiten an Maushirnen und N2A Neuroblastomzellen zu sehen war (Kohl et al., 1992), ist ein Transkriptionsstart innerhalb des Exons 1 lokalisiert. Die vorgeschaltete Region umfasst dementsprechend den ersten identifizierten Promoter. Mit Hilfe eines Mausmodells wurde ein weiteres Promotorelement entdeckt. Dieses regulative Element ist mehr als 10 kb von Exon 1, vor dem nicht-translatierenden Exon 0 lokalisiert (Kallunki et al 1997).

Trotz dieser Erkenntnisse ist unklar, ob und wie diese regulativen Elemente in die Expression von L1CAM eingreifen und zu einer massiven Hochregulation in Tumorzellen beitragen.

1. Charakterisierung von Zelllinien aus dem EK

Um die in dieser Arbeit verwendeten EK-Zelllinien zu charakterisieren, wurden sie auf die Expression von L1CAM untersucht. Neben der Feststellung des L1CAM Expressionslevels, wurde ebenfalls die Expression von diversen Transkriptionsfaktoren und definierten EMT-assoziierten Markern untersucht. Soweit möglich, wurde die Expression der einzelnen Gene sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene analysiert.

1.1 L1CAM-Oberflächenexpression bei EK-Zelllinien

In Abbildung D1 ist die Oberflächenexpression von L1CAM in 13 EK-Zelllinien nach FACS-Analyse dargestellt. Die höchste Expression konnte bei den Zelllinien Hec1B, SNGII und SPAC1L detektiert werden. Eine starke L1CAM-Expression zeigen ebenfalls die Zelllinien MFE319, Hec155 und SNGM. Dagegen zeigen die Zelllinien EN1, Hec1A, AN3CA und MFE296 keine L1CAM Oberflächenexpression. Zusätzlich war bei 3 der 13 Zelllinien ein schwaches bis mittleres L1CAM Expressionslevel nachweisbar.

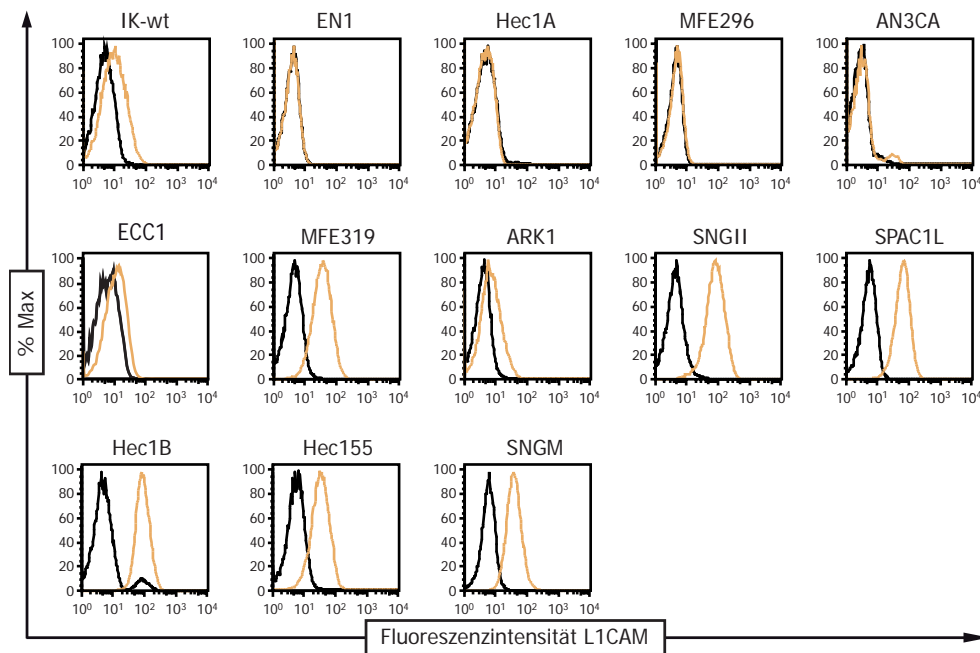


Abbildung D 1 FACS-Analyse der Oberflächenexpression von L1CAM bei EK-Zelllinien. Dazu wurden von jeder Zelllinie 3×10^5 Zellen analysiert. Für die Analyse wurden Zellen zwischen 70-90% Konfluenz verwendet. Um dies zu gewährleisten wurden 1×10^6 Zellen in eine 75 cm^2 Zellkulturschale ausgesät und für 48h unter Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert. Die Ektodomäne des L1CAM-Moleküls wurde mittels mAb L1-11A detektiert. Die schwarze Kurve gibt die gam-PE Zweitantikörperkontrolle wieder; die gelbe Kurve stellt das Signal für die spezifische L1CAM-Färbung dar.

1.2 Charakterisierung der L1CAM-Proteinexpression in EK-Zelllinien

Neben der Oberflächenexpression wurde auch die Gesamtproteinmenge von L1CAM in den EK-Zelllinien untersucht. Parallel dazu wurden die Proteinlevel der Transkriptionsfaktoren REST (RE-1 silencing transcription factor) und β -catenin bestimmt. Außerdem wurde die Expression des epithelialen Markers E-cadherin analysiert (s. Abb. D2). Durch das Überprüfen der Expressionslevel der beiden Transkriptionsfaktoren sollte geklärt werden, ob eine Korrelation zwischen dem L1CAM Expressionslevel und dem der Transkriptionsfaktoren besteht. In Abb. D2 wird jedoch deutlich, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der L1CAM- und REST/ β -catenin-Expression besteht. Während die REST-Proteinmenge in allen getesteten Zelllinien nahezu identisch ist, variiert die β -catenin Proteinexpression. β -catenin wird sowohl von den zwei L1CAM-defizienten Zelllinien ECC1 und Hec1A, als auch von den zwei L1CAM positiven Zelllinien SNG II und SNG M stark exprimiert.

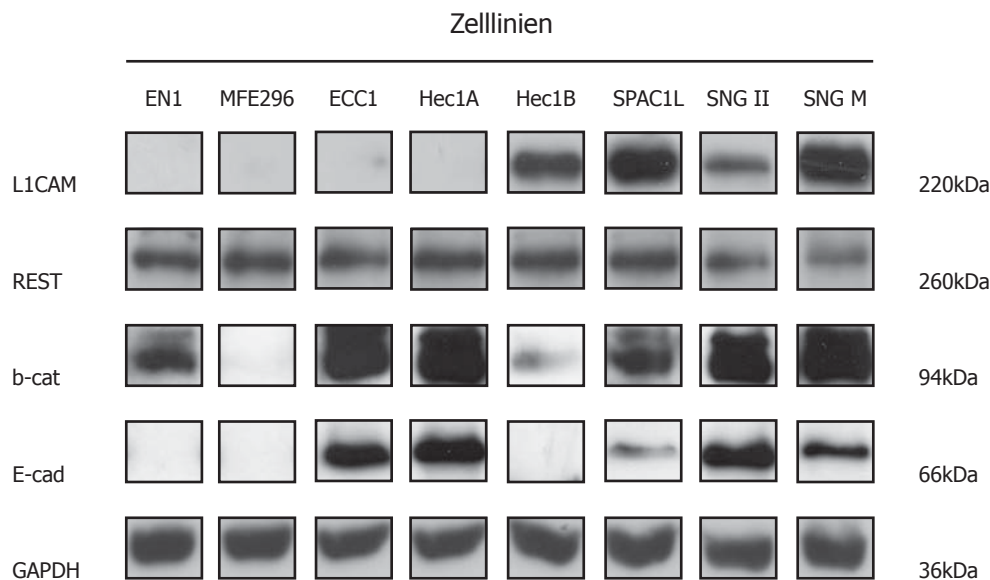


Abbildung D 2 Charakterisierung der L1CAM-Proteinexpression. Western Blot Analyse zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge aus Lysaten der unterschiedlichen Zelllinien. Zur Detektion wurden die Membranen mit Antikörpern gegen L1CAM, REST, β -catenin (b-cat) und E-cadherin (E-cad) überprüft. Als Ladekontrolle wurde ein GAPDH Antikörper verwendet.

Für E-cadherin konnte ein ähnliches Expressionsmuster wie für β -catenin festgestellt werden. Die Co-Expression der beiden Proteine ist ein Hinweis für ihre Funktion bei der Bildung und Aufrechterhaltung von adhärenenten Verbindungen bei epithelialen Zellen. E-cadherin ist als Zell-Adhäsionsmolekül ein epitheliales Markermolekül und involviert in den EMT-Prozess von Zellen. Als Kontrolle für eine gleich aufgetragene Proteinmenge diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Das Enzym spielt eine zentrale Rolle beim Ablauf der Glykolyse und wird ubiquitär von allen Zellen exprimiert.

1.3 Charakterisierung der EK-Zelllinien auf mRNA-Level

Zur Bestätigung der Proteindaten wurden EK-Zelllinien hinsichtlich des mRNA-Gehalts einzelner Gene analysiert. Dies erfolgte über qRT-PCR mit SYBR-green® als Detektionsfarbstoff. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus den entsprechenden Zelllinien isoliert und anschließend für eine cDNA-Synthese eingesetzt. Zur Detektion der gewünschten Gene wurden genspezifische Primerpaare mit einer Produktgröße von ca. 120 bp entworfen.

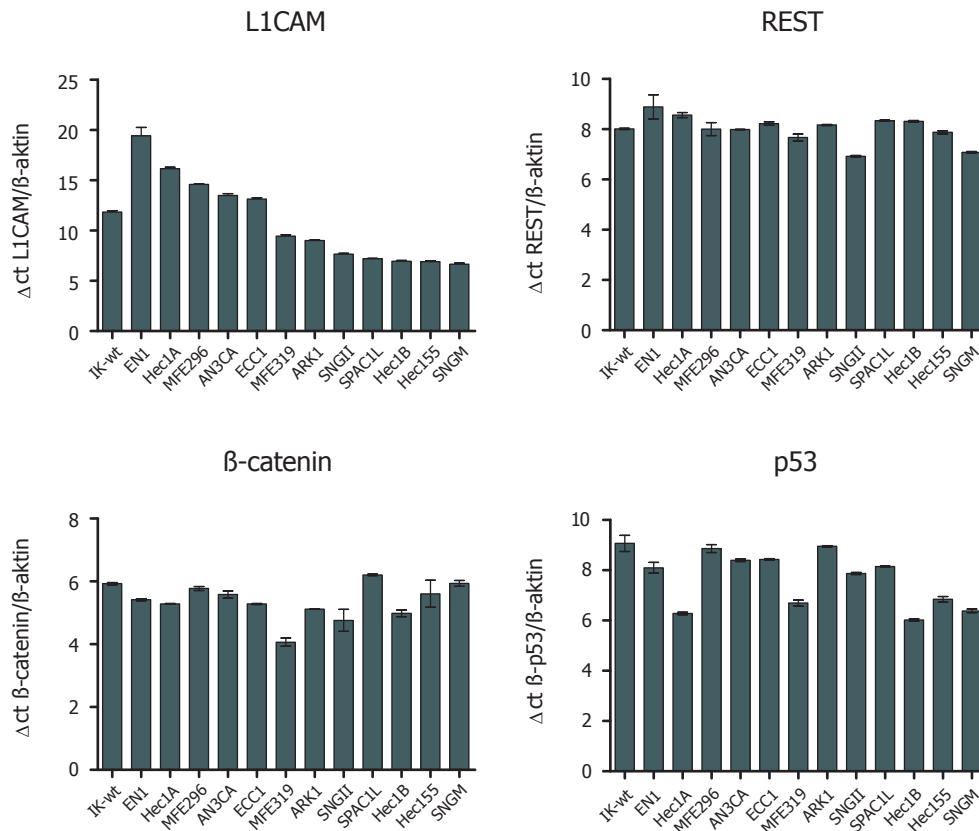


Abbildung D 3 qRT-PCR-Analyse der mRNA-Level von L1CAM, REST, β -catenin, p53 bei den EK-Zelllinien. Die aus den Zelllinien isolierte Gesamt-RNA wurde in cDNA konvertiert. Anschließend wurde eine qRT-PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Dargestellt ist der Δct -Wert zwischen dem Zielgen und β -aktin. Ein niedriger Wert bedeutet eine höhere Expression.

Im Einzelnen wurden die mRNA-Level von L1CAM, den Transkriptionsfaktoren REST, β -catenin, p53 (s. Abb. D3) sowie den EMT-Markern Vimentin, E-cadherin, SNAIL und Slug (s. Abb. D4) analysiert. Bei SNAIL und Slug handelt es sich ebenfalls um Transkriptionsfaktoren. Beide gehören zur Familie der SNAI-Transkriptionsfaktoren und führen über die Repression von E-cadherin zur Induktion des EMT-Prozesses (Peinado et al., 2007). Für alle getesteten Transkriptionsfaktoren konnte eine Bindestelle im L1CAM-Promoter durch in silico-Analyse identifiziert werden (Pfeifer et al., 2010). Durch die Charakterisierung sollen erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von L1CAM und den einzelnen Transkriptionsfaktoren gewonnen werden.

In Abbildung D3 sind die mRNA Level als Δ ct-Wert dargestellt. Als ubiquitär exprimiertes Gen dient β -aktin als interner Standard bei der qRT-PCR. Der ct-Wert (cycle threshold) beschreibt, bei welchen Zyklus die Kurve des Fluoreszenzsignals erstmals exponentiell über dem Hintergrundsignal ansteigt. Die Expression des Zielgens ist umso höher, desto kleiner der Δ ct-Wert zu β -aktin ist. Für L1CAM konnte eine Korrelation zwischen der mRNA- und der L1CAM Oberflächenexpression (s. Abb. D1) sowie der Gesamtproteinmenge in den untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (s. Abb. D2). Die vier Zelllinien ohne detektierbare Oberflächenexpression (EN1, Hec1A, MFE296 und AN3CA), haben auch den geringsten mRNA Level. Dagegen konnte bei den Zelllinien mit der höchsten L1CAM Oberflächenexpression ebenfalls ein hoher mRNA-Level nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Zellen mit starker L1CAM Expression, besitzen Zellen mit einer schwachen, aber nachweisbaren Oberflächenexpression, ein dementsprechend niedrigeres mRNA-Level.

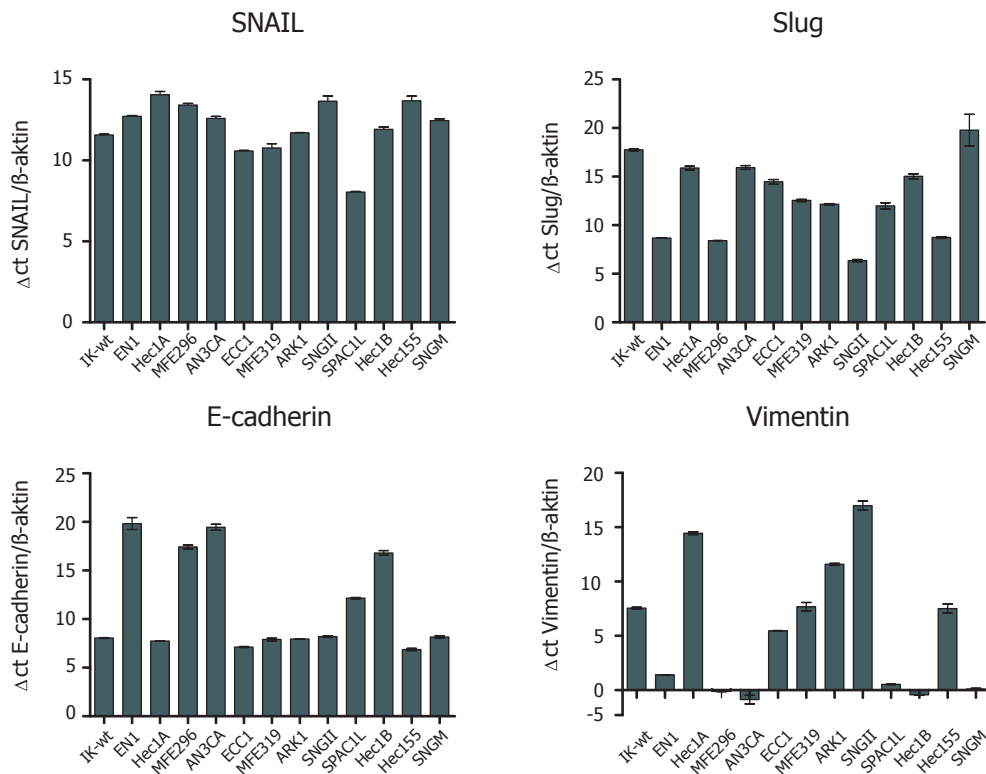


Abbildung D 4 qRT-PCR-Analyse der mRNA-Level von SNAIL, Slug, E-cadherin und Vimentin in EK-Zelllinien. Die aus den Zelllinien isolierte Gesamt-RNA wurde in cDNA konvertiert. Anschließend wurde eine qRT-PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Dargestellt ist der Δ ct-Wert zwischen dem Zielgen und β -aktin. Ein niedriger Wert bedeutet eine höhere Expression.

Im Gegensatz zur variierenden L1CAM-Expression, wurde für die drei analysierten Transkriptionsfaktoren REST, β -catenin und p53 jeweils nahezu gleiche mRNA-Level in allen Zelllinien detektiert. Bei REST decken sich die konstanten Level auf mRNA-Ebene mit den nahezu identischen Proteinmengen aus der Western-Blot-Analyse (s. Abb. D2). Für β -catenin existiert dagegen eine Diskrepanz zwischen der stabilen Expression auf mRNA-Niveau und der Proteinexpression (s. Abb. D2). Wie die Western-Blot-Analyse

aus Abbildung D2 zeigt, besitzen die Zelllinien Hec1A, ECC1, SNGII und SNGM eine wesentlich höhere β -catenin Proteinmenge als die anderen getesteten Zelllinien. Auf mRNA-Level zeigen dagegen alle Zelllinien ein ähnliches Expressionslevel.

Abbildung D4 zeigt die mRNA-Level der EMT-Marker SNAIL, Slug, E-cadherin und Vimentin. SNAIL und Slug sind E-Box bindende Transkriptionsfaktoren und bekannte Initiatoren des EMT Prozesses. Beide führen in epithelialen Zellen zu einer Repression von E-cadherin. In den Zellen wird inverse Korrelation von SNAIL/Slug zu E-cadherin vermutet. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass die Expression von Vimentin, als mesenchymaler Marker, ebenfalls invers korrelieren. Eine inverse Korrelation zwischen E-cadherin und mindestens einem der anderen drei Gene konnte allerdings nur vereinzelt beobachtet werden. Beispielsweise korrelierte die Expression von E-cadherin und Vimentin, bei den Zelllinien EN1, Hec1A, MFE296, AN3CA, SNGII, SPAC1L und Hec1B invers. Lediglich in drei der 13 Zelllinien existiert eine inverse Korrelation zwischen E-cadherin und Slug. Es handelt sich dabei um die Zelllinien EN1, Hec1A und MFE296. Für SNAIL wurde in allen Zelllinien ein fast identischer mRNA-Level detektiert. Demzufolge ist keine Aussage über eine inverse Korrelation zu E-cadherin möglich.

1.4 Korrelation der Expressionsprofile von EK-Zelllinien

Um eine genauere Aussage machen zu können, wurden die einzelnen Δ ct-Werte anschließend in eine statistisch auswertbare Form gebracht. Dazu wurden die Δ ct-Werte der mRNA-Expressionslevel zweier Moleküle in ein Punktdiagramm aufgetragen. Jeder Punkt steht dabei für die Δ ct-Werte einer einzelnen Zelllinie. Anschließend wurde eine lineare Regressionsgerade aus den sich ergebenden Punkten berechnet. Die Steigung der Gerade gibt dabei den Korrelationswert r (nach Spearman) wieder. Ein R -Wert von $-1,0$ bedeutet dabei eine inverse Korrelation und ein Wert von $+1,0$ eine direkte Korrelation. Je näher sich dieser Wert an 0 annähert, desto geringer ist die Korrelation zu bewerten.

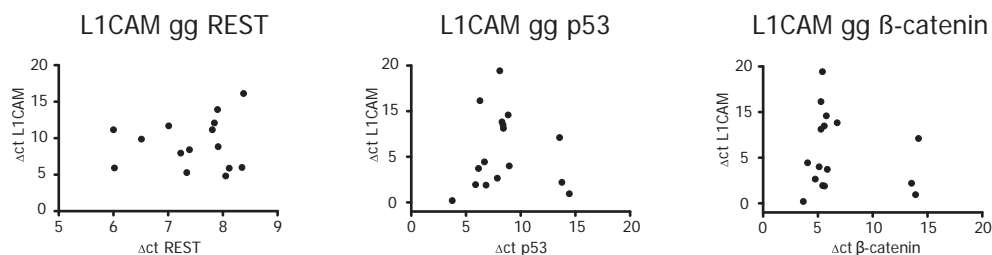


Abbildung D 5 Korrelation von L1CAM mit den Transkriptionsfaktoren REST (links), p53 (Mitte) und β -catenin (rechts). Die Δ ct-Werte der einzelnen Gene ergeben sich aus der Differenz mit dem ct-Wert des verwendeten Standards β -Aktin. Jeder Punkt im Diagramm steht für eine Zelllinie. Verwendet wurden die ct-Werte der Zelllinien IK-wt, AN3CA, ARK1, ECC1, EN1, Hec1A, Hec1B, Hec155, IK-ER-, MFE296, MFR319, RL952, SNGII, SNGM, SPAC1L, SPAC1S. Ein niedriger ct-Wert steht für eine hohe Expression.

Bei dem Vergleich der L1CAM Expressionslevel mit dem der drei Transkriptionsfaktoren REST, p53 und β -catenin konnte keine Korrelation ermittelt werden. Wie in Abbildung D5 erkennbar ist, war es nicht möglich eine lineare Regressionsgerade zu berechnen bzw. einen r -Wert mit einer Tendenz zu ± 1 zu bestimm-

men. Weiterhin wurde, wie in Abbildung D6 dargestellt, eine Korrelation von L1CAM mit den EMT-Markern SNAIL, Slug, E-cadherin und Vimentin berechnet. Eine signifikante Korrelation für SNAIL und Vimentin mit dem L1CAM-Expressionslevel konnte jedoch nicht beobachtet werden. Allerdings zeigte der Auftrag der Slug und E-cadherin mRNA-Level eine positive Korrelation mit der von L1CAM. Das bedeutet in beiden Fällen, je höher oder niedriger der L1CAM-mRNA-Level, desto höher oder niedriger der mRNA-Level von Slug bzw. E-cadherin. Der r -Wert für die Korrelation zwischen L1CAM und Slug beträgt dabei 0,6879 ($p=0,0065$). Für L1CAM und E-cadherin beträgt der Wert 0,5529 ($p=0,0263$). Die Korrelation zwischen L1CAM und E-cadherin steht dabei im Widerspruch zu der Slug-Korrelation. Ausgehend von diesen Daten wurde im Falle von E-cadherin eine inverse Korrelation erwartet.

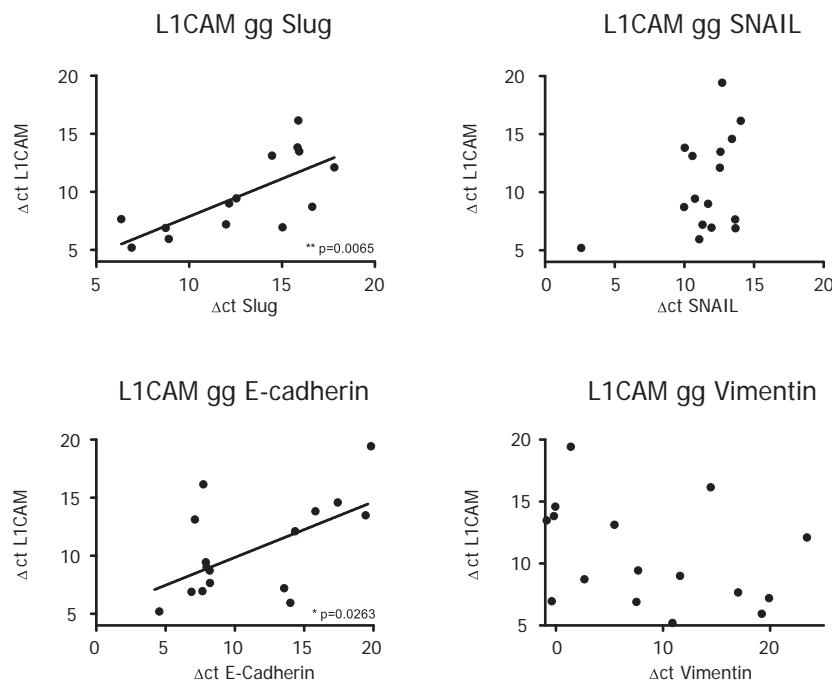


Abbildung D 6 Korrelation von L1CAM mit den EMT-Markern Slug (oben links), SNAIL (oben rechts), E-cadherin (unten links) und Vimentin (unten rechts). Die Δ ct-Werte der einzelnen Gene ergeben sich aus der Differenz mit dem ct-Wert des verwendeten Standards β -Aktin. Jeder Punkt im Diagramm steht für eine Zelllinie. Verwendet wurden die ct-Werte der Zelllinien IK-wt, AN3CA, ARK1, ECC1, EN1, Hec1A, Hec1B, Hec155, IK-ER-, MFE296, MFR319, RL952, SNGII, SNGM, SPAC1L, SPAC1S. Ein niedriger ct-Wert steht für eine hohe Expression.

Die direkte Korrelation zwischen den Expressionslevel von L1CAM und Slug lässt auf einen entscheidenden Einfluss von Slug bei der L1CAM Regulation schließen. Eine Funktion der anderen Transkriptionsfaktoren kann auf Grund des mRNA Levels allerdings nicht ausgeschlossen werden. Im Falle von REST ist bekannt, dass es ubiquitär in nichtneuronalen Zellen exprimiert wird. Die Funktion von Transkriptionsfaktoren wird jedoch gerade auf posttranskriptioneller Ebene stark reguliert. Es bedarf also weiterer Untersuchungen um die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren bei der L1CAM-Regulation zu untersuchen.

1.5 EK-Zelllinien weisen unterschiedliche p53-Mutationen auf

Bereits 1998 wurde in einer Arbeit von Tsuzuki eine Korrelation zwischen p53-Mutationen und der L1CAM-Expression in Glioma beschrieben (Tsuzuki et al., 1998). In dem Ovarialkarzinom wurde vor kurzem eine Korrelation von auftretenden p53-Mutationen mit erhöhter L1CAM-Expression beobachtet (Bondong et al., 2012). Auch in zahlreichen anderen Tumorentitäten und Krankheiten konnte mutiertes p53 identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden die hier charakterisierten Endometrialkarzinomzelllinien nicht nur hinsichtlich der p53-Expression untersucht, sondern auch auf Mutationen im p53-Genlokus analysiert.

Zelllinie	SNP Position	Exon	Polymorphismus	AS-Position
ECC1				
SNG II	246	7	ATG(Met)-->GTG(Val)	Pos.246
SNG M				
SPAC 1 L	273	8	CGT(Arg)-->CAT(His)	Pos.273
ARK1	248	7	CGG(Arg)-->TGG(Trp))	Pos.248
HEC 1 B	248	7	CGG(Arg)-->CAG(Gln)	Pos.248
HEC 1 A	248	7	CGG(Arg)-->CAG(Gln)	Pos.248
EFE 184	282	8	CGG(Arg)-->TGG(Trp)	Pos.282
HEC 155	195	6	ATC(Ile)-->AAC(Asn)	Pos.195
MFE 280	261	8	Exon 8 Deletion	
AN3CA	213	6	CGA(Arg)-->CAA(Gln)	Pos.213
MFE 319	220	6	TAT(Tyr)-->TGT(Cys)	Pos.220
IK ER	187	6	Exon 6 Deletion	
EN 1	273	8	CGT(Arg)-->CAT(His)	Pos.273
EN	273	8	CGT(Arg)-->CAT(His)	Pos.273
MFE 296	220	6	TAT(Tyr)-->TGT(Cys)	Pos.220
ARK 2	165	5	CAG(Gln)-->TAG(STOP)	Pos.165

Tabelle D 1. Bestimmung der p53-Mutationen in EK-Zelllinien

Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurden 17 Zelllinien untersucht. In 14 der 17 Zelllinien konnte eine Mutation in Form eines Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) nachgewiesen werden. Alle SNPs resultieren in einem Aminosäureaustausch innerhalb der Exons sechs, sieben und acht. Zwei Mutationen innerhalb der Exons sechs und acht führen zu einer Deletion des jeweiligen Exons. Lediglich drei der 17 untersuchten EK-Zelllinien wiesen keine Mutation im p53-Genlokus auf. Es konnte demnach kein Zusammenhang zwischen den auftretenden p53-Mutationen und der L1CAM-Expression gefunden werden.

2. *Induktion der L1CAM-Expression durch TGF- β 1 ist Slug vermittelt*

Sowohl TGF- β 1 als auch Slug sind als Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT) induzierende Moleküle bekannt. Der EMT-Prozess ist charakterisiert durch den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und einer Zunahme der Zellmotilität. Ursprünglich wurde dieser Prozess als Vorgang während der Embryogenese beschrieben. In den letzten Jahren, wurden die typischen Eigenschaften dieses Phänomens auch für den Übergang von einem frühen nicht invasiven Tumorstadium zu einem aggressiven infiltrierenden Stadium beschrieben (Kyo et al. 2006).

Eine zentrale Rolle spielt dabei der Verlust von E-cadherin und der damit verbundene Verlust der epithelialen Zellhomöostase. In einigen Arbeiten konnte bereits eine erhöhte Metastasierung in Folge des E-cadherin-Verlustes nachgewiesen werden (Saito et al 1999, Hirohashi et al 1998). Daneben kommt es während des EMT-Prozesses auch zur Deregulation zahlreicher anderer Zelladhäsionsmoleküle, die am Aufbau der Adhärenzverbindungen und Tight Junctions beteiligt sind. Eine weitere Parallele zum EMT-Prozess in der Embryologie besteht in der zunehmenden Expression der E-cadherin-Repressoren SNAIL und Slug. Ebenso wie die meisten E-cadherin-Repressoren sind SNAIL und Slug Zinkfinger-Motiv-Proteine und gehören zu der Snail-Familie von Transkriptionsfaktoren.

Als eines der Hauptinduktionssignale der EMT gilt der Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) (Batlle et al., 2000). Im Gegensatz zu anderen Zytokinen, wie z.B. der Hepatocellular growth factor (HGF), gilt TGF- β 1 als prototypisches Zytokin und führt zu einer vollständigen Induktion des EMT-Prozesses. Dagegen wirkt HGF oft nur im zellulären Kontext und kann sowohl zu einer Induktion als auch zu einer Repression der EMT führen (Yang et al., 2005). Die Zytokinproduktion ist dabei ebenfalls vom Tumormilieu abhängig. Zytokine können sowohl von infiltrierenden Zellen als auch von den Tumorzellen selbst gebildet werden. In den Zielzellen führen sie anschließend zu einer Änderung des Expressionsmusters von zahlreichen Repressoren und Aktivatoren der Transkription. SNAIL und Slug sind dabei die prominentesten Transkriptionsfaktoren, deren Expression durch TGF- β 1-Exposition induziert wird. (Peinado et al., 2008; Barrallo-Gimeno & Nieto, 2005).

Da in ersten in silico Analysen SNAIL/Slug Bindemotive (E-Boxen) im L1CAM-Promoter identifiziert wurden, bedarf es der Klärung ob L1CAM durch die Transkriptionsfaktoren SNAIL und Slug reguliert werden kann. Dazu wurden EK-Zelllinien für 10 Tage mit TGF- β 1 oder HGF behandelt und auf eine EMT-Induktion analysiert. Parallel dazu wurde auf mögliche Effekte auf die L1CAM-Expression geachtet.

2.1 TGF- β 1 und HGF induzieren EMT und L1CAM-Expression

Um eine EMT zu induzieren, wurden die für L1CAM negative Zelllinie EN1, die schwach positiven Zellen, ECC1 und Hec1A, und die stark exprimierenden Hec1B-Zellen für 10 Tage mit TGF- β 1 (10 ng/ml) oder HGF (5 ng/ml) behandelt. Anschließend wurde die Expression von den EMT-Markern SNAIL, Slug, E-cadherin und Vimentin untersucht. Die Analyse erfolgte nach Möglichkeit auf mRNA- und Proteinebene. Es wurde versucht zu klären, ob eine EMT-Induktion zu einer erhöhten Expression von L1CAM führt.

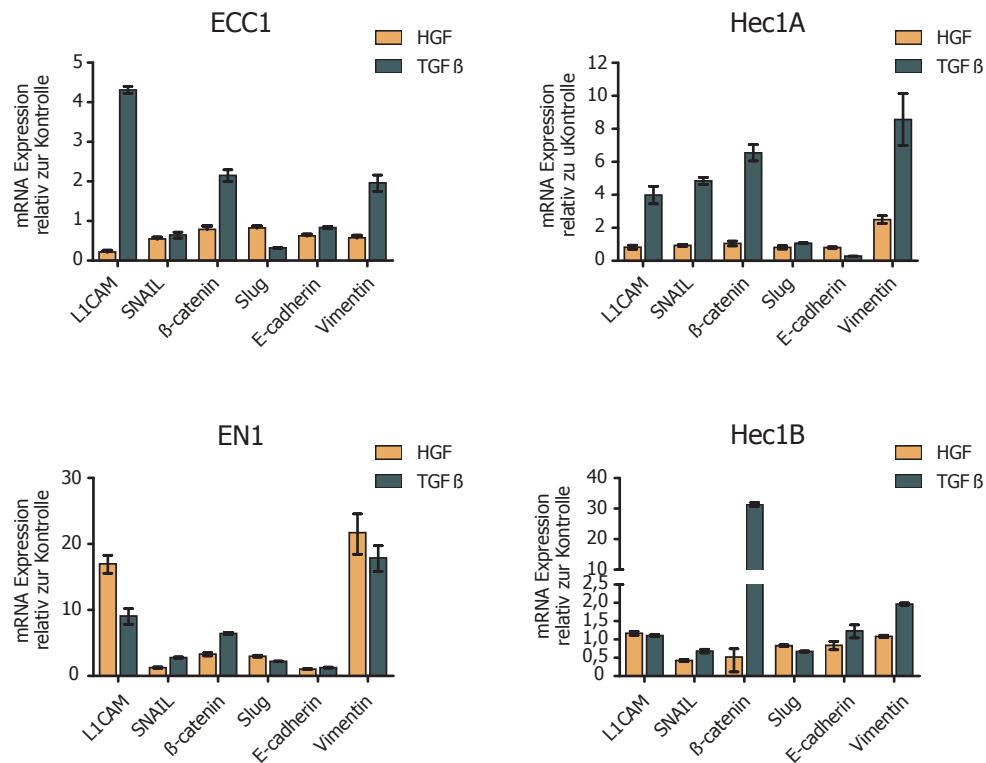


Abbildung D 7 mRNA-Level nach HGF (gelb) und TGF- β 1 (blau) Behandlung über einen Zeitraum von 10 Tagen. Aus den Zellen ECC1, Hec1A, EN1 und Hec1B wurde Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die Detektion der mRNA-Level erfolgte über qRT-PCR. Untersucht wurden Veränderungen im mRNA-Level der Gene von L1CAM, SNAIL, Slug, β -catenin, E-cadherin und Vimentin. Alle mRNA-Level wurden zu dem von β -aktin normalisiert. β -aktin diente ebenfalls als interner Standard. (die Daten wurden in Kooperation mit Marco Pfeifer angefertigt)

Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen eine deutliche EMT-Induktion nach TGF- β 1-Behandlung (s. Abb. D 7). Sowohl bei ECC1 als auch bei Hec1A ist eine Induktion der EMT nach TGF- β 1-Zugabe erkennbar. In beiden Zelllinien kommt es zu einer Hochregulation von Vimentin bzw. Herabregulation von E-cadherin. Der deutlichste Effekt ist bei Hec1A Zellen zu beobachten. So kommt es zu einem 8,6-fachen Anstieg des mRNA-Levels von Vimentin und einem 3,5-fachen Abfall des E-cadherin Levels. Eine TGF- β 1-induzierte EMT wurde ebenfalls für die Zelllinie EN1 festgestellt. Hier kam es zu einem ca. 20-fachen Anstieg der Vimentin-Expression. Der E-cadherin-mRNA-Level blieb dagegen konstant. Jedoch geht aus den vorhergehenden Analysen hervor, dass diese Zelllinie bereits ein sehr niedriges Expressionsniveau für E-cadherin besitzt. Im Gegensatz zu TGF- β 1 führte HGF nur zu einer partiellen EMT-Induktion. Es kommt dabei

nur zu einer schwachen Regulation der EMT-Marker-Moleküle. Bei den Transkriptionsfaktoren SNAIL und β -catenin blieb die Expression dagegen in allen Zelllinien stabil. Lediglich die Hec1A Zellen reagierten mit einer zunehmenden SNAIL-Expression auf die TGF- β 1 Behandlung. In Folge der TGF- β 1-Behandlung kam es dagegen in allen Zellen zu einer Erhöhung der Slug-Expression. Überraschenderweise ist der Slug-Level ebenfalls in der L1CAM positiven Zelllinie Hec1B angestiegen. Der L1CAM-mRNA-Level stieg nach der TGF- β 1-Zugabe in allen L1CAM-defizienten Zelllinien signifikant an. Den größten Effekt zeigte die Zelllinie EN1. Hier stieg die L1CAM Expression um das 9-fache an. Bei der Zelllinie Hec1B zeigte die Zytokin-Behandlung dagegen keine Auswirkungen auf die L1CAM-Expression. Allerdings exprimiert diese Zelllinie bereits sehr stark L1CAM und es wurde keine weitere Zunahme der L1CAM-Expression erwartet.

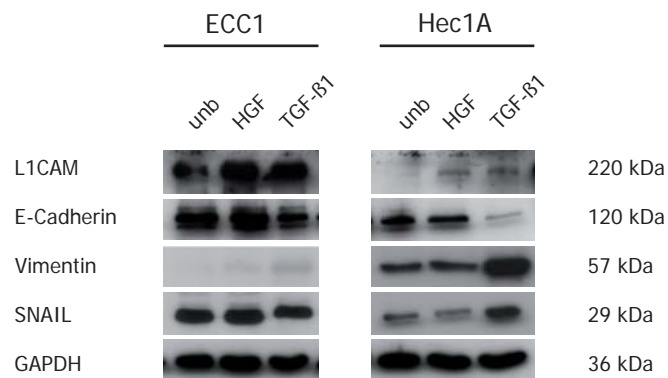


Abbildung D 8 Induktion der EMT durch Langzeitbehandlung mit TGF- β 1 oder HGF über einen Zeitraum von 10 Tagen. Behandelt wurden die Zelllinien ECC1 (links) und Hec1A (rechts). Für die Western-Blot-Analyse wurde das Gesamtzelllysate aufgetragen. Die Membran wurde mit spezifischen Antikörpern gegen L1CAM, E-cadherin, Vimentin, SNAIL und GAPDH überprobt. GAPDH diente als Ladekontrolle. (die Daten wurden in Kooperation mit Marco Pfeifer angefertigt)

Zur Validierung der qRT-PCR-Daten, wurde zusätzlich eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die Änderung der Proteinlevel in den EK-Zelllinien ECC1 und Hec1A untersucht (Abb. D 8). In beiden Zelllinien ist nach der TGF- β -Behandlung eine Reduktion des epithelialen Markers E-cadherin erkennbar. Dies geht erwartungsgemäß einher mit einer erhöhten Expression des mesenchymalen Markers Vimentin. In Hec1A Zellen ist ebenfalls ein Anstieg der SNAIL-Expression zu verzeichnen. In ECC1 Zellen ist dagegen kein Anstieg des SNAIL-Proteinlevels erkennbar. Die HGF-Behandlung führte entsprechend den qRT-PCR-Ergebnissen weder in Hec1A noch in ECC1-Zellen zu einer Änderung der E-cadherin, Vimentin und SNAIL-Proteinexpression. Im Kontrast dazu, konnte in beiden Zelllinien ein Anstieg der L1CAM-Expression nach der Behandlung mit beiden Zytokinen beobachtet werden. Der erhöhte L1CAM Proteinlevel nach HGF-Behandlung widerlegt tlw. die qRT-PCR-Daten, bei denen kein Anstieg der L1CAM-Expression detektiert wurde. Inwiefern HGF auf Protein- aber nicht auf mRNA-Niveau zu einer Erhöhung von L1CAM führt, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

2.2 Überexpression von Slug führt zu einer Induktion der L1CAM-Expression

Durch die TGF- β 1- und HGF Behandlung wurde deutlich, dass L1CAM im Zuge des EMT-Prozesses hochreguliert wird. Daraufhin wurde untersucht, welchen Anteil der Transkriptionsfaktor Slug bei der Regulation von L1CAM spielt.

Eine Beteiligung von SNAIL und β -catenin konnte allerdings auch weiterhin nicht ausgeschlossen werden. Doch beide Transkriptionsfaktoren zeigten im Verlauf der induzierten EMT eine stabile Expression. Slug wurde dagegen wie erwartet in allen Zellen in einem erhöhten Maße exprimiert. Das deutet darauf hin, dass die TGF- β 1 induzierte L1CAM Hochregulation eventuell durch Slug vermittelt wird.

Um zu zeigen das Slug einen direkten Effekt auf die L1CAM-Expression hat, wurde Slug in den beiden Zelllinien ECC1 und Hec1A überexprimiert. Anschließend erfolgte eine Analyse auf Protein- und mRNA-Ebene. In beiden EK-Zelllinien, ECC1 und Hec1A, führt die Überexpression von Slug zu einer Induktion der L1CAM-Expression. Sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene war nach der Transfektion mit Slug-HA eine erhöhte L1CAM-Expression detektierbar. In ECC1-Zellen kommt es zu einem 5,5-fachen, in Hec1A-Zellen zu einem 10,5-fachen Anstieg des L1CAM-mRNA-Gehalts. Im Vergleich dazu führt die Transfektion mit dem Kontrollvektor pcDNA3 zu keinem erhöhten L1CAM-Level.

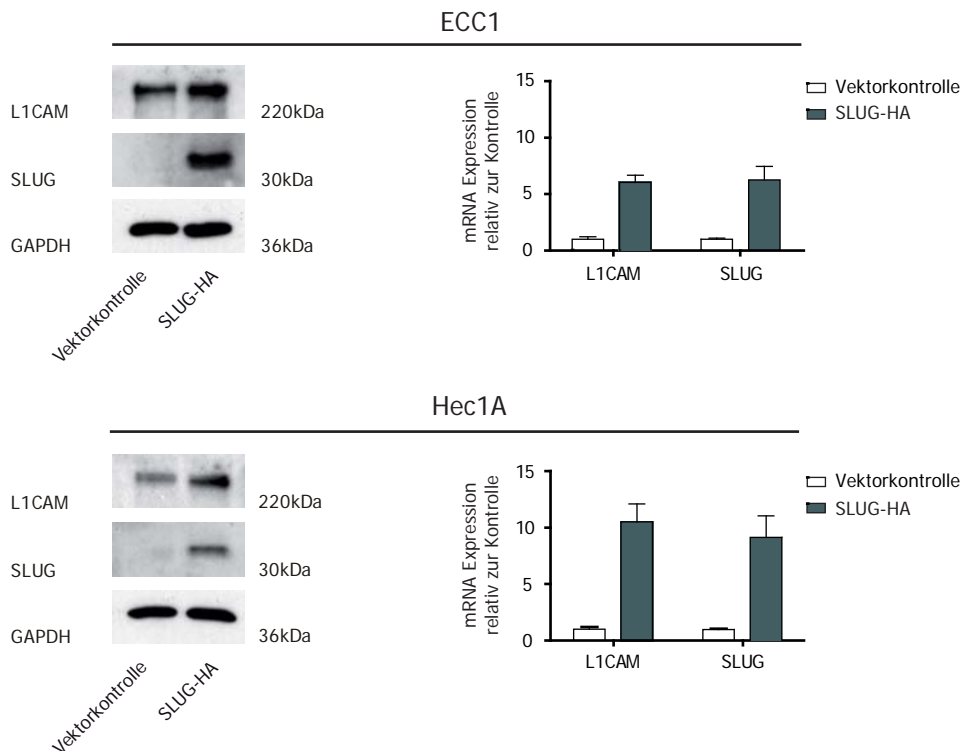


Abbildung D 9 Protein und mRNA-Level nach Slug-Überexpression. Bestimmung des Proteingehalts erfolgte durch Western-Blot-Analyse, des mRNA-Levels durch qRT-PCR. Bei der Western-Blot-Analyse (links) wurde die Membran mit spezifischen Antikörpern gegen L1CAM, Slug und GAPDH überprobt. GAPDH fungierte dabei als interne Ladekontrolle. Für die Normalisierung der qRT-PCR (rechts) wurde β aktin verwendet. Die Zelllinien ECC1 (oben) und Hec1A (unten) wurden jeweils mit einer Vektorkontrolle oder einem Slug-Überexpressionsvektor transfiziert. Die Analyse erfolgte 48 h nach der Transfektion (Experimente wurden in Kooperation mit Marco Pfeifer durchgeführt).

2.3 Spezifische siRNA gegen Slug mRNA blockiert TGF- β 1 induzierte L1CAM-Expression

Die Abbildungen D7 und D8 zeigen, dass TGF- β 1 zu einer Induktion der L1CAM-Expression führt. Weiterhin wurde deutlich, dass Slug direkt an der L1CAM-Regulation beteiligt ist (s. Abb. D9). Demzufolge war es von Interesse, zu untersuchen ob die TGF- β 1 induzierte Reaktion Slug vermittelt ist. Hierfür wurden die Zelllinien ECC1 und Hec1A vor der Zytokinzugabe transient mit Kontroll-siRNA (siGFP) oder spezifischer siRNA gegen Slug mRNA transfiziert. Anschließend erfolgte eine TGF- β 1 oder HGF-Behandlung über einen Zeitraum von 10 Tagen.

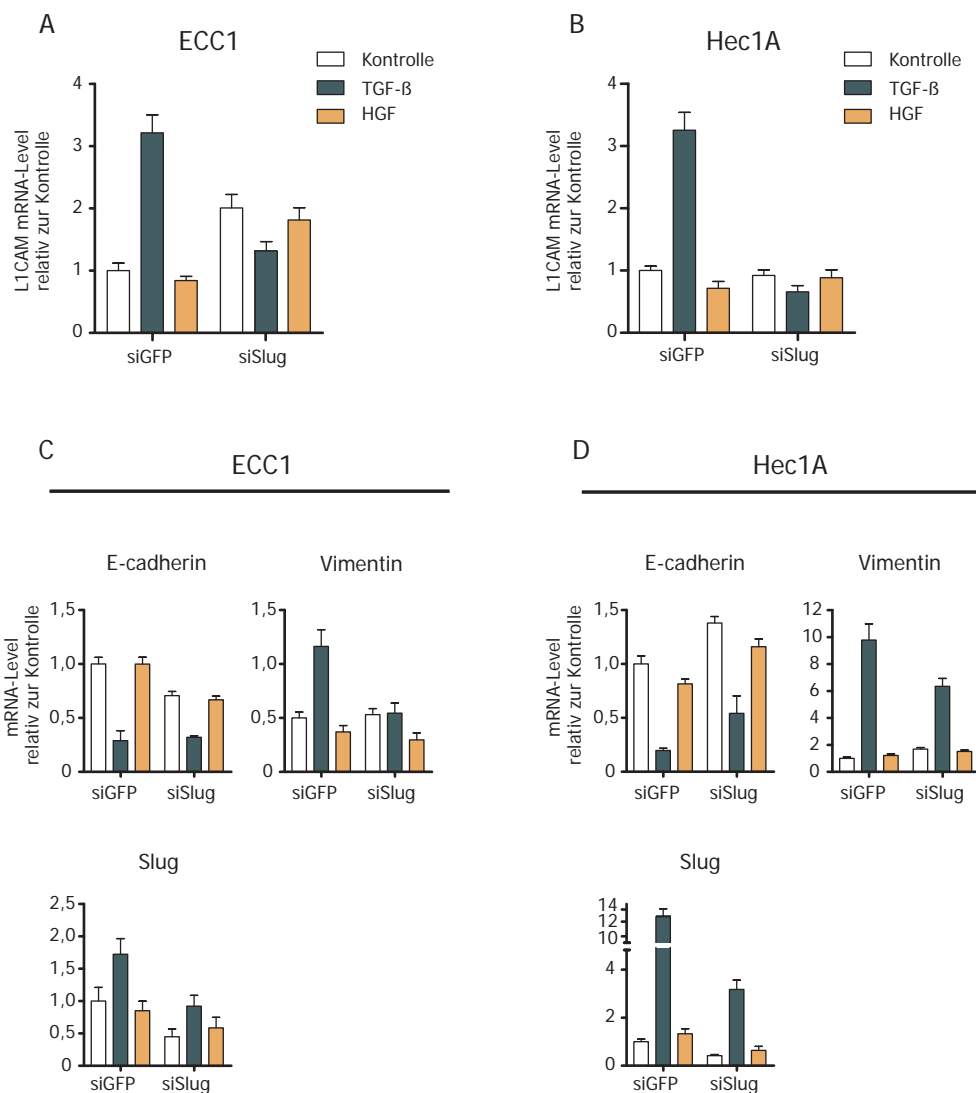


Abbildung D 10 Einfluss von Slug-siRNA auf die EMT nach Zytokinbehandlung. Die Zelllinien ECC1 und Hec1A wurden mit Kontroll- (siGFP) oder siRNA gegen Slug (siSlug) transfiziert. Nach der Transfektion erfolgte eine Behandlung mit TGF- β 1 oder HGF für 10 Tage. Anschließend erfolgte eine Analyse der mRNA-Level durch qRT-PCR. (A) L1CAM mRNA-Level von ECC1 Zellen und (B) Hec1A Zellen nach Zytokinbehandlung und siRNA-Transfektion. (C) E-cadherin, Vimentin und Slug mRNA-Level von ECC1 Zellen und (D) Hec1A Zellen nach Zytokinbehandlung und siRNA-Transfektion. Alle Daten wurden gegen β -Aktin normalisiert (Die Durchführung der Experimente erfolgte in Kooperation mit Marco Pfeifer).

Nach der Zytokinbehandlung erfolgte die RNA-Isolation und Analyse durch qRT-PCR. Die Quantifizierung zeigte eine stabile Repression der Slug-Expression über einen Zeitraum von 10 Tage. In der Abbildung D 10 ist deutlich zu erkennen, dass die Unterdrückung von Slug zu einer Inhibition der TGF- β 1 induzierten L1CAM-Expression führt (s. Abb. D10 a und b). Darüber hinaus wird in beiden Zelllinien eine EMT-Induktion verhindert (s. Abb. D10 c und d).

Eine Analyse der Expressionslevel von Vimentin und E-cadherin bestätigten eine Blockierung der Slug vermittelten EMT-Induktion nach siRNA-Behandlung. Wie erwartet, kommt es in den siGFP transfizierten ECC1-Zellen zu einer Herabregulation von E-cadherin und einer Hochregulation von Vimentin nach TGF- β 1-Stimulation. Die erhöhte Expression von Vimentin wurde durch die Transfektion mit Slug siRNA aufgehoben. Für Hec1A-Zellen ergibt sich ein ähnliches Bild wie für ECC1-Zellen. Die L1CAM-Expression steigt in siGFP transfizierten Hec1A-Zellen um das 3,3-fache nach der Stimulation mit TGF- β 1 (Abb. D10-B). Die Transfektion mit Slug-siRNA reduziert diesen Effekt vollständig. Durch den *Knock down* von Slug kommt es ebenso zu einer abgeschwächten E-cadherin-Repression. Der Anstieg der Vimentin-Expression wird nur gering beeinflusst (s. Abb. D10). Die übereinstimmenden Ergebnisse aus den beiden Zelllinien ECC1 und Hec1A sind ein weiterer Hinweis für eine Beteiligung von Slug bei der Regulation von L1CAM. Insbesondere bei der TGF- β 1 induzierten L1CAM-Expression scheint Slug eine zentrale Rolle einzunehmen.

2.4 Der Transkriptionsfaktor Slug bindet an Bindemotive im L1CAM-Promoter

Um eine direkte Interaktion von Slug mit den L1CAM Promotorelementen nachzuweisen, wurde eine Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) durchgeführt. Die ChIP ist ein essentieller Nachweis für eine DNA-Protein-Interaktion. Der Assay zeigt, welche Wechselwirkungen bestimmte Proteine mit bestimmten Regionen des Genoms eingehen. Da die Durchführung *in vivo* erfolgt, ist es möglich, die Interaktionen innerhalb einer Zelle kontextabhängig zu untersuchen. Die Verwendung der PCR als Analysemethode, ermöglicht außerdem eine äußerst genaue Betrachtung einer definierten Genomregion. Im Allgemeinen dient die ChIP nicht nur zum Nachweis der Bindung eines Transkriptionsfaktors an die DNA. Die Interaktion von Transkriptions-Co-Faktoren, modifizierten Histonen, Replikationsfaktoren und DNA-Reparatur-Proteinen kann ebenfalls mit Hilfe der ChIP untersucht werden. Diese genaue Betrachtungsmöglichkeit stellt einen Vorteil gegenüber anderen *in vitro* Verfahren, wie z.B. dem EMSA, dar. Desweiteren können mittels ChIP Bindungseigenschaften innerhalb einer natürlich vorliegenden Chromatinstruktur untersucht werden.

Durch die ChIP Analyse konnte die Bindung von Slug an die E-Box-Bindemotive innerhalb der Promotorelemente des L1CAM-Promoters nachgewiesen werden. Nach der Überexpression von Slug-HA in den Zelllinien ECC1 und Hec1A kam es zu einem Anstieg der spezifischen Bindung von Slug. Zur Präzipitation von Slug wurde ein HA-Antikörper verwendet, da ein qualitativ ausreichender kommerzieller ChIP-Antikörper gegen Slug nicht verfügbar war. Die Überexpression offenbarte unterschiedliche Bindungseigenschaften zwischen den beiden Zelllinien. In Hec1A-Zellen führte die Slug-Überexpression zu einem Anstieg des Signals bei allen untersuchten Bindestellen. Die Signalstärke lag im Schnitt bei 4% des Inputsignals. Zur stärksten Anreicherung kam es bei den Bindemotiven E-Box 7 (E7) und E-Box 8 (E8) mit 5,5 % bzw. 4,6 %. Im Gegensatz zu Hec1A zeigten ECC1-Zellen nur bei zwei Bindestellen eine erhöhte Präzipitation. Bei den Bindestellen E7 und E9 kam es zu einer deutlichen Erhöhung des Signals. Die Signalstärke betrug 5,5 % bei

E7, bzw. 3,4 % bei E9. Beide Zelllinien zeigen somit Unterschiede bei der Bindung von Slug an die L1CAM Promoterregionen. Das deutet sowohl auf eine differenzielle Aktivität der zwei Promoterelemente und eine kontextabhängige Nutzung der beiden Promotoren hin. Für die Aktivität beider Elemente spielt Slug allerdings eine entscheidende Rolle.

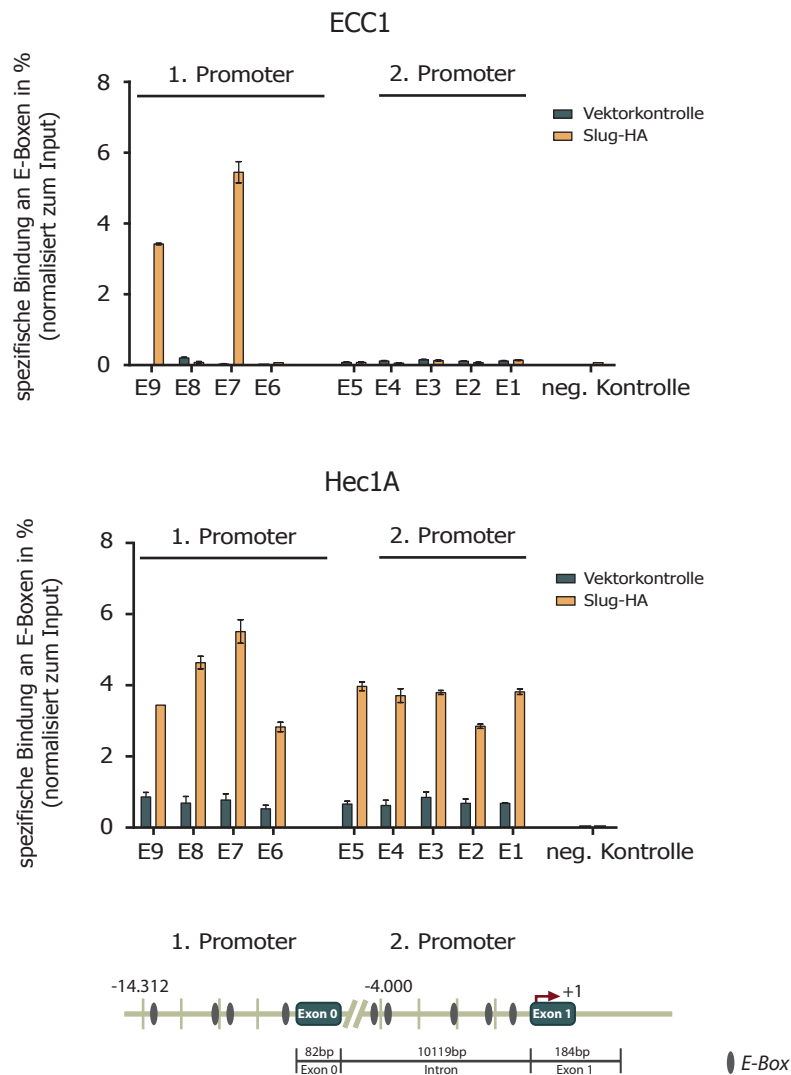


Abbildung D 11 ChIP-Experiment mit ECC1-Zellen (oben) und Hec1A-Zellen (unten). Zur Präzipitation wurde ein monoklonaler Antikörper gegen HA verwendet. Die Zellen wurden entweder mit einem Kontrollvektor (pcDNA3) oder einem Slug-HA Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen wurden für ChIP fixiert, das Chromatin isoliert, verdaut und mit dem HA-Antikörper präzipitiert. Die Analyse erfolgte durch qRT-PCR. Das Signal der präzipitierten DNA wurde zu dem des Input normalisiert. Als neg. Kontrolle diente ein für eine Region außerhalb des L1CAM-Promoters spezifisches Primerpaar.

3. *Einfluss des Transkriptionsfaktors REST (RE1 silencing transcription factor) auf die L1CAM Expression in EK-Zelllinien*

In einer Arbeit von Kallunki und Kollegen aus den 1990er wurde die Beteiligung des RE1 silencing transcription factors (REST) bei der L1CAM Regulation in der Maus untersucht (Kallunki et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass REST entsprechend seiner bekannten Funktion als Repressor neuronaler Gene die Inhibition der L1CAM-Expression in nicht neuronalem Gewebe vermittelt. *In vitro* konnte die Aktivität des NRSE-Bindemotivs bestätigt werden. Gene, welche dieses regulative Bindemotiv besitzen, werden durch REST negativ reguliert.

Beim Menschen nimmt REST ebenfalls die Rolle eines globalen Repressors von nicht neuronalen Genen ein. Dabei konnte in Chip on CHIP-Experimenten die Bindung von REST innerhalb der Promoterregionen zahlreicher neuronaler Gene nachgewiesen werden (Bruce et al., 2004). Neben dem Promoter von L1CAM, bindet REST ebenfalls an die Promotoren von SNAP25, Synaptophysin. Entsprechend seiner Funktion als globaler Regulator neuronaler Gene wird REST in nicht-neuronalen Gewebe ubiquitär exprimiert und zeigt spezifische Expressionsmuster während der embryonalen Entwicklung. Für die hier untersuchten EK-Zelllinien wurden gleiche REST-Expressionslevel festgestellt (Abb.: D2 und D3). Dennoch wurde bei der Charakterisierung der Zelllinien eine sehr differenzierte Expression von L1CAM innerhalb der Zelllinien sichtbar (Abb.:D1-D3). Das lässt die Frage aufkommen, was zu dem offensichtlichen Funktionsverlust von REST führt? In zahlreichen Arbeiten konnte schon ein Zusammenhang zwischen einer Änderung des REST-Levels bzw. der -funktion und einer veränderten Tumorprogression hergestellt werden (Westbrook et al., 2008; Moss et al., 2009; Kreisler et al., 2010; Taylor et al., 2012). Jedoch offenbarte bis zum heutigen Zeitpunkt lediglich eine Arbeit eine Funktion von REST bei der L1CAM-Regulation in Tumorzellen. Kreisler und Kollegen zeigten in SCLC-Zelllinien, dass eine REST-Promotermethylierung mit der L1CAM-Expression korreliert (Kreisler et al., 2010).

In dieser Arbeit wurde versucht zu klären, ob REST eine entscheidende Rolle bei der aufkommenden Expression von L1CAM im EK einnimmt. Dazu wurden zum einem die Auswirkungen veränderter REST-Expressionslevel auf die L1CAM-Expression untersucht. Zum anderen wurde die REST-DNA-Interaktion in L1CAM positiven und L1CAM-defizienten Zelllinien betrachtet.

3.1 REST-Überexpression reduziert L1CAM-Expression in L1CAM positiven Zelllinien

Durch die Überexpression von REST sollte nun die mögliche Relevanz der Repressorfunktion bei der L1CAM-Expression im EK nachgewiesen werden. Dazu wurden die beiden Zelllinien Hec1B und SPAC1L entweder mit Kontrollvektor (pCMV) oder dem REST-Expressionsplasmid (pCMV-REST) transfiziert. Nach 48 h wurde mRNA isoliert und Gesamtprotein-Lysate hergestellt und für Expressionsanalysen von L1CAM und REST mittels qRT-PCR bzw. Westernblot verwendet.

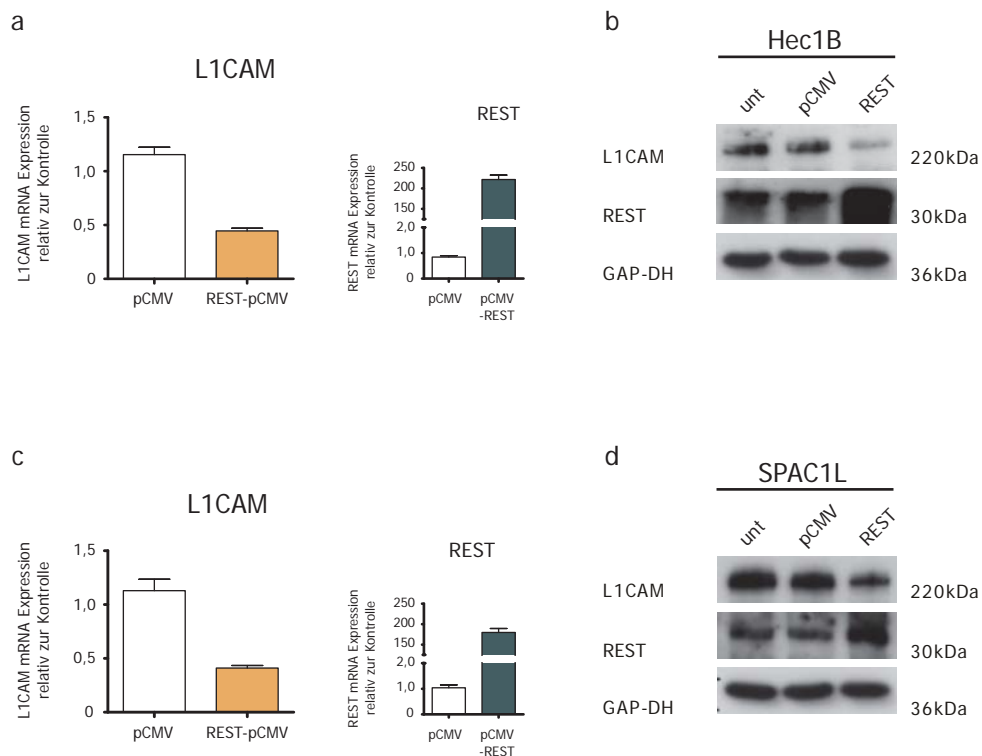


Abbildung D 12 qRT-PCR und Western-Blot-Analyse nach 48h REST-Überexpression in Hec1B (a+b) und SPAC1L (c+d) Zellen. Die Zellen wurden entweder mit dem Kontrollvektor oder dem pCMV-REST-Vektor transfiziert. Bei der qRT-PCR erfolgte die Normalisierung zum internen Standard β -aktin. GAPDH diente als Ladekontrolle bei der Western-Blot-Analyse.

In beiden Zelllinien führt die Überexpression von REST zu einer deutlichen Reduktion der L1CAM-Expression. Sowohl in Hec1B- als auch in SPAC1L-Zellen sinkt die Menge an L1CAM-mRNA um ca. 50 % (Abb. D12 a und c). Durch die Transfektion des Kontrollvektors (pCMV) wird die L1CAM-Expression dagegen nicht beeinflusst. Die Proteinanalysen (Abb.12 b und d) bestätigen die Ergebnisse der qRT-PCR. Auch hier ist in beiden Zelllinien ein deutlicher Abfall der L1CAM-Proteinmenge nach REST-Überexpression erkennbar. Die Daten zeigen deutlich, dass eine erhöhte Expression von funktionellem REST in stark L1CAM-exprimierenden Zellen zu einer Repression von L1CAM führt.

3.2 In L1CAM-defizienten Zelllinien führt der siRNA-vermittelte knockdown von REST zur Induktion der L1CAM-Expression

Die Überexpression von REST zeigte eindeutige Effekte auf die L1CAM-Expression in L1CAM positiven Zellen. Nachfolgend sollte geklärt werden, ob der Verlust von REST mit einem Anstieg der L1CAM-Expression in EK-Zellen einhergeht. Hierfür wurden die vier L1CAM-defizienten Zelllinien EN1, MFE296, ECC1 und Hec1A mit spezifischer siRNA komplementär zu REST-mRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion erfolgte die Analyse der L1CAM-Expression. Dabei wurden alle vier Zelllinien hinsichtlich der Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Für ECC1 und Hec1A Zellen wurden zusätzlich Westernblot-Analysen zur Detektion von Gesamtproteinmengen durchgeführt. Die in Abbildung D13 dargestellten Ergebnisse zeigen einen deutlichen Effekt auf die L1CAM-Expression nach siRNA-vermittelter Depletion des REST-Proteins. In allen vier Zelllinien kam es zu einer effizienten Reduktion der REST mRNA-Level und in Folge dessen zu einer erhöhten L1CAM-Expression. Der höchste Anstieg konnte bei der Zelllinie EN1 beobachtet werden, der geringste bei der Zelllinie MFE296. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen der Proteinexpression. Die Gesamtproteinmenge von L1CAM war nach der Transfektion mit REST-spezifischer siRNA deutlich erhöht (s. Abb. D13).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine verminderte REST-Aktivität zu einer höheren L1CAM-Expression führt. Somit besitzen auch L1CAM-defiziente EKzellen die molekularen Voraussetzungen zur Expression von L1CAM. Die Anwesenheit von REST blockiert jedoch eine mögliche L1CAM Expression.

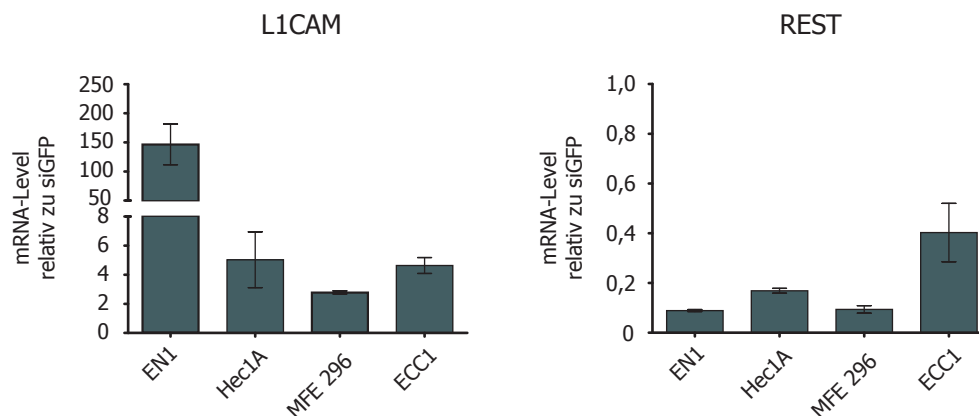


Abbildung D 13 qRT-PCR-Analyse nach Transfektion von REST-siRNA. Die vier Zelllinien EN1, Hec1A, MFE296 und ECC1 wurden entweder mit Kontroll-siRNA (siGFP) oder spezifischer siRNA (siREST) transfiziert. Nach 72 h wurde der mRNA-Level von L1CAM und REST bei allen Zelllinien bestimmt. Links ist der L1CAM-mRNA-Level zu sehen, rechts der von REST, welcher zur Bestimmung der siRNA-Effizienz gemessen wurde. Alle Daten wurden zu den von β -aktin normalisiert.

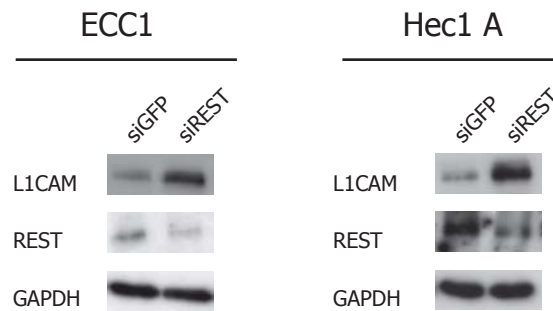


Abbildung D 14 Analyse der Oberflächenexpression und der Gesamtproteinmenge von L1CAM. ECC1- und Hec1A-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (siGFP) oder spezifischer siRNA (siREST) transfiziert. Die Oberflächenexpression wurde durch FACS-Analyse, die Gesamtproteinmenge durch Western-Blot-Analyse bestimmt.

3.3 L1CAM positive und L1CAM-defiziente Zelllinien zeigen die gleiche subzelluläre Lokalisation von REST

In den vorhergehenden Experimenten konnte die Funktionalität von REST bei der L1CAM-Regulation in EK-Zelllinien nachgewiesen werden. Bisher ungeklärt blieb die Frage, warum ein Teil der EKe eine scheinbar konstitutive Expression von L1CAM aufweist, während ca. 70% - 80% der EKe L1CAM-negativ sind (Pfeifer et al., 2010, Fogel et al., 2003). L1CAM positive Tumoren zeigen zum Teil eine massive Expression des Proteins, welche sich über den gesamten soliden Tumor erstreckt. Dieses Phänomen kann nicht allein durch die TGF- β 1 induzierte L1CAM-Expression erklärt werden.

Eine ähnliche Situation liegt auch bei EK-Zelllinien vor. Ein Teil der Zelllinien zeigt eine sehr schwache bis nicht detektierbare L1CAM-Expression. Der andere Teil zeigt im Gegensatz dazu eine sehr starke L1CAM-Expression. Eine veränderte Subzelluläre Verteilung von REST ist daher von Interesse, da sie die Unterschiede im L1CAM-Expressionsmuster erklären könnte.

Mithilfe der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die zelluläre Lokalisation von REST in den EK-Zelllinien untersucht. Wie bei aktiven Transkriptionsfaktoren üblich, ist auch REST normalerweise im Nukleus der Zelle lokalisiert. Allerdings ist bekannt, dass die Lokalisation durch verschiedene Ereignisse reguliert werden kann. So besitzt das REST-Protein ein NLS- (*nuclear localisation side*) und ein Zinkfinger 5-Motiv (Shimojo et al., 2001), welche den Kerntransport des Moleküls regulieren. Außerdem ist REST auch mit anderen Proteinen wie z.B. PRICKLE1 (RILP) (Shimojo and Hersh, 2003), HIT (Zuccato et al., 2003) oder DCTN1 (Shimojo, 2008) assoziiert. Auch diese beeinflussen die Lokalisation von REST. Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie sollte die subzelluläre Lokalisation von REST in den Zelllinien EN1, ECC1, Hec1A, Hec1B, MFE296 und SPAC1L untersucht werden. Die konfokalen Mikroskop Aufnahmen zeigten jedoch keine Unterschiede in der subzellulären Verteilungen von REST. Sowohl bei den L1CAM-defizienten Zelllinien, ECC1, Hec1A, MFE296 und EN1, als auch bei den L1CAM positiven Zelllinien, Hec1B und SPAC1L, wurde REST ausschließlich im Kern der Zellen detektiert. Eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation von REST kommt somit nicht als Erklärung für die unterschiedliche L1CAM-Expression in Betracht.

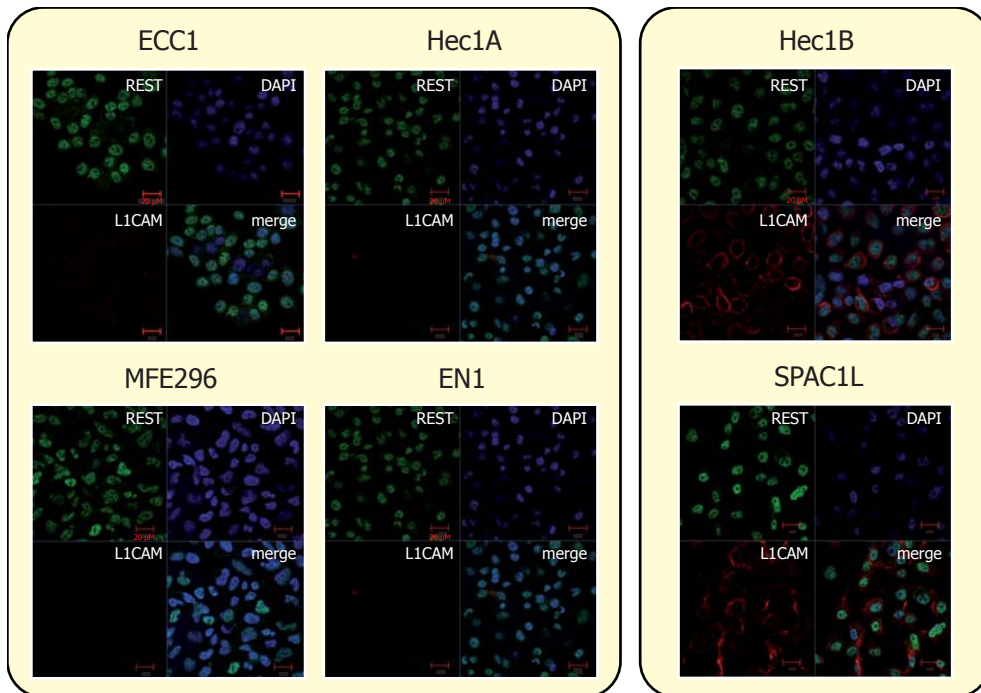


Abbildung D 15 Subzelluläre Lokalisation von REST in unterschiedlichen EK-Zelllinien. Die Detektion von REST und L1CAM erfolgte durch spezifische Erstantikörper und Alexa488-konjugierten Zweitantikörper gegen den REST-Antikörper, bzw. durch einen Alexa647-konjugierten Zweitantikörper gegen den L1CAM Antikörper. Die Kerne wurden mit Hilfe von DAPI angefärbt. Konfokale Aufnahmen wurden bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.4 Alternatives Splicing von REST spielt nur eine untergeordnete Rolle in EK-Zelllinien

Eine Arbeit von Wagoner et al. (2010) zeigte, dass es in Brusttumoren zum alternativen Splicing des REST-Primärtranskripts kommt. Aus diesem Ereignis geht eine *loss of function* Version von REST hervor. Die mRNA-Isoform des REST4-Proteins (Isoform3) beinhaltet im Gegensatz zur normalen mRNA-Isoform (Isoform1) ein zusätzliches Exon (Exon4) und kodiert für ein Stopcodon. Das führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. Dem als REST4 bezeichneten C-Terminal verkürzten Protein fehlen die Zinkfingerdomänen 5-7 sowie die Repressordomäne 2 (Palm et al., 1998). Das hat zu Folge, dass Brusttumore mit einer übermäßigen REST4-Expression REST-Zielgene überexprimieren (Wagoner et al. 2010). In anderen Tumorentitäten wie z.B. in Neuroblastoma-Zelllinien (Palm et al., 1999) oder SCLC-Zelllinien (Coulsen et al., 2001) und -Tumoren konnte die alternative Form REST4 ebenfalls nachgewiesen werden.

Durch eine spezifische PCR und qRT-PCR wurde analysiert, in welchem Maße REST4-mRNA in den hier untersuchten EK-Zelllinien exprimiert wird. In Abbildung D16 ist ein Schema der PCR-Strategie zur Detektion der unterschiedlichen Splice-Varianten dargestellt. Nach der Durchführung der PCR konnte in allen Zellen die REST mRNA-Isoform3 nachgewiesen werden (Abb. D17). Dabei wurde in den Zelllinien EN1 und Hec1B die höchste Produktmenge detektiert. Wie erwartet, ergab eine Sequenzierung der entsprechenden Amplifikate, dass diese das Exon4 beinhalteten (s. Anhang). Beide Zelllinien exprimieren allerdings

unterschiedlich stark L1CAM. Auch bei den übrigen EK-Zelllinien ist kein Zusammenhang zwischen der L1CAM- und REST4-Expression erkennbar. Die beiden SCLC-Zelllinien H1299 und H1390 dienten lediglich als Positiv- bzw. Negativkontrolle für die REST4-Expression.

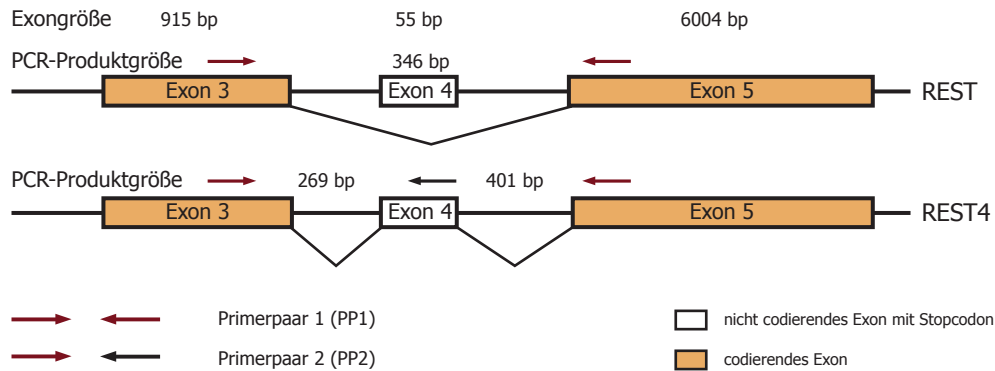


Abbildung D 16 Strategie zur Detektion der nativen REST-Variante und der alternativen Splice-Variante REST4. Zur Detektion wurden zwei unterschiedliche Primerpaare (PP1 und PP2) verwendet. Je nach Isoform erhält man mit dem PP1 zwei unterschiedliche Fragmentgrößen. Bei der mRNA-Isoform 1 (REST) erhält man eine PCR-Produktgröße von 346 bp. Die Isoform 3 mit dem zusätzlichen Exon 4 ergibt eine Produktgröße von 401 bp. Zur spezifischen Detektion des Exon 4 wurde das PP2 verwendet. Das PP2 detektiert ausschließlich die Isoform 3 und man erhält eine Produktgröße von 269 bp.

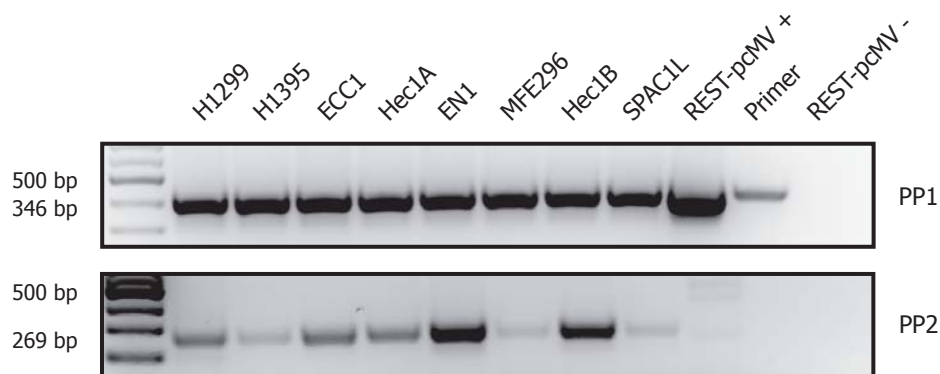


Abbildung D 17 PCR zur Detektion unterschiedlicher REST mRNA-Isoformen. Für den Nachweis wurde von jeder Zelllinie die Gesamt-mRNA isoliert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription in cDNA. Pro PCR-Ansatz wurden 10 ng der cDNA eingesetzt. Von jeder cDNA erfolgte eine Amplifikation mit dem PP1 und dem PP2. H1299 und H1395-Zellen sind als negativ für die Isoform 3 beschrieben wurden. REST-pCMV + ist die entsprechende Positivkontrolle mit dem REST-pCMV-Vektor als Template. Bei der Wasserkontrolle wurde die PCR-Reaktion ohne Primer bzw. das Template angesetzt (Primer, REST-pCMV-).

Um die Quantität der REST4-Expression zu bestimmen wurde eine qRT-PCR mit der gleichen cDNA durchgeführt. Die qRT-PCR erlaubt eine genauere Aussage über das Expressionsniveau der einzelnen REST-Isoformen und deren Einfluss auf die L1CAM-Regulation. Die durchgeführte qRT-PCR (s. Abb.

D18) bestätigte das Ergebnis aus den vorhergehenden Versuchen. Das relativ konstante Expressionslevel von REST konnte bereits bei der Zellcharakterisierung gezeigt werden. Außerdem ist keine elementare Differenz in der Expressionsstärke der Isoform3 erkennbar. Bei allen Proben liegt die Signalstärke im pmol-Bereich des verdünnten Standards. Der gebildete Quotient aus den Expressionsstärken der unterschiedlichen Isoformen variiert zwar stark zwischen den Zelllinien, dennoch ist das Niveau der REST4-Expression in allen Zelllinien niedriger als das der REST-Expression. Die dominant negative Isoform3 spielt somit in allen Zellen nur eine untergeordnete Rolle.

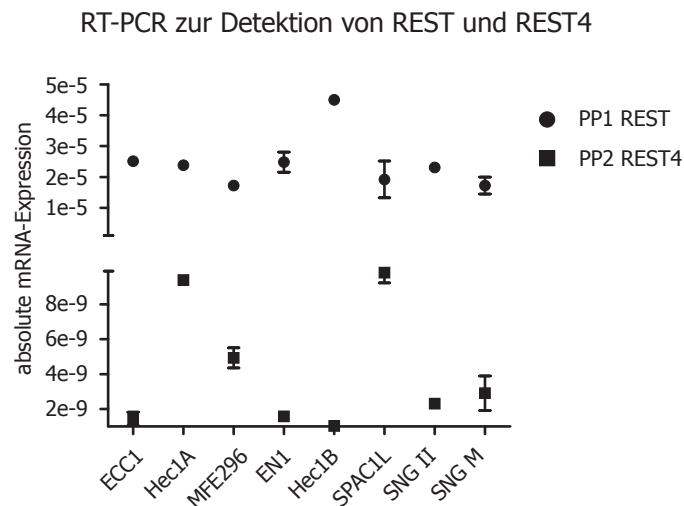


Abbildung D 18 *qRT-PCR zur Detektion von der mRNA von REST und REST4. Verwendet wurden die gleichen Primerpaare wie in Abb. D16 beschrieben. Zur Bestimmung der absoluten mRNA-Expression wurde ein externer Standard verwendet. Der externe Standard besteht aus PCR-Produkten der verwendeten Primer. Diese wurden aus einem Agarose-Gel isoliert und vermessen. Anschließend wurden sie so verdünnt, dass man eine lineare Eichgerade erhält. Die einzelnen Verdünnungen werden anschließend in der qRT-PCR eingesetzt. Anhand der Eichgerade und der bekannten Ausgangskonzentration der PCR-Produkte, kann bei entsprechender Signalstärke die absolute mRNA-Expression der einzelnen Proben bestimmt werden. Untersucht wurde die Expression von acht EK-Zelllinien.*

Zelllinien	ECC1	Hec1A	EN1	MFE296	Hec1B	SPAC1L	SNG II	SNG M
Quotient PP1/PP2	17552,45	2531,91	3488,84	15696,20	4582,48	38631,79	10000,00	5910,65

Tabelle D 2. *Quotienten aus der absoluten mRNA-Expression von REST (PP1) und REST4 (PP2). Ein niedriger Quotient bedeutet eine höhere REST4-Expression im Verhältnis zur REST-Expression.*

3.5 Die Bindungsaffinität zum RE-1 Bindemotiv ist in L1CAM-defizienten Zelllinien höher

In vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass REST in EK-Zelllinien einen Einfluss auf die L1CAM-Expression hat. So führte eine siRNA vermittelter Knock down von REST zu einer erhöhten L1CAM-Expression (s. Abb. D13 und D14). Im Gegenzug führte eine REST-Überexpression zur Repression von L1CAM (s. Abb. D12). Dennoch konnte keine befriedigende Erklärung dafür gefunden werden, in welchem Maße endogenes REST zu den unterschiedlichen L1CAM-Expressionsleveln der Zelllinien beiträgt. Alle Zelllinien hatten ein weitestgehend gleiches REST-Expressionslevel (s. Abb. D2 und D3) und zeigten keine Unterschiede in der subzellulären Lokalisation von REST (s. Abb. D15). Auch die dominant negative Isoform REST4 wird in allen Zelllinien nur sehr schwach exprimiert. Für die Aktivität eines Repressors ist es allerdings auch entscheidend in welchem Maß er mit den DNA-Bindemotiven interagiert.

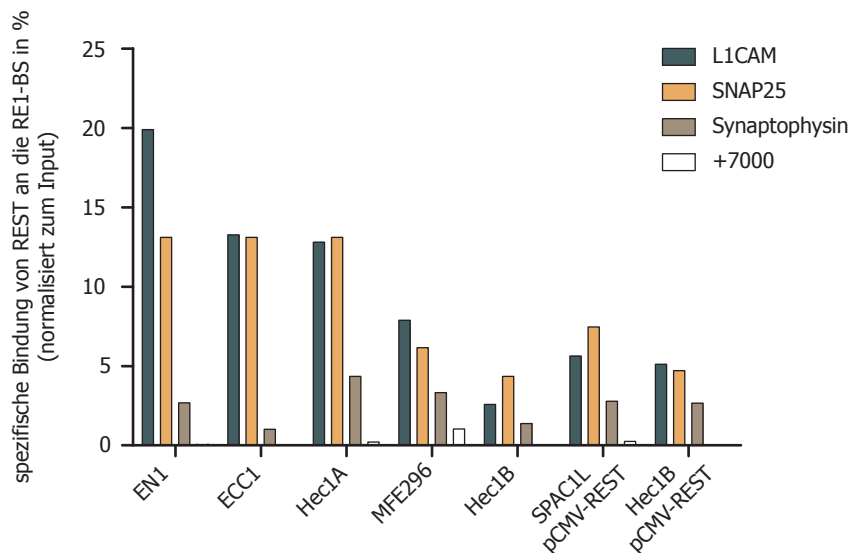


Abbildung D 19 ChIP mit REST-spezifischen Antikörper. Analysiert wurde die Bindung von REST an das Bindemotiv RE1. Neben L1CAM wurden ebenfalls die Promotoren von SNAP25 und Synaptophysin auf eine REST-Interaktion untersucht. Als Negativkontrolle für die REST-Bindung diente eine Region 7000 bp vor der L1CAM Promoterregion. Für die Analyse wurde Chromatin von den Zelllinien EN1, ECC1, Hec1A, MFE296 und Hec1B verwendet. Zusätzlich wurde ebenfalls das Chromatin aus mit REST-pCMV transfizierten Zellen verwendet (Hec1B pCMV-REST, SPAC1L pCMV-REST). Die Auswertung erfolgte über qRT-PCR und die Daten wurden zum Input normalisiert. Gezeigt ist das repräsentative Ergebnis aus zwei unabhängigen Ergebnissen.

Durch eine ChIP-Analyse wurde die Bindungsaffinität von REST zu dem RE1-Bindemotiv im L1CAM-Promoter untersucht. Für die Immunpräzipitation wurde ein REST-spezifischer Antikörper verwendet. Die Analyse durch qRT-PCR ergab eine hohe Interaktion von REST mit dem RE1-Bindemotiv in den L1CAM-defizienten Zelllinien. Am stärksten bindet REST an das RE1-Motiv innerhalb des L1CAM-Lokus bei EN1 Zellen. Im Vergleich dazu war das Level an konstitutiv gebundenen REST an die Bindestelle im L1CAM-Promoter in MFE296-Zellen um die Hälfte reduziert. Von den vier L1CAM-defizienten Zelli-

nien besitzen die MFE296-Zelllinien damit die geringste REST-Interaktion mit dem L1CAM-Promoter. Allerdings war die Menge präzipitierter DNA bei der L1CAM positiven Zelllinie Hec1B deutlich geringer als bei den MFE296 Zellen. Die Bindung von endogenem REST ist in Hec1B-Zelllinien mehr als dreifach geringer. Eine Steigerung der REST-Bindung konnte durch eine Überexpression von REST erreicht werden. Dennoch liegt in beiden pCMV-REST transfizierten Zellen der Level an gebundenen REST immer noch unter dem der L1CAM-defizienten Zelllinien. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für die zwei weiteren untersuchten RE1-Bindemotive. Jeweils ein regulatives Element ist in den Promotoren von SNAP25 und Synaptophysin zu finden. Dabei bindet REST generell schwächer an das Motiv im Promoter von Synaptophysin. Die gewählten EK-Zelllinien weisen Unterschiede in der Interaktion von REST mit dem regulativen Element RE1. Diese Resultate könnten eine erste Erklärung für die differenzielle L1CAM-Expression bei den Zelllinien sein.

4. Epigenetische Regulation von L1CAM

Arbeiten aus den letzten Jahren belegen eine Beteiligung von epigenetischen Mechanismen bei der Regulation von L1CAM. So zeigten Kuwajima et al. (Kuwajima et al., 2007), dass die Histon-Deacetylase-Inhibitoren TSA und Butyrat in B16-BL6 Melanomzellen zu einer erhöhten Expression von Mel-CAM und L1CAM führen. Eine weitere Gruppe um Cato belegte außerdem eine inverse Korrelation zwischen der Methylierung des L1CAM-Promoters und der L1CAM-Expression bei kolorektalen Karzinomen (Kato et al., 2009). Zunehmend werden auch Zusammenhänge zwischen Epigenetik und Tumorprogression des EK hergestellt (Balch et al., 2010; Tao and Freudenheim, 2010). Im Verlauf dieser Arbeit, wurde der direkte Einfluss epigenetischer Mechanismen auf die L1CAM-Expression in EK-Zelllinien untersucht.

4.1 Histon-Deacetylase-Inhibitoren führen zu einer erhöhten Expression von L1CAM

Aus der Vielzahl unterschiedlicher Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC-Inhibitoren) wurden Trichostatin A und Valproinsäure auf ihre Effektivität in EK-Zelllinien getestet. Trichostatin A blockiert selektiv die Funktion von Klasse I- und Klasse II-Histonen und führt zu einem Arrest des Zellzyklus in eukaryotischen Zellen (Vanhaecke et al., 2004). TSA wurde aus dem Bakterium *Streptomyces patensis* isoliert und wirkt als Antibiotikum gegen Pilze. Im Gegensatz dazu ist die Valproinsäure (VA) eine synthetisch chemische Komponente und inhibiert ausschließlich die Histon-Deacetylase-I. Beide Komponenten werden seit einiger Zeit auf ihre Wirksamkeit als Chemotherapeutikum getestet. Durch die Behandlung wurde versucht den Effekt der zwei Inhibitoren TSA und Valproinsäure auf die L1CAM-Expression in EK-Zelllinien nachzuweisen. Um eine minimal effektive Konzentration zu bestimmen wurde eine Titration der beiden Komponenten durchgeführt. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen von TSA und Valproinsäure zu den zwei Zelllinien Hec1A und ECC1 gegeben. Die Behandlung erfolgte jeweils über einen Zeitraum von 24 h, anschließend wurde die mRNA für die qRT-PCR isoliert.

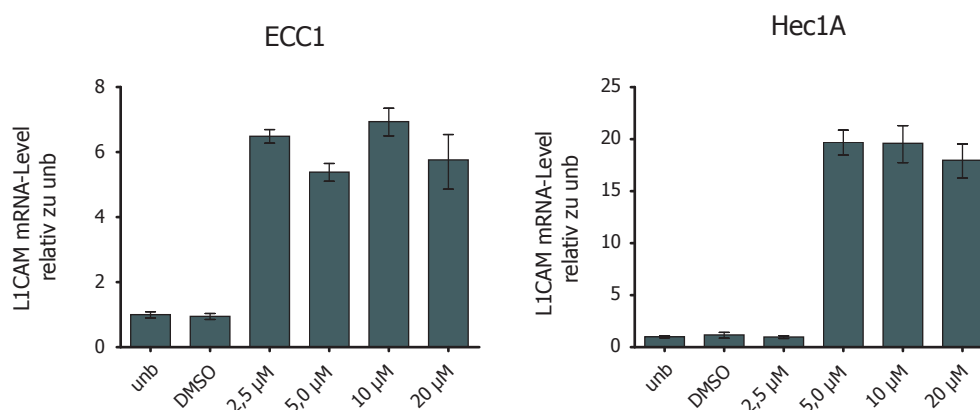


Abbildung D 20 qRT-PCR zur Bestimmung des L1CAM mRNA-Levels. Die Zelllinien wurden mit den angegebenen TSA-Konzentrationen für 24 h behandelt. In der Abb. ist der mRNA-Level relativ zu unbehandelt dargestellt. Alle Daten wurden zu den von β -aktin normalisiert. DMSO stellt die Lösungsmittelkontrolle dar.

L1CAM wurde bei allen verwendeten Konzentrationen auf ein ähnliches Level hochreguliert. Dabei lag die Mindestkonzentration zur Induktion der L1CAM mRNA-Expression in ECC1-Zellen bei 2,5 μM TSA und bei Hec1A-Zellen bei 5 μM TSA. Für alle nachfolgenden Experimente wurden die Zellen mit der minimalen TSA-Konzentration aus der Western-Blot-Analyse behandelt. Hier zeigten beide Zelllinien bereits bei der Behandlung mit 0,5 μM TSA sowohl bei der Histonacetylierung als auch bei der L1CAM-Regulation einen deutlichen Effekt (s. Abb. D20).

Die Effekte der HDAC-Inhibitoren wurden zusätzlich auf Protein-Ebene validiert. Dazu wurden Gesamtzelllysate für Westernblot-Analysen hergestellt. In Abbildung D 21 ist eine deutliche Zunahme des L1CAM-Proteinlevels in Abhängigkeit der HDAC-Inhibitor-Konzentration zu sehen. Sowohl TSA als auch Valproinsäure führen in beiden Zelllinien zu einer erhöhten L1CAM-Expression. Es kommt ebenfalls zu einer Zunahme des acetylierten Histon 3-Proteins. Eine erhöhte Acetylierung von Histonen ist eine Folge der blockierten HDAC-Funktion und ein Indikator für die Effizienz der HDAC-Inhibitoren. Dabei ist eine ansteigende Acetylierung schon bei der am geringsten gewählten Konzentration von TSA und Valproinsäure zu erkennen.

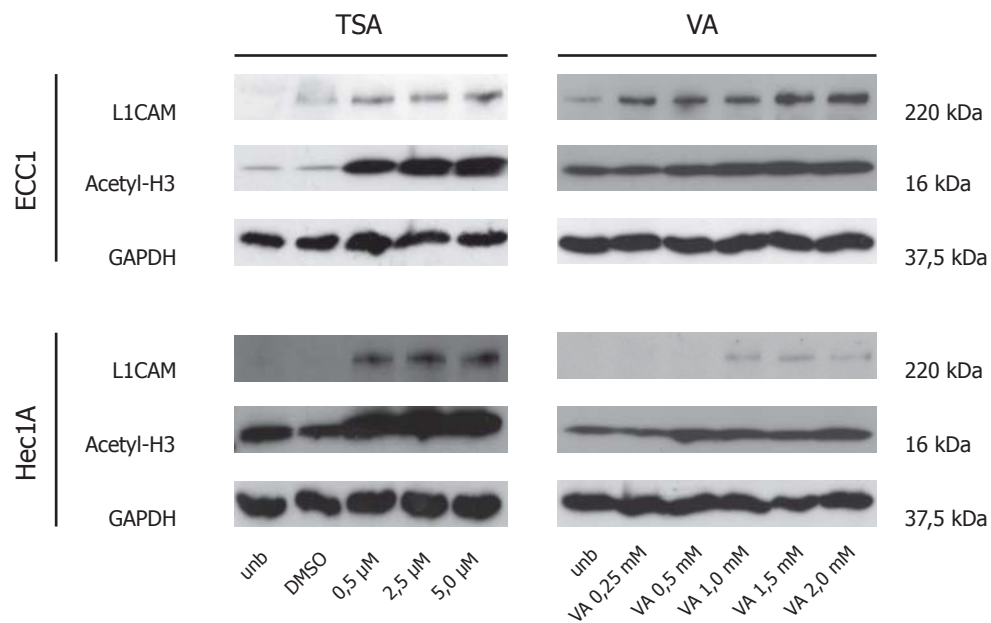


Abbildung D 21 Western-Blot-Analysen von EK-Zelllinien nach TSA und VA-Behandlung. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der entsprechenden Substanz für 24 h behandelt. Zur Detektion der Proteinlevel wurden spezifische Antikörper gegen L1CAM, acetyliertes Histon 3 (Acetyl-H3) und GAPDH verwendet, letzteres diente als Ladekontrolle.

4.2 CT-X-Gene (cancer testis genes) werden in EK-Zelllinien epigenetisch reguliert

Die CT-X-Gene sind, wie L1CAM, auf dem X-Chromosom lokalisiert und werden ähnlich wie L1CAM nicht von Normalgewebe exprimiert. Bei allen Genen ist die Expression auf das Testisgewebe oder andere immunprivilegierte Gewebe beschränkt. Darüber hinaus konnten sie bereits in mehreren Tumorentitäten nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass die CT-X-Gene sehr stark durch epigenetische Effekte reguliert werden und im somatischen Gewebe sind die Promotoren durch eine Hypermethylierung gekennzeichnet. In der Literatur sind additive Effekte von 5'-AzaC und TSA bei epigenetisch regulierten Genen beschrieben (Gjerstorff et al., 2009). Auch bei Genen aus der Gruppe der CT-X-Gene (*cancer testis genes*) konnte dieser Effekt nachgewiesen werden (James et al., 2006; Oi et al., 2009). Ein Anstieg der Expression von CT-X-Genen ist somit ein Indikator für eine Änderung des Methylierungsmusters bzw. eine zunehmende Hypomethylierung. Die Gemeinsamkeiten zwischen CT-X-Genen und L1CAM werfen die Fragen auf, inwiefern die Gene im EK epigenetisch reguliert sind und ob es eine Co-Regulation in den Zellen gibt? Um diese Fragen zu beantworten, wurde die Expression von CT-X-Genen in EK-Zelllinien und Tumorgewebeschnitten untersucht. Außerdem wurde die Änderung der Expression nach der Inhibition von HDACs und DNMTs betrachtet. Wie vorher beschrieben, wurden die Zellen ebenfalls mit 5'-AzaC oder TSA behandelt.

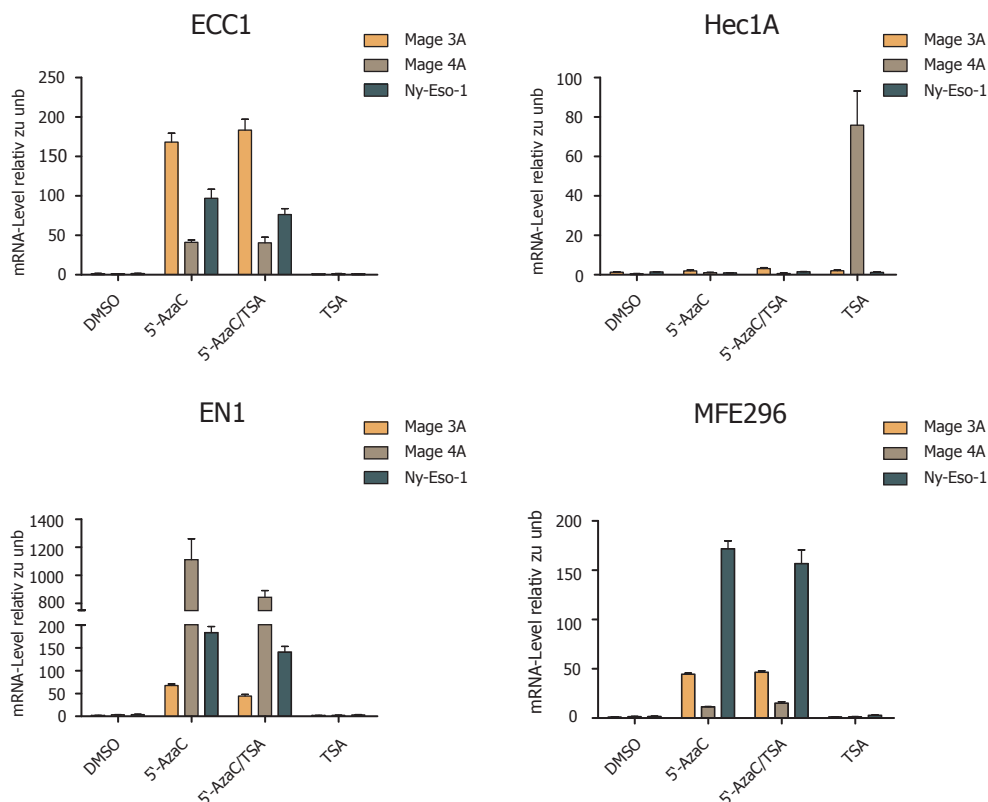


Abbildung D 22 qRT-PCR-Analyse zur Bestimmung der mRNA-Level von Mage 3A, Mage 4A und Ny-Eso-1. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einem von drei unabhängigen Experimenten. Die Zellen wurden jeweils mit 5'AzaC (5 μ M), TSA (500 nM) allein oder mit beiden in Kombination behandelt. Die Dauer der Behandlung betrug 5 d bei 5'AzaC bzw. 1 d bei TSA. Alle Daten wurden zu denen von β -aktin normalisiert.

Die drei getesteten CT-X-Gene Mage 3A, Mage 4A und Ny-Eso-1 durch die Inhibition von HDACs und DNMTs in den EK-Zelllinien hochreguliert (s. Abb. D22). Für die Zelllinie Hec1A zeigte sich hier kein Effekt nach 5'AzaC-Behandlung. Bei den anderen drei Zelllinien (ECC1, EN1, MFE296) war das Ausmaß der Regulation der einzelne CT-X-Gene unterschiedlich stark und variierte auch unter den Zelllinien. Im Allgemeinen war die Induktion durch 5'AzaC wesentlich stärker als durch TSA. Dieses Phänomen wurde bereits für einige der hier untersuchten CT-X-Gene beschrieben (Gjerstorff et al., 2009). Das Experiment zeigt, dass bis auf Hec1A-Zellen, alle EK-Zelllinien sensitiv für die Behandlung mit den Inhibitoren sind und die Blockierung der jeweiligen Enzyme zu einer veränderten Expression von epigenetisch regulierten Genen führt.

4.3 DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5'-AzaC induziert L1CAM-Expression in L1CAM-defizienten Zellen

Neben der Histonmodifizierung ist die DNA-Methylierung ein weiterer Hauptmechanismus der Epigenetik. Die DNA-Methylierung erfolgt in mit CpGs angereicherten Regionen, sogenannten CpG-Inseln.

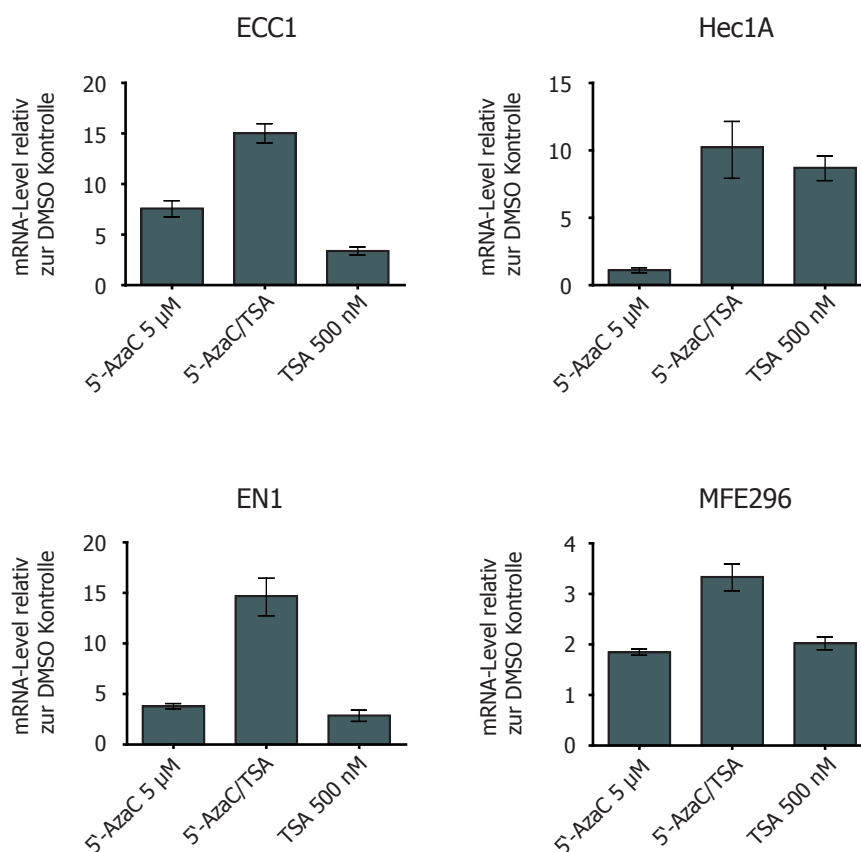


Abbildung D 23 *qRT-PCR-Analyse zur Bestimmung des L1CAM-mRNA-Levels. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einem von drei unabhängigen Experimenten. Die Zellen wurden jeweils mit 5'AzaC (5 µM) oder TSA (500 nM) allein oder mit beiden in Kombination behandelt. Die Dauer der Behandlung betrug 5 d bei 5'AzaC bzw. 1 d bei TSA. Alle Daten wurden zu denen von β-aktin normalisiert.*

Die Inseln sind hauptsächlich in repetitiven Elementen sowie Zentromer- und Promoterregionen bestimmter Gene lokalisiert (Bird, 2002; Weber and Schubeler, 2007). Auch im L1CAM-Promoter wurden nach einer *in silico*-Analyse CpG-Inseln identifiziert. Mithilfe des Demethylierungsreagenz 5'-AzaC wurde überprüft, inwiefern die DNA-Methylierung in die L1CAM-Regulation in EK-Zelllinien eingreift. Dazu wurden unterschiedliche Zelllinien mit dem Inhibitor behandelt und auf Veränderungen im Methylierungsmuster und der L1CAM-Expression, sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene, untersucht.

Die Effekte der 5'AzaC-Behandlung auf die L1CAM-Expression sind in Abbildung D 23 zu sehen. Neben 5'-AzaC wurden die Zellen ebenfalls mit TSA oder mit einer Kombination aus beiden Inhibitoren behandelt. Der Einfluss von TSA auf die L1CAM-Expression wurde bereits vorher beschrieben (s. Abb. D 20 und D 21) und konnte in diesem Experiment bestätigt werden. Alle untersuchten Zellen zeigten einen Anstieg der L1CAM-Expression nach Zugabe von TSA. Ähnlich starke Effekte zeigte die 5'AzaC-Behandlung. Mit Ausnahme der Hec1A-Zellen kam es hier ebenfalls bei allen Zellen zu einer Hochregulation von L1CAM. Bei der dualen Behandlung wurde der additive Effekt der beiden Inhibitoren getestet. Dabei konnten für die L1CAM-Regulation additive Effekte nach der Behandlung mit beiden Inhibitoren beobachtet werden. Lediglich bei den Hec1A-Zellen war kein Unterschied im Anstieg der L1CAM-mRNA im Vergleich zur TSA-Behandlung zu detektieren. Das Ergebnis deckt sich allerdings mit dem konstanten L1CAM-Level nach der 5'AzaC-Behandlung.

Die Sensitivität der Zelllinien gegenüber den einzelnen Inhibitoren, wurde ebenfalls auf Ebene der Proteinexpression untersucht. Zunächst wurde eine Analyse der L1CAM-Oberflächenexpression und anschließend eine Westernblot-Analyse zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge durchgeführt.

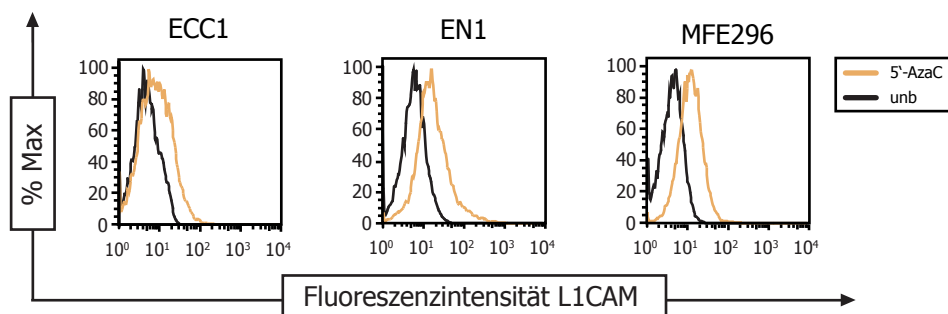


Abbildung D 24 FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression von L1CAM. Die Zellen wurden für 5 d mit 5'AzaC (5 μ M) behandelt. Anschließend erfolgte die Detektion durch einen L1CAM-Ektodomänen spezifischen Antikörper (L1-11a) und gam-PE-Zweitantikörper. Dargestellt sind die L1CAM-Oberflächenexpression der unbehandelten Zellen (schwarze Linie) und der 5'-AzaC-behandelten Zellen (gelbe Linie).

In Abbildung D 24 ist eine deutliche Hochregulation der L1CAM-Oberflächenexpression nach 5'-AzaC-Behandlung zu erkennen. Das Ergebnis ist eine erste Bestätigung der mRNA-Analyse aus Abbildung D 23. Ebenso wie in diesem Experiment, zeigen auch die FACS-Analysen der drei Zelllinien ECC1, EN1 und MFE296 eine erhöhte L1CAM-Expression nach einer Inhibition der DNA-Methyltransferasen. Für die Analyse der Gesamtproteinmenge wurden die Zellen erneut mit 5'AzaC oder TSA allein bzw. mit einer Kombination der beiden Inhibitoren behandelt.

Die Behandlung mit den beiden Inhibitoren führte ebenfalls zu einem Anstieg der L1CAM-Gesamtproteinmenge (Abb. D 25). Lediglich bei der Zelllinie EN1 war kein Effekt zu beobachten. Bei den EN1-Zellen konnte zwar eine L1CAM-Regulation auf mRNA-Level detektiert werden, dennoch scheint ein Nachweis dieses Effekts per Western-Blot-Analyse nicht möglich. Dagegen konnte bei den ECC1- und Hec1A-Zellen eine deutliche Erhöhung der L1CAM-Expression nachgewiesen werden. Während es in Hec1A-Zellen jedoch erneut nur unter Beteiligung von TSA zu einer stärkeren Expression kommt, reagierten ECC1-Zellen bei allen Behandlungen mit einer Zunahme von L1CAM. Bei der Zelllinie MFE296 konnte nur nach der Doppelbehandlung mit 5'-AzaC und TSA ein erhöhtes L1CAM-Level detektiert werden. Das wäre eine Bestätigung des beobachteten additiven Effekts bei der Analyse der mRNA-Level (Abb. D 22).

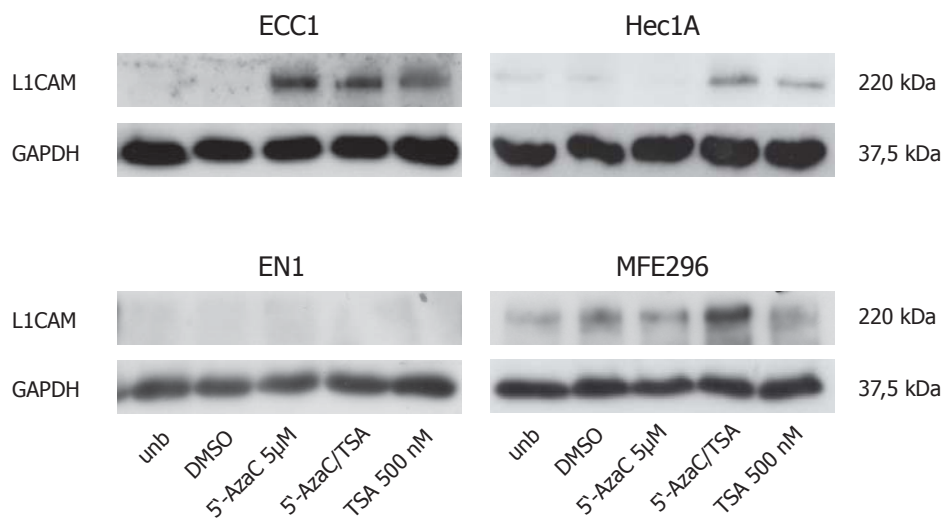


Abbildung D 25 Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteinmenge von L1CAM. Vier unterschiedliche EK-Zelllinien wurden für 5 d mit 5'AzaC (5µM) oder 1 d mit TSA (500 nM) behandelt und zusätzlich mit einer Kombination aus beiden Substanzen. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet. GAPDH diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten.

4.4 Spezifische siRNA gegen DNMT1 mRNA induziert die L1CAM-Expression

Um die Daten aus den Inhibitorexperimenten zu verifizieren, wurden die Zelllinien ECC1 und Hec1A mit spezifischer siRNA gegen DNMT1-mRNA transfiziert.

Die DNA-Methyltransferase 1 ist das zentrale Molekül bei der Aufrechterhaltung des chromosomalen Methylierungsmusters. Demzufolge führt eine veränderte DNMT1-Funktion zu einer Änderung des Methylierungsmusters. DNMT1 bindet mit erhöhter Affinität an hemimethylierte DNA und besitzt dabei eine sieben bis 100-fach höhere Aktivität gegenüber unmethylierter DNA (Bestor, 1992; Pradhan et al., 1999). Die erhöhte Affinität und Aktivität gegenüber hemimethylierter DNA ist essentiell für die Wiedererkennung und Wiederherstellung des Methylierungsmusters nach einer Zellteilung. In Folge der siRNA vermittelten Herabregulierung der DNA-Methyltransferase 1 kommt es zu einer Hypomethylierung des Chromatins. Die Folge wäre eine erhöhte Expression epigenetisch regulierter Gene. Stellvertretend dafür wurden drei CT-X-Gene ausgewählt, von denen bekannt ist das deren Expression stark durch epigenetische Ereignisse beeinflusst werden (James et al., 2006).

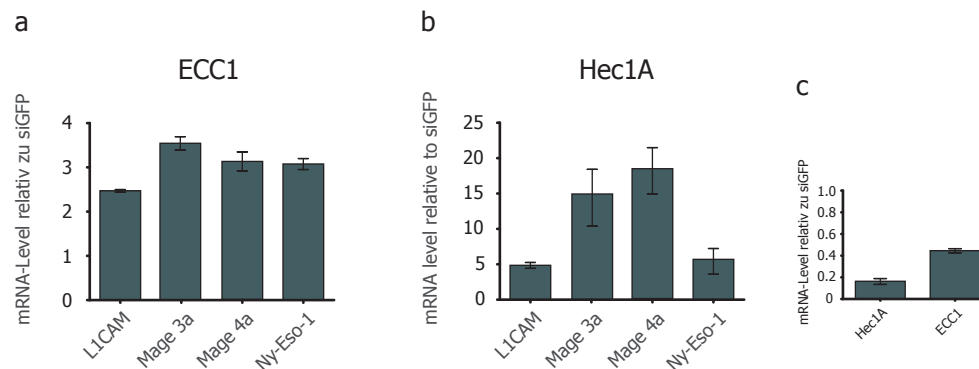


Abbildung D 26 qRT-PCR-Analyse zur Bestimmung der mRNA-Level von L1CAM, Mage 3a, Mage 4a und Ny-Eso-1 in (a) ECC1- und (b) Hec1A-Zellen. Die Zellen wurden mit DNMT1 siRNA transfiziert. Nach 72 h erfolgte die Analyse der mRNA-Level. (c) Effizienz der siRNA-Transfektion. Die mRNA-Level sind relativ zur Kontrolle (siGFP) dargestellt. Alle Daten wurden zu Denen von β -aktin normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten.

In ECC1- und Hec1A Zellen führte eine Transfektion mit spezifischer DNMT1 siRNA ebenfalls zu einer Hypomethylierung und einer erhöhten L1CAM-Expression. Die Zunahme der L1CAM-Expression war auf mRNA-Level in beiden Zelllinien deutlich zu erkennen (Abb. D26). Bei ECC1 (Abb. D26 a) stieg der L1CAM-mRNA-Level nach der Transfektion mit DNMT1 siRNA um das 2,5-fache. Noch deutlicher war der Effekt in Hec1A-Zellen. Hier erhöhte sich der L1CAM-mRNA-Level um das 5-fache. Ebenfalls zu beobachten war ein Anstieg in der Expression der drei untersuchten CT-X-Gene.

Da CT-X-Gene im Allgemeinen sehr stark durch DNA-Methylierung reguliert werden, ist die DNMT1 siRNA vermittelte Hochregulation ein Hinweis für eine Änderung der Epigenetik der Zellen. Die Regulation von L1CAM ist demnach ebenfalls eine Folge der geänderten Epigenetik. Die Änderung der L1CAM-Expression konnte ebenfalls auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb D27). Auch hier kam es nach der DNMT1 siRNA-Transfektion zu einer Erhöhung des L1CAM-Proteinlevels (Abb. D27). Die Effizienz der

DNMT1 siRNA in diesem Experiment ist in Abbildung D26 c dargestellt. Wie auf mRNA-Ebene kam es auch auf Proteinebene in beiden Zelllinien zu einem Anstieg der L1CAM-Expression. Für die CT-X-Gene konnte dagegen nicht für alle analysierten Proteine eine Zunahme detektiert werden. Bei den ECC1-Zellen stieg die Proteinmenge nur im Falle von Mage 3a und Mage 4a. Während es bei den Hec1A-Zellen nur bei Mage 4a und Ny-Eso-1 zu einer Zunahme kam.

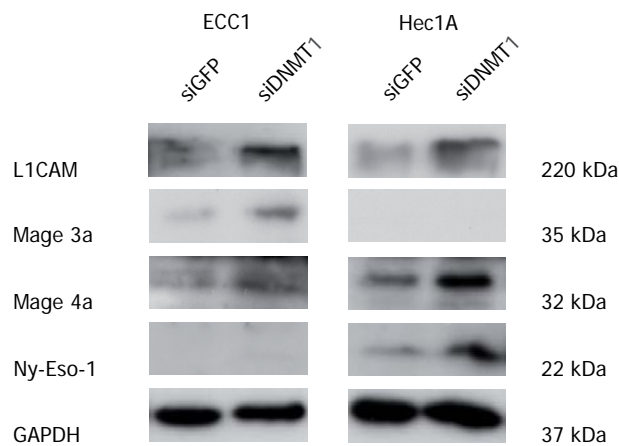


Abbildung D 27 *Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteinexpression von L1CAM, Mage 3a, Mage 4a und Ny-Eso-1. Die Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen DNMT1 (siDNMT1) oder Kontroll-siRNA (siGFP) transfiziert. 72 h nach der Transfektion erfolgte die Analyse. GAPDH diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten*

4.5 5'-AzaC reduziert die DNA-Methylierung des L1CAM-Promoters

Um zu untersuchen ob 5'-AzaC zu einer Änderung der DNA-Methylierung führt, wurde eine Methyl-Lichte-PCR durchgeführt. Hiermit sollte gezeigt werden, dass es durch die Behandlung zu einer Änderung des DNA-Methylierungsmusters im Bereich des L1CAM-Promoters kommt und somit die Aktivität des Promoters beeinflusst wird. Dadurch könnte ein direkter Beitrag der DNA-Methylierung zur L1CAM-Expression bestätigt werden.

Die Methyl-Lichte-Methode ist eine auf qRT-PCR basierende Methode, bei der spezifische Primer und eine Hybridisierungsprobe verwendet werden. Beschrieben wurde diese Methode erstmals von Eads und Kollegen (2000) (Eads et al., 2000). Der eigentlichen PCR geht eine Bisulfit-Konvertierung voraus. Diese chemische Modifikation des isolierten Chromatins ist notwendig, um methylierte von nicht methylierten Cytosinen unterscheiden zu können. Denn durch die Behandlung des Chromatins mit Natriumhydrogensulfit, kommt es zu einer hydrolytischen Deaminierung aller nicht methylierten Cytosine im Chromatin. Die Deaminierung führt letzten Endes zu einer Konvertierung von Cytosin zu Uracil. Bei einer anschließenden PCR wird Uracil durch Thymin ersetzt. In einer Basenfolge werden somit alle nicht methylierten Cytosine durch Thymin ausgetauscht. Dieser Austausch wird wiederum beim Entwerfen der spezifischen Primer und Hybridisierungsprobe ausgenutzt. Man setzt spezifische Primer und Hybridisierungsprobe gegen nicht konvertierte-DNA und zusätzlich spezifische Primer und Probe gegen konvertierte DNA ein. Anschließend werden die zusammengehörenden Primer und Proben in einer qRT-PCR verwendet. Die erhaltenen Signal-

stärken werden anschließend gegen einen externen Standard normalisiert. Aus der Differenz der normalisierten Signalstärke lässt sich anschließend ableiten in welchem Maß das Chromatin methyliert war.

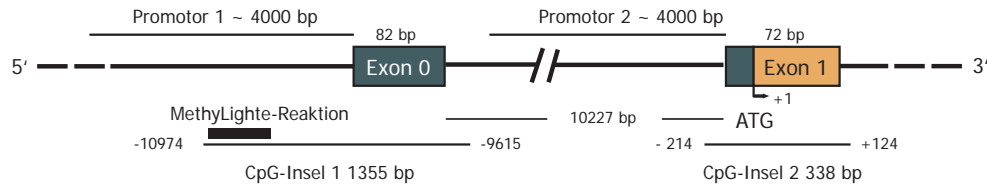


Abbildung D 28 Grafische Darstellung der L1CAM-Promoterstruktur. Die Position des PCR-Produkts der MethyLighte-Reaktion ist durch eine schwarz gefüllte Fläche dargestellt. Die im Umfang dieser Arbeit analysierten CpG-Inseln sind durch eine durchgehende Linie dargestellt. Die CpG-Insel 1 erstreckt sich über 1355 bp und beinhaltet das Exon 0. Die CpG-Insel 2 erstreckt sich über 338 bp und beinhaltet das Exon 1.

Die Lokalisation der spezifischen Primer und der Hybridisierungsprobe, welche für die L1CAM-spezifische MethyLight-Reaktion entworfen wurden, sind in Abbildung D28 dargestellt. Vor der Durchführung der MethyLight-Reaktion wurden die vier EK-Zelllinien EN1, ECC1, MFE296 und Hec1A für 5 d mit Azacytidin behandelt. Die Behandlung führte anschließend in drei von vier Zelllinien zu einer Hypomethylierung des L1CAM-Promoters (Abb. D29). Es ist deutlich zu sehen, dass die Reduktion des Methylierungsniveaus bei allen Zelllinien ca. 70 % betrug und es nur bei Hec1A zu keiner Abnahme der Methylierung kam.

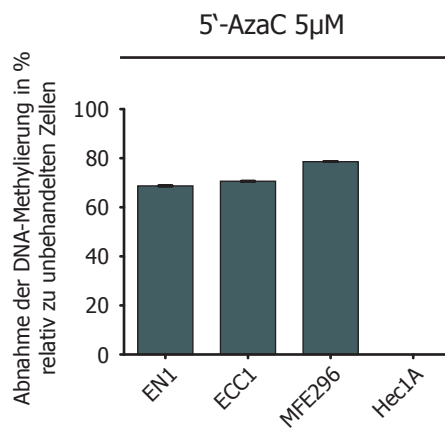


Abbildung D 29 MethyLighte-qRT-PCR zur Analyse der DNA-Methylierung nach 5'-AzaC-Behandlung. Die Zellen wurde für 5 d mit 5'-AzaC behandelt, anschließend das Chromatin isoliert, mit Natriumhydrogensulfid behandelt und für die qRT-PCR eingesetzt. Abgebildet ist die Reduktion der DNA-Methylierung in % relativ zu unbehandelten Zellen der entsprechenden Zelllinie. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen.

4.6 Die L1CAM Promotermethylierung unterscheidet sich bei stark und schwach exprimierenden Zellen.

Die Charakterisierung der Zelllinien ergab einen klaren Unterschied in der L1CAM-Expression. Man konnte die Zelllinien in drei Expressionstypen einteilen: Zellen ohne endogenes L1CAM, Zellen mit wenig endogenem L1CAM, Zellen mit viel endogenem L1CAM. In Zellen ohne endogenem L1CAM führte die Änderung der L1CAM-Promotermethylierung jedoch zu einer geänderten L1CAM-Regulation. So resultierte eine induzierte Hypomethylierung des L1CAM-Promoters in einer Zunahme des L1CAM-Levels. Im nächsten Schritt sollte der Einfluss der Promotermethylierung auf das endogene Expressionslevel untersucht werden. Dazu wurde der Grad der DNA-Methylierung im L1CAM-Promoterbereich bei unterschiedlich stark L1CAM-exprimierenden Zellen untersucht. Die Analyse der Methylierung wurde mittels MethyLight und konventioneller Bisulfit-Sequenzierung durchgeführt. Die Stärke der L1CAM-Expression wurde anschließend mit dem Grad der Methylierung korreliert.

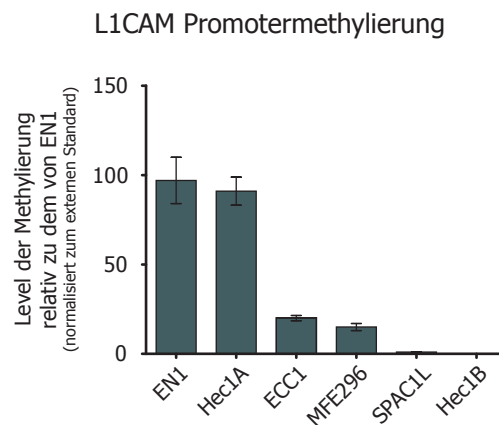


Abbildung D 30 *MethyLight-qRT-PCR zur Bestimmung der DNA-Methylierung in unterschiedlichen EK-Zelllinien. Analysiert wurden die Zelllinien EN1, Hec1A, ECC1, MFE296, SPAC1L und Hec1B. Aus den Zellen wurde das Chromatin isoliert, mit Natriumhydrogensulfit behandelt und anschließend für die qRT-PCR eingesetzt. Abgebildet ist der Level der Methylierung relativ zu dem der Zelllinie EN1 (EN1 = 100%). Die Zelllinien sind nach dem Grad der Methylierung von links nach rechts sortiert. Alle Daten wurden zu dem des externen Standards normalisiert. Abgebildet ist eine repräsentatives aus zwei unabhängigen Experimenten.*

Über die MethyLight-Reaktion wurde der Level der Methylierung bei sechs Zelllinien analysiert (Abb. D 30). Von den sechs Zelllinien exprimieren vier Zelllinien endogen kein L1CAM (EN1, Hec1A, ECC1 und MFE296) und zwei exprimieren endogen sehr stark L1CAM (SPAC1L, Hec1B). Grundsätzlich weisen dabei die vier Zelllinien ohne L1CAM eine wesentlich höhere Promoter-DNA-Methylierung auf, als die zwei Zelllinien mit starker L1CAM-Expression. Im Vergleich zu den am stärksten methylierten L1CAM-Promotoren von EN1 und Hec1A-Zellen, war die DNA der beiden Zelllinien SPAC1L und Hec1B nahezu unmethyliert. Es ist die klare Tendenz zu erkennen, dass der L1CAM-Promoter von stark L1CAM exprimierenden Zellen hypo- und der von nicht L1CAM exprimierenden Zellen hypermethyliert ist.

Um eine detailliertere und statistisch relevante Aussage machen zu können, wurde zusätzlich eine Bisulfidsequenzierung durchgeführt. Dazu wurde eine PCR mit spezifischen Primern gegen die L1CAM Promoterregion und dem Chromatin der einzelnen Zelllinien angefertigt (s. Abb. D31 a).

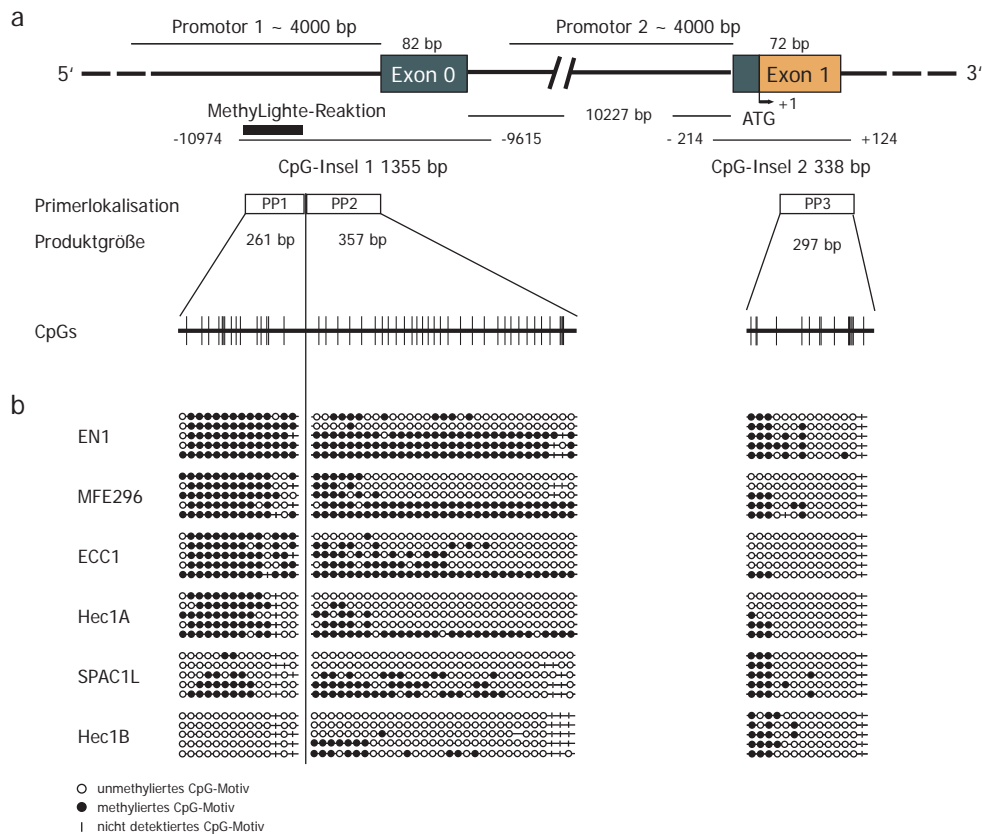


Abbildung D 31 (a) Schematische Darstellung der L1CAM-Promoterstruktur. Ebenfalls grafisch dargestellt sind Positionen der zwei analysierten CpG-Inseln ausgehend vom Startcodon in Exon 1. Die Lokalisation der drei Primerpaare für die Bisulfidsequenzierung sind durch weiß flächige Rechtecke gekennzeichnet (PP1, PP2, PP3). Die Positionen der analysierten CpG-Dinukleotide, innerhalb der PCR-Produkte, werden durch senkrechte Linien dargestellt. (b) Grafische Darstellung der analysierten CpG-Dinukleotide nach Bisulfid-Konvertierung. Jede waagerechte Linie steht für ein sequenziertes PCR-Produkt und gibt das Methylierungsmuster einer einzelnen Zelle der entsprechenden Zelllinie wieder. Ein unausgefüllter Kreis steht für ein unmethyliertes CpG-Motiv, ein schwarz ausgefüllter Kreis für ein methyliertes CpG-Motiv, ein senkrechter Strich für ein nicht detektiertes CpG-Motiv im Vergleich zur Kontrollsequenz.

Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden anschließend in einen Sequenzierungsvektor kloniert und sequenziert. Vor der PCR wurde das isolierte Chromatin der Zellen mit Natrihydrogensulfit behandelt. Die Analyse der in Folge der Behandlung konvertierten Nukleotide und die statistische Auswertung erfolgten mit dem Programm BiQ-Analyser®. In der Abbildung D 31a ist eine Grafik mit der Primerlokalisierung und dem sequenzierten Bereich abgebildet. Ebenfalls dargestellt ist eine schematische Darstellung mit der Position der einzelnen CpG-Dinukleotide in diesem Bereich. Die statistische Auswertung der Analyse ist in Tabelle D 3 zu sehen. Die Resultate der Bisulfidsequenzierung (Abb. D 31 und Tab. D 3) bestätigten die

Ergebnisse der MethyLight-Reaktion. In den nicht L1CAM exprimierenden Zellen waren die Cytosine der CpG-Insel 1 im Promoter 1 häufiger modifiziert als die der stark L1CAM exprimierenden Zellen. So waren bei der Zelllinie EN1 60,44% der analysierten CpG-Dinukleotide methyliert und nur 8,44% bei der Zelllinie Hec1B. Vor allem im ersten Abschnitt der CpG-Insel 1 (PP1) gab es einen deutlichen Unterschied in der Methylierung von L1CAM-defizienten (EN1, MFE296, ECC1, Hec1A) und L1CAM positiven (SPAC1L, Hec1B) Zelllinien. Dieser Bereich wurde ebenfalls durch die MethyLight-Reaktion abgedeckt. Im Gegensatz dazu, waren bei der CpG-Insel 2 keine Tendenz im Methylierungsmuster und ein daraus resultierender Effekt auf die L1CAM-Expression erkennbar. Die DNA der L1CAM exprimierenden Zellen war in diesem Bereich ähnlich stark methyliert wie die der nicht L1CAM exprimierenden Zellen (Abb. D 31 und Tab. D 3).

Zelllinie	CpG-Insel 1			CpG-Insel 2		
	Gesamtzahl CpGs	methylierte CpGs	%	Gesamtzahl CpGs	methylierte CpGs	%
EN1	225	136	60,44	70	24	34,30
MFE296	225	129	57,33	70	12	17,10
ECC1	287	116	40,42	70	7	10,00
Hec1A	225	80	35,56	84	3	3,60
SPAC1L	256	69	26,95	84	22	26,20
Hec1B	225	19	8,44	84	19	22,60

Tabelle D 3. Statistische Auswertung der analysierten CpG-Motive pro Zelllinie. Die Anzahl analysierter CpGs variiert je nach Anzahl durchgeführter Sequenzierungen bei einer Zelllinie. Gezeigt sind die statistischen Ergebnisse aus den Bisulfitequenzierungen der CpG-Insel 1 (CpG-1) und der CpG-Insel 2 (CpG-2).

4.7 Die L1CAM-Promotermethylierung variiert im Tumorgewebe und zeigt keine Korrelation mit dem L1CAM-Expressionslevel

Nach der *in vitro*-Analyse der L1CAM-Promotermethylierung erfolgte zusätzlich eine *in vivo*-Analyse der Promotermethylierung. Dazu wurde aus jeweils L1CAM positiven und L1CAM-defizienten Arealen eines Tumors Gewebe entnommen und aus diesem Gewebe Chromatin isoliert. Das benötigte Tumorgewebe wurde durch Mikrosektion aus einem kryokonservierten Gewebeschnitt gewonnen. Die vorhergehende Bestimmung der L1CAM-Expression erfolgte durch immunhistologische Methoden unter Verwendung eines L1CAM spezifischen Antikörpers. Zur Analyse der L1CAM-Promotermethylierung wurde die bereits vorher beschriebene MethyLight-qRT-PCR verwendet. Die Analyse der Tumorproben lässt keine direkten Zusammenhänge zwischen der DNA-Methylierung und der L1CAM-Expression innerhalb eines Tumors erkennen. Drei Tumore zeigten eine erhöhte Methylierung in L1CAM positiven Arealen (T1, T2, T5), drei andere Tumore zeigten eine erhöhte Methylierung in L1CAM-defizienten Arealen (T3, T4, T6). Eine besondere Tendenz innerhalb eines bestimmten histologischen Phänotyps war ebenfalls nicht erkennbar. Die Analyse gibt somit keinen Hinweis darauf, ob eine Hypomethylierung des L1CAM-Promoters auch zwangsläufig zu einer erhöhten L1CAM-Expression führt. Das Ergebnis aus den Methylierungsanalysen der Tumorproben gibt somit ein anderes Bild wieder als die der untersuchten Zelllinien.

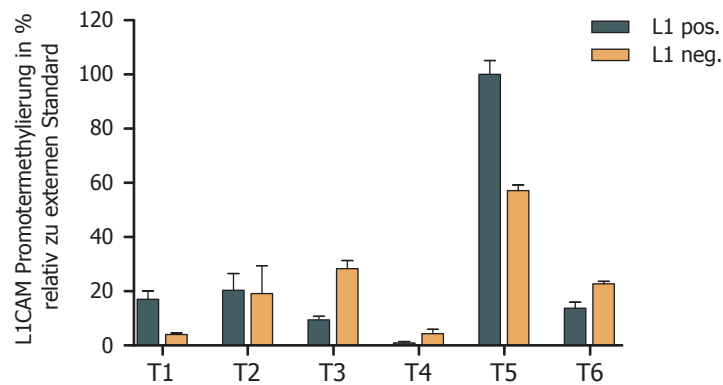


Abbildung D 32 *MethyLight-qRT-PCR zur Bestimmung der DNA-Methylierung in unterschiedlichen Tumorproben. Die L1CAM positiven und L1CAM-defizienten Areale eines Tumors (T1-T6) wurden durch immunhistologische Methoden unter Verwendung eines L1CAM spezifischen Antikörpers bestimmt. Aus den Arealen wurde mittels Mikrosektion Tumorgewebe isoliert. Anschließend wurde das Chromatin extrahiert und mit Natriumhydrogensulfid behandelt. Das behandelte Chromatin wurde anschließend zur qRT-PCR eingesetzt. Die L1CAM-Promotermethylierung des L1CAM positiven Areals eines Tumors ist im Diagramm blau gekennzeichnet, die des negativen Areals ist gelb gekennzeichnet.*

Tumor	PCR-Probe	Histologie	L1CAM-Färbung Gewebe	Methylierung in %	Std
1	1	Klarz. Ca.	1	17,09	3,00
	2	Klarz. Ca.	0	4,02	0,68
2	3	Klarz. Ca.	1	20,35	6,19
	4	Klarz. Ca.	0	19,12	10,37
3	5	Klarz. Ca.	1	9,43	1,33
	6	Klarz. Ca.	0	28,32	3,05
4	7	serös.-papill.Adenoca.	1	0,95	0,51
	8	serös.-papill.Adenoca.	0	4,39	1,59
5	9	serös.-papill.Adenoca.	1	100,00	5,12
	10	serös.-papill.Adenoca.	0	57,18	2,05
6	11	Klarz. Ca.	1	13,75	2,17
	12	Klarz. Ca.	0	22,77	0,86

Tabelle D 4. *Übersicht zur Analyse der DNA-Methylierung durch MethyLight-qRT-PCR. Von jeder Tumorprobe sind die Ergebnisse der zwei zugehörigen PCR-Proben und die Histologie aufgelistet.*

5. Repression der L1CAM Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde auch der Einfluss von 5'-AzaC auf L1CAM exprimierende Zellen untersucht. Dazu wurden die zwei L1CAM-positive EK-Zelllinien Hec1B und SPAC1L sowie die L1CAM-negative Zelllinie ECC1 für 5 Tage mit 5'-AzaC behandelt. Außerdem wurde zusätzlich eine Ovarialkarzinom-Zelllinie (OVM) auf die Effekte einer 5'-AzaC-Behandlung untersucht. Die gewählte Zelllinie exprimiert ebenfalls L1CAM. Die Auswirkungen der 5'-AzaC-Verabreichung wurden durch die Analyse der Gesamtproteinmenge, des mRNA-Levels und der Oberflächenexpression untersucht.

5.1 Azacytidine inhibiert L1CAM-Expression in L1CAM exprimierenden Zellen

Überraschenderweise, wurde bei der Gesamtproteinmenge als auch bei der mRNA-Menge ein deutlicher Rückgang der endogenen L1CAM-Expression bei den positiven Zelllinien beobachtet (Abb. D 33).

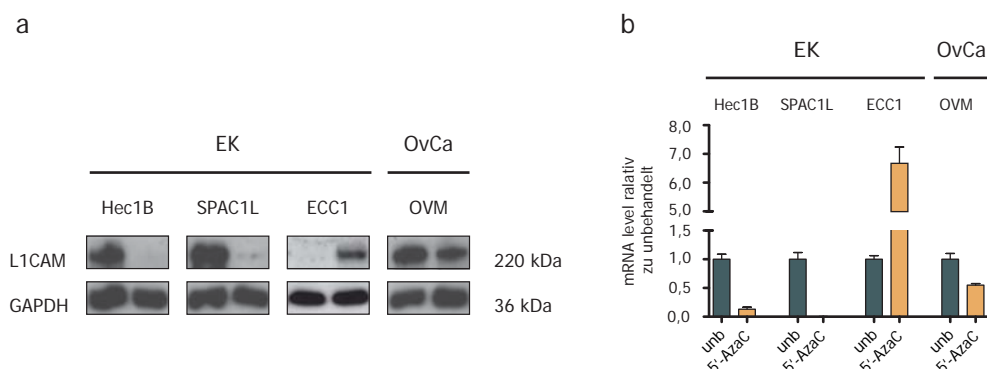


Abbildung D 33 Auswirkung der 5'AzaC oder Dec-Behandlung auf L1CAM-Expression in L1CAM positiven Zellen. EK = Endometriumkarzinom-, OvKa = Ovarialkarzinom-Zelllinie. Die Zellen wurden für 5 d mit 5 μ M 5'AzaC behandelt. (a) Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge Der L1CAM-Proteinlevel wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen L1CAM detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. (b) qRT-PCR zu Bestimmung des L1CAM-mRNA-Level. Alle Daten wurden gegen β -aktin normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

Der Effekt war bei den Zelllinien aus der Entität des EKs (EK) wesentlich stärker als bei der Ovarialkarzinom-Zelllinie. Bei den Zelllinien Hec1B und SPAC1L konnte das L1CAM-Protein nach der Behandlung nicht mehr bzw. nur schwach detektiert werden. Die OVM-Zellen zeigten auch eine Reduktion in der L1CAM-Proteinexpression, allerdings wurden noch schwache L1CAM-Proteinlevel detektiert (Abb. D33 a). Im Gegensatz zur Repression bei den positiven Zellen, kam es bei den negativen ECC1-Zellen zu einem Anstieg der Expression. Es ist somit deutlich zu sehen, dass stark und schwach exprimierende Zellen auf L1CAM-Niveau gegensätzliche Effekte nach der 5'-AzaC-Beahndlung offenbaren. Die Resultate der qRT-PCR konnten auf Western-Blot-Analyse bestätigt werden. Hier kam es bei den OVM-Zellen ebenfalls zu einem schwächeren Effekt als bei den Hec1B und SPAC1L-Zellen. Bei den ECC1-Zellen war dagegen erneut eine Zunahme der L1CAM-Expression zu sehen.

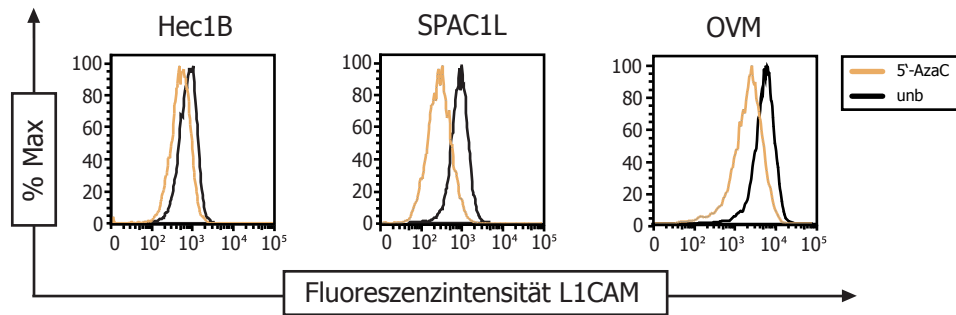


Abbildung D 34 FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression. Die Zellen wurden für 5 d mit $5 \mu\text{M}$ 5'-AzaC behandelt. Anschließend erfolgte die Detektion durch einen L1CAM-Ektodomänen spezifischen Antikörper (L1-11a) und gam-PE-Zweitantikörper. Die schwarze Kurve ist die L1CAM-Oberflächenexpression der unbehandelten Zellen; die gelbe Kurve ist die Oberflächenexpression nach 5'-AzaC-Behandlung.

Durch die Analyse der Oberflächenexpression konnte ebenfalls eine Herabregulation von funktionellem L1CAM durch 5'-AzaC nachgewiesen werden (Abb. D 34). Die geringste L1CAM-Expression nach der Behandlung wurde bei der Zelllinie SPAC1L detektiert. Somit kann in allen Analysen eine Repression der L1CAM-Expression nach 5'-AzaC-Behandlung bestätigt werden.

5.2 Azacytidin aber nicht TSA führt zu einer Repression der L1CAM-Expression

Wie bereits beschrieben (Abb D 33), führt 5'-AzaC zu einer Inhibition der DNA-Methyltransferasen und zu einer Änderung des DNA-Methylierungsmusters. Als zweiter Hauptmechanismus der epigenetischen Regulation gilt, neben der DNA-Methylierung, die Modifizierung von Histonen. Durch die Behandlung mit TSA, einem HDAC-Inhibitor, wurde der Versuch angestellt, ob Histonmodifizierung zu einer geänderten L1CAM-Expression in L1CAM positiven Zellen führt.

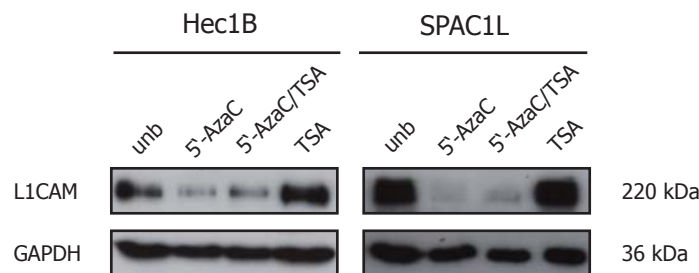


Abbildung D 35 Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge. Die Zellen wurden für 5 d mit $5 \mu\text{M}$ 5'-AzaC und/oder für 24 h mit 500 nm TSA behandelt. Der L1CAM-Proteinlevel wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen L1CAM detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Um den Einfluss von TSA in endogen L1CAM exprimierenden Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen erneut mit 5'-AzaC, zusätzlich mit TSA und parallel mit beiden Substanzen behandelt. Anschließend erfolgte eine Western-Blot-Analyse und qRT-PCR. Wie in Abbildung D 35 zu sehen, führte die TSA-Behandlung

auf Proteinebene zu keiner Reduktion des L1CAM-Proteinlevels. In beiden Zelllinien blieb die L1CAM-Expression nach der Behandlung mit TSA unverändert. Damit geht der Effekt, welcher bei einer Behandlung mit beiden Inhibitoren (5'-AzaC/TSA) zu sehen ist, allein auf die Anwesenheit von 5'-AzaC zurück. Nur die Behandlung mit 5'-AzaC zeigt einen ähnlichen Effekt und führt wie in den vorhergehenden Experimenten (s. Abb. D 33 und D 34) zu einem Abfall der L1CAM-Expression.

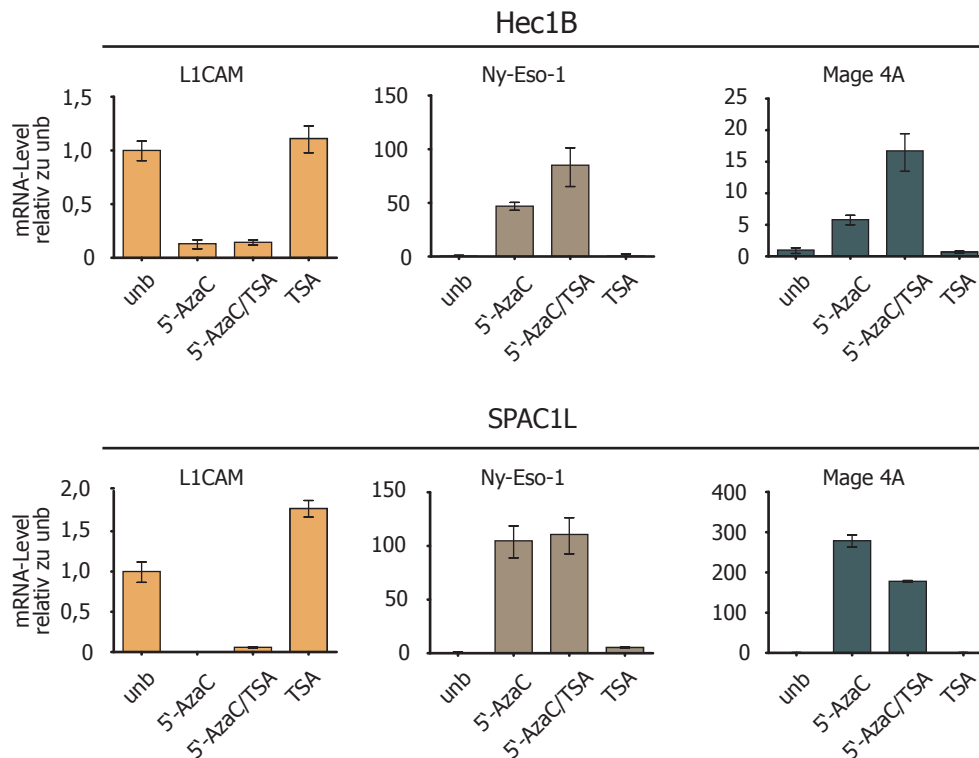


Abbildung D 36 qRT-PCR zur Bestimmung des mRNA-Niveaus von L1CAM, Ny-Eso-1 und Mage 4a. Die Zellen wurden für 5 d mit 5 μ M 5'-AzaC und/oder für 24 h mit 500 nm TSA behandelt. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation. Alle Daten wurden gegen β -aktin normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse (s. Abb. D 35) konnten auf mRNA-Level bestätigt werden. Auch auf mRNA-Niveau kam es nur in Anwesenheit von Azacytidin zu einer Repression der L1CAM-Expression. Bei der Behandlung ausschließlich mit TSA wurde kein Effekt auf die L1CAM-Regulation nachgewiesen. Das deutet darauf hin, dass die Runterregulation von L1CAM in den Zellen mit viel endogenen L1CAM durch eine Änderung des DNA-Methylierungsmusters hervorgerufen wird. Ein Indiz für eine geänderte DNA-Methylierung ist die induzierte Expression der CT-X-Gene Ny-Eso-1 und Mage 4a. Wie in den L1CAM-defizienten Zelllinien (s. Abb. D 27) kommt es auch in den L1CAM exprimierenden Zellen Hec1B und SPAC1L zu einer deutlichen Hochregulation der CT-X-Gene auf mRNA-Level (s. Abb. D 36).

Die Behandlung mit 5'-AzaC inhibiert demnach die DNA-Methyltransferasen und initiiert eine Hypomethylierung der DNA. Entgegen den Ergebnissen aus den Versuchen mit L1CAM-defizienten Zelllinien führt die Hypomethylierung bei L1CAM positiven Zelllinien allerdings zu einem drastischen Abfall der L1CAM Expression.

5.3 Der Effekt der 5'-AzaC-Behandlung ist zeit- und konzentrationsabhängig

Bei den ersten Arbeiten mit Azacytidin wurde gezeigt, dass bereits geringe Konzentrationen der Substanz zu einer Inhibition der DNA-Methylase führen (Glover et al., 1987). Außerdem konnte bestätigt werden, dass verschiedene DNMT-Inhibitoren bei geringen Dosen nicht zum Zelltod führen sondern ausschließlich in die Zell-DNA integrieren (Christman et al., 1983, Creusot et al 1982., Tayler and Jones, 1982). Auf Grund der Funktion der DNA-Methyltransferasen semi-methylierte DNA nach erfolgter Zellteilung zu erkennen und zu methylieren, ist die Integration von 5'-AzaC von der Zellproliferation abhängig (Davidson et al., 1992). Mit zunehmender Behandlungsdauer und erfolgter Zellproliferation nimmt der Effekt von 5'-AzaC zu und manifestiert sich (Rayan et.al., 2012) . Allerdings erfolgt eine Inhibition der DNMTs auch bereits wenige Stunden nach der ersten Behandlung. Denn durch die hohe Spezifität der DNMTs, werden diese blockiert, sobald das 5'-AzaC in die DNA integriert wurde (Creusot et al., 1982). Der Level der Methylierung ist somit auch abhängig von der Aktivität der verbleibenden DNMT-Moleküle (Flatau et al., 1984; Juttermann et al 1994). Um diese Aussagen zu bestätigen, wurde sowohl eine Titration von 5'-AzaC als auch eine Kinetik durchgeführt.

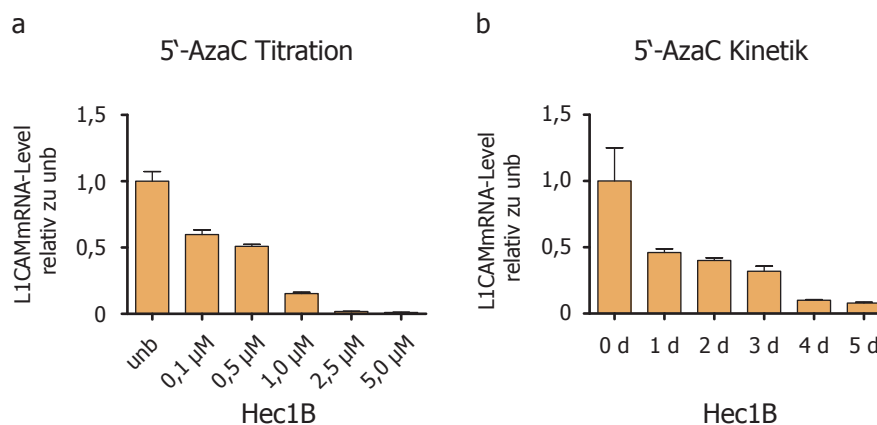


Abbildung D 37 *qRT-PCR zu Bestimmung des mRNA-Levels von L1CAM. (a) Titration von 5'-AzaC. Die Zellen wurden über eine Dauer von 5 d mit den angegebenen Konzentrationen behandelt. (b) Kinetik mit 5'-AzaC. Die Zellen wurden für eine unterschiedliche Dauer mit 5'-AzaC behandelt. Nach den Behandlungen erfolgte die RNA-Isolation. Alle Daten wurden gegen β -aktin normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.*

Die vorliegenden Daten offenbaren auch in der Zelllinie Hec1B eine konzentrations- und zeitabhängige Wirkung von 5'-AzaC (s. Abb. D37). Bereits bei einer Konzentration von 0,1 μ M 5'-AzaC war eine Reduktion der L1CAM-Expression um ca. 40 % zu erkennen. Die stärkste Inhibition der L1CAM-Expression war bei 5,0 μ M 5'-AzaC zu beobachten (s. Abb. D37a). Ähnlich verhält es sich bei der kinetischen Wirkung des DNA-Methyltransferase-Inhibitors. Die Behandlung ist bei zunehmender Dauer durch eine starke Abnahme der L1CAM-Expression gekennzeichnet. Nach 24 h konnte ein Abfall des L1CAM-mRNA-Levels detektiert werden. Der stärkste Effekt wurde jedoch nach fünf Tagen Behandlung mit 5'AzaC festgestellt. Nach dieser Zeit lag der mRNA-Level von L1CAM nur noch bei ca. 5 % vom Ausgangswert (0 d) (s. Abb.

D37b). Dass diese Effekte auf epigenetische Veränderung zurückzuführen sind, belegen die ansteigenden Expressionslevel der CT-X-Gene (Abb. D38). Bei der Konzentrationstitration von 5'AzaC wurde bereits bei 0,1 μM 5'AzaC ein Anstieg der CT-Gen mRNA detektiert. Sowohl bei Ny-Eso-1 als auch bei Mage 4A kam es zu einer Erhöhung des mRNA-Levels. Die höchste Expression wurde bei einer Konzentration von 1,0 μM erreicht (s. Abb. D38a). Bei der Kinetik war allerdings nur bei Ny-Eso-1 eine Regulation zu erkennen. Der erste Effekt der Behandlung war nach einer Dauer von zwei Tagen sichtbar (s. Abb. D 38b).

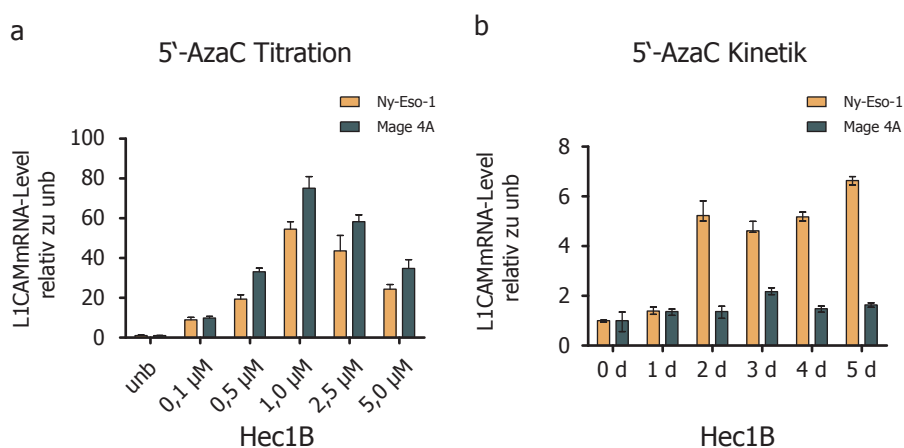


Abbildung D 38 qRT-PCR zur Bestimmung des mRNA-Levels von L1CAM. (a) Titration von 5'-AzaC. Die Zellen wurden über eine Dauer von 5 d mit den angegebenen Konzentrationen behandelt. (b) Kinetik mit 5'-AzaC. Die Zellen wurden für eine unterschiedliche Dauer mit 5 μM mit 5'-AzaC behandelt. Nach den Behandlungen erfolgte die RNA-Isolation. Alle Daten wurden gegen β -aktin normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

5.4 Decitabin, ein weiteres Cytosinanalogen, induziert wie Azacytidin L1CAM Repression

Arbeiten über den Wirkungsmechanismus von Azacytidin konnten beweisen, dass es bei höheren Konzentrationen sowohl in DNA als auch in RNA integriert wird (Cihak and Vesely, 1978). Wird 5'-AzaC in RNA integriert, kommt es zu einer veränderten RNA-Funktion und Stabilität. Ebenfalls beeinflusst werden die Methylierung und das Prozessieren von tRNAs in einer Zelle (Lu und Randerath, 1980; Lee und Karon, 1980). Die verschiedenen Effekte resultieren in einer Beeinflussung der Proteinbiosynthese und wirken damit zytotoxisch. Das Cytosin-Analogen Decitabin (5'Aza-2'-deoxycytidin) wird dagegen ausschließlich in DNA integriert und inhibiert DNA-Methyltransferasen. Decitabin initiiert somit keine RNA-Degradation oder eine Inhibition der Proteinbiosynthese durch Integration in tRNAs.

Bei einer Behandlung mit Decitabin können direkte Effekte auf die mRNA-Prozessierung und Translation ausgeschlossen werden. Bei L1CAM positiven Zelllinien wurden die Folgen einer Decitabin-Behandlung auf die L1CAM-Expression untersucht.

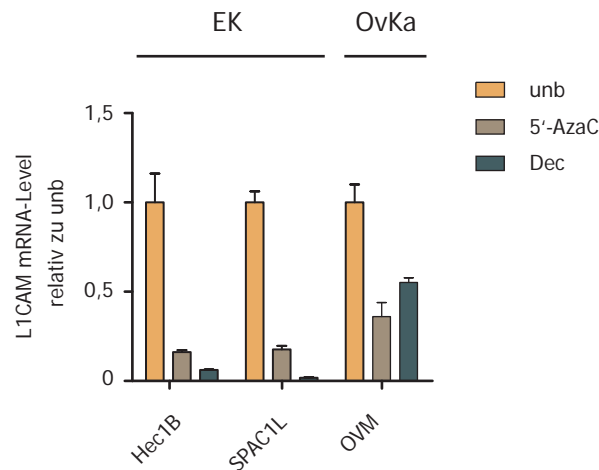


Abbildung D 39 *qRT-PCR zur Bestimmung des mRNA-Levels von L1CAM. Die Zellen wurden über eine Dauer von 5 d mit 5 μ M 5'AzaC oder 5 μ M Dec behandelt. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation. Alle Daten wurden zu den von β -aktin normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.*

Die Analyse der L1CAM mRNA-Expression offenbarte den gleichen Effekt bei der Decitabin-Behandlung wie bei 5'-AzaC (s. Abb. D39). Decitabin induziert in den drei behandelten Zelllinien eine Repression der L1CAM-Expression. Bei der Ovarialkarzinom-Zelllinie OVM war die Inhibition der L1CAM-Expression schwächer als bei den beiden Endometriumkarzinom-Zelllinien Hec1B und SPAC1L (s. Abb. D40). Beide Inhibitoren führen durch Inhibition der DNA-Methyltransferasen und einer zunehmenden Hypomethylierung zu einer L1CAM-Repression. Der Einfluss von Decitabin auf die L1CAM-Regulation war auch auf dem Proteinlevel erkennbar (s. Abb. D40). Die L1CAM-Proteinmenge verringerte sich bei den Zelllinien Hec1B und OVM durch Decitabin und 5'AzaC.

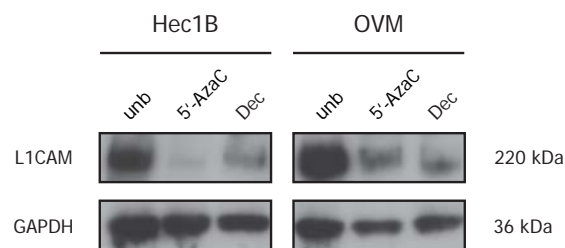


Abbildung D 40 *Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge. Die Zellen wurden für 5 d mit 5 μ M 5'AzaC oder 5 μ M Dec behandelt. Der L1CAM-Proteinlevel wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen L1CAM detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle.*

5.5 Runterregulierung von DNMT1 durch spezifische siRNA führt zu einer Inhibition der L1CAM Expression

Die Daten aus den Inhibitorexperimenten sollten durch eine spezifische Runterregulierung der DNMT1 bestätigt werden. Eine Transfektion mit komplementärer siRNA zur DNMT1 mRNA resultiert in einer geringeren DNMT1-Aktivität und einer Hypomethylierung des Chromatins. Wie bereits beschrieben, induzieren 5'AzaC und Decitabin ebenfalls eine Hypomethylierung des zellulären Chromatins und dadurch eine Repression der L1CAM-Expression in L1CAM positiven Zellen. Um die Auswirkungen einer Runterregulation von DNMT1 zu untersuchen, erfolgte eine qRT-PCR-Analyse.

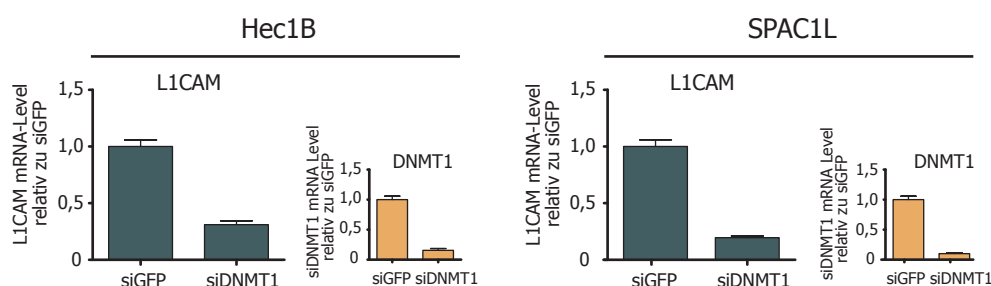


Abbildung D 41 qRT-PCR-Analyse zur Bestimmung der mRNA-Level von L1CAM und DNMT1. Die Zellen wurden mit DNMT1 siRNA transfiziert. Nach 72 h erfolgte die Analyse der mRNA-Level. Die mRNA-Level sind relativ zur Kontrolle (siGFP) dargestellt. Alle Daten wurden zu denen von β -aktin normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten

Die DNMT1 siRNA transfizierten Zellen Hec1B und SPAC1L reagieren auf die verminderte DNMT1-Aktivität mit einer Runterregulierung von L1CAM. Sowohl bei Hec1B-Zellen, als auch bei SPAC1L-Zellen nimmt das L1CAM-mRNA-Level nach der Transfektion ab (s. Abb. D41). Die spezifische DNMT1 siRNA und die DNMT-Inhibitoren führen demnach zu einer verminderten L1CAM-Expression.

5.6 Hypomethylierung führt zu keiner geänderten Expression L1CAM regulierender Transkriptionsfaktoren

Die vorhergehenden Versuche deuten darauf hin, dass eine globale Hypomethylierung in einer Reduktion der L1CAM-Expression resultiert. Durch eine qRT-PCR wurde die Expression von drei Transkriptionsfaktoren überprüft (s. Abb. 42).

Die drei Transkriptionsfaktoren REST, Slug und β -catenin sind als Regulatoren von L1CAM in unterschiedlichem Kontext bekannt. REST wurde ursprünglich als Repressor von L1CAM in nicht neuronalen Zellen beschrieben und begrenzt die Expression von L1CAM auf das neuronale System (Kallunki et al., 1997). In Colonkarzinomen konnte ein Zusammenhang zwischen L1CAM und β -catenin hergestellt werden (Gavert et al., 2005). Der Transkriptionsfaktor Slug vermittelt das Signal der TGF- β 1 induzierten L1CAM-Expression in der duktaalen epithelialen Zelllinie H6c7 (Geismann et al., 2009) und in EK-Zelllinien (Pfeifer et al., 2010). Durch eine qRT-PCR wurden die mRNA-Level der drei Transkriptionsfaktoren nach einer Azacytidin-Behandlung überprüft.

Die Expressionslevel der drei Transkriptionsfaktoren änderte sich bei den Hec1B- und SPAC1L-Zellen nur marginal und die 5'-AzaC-Behandlung hat keinen Einfluss auf deren Expression. Für die Regulation von REST steht das im Widerspruch zu bereits bekannten Daten aus SCLC-Zelllinien. Dort ergab die Analyse der REST-Promotermethylierung eine direkte Korrelation zwischen Promoterdemethylierung und REST-Expression. Der REST-Level beeinflusste in diesen Zellen auch die L1CAM-Expression (Kreisler et al., 2010). In EK-Zelllinien ist die REST-Expression allerdings auf einem hohen Niveau und es kommt zu keiner Erhöhung durch die Behandlung mit 5'-AzaC. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Hypomethylierung nicht indirekt die Repression von L1CAM über einen der drei Transkriptionsfaktoren initiiert.

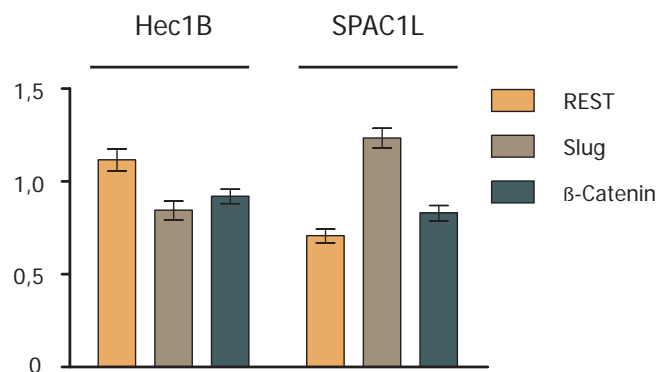


Abbildung D 42 *qRT-PCR-Analyse zur Bestimmung der mRNA-Level von REST, Slug und β-catenin. Die Zellen wurden für 5 d mit 5'AzaC behandelt. Anschließend erfolgte die Isolation der mRNA. Die mRNA-Level sind relativ zur Kontrolle (unbehandelt) dargestellt. Alle Daten wurden zu denen von β-aktin normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten.*

5.7 Azacytidin führt zur Änderung des miRNA-Expressionsmusters

Neben der Expression von Genen kann auch die Expression von nicht translaterter RNA durch epigenetische Prozesse reguliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass TSA und DNMT-Inhibitoren ein Änderung des microRNA-Expressionsmuster (miRNA) induzieren (Yan et al., 2011; Heller et al., 2012; Yang et al., 2012). miRNAs sind kurze, hochkonservierte und nicht codierenden RNAs. Die RNA-Spezies ist involviert in den Prozess der RNA-Interferenz und regulieren die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene. Die Expression der miRNAs wird während der Entwicklung und in physiologischen Prozessen unterschiedlich reguliert. In der Regel ist das Expressionsmuster gewebsspezifisch. Während der Tumorentwicklung kann es jedoch zu einer Abweichung vom Expressionsmuster kommen (Lu et al., 2005). In einigen Tumorentitäten wurde außerdem eine Korrelation zwischen der miRNA DNA-Methylierung und der Tumorentwicklung festgestellt (Lujambio et al., 2008; Lehmann et al., 2008; Agirre et al 2009). Welches Zielgen eine miRNA reguliert und somit zur Tumorentwicklung beiträgt, ist nicht für jede miRNA vollständig geklärt. Durch die Analyse des miRNA-Expressionsmusters vor und nach einer Behandlung mit 5'AzaC wurde geklärt, ob es zu einer Änderung des miRNA-Expressionsmusters kam. Die miRNA-Expression wurde mit einem miRNA-TagMan®-Expressionsarray analysiert, wodurch der simultane Vergleich von 384 miRNAs möglich wurde (s. Anhang 1).

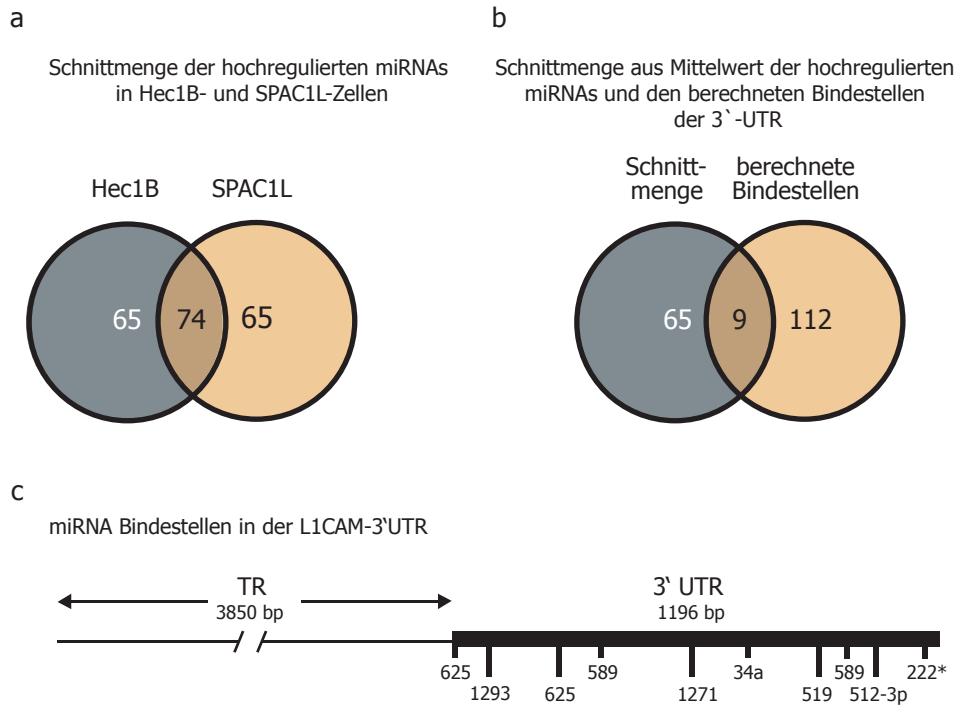


Abbildung D 43 Graphische Darstellung der Analyse des miRNA-Expressionsmusters vor und nach 5'-AzaC-Behandlung. Die Zellen wurden für 5 d mit 5'-AzaC behandelt. Anschließend erfolgte die Isolation aller kleinen RNA-Spezies und die Transkription der miRNAs. Die Analyse erfolgte durch qRT-PCR mit einem 384-Loch TaqMan®-array. (a) Die Schnittmenge der mindestens 2-fach hochregulierten miRNAs bei den Zelllinien Hec1B und SPAC1L. (b) Die Schnittmenge der 74 Kandidaten und den berechneten miRNA-3'-UTR-Bindestellen im L1CAM. (c) Lokalisation der hypothetischen miRNA-Bindestellen im L1CAM-Promoter.

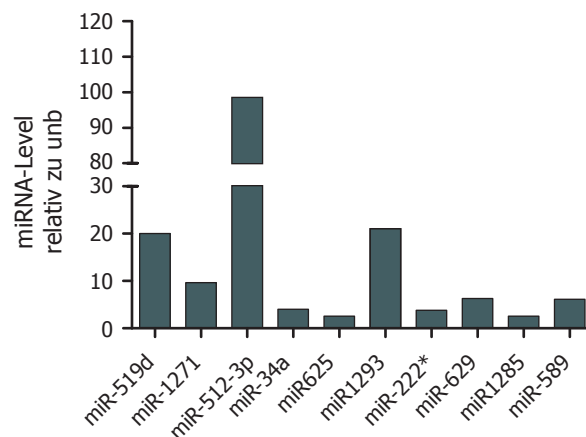


Abbildung D 44 Änderung der miRNA-Expression nach 5 d 5'-AzaC-Behandlung. Dargestellt ist der Mittelwert der Änderung des relativen miRNA-Level. Die Analyse erfolgte durch TaqMan®-qRT-PCR in dem Format einer 384-Lochplatte.

Verglichen wurde die Transkription von Hec1B- und SPAC1L-Zellen vor und nach 5'-AzaC-Behandlung. Von jeder Probe wurden zwei Replikate angefertigt. Als Indikatoren für die statistische Signifikanz wurden die Differenz der Standardfehler der Plattenduplikate und die Standardabweichung der biologischen Replikate berechnet. Um die Anzahl der möglichen Kandidaten so gering wie möglich zu halten, wurde ein Schwellenwert mit einer hohen Stringenz verwendet. Der Vergleich der zwei Zelllinien ergab 74 mindestens 2-fach hochregulierte miRNAs durch Hypomethylierung (s. Abb. D43a). Eine anschließende *in silico*-Analyse (miRWalk) der L1CAM-3'-UTR ergab das neun der 74 miRNA-Kandidaten ein Bindemotiv in dem Lokus besitzen (Abb. D43b; Anhang 2). Die neun miRNAs wurden durch die 5'-AzaC-Behandlung unterschiedlich stark hochreguliert und gehören zu verschiedenen Familien (Abb. D 44). Die Lokalisationen der hypothetischen Bindestellen der einzelne miRNAs sind in der schematischen Grafik in Abbildung D 43 c dargestellt.

5.8 miR-34a bindet an die L1CAM-3'-UTR

Um zu untersuchen, ob es zu einer spezifischen Bindung innerhalb der L1CAM-3'UTR kommt, wurde jeweils eine der neun miRNAs zusammen mit einem Luziferase-L1CAM-3'UTR-Reporterkonstrukt in Hec1B-Zellen überexprimiert. In der Analyse wurde anschließend die Luziferaseaktivität bestimmt.

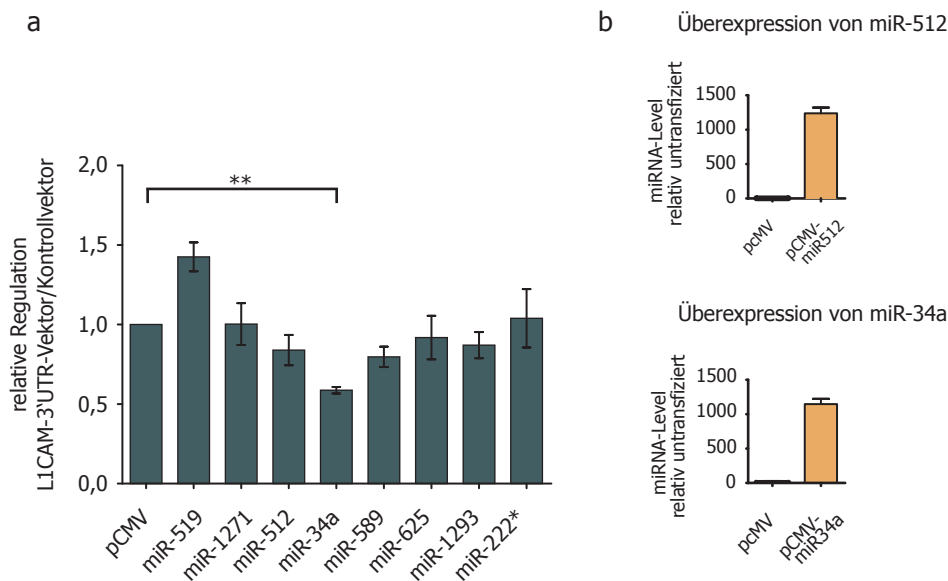


Abbildung D 45 L1CAM 3'-UTR Luziferase Reporter-Assay. Analysiert wurde die Luziferase-Aktivität des Kontrollvektors und des L1CAM-3'-UTR-Reportervektors nach miRNA Überexpression In Hec1B Zellen. (a) Dargestellt ist der Quotient aus der Messung des Kontrollvektors zum 3'-UTR-Reporter-Vektor. Umso niedriger der Quotient desto stärker der Effekt der überexprimierten miRNA. Durch die Bildung eines Quotienten kommt es zu Bereinigung von unspezifischen Effekten. (b) Überexpression von zwei ausgewählten miRNAs. Die Bestimmung erfolgte durch TaqMan[®]-qRT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwert aus n=3 Experimenten.

Bei der Co-Expression des Luziferase-Reportergens und der miRNAs resultiert nur die Überexpression von miR-34a in einer Reduktion der Luziferaseaktivität in Anwesenheit der L1CAM-3'-UTR (s. Abb. D45 a).

Durch die Überexpression der miRNA-34a sinkt das Luziferasesignal des 3'-UTR-Reportervektors um ca. 50 %. Nach der Bereinigung von unspezifischen Effekten durch Bildung eines Quotienten aus dem Lumineszenzsignal des Kontrollvektors und des 3'UTR-Vektors, offenbarte die Überexpression der miR-34a einen spezifischen Effekt (Abb D45 a).

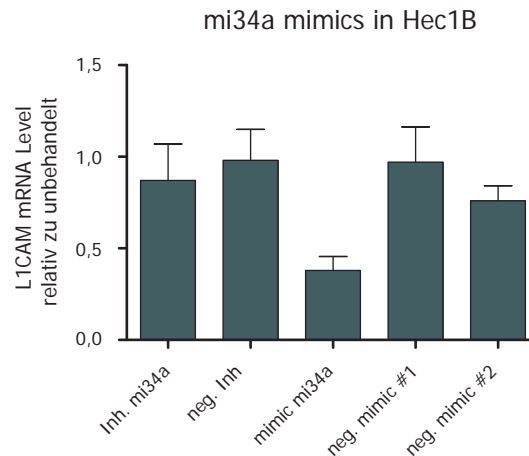


Abbildung D 46 *qRT-PCR-Analyse zur Bestimmung des L1CAM-mRNA-Levels. Hec1B Zellen wurden mit RNA-Oligonukleotiden transfiziert und nach 72 h erfolgte die RNA-Isolation. Die mRNA-Level sind relativ zur Kontrolle (unbehandelt) dargestellt. Alle Daten wurden zu denen von β -aktin normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten.*

Die Transfektion von Hec1B-Zellen mit bereits prozessierter miR-34a bestätigten diese Resultate. Auf mRNA-Ebene konnte eine verminderte L1CAM-Expression nach der Transfektion mit miR-34a-Oligonukleotiden detektiert werden (s. Abb. D46). Die vorhergehenden Daten deuten darauf hin, dass die miR-34a zu einer Degradation der L1CAM-mRNA beiträgt und als ein posttranskriptioneller Regulator der L1CAM-Expression in Betracht gezogen werden kann.

5.9 Endogene miR-34a-Expression korreliert nicht mit der L1CAM-Expression

In Zelllinien des Endometrium- oder Ovarialkarzinoms wurde das endogene Expressionslevel der miR-34a festgestellt. Die Detektion erfolgte durch TaqMan[®]-qRT-PCR. Für das Ovarialkarzinom wurde bereits eine Korrelation der miR-34a-Expression mit der Tumorprogression aufgezeigt (Reimer et al., 2011). Ob die miRNA-Expression ebenfalls die L1CAM-Expression beeinflusst, wurde im Umfang dieser Arbeit nicht untersucht. Im Falle des EK kam es bis zu diesem Zeitpunkt zu keinem Nachweis, dass miR34a im Zusammenhang mit der Karzinogenese steht. Bei den vorliegenden Zelllinien konnte keine Korrelation zwischen der L1CAM- und miR-34a-Expression belegt werden. Bis auf die Zelllinien ECC1 und OVM weisen die Zellen im Allgemeinen einen niedrigen miR-34a-Level auf, unabhängig von dem Level der L1CAM-Expression.

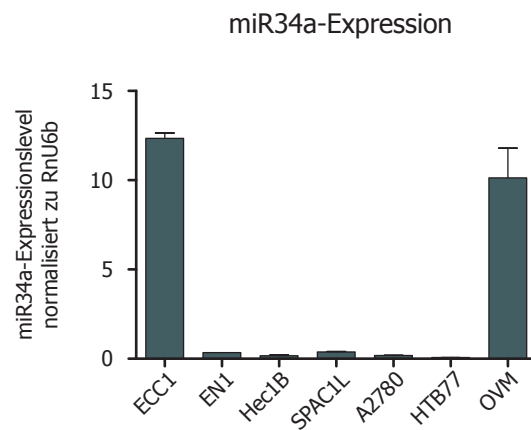


Abbildung D 47 Bestimmung der miR-34a-Expression in unterschiedlichen Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien. Die Analyse erfolgte durch TaqMan[®]-qRT-PCR. Alle Daten wurden zu denen von RnU6b normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives aus zwei unabhängigen Experimenten.

6. Herstellung einer transgenen Maus

Die Herstellung einer transgenen Maus erfolgte zur Untersuchung der Auswirkungen einer Antikörperbehandlung auf den Organismus. Bereits mehrere Arbeiten belegten die Effekte einer Antikörperinjektion auf die Tumorprogression von L1CAM positiven Tumoren. Es konnte belegt werden, dass Antikörper gegen L1CAM einen therapeutischen Effekt besitzen und sowohl die Zellproliferation *in vitro* reduzieren als auch das Tumorwachstum von humanen Ovariumkarzinomen in Maus Xenograftmodellen negativ beeinflusst (Wolterink et al., 2010; Arlt et al., 2006; Knogler et al., 2007; Gast et al., 2008). Noch ist allerdings unklar in welchem Maß der Antikörper die Homöostase von anderem L1CAM exprimierendem Gewebe beeinflusst. Neben den peripheren Nerven wird L1CAM außerdem von Zellen des Nieren und Milzgewebes exprimiert (Pancook et al., 1997; Helbert et al., 2001; Weidle et al., 2009).

Die Herstellung eines transgenen Tieres erfolgte via Mikronjektion der humanen L1CAM DNA-Sequenz in die Eizellen während der Pronukleusphase und als Trägertiere wurde Mäuse von dem Stamm C57Bl/6 verwendet (*black 6*). Die verwendete genomische Sequenz von L1CAM wurde aus einem BAC-Klon isoliert. Nach dem Austragen der Nachkommen wurden Schwanzgewebeproben entnommen und die Tiere über eine PCR-Analyse auf die Transgen-DNA getestet. In Abbildung D 47 ist ein exemplarisches Ergebnis einer PCR-Analyse sichtbar (s. Abb. 48). Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen.

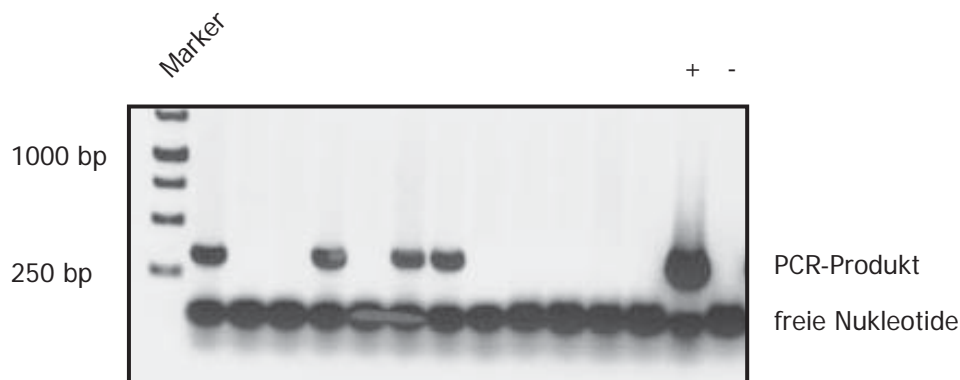


Abbildung D 48 Genotypisierung von transgenen Mäusen durch PCR-Analyse. Zur Detektion des ins Genom integrierte L1CAM wurden spezifische Primer gegen das humane L1CAM verwendet. Als Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA (BAC-Klon) mit der genomischen Sequenz des humanen L1CAM verwendet. In der Negativkontrolle wurde die DNA gegen das entsprechende Volumen Wasser ersetzt. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von 324 bp. (+) Positivkontrolle (-) Negativkontrolle

Die gezeigte Abbildung offenbart vier positive transgene Mäuse mit humanen L1CAM und insgesamt wurden von 210 Nachkommen 40 Mäuse mit transgenen humanen L1CAM detektiert. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von 324 bp und die Primer waren spezifisch für humanes L1CAM.

Neben der Genotypisierung erfolgte zusätzlich die Analyse der Oberflächenexpression des humanen L1CAM auf Mauslymphozyten. Es ist bekannt, dass L1CAM sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen im geringen Maße auf der Oberfläche von Lymphozyten exprimiert wird (Hubbe et al., 1993; Ebeling et al., 1996; Duczmal et al., 1997). Durch einen Zentrifugationsschritt über ein spezielles Dichtemedium wurden die peripheren Blutzellen isoliert und anschließend in einer FACS-Analyse eingesetzt. Die Verwendung von spezifischen Antikörpern ermöglichte die Detektion von murinen und humanen L1CAM. In der Abbildung D 49 b ist wiederum ein exemplarisches Ergebnis der FACS-Analyse dargestellt. Die vollständige Analyse ist im Anhang dargestellt.

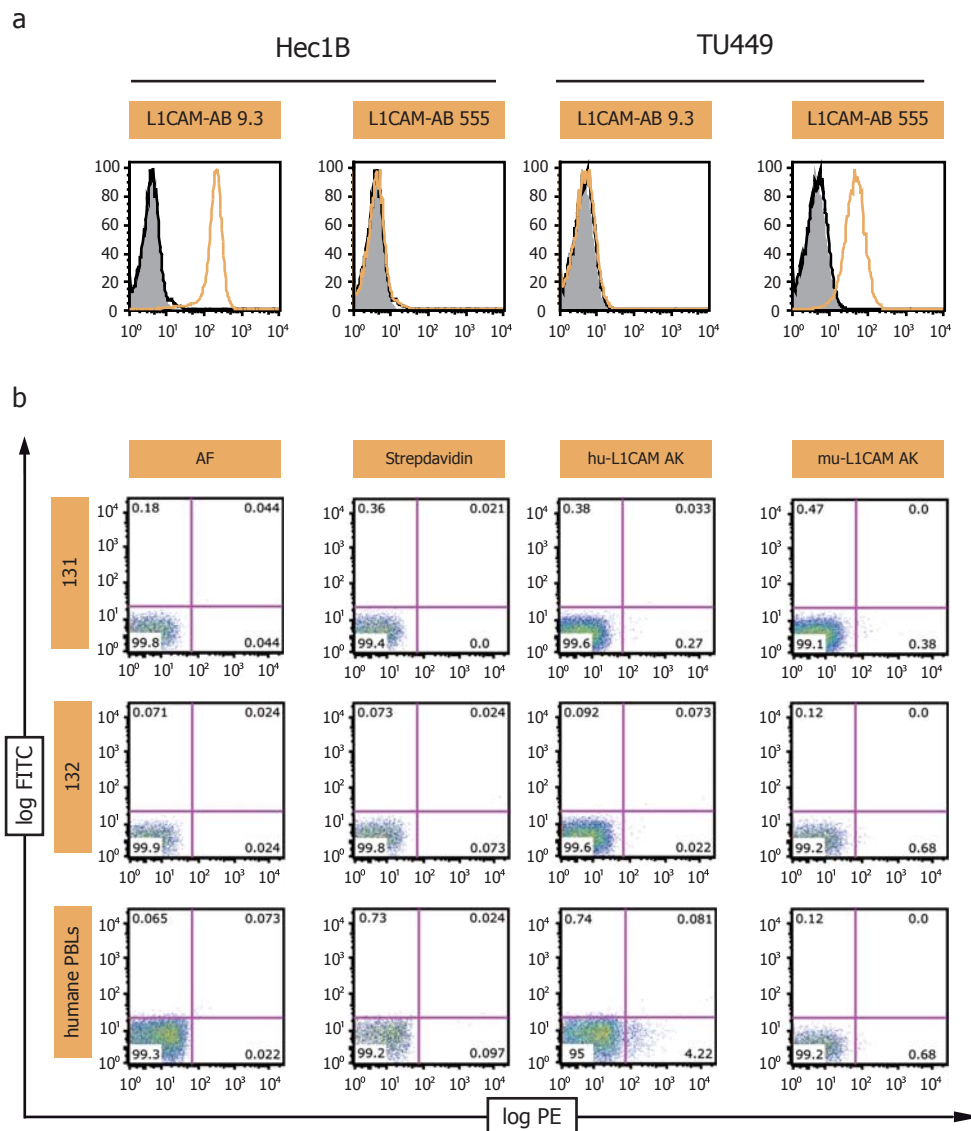


Abbildung D 49 FACS-Analyse der Oberflächenexpression von transgenen L1CAM. Die Ektodomäne des humanen L1CAM-Moleküls wurde mittels mAb L1-9.3 und des murinen L1CAMs mittels rAb 555 detektiert. Beide Antikörper wurden mit Bioin gekoppelt und Streptavidin-PE diente als Fluoreszenzkontrolle. (a) FACS-Analyse zur Bestätigung der spezifischen AK-Bindung an murines oder humanes L1CAM bei einer humanen EK-Zelllinie (Hec1B) und einer murinen Zelllinie (TU449). (b) L1CAM Oberflächenexpression bei murinen und humanen PBLs.

Alle getesteten transgenen Mäuse waren negativ für die Oberflächenexpression von humanen L1CAM bei Lymphozyten. Lediglich bei der humanen Positivkontrolle war es möglich eine Population von L1CAM exprimierenden Lymphozyten zu identifizieren. Auf Mauslymphozyten wurde teilweise nur eine sehr schwache Expression von murinen L1CAM nachgewiesen. Die Funktionalität und Spezifität der Antikörper wurde in einem weiteren Experiment mit humanen und murinen L1CAM positiven Zelllinien nachgewiesen. Der L1CAM-9.3 Antikörper bindet ausschließlich an humanes L1CAM während der L1CAM-555 dementsprechend nur murines L1CAM erkennt (s. Abb. 49.a). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie war es jedoch nicht möglich eine Expression von humanen L1CAM bei Mauslymphozyten nachzuweisen. Es ist möglich, dass die Zellzahl der Population von L1CAM exprimierenden B-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl zu gering war und unter der Detektionsgrenze lag. In diesem Fall wäre eine Anreicherung der B-Zellpopulation notwendig und anschließend eine Analyse der L1CAM-Expression. Alternativ dazu wurde die L1CAM-Expression im Nierengewebe durch einen L1CAM spezifischen Elisa oder eine Immunopräzipitation untersucht. Dazu wurden Lysate aus dem Nierengewebe hergestellt und für den jeweiligen Assay eingesetzt. Es wurden die Nieren aus sechs positiv getesteten transgenen Tieren entnommen. Zur Kontrolle wurden zusätzlich die Nieren aus einer negativen Maus isoliert. Der Elisa bzw. die Immunpräzipitation wurden jeweils mit einem humanen oder murinen L1CAM-Antikörper durchgeführt. Die Expression des murinen L1CAM-Proteins sollte in allen Mäusen ein ähnliches Niveau erreichen.

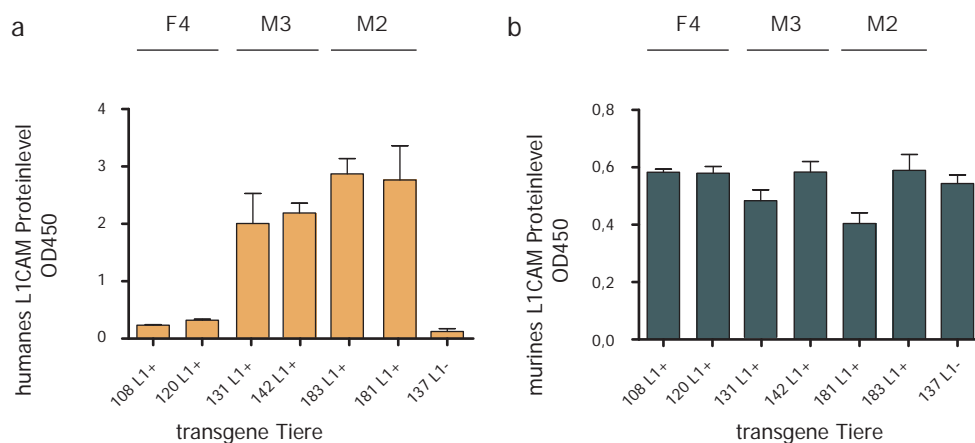


Abbildung D 50 L1CAM-Elisa zur Detektion des L1CAM-Proteinlevels im Nierengewebe von transgenen Mäusen. (a) Elisa mit humanen L1CAM Antikörper. (b) Elisa mit murinen L1CAM Antikörper. Die Photometrische Messung erfolgte bei 450 nm und das OD-Signal ist proportional zur L1CAM-Expression. In der Genotypisierung für humanes L1CAM positiv getestete Mäuse sind durch die entsprechende Nummer und (L1+) gekennzeichnet. Als Kontrolltier wurde ein negativ getestetes Tier verwendet (L1-).

In Abbildung D 50 sind die Expressionslevel von humanen und murinen L1CAM dargestellt. Die Resultate zeigen eine deutliche Expression von humanen L1CAM in vier der sechs positiv getesteten Tiere und eine schwächere Expression in den zwei übrigen Tieren. Keine Expression von humanen L1CAM konnte dagegen in dem Kontrolltier festgestellt werden (s. Abb. D48 a). Die schwach exprimierenden Tiere stammen von einem gemeinsamen Elterntier (F4), während die vier positiven Tiere von jeweils zwei weiteren Elterntieren stammen (M3 und M2). Das lässt darauf schließen, dass der Locus des humanen L1CAM ent-

scheidend für die Expression ist und es trotz der Bestätigung durch die Genotypisierung es zu einer Varianz in der Proteinexpression kommt. Das erfordert neben der Genotypisierung auch immer eine Bestimmung des Proteinlevels bei mindestens einem Nachkommen eines Elterntiers. Elterntiere deren Nachkommen einen zu geringen Proteinlevel aufweisen sind für eine weitere Verpaarung und Untersuchung der Antikörpereffekte auszuschließen. Die Expression des murinen L1CAM war entsprechend den Erwartungen bei allen Tieren gleich (s. Abb. D 50b). Das Ergebnis gilt als interne Kontrolle und bestätigt die Funktionalität des L1CAM-Elisa-Assays.

Durch Immunpräzipitation konnten die Ergebnisse aus dem Elisa bestätigt werden (s. Abb. 51).

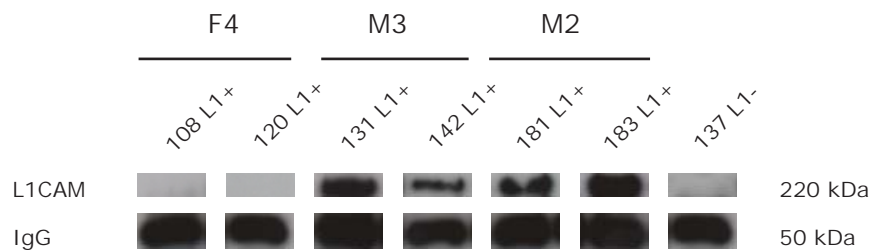


Abbildung D 51 Immunpräzipitation von humanen L1CAM aus murinen Gewebelysaten. Die Präzipitation und Detektion erfolgte mit dem L1CAM-9.3 Antikörper gegen humanes L1CAM. Bei jedem IP-Ansatz wurde die gleiche Gesamtprotein- und Antikörpermenge eingesetzt. Als Lade- und Transferkontrolle dienten die detektierten Ketten des eingesetzten Antikörpers

E Diskussion

1. *Expression von L1CAM im Endometriumkarzinom*

Die Expression von L1CAM in gynäkologischen Tumoren wurde bereits 2003 beschrieben (Fogel et al., 2003). Im Ovarial- und Endometriumkarzinom korreliert die Expression von L1CAM mit einer schlechten Prognose. Besonders auffällig ist die Expression von L1CAM im Endometriumkarzinom. Hier wird L1CAM hauptsächlich von Typ-II-Karzinomen exprimiert, welche wiederum mit einer schlechten Prognose korrelieren. Trotz des üblicherweise positiven Verlaufs von Typ-I-Karzinomen nimmt die Krankheit im Falle einer L1CAM-Detektion einen schlechten Verlauf (Fogel et al., 2004). Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde das L1CAM-Molekül als prognostischer Marker vorgeschlagen (Fogel et al., 2004).

Die Expression von L1CAM innerhalb der invasiven Front und metastatischen Läsionen von Ovarial- und Endometriumkarzinomen ist ein weiteres charakteristisches Merkmal und unterstreicht die Rolle von L1CAM bei der Progression des primären Tumors oder der Metastasierung. Die Detektion von L1CAM in atypischen Endometriosen des Ovars, welche sich mit höherer Wahrscheinlichkeit zu Karzinomen entwickeln, deutet ebenfalls auf eine Funktion bei der Entstehung der Tumore hin (Finas et al., 2008). Abgesehen davon wird ebenfalls vermutet, dass nicht nur allein das Epithel des Ovars der Ursprung für seröse Ovarialkarzinome ist. Eine weitere Theorie besagt, dass aus den Fimbrien der Eileiter ebenfalls Tumorzellen hervorgehen, diese ins Ovar migrieren und dort ein malignes Wachstum auslösen (Kim et al., 2012, Hillier et al., 2012). Ein ähnliches Szenario ist ebenfalls für Endometriumkarzinome denkbar. Außerdem ist uns bekannt das Zellen in den Fimbrien der Eileiter ebenfalls mehr oder weniger L1CAM exprimieren können. Es ist also durchaus denkbar das diese L1CAM positiven Zellen der Ursprung für L1CAM exprimierende gynäkologische seröse Karzinome ist.

In welchem Maße L1CAM zur Entwicklung gynäkologischer Tumoren beiträgt wurde in zahlreichen funktionellen Analysen des Moleküls untersucht, ist aber noch nicht vollständig verstanden. In Ovarialkarzinomen vermittelt L1CAM eine erhöhte Migration, Zellproliferation und übernimmt eine entscheidende Funktion bei der Aktivierung der Erk-Kinase. (Silletti et al., 2004; Gavert et al., 2005; Gast et al., 2008). Außerdem zeigen Zellen mit einer erhöhten L1CAM-Expression eine geringere Apoptoserate (Stoek et al., 2007; Muerkoster et al., 2010). Eine Analyse der L1CAM-Expression in Endometriumkarzinomen offenbarte eine TGF- β 1 induzierte und vom Transkriptionsfaktor Slug vermittelte Aktivierung des L1CAM Gens (Huszar et al., 2010). Die Behandlung mit TGF- β 1 steigerte zudem das Invasionspotential der untersuchten Endometriumkarzinom-Zelllinien.

Trotz zahlreicher Studien zur Funktion von L1CAM während der Tumorprogression ist wenig über den Mechanismus der Hochregulation dieses Gens in Tumoren bekannt. Für Endometriumkarzinome, insbesondere die Typ-II-Karzinome, gibt es bisher keinerlei Erkenntnisse zu den molekularen Grundlagen der abnormalen L1CAM-Expression.

2. Die Expression von L1CAM während der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT)

In den vergangenen Jahren wurde eine EMT abhängige Expression von L1CAM diskutiert. Die Expression von L1CAM an der invasiven Front von Primärtumoren unterschiedlicher Entitäten war ein erster Hinweis, dass L1CAM beim Ablauf der EMT involviert sein könnte (Kajiwara et al., 2012; Min et al., 2010; Gavert et al., 2005; Zecchini et al., 2008; Huszar et al., 2010). Einige Prozesse innerhalb der invasiven Front gleichen den molekularen Wechseln der EMT während der embryonalen Entwicklung (Thiery et al., 2009, Prall et al., 2007). Ein zentrales Ereignis der EMT, sowohl in der Tumorgenese als auch der Embryogenese, ist die Repression von E-cadherin durch die Zinkfinger- Transkriptionsfaktoren SNAIL und Slug (Peinado et al., 2007, Batlle et al., 2000). Huszar und Kollegen detektierten in der invasiven Front von Endometrialkarzinomen eine Reduktion der E-cadherin-Expression, was invers korrelierte mit der L1CAM-Expression (Huszar et al., 2010). Dieses Ergebnis war ein weiteres Indiz für eine EMT-abhängige Expression von L1CAM. Der EMT-Prozess ermöglicht die Migration und anschließende Invasion einzelner Zellen aus dem Primärtumor in das benachbarte Gewebe (Thiery et al., 2002, Yang und Liu, 2001). Es ist bekannt, dass diese Zellfunktionen auch durch eine erhöhte Expression von L1CAM in Tumorzellen unterstützt werden (Shtutman et al., 2006; Gast et al., 2009; Thelen et al., 2002, Gavert et al., 2005; Mechtersheimer et al., 2001). Ein weiteres Merkmal der EMT in der Entwicklung ist die Induktion durch Zytokine wie TGF- β 1 und HGF. Bei der Tumorprogression wurde ebenfalls eine EMT-Induktion durch TGF- β 1 oder HGF nachgewiesen. Die Zytokine werden von Stromazellen, infiltrierenden Zellen oder den Tumorzellen selbst produziert, führen zu einer Aktivierung unterschiedlicher Signalwege und einer geänderten Expression von Transkriptionsrepressoren oder -aktivatoren (Yang et al., 2008; Schmalhofer et al., 2008). TGF- β 1 hat während der Tumorprogression eine bivalente Rolle. Während es in der frühen Phase den Zellzyklus blockiert und Apoptose induziert, verstärkt es in der späten Phase die Karzinogenese, induziert EMT, die Zellinvasion und die Metastasierung (Siegel et al., 2003). Dementsprechend korreliert in einigen Tumoren eine TGF- β 1-Überexpression mit einer schlechten Prognose (Lee et al., 2012; von Rahden et al., 2006; Christeli et al., 1996). Eine erhöhte HGF-Konzentration wurde ebenfalls in der Aszites-Flüssigkeit von Ovarialkarzinomen detektiert (Corps et al., 1997; Baykal et al., 2003).

Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Langzeitbehandlungen der Endometriumkarzinomzelllinien mit TGF- β 1 oder HGF ergaben differenzielle Effekte der Zytokine bei der EMT-Induktion (s. Abb. D 7 und 8). Die für die EMT charakteristischen molekularen Wechsel wurden für die Zelllinien Hec1A, ECC1, EN1 und Hec1B auf mRNA-Ebene und für die bei ECC1 und Hec1A auf Proteinebene analysiert. Auf mRNA-Ebene konnte nachgewiesen werden, dass bei drei der vier Zelllinien lediglich die TGF- β 1-Behandlung zu einer kompletten Induktion der EMT führte. Ein ähnliches Bild ergab sich auf Proteinebene für die Zelllinien ECC1 und Hec1A. Im Gegensatz dazu waren die Effekte von HGF nur auf einige der untersuchten Gene beschränkt.

HGF wird in der Literatur als „scatter factor“ bezeichnet, da er durch die Aktivierung der p70^{S6}-Kinase oft nur zu einer unvollständigen EMT-Induktion führt (Zhou et al., 2006; Birchheimer et al., 1997). Die Western-Blot-Analyse offenbarte eine Hochregulation von L1CAM bei ECC1 und Hec1A durch HGF. Auf mRNA-Level wurde dagegen lediglich bei den Zelllinien Hec1A und EN1 eine Hochregulation von Vimentin detektiert. Die Behandlung führte außerdem in EN1-Zellen zu einer Hochregulation der L1CAM-

Expression. Bei allen Zelllinien wurde jedoch keine entscheidende Änderung in der Expression von E-cadherin, SNAIL und Slug beobachtet. Die Hochregulation von SNAIL und Slug bzw. Repression von E-cadherin ist jedoch entscheidend für den EMT-Prozess (Peinado et al., 2007; Thiery et al., 2009).

Im Gegensatz dazu kam es nach der Behandlung mit TGF- β 1 zu einer EMT-ähnlichen Regulation der molekularen Marker. Die drei L1CAM negativen Zelllinien ECC1, Hec1A und EN1 reagierten bei der Analyse der mRNA mit einer deutlich erhöhten Expression von Vimentin und einer Repression von E-cadherin. Vimentin ist als Intermediärfilament mit der EMT assoziiert und wird im Verlauf des Prozesses hochreguliert (Gilles et al., 2004; Kokkinos et al., 2012). Ein weiterer Indikator für einen Wechsel zum mesenchymalen Phänotyp ist die Hochregulation von Slug in allen getesteten Zelllinien. Allerdings zeigten die Level der Transkriptionsfaktoren SNAIL und β -catenin nur marginale Veränderungen nach der TGF- β 1-Behandlung. Lediglich bei der Zelllinie Hec1A konnte ein Anstieg der SNAIL-Expression detektiert werden. Nach diesen Ergebnissen spielen SNAIL und β -catenin nur eine untergeordnete Rolle bei der Induktion des EMT-Prozesses in Endometrialkarzinomzelllinien.

Die Hochregulation von Slug weist jedoch auf dessen zentrale Rolle hin. Eine durch TGF- β 1 induzierte und durch Slug vermittelte Repression von E-cadherin konnte bereits in anderen epithelialen Zellen nachgewiesen werden (Choi et al., 2007). Dass Slug in den Endometriumkarzinomzelllinien essentiell für die EMT-Regulation ist, konnte durch die Transfektion mit Slug siRNA nachgewiesen werden (s. Abb. D 10). Die Inhibition der Slug-Expression führte zu einer Reversion der EMT spezifischen molekularen Wechsel nach TGF- β 1-Behandlung. Durch die Slug-siRNA verringert sich im Vergleich zu siGFP transfizierten Zellen der Effekt der Slug-Genaktivierung nach der TGF- β 1-Behandlung. So näherte sich der Slug-mRNA-Level dem Ausgangswert der unbehandelten Zellen und als Folge dessen verringert sich der Effekt auf die E-cadherin-Repression und Vimentin-Expression. Die TGF- β 1 induzierte L1CAM-Expression ging in den beiden analysierten Zelllinien nach siSlug-Transfektion ebenfalls auf das Grundniveau der unbehandelten Zellen zurück (s. Abb. D 10 A und B). Dass ein erhöhter Slug-Level in der Folge das L1CAM-Gen aktiviert, konnte durch die Überexpression von L1CAM bestätigt werden (Abb. D 9).

In Pankreaskarzinomzellen und epithelialen Kolonzellen wurde ein aktivierender Effekt von Slug auf die L1CAM-Expression nachgewiesen und gezeigt, dass die TGF- β 1 induzierte Hochregulation von L1CAM Smad-Protein unabhängig ist. Die Induktion des Slug-Gens erfordert dagegen die Aktivierung der c-Jun-NH₂-terminalen Kinase (Geismann et al., 2009; Schäfer et al., 2012). Eine weitere Arbeit belegte eine EMT assoziierte Expression von L1CAM bei Pankreaskarzinomzelllinien nach TGF- β 1 Behandlung. Es kam zu einer Hochregulation der mesenchymalen Marker Vimentin und Slug und einer Runterregulation des epithelialen Markers E-cadherin (Kiefel et al., 2011).

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit belegen die EMT assoziierte L1CAM-Expression nach TGF- β 1 Behandlung. Drei der vier Zelllinien reagierten auf mRNA-Ebene mit einer vollständigen EMT und einem Wechsel in der Expression der molekularen Marker. Im Gegensatz dazu kam es bei der L1CAM-positiven Zelllinie Hec1B nur zu einer Hochregulation von Slug während die weiteren analysierten Gene keine Änderung in der Expression aufwiesen. Der deutlich erhöhte Slug-Level induzierte auch keine L1CAM-Expression. Allerdings exprimieren die Zellen bereits sehr stark L1CAM und Vimentin wodurch weitere Effekte durch den TGF- β 1 Signalweg anscheinend nicht nachweisbar sind (s. Abb D 2 und D 4). Die E-cadherin-Expression ist im Gegensatz dazu relativ niedrig (s. Abb. D 4). Nach diesem Expressionsmuster entsprechen die Hec1B-Zellen dem mesenchymalen Phänotyp (Kalluri und Weinberg, 2009) welcher demnach auch

mit einer erhöhten L1CAM-Expression assoziiert ist.

Die ChIP-Analyse der L1CAM-Promoterregion mit einem Slug-spezifischen Antikörper ist ein Beleg für die direkte Aktivierung der L1CAM-Expression während des EMT-Prozesses durch Slug (s. Abb. D 11). Eine Interaktion von Slug mit dem L1CAM-Promoter wurde auch in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 und der epithelialen Kolonzelllinien NCM460 gezeigt (Geismann et al 2009, Schäfer et al., 2012). Bei Hec1A-Zellen wurde mittels ChIP-Analyse eine Bindung von Slug in beiden L1CAM-Promoterelementen nachgewiesen. ECC1-Zellen offenbarten nur im 2. Promoter eine Bindung von Slug. Die differenzielle Bindung kann durch eine zellabhängige Nutzung der Promotoren erklärt werden (Pfeifer et al., 2010)

Die HGF-Behandlung resultierte im Gegensatz zu TGF- β 1 nur in einer unvollständigen Induktion der EMT. In keiner Zelllinie konnte eine E-cadherin-Repression gleichzeitig mit einer Vimentin-Aktivierung detektiert werden (s. Abb. D 8). Bei Hec1A- und ECC1-Zellen wurde auf Proteinebene allerdings eine Hochregulation von L1CAM nach der HGF-Behandlung sichtbar. Gleiches war auch bei SKOV3ip-Zellen zu beobachten (Nova-Hofer et al., 2008). Eine Hochregulation von L1CAM war nach Analyse des mRNA-Levels jedoch nicht sichtbar. Es ist denkbar, dass es durch die HGF-Behandlung zu einer Stabilisierung des L1CAM-Proteins kommt. Für eine genauere Erklärung bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

3. *Regulation von L1CAM durch REST und Histonmodifizierungen*

Die meisten Erkenntnisse zur Repressorfunktion des RE1-silencing transcription factor (REST) stammen aus Experimenten mit neuronalen Zellen. REST wurde als transkriptioneller Repressor von einer Vielzahl neuronaler Differenzierungsgene identifiziert (Schoenherr et al., 1995) und wird im Allgemeinen ubiquitär von nichtneuronalen Zellen exprimiert (Chen et al., 1998). Bei den hier analysierten EK-Zelllinien wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine gleichmäßige REST-Expression detektiert (Abb. D 2 und D 3), was die ubiquitäre Expression von REST in nicht neuronalen Zellen belegt.

Die Repressorfunktion von REST wird durch zahlreiche Interaktionspartner vermittelt. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Chromatinmodifizierende-Enzyme wie Histondeactylasen und Histonmethyltransferasen (Huang et al., 1999; Roopra et al., 2000).

Die zentrale Funktion von REST wurde weiterhin durch einige globale Bindungsstudien belegt. So wurde in bis zu 2000 Genen mit Hilfe von genomische Analysen die RE-1 Bindestelle identifiziert (Bruce et al., 2004; Johnsen et al., 2007). Neben L1CAM wurde bei den Analysen das Repressorelement-1 (RE-1) unter anderem in den Promotoren von SNAP25, Synaptophysin und Chromogranin identifiziert. Die Moleküle Synaptophysin und Chromogranin sind unter anderem Marker für neuroendokrine Tumore (Erikson et al., 2004), deren REST-abhängige Regulation in verschiedenen Tumoren nachgewiesen wurde (Majumder et al., 2006; Kashiwagi et al., 2012). Außerdem supprimiert REST die Aktivität der Phosphatidylinositol 3-Kinase (Westbrook et al., 2005). Eine Tumorsuppressorfunktion von REST zeigte sich auch durch die Regulation des Onkogens TAC-1 in den Brustkarzinomzellen T47D und MCF12A (Reddy et al., 2009).

Die Ergebnisse belegen die Relevanz von REST bei der Regulation von neuronalen Markern in unterschiedlichen Tumoren. Neben den globalen Analysen wurde die Regulation von L1CAM durch REST bereits in neuronalen Zellen nachgewiesen (Kallunki et al., 1997, 1998). Trotz der bekannten Tumorsuppressorfunktion von REST und der Regulation von L1CAM wurde der Einfluss zwischen einer eingeschränkten

REST-Funktion und einer erhöhten L1CAM-Expression in den Tumoren noch nicht untersucht.

Die Transfektion der L1CAM-negativen Zelllinien mit REST spezifischer siRNA induzierte eine deutliche Hochregulation von L1CAM auf mRNA- und Protein-Ebene (s. Abb. D 13 und D 14). Konform zu diesen Ergebnissen inhibiert die REST-Überexpression die L1CAM-Expression in den L1CAM positiven Zelllinien Hec1B und SPAC1L (Abb. D 12). Die Resultate belegen die REST-Suppressorfunktion bei L1CAM in den Endometriumkarzinomzelllinien. Eine transiente REST-Repression resultiert demnach in einem Anstieg der L1CAM-Expression in L1CAM-negativen Zelllinien, während eine REST-Überexpression den gegenteiligen Effekt erzielt. Die Analyse der endogenen Expressionslevel von REST in den EK-Zelllinien gibt jedoch keinen Aufschluss über den Zusammenhang zwischen der REST- und L1CAM-Expression. In Brustkarzinomen konnte nachgewiesen werden, dass nicht allein der REST-Expressionslevel für die Tumorprogression entscheidend ist. Die Experimente offenbarten einen Verlust der REST-Funktion durch die dominant negative Variante REST4 bei gleichbleibender REST-Expression (Wagoner et al., 2010). Durch ein zusätzliches Exon in der mRNA wird ein weiteres Stopcodon in die Sequenz eingeführt und es kommt zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. Die Expression von REST4 und der damit einhergehende Verlust der Suppressorfunktion wurden ursprünglich in Neuroblastomzelllinien nachgewiesen (Palm et al., 1998 ; Lee et al. , 2000 ; Tabuchi et al., 2002).

Bei den untersuchten EK-Zelllinien spielt die Expression von REST4 jedoch nur eine untergeordnete Rolle (s. Abb. D 18 und Tab. D 2). Die Sequenzierung der PCR-Fragmente offenbarte die Expression von REST4 in den Zelllinien EN1 und Hec1B. Allerdings belegte die Analyse der relativen Expression einen äußerst geringen Expressionlevel von REST4 im Vergleich zur normalen Form von REST. Die Daten belegen, dass REST4 nicht zur differenzierten Expression von L1CAM in den EK-Zelllinien beiträgt. Bei allen Zellen lag das mRNA-Level von REST4 nur knapp unter der Nachweisgrenze und war bei einigen Zellen bis zu 40.000 mal niedriger als der REST-mRNA-Level (s. Tab. 2).

Ein weiteres Kriterium für die Funktionalität eines Transkriptionsfaktors ist die nukleäre Translokation. Der nukleocytoplasmatische Transport von REST ist abhängig von der nukleären Lokalisationsdomäne oder wird von der Interaktion mit weiteren Proteinen wie PRICKLE1 (RILP), HTT und DCTN1 (Shimojo et al., 2001; Shimojo und Hersh, 2003; Shimojo et al., 2008) beeinflusst. Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von REST in EK-Zelllinien mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie offenbarte eine gleichmäßige Lokalisation von REST innerhalb der Nuklei und es konnte keine Anreicherung von REST im Zytoplasma detektiert werden. Eine geänderte Translokation von REST ist vor allem bei der sog. „Huntington Erkrankung“ von Bedeutung. Durch die Mutation des htt-Proteins wird die Interaktion mit REST inhibiert und es ist eine erhöhte Akkumulation von REST im Nukleus nachweisbar. In Folge dessen kommt es zu einer Repression von neuronalen Genen in den Neuronen (Zaccato et al., 2007). In Tumoren wurde bis zum heutigen Zeitpunkt jedoch keine veränderte nukleäre Translokation des REST-Proteins nachgewiesen.

Einen ersten Hinweis auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Suppressorfunktion von REST und der erhöhten L1CAM-Expression in den EK-Zelllinien ergab die Analyse der Bindungsaffinität von REST innerhalb des L1CAM-Promoters (s. Abb. D 19). Die L1CAM positiven Zelllinien wiesen in der ChIP-Analyse eine geringere REST-Bindungsaffinität an verschiedene RE-1 Bindesequenzen auf. So lag die nachgewiesene Bindung von endogenem REST an die RE1-Bindesequenzen im Promoter von L1CAM und SNAP25 jeweils unter der von den vier L1CAM negativen Zelllinien EN1, ECC1, Hec1A, MFE296. Dagegen war die Interaktion von REST mit dem Promoter von Synaptophysin in allen Zellen auf einem deutlich

geringeren Niveau. Durch eine Überexpression von REST in den L1CAM-positiven Zelllinien Hec1B und SPAC1L kam es zu einem Anstieg der Interaktion von REST mit dem RE-1-Bindemotiv. Als Folge dieser erhöhten Bindung kam es sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinlevel zu einer Repression von L1CAM (s. Abb. D12). Dennoch war die spezifische Bindung von REST bei den transfizierten L1CAM-positiven Zellen stets schwächer als bei allen L1CAM-negativen Zelllinien.

Die Bindung von REST allein ist allerdings noch keine Erklärung für die Repression von neuronalen Genen, in deren Promotor ein RE-1 Bindemotiv lokalisiert ist. Verschiedene Arbeiten belegen, dass die Repressorfunktion von REST von Chromatin-modifizierenden Co-Faktoren vermittelt wird und die Funktion auch in Abwesenheit von REST aufrecht erhalten werden kann (Balles et al., 2005a; Balles et al., 2005b). Von besonderer Bedeutung sind hier die Interaktionspartner CoREST und mSin3, welche durch die Wechselwirkung mit unterschiedlichen Histon-modifizierenden Enzymen die dauerhafte Repression von neuronalen Genen in nicht neuronalen Zellen induzieren. Zum Beispiel ist in embryonalen Stammzellen und neuronalen Vorläuferzellen die Rekrutierung von Histondeacetylasen (HDACs) durch CoREST und Sin3a essentiell für die REST-Repressorfunktion (Balles et al., 2005a). Beide Moleküle bilden in nicht neuronalen Zellen stabile Komplexe mit HDACs (Roopra et al., 2000; Naruso et al., 1999; You et al., 2001; Balles et al., 2001). Ein Beleg für die HDAC abhängige Regulation von neuronalen Genen ist deren Hochregulation in neuronalen Vorläuferzellen nach der Behandlung mit dem HDAC-Inhibitoren (Balles et al., 2005a; Hsieh et al., 2004). So induzierte eine Behandlung mit Valproinsäure (VA) die Expression von Synapsin I und NeuroD oder mit Trichostatin A (TSA) die von SNAP25, Calbindin und BDNF. Beide Inhibitoren führen in ECC1- und Hec1A-Zellen ebenfalls zu einer erhöhten Expression von L1CAM. Die Ergebnisse sind ein Hinweis auf eine Histondeacetylase vermittelte Repression von L1CAM unter der Beteiligung von REST (s. Abb D 20 und D 21). Aus der spezifischen Inhibition der HDAC1 durch die Valproinsäure lässt sich auch auf eine Funktion der Histondeacetylase bei der L1CAM-Repression schließen.

Beide Inhibitoren beeinflussen die globale Histonmodifizierung bereits bei der geringsten verwendeten Konzentration und induzieren eine zunehmende Acetylierung des Histonproteins H3 und einen Anstieg der L1CAM-Expression (Abb. D 20). Die Acetylierung erfolgt an den Lysinen des Histons und ist im Allgemeinen mit einer transkriptionellen Aktivierung verbunden (Mack et al., 2006; Bernstein et al., 2007). Durch die Neutralisation der positiv geladenen Lysin-Seitenkette wird die Interaktion mit den Phosphatgruppen der DNA eingeschränkt und das Chromatin damit für Transkriptionsfaktoren zugänglich.

Bereits 2007 berichteten Kuwajima und Kollegen von dem Einfluss unterschiedlicher HDAC-Inhibitoren in B16-BL6 Melanomzellen. Sowohl der Inhibitor TSA als auch Butyrat induzierten eine Hochregulation von L1CAM (Kuwajima et al., 2007).

Die Daten aus dieser Arbeit bestätigen eine Modulation der L1CAM-Expression durch HDAC-Inhibitoren in Endometriumkarzinomzelllinien. Einen ähnlichen Effekt auf die L1CAM-Aktivierung hatte die Inhibition der REST-Expression in den EK-Zellen. Basierend auf den beschriebenen Interaktionen zwischen REST und HDACs lässt sich ein Zusammenhang zwischen beiden Effekten herstellen. Es ist denkbar, dass die epigenetischen Effekte der Histonmodifizierung REST-vermittelt sind und durch eine Interaktion zwischen REST mit dem RE-1-Bindemotiv im L1CAM-Promoter bestimmt werden. Die einzelnen Co-Faktoren sind essentiell für die Repressorfunktion von REST. Demnach ist der Expressionslevel von REST nicht unbedingt ausschlaggebend für die Repression der neuronalen Zielgene. Für eine Identifikation der an der L1CAM-Regulation beteiligten Co-Faktoren sind weitere Experimente notwendig.

4. Regulation von L1CAM durch DNA-Methylierung

Eine der ersten epigenetischen Änderung, die bei humanen Tumoren entdeckt wurde, war die verminderte DNA-Methylierung im Vergleich zu dem entsprechenden gesunden Gewebe (Feinberg et al., 1983). Es wird vermutet, dass in der Konsequenz die globale DNA-Hypomethylierung über drei Mechanismen zu der Tumorprogression beiträgt: Entstehung chromosomaler Instabilität, die Reaktivierung von Transposonelementen und der Verlust der genomischen Prägung (*Imprinting*) (Esteller, 2008).

Eine verminderte DNA-Methylierung und eine Änderung der genomischen Prägung induziert eine Expression von Genen, welche unter normalen Bedingungen in dem betroffenen Gewebe stark reguliert ist. So ist die Ursache für eine Expression von *IGF2* (Insulin-Wachstumsfaktor, *insulin growth factor 2*) in Kolonkarzinomen eine verminderte DNA-Methylierung und der damit verbundene Verlust der genomischen Prägung (Cui et al., 2003; Kaneda et al., 2005). Die Expression von Testis spezifischen Genen, beispielsweise CT-X-Genen, ist auch auf eine Hypomethylierung zurück zu führen. Bei diesen Genen kommt es zu einer Demethylierung der CpGs im Promoterbereich und einer zunehmenden Expression in somatischen Zellen (Feinberg, 2004). Zwei weitere Beispiele für dieses Ereignis sind die Regulation des Pax2-Gens und die Aktivierung des let-7a-3 miRNA-Gens in Endometrium- bzw. Kolonkarzinomen (Wu et al., 2005; Brueckner et al., 2007). Einen Zusammenhang zwischen der Promotermethylierung und der Genaktivierung wurde auch für L1CAM beschrieben. In Kolonkarzinomen war die Hypomethylierung des Promoters mit einer erhöhten L1CAM-Expression assoziiert (Kato et al., 2009).

In Endometriumkarzinomen wurde der Aspekt der Epigenetik und deren Einfluss auf die L1CAM-Expression bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht untersucht. Es wird allerdings vermutet, dass die epigenetische Regulation auch die Tumorprogression bei Endometriumkarzinomen beeinflusst. Die Ergebnisse einer Analyse des globalen Methylierungsmusters offenbarten einen Anstieg der Promotermethylierung bei 24 Tumorsuppressorgenen mit zunehmender Progression vom normalen Endometrium bis zur komplexen Hyperplasie (Nieminen et al., 2009). Dementsprechend wurde in Endometriumkarzinomen vermehrt die epigenetische Inaktivierung der Promoteren von Tumorsuppressorgenen festgestellt. Epigenetische Veränderungen scheinen in Endometriumkarzinomen weit häufiger die Ursache für anormale Genexpressionen zu sein als genetische Veränderungen (Campan et al., 2006.; Sasakai et al., 2003; Kang et al., 2006). Eine gesteigerte Hypermethylierung wurde unter anderem in den Promoterbereichen der Gene APC, E-cadherin, PTEN und RASSF1A nachgewiesen (Salvesen et al., 2001; Campan et al., 2006; Sasakei et al., 2003; Kang et al., 2006). Diese Ergebnisse unterstrichen die zentrale Rolle der DNA-Methylierung bei der Progression von Endometriumkarzinomen. Allerdings belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass L1CAM im Gegensatz zu den Tumorsuppressorgenen in Folge einer Hypomethylierung hochreguliert wird. Hier konnte die Arbeitsgruppe um Zhou und Kollegen jedoch belegen, dass es im Vergleich zum Normalgewebe vor allem in Typ-II-EK zu einem verminderten Expression von DNMT1 und DNMT3b kommt (Zhou et al 2007; Xiong et al., 2005). Der Verlust von den DNMTs würde demnach zu einer Hypomethylierung der chromosomalen DNA führen. Die Effekte einer globalen Hypomethylierung durch eine verminderte DNMT1-Aktivität wurden bereits bei Mäusen und im humanen Gewebe untersucht. So kommt es auf Grund der Demethylierung zu einer zunehmenden genomischen Instabilität, Aneuploidie und Gendeletion (Hamilton et al., 2011). Diese genetischen Defekte treten ebenfalls verstärkt bei Typ-II-EK auf, welche wiederum positiv für L1CAM sind (Sivridis et al., 2011, Fogel et al., 2003b). Es ist demnach durchaus anzunehmen,

dass eine globale Hypomethylierung im EK auch im Bereich des L1CAM-Promoters erfolgt und so eine L1CAM-Expression ermöglicht.

Die Daten dieser Arbeit zeigen demnach, dass die Inhibition der DNA-Methyltransferasen (DNMT) durch 5'-Azacytidin eine Hypomethylierung des L1CAM-Promoters induziert und es zu einer Zunahme der L1CAM-Expression in L1CAM-negativen Zellen kommt (s. Abb. D 29, D 22-D 24). In drei der vier analysierten Zelllinien resultiert die 5'-AzaC-Behandlung in einer Reduktion der DNA-Methylierung (s. Abb. D 29). Bei den Zelllinien EN1, ECC1 und MFE296 kam es zu einer Reduktion der Methylierung um ca. 70 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Einzig die Zelllinie Hec1A zeigte keine Effekte nach der 5'-AzaC-Behandlung und der Methylierungslevel blieb konstant (s. Abb. D 29). Interessanterweise konnte in der Zelllinie auch keine Induktion der L1CAM- oder CT-X-Gen-Expression durch 5'-AzaC detektiert werden. Die Zelllinie Hec1A ist demnach resistent gegen 5'-AzaC und das ursprüngliche Methylierungsmuster bleibt erhalten. Im Gegensatz dazu reagierten die übrigen Zelllinien nach der Behandlung mit einer Aktivierung des L1CAM-Gens. Ein Vergleich der Promotermethylierung zeigte bei den drei sensitiven Zellen eine klare Reduktion nach 5'-AzaC-Behandlung (s. Abb. D29). Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass eine Hypomethylierung des Promoters zu einer Erhöhung der L1CAM-Expression führt. Ein Knockdown der DNMT1 in Hec1A-Zellen führte schließlich zu einer Induktion der L1CAM-Expression. Hierdurch wird deutlich, dass die Promotermethylierung auch in Hec1A-Zellen zur Regulation von L1CAM beiträgt. Eine weitere Bestätigung für den Einfluss der Methylierung ist die statistische Auswertung der untersuchten CpGs innerhalb des L1CAM-Promoters bei sechs EK-Zelllinien. Es zeigt sich, dass die L1CAM exprimierenden Zelllinien Hec1B und SPAC1L im distalen Promoter ein geringeres Methylierungslevel besitzen als die L1CAM-negativen Zelllinien. Einen deutlichen Unterschied im Methylierungsprofil gibt es bei den ersten 14 CpGs der CpG-Insel 1 (s. Abb. D32 u. Tab. D2). Die Analyse des Methylierungsmusters von Tumoren gab dagegen keinen Aufschluss über den Zusammenhang von Promotermethylierung und L1CAM-Expression (s. Abb. D33). In diesem Experiment wurde das Methylierungsmuster von L1CAM-positiven und -negativen Tumorearealen verglichen. Die Analyse ergab ein durchaus kontroverses Ergebnis. Denn während in drei Tumoren wie erwartet in den L1CAM defizienten Arealen eine höhere Methylierung detektiert wurde, war in drei weiteren Tumoren im L1CAM exprimierenden Gewebe die Methylierung stärker. Die Unterschiede im Methylierungslevel der Proben waren im Allgemeinen jedoch relativ gering und der Grad der Methylierung in fünf der sechs Probe ausgesprochen niedrig. Das deutet darauf hin, dass im gesamten Tumorgewebe ein niedriges Methylierungsniveau vorliegt und zur Expression von L1CAM noch weitere Faktoren notwendig sind.

In einer Arbeit von Rajnal und Kollegen konnte gezeigt werden, dass es trotz DNA-Methylierung zu einer Genexpression über einen kurzen Zeitraum kommt (Rajnal et al., 2012). Der gezeigten temporären Effekte beruhten auf einer Änderung der Histonmodifizierung und war zu jeder Zeit reversibel. Im Verlauf dieser Arbeit wurde deutlich, dass L1CAM ebenfalls durch eine Änderung der Histonmodifikationen reguliert wird und so die erhöhte Expression von L1CAM in der Tumorseite fünf erklärt werden kann. Die DNA-Methylierung resultiert nach Rajnal und Kollegen dagegen vielmehr in einer permanenten epigenetischen Reprogrammierung und ist ein molekularer Marker für die langzeitige Genregulation (Rajnal et al., 2012). Das Methylierungsmuster bleibt somit über mehrere Zellgenerationen erhalten und kann sich manifestieren (Rajnal et al., 2012, Cedar et al., 2009). Dieser Mechanismus ist eine mögliche Erklärung für das gleiche Methylierungsmuster innerhalb der untersuchten Tumore. Der Unterschied in der L1CAM-

Expression ist somit auch ein Hinweis für die Beteiligung weiterer Faktoren bei der L1CAM-Regulation und die schwache Methylierung ist die Grundlage für die Induktion der Expression. Ein Vergleich der L1CAM-Promotermethylierung von gesundem Endometriumgewebe und Tumorgewebe könnte mögliche Differenzen im Methylierungsmuster demnach besser erklären.

Aus den Analysen der Bisulfidsequenzierung ging hervor, dass die L1CAM exprimierenden Zellen Hec1B und SPAC1L nur in geringem Maße eine Methylierung des L1CAM-Promoters aufweisen. Eine Behandlung der Zellen mit 5'-AzaC diente als Kontrolle und sollte zeigen, inwiefern es zu einer Änderung der L1CAM-Expression kommt. In L1CAM positiven Kolonkarzinomen wurden nach der DNMT-Inhibitorbehandlung keine geänderten Expressionslevel festgestellt (Kato et al., 2009). Auf Grund der Promotermethylierung wurde ein ähnliches Ergebnis für Hec1B und SPAC1L-Zellen erwartet. Überraschenderweise kam es bei den EK-Zelllinien aber zu einer drastischen Reduktion der L1CAM-Expression. Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene konnte ein deutlicher Effekt beobachtet werden (s. Abb. D33 und D34).

Allerdings interkaliert 5'-AzaC bei höheren Konzentrationen neben genomischer DNA auch in mRNA oder beeinflusst die Methylierung von tRNAs (Lu und Randerath, 1980; Lee und Karon, 1980; Cihak et al., 1978). Die Interkalation in RNA resultiert in einer Beeinflussung der Proteinbiosynthese und wirkt zytotoxisch. Eine Destabilisierung der mRNA würde demnach auch zu einer Reduktion der L1CAM-mRNA führen. Durch die Behandlung mit Decitabin und den Knockdown der DNMT1 mRNA konnte jedoch gezeigt werden, dass die Effekte allein auf die globale Hypomethylierung zurück zu führen sind. Im Gegensatz zu 5'-AzaC wird Decitabin zu fast 100 % in genomische DNA integriert und führt somit ausschließlich zu einer Inhibition der DNA-Methyltransferasen (Christman et al., 2002). Dementsprechend bewirkt eine Decitabin-vermittelte Blockierung der DNMT-Funktion eine Hypomethylierung und somit eine Repression von L1CAM (s. Abb. D39 und D40). Der durchgeführte Knockdown der DNMT1 ist ein weiterer Beleg für den Einfluss eines geänderten Methylierungsmusters auf die L1CAM-Expression.

Diese Ergebnisse ergänzen die Resultate der 5'-AzaC-Behandlung und bestätigen den Zusammenhang zwischen globaler Hypomethylierung und L1CAM-Repression. Ein deutlicher Hinweis für eine zunehmende Demethylierung ist die Aktivierung der epigenetisch regulierten CT-X-Gene (s. Abb. D36). Bereits bei geringer Konzentration von 5'-AzaC ist eine Hochregulation der CT-X-Gene als Folge einer verminderten DNA-Methylierung detektierbar (s. Abb. D38). Die Repression von L1CAM ist ebenfalls bei geringen Konzentrationen nachweisbar und nimmt bei steigenden Konzentrationen zu. Der Effekt der verminderten L1CAM-Expression durch zunehmende Hypomethylierung lässt sich allerdings nicht mit einem geänderten Expressionslevel der Transkriptions-faktoren REST, Slug oder β -catenin in Verbindung bringen. Die mRNA-Level der drei Moleküle änderten sich in Hec1B- und SPAC1L-Zellen nur marginal und blieben weitestgehend stabil. Zumindest für REST wurde bereits eine Regulation durch Promotermethylierung in *Small Cell Lung Cancer* (SCLC)-Zelllinien beschrieben (Kreisler et al., 2010). Bei REST-defizienten SCLC-Zellen wurde eine erhöhte Promotermethylierung festgestellt und die Expression konnte durch 5'-AzaC aktiviert werden. Die hier untersuchten EK-Zellen exprimieren REST und dessen Expression blieb durch die Behandlung unverändert. Das nach der 5'-AzaC-Behandlung konstante Level der drei Transkriptionsfaktoren lässt demnach auf einen weiteren Mechanismus bei der L1CAM-Regulation schließen. Durch die induzierte Hypomethylierung kommt es zu einer indirekten Repression der L1CAM-Expression. Eine potentieller Mechanismus könnte die Aktivierung eines weiteren Repressormoleküls sein oder eine post-transkriptionelle Regulation der L1CAM-Expression.

5. *Post-transkriptionelle Regulation von L1CAM durch mi34a*

Ein potentieller Mechanismus der post-transkriptionellen Regulation ist die RNA-Interferenz durch MicroRNAs (miRNAs). Eine epigenetische Regulation wurde bereits für verschiedene miRNA-Spezies beschrieben und eine Veränderung des Methylierungsmusters führt zu einer Beeinflussung der miRNA-Expression (Lopez-Serra et al., 2012). MicroRNAs (miRNAs) sind eine Spezies kurzer nicht-kodierender RNAs aus ca. 22 Nukleotiden und es wird vermutet, dass mehr als 60 % der proteinkodierenden Gene durch miRNAs reguliert werden (Friedman et al., 2009). Das genomische Transkript einer miRNA, die pri-miRNA, ist wesentlich länger als die reife miRNA und besitzt wie mRNA einen poly-A-Teil. Die Prozessierung der pri-miRNA erfolgt durch das Enzym Drosha und DGCR8 und es kommt zur Bildung einer ca. 70 nt langen pre-miRNA (Gregory et al., 2004). Durch das Kerntransport-Protein Exportin-5 (XPO5) wird die pre-miRNA aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert und es erfolgt eine weitere Prozessierung durch das Ribonuklease-III-Protein Dicer in einem Komplex mit TRBP (Yi et al., 2003; Hutvagner et al., 2001). In diesem Schritt wird die funktionelle 22 nt lange miRNA gebildet und durch die weitere Bindung eines Proteins der Argonauten-Proteine (Ago) entsteht der RNA-*induced-silencing-complex* (RISC) (Liu et al., 2004). Dabei wirkt das Ago-Protein als katalytische Untereinheit. Das Zielgen des Komplexes wird durch die miRNA definiert und die Bindung von RISC erfolgt in den meisten Fällen im 3'-UTR Bereich der Ziel-mRNA. Allerdings ist die Sequenz der miRNA nicht vollständig komplementär zur mRNA-Sequenz und eine nur 2-8 nt große Kernsequenz der miRNA ist essentiell für die Interaktion (Lai et al., 2002; Lewis et al., 2003). Innerhalb der 3'-UTR von L1CAM konnten durch eine *in silico*-Bindeanalyse zahlreiche potentielle miRNA-Bindemotive identifiziert werden. Neun von diesen miRNAs zeigten eine erhöhte Expression nach 5'-AzaC-Behandlung. Insgesamt wurden sowohl in Hec1B- als auch in SPAC1L-Zellen 139 mindestens zweifach hochregulierte miRNAs detektiert, von denen wiederum 74 in beiden Zelllinien identifiziert wurden (s. Abb. D43). Der Einfluss von DNMT-Inhibitoren auf die miRNA-Expression konnte auch in anderen Tumorentitäten gezeigt werden. So führte die Blockierung der DNMTs in Kolonkarzinomzellen, NSCLC und Brustkarzinomzellen zu einer veränderten Expression von miRNAs (Heller et al., 2012; Radpour et al., 2012; Yan et al., 2011). Der miRNA-Expressions-Array bestätigte diese Beobachtungen nun auch für Endometriumkarzinomzellen. Inwiefern die neun identifizierten Kandidaten jedoch zur Regulation von L1CAM oder allgemein zur Tumourprogression des Endometriumkarzinoms beitragen, wurde bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht aufgezeigt. Der Luziferase-Reporter-Assay offenbarte, dass lediglich eine der neun Kandidaten-miRNAs zu einer Inhibition der Translation führt. In Anwesenheit der L1CAM-3'UTR kommt es bei der Überexpression von miR-34a zu einer 50%-igen Reduktion der Luziferase-Expression. Die anderen identifizierten miRNAs zeigen dagegen keine spezifischen Effekte auf die Luziferase-Aktivität. Die Analyse des L1CAM-mRNA-Levels nach der Transfektion von Hec1B-Zellen mit exogener miR-34a bestätigten die Resultate des Reporterassays (s. Abb. D45 und D46).

Die miR-34a ist im Allgemeinen als Tumorsuppressor-miRNA bekannt und ist in den p53-Apoptose-Signalweg involviert. Eine epigenetische Regulation von miR-34a wurde bereits in einigen Arbeiten beschrieben und der Transkriptionsstart des Genlokus (FLJ41150) ist assoziiert mit einer CpG-Insel. In einigen Tumorentitäten wie dem Ovarial-, Kolon-, Mamma- oder Pankreaskarzinom konnte eine erhöhte Methylierung dieser CpG-Insel nachgewiesen werden (Vogt et al., 2011, Kozaki et al., 2008). Ob es in Endometriumkarzinomen ebenfalls zu einer Fehlregulation der miR-34a kommt, gilt es noch zu klären. Die post-

transkriptionelle Regulation von L1CAM durch miR-34a wäre demnach ein völlig neuer Mechanismus bei der Expressionskontrolle. Für einige miRNAs wurde eine Herabregulation im EK-Gewebe bereits gezeigt (Balch et al., 2010). Allerdings befindet sich unter den beschriebenen miRNAs keine der hier identifizierten neun Kandidaten, welche innerhalb der L1CAM-3'-UTR binden.

Neben der DNA-Methylierung wird die Expression von miR-34a auch direkt durch p53 reguliert. Innerhalb der Promoterregionen konnten mehrere p53-Bindestellen identifiziert werden. Die miR-34a wird dementsprechend auch bei p53-assoziierten Ereignissen exprimiert, welche zur Zellzykluskontrolle, Induktion der Apoptose und Tumorsuppression beitragen (He et al., 2007; Chang et al., 2007). Eine p53 induzierte Expression von miR-34a hätte nach den Ergebnissen dieser Arbeit auch Auswirkungen auf die L1CAM Expression. In den Entitäten des Ovarialkarzinoms und des Glioms wurde bereits eine signifikante Korrelation zwischen auftretenden p53-Mutationen und erhöhter L1CAM Expression aufgezeigt (Bondong et al., 2011; Tsuzuki et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeiten belegen also einen Zusammenhang zwischen p53-Inaktivierung und L1CAM Hochregulation. Welche Rolle miR-34a in diesem Kontext einnimmt, muss allerdings noch geklärt werden. In EK-Zelllinien offenbarte die Analyse der endogenen miR-34a-Expression zumindest eine Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus (s. Tab. D1 und Abb. D46). Lediglich bei der EK-Zelllinie ECC1 ohne p53-Mutation konnte eine miR-34a-Expression detektiert werden. Bei den übrigen Zelllinien wurde dagegen nur eine sehr schwache miRNA-Expression nachgewiesen. Neben den ECC1-Zellen exprimiert auch die OvKa-Zelllinie OVM miR-34a auf einem höheren Level. Eine Korrelation zwischen L1CAM-Expression und miR-34a-Expression konnte allerdings nicht festgestellt werden. Die ECC1- und EN1-Zellen sind beide L1CAM-negativ, unterscheiden sich aber im miR-34a-Expressionslevel. Ebenso wie die stark L1CAM exprimierenden Zellen Hec1B und SPAC1L wurde bei EN1-Zellen miR-34a nur in äußerst geringem Maße detektiert. Ähnlich verhält es sich bei den untersuchten OvKa-Zelllinien. Auch hier gab es keine Korrelation zwischen der Expression von L1CAM und miR-34a. Allerdings ist die Anzahl der untersuchten Zelllinien für eine signifikante Aussage zu gering, zudem können Zelllinienbedingte Artefakte nicht völlig ausgeschlossen werden.

Es ist ebenfalls denkbar, dass eine Störung der miRNA-Prozessierung zu einer erhöhten L1CAM-Expression führt. So wurde mit Hilfe einer Doppel-Knock-out-Maus gezeigt, dass Zellen aus den Fimbrien des Eileiters ebenfalls der Ursprung für seröse Ovarialkarzinome sein können (Kim et al., 2012). Neben PTEN wurde in diesen Mäusen ebenfalls das RNase-III-Molekül Dicer ausgeschaltet. Von den induzierten hochgradig serösen Ovarialkarzinomen ist ebenfalls bekannt, dass diese verstärkt L1CAM exprimieren (Fogel et al., 2003a, Fogel et al., 2004). Daraus ergibt sich ein Szenario in dem eine verminderte Dicer-Expression in den Zellen der Fimbrien zu einer erhöhten L1CAM-Expression führt, diese Zellen anschließend ins Ovar migrieren und dort zu einem Tumor heranwachsen. Ähnliches ist auch beim Endometriumkarzinom denkbar.

Die hier beschriebenen Resultate machen jedoch auch deutlich, dass die Regulation von L1CAM auf mehreren Ebenen stattfindet. Eine zentrale Frage bei der L1CAM-Regulation ist daher, wie die einzelnen Mechanismen während der Tumorprogression interagieren. Es ist anzunehmen, dass wenn die transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulation frühe Ereignisse in der Tumorprogression sind, eine anormale Expression durch die DNA-Hypermethylierung innerhalb der L1CAM-Promoterregion blockiert werden kann (Kato et al., 2009). Durch eine zunehmende Histonacetylierung und DNA-Hypomethylierung des L1CAM-Promoters, assoziiert mit einer progressiven globalen Demethylierung, würde die erhöhte L1CAM-

Expression als ein spätes Ereignis erfolgen. Der hierarchische Aufbau der Regulationsmechanismen macht die epigenetischen Effekte zu den Hauptregulatoren der L1CAM-Expression, in Folge dessen die transkriptionelle Regulation durch β -catenin oder Slug in einem kontextabhängigen Milieu erfolgt.

In diesem Zusammenhang bleibt auch die Funktion des komplexbildenden Repressors REST noch zu klären.

6. Die transkriptionelle Regulation von L1CAM in neuronalen Zellen und während der Tumorprogression

In mehreren Tumorentitäten wurde bis zum heutigen Zeitpunkt eine erhöhte L1CAM-Expression detektiert (Gavert et al., 2005; Fogel et al., 2003; Boo et al., 2007; Ben et al., 2010). In zahlreichen Fällen korrelierte die Expression auch mit einem erhöhten Invasionspotential der Tumorzellen oder Metastasierung (Thies et al., 2002; Fogel et al., 2003; Allory et al., 2003). Auch im Endometriumkarzinom wurde L1CAM nachgewiesen und wurde dort verstärkt innerhalb der invasiven Front lokalisiert (Huszar et al., 2010).

In einigen Arbeiten wurde ebenfalls die Regulation von L1CAM durch unterschiedliche Signalwege und transkriptionelle Mechanismen untersucht. Welche Effekte die einzelnen Mechanismen auf die L1CAM-Expression haben, wurde sowohl in neuronalen Zellen als auch in der Tumorprogression untersucht. Ein klarer Schwerpunkt liegt dabei auf der Induktion der L1CAM-Expression durch Zytokine. So identifizierten unterschiedliche Gruppen den Wachstumsfaktor NGF als stimulierendes Molekül der L1CAM-Expression in mehreren neuronalen und nicht-neuronalen Zelltypen (Lee et al., 1981; Bock et al., 1985; Seilheimer et al., 1987). Andere Zytokine wie $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ führen bei dendritischen Zellen zu einer erhöhten Expression von L1CAM (Pancook et al., 1997). In Tumorzellen wurde wiederum eine Induktion der Expression durch Moleküle der TGF- β -Familie wie BMPs oder TGF- β 1 nachgewiesen (Pancook et al., 1997). Weiterhin zeigten Experimente mit OvKa-Zellen, dass der HGF/c-Met-Signalweg zu einer Hochregulation von L1CAM führt. Die induzierenden Effekte von Zytokinen konnten vor allem für TGF- β 1 in mehreren Arbeiten bestätigt werden (Geismann et al., 2009; Huszar et al., 2010). Es stellte sich heraus, dass speziell die L1CAM-Induktion nicht durch Smad-Proteine vermittelt wird sondern eine JNK-Aktivierung erfordert (Geismann et al., 2009). Des Weiteren spielt die Hochregulation von Slug durch TGF- β 1 eine essentielle Rolle bei der Regulation von L1CAM. Sowohl in Pankreaskarzinomzellen als auch in EK-Zellen bindet Slug an E-Box-Motive innerhalb der L1CAM-Promoterregion. Zusätzlich korreliert in den EK-Zellen die Slug-Expression mit der von L1CAM. β -catenin ist ein weiterer Transkriptionsfaktor mit Einfluss auf die L1CAM-Expression in Kolonkarzinomzellen. Ähnlich wie im EK ist L1CAM auch bei Kolonkarzinomen in der invasiven Front des Tumors detektierbar und ist dort mit β -catenin co-lokalisiert (Gavert et al., 2005). Im Zusammenhang mit dem EMT-Prozess ist es möglich, dass ein *cross-talk* zwischen den Wnt/ β -catenin- und Slug-Signalwegen zu einer erhöhten L1CAM-Expression führt (Stemmer et al., 2008; Heuberger et al., 2010). Bei der Regulation von L1CAM in EK-Zellen spielt β -catenin jedoch nur eine untergeordnete Rolle.

Neben der induzierbaren L1CAM-Expression durch Zytokine und die darauf folgende geänderte Genexpression, insbesondere von Transkriptionsfaktoren, existieren noch weitere Mechanismen zur Regulation von L1CAM. Ein eher globaler Ansatz ist die Inhibition der L1CAM-Expression durch den Repressor REST. Das Protein wird ubiquitär von nicht-neuronalen Zellen exprimiert und blockiert die Transkription

von Genen mit einem Repressorelement-1 Bindemotiv (RE-1) im Promoter (Schoenherr et al., 1995, 1996; Chen et al., 1998; Bruce et al., 2004; Johnson 2007). Auch in einem Intron des L1CAM-Gens wurde ein RE-1 Motiv identifiziert und in Mausexperimenten bestätigte sich die Repression in nicht-neuronalen Zellen durch REST (Kallunki et al., 1997). Die Resultate führten zu der Annahme, dass REST ein Hauptregulator von L1CAM während der neuronalen Differenzierung ist. Auch in EK-Zellen konnte die Repressorfunktion von REST nachgewiesen werden. Offen bleibt hingegen die Frage, durch welchen Mechanismus REST die L1CAM-Expression beeinflusst. Denn weder das REST-Expressionslevel noch die subzelluläre Lokalisation oder REST4-Expression unterscheidet sich in den EK-Zellen (s. Abb. D14 und D17). Dennoch offenbaren die Zellen drastische Abweichungen in der L1CAM-Expression. In diesem Fall ist eventuell eine genauere Untersuchung der Interaktionspartner von REST erforderlich, da die Repressorfunktion des Komplexes auf der Rekrutierung von chromatinmodifizierenden Enzymen beruht. So interagiert REST mit Enzymen, welche durch eine Acetylierung oder Methylierung von spezifischen Histonresten die DNA-Histon-Interaktion stabilisieren und so die Transkriptionsinitiation erschweren.

Einen ersten Hinweis, dass auch Histonmodifikationen eine weitere Ebene bei der Regulation von L1CAM darstellen, zeigen Experimente mit HDAC-Inhibitoren. In L1CAM negativen EK-Zellen führt die Behandlung mit TSA oder Valproinsäure zu einem Anstieg der L1CAM-Expression. Der gleiche Effekt wurde auch in Melanomzellen nach der Behandlung mit TSA oder Butyrat beobachtet (Kuwajima et al., 2007). Neben der Histonmodifizierung ist die DNA-Methylierung als zweiter epigenetischer Mechanismus ebenso bei der L1CAM-Regulation beteiligt. Die DNA-Methylierung ist ein Maß für die dauerhafte Repression eines Gens und das Methylierungsmuster wird über mehrere Zellgenerationen weitergegeben (Cedar et al., 2012; Rajnal et al., 2012). In EK-Zellen korreliert die Hypomethylierung des Promoters mit der Expression von L1CAM und eine Inhibition der DNMTs mit 5'-AzaC führt zu einem Anstieg des L1CAM-Levels. Auch in Kolonkarzinomen wurde eine inverse Korrelation zwischen Promotermethylierung und L1CAM-Expression festgestellt (Kato et al., 2009). Es ist demnach denkbar, dass die epigenetischen Mechanismen, insbesondere die DNA-Methylierung, im Verlauf der Entwicklung zu einer dauerhaften L1CAM-Repression beitragen und einen Hauptregulator darstellt.

Einen weiteren Mechanismus bei der L1CAM-Regulation stellt die post-transkriptionelle Regulation durch miRNAs dar. Der Verlust von L1CAM nach der 5'-AzaC-Behandlung und der damit assoziierte Anstieg von diversen miRNAs waren erste Hinweise auf eine mögliche indirekte Regulation. Mit der miR-34a wurde eine hochregulierte miRNA identifiziert, welche sowohl innerhalb des L1CAM-3'UTR bindet als auch zu einer Inhibition der Transkription führt. Für eine genauere Aussage sind allerdings noch weitere Untersuchungen nötig. Nichts desto trotz wurde in Magenkarzinomzellen mit der miR-146a eine weitere L1CAM mRNA regulierende miRNA identifiziert (Hou et al., 2012). In unseren Versuchen blieb das Expressionsniveau dieser miRNA jedoch konstant.

Die Vielzahl der Mechanismen macht deutlich, dass die Kontrolle der L1CAM-Regulation auf unterschiedlichen Ebenen stattfindet. So wird in nicht-neuronalen Zellen die Repression von L1CAM wohl durch die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung (Cedar et al, 2012, Radyan et al., 2012), die Histonacetylierung und die ubiquitäre Expression von REST gesichert. Die Hypermethylierung wirkt dabei als langzeitliche Blockade der L1CAM-Expression, kann jedoch abhängig von Zellkontext und dem Milieu temporär kompensiert werden (Radyan et al., 2012). Für eine vollständige Reaktivierung von L1CAM ist die Blockade eines einzelnen Mechanismus allerdings nicht ausreichend (Cedar et al., 2012; Lande-Diner et al., 2005). Das

zeigt sich auch darin, dass L1CAM-negative EK-Zellen trotz eines sichtbaren Anstiegs der Expression nach einer entsprechenden Modifikation nie das L1CAM-Level der endogen exprimierenden Zellen erreichten. Es zeigte sich jedoch, dass die Tumorprogression oft mit einer chromosomalen Instabilität einhergeht, welche auch durch eine zunehmende Hypomethylierung verursacht wird (Hoffman et al., 2005). Eine solche Deregelation zusammen mit Inaktivierung eines weiteren Repressormechanismus würde allerdings die transkriptionelle Regulation von L1CAM ermöglichen und so zur Invasion und Metastasierung beitragen.

7. *Schlussfolgerung*

Die vorliegende Arbeit deutet auf eine mehrschichtige Regulation von L1CAM in der Tumorprogression des Endometriumkarzinoms hin. So führt auf der transkriptionellen Ebene ein extrazellulärer Stimuli zu der Aktivierung des TGF-Signalwegs und es kommt in der Folge zu einer Hochregulation von L1CAM. In dem Signalweg nimmt der EMT assoziiert Transkriptionsfaktor (TF) Slug eine besondere Rolle ein, da dieser auf der transkriptionellen Ebene die TGF- β 1 induzierte L1CAM-Expression vermittelt.

Des Weiteren hat der in nicht neuronalen Zellen ubiquitär exprimierte Repressor REST einen entscheidenden Einfluss auf die L1CAM-Regulation. Der TF limitiert die Expression von neuronalen Differenzierungsgenen und die Modifikation des REST-Levels hatte in EK-Zelllinien ebenfalls deutliche Auswirkungen auf das von L1CAM. Über welchen spezifischen Mechanismus REST die L1CAM-Regulation beeinflusst ist allerdings noch zu klären.

Zusätzlich stellen die epigenetischen Mechanismen der Histon- und DNA-Modifizierung eine weitere Regulationsebene des L1CAM-Gens dar. Sowohl die Inhibition der Histondeacetylasen als auch der DNA-Methyltransferasen führten zu einem deutlichen Anstieg der L1CAM-Expression in negativen EK-Zelllinien. Die Korrelation zwischen der Hypomethylierung des L1CAM-Promoters und dem Expressionslevel bestätigen eine Abhängigkeit vom Grad der DNA-Methylierung.

Die Ergebnisse lassen ebenfalls die Schlussfolgerung zu, dass L1CAM durch post-transkriptionelle Mechanismen reguliert wird. Insbesondere die miR-34a scheint hier ein möglicher Kandidat zu sein. Die Überexpression der microRNA inhibierte die Translation von mRNA mit einem L1CAM 3'-UTR.

Es wird demnach deutlich das unterschiedliche Mechanismen zu der Repression von L1CAM in nicht-neuronalen beitragen. Die Blockierung eines einzelnen Mechanismus führt möglicherweise nicht umgehend zu einer L1CAM-Expression. Allerdings kommt es während der Tumorprogression zu dramatischen genetischen Änderungen, welche eine Deregulation des L1CAM-Gens unterstützen würden. Die vorliegende Arbeit gibt Einblicke in die Regulation des L1CAM-Gens in EK-Zellen und ermöglicht somit auch Aussagen über die genetischen sowie molekularbiologische Unterschiede bei L1CAM positiven und negativen EK-Zellen. Diese Erkenntnisse ermöglichen auf längerer Sicht wiederum eine gezieltere Behandlung von L1CAM positiven Tumoren.

F Anhang

1. *Liste der Publikationen*

Geismann, C., Arlt, A., Bauer, I., Pfeifer, M., **Schirmer, U.**, Altevogt, P., Muerkoster, S. S. and Schafer, H. (2011) ‚Binding of the transcription factor Slug to the L1CAM promoter is essential for transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced L1CAM expression in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells‘, *Int J Oncol* 38(1): 257-66.

*Huszar, M., Pfeifer, M., **Schirmer, U.**, Kiefel, H., Konecny, G. E., Ben-Arie, A., Edler, L., Munch, M., Muller-Holzner, E., Jerabek-Klestil, S. et al. (2010) ‚Up-regulation of L1CAM is linked to loss of hormone receptors and E-cadherin in aggressive subtypes of endometrial carcinomas‘, *J Pathol* 220(5): 551-61.

Kiefel, H., Bondong, S., Hazin, J., Ridinger, J., **Schirmer, U.**, Riedle, S. and Altevogt, P. (2012a) ‚L1CAM: A major driver for tumor cell invasion and motility‘, *Cell Adh Migr* 6(4).

Kiefel, H., Bondong, S., Pfeifer, M., **Schirmer, U.**, Erbe-Hoffmann, N., Schafer, H., Sebens, S. and Altevogt, P. (2012b) ‚EMT-associated up-regulation of L1CAM provides insights into L1CAM-mediated integrin signalling and NF-kappaB activation‘, *Carcinogenesis*.

*Pfeifer, M., **Schirmer, U.**, Geismann, C., Schafer, H., Sebens, S. and Altevogt, P. (2010) ‚L1CAM expression in endometrial carcinomas is regulated by usage of two different promoter regions‘, *BMC Mol Biol* 11: 64.

*Tischler, V., Pfeifer, M., Hausladen, S., **Schirmer, U.**, Bonde, A. K., Kristiansen, G., Sos, M. L., Weder, W., Moch, H., Altevogt, P. et al. (2011) ‚L1CAM protein expression is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer‘, *Mol Cancer* 10: 127.

Bei den mit einem Stern gekennzeichneten Arbeiten sind Daten aus dieser Arbeit eingeflossen.

2. *Abkürzungen*

A	5'-AzaC	5-Aza-Cytidine
	AK	Antikörper
	ADAM	eine Disintegrin und Metalloproteinase
	AP-1	activator protein-1
	AP-2	clathrin adaptor Protein complex-2
B	BMP	bone morphogenic Protein
	BDNF	brain derived neurotrophic factor
	BP	Base pair
	BRCA2	breast Cancer type 2 susceptibility Protein
	BRM/BRG1	siehe SWI/SNF
C	CAM	cell adhesion molecule
	ChIP	Chromatin immunoprecipitation
	CHL1	close homologue of L1CAM
	CpG	Cytosine-Guanidin-Dinukleotid
	CRASH	Corpus callosum hypoplasia, mental Retardation, adducted thumbs, spastic paraplegia, x-linked hydrocephalus
	CSC	Cancer stem cell
	Ct	cycle time
	CTBP1	C-terminal binding protein 1
D	DCTN1	dynactin1
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	deoxyribonucleic acid
	DNMT	DNA methyltransferase
	dsDNA	double stranded DNA
	DYRK1	dual specificity tyrosine-(y)-phosphorylation regulated kinase-1A
E	E47	transcription factor, Tcf3
	EEK	endometrioides Endometriumkarzinom
	EGF	epidermal growth factor
	EGFR	epidermal growth factor receptor
	EK	Endometriumkarzinom
	EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
	ER	oestrogen receptor
	ERK	extracellular signal-regulated kinase
	ERM	ezrin radixin-meosin
	EP1	prostaglandin E receptor 1 (PTGER)

	EZM	extrazelluläre Matrix
F	FACS	fluorescence activated cell sorting
	FGF	fibroblast growth factor
	FGFR	fibroblast growth factor receptor
	FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
	FN	Fibronectin
G	GAPDH	glyceralaldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	GSK-3beta	glycogen-synthase kinase-3beta
H	HAT	histone acetyltransferase
	HDAC	histon deacetyltransferase
	HGF	hepatocytic growth factor
	HPD	Homeodomänen- und Pairedomänen-Bindestellen
	htt	huntington
	HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
I	ICD	intracellular domain
	Ig	immunglobiline
	INF	Interferone Gamma
J	JNK	c-Jun N-terminal kinase
K	kb	kilo Base
	kDa	Kilo Dalton
L	L1CAM	L1 cell adhesion molecule
	Lef	lymphoid enhancer factor
M	mAK	monoklonaler Antikörper
	MAPK	mitogen activated Protein kinase 1
	MASA	mental Retardation, aphasia, shuffling gait, and adducted thumbs
	MMP	matrix metalloprotease
	MPSS	massive parallel signature sequencing
	miRNA	microRNA
	mRNA	messenger RNA
	mSin3a	SIN3 transcription Regulator homologe A
N	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1
	NEEC	Non endometroid endometrial Carcinoma

	NES	nuclear exporting sequence
	NF-1	nuclear factor sequence
	NF1-A	nuclear factor 1 A, transcription factor
	NGF	nerve growth factor
	NOVA2	neural oncological ventral antigen 2
	NP-1	Neuropilin-1
	NRSE	neural restrictive silencer Element
	NRSF	neural restrictive silencer factor
	NSCLC	Non-small cell lung Cancer
P	p53	tumor protein 53
	Pax6/8	paired box protein 6/8
	PCR	polymerase chain reaction
	PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
	PE	phycoerythrin
	PHA	Polyhydroxyalkanoate
	PI(3)K	Phosphoinositid-3-Kinase
	PR	progesterone receptor
	PRA	progesterone receptor Alpha
	PTEN	phosphatase and tensin homolog
	PUMA	p53 up-regulated modulator of apoptosis, BBC3
Q	qRT-PCR	quantitative Real-time polymerase chain reaction
R	RD	repressor domain
	RE-1	repressor element 1
	REST	RE1 silencing transcription factor
	RILP	rab interacting lysosomal protein
	RNA	ribonucleic Acid
	RNAi	RNA interference
	RSLE	repressor silencer element
	RTK	receptor tyrosine kinase
S	Sema3a	Semaphorin 3a
	SCLC	small cell lung Cancer
	SCG3	secretogranin3
	SIP1	survival of motor neuron protein interacting 1; ZEB2
	siRNA	small-interfering RNA
	SOX4	sex determinating region Y-box 4
	ssDNA	single-stranded DNA

T	TBP	TATA-binding Protein
	TGF-beta1	transforming growth factor beta 1
	TCF	T-cell factor
	TNF-alpha	tumor necrosis factor Alpha
	TF	transcription factor
	TSA	Trichostatin A
	TSS	transcriptional start site

3. Ergänzendes Material

Ergebnisse miRNA-TaqMan-Array

microRNA	P-value	fc	fc.Hec1B	fc.SPAC1L	fold change Hec1B	fold change SPAC1L	MW
hsa-miR-139-3p-4395424	0,118	-10,029	-8,153	-11,905	284,656	3835,298	1044,863
hsa-miR-129-3p-4373297	0,041	-8,565	-8,006	-9,124	257,019	557,892	378,667
hsa-miR-886-3p-4395305	0,422	-8,026	-14,299	-1,753	20158,365	3,371	260,691
hsa-miR-495-4381078	0,327	-6,958	-3,026	-10,890	8,144	1897,137	124,302
hsa-miR-518c-4395506	0,045	-6,743	-6,261	-7,224	76,711	149,511	107,094
hsa-miR-512-3p-4381034	0,265	-6,623	-3,692	-9,554	12,922	751,859	98,569
hsa-miR-517b-4373244	0,086	-6,128	-5,300	-6,956	39,394	124,153	69,935
hsa-miR-363-4378090	0,206	-6,028	-4,009	-8,047	16,100	264,527	65,259
hsa-miR-155-4395459	0,259	-5,544	-7,936	-3,153	244,839	8,894	46,666
hsa-miR-892b-002214	0,121	-4,922	-5,867	-3,977	58,379	15,744	30,317
hsa-miR-886-5p-4395304	0,267	-4,732	-6,839	-2,624	114,487	6,164	26,566
hsa-miR-1293-002905	0,454	-4,397	-0,591	-8,203	1,507	294,777	21,074
hsa-miR-519d-4395514	0,200	-4,324	-2,921	-5,728	7,576	52,989	20,036
hsa-miR-132*-002132	0,275	-4,212	-2,270	-6,154	4,823	71,230	18,534
hsa-miR-142-3p-4373136	0,208	-4,189	-2,768	-5,611	6,812	48,860	18,244
hsa-miR-34a*-002316	0,035	-3,691	-3,895	-3,488	14,873	11,217	12,916
hsa-miR-199a-3p-4395415	0,151	-3,677	-2,788	-4,566	6,907	23,681	12,789
hsa-miR-1298-002861	0,060	-3,627	-3,283	-3,970	9,733	15,673	12,351
hsa-miR-148a*-002134	0,611	-3,401	1,447	-8,249	0,367	304,124	10,562
hsa-let-7i*-002172	0,359	-3,367	-5,494	-1,241	45,058	2,364	10,320
hsa-miR-34c-5p-4373036	0,495	-3,356	-0,053	-6,659	1,037	101,022	10,237
hsa-miR-139-5p-4395400	0,031	-3,271	-3,433	-3,110	10,797	8,631	9,654
hsa-miR-1271-002779	0,019	-3,270	-3,369	-3,171	10,335	9,005	9,647
hsa-miR-9*-002231	0,185	-3,240	-2,271	-4,209	4,826	18,493	9,447
hsa-miR-616-4395525	0,162	-3,217	-4,052	-2,381	16,590	5,209	9,297
hsa-miR-584-001624	0,235	-3,172	-1,943	-4,401	3,845	21,125	9,013
hsa-miR-1300-002902	0,385	-3,148	-5,325	-0,971	40,088	1,960	8,864
hsa-miR-517a-4395513	0,217	-2,838	-1,833	-3,842	3,564	14,340	7,149
hsa-miR-137-4373301	0,071	-2,814	-2,498	-3,130	5,649	8,754	7,032
hsa-miR-520c-3p-002400	0,101	-2,776	-2,332	-3,220	5,034	9,316	6,848
hsa-miR-1274B-002884	0,286	-2,763	-4,094	-1,431	17,081	2,696	6,786
hsa-miR-409-3p-002332	0,534	-2,729	0,306	-5,764	0,809	54,349	6,631
hsa-miR-194*-002379	0,419	-2,713	-0,616	-4,811	1,532	28,077	6,559
hsa-miR-941-002183	0,434	-2,677	-4,853	-0,502	28,895	1,416	6,397
hsa-miR-629-001562	0,090	-2,657	-2,277	-3,036	4,848	8,203	6,306
hsa-miR-33a-002135	0,741	-2,621	3,464	-8,706	0,091	417,698	6,153
hsa-miR-589-4395520	0,415	-2,621	-4,622	-0,620	24,618	1,537	6,151
hsa-miR-302a*-002381	0,122	-2,618	-3,125	-2,110	8,727	4,318	6,138
hsa-miR-216b-4395437	0,268	-2,609	-1,440	-3,779	2,713	13,725	6,102
hsa-miR-1226*-002758	0,112	-2,523	-2,074	-2,972	4,210	7,844	5,747
hsa-let-7g*-002118	0,533	-2,502	-5,279	0,274	38,819	0,827	5,666
hsa-miR-27a*-002445	0,060	-2,451	-2,684	-2,218	6,427	4,654	5,469
hsa-miR-518f-4395499	0,390	-2,406	-0,714	-4,099	1,640	17,132	5,300
hsa-miR-629-4395547	0,167	-2,309	-1,690	-2,928	3,226	7,611	4,955
hsa-miR-548b-5p-4395519	0,413	-2,296	-0,555	-4,037	1,469	16,419	4,911
hsa-miR-517c-4373264	0,404	-2,269	-0,597	-3,940	1,512	15,350	4,818
hsa-miR-193a-3p-4395361	0,083	-2,265	-1,969	-2,562	3,914	5,904	4,807
hsa-miR-582-3p-4395510	0,286	-2,252	-3,340	-1,164	10,123	2,241	4,763
hsa-miR-141-4373137	0,132	-2,251	-1,779	-2,724	3,432	6,606	4,762
hsa-miR-1260-002896	0,179	-2,221	-2,862	-1,580	7,271	2,989	4,662
hsa-miR-34b-002102	0,280	-2,195	-1,160	-3,230	2,235	9,385	4,580
hsa-miR-520D-3P-002743	0,404	-2,152	-0,566	-3,738	1,481	13,342	4,445
hsa-miR-23a-4373074	0,124	-2,146	-1,722	-2,571	3,299	5,940	4,427
hsa-miR-513-5p-4395201	0,199	-2,125	-2,813	-1,437	7,026	2,708	4,362
hsa-miR-200c-4395411	0,143	-2,107	-1,625	-2,590	3,084	6,021	4,309
hsa-miR-21*-002438	0,045	-2,072	-2,220	-1,924	4,660	3,795	4,205

microRNA	P-value	fc	fc.Hec1B	fc.SPAC1L	fold change Hec1B	fold change SPAC1L	MW
hsa-miR-34a-4395168	0,036	-2,012	-1,897	-2,127	3,724	4,368	4,033
hsa-miR-302b-4378071	0,185	-1,993	-1,395	-2,590	2,630	6,022	3,980
hsa-miR-1201-002781	0,223	-1,990	-2,717	-1,264	6,574	2,401	3,973
hsa-miR-29b-1*-002165	0,154	-1,949	-1,467	-2,431	2,764	5,391	3,860
hsa-miR-720-002895	0,268	-1,934	-2,801	-1,067	6,967	2,095	3,820
hsa-miR-222*-002097	0,043	-1,931	-2,061	-1,801	4,173	3,485	3,813
hsa-miR-20a*-002437	0,083	-1,922	-2,174	-1,670	4,512	3,183	3,790
hsa-miR-27b*-002174	0,533	-1,858	-3,920	0,204	15,136	0,868	3,625
hsa-miR-1183-002841	0,176	-1,850	-1,325	-2,375	2,505	5,187	3,605
hsa-miR-616-001589	0,309	-1,844	-2,816	-0,871	7,044	1,829	3,590
hsa-miR-151-5P-002642	0,328	-1,834	-2,871	-0,797	7,315	1,738	3,565
hsa-let-7f-4373164	0,030	-1,803	-1,890	-1,717	3,706	3,288	3,490
hsa-miR-708-4395452	0,285	-1,793	-0,933	-2,653	1,910	6,290	3,466
hsa-miR-33b-4395196	0,116	-1,769	-1,444	-2,095	2,720	4,273	3,409
hsa-miR-9-4373285	0,505	-1,764	0,026	-3,555	0,982	11,749	3,397
hsa-miR-577-002675	0,055	-1,764	-1,917	-1,611	3,775	3,055	3,396
hsa-miR-29a*-002447	0,023	-1,763	-1,699	-1,826	3,248	3,547	3,394
hsa-miR-367-4373034	0,606	-1,745	0,702	-4,192	0,615	18,273	3,351
hsa-miR-92b*-002343	0,589	-1,742	0,568	-4,051	0,675	16,580	3,345
hsa-miR-545-4395378	0,209	-1,728	-2,316	-1,139	4,979	2,203	3,312
hsa-miR-383-4373018	0,483	-1,727	-3,364	-0,090	10,299	1,064	3,311
hsa-miR-548c-5p-4395540	0,451	-1,727	-0,245	-3,209	1,185	9,244	3,310
hsa-miR-1290-002863	0,084	-1,727	-1,957	-1,497	3,882	2,823	3,310
hsa-miR-1274A-002883	0,133	-1,715	-2,078	-1,352	4,222	2,552	3,283
hsa-miR-17*-002421	0,255	-1,657	-0,955	-2,359	1,939	5,131	3,154
hsa-miR-19a*-002424	0,534	-1,657	0,187	-3,501	0,878	11,320	3,153
hsa-miR-222-4395387	0,144	-1,656	-1,276	-2,035	2,421	4,100	3,150
hsa-miR-29b-4373288	0,016	-1,648	-1,607	-1,689	3,047	3,224	3,134
hsa-miR-942-002187	0,060	-1,644	-1,489	-1,799	2,808	3,480	3,126
rno-miR-29c*-001818	0,316	-1,639	-2,526	-0,752	5,761	1,684	3,115
hsa-miR-573-001615	0,395	-1,639	-2,809	-0,468	7,008	1,384	3,114
hsa-miR-150-4373127	0,242	-1,631	-0,981	-2,281	1,973	4,861	3,097
hsa-miR-576-3p-4395462	0,081	-1,629	-1,837	-1,421	3,573	2,678	3,093
hsa-miR-661-001606	0,520	-1,629	-3,365	0,107	10,304	0,928	3,093
hsa-miR-10b*-002315	0,368	-1,595	-2,635	-0,554	6,213	1,468	3,020
hsa-miR-939-002182	0,255	-1,541	-2,195	-0,888	4,579	1,850	2,910
hsa-miR-122-4395356	0,519	-1,520	-3,136	0,096	8,789	0,936	2,868
hsa-miR-1244-002791	0,128	-1,515	-1,206	-1,823	2,307	3,538	2,857
hsa-miR-627-4380967	0,016	-1,504	-1,542	-1,466	2,912	2,763	2,836
hsa-miR-1233-002768	0,256	-1,498	-2,137	-0,860	4,397	1,815	2,825
hsa-miR-548d-3p-4381008	0,261	-1,485	-0,840	-2,129	1,790	4,375	2,798
hsa-miR-579-4395509	0,038	-1,479	-1,568	-1,389	2,965	2,620	2,787
hsa-miR-335*-002185	0,266	-1,448	-0,805	-2,091	1,747	4,260	2,728
hsa-miR-146a-4373132	0,584	-1,437	0,441	-3,314	0,737	9,942	2,707
hsa-miR-29b-2*-002166	0,029	-1,435	-1,500	-1,370	2,829	2,585	2,704
hsa-miR-193a-5p-4395392	0,213	-1,432	-0,936	-1,929	1,913	3,809	2,699
hsa-miR-1254-002818	0,171	-1,415	-1,805	-1,025	3,494	2,036	2,667
hsa-let-7a*-002307	0,531	-1,408	-2,961	0,146	7,787	0,904	2,653
hsa-miR-519a-4395526	0,436	-1,403	-0,255	-2,551	1,194	5,862	2,645
hsa-miR-572-001614	0,075	-1,401	-1,236	-1,566	2,356	2,960	2,641
hsa-miR-25*-002442	0,692	-1,400	1,268	-4,068	0,415	16,770	2,639
hsa-miR-638-001582	0,453	-1,398	-2,603	-0,193	6,075	1,143	2,635
hsa-miR-770-5p-002002	0,429	-1,382	-2,486	-0,277	5,604	1,212	2,606
hsa-miR-192*-002272	0,044	-1,379	-1,283	-1,475	2,433	2,779	2,600
hsa-miR-519b-3p-002384	0,260	-1,378	-0,782	-1,975	1,719	3,931	2,600
dme-miR-7-000268	0,506	-1,375	0,024	-2,774	0,983	6,838	2,593
hsa-miR-1285-002822	0,150	-1,360	-1,034	-1,686	2,048	3,219	2,568
hsa-miR-625-4395542	0,017	-1,360	-1,323	-1,398	2,502	2,634	2,567
hsa-miR-146b-5p-4373178	0,296	-1,334	-0,666	-2,003	1,587	4,008	2,522
hsa-miR-18a*-002423	0,020	-1,300	-1,341	-1,260	2,533	2,395	2,463
hsa-miR-590-3P-002677	0,405	-1,288	-2,238	-0,338	4,719	1,264	2,442
hsa-miR-203-4373095	0,314	-1,275	-0,590	-1,960	1,506	3,891	2,420

microRNA	P-value	fc	fc.Hec1B	fc.SPAC1L	fold change Hec1B	fold change SPAC1L	MW
hsa-miR-29a-4395223	0,024	-1,259	-1,212	-1,306	2,316	2,473	2,393
hsa-miR-19b-1*-002425	0,099	-1,213	-1,402	-1,023	2,643	2,032	2,317
hsa-miR-1275-002840	0,437	-1,170	-0,211	-2,130	1,158	4,376	2,251
hsa-miR-24-2*-002441	0,276	-1,165	-1,705	-0,625	3,260	1,542	2,242
hsa-miR-625*-002432	0,064	-1,159	-1,043	-1,275	2,061	2,421	2,233
hsa-miR-1291-002838	0,457	-1,147	-2,148	-0,146	4,432	1,107	2,215
hsa-miR-1276-002843	0,476	-1,140	-0,082	-2,198	1,058	4,588	2,204
hsa-miR-125a-3p-4395310	0,115	-1,133	-1,340	-0,925	2,532	1,899	2,193
hsa-miR-545*-002266	0,543	-1,124	-2,410	0,162	5,316	0,894	2,180
hsa-miR-148b*-002160	0,013	-1,114	-1,092	-1,136	2,131	2,198	2,164
hsa-miR-152-4395170	0,053	-1,094	-1,186	-1,002	2,275	2,003	2,135
hsa-miR-200a-4378069	0,241	-1,060	-0,639	-1,481	1,557	2,792	2,085
hsa-miR-126-4395339	0,281	-1,052	-1,550	-0,554	2,927	1,469	2,073
hsa-miR-597-4380960	0,123	-1,046	-0,841	-1,251	1,791	2,380	2,065
hsa-miR-651-4381007	0,099	-1,038	-1,200	-0,875	2,298	1,833	2,053
hsa-miR-151-3p-002254	0,349	-1,034	-1,665	-0,402	3,172	1,321	2,047
hsa-miR-135b*-002159	0,483	-1,016	-0,053	-1,980	1,038	3,944	2,023
hsa-miR-145*-002149	0,816	-1,007	-4,402	2,388	21,138	0,191	2,010
hsa-miR-21-4373090	0,047	-1,003	-1,077	-0,928	2,110	1,903	2,004
hsa-miR-26a-2*-002115	0,481	-0,995	-1,930	-0,059	3,811	1,042	1,993
hsa-miR-19a-4373099	0,218	-0,989	-0,637	-1,341	1,555	2,534	1,985
hsa-miR-200b-4395362	0,365	-0,970	-0,343	-1,598	1,268	3,028	1,960
hsa-miR-340*-002259	0,509	-0,968	-1,964	0,028	3,901	0,981	1,956
hsa-miR-22-4373079	0,339	-0,966	-1,534	-0,397	2,896	1,317	1,953
hsa-miR-29c-4395171	0,152	-0,956	-1,189	-0,722	2,280	1,650	1,939
hsa-miR-212-4373087	0,378	-0,946	-0,308	-1,584	1,238	2,998	1,926
hsa-miR-26a-1*-002443	0,362	-0,941	-1,543	-0,339	2,914	1,265	1,920
hsa-miR-652-4395463	0,205	-0,938	-0,625	-1,250	1,543	2,379	1,916
hsa-miR-92a-4395169	0,248	-0,937	-0,553	-1,322	1,467	2,499	1,915
hsa-miR-330-5p-4395341	0,117	-0,933	-1,107	-0,759	2,154	1,693	1,909
hsa-miR-642-4380995	0,698	-0,923	0,873	-2,720	0,546	6,587	1,896
hsa-miR-376a-4373026	0,009	-0,922	-0,935	-0,908	1,912	1,877	1,894
hsa-miR-33a*-002136	0,120	-0,920	-1,096	-0,744	2,138	1,675	1,892
hsa-miR-1255B-002801	0,557	-0,911	-2,003	0,181	4,008	0,882	1,881
hsa-miR-1267-002885	0,394	-0,909	-0,261	-1,557	1,198	2,943	1,878
hsa-miR-888-4395323	0,258	-0,904	-1,292	-0,516	2,448	1,430	1,871
hsa-miR-30c-1*-002108	0,626	-0,899	0,451	-2,249	0,731	4,754	1,865
hsa-miR-140-3p-4395345	0,057	-0,872	-0,950	-0,793	1,932	1,733	1,830
hsa-miR-30d*-002305	0,156	-0,863	-1,078	-0,647	2,112	1,566	1,819
hsa-miR-28-3p-4395557	0,252	-0,860	-0,502	-1,219	1,416	2,328	1,816
hsa-miR-16-1*-002420	0,019	-0,859	-0,833	-0,885	1,781	1,847	1,814
RNU44-001094	0,427	-0,849	-1,524	-0,174	2,875	1,129	1,801
hsa-miR-523-4395497	0,664	-0,840	-2,281	0,600	4,860	0,660	1,790
hsa-miR-20a-4373286	0,093	-0,836	-0,713	-0,959	1,639	1,944	1,785
hsa-miR-424-4373201	0,087	-0,829	-0,944	-0,715	1,924	1,641	1,777
hsa-miR-671-3p-4395433	0,396	-0,828	-0,234	-1,423	1,176	2,681	1,775
hsa-miR-223-4395406	0,394	-0,818	-1,399	-0,236	2,638	1,178	1,763
hsa-miR-296-5p-4373066	0,017	-0,802	-0,781	-0,823	1,719	1,770	1,744
hsa-let-7b*-002404	0,764	-0,787	1,241	-2,814	0,423	7,033	1,725
hsa-miR-10b-4395329	0,208	-0,778	-1,042	-0,515	2,059	1,429	1,715
hsa-miR-323-3p-4395338	0,671	-0,773	0,585	-2,131	0,666	4,381	1,709
hsa-miR-301b-4395503	0,369	-0,770	-0,265	-1,275	1,202	2,420	1,705
hsa-miR-19b-4373098	0,311	-0,765	-0,359	-1,171	1,282	2,251	1,699
hsa-miR-192-4373108	0,267	-0,764	-0,424	-1,104	1,341	2,149	1,698
hsa-miR-624-001557	0,208	-0,760	-1,018	-0,502	2,026	1,417	1,694
hsa-miR-185-4395382	0,213	-0,749	-0,489	-1,010	1,404	2,013	1,681
hsa-miR-146b-3p-4395472	0,198	-0,746	-0,986	-0,507	1,980	1,421	1,678
hsa-miR-27a-4373287	0,389	-0,736	-0,22	-1,252	1,165	2,382	1,666
hsa-miR-132-4373143	0,197	-0,736	-0,500	-0,971	1,415	1,960	1,665
hsa-miR-20b-4373263	0,176	-0,721	-0,517	-0,925	1,431	1,899	1,648
hsa-miR-16-4373121	0,106	-0,689	-0,573	-0,806	1,488	1,748	1,613
RNU44-4373384	0,199	-0,687	-0,908	-0,465	1,877	1,380	1,610

microRNA	P-value	fc	fc.Hec1B	fc.SPAC1L	fold change Hec1B	fold change SPAC1L	MW
hsa-miR-196b-4395326	0,264	-0,682	-0,982	-0,381	1,976	1,302	1,604
hsa-miR-590-5p-4395176	0,368	-0,679	-0,236	-1,122	1,177	2,176	1,601
hsa-miR-195-4373105	0,174	-0,674	-0,485	-0,862	1,400	1,818	1,595
hsa-miR-494-4395476	0,180	-0,665	-0,858	-0,471	1,813	1,386	1,585
hsa-miR-106a-4395280	0,226	-0,658	-0,414	-0,902	1,332	1,869	1,578
hsa-miR-455-5p-4378098	0,070	-0,653	-0,725	-0,582	1,653	1,497	1,573
hsa-miR-422a-4395408	0,655	-0,650	0,428	-1,728	0,743	3,313	1,569
hsa-miR-140-5p-4373374	0,317	-0,647	-0,999	-0,296	1,998	1,227	1,566
hsa-miR-221-4373077	0,318	-0,635	-0,288	-0,981	1,221	1,974	1,553
hsa-miR-106b-4373155	0,232	-0,631	-0,391	-0,872	1,311	1,830	1,549
hsa-miR-194-4373106	0,597	-0,626	0,228	-1,480	0,854	2,790	1,543
hsa-miR-335-4373045	0,402	-0,610	-0,164	-1,056	1,120	2,079	1,526
hsa-miR-378-002243	0,615	-0,607	0,270	-1,484	0,829	2,798	1,523
hsa-miR-424*-002309	0,531	-0,578	0,060	-1,217	0,959	2,324	1,493
hsa-miR-17-4395419	0,400	-0,577	-0,158	-0,995	1,116	1,993	1,491
hsa-miR-186-4395396	0,030	-0,575	-0,548	-0,602	1,462	1,518	1,490
hsa-miR-125a-5p-4395309	0,095	-0,569	-0,484	-0,655	1,399	1,574	1,484
hsa-miR-32-4395220	0,091	-0,552	-0,473	-0,631	1,388	1,549	1,466
hsa-miR-133b-4395358	0,741	-0,549	-1,821	0,724	3,534	0,606	1,463
hsa-miR-181a-4373117	0,207	-0,545	-0,729	-0,361	1,657	1,284	1,459
hsa-miR-885-5p-4395407	0,532	-0,540	-1,135	0,056	2,197	0,962	1,453
hsa-miR-570-4395458	0,423	-0,535	-0,953	-0,116	1,936	1,084	1,448
RNU48-4373383	0,202	-0,534	-0,359	-0,710	1,282	1,635	1,448
hsa-miR-1227-002769	0,276	-0,534	-0,287	-0,780	1,220	1,718	1,448
hsa-miR-454-4395434	0,050	-0,531	-0,489	-0,573	1,403	1,487	1,445
hsa-miR-485-3p-4378095	0,306	-0,525	-0,252	-0,799	1,191	1,740	1,439
hsa-miR-99b*-002196	0,487	-0,525	-1,029	-0,021	2,041	1,015	1,439
hsa-miR-219-1-3p-4395206	0,694	-0,524	0,480	-1,528	0,717	2,884	1,438
hsa-miR-130b-4373144	0,347	-0,506	-0,199	-0,813	1,148	1,756	1,420
hsa-miR-101-4395364	0,077	-0,505	-0,567	-0,444	1,481	1,361	1,420
hsa-miR-522-4395524	0,633	-0,504	0,270	-1,278	0,829	2,426	1,418
hsa-miR-636-4395199	0,652	-0,497	-1,313	0,319	2,485	0,802	1,411
RNU48-001006	0,177	-0,495	-0,636	-0,353	1,554	1,278	1,409
hsa-miR-596-001550	0,954	-0,490	-7,221	6,241	149,166	0,013	1,405
hsa-miR-505-4395200	0,083	-0,485	-0,549	-0,421	1,463	1,339	1,399
hsa-miR-28-5p-4373067	0,426	-0,481	-0,101	-0,860	1,072	1,816	1,395
hsa-miR-429-4373203	0,628	-0,471	0,241	-1,183	0,846	2,271	1,386
hsa-miR-25-4373071	0,346	-0,470	-0,186	-0,753	1,138	1,685	1,385
hsa-miR-181a-2*-002317	0,506	-0,469	0,009	-0,947	0,994	1,927	1,384
hsa-miR-374a-4373028	0,211	-0,465	-0,306	-0,625	1,236	1,542	1,381
hsa-miR-31*-002113	0,765	-0,461	-1,651	0,729	3,141	0,603	1,377
hsa-miR-22*-002301	0,563	-0,457	-1,016	0,101	2,022	0,932	1,373
hsa-miR-505*-002087	0,180	-0,452	-0,583	-0,321	1,498	1,249	1,368
hsa-miR-148b-4373129	0,062	-0,450	-0,406	-0,494	1,325	1,408	1,366
hsa-miR-664-002897	0,452	-0,438	-0,815	-0,061	1,760	1,043	1,355
hsa-miR-93-4373302	0,087	-0,425	-0,367	-0,484	1,289	1,398	1,343
hsa-miR-339-3p-4395295	0,318	-0,416	-0,643	-0,189	1,561	1,140	1,334
MammU6-4395470	0,418	-0,410	-0,094	-0,726	1,067	1,654	1,329
MammU6-4395470	0,429	-0,407	-0,082	-0,733	1,058	1,662	1,326
MammU6-4395470	0,046	-0,385	-0,357	-0,413	1,280	1,331	1,306
hsa-miR-548d-5p-4395348	0,065	-0,384	-0,345	-0,423	1,270	1,341	1,305
hsa-miR-1248-002870	0,599	-0,370	0,138	-0,878	0,909	1,838	1,292
hsa-miR-423-5p-4395451	0,326	-0,358	-0,560	-0,157	1,474	1,115	1,282
hsa-miR-1301-002827	0,501	-0,355	0,002	-0,711	0,999	1,637	1,279
hsa-miR-130a-4373145	0,190	-0,353	-0,462	-0,245	1,377	1,185	1,277
hsa-miR-301a-4373064	0,414	-0,334	-0,080	-0,587	1,057	1,502	1,260
MammU6-4395470	0,472	-0,332	-0,028	-0,635	1,020	1,553	1,259
hsa-miR-190-4373110	0,137	-0,330	-0,258	-0,402	1,196	1,321	1,257
hsa-miR-191-4395410	0,285	-0,330	-0,172	-0,488	1,126	1,402	1,257
hsa-miR-331-3p-4373046	0,295	-0,328	-0,164	-0,492	1,120	1,406	1,255
hsa-miR-18b-4395328	0,668	-0,327	0,242	-0,897	0,845	1,862	1,255
hsa-let-7g-4395393	0,287	-0,320	-0,165	-0,475	1,121	1,390	1,248

microRNA	P-value	fc	fc.Hec1B	fc.SPAC1L	fold change Hec1B	fold change SPAC1L	MW
hsa-miR-320-4395388	0,410	-0,318	-0,557	-0,079	1,471	1,057	1,247
hsa-miR-24-4373072	0,570	-0,318	0,079	-0,714	0,947	1,641	1,246
hsa-miR-26b-4395167	0,423	-0,315	-0,561	-0,068	1,476	1,049	1,244
hsa-miR-454*-001996	0,675	-0,313	-0,872	0,246	1,830	0,843	1,242
hsa-miR-374b*-002391	0,658	-0,312	0,211	-0,835	0,864	1,784	1,241
hsa-miR-149*-002164	0,718	-0,305	0,337	-0,947	0,792	1,927	1,235
hsa-miR-491-5p-4381053	0,632	-0,305	-0,772	0,162	1,707	0,894	1,235
hsa-miR-365-4373194	0,012	-0,294	-0,300	-0,288	1,231	1,221	1,226
hsa-miR-489-4395469	0,698	-0,292	0,277	-0,860	0,826	1,815	1,224
hsa-miR-361-5p-4373035	0,411	-0,291	-0,072	-0,510	1,051	1,425	1,224
hsa-miR-18a-4395533	0,711	-0,279	0,292	-0,851	0,817	1,804	1,214
hsa-miR-135a-4373140	0,780	-0,276	0,490	-1,042	0,712	2,059	1,211
hsa-let-7a-4373169	0,660	-0,263	-0,707	0,181	1,632	0,882	1,200
hsa-miR-342-3p-4395371	0,450	-0,246	-0,457	-0,036	1,372	1,025	1,186
hsa-miR-1282-002803	0,642	-0,230	-0,595	0,135	1,510	0,911	1,173
hsa-miR-133a-4395357	0,873	-0,230	-1,363	0,903	2,572	0,535	1,173
hsa-miR-330-3p-4373047	0,686	-0,215	-0,615	0,185	1,531	0,880	1,161
hsa-miR-338-5p-002658	0,758	-0,214	0,322	-0,750	0,800	1,682	1,160
hsa-miR-331-5p-4395344	0,861	-0,211	-1,157	0,735	2,229	0,601	1,157
hsa-miR-589-001543	0,555	-0,208	0,039	-0,454	0,973	1,370	1,155
hsa-miR-191*-002678	0,434	-0,206	-0,039	-0,374	1,027	1,296	1,154
hsa-miR-124-4373295	0,932	-0,206	-2,136	1,723	4,394	0,303	1,154
hsa-miR-103-4373158	0,287	-0,200	-0,103	-0,297	1,074	1,229	1,149
hsa-miR-26b*-002444	0,774	-0,190	-0,701	0,321	1,626	0,800	1,141
hsa-miR-758-4395180	0,848	-0,186	0,580	-0,952	0,669	1,935	1,138
hsa-miR-200b*-002274	0,940	-0,165	1,586	-1,916	0,333	3,773	1,121
hsa-miR-138-4395395	0,597	-0,157	0,057	-0,371	0,961	1,293	1,115
hsa-miR-449b-4381011	0,752	-0,153	0,221	-0,528	0,858	1,442	1,112
hsa-miR-532-5p-4380928	0,064	-0,141	-0,126	-0,155	1,092	1,113	1,102
hsa-miR-15a*-002419	0,452	-0,136	-0,253	-0,019	1,192	1,013	1,099
hsa-miR-135b-4395372	0,900	-0,129	0,689	-0,946	0,620	1,927	1,093
hsa-miR-193b*-002366	0,888	-0,116	0,535	-0,768	0,690	1,703	1,084
hsa-miR-503-4373228	0,923	-0,094	0,673	-0,861	0,627	1,816	1,067
hsa-miR-499-5p-4381047	0,977	-0,088	-2,535	2,359	5,794	0,195	1,063
hsa-miR-374b-4381045	0,905	-0,087	0,489	-0,663	0,712	1,583	1,062
hsa-miR-484-4381032	0,187	-0,082	-0,057	-0,106	1,040	1,077	1,058
hsa-miR-324-5p-4373052	0,847	-0,078	-0,397	0,241	1,317	0,846	1,056
hsa-miR-26a-4395166	0,742	-0,076	-0,253	0,101	1,192	0,932	1,054
hsa-miR-576-5p-4395461	0,885	-0,072	-0,469	0,324	1,384	0,799	1,051
hsa-miR-106b*-002380	0,838	-0,067	0,191	-0,326	0,876	1,253	1,048
hsa-miR-519c-4395481	0,973	-0,065	1,492	-1,622	0,356	3,079	1,046
hsa-miR-128-4395327	0,455	-0,057	-0,106	-0,008	1,076	1,005	1,040
hsa-miR-31-4395390	0,930	-0,039	-0,388	0,311	1,309	0,806	1,027
hsa-miR-574-3p-4395460	0,948	-0,038	-0,500	0,424	1,414	0,746	1,027
hsa-miR-744*-002325	0,963	-0,036	-0,646	0,574	1,565	0,672	1,025
hsa-miR-502-5p-4373227	0,976	-0,034	0,867	-0,935	0,548	1,912	1,024
hsa-miR-660-4380925	0,884	-0,022	-0,139	0,096	1,101	0,936	1,015
hsa-miR-340-4395369	0,849	-0,019	-0,096	0,059	1,069	0,960	1,013
hsa-miR-125b-2*-002158	0,994	-0,012	-1,205	1,181	2,306	0,441	1,008
hsa-miR-193b-4395478	0,989	-0,005	0,297	-0,307	0,814	1,237	1,003

Sequenzierung AS-Variante REST4

Sequenzierung Hec1B REST cDNA Amplikon

cntaTCGgaTccgnATTCGTGaTTGaGCGaGTATCACTGGAGGaAACaTtTAAGaAACCATTCTCCAA
 GGaAAGTATACACATgtGGAAAATGCAACTATTTTTTCAGACAGAAAAACAATTATGTTTCAGCATGTT
 AGAACTCATAACAGGAGAAGCCCATATAAATGTGAACTTTGTCCTTACTCAAGTTCTCAGAAGACTCA
 TCTAACTAGACATATGCGTA^{CTCATTCAGTGGGGTATGGATACCA}^{TTGGTAATATTACTAGAGTGT}
^{GATCTAGATGGGTGAGAAGCA}^{ATCTGAATTCGTTCGACAA}GCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACC
 ACACGTGTGGGGCCCGAGCTCGCGCCGCTGTATTCTATAGTGTACCTAAATGGCCGCACAATTCA
 CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGC
 ACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGC

Sequenzierung EN1 REST cDNA Amplikon

cgtatCGgaTccgAnTTCGTgaT^{TGCTTCTCACCCATCTAGATCACACTCTAGTaAAATATTACCaAAT}
^{GGTATCCATACCCCACTGAATGAG}TACGCATATGTCTAGTTAGATGAGTCTTCTGAGAAGTTGAGTAA
 GGACAAAGTTCACATTTATATGGGCGTTCTCCTGTATGAGTTCTAACATGCTGAACATAATTTGTTTTT
 TCTGTCTGAAAAATAGTTGCATTTCCACATGTGTATACTTTCCTTGAAAAATGGTTTCTTAAATGTT
 TCCTCCAGTGATACTCGCTCA^{ATCTGAATTCGTTCGACAA}GCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACC
 ACACGTGTGGGGCCCGAGCTCGCGCCGCTGTATTCTATAGTGTACCTAAATGGCCGCACAATTCA
 CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGC

- Exon3 vor alternativ gesplictes Exon4
- Exon4
- Plasmid Sequenz

G Bibliographie

- Agirre, X.**, Vilas-Zornoza, A., Jimenez-Velasco, A., Martin-Subero, J. I., Cordeu, L., Garate, L., San Jose-Eneriz, E., Abizanda, G., Rodriguez-Otero, P., Fortes, P. et al. (2009) 'Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia', *Cancer Res* 69(10): 4443-53.
- Allory, Y.**, Audard, V., Fontanges, P., Ronco, P. and Debiec, H. (2008) 'The L1 cell adhesion molecule is a potential biomarker of human distal nephron injury in acute tubular necrosis', *Kidney Int* 73(6): 751-8.
- Allory, Y.**, Matsuoka, Y., Bazille, C., Christensen, E. I., Ronco, P. and 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(3): 1190-7.
- Amant, F.**, Cadron, I., Fuso, L., Berteloot, P., de Jonge, E., Jacomen, G., Van Robaey, J., Neven, P., Mørmann, P. and Vergote, I. (2005) 'Endometrial carcinosarcomas have a different prognosis and pattern of spread compared to high-risk epithelial endometrial cancer', *Gynecol Oncol* 98(2): 274-80.
- Amant, F.**, Leunen, K., Neven, P., Berteloot, P. and Vergote, I. (2006) 'Endometrial cancer: predictors of response and preferred endocrine therapy', *Int J Gynecol Cancer* 16 Suppl 2: 527-8.
- Andres, M. E.**, Burger, C., Peral-Rubio, M. J., Battaglioli, E., Anderson, M. E., Grimes, J., Dallman, J., Ballas, N. and Mandel, G. (1999) 'CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression', *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(17): 9873-8.
- Arlt, M. J.**, Novak-Hofer, I., Gast, D., Gschwend, V., Moldenhauer, G., Grunberg, J., Honer, M., Schubiger, P. A., Altevogt, P. and Kruger, A. (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(2): 936-43.
- Balaian, L. B.**, Moehler, T. and Montgomery, A. M. (2000) 'The human neural cell adhesion molecule L1 functions as a costimulatory molecule in T cell activation', *Eur J Immunol* 30(3): 938-43.
- Balch, C.**, Matei, D. E., Huang, T. H. and Nephew, K. P. (2010) 'Role of epigenomics in ovarian and endometrial cancers', *Epigenomics* 2(3): 419-47.
- Ballas, N.**, Battaglioli, E., Atouf, F., Andres, M. E., Chenoweth, J., Anderson, M. E., Burger, C., Moniwa, M., Davie, J. R., Bowers, W. J. et al. (2001) 'Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex', *Neuron* 31(3): 353-65.
- Ballas, N.**, Grunseich, C., Lu, D. D., Speh, J. C. and Mandel, G. (2005) 'REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis', *Cell* 121(4): 645-57.
- Ballas, N.** and Mandel, G. (2005) 'The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes', *Curr Opin Neurobiol* 15(5): 500-6.
- Ballestar, E. and Esteller, M.** (2008) 'Epigenetic gene regulation in cancer', *Adv Genet* 61: 247-67.
- Bansal, N.**, Yendluri, V. and Wenham, R. M. (2009) 'The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies', *Cancer Control* 16(1): 8-13.

- Bao, S.**, Wu, Q., Li, Z., Sathornsumetee, S., Wang, H., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B. and Rich, J. N. (2008) 'Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth', *Cancer Res* 68(15): 6043-8.
- Barrallo-Gimeno, A. and Nieto, M. A.** (2005) 'The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer', *Development* 132(14): 3151-61.
- Basel-Vanagaite, L.**, Straussberg, R., Friez, M. J., Inbar, D., Korenreich, L., Shohat, M. and Schwartz, C. E. (2006) 'Expanding the phenotypic spectrum of L1CAM-associated disease', *Clin Genet* 69(5): 414-9.
- Battle, E.**, Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J. and Garcia De Herreros, A. (2000) 'The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells', *Nat Cell Biol* 2(2): 84-9.
- Baum, B.**, Settleman, J. and Quinlan, M. P. (2008) 'Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease', *Semin Cell Dev Biol* 19(3): 294-308.
- Baykal, C.**, Ayhan, A., Al, A. and Yuce, K. (2003) 'Overexpression of the c-Met/HGF receptor and its prognostic significance in uterine cervix carcinomas', *Gynecol Oncol* 88(2): 123-9.
- Beer, S.**, Oleszewski, M., Gutwein, P., Geiger, C. and Altevogt, P. (1999) 'Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule', *J Cell Sci* 112 (Pt 16): 2667-75.
- Ben, Q. W.**, Wang, J. C., Liu, J., Zhu, Y., Yuan, F., Yao, W. Y. and Yuan, Y. Z. (2010) 'Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma', *Ann Surg Oncol* 17(8): 2213-21.
- Berger, F.** (2008) 'The strictest usage of the term epigenetic', *Semin Cell Dev Biol* 19(6): 525-6.
- Bergmann, F.**, Moldenhauer, G., Herpel, E., Gaida, M. M., Strobel, O., Werner, J., Esposito, I., Muerkoster, S. S., Schirmacher, P. and Kern, M. A. (2010) 'Expression of L1CAM, COX-2, EGFR, c-KIT and Her2/neu in anaplastic pancreatic cancer: putative therapeutic targets?', *Histopathology* 56(4): 440-8.
- Bernstein, B. E.**, Meissner, A. and Lander, E. S. (2007) 'The mammalian epigenome', *Cell* 128(4): 669-81.
- Bestor, T. H.** (1992) 'Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain', *EMBO J* 11(7): 2611-7.
- Bieber, A. J.**, Snow, P. M., Hortsch, M., Patel, N. H., Jacobs, J. R., Traquina, Z. R., Schilling, J. and Goodman, C. S. (1989) 'Drosophila neuroglian: a member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to the vertebrate neural adhesion molecule L1', *Cell* 59(3): 447-60.
- Bilder, D.** (2004) 'Epithelial polarity and proliferation control: links from the Drosophila neoplastic tumor suppressors', *Genes Dev* 18(16): 1909-25.
- Birchmeier, W.**, Brinkmann, V., Niemann, C., Meiners, S., DiCesare, S., Naundorf, H. and Sachs, M. (1997) 'Role of HGF/SF and c-Met in morphogenesis and metastasis of epithelial cells', *Ciba Found Symp* 212: 230-40; discussion 240-6.
- Bird, A.** (2002) 'DNA methylation patterns and epigenetic memory', *Genes Dev* 16(1): 6-21.
- Bisgrove, D. A.**, Monckton, E. A., Packer, M. and Godbout, R. (2000) 'Regulation of brain fatty acid-binding protein expression by differential phosphorylation of nuclear factor I in malignant glioma cell lines', *J Biol Chem* 275(39): 30668-76.

- Blaess, S.**, Kammerer, R. A. and 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(6): 2615-25.
- Blanco, M. J.**, Moreno-Bueno, G., Sarrío, D., Locascio, A., Cano, A., Palacios, J. and Nieto, M. A. (2002) 'Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas', *Oncogene* 21(20): 3241-6.
- Bock, E.**, Richter-Landsberg, C., Faissner, A. and Schachner, M. (1985) 'Demonstration of immunochemical identity between the nerve growth factor-inducible large external (NILE) glycoprotein and the cell adhesion molecule L1', *EMBO J* 4(11): 2765-8.
- Bokhman, J. V.** (1983) 'Two pathogenetic types of endometrial carcinoma', *Gynecol Oncol* 15(1): 10-7.
- Bondong, S.**, Kiefel, H., Hielscher, T., Zeimet, A. G., Zeillinger, R., Pils, D., Schuster, E., Castillo-Tong, D. C., Cadron, I., Vergote, I. et al. (2012) 'Prognostic significance of L1CAM in ovarian cancer and its role in constitutive NF-kappaB activation', *Ann Oncol* 23(7): 1795-802.
- Bonnomet, A.**, Syne, L., Brysse, A., Feyereisen, E., Thompson, E. W., Noel, A., Foidart, J. M., Birembaut, P., Polette, M. and Gilles, C. (2012) 'A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer', *Oncogene* 31(33): 3741-53.
- Boo, Y. J.**, Park, J. M., Kim, J., Chae, Y. S., Min, B. W., Um, J. W. and Moon, H. Y. (2007) 'L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer', *Ann Surg Oncol* 14(5): 1703-11.
- Boyer, A. S.**, Ayerinskas, II, Vincent, E. B., McKinney, L. A., Weeks, D. L. and Runyan, R. B. (1999) 'TGFbeta2 and TGFbeta3 have separate and sequential activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart', *Dev Biol* 208(2): 530-45.
- Boyer, B.**, Valles, A. M. and Thiery, J. P. (1996) 'Model systems of epithelium-mesenchyme transitions', *Acta Anat (Basel)* 156(3): 227-39.
- Brabletz, T.**, Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A. and Kirchner, T. (2005) 'Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin', *Cells Tissues Organs* 179(1-2): 56-65.
- Bruce, A. W.**, Donaldson, I. J., Wood, I. C., Yerbury, S. A., Sadowski, M. I., Chapman, M., Gottgens, B. and Buckley, N. J. (2004) 'Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes', *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28): 10458-63.
- Brueckner, B.**, Stresemann, C., Kuner, R., Mund, C., Musch, T., Meister, M., Sultmann, H. and Lyko, F. (2007) 'The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function', *Cancer Res* 67(4): 1419-23.
- Brummendorf, T.**, Kenwrick, S. and Rathjen, F. G. (1998) 'Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations', *Curr Opin Neurobiol* 8(1): 87-97.
- Brummendorf, T.** and Rathjen, F. G. (1993) 'Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction', *J Neurochem* 61(4): 1207-19.
- Camp, E. R.**, Findlay, V. J., Vaena, S. G., Walsh, J., Lewin, D. N., Turner, D. P. and Watson, D. K. (2011)

- 'Slug expression enhances tumor formation in a noninvasive rectal cancer model', *J Surg Res* 170(1): 56-63.
- Campan, M.**, Weisenberger, D. J. and Laird, P. W. (2006) 'DNA methylation profiles of female steroid hormone-driven human malignancies', *Curr Top Microbiol Immunol* 310: 141-78.
- Cano, A.**, Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F. and Nieto, M. A. (2000) 'The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression', *Nat Cell Biol* 2(2): 76-83.
- Castellani, V.** (2002) 'The function of neuropilin/L1 complex', *Adv Exp Med Biol* 515: 91-102.
- Castellani, V.**, Chedotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C. and Rougon, G. (2000) 'Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance', *Neuron* 27(2): 237-49.
- Castellani, V.**, De Angelis, E., Kenwrick, S. and Rougon, G. (2002) 'Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A', *EMBO J* 21(23): 6348-57.
- Cedar, H.** and Bergman, Y. (2009) 'Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms', *Nat Rev Genet* 10(5): 295-304.
- Cedar, H.** and Bergman, Y. (2012) 'Programming of DNA methylation patterns', *Annu Rev Biochem* 81: 97-117.
- Chang, T. C.**, Wentzel, E. A., Kent, O. A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K. H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C. J. et al. (2007) 'Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis', *Mol Cell* 26(5): 745-52.
- Chen, X. F.**, Zhang, H. J., Wang, H. B., Zhu, J., Zhou, W. Y., Zhang, H., Zhao, M. C., Su, J. M., Gao, W., Zhang, L. et al. (2012) 'Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways', *Mol Biol Rep* 39(4): 3549-56.
- Chen, Z. F.**, Paquette, A. J. and Anderson, D. J. (1998) 'NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis', *Nat Genet* 20(2): 136-42.
- Cheng, L.**, Itoh, K. and Lemmon, V. (2005a) 'L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region', *J Neurosci* 25(2): 395-403.
- Cheng, L.**, Lemmon, S. and Lemmon, V. (2005b) 'RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation', *J Neurochem* 94(4): 1102-10.
- Cheng, L.**, Wu, Q., Huang, Z., Guryanova, O. A., Huang, Q., Shou, W., Rich, J. N. and Bao, S. (2011) 'L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1', *EMBO J* 30(5): 800-13.
- Choi, J.**, Park, S. Y. and Joo, C. K. (2007) 'Transforming growth factor-beta1 represses E-cadherin production via slug expression in lens epithelial cells', *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(6): 2708-18.
- Chong, J. A.**, Tapia-Ramirez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J. J., Zheng, Y., Boutros, M. C., Altshuler, Y. M., Frohman, M. A., Kraner, S. D. and Mandel, G. (1995) 'REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons', *Cell* 80(6): 949-57.

- Christeli, E.,** Zoumpourlis, V., Kiaris, H., Ergazaki, M., Vassilaros, S. and Spandidos, D. (1996) 'TGF-beta 1 overexpression in breast cancer', *Oncol Rep* 3(6): 1115-8.
- Christman, J. K.** (2002) '5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy', *Oncogene* 21(35): 5483-95.
- Cihak, A. and Vesely, J.** (1978) 'Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on DNA synthesis in mouse lymphatic tissues', *Neoplasma* 25(4): 385-93.
- Conacci-Sorrell, M.,** Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P. and Ben-Ze'ev, A. (2003) 'Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK', *J Cell Biol* 163(4): 847-57.
- Corps, A. N.,** Sowter, H. M. and Smith, S. K. (1997) 'Hepatocyte growth factor stimulates motility, chemotaxis and mitogenesis in ovarian carcinoma cells expressing high levels of c-met', *Int J Cancer* 73(1): 151-5.
- Correia, A. C.,** Costa, M., Moraes, F., Bom, J., Novoa, A. and Mallo, M. (2007) 'Bmp2 is required for migration but not for induction of neural crest cells in the mouse', *Dev Dyn* 236(9): 2493-501.
- Coulson, J. M.,** Edgson, J. L., Woll, P. J. and Quinn, J. P. (2000) 'A splice variant of the neuron-restrictive silencer factor repressor is expressed in small cell lung cancer: a potential role in derepression of neuroendocrine genes and a useful clinical marker', *Cancer Res* 60(7): 1840-4.
- Cox, E. A.,** Tuskey, C. and Hardin, J. (2004) 'Cell adhesion receptors in *C. elegans*', *J Cell Sci* 117(Pt 10): 1867-70.
- Cui, H.,** Cruz-Correa, M., Giardiello, F. M., Hutcheon, D. F., Kafonek, D. R., Brandenburg, S., Wu, Y., He, X., Powe, N. R. and Feinberg, A. P. (2003) 'Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk', *Science* 299(5613): 1753-5.
- Dahme, M.,** Bartsch, U., Martini, R., Anliker, B., Schachner, M. and Mantei, N. (1997) 'Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system', *Nat Genet* 17(3): 346-9.
- Das, C. M.,** Taylor, P., Gireud, M., Singh, A., Lee, D., Fuller, G., Ji, L., Fangusaro, J., Rajaram, V., Goldman, S. et al. (2012) 'The deubiquitylase USP37 links REST to the control of p27 stability and cell proliferation', *Oncogene*.
- Davis, J. Q. and Bennett, V.** (1994) 'Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules', *J Biol Chem* 269(44): 27163-6.
- De Angelis, E.,** Brummendorf, T., Cheng, L., Lemmon, V. and Kenwrick, S. (2001) 'Alternative use of a mini exon of the L1 gene affects L1 binding to neural ligands', *J Biol Chem* 276(35): 32738-42.
- De Angelis, E.,** Watkins, A., Schafer, M., Brummendorf, T. and Kenwrick, S. (2002) 'Disease-associated mutations in L1 CAM interfere with ligand interactions and cell-surface expression', *Hum Mol Genet* 11(1): 1-12.
- Demyanenko, G. P.,** Schachner, M., Anton, E., Schmid, R., Feng, G., Sanes, J. and Maness, P. F. (2004) 'Close homolog of L1 modulates area-specific neuronal positioning and dendrite orientation in the cerebral cortex', *Neuron* 44(3): 423-37.
- Dhasarathy, A.,** Phadke, D., Mav, D., Shah, R. R. and Wade, P. A. (2011) 'The transcription factors Snail and Slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in breast cancer', *PLoS One*

6(10): e26514.

- Di Sciuolo, G.**, Donahue, T., Schachner, M. and Bogen, S. A. (1998) 'L1 antibodies block lymph node fibroblastic reticular matrix remodeling in vivo', *J Exp Med* 187(12): 1953-63.
- Djabali, M.**, Mattei, M. G., Nguyen, C., Roux, D., Demengeot, J., Denizot, F., Moos, M., Schachner, M., Goridis, C. and Jordan, B. R. (1990) 'The gene encoding L1, a neural adhesion molecule of the immunoglobulin family, is located on the X chromosome in mouse and man', *Genomics* 7(4): 587-93.
- Doberstein, K.**, Wieland, A., Lee, S. B., Blaheta, R. A., Wedel, S., Moch, H., Schraml, P., Pfeilschifter, J., Kristiansen, G. and Gutwein, P. (2011) 'L1-CAM expression in ccRCC correlates with shorter patients survival times and confers chemoresistance in renal cell carcinoma cells', *Carcinogenesis* 32(3): 262-70.
- Doherty, P. and Walsh, F. S.** (1996) 'CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth', *Mol Cell Neurosci* 8(2/3): 99-111.
- Duband, J. L.**, Monier, F., Delannet, M. and Newgreen, D. (1995) 'Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development', *Acta Anat (Basel)* 154(1): 63-78.
- Duczmal, A.**, Schollhammer, S., Katich, S., Ebeling, O., Schwartz-Albiez, R. and 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(1): 236-9.
- Eads, C. A.**, Danenberg, K. D., Kawakami, K., Saltz, L. B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P. V. and Laird, P. W. (2000) 'MethylLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation', *Nucleic Acids Res* 28(8): E32.
- Ebeling, O.**, Duczmal, A., Aigner, S., Geiger, C., Schollhammer, S., Kemshead, J. T., Moller, P., Schwartz-Albiez, R. and Altevogt, P. (1996) 'L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin', *Eur J Immunol* 26(10): 2508-16.
- Eden, A.**, Gaudet, F., Waghmare, A. and Jaenisch, R. (2003) 'Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation', *Science* 300(5618): 455.
- Elloul, S.**, Elstrand, M. B., Nesland, J. M., Trope, C. G., Kvalheim, G., Goldberg, I., Reich, R. and Davidson, B. (2005) 'Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma', *Cancer* 103(8): 1631-43.
- Erickson, L. A. and Lloyd, R. V.** (2004) 'Practical markers used in the diagnosis of endocrine tumors', *Adv Anat Pathol* 11(4): 175-89.
- Faissner, A.**, Kruse, J., Chiquet-Ehrismann, R. and Mackie, E. (1988) 'The high-molecular-weight J1 glycoproteins are immunochemically related to tenascin', *Differentiation* 37(2): 104-14.
- Faissner, A.**, Teplow, D. B., Kubler, D., Keilhauer, G., Kinzel, V. and Schachner, M. (1985) 'Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule L1', *EMBO J* 4(12): 3105-13.
- Feinberg, A. P.** (2004) 'The epigenetics of cancer etiology', *Semin Cancer Biol* 14(6): 427-32.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.** (1983) 'Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts', *Nature* 301(5895): 89-92.
- Felding-Habermann, B.**, Silletti, S., Mei, F., Siu, C. H., Yip, P. M., Brooks, P. C., Cheresch, D. A., O'Toole, T. E., Ginsberg, M. H. and Montgomery, A. M. (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(6): 1567-81.

- Felsenfeld, D. P.**, Hynes, M. A., Skoler, K. M., Furley, A. J. and Jessell, T. M. (1994) 'TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and beta 1 integrins', *Neuron* 12(3): 675-90.
- Finas, D.**, Huszar, M., Agic, A., Dogan, S., Kiefel, H., Riedle, S., Gast, D., Marcovich, R., Noack, F., Altevogt, P. et al. (2008) 'L1 cell adhesion molecule (L1CAM) as a pathogenetic factor in endometriosis', *Hum Reprod* 23(5): 1053-62.
- Fogel, M.**, Gutwein, P., Mechttersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Smirnov, A., Edler, L., Ben-Arie, A., Huszar, M. and Altevogt, P. (2003a) 'L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas', *Lancet* 362(9387): 869-75.
- Fogel, M.**, Huszar, M., Altevogt, P. and Ben-Arie, A. (2004) 'L1 (CD171) as a novel biomarker for ovarian and endometrial carcinomas', *Expert Rev Mol Diagn* 4(4): 455-62.
- Fogel, M.**, Mechttersheimer, S., Huszar, M., Smirnov, A., Abu-Dahi, A., Tilgen, W., Reichrath, J., Georg, T., Altevogt, P. and Gutwein, P. (2003b) 'L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma', *Cancer Lett* 189(2): 237-47.
- Fransen, E.**, Lemmon, V., Van Camp, G., Vits, L., Coucke, P. and Willems, P. J. (1995) 'CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1', *Eur J Hum Genet* 3(5): 273-84.
- Friedman, R. C.**, Farh, K. K., Burge, C. B. and Bartel, D. P. (2009) 'Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs', *Genome Res* 19(1): 92-105.
- Fukuoka, J.**, Fujii, T., Shih, J. H., Dracheva, T., Meerzaman, D., Player, A., Hong, K., Settnek, S., Gupta, A., Buetow, K. et al. (2004) 'Chromatin remodeling factors and BRM/BRG1 expression as prognostic indicators in non-small cell lung cancer', *Clin Cancer Res* 10(13): 4314-24.
- Fuller, G. N.**, Su, X., Price, R. E., Cohen, Z. R., Lang, F. F., Sawaya, R. and Majumder, S. (2005) 'Many human medulloblastoma tumors overexpress repressor element-1 silencing transcription (REST)/neuron-restrictive silencer factor, which can be functionally countered by REST-VP16', *Mol Cancer Ther* 4(3): 343-9.
- Gallo, D.**, Ferlini, C. and Scambia, G. (2010) 'The epithelial-mesenchymal transition and the estrogen-signaling in ovarian cancer', *Curr Drug Targets* 11(4): 474-81.
- Garver, T. D.**, Ren, Q., Tuvia, S. and 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(3): 703-14.
- Gast, D.**, Riedle, S., Issa, Y., Pfeifer, M., Beckhove, P., Sanderson, M. P., Arlt, M., Moldenhauer, G., Fogel, M., Kruger, A. et al. (2008a) 'The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies', *Oncogene* 27(9): 1281-9.
- Gast, D.**, Riedle, S., Kiefel, H., Muerkoster, S. S., Schafer, H., Schafer, M. K. and Altevogt, P. (2008b) 'The RGD integrin binding site in human L1-CAM is important for nuclear signaling', *Exp Cell Res* 314(13): 2411-8.

- Gast, D.**, Riedle, S., Schabath, H., Schlich, S., Schneider, A., Issa, Y., Stoeck, A., Fogel, M., Joumaa, S., Wenger, T. et al. (2005) 'L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas', *Int J Cancer* 115(4): 658-65.
- Gavert, N.**, Conacci-Sorrell, M., Gast, D., Schneider, A., Altevogt, P., Brabletz, T. and Ben-Ze'ev, A. (2005) 'L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers', *J Cell Biol* 168(4): 633-42.
- Geismann, C.**, Arlt, A., Bauer, I., Pfeifer, M., Schirmer, U., Altevogt, P., Muerkoster, S. S. and Schafer, H. (2011) 'Binding of the transcription factor Slug to the L1CAM promoter is essential for transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced L1CAM expression in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells', *Int J Oncol* 38(1): 257-66.
- Geismann, C.**, Morscheck, M., Koch, D., Bergmann, F., Ungefroren, H., Arlt, A., Tsao, M. S., Bachem, M. G., Altevogt, P., Sipos, B. et al. (2009) 'Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer', *Cancer Res* 69(10): 4517-26.
- Gil, O. D.**, Sakurai, T., Bradley, A. E., Fink, M. Y., Cassella, M. R., Kuo, J. A. and Felsenfeld, D. P. (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(4): 719-30.
- Gilles, C.**, Polette, M., Mestdagt, M., Nawrocki-Raby, B., Ruggeri, P., Birembaut, P. and Foidart, J. M. (2003) 'Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells', *Cancer Res* 63(10): 2658-64.
- Gjerstorff, M.**, Burns, J. S., Nielsen, O., Kassem, M. and Ditzel, H. (2009) 'Epigenetic modulation of cancer-germline antigen gene expression in tumorigenic human mesenchymal stem cells: implications for cancer therapy', *Am J Pathol* 175(1): 314-23.
- Gouveia, R. M.**, Gomes, C. M., Sousa, M., Alves, P. M. and Costa, J. (2008) 'Kinetic analysis of L1 homophilic interaction: role of the first four immunoglobulin domains and implications on binding mechanism', *J Biol Chem* 283(42): 28038-47.
- Gregory, R. I.**, Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2004) 'The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs', *Nature* 432(7014): 235-40.
- Grumet, M.**, Friedlander, D. R. and Sakurai, T. (1996) 'Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules', *Perspect Dev Neurobiol* 3(4): 319-30.
- Grumet, M.**, Hoffman, S. and Edelman, G. M. (1984) 'Two antigenically related neuronal cell adhesion molecules of different specificities mediate neuron-neuron and neuron-glia adhesion', *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(1): 267-71.
- Gutwein, P.**, Oleszewski, M., Mechtersheimer, S., Agmon-Levin, N., Krauss, K. and Altevogt, P. (2000) 'Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells', *J Biol Chem* 275(20): 15490-7.
- Gutwein, P.**, Stoeck, A., Riedle, S., Gast, D., Runz, S., Condon, T. P., Marme, A., Phong, M. C., Linderkamp, O., Skorokhod, A. et al. (2005) 'Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells', *Clin Cancer Res* 11(7): 2492-501.
- Hai, J.**, Zhu, C. Q., Bandarchi, B., Wang, Y. H., Navab, R., Shepherd, F. A., Jurisica, I. and Tsao, M. S.

- (2012) 'L1 cell adhesion molecule promotes tumorigenicity and metastatic potential in non-small cell lung cancer', *Clin Cancer Res* 18(7): 1914-24.
- Hall, H.**, Djonov, V., Ehrbar, M., Hoechli, M. and Hubbell, J. A. (2004) 'Heterophilic interactions between cell adhesion molecule L1 and alphavbeta3-integrin induce HUVEC process extension in vitro and angiogenesis in vivo', *Angiogenesis* 7(3): 213-23.
- Hamilton, J. P.** (2011) 'Epigenetics: principles and practice', *Dig Dis* 29(2): 130-5.
- Haspel, J.**, Friedlander, D. R., Ivgy-May, N., Chickramane, S., Roonprapunt, C., Chen, S., Schachner, M. and Grumet, M. (2000) 'Critical and optimal Ig domains for promotion of neurite outgrowth by L1/ Ng-CAM', *J Neurobiol* 42(3): 287-302.
- Hauser, S.**, Bickel, L., Weinspach, D., Gerg, M., Schafer, M. K., Pfeifer, M., Hazin, J., Schelter, F., Weidle, U. H., Ramser, J. et al. (2011) 'Full-length L1CAM and not its Delta2Delta27 splice variant promotes metastasis through induction of gelatinase expression', *PLoS One* 6(4): e18989.
- Hay, E. D.** (2005) 'The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it', *Dev Dyn* 233(3): 706-20.
- He, X.**, He, L. and Hannon, G. J. (2007) 'The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network', *Cancer Res* 67(23): 11099-101.
- Heiz, M.**, Grunberg, J., Schubiger, P. A. and 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(30): 31149-56.
- Helbert, M. J.**, Dauwe, S. E. and De Broe, M. E. (2001) 'Flow cytometric immunodissection of the human distal tubule and cortical collecting duct system', *Kidney Int* 59(2): 554-64.
- Heller, G.**, Weinzierl, M., Noll, C., Babinsky, V., Ziegler, B., Altenberger, C., Minichsdorfer, C., Lang, G., Dome, B., End-Pfutzenreuter, A. et al. (2012) 'Genome-wide miRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers', *Clin Cancer Res* 18(6): 1619-29.
- Hemavathy, K.**, Ashraf, S. I. and Ip, Y. T. (2000) 'Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer', *Gene* 257(1): 1-12.
- Hendrickson, M.**, Ross, J., Eifel, P., Martinez, A. and Kempson, R. (1982) 'Uterine papillary serous carcinoma: a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma', *Am J Surg Pathol* 6(2): 93-108.
- Herron, L. R.**, Hill, M., Davey, F. and Gunn-Moore, F. J. (2009) 'The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules', *Biochem J* 419(3): 519-31.
- Heuberger, J. and Birchmeier, W.** (2010) 'Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling', *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2): a002915.
- Hirohashi, S.** (1998) 'Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers', *Am J Pathol* 153(2): 333-9.
- Hlavin, M. L. and Lemmon, V.** (1991) 'Molecular structure and functional testing of human L1CAM: an interspecies comparison', *Genomics* 11(2): 416-23.
- Holliday, R. and Pugh, J. E.** (1975) 'DNA modification mechanisms and gene activity during develop-

- ment', *Science* 187(4173): 226-32.
- Hortsch, M.** (1996) 'The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks', *Neuron* 17(4): 587-93.
- Hou, Z.**, Yin, H., Chen, C., Dai, X., Li, X., Liu, B. and Fang, X. (2012) 'microRNA-146a targets the L1 cell adhesion molecule and suppresses the metastatic potential of gastric cancer', *Mol Med Report* 6(3): 501-6.
- Hsieh, J.**, Nakashima, K., Kuwabara, T., Mejia, E. and Gage, F. H. (2004) 'Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells', *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(47): 16659-64.
- Huang, Y.**, Myers, S. J. and Dingledine, R. (1999) 'Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes', *Nat Neurosci* 2(10): 867-72.
- Hubbe, M.**, Kowitz, A., Schirrmacher, V., Schachner, M. and Altevogt, P. (1993) 'L1 adhesion molecule on mouse leukocytes: regulation and involvement in endothelial cell binding', *Eur J Immunol* 23(11): 2927-31.
- Hung, S. C.**, Wu, I. H., Hsue, S. S., Liao, C. H., Wang, H. C., Chuang, P. H., Sung, S. Y. and Hsieh, C. L. (2010) 'Targeting l1 cell adhesion molecule using lentivirus-mediated short hairpin RNA interference reverses aggressiveness of oral squamous cell carcinoma', *Mol Pharm* 7(6): 2312-23.
- Huszar, M.**, Pfeifer, M., Schirmer, U., Kiefel, H., Konecny, G. E., Ben-Arie, A., Edler, L., Munch, M., Muller-Holzner, E., Jerabek-Klestil, S. et al. (2010) 'Up-regulation of L1CAM is linked to loss of hormone receptors and E-cadherin in aggressive subtypes of endometrial carcinomas', *J Pathol* 220(5): 551-61.
- Hutvagner, G.**, McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T. and Zamore, P. D. (2001) 'A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA', *Science* 293(5531): 834-8.
- Islam, R.**, Kristiansen, L. V., Romani, S., Garcia-Alonso, L. and Hortsch, M. (2004) 'Activation of EGF receptor kinase by L1-mediated homophilic cell interactions', *Mol Biol Cell* 15(4): 2003-12.
- Issa, Y.**, Nummer, D., Seibel, T., Muerkoster, S. S., Koch, M., Schmitz-Winnenthal, F. H., Galindo, L., Weitz, J., Beckhove, P. and Altevogt, P. (2009) 'Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration', *J Mol Med (Berl)* 87(1): 99-112.
- Itoh, K.**, Brackenbury, R. and Akeson, R. A. (1995) 'Induction of L1 mRNA in PC12 cells by NGF is modulated by cell-cell contact and does not require the high-affinity NGF receptor', *J Neurosci* 15(3 Pt 2): 2504-12.
- Jackson, S. R.**, Guner, Y. S., Woo, R., Randolph, L. M., Ford, H. and Shin, C. E. (2009) 'L1CAM mutation in association with X-linked hydrocephalus and Hirschsprung's disease', *Pediatr Surg Int* 25(9): 823-5.
- Jacob, J.**, Haspel, J., Kane-Goldsmith, N. and Grumet, M. (2002) 'L1 mediated homophilic binding and neurite outgrowth are modulated by alternative splicing of exon 2', *J Neurobiol* 51(3): 177-89.
- Jaenisch, R.** (1997) 'DNA methylation and imprinting: why bother?', *Trends Genet* 13(8): 323-9.
- James, S. R.**, Link, P. A. and Karpf, A. R. (2006) 'Epigenetic regulation of X-linked cancer/germline

- antigen genes by DNMT1 and DNMT3b', *Oncogene* 25(52): 6975-85.
- Janda, E.**, Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H. and Grunert, S. (2002) 'Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways', *J Cell Biol* 156(2): 299-313.
- Jenkins, S. M. and Bennett, V.** (2001) 'Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments', *J Cell Biol* 155(5): 739-46.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D.** (2001) 'Translating the histone code', *Science* 293(5532): 1074-80.
- Jiang, W., Pang, X. G., Wang, Q., Shen, Y. X., Chen, X. K. and Xi, J. J. (2012) 'Prognostic role of Twist, Slug, and Foxc2 expression in stage I non-small-cell lung cancer after curative resection', *Clin Lung Cancer* 13(4): 280-7.
- Johnson, D. S.**, Mortazavi, A., Myers, R. M. and Wold, B. (2007) 'Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions', *Science* 316(5830): 1497-502.
- Jouet, M.**, Moncla, A., Paterson, J., McKeown, C., Fryer, A., Carpenter, N., Holmberg, E., Wadelius, C. and Kenwrick, S. (1995a) 'New domains of neural cell-adhesion molecule L1 implicated in X-linked hydrocephalus and MASA syndrome', *Am J Hum Genet* 56(6): 1304-14.
- Jouet, M.**, Rosenthal, A., Armstrong, G., MacFarlane, J., Stevenson, R., Paterson, J., Metzzenberg, A., Ionasescu, V., Temple, K. and Kenwrick, S. (1994) 'X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene', *Nat Genet* 7(3): 402-7.
- Jouet, M.**, Rosenthal, A. and Kenwrick, S. (1995b) 'Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells', *Brain Res Mol Brain Res* 30(2): 378-80.
- Jung, J.**, Son, Y. S., Park, H., Jeon, S. K., Lee, J. W., Choi, S. Y., Kim, J. M., Kwon, Y. G., Hong, H. J. and Min, J. K. (2011) 'The cell adhesion molecule L1 promotes gallbladder carcinoma progression in vitro and in vivo', *Oncol Rep* 25(4): 945-52.
- Kaifi, J. T.**, Reichelt, U., Quaas, A., Schurr, P. G., Wachowiak, R., Yekebas, E. F., Strate, T., Schneider, C., Pantel, K., Schachner, M. et al. (2007) 'L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer', *Mod Pathol* 20(11): 1183-90.
- Kajita, M.**, McClinic, K. N. and Wade, P. A. (2004) 'Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress', *Mol Cell Biol* 24(17): 7559-66.
- Kajiwara, Y.**, Ueno, H., Hashiguchi, Y., Shinto, E., Shimazaki, H., Mochizuki, H. and Hase, K. (2011) 'Expression of l1 cell adhesion molecule and morphologic features at the invasive front of colorectal cancer', *Am J Clin Pathol* 136(1): 138-44.
- Kallunki, P.**, Edelman, G. M. and Jones, F. S. (1997) 'Tissue-specific expression of the L1 cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element', *J Cell Biol* 138(6): 1343-54.
- Kallunki, P.**, Edelman, G. M. and Jones, F. S. (1998) 'The neural restrictive silencer element can act as both a repressor and enhancer of L1 cell adhesion molecule gene expression during postnatal development', *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 3233-8.
- Kalluri, R.** and Weinberg, R. A. (2009) 'The basics of epithelial-mesenchymal transition', *J Clin Invest* 119(6): 1420-8.

- Kalus, I.**, Schnegelsberg, B., Seidah, N. G., Kleene, R. and 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(12): 10381-8.
- Kamiguchi, H.** and Lemmon, V. (1998) 'A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone', *J Neurosci* 18(10): 3749-56.
- Kamiguchi, H.**, Long, K. E., Pendergast, M., Schaefer, A. W., Rapoport, I., Kirchhausen, T. and Lemmon, V. (1998) 'The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway', *J Neurosci* 18(14): 5311-21.
- Kaneda, A. and Feinberg, A. P.** (2005) 'Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk', *Cancer Res* 65(24): 11236-40.
- Kang, S.**, Kim, J. W., Kang, G. H., Lee, S., Park, N. H., Song, Y. S., Park, S. Y., Kang, S. B. and Lee, H. P. (2006a) 'Comparison of DNA hypermethylation patterns in different types of uterine cancer: cervical squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma', *Int J Cancer* 118(9): 2168-71.
- Kang, S.**, Lee, J. M., Jeon, E. S., Lee, S., Kim, H., Kim, H. S., Seo, S. S., Park, S. Y., Sidransky, D. and Dong, S. M. (2006b) 'RASSF1A hypermethylation and its inverse correlation with BRAF and/or KRAS mutations in MSI-associated endometrial carcinoma', *Int J Cancer* 119(6): 1316-21.
- Kashiwagi, K.**, Ishii, J., Sakaeda, M., Arimasu, Y., Shimoyamada, H., Sato, H., Miyata, C., Kamma, H., Aoki, I. and Yazawa, T. (2012) 'Differences of molecular expression mechanisms among neural cell adhesion molecule 1, synaptophysin, and chromogranin A in lung cancer cells', *Pathol Int* 62(4): 232-45.
- Kataoka, H.**, Murayama, T., Yokode, M., Mori, S., Sano, H., Ozaki, H., Yokota, Y., Nishikawa, S. and Kita, T. (2000) 'A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs', *Nucleic Acids Res* 28(2): 626-33.
- Kato, K.**, Maesawa, C., Itabashi, T., Fujisawa, K., Otsuka, K., Kanno, S., Tada, H., Tatemichi, Y., Kotani, K., Oikawa, H. et al. (2009) 'DNA hypomethylation at the CpG island is involved in aberrant expression of the L1 cell adhesion molecule gene in colorectal cancer', *Int J Oncol* 35(3): 467-76.
- Kenwrick, S.**, Watkins, A. and De Angelis, E. (2000) 'Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations', *Hum Mol Genet* 9(6): 879-86.
- Kiefel, H.**, Bondong, S., Pfeifer, M., Schirmer, U., Erbe-Hoffmann, N., Schafer, H., Sebens, S. and Altevogt, P. (2012) 'EMT-associated up-regulation of L1CAM provides insights into L1CAM-mediated integrin signalling and NF-kappaB activation', *Carcinogenesis*.
- Kim, J.**, Coffey, D. M., Creighton, C. J., Yu, Z., Hawkins, S. M. and Matzuk, M. M. (2012) 'High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model', *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(10): 3921-6.
- Kimelman, D.** (2006) 'Mesoderm induction: from caps to chips', *Nat Rev Genet* 7(5): 360-72.
- Kleene, R.**, Yang, H., Kutsche, M. and 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(24): 21656-63.
- Knogler, K.**, Grunberg, J., Zimmermann, K., Cohrs, S., Honer, M., Ametamey, S., Altevogt, P., Fogel, M., Schubiger, P. A. and Novak-Hofer, I. (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(2 Pt 1): 603-11.
- Kohl, A.**, Giese, K. P., Mohajeri, M. H., Montag, D., Moos, M. and Schachner, M. (1992) 'Analysis of promoter activity and 5' genomic structure of the neural cell adhesion molecule L1', *J Neurosci Res* 32(2): 167-77.
- Kondo, T.**, Bobek, M. P., Kuick, R., Lamb, B., Zhu, X., Narayan, A., Bourc'his, D., Viegas-Pequignot, E., Ehrlich, M. and Hanash, S. M. (2000) 'Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: hypomethylation of non-satellite DNA repeats D4Z4 and NBL2', *Hum Mol Genet* 9(4): 597-604.
- Kouzarides, T.** (2007) 'Chromatin modifications and their function', *Cell* 128(4): 693-705.
- Kowitz, A.**, Kadmon, G., Eckert, M., Schirmacher, V., Schachner, M. and Altevogt, P. (1992) 'Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes', *Eur J Immunol* 22(5): 1199-205.
- Kreisler, A.**, Strissel, P. L., Strick, R., Neumann, S. B., Schumacher, U. and Becker, C. M. (2010) 'Regulation of the NRSF/REST gene by methylation and CREB affects the cellular phenotype of small-cell lung cancer', *Oncogene* 29(43): 5828-38.
- Kuhn, T. B.**, Stoeckli, E. T., Condrau, M. A., Rathjen, F. G. and Sonderegger, P. (1991) 'Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4)', *J Cell Biol* 115(4): 1113-26.
- Kujat, R.**, Miragall, F., Krause, D., Dermietzel, R. and Wröbel, K. H. (1995) 'Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in non-proliferating epithelial cells of the male urogenital tract', *Histochem Cell Biol* 103(4): 311-21.
- Kulahin, N.**, Li, S., Hinsby, A., Kiselyov, V., Berezin, V. and Bock, E. (2008) 'Fibronectin type III (FN3) modules of the neuronal cell adhesion molecule L1 interact directly with the fibroblast growth factor (FGF) receptor', *Mol Cell Neurosci* 37(3): 528-36.
- Kulahin, N.**, Li, S., Kiselyov, V., Bock, E. and Berezin, V. (2009) 'Identification of neural cell adhesion molecule L1-derived neuritogenic ligands of the fibroblast growth factor receptor', *J Neurosci Res* 87(8): 1806-12.
- Kurrey, N. K.**, Jalgaonkar, S. P., Joglekar, A. V., Ghanate, A. D., Chaskar, P. D., Doiphode, R. Y. and Bapat, S. A. (2009) 'Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells', *Stem Cells* 27(9): 2059-68.
- Kuwajima, A.**, Iwashita, J., Murata, J. and Abe, T. (2007) 'The histone deacetylase inhibitor butyrate inhibits melanoma cell invasion of Matrigel', *Anticancer Res* 27(6B): 4163-9.
- Kyo, S.**, Sakaguchi, J., Ohno, S., Mizumoto, Y., Maida, Y., Hashimoto, M., Nakamura, M., Takakura, M., Nakajima, M., Masutomi, K. et al. (2006) 'High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival', *Hum Pathol* 37(4): 431-8.
- Lagarda, H.**, Catusus, L., Arguelles, R., Matias-Guiu, X. and Prat, J. (2001) 'K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability', *J Pathol* 193(2): 193-9.
- Lai, E. C.** (2002) 'Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation', *Nat Genet* 30(4): 363-4.

- Lande-Diner, L. and Cedar, H.** (2005) 'Silence of the genes--mechanisms of long-term repression', *Nat Rev Genet* 6(8): 648-54.
- Lander, E. S. Linton, L. M. Birren, B. Nusbaum, C. Zody, M. C. Baldwin, J. Devon, K. Dewar, K. Doyle, M. FitzHugh, W. et al.** (2001) 'Initial sequencing and analysis of the human genome', *Nature* 409(6822): 860-921.
- Lawinger, P., Venugopal, R., Guo, Z. S., Immaneni, A., Sengupta, D., Lu, W., Rastelli, L., Marin Dias Carneiro, A., Levin, V., Fuller, G. N. et al.** (2000) 'The neuronal repressor REST/NRSF is an essential regulator in medulloblastoma cells', *Nat Med* 6(7): 826-31.
- Lax, S. F.** (2004) 'Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification', *Virchows Arch* 444(3): 213-23.
- Lax, S. F., Kurman, R. J., Pizer, E. S., Wu, L. and Ronnett, B. M.** (2000) 'A binary architectural grading system for uterine endometrial endometrioid carcinoma has superior reproducibility compared with FIGO grading and identifies subsets of advance-stage tumors with favorable and unfavorable prognosis', *Am J Surg Pathol* 24(9): 1201-8.
- Lee, D., Chung, Y. H., Kim, J. A., Lee, Y. S., Jang, M. K., Kim, K. M., Lim, Y. S. and Lee, H. C.** (2012) 'Transforming growth factor beta 1 overexpression is closely related to invasiveness of hepatocellular carcinoma', *Oncology* 82(1): 11-8.
- Lee, J. H., Chai, Y. G. and Hersh, L. B.** (2000) 'Expression patterns of mouse repressor element-1 silencing transcription factor 4 (REST4) and its possible function in neuroblastoma', *J Mol Neurosci* 15(3): 205-14.
- Lee, V. M., Greene, L. and Shelanski, M. L.** (1981) 'Identification of neural and adrenal medullary surface membrane glycoproteins recognized by antisera to cultured rat sympathetic neurons and PC12 pheochromocytoma cells', *Neuroscience* 6(12): 2773-86.
- Lehmann, U., Hasemeier, B., Christgen, M., Muller, M., Romermann, D., Langer, F. and Kreipe, H.** (2008) 'Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer', *J Pathol* 214(1): 17-24.
- Lemmon, M. A. and Schlessinger, J.** (1998) 'Transmembrane signaling by receptor oligomerization', *Methods Mol Biol* 84: 49-71.
- Lepagnol-Bestel, A. M., Zvara, A., Maussion, G., Quignon, F., Ngimbous, B., Ramoz, N., Imbeaud, S., Loe-Mie, Y., Benihoud, K., Agier, N. et al.** (2009) 'DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome', *Hum Mol Genet* 18(8): 1405-14.
- Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. and Burge, C. B.** (2003) 'Prediction of mammalian microRNA targets', *Cell* 115(7): 787-98.
- Liao, X., Siu, M. K., Chan, K. Y., Wong, E. S., Ngan, H. Y., Chan, Q. K., Li, A. S., Khoo, U. S. and Cheung, A. N.** (2008) 'Hypermethylation of RAS effector related genes and DNA methyltransferase 1 expression in endometrial carcinogenesis', *Int J Cancer* 123(2): 296-302.
- Lin, B., Madan, A., Yoon, J. G., Fang, X., Yan, X., Kim, T. K., Hwang, D., Hood, L. and Foltz, G.** (2010) 'Massively parallel signature sequencing and bioinformatics analysis identifies up-regulation of TGFBI and SOX4 in human glioblastoma', *PLoS One* 5(4): e10210.

- Lindner, J.**, Rathjen, F. G. and Schachner, M. (1983) 'L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum', *Nature* 305(5933): 427-30.
- Liu, J.**, Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G. J. (2004) 'Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi', *Science* 305(5689): 1437-41.
- Liu, T.**, Zhang, X., Shang, M., Zhang, Y., Xia, B., Niu, M., Liu, Y. and Pang, D. (2012) 'Dysregulated expression of Slug, vimentin, and E-cadherin correlates with poor clinical outcome in patients with basal-like breast cancer', *J Surg Oncol*.
- Lopez-Serra, P. and Esteller, M.** (2012) 'DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer', *Oncogene* 31(13): 1609-22.
- Lu, J.**, Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A. et al. (2005) 'MicroRNA expression profiles classify human cancers', *Nature* 435(7043): 834-8.
- Lujambio, A.**, Calin, G. A., Villanueva, A., Ropero, S., Sanchez-Cespedes, M., Blanco, D., Montuenga, L. M., Rossi, S., Nicoloso, M. S., Faller, W. J. et al. (2008) 'A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis', *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(36): 13556-61.
- Lutz, D.**, Wolters-Eisfeld, G., Joshi, G., Djogo, N., Jakovcevski, I., Schachner, M. and Kleene, R. (2012) 'Generation and nuclear translocation of sumoylated transmembrane fragment of cell adhesion molecule L1', *J Biol Chem* 287(21): 17161-75.
- Lv, H.**, Pan, G., Zheng, G., Wu, X., Ren, H., Liu, Y. and Wen, J. (2010) 'Expression and functions of the repressor element 1 (RE-1)-silencing transcription factor (REST) in breast cancer', *J Cell Biochem* 110(4): 968-74.
- Majumder, S.** (2006) 'REST in good times and bad: roles in tumor suppressor and oncogenic activities', *Cell Cycle* 5(17): 1929-35.
- Mancini, M.**, Petta, S., Iacobucci, I., Salvestrini, V., Barbieri, E. and Santucci, M. A. (2010) 'Zinc-finger transcription factor slug contributes to the survival advantage of chronic myeloid leukemia cells', *Cell Signal* 22(8): 1247-53.
- Manzanares, M.**, Locascio, A. and Nieto, M. A. (2001) 'The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution', *Trends Genet* 17(4): 178-81.
- Maretzky, T.**, Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D., Altevogt, P., Saftig, P. and Reiss, K. (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(20): 9040-53.
- Martin, T. A.**, Goyal, A., Watkins, G. and Jiang, W. G. (2005) 'Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer', *Ann Surg Oncol* 12(6): 488-96.
- Mauhin, V.**, Lutz, Y., Dennefeld, C. and Alberga, A. (1993) 'Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL', *Nucleic Acids Res* 21(17): 3951-7.
- Maxwell, G. L.**, Risinger, J. I., Alvarez, A. A., Barrett, J. C. and Berchuck, A. (2001) 'Favorable survival associated with microsatellite instability in endometrioid endometrial cancers', *Obstet Gynecol* 97(3): 417-

22.

- Mechtersheimer, S.**, Gutwein, P., Agmon-Levin, N., Stoeck, A., Oleszewski, M., Riedle, S., Postina, R., Fahrenholz, F., Fogel, M., Lemmon, V. et al. (2001) 'Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins', *J Cell Biol* 155(4): 661-73.
- Meech, R.**, Kallunki, P., Edelman, G. M. and Jones, F. S. (1999) 'A binding site for homeodomain and Pax proteins is necessary for L1 cell adhesion molecule gene expression by Pax-6 and bone morphogenetic proteins', *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 2420-5.
- Meier, F.**, Busch, S., Gast, D., Goppert, A., Altevogt, P., Maczey, E., Riedle, S., Garbe, C. and Schitteck, B. (2006) 'The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression', *Int J Cancer* 119(3): 549-55.
- Mendivil, A.**, Schuler, K. M. and Gehrig, P. A. (2009) 'Non-endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus: a review of selected histological subtypes', *Cancer Control* 16(1): 46-52.
- Mercado-Pimentel, M. E. and Runyan, R. B.** (2007) 'Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart', *Cells Tissues Organs* 185(1-3): 146-56.
- Mikulak, J.**, Negrini, S., Klajn, A., D'Alessandro, R., Mavilio, D. and Meldolesi, J. (2012) 'Dual REST-dependence of L1CAM: from gene expression to alternative splicing governed by Nova2 in neural cells', *J Neurochem* 120(5): 699-709.
- Min, J. K.**, Kim, J. M., Li, S., Lee, J. W., Yoon, H., Ryu, C. J., Jeon, S. H., Lee, J. H., Kim, J. Y., Yoon, H. K. et al. (2010) 'L1 cell adhesion molecule is a novel therapeutic target in intrahepatic cholangiocarcinoma', *Clin Cancer Res* 16(14): 3571-80.
- Miniou, P.**, Jeanpierre, M., Blanquet, V., Sibella, V., Bonneau, D., Herbelin, C., Fischer, A., Niveleau, A. and Viegas-Pequignot, E. (1994) 'Abnormal methylation pattern in constitutive and facultative (X inactive chromosome) heterochromatin of ICF patients', *Hum Mol Genet* 3(12): 2093-102.
- Miura, M.**, Asou, H., Kobayashi, M. and Uyemura, K. (1992) 'Functional expression of a full-length cDNA coding for rat neural cell adhesion molecule L1 mediates homophilic intercellular adhesion and migration of cerebellar neurons', *J Biol Chem* 267(15): 10752-8.
- Miura, M.**, Kobayashi, M., Asou, H. and 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(1): 91-5.
- Miyahara, R.**, Tanaka, F., Nakagawa, T., Matsuoka, K., Isii, K. and Wada, H. (2001) 'Expression of neural cell adhesion molecules (polysialylated form of neural cell adhesion molecule and L1-cell adhesion molecule) on resected small cell lung cancer specimens: in relation to proliferation state', *J Surg Oncol* 77(1): 49-54.
- Montgomery, A. M.**, Becker, J. C., Siu, C. H., Lemmon, V. P., Cheresch, D. A., Pancook, J. D., Zhao, X. and Reisfeld, R. A. (1996) 'Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3', *J Cell Biol* 132(3): 475-85.
- Moos, M.**, Tacke, R., Scherer, H., Teplow, D., Fruh, K. and Schachner, M. (1988) 'Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin', *Nature* 334(6184): 701-3.

- Morales, G.**, Hubert, M., Brummendorf, T., Treubert, U., Tarnok, A., Schwarz, U. and Rathjen, F. G. (1993) 'Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo', *Neuron* 11(6): 1113-22.
- Moreno-Bueno, G.**, Hardisson, D., Sanchez, C., Sarrío, D., Cassia, R., Garcia-Rostan, G., Prat, J., Guo, M., Herman, J. G., Matias-Guiu, X. et al. (2002) 'Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer', *Oncogene* 21(52): 7981-90.
- Moss, A. C.**, Jacobson, G. M., Walker, L. E., Blake, N. W., Marshall, E. and Coulson, J. M. (2009) 'SCG3 transcript in peripheral blood is a prognostic biomarker for REST-deficient small cell lung cancer', *Clin Cancer Res* 15(1): 274-83.
- Mutter, G. L.**, Lin, M. C., Fitzgerald, J. T., Kum, J. B., Baak, J. P., Lees, J. A., Weng, L. P. and Eng, C. (2000) 'Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers', *J Natl Cancer Inst* 92(11): 924-30.
- Nagaraj, K.** and Hortsch, M. (2006) 'Phosphorylation of L1-type cell-adhesion molecules--ankyrins away!', *Trends Biochem Sci* 31(10): 544-6.
- Nakakimura, S.**, Sasaki, F., Okada, T., Arisue, A., Cho, K., Yoshino, M., Kanemura, Y., Yamasaki, M. and Todo, S. (2008) 'Hirschsprung's disease, acrocallosal syndrome, and congenital hydrocephalus: report of 2 patients and literature review', *J Pediatr Surg* 43(5): E13-7.
- Naruse, Y.**, Aoki, T., Kojima, T. and Mori, N. (1999) 'Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes', *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 13691-6.
- Nayeem, N.**, Silletti, S., Yang, X., Lemmon, V. P., Reisfeld, R. A., Stallcup, W. B. and Montgomery, A. M. (1999) 'A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1', *J Cell Sci* 112 (Pt 24): 4739-49.
- Neumann, S. B.**, Seitz, R., Gorzella, A., Heister, A., Doeberitz, M. K. and Becker, C. M. (2004) 'Relaxation of glycine receptor and onconeural gene transcription control in NRSF deficient small cell lung cancer cell lines', *Brain Res Mol Brain Res* 120(2): 173-81.
- Nieminen, T. T.**, Gylling, A., Abdel-Rahman, W. M., Nuorva, K., Aarnio, M., Renkonen-Sinisalo, L., Jarvinen, H. J., Mecklin, J. P., Butzow, R. and Peltomaki, P. (2009) 'Molecular analysis of endometrial tumorigenesis: importance of complex hyperplasia regardless of atypia', *Clin Cancer Res* 15(18): 5772-83.
- Nishioka, R.**, Itoh, S., Gui, T., Gai, Z., Oikawa, K., Kawai, M., Tani, M., Yamaue, H. and Muragaki, Y. (2010) 'SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo', *Exp Mol Pathol* 89(2): 149-57.
- Novak-Hofer, I.**, Cohrs, S., Grunberg, J., Friedli, A., Schlatter, M. C., Pfeifer, M., Altevogt, P. and Schubiger, P. A. (2008) 'Antibodies directed against L1-CAM synergize with Genistein in inhibiting growth and survival pathways in SKOV3ip human ovarian cancer cells', *Cancer Lett* 261(2): 193-204.
- Oft, M.**, Heider, K. H. and Beug, H. (1998) 'TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis', *Curr Biol* 8(23): 1243-52.
- Oi, S.**, Natsume, A., Ito, M., Kondo, Y., Shimato, S., Maeda, Y., Saito, K. and Wakabayashi, T. (2009) 'Synergistic induction of NY-ESO-1 antigen expression by a novel histone deacetylase inhibitor, valproic acid, with 5-aza-2'-deoxycytidine in glioma cells', *J Neurooncol* 92(1): 15-22.

- Okamoto, N.**, Wada, Y. and Goto, M. (1997) 'Hydrocephalus and Hirschsprung's disease in a patient with a mutation of L1CAM', *J Med Genet* 34(8): 670-1.
- Okano, M.**, Bell, D. W., Haber, D. A. and Li, E. (1999a) 'DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development', *Cell* 99(3): 247-57.
- Okano, M.**, Takebayashi, S., Okumura, K. and Li, E. (1999b) 'Assignment of cytosine-5 DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b to mouse chromosome bands 12A2-A3 and 2H1 by in situ hybridization', *Cytogenet Cell Genet* 86(3-4): 333-4.
- Oleszewski, M.**, Beer, S., Katich, S., Geiger, C., Zeller, Y., Rauch, U. and Altevogt, P. (1999) 'Integrin and neurocan binding to L1 involves distinct Ig domains', *J Biol Chem* 274(35): 24602-10.
- Onder, T. T.**, Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S. and Weinberg, R. A. (2008) 'Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways', *Cancer Res* 68(10): 3645-54.
- Otto, S. J.**, McCorkle, S. R., Hover, J., Conaco, C., Han, J. J., Impey, S., Yochum, G. S., Dunn, J. J., Goodman, R. H. and Mandel, G. (2007) 'A new binding motif for the transcriptional repressor REST uncovers large gene networks devoted to neuronal functions', *J Neurosci* 27(25): 6729-39.
- Packer, A. N.**, Xing, Y., Harper, S. Q., Jones, L. and Davidson, B. L. (2008) 'The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease', *J Neurosci* 28(53): 14341-6.
- Palm, K.**, Belluardo, N., Metsis, M. and Timmusk, T. (1998) 'Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene', *J Neurosci* 18(4): 1280-96.
- Palm, K.**, Metsis, M. and Timmusk, T. (1999) 'Neuron-specific splicing of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR is frequent in neuroblastomas and conserved in human, mouse and rat', *Brain Res Mol Brain Res* 72(1): 30-9.
- Pancook, J. D.**, Reisfeld, R. A., Varki, N., Vitiello, A., Fox, R. I. and Montgomery, A. M. (1997) 'Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin', *J Immunol* 158(9): 4413-21.
- Parisi, M. A.**, Kapur, R. P., Neilson, I., Hofstra, R. M., Holloway, L. W., Michaelis, R. C. and Leppig, K. A. (2002) 'Hydrocephalus and intestinal aganglionosis: is L1CAM a modifier gene in Hirschsprung disease?', *Am J Med Genet* 108(1): 51-6.
- Peinado, H.**, Ballestar, E., Esteller, M. and Cano, A. (2004) 'Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex', *Mol Cell Biol* 24(1): 306-19.
- Peinado, H.**, Olmeda, D. and Cano, A. (2007) 'Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?', *Nat Rev Cancer* 7(6): 415-28.
- Peinado, H.**, Quintanilla, M. and Cano, A. (2003) 'Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions', *J Biol Chem* 278(23): 21113-23.
- Perides, G.**, Safran, R. M., Downing, L. A. and Charness, M. E. (1994) 'Regulation of neural cell adhesion molecule and L1 by the transforming growth factor-beta superfamily. Selective effects of the bone morphogenetic proteins', *J Biol Chem* 269(1): 765-70.

- Person, A. D.**, Klewer, S. E. and Runyan, R. B. (2005) 'Cell biology of cardiac cushion development', *Int Rev Cytol* 243: 287-335.
- Pfeifer, M.**, Schirmer, U., Geismann, C., Schafer, H., Sebens, S. and Altevogt, P. (2010) 'L1CAM expression in endometrial carcinomas is regulated by usage of two different promoter regions', *BMC Mol Biol* 11: 64.
- Pradhan, S.**, Bacolla, A., Wells, R. D. and Roberts, R. J. (1999) 'Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation', *J Biol Chem* 274(46): 33002-10.
- Primiano, T.**, Baig, M., Maliyekkel, A., Chang, B. D., Fellars, S., Sadhu, J., Axenovich, S. A., Holzmayer, T. A. and Roninson, I. B. (2003) 'Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements', *Cancer Cell* 4(1): 41-53.
- Putzke, A. P.**, Ventura, A. P., Bailey, A. M., Akture, C., Opoku-Ansah, J., Celiktas, M., Hwang, M. S., Darling, D. S., Coleman, I. M., Nelson, P. S. et al. (2011) 'Metastatic progression of prostate cancer and e-cadherin regulation by zeb1 and SRC family kinases', *Am J Pathol* 179(1): 400-10.
- Radpour, R.**, Berekati, Z., Kohler, C., Schumacher, M. M., Grussenmeyer, T., Jenoe, P., Hartmann, N., Moes, S., Letzkus, M., Bitzer, J. et al. (2011) 'Integrated epigenetics of human breast cancer: synoptic investigation of targeted genes, microRNAs and proteins upon demethylation treatment', *PLoS One* 6(11): e27355.
- Raible, D. W.** (2006) 'Development of the neural crest: achieving specificity in regulatory pathways', *Curr Opin Cell Biol* 18(6): 698-703.
- Raynal, N. J.**, Si, J., Taby, R. F., Gharibyan, V., Ahmed, S., Jelinek, J., Estecio, M. R. and Issa, J. P. (2012) 'DNA methylation does not stably lock gene expression but instead serves as a molecular mark for gene silencing memory', *Cancer Res* 72(5): 1170-81.
- Reddy, B. Y.**, Greco, S. J., Patel, P. S., Trzaska, K. A. and Rameshwar, P. (2009) 'RE-1-silencing transcription factor shows tumor-suppressor functions and negatively regulates the oncogenic TAC1 in breast cancer cells', *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(11): 4408-13.
- Reid, R. A.** and Hemperly, J. J. (1992) 'Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of RNA', *J Mol Neurosci* 3(3): 127-35.
- Reidy, M.**, Zihlmann, P., Hubbell, J. A. and Hall, H. (2006) 'Activation of cell-survival transcription factor NFkappaB in L1Ig6-stimulated endothelial cells', *J Biomed Mater Res A* 77(3): 542-50.
- Reisman, D. N.**, Sciarrotta, J., Wang, W., Funkhouser, W. K. and Weissman, B. E. (2003) 'Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis', *Cancer Res* 63(3): 560-6.
- Rhee, I.**, Jair, K. W., Yen, R. W., Lengauer, C., Herman, J. G., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Baylin, S. B. and Schuebel, K. E. (2000) 'CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1', *Nature* 404(6781): 1003-7.
- Riedle, S.**, Kiefel, H., Gast, D., Bondong, S., Wolterink, S., Gutwein, P. and Altevogt, P. (2009) 'Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity', *Biochem J* 420(3): 391-402.
- Romano, L. A. and Runyan, R. B.** (2000) 'Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the de-

- veloping chicken heart', *Dev Biol* 223(1): 91-102.
- Roopra, A.**, Sharling, L., Wood, I. C., Briggs, T., Bachfischer, U., Paquette, A. J. and Buckley, N. J. (2000) 'Transcriptional repression by neuron-restrictive silencer factor is mediated via the Sin3-histone deacetylase complex', *Mol Cell Biol* 20(6): 2147-57.
- Rosario, M. and Birchmeier, W.** (2003) 'How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase', *Trends Cell Biol* 13(6): 328-35.
- Ruppert, M.**, Aigner, S., Hubbe, M., Yagita, H. and Altevogt, P. (1995) 'The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5', *J Cell Biol* 131(6 Pt 2): 1881-91.
- Saad, B.**, Constam, D. B., Ortmann, R., Moos, M., Fontana, A. and Schachner, M. (1991) 'Astrocyte-derived TGF-beta 2 and NGF differentially regulate neural recognition molecule expression by cultured astrocytes', *J Cell Biol* 115(2): 473-84.
- Sadoul, K.**, Sadoul, R., Faissner, A. and Schachner, M. (1988) 'Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1', *J Neurochem* 50(2): 510-21.
- Salvesen, H. B.**, MacDonald, N., Ryan, A., Jacobs, I. J., Lynch, E. D., Akslen, L. A. and Das, S. (2001) 'PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma', *Int J Cancer* 91(1): 22-6.
- Sarrio, D.**, Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G. and Palacios, J. (2008) 'Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype', *Cancer Res* 68(4): 989-97.
- Schafer, H.**, Dieckmann, C., Korniienko, O., Moldenhauer, G., Kiefel, H., Salnikow, A., Kruger, A., Altevogt, P. and Sebens, S. (2012a) 'Combined treatment of L1CAM antibodies and cytostatic drugs improve the therapeutic response of pancreatic and ovarian carcinoma', *Cancer Lett* 319(1): 66-82.
- Schafer, H.**, Geismann, C., Heneweer, C., Egberts, J. H., Korniienko, O., Kiefel, H., Moldenhauer, G., Bachem, M. G., Kalthoff, H., Altevogt, P. et al. (2012b) 'Myofibroblast-induced tumorigenicity of pancreatic ductal epithelial cells is L1CAM dependent', *Carcinogenesis* 33(1): 84-93.
- Schafer, H.**, Struck, B., Feldmann, E. M., Bergmann, F., Grage-Griebenow, E., Geismann, C., Ehlers, S., Altevogt, P. and Sebens, S. (2012c) 'TGF-beta1-dependent L1CAM expression has an essential role in macrophage-induced apoptosis resistance and cell migration of human intestinal epithelial cells', *Oncogene*.
- Scherer, M.**, Heller, M. and Schachner, M. (1992) 'Expression of the Neural Recognition Molecule L1 by Cultured Neural Cells is influenced by K⁺ and the Glutamate Receptor Agonist NMDA', *Eur J Neurosci* 4(6): 554-562.
- Schmalhofer, O.**, Spaderna, S. and Brabletz, T. (2008) 'Native promoter reporters validate transcriptional targets', *Methods Mol Biol* 468: 111-28.
- Schmid, R. S.**, Pruitt, W. M. and Maness, P. F. (2000) 'A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis', *J Neurosci* 20(11): 4177-88.
- Schneegans, T.**, Borgmeyer, U., Hentschke, M., Gronostajski, R. M., Schachner, M. and Tilling, T. (2009) 'Nuclear factor I-A represses expression of the cell adhesion molecule L1', *BMC Mol Biol* 10: 107.
- Schoenherr, C. J. and Anderson, D. J.** (1995) 'The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordi-

- nate repressor of multiple neuron-specific genes', *Science* 267(5202): 1360-3.
- Schroder, C.**, Schumacher, U., Fogel, M., Feuerhake, F., Muller, V., Wirtz, R. M., Altevogt, P., Krenkel, S., Janicke, F. and Milde-Langosch, K. (2009) 'Expression and prognostic value of L1-CAM in breast cancer', *Oncol Rep* 22(5): 1109-17.
- Schurmann, G.**, Haspel, J., Grumet, M. and Erickson, H. P. (2001) 'Cell adhesion molecule L1 in folded (horseshoe) and extended conformations', *Mol Biol Cell* 12(6): 1765-73.
- Sebens Muerkoster, S.**, Kotteritzsch, J., Geismann, C., Gast, D., Kruse, M. L., Altevogt, P., Folsch, U. R. and Schafer, H. (2009) 'alpha5-integrin is crucial for L1CAM-mediated chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma', *Int J Oncol* 34(1): 243-53.
- Sebens Muerkoster, S.**, Werbing, V., Sipos, B., Debus, M. A., Witt, M., Grossmann, M., Leisner, D., Kotteritzsch, J., Kappes, H., Kloppel, G. 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(19): 2759-68.
- Sefton, M.**, Sanchez, S. and Nieto, M. A. (1998) 'Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo', *Development* 125(16): 3111-21.
- Seilheimer, B.** and Schachner, M. (1987) 'Regulation of neural cell adhesion molecule expression on cultured mouse Schwann cells by nerve growth factor', *EMBO J* 6(6): 1611-6.
- Seki, K.**, Fujimori, T., Savagner, P., Hata, A., Aikawa, T., Ogata, N., Nabeshima, Y. and Kaechoong, L. (2003) 'Mouse Snail family transcription repressors regulate chondrocyte, extracellular matrix, type II collagen, and aggrecan', *J Biol Chem* 278(43): 41862-70.
- Shang, Y.** (2006) 'Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis', *Nat Rev Cancer* 6(5): 360-8.
- Shi, Y.**, Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A. and Casero, R. A. (2004) 'Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1', *Cell* 119(7): 941-53.
- Shi, Y.**, Sawada, J., Sui, G., Affar el, B., Whetstine, J. R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M. P. and Nakatani, Y. (2003) 'Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex', *Nature* 422(6933): 735-8.
- Shih, J. Y.**, Tsai, M. F., Chang, T. H., Chang, Y. L., Yuan, A., Yu, C. J., Lin, S. B., Liou, G. Y., Lee, M. L., Chen, J. J. et al. (2005) 'Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma', *Clin Cancer Res* 11(22): 8070-8.
- Shimojo, M.** (2008) 'Huntingtin regulates RE1-silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) nuclear trafficking indirectly through a complex with REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP) and dynactin p150 Glued', *J Biol Chem* 283(50): 34880-6.
- Shimojo, M.** and Hersh, L. B. (2003) 'REST/NRSF-interacting LIM domain protein, a putative nuclear translocation receptor', *Mol Cell Biol* 23(24): 9025-31.
- Shimojo, M.**, Lee, J. H. and Hersh, L. B. (2001) 'Role of zinc finger domains of the transcription factor neuron-restrictive silencer factor/repressor element-1 silencing transcription factor in DNA binding and nuclear localization', *J Biol Chem* 276(16): 13121-6.
- Shutman, M.**, Levina, E., Ohouo, P., Baig, M. and Roninson, I. B. (2006) 'Cell adhesion molecule L1

- disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells', *Cancer Res* 66(23): 11370-80.
- Silletti, S.**, Mei, F., Sheppard, D. and Montgomery, A. M. (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(7): 1485-502.
- Silletti, S.**, Yebra, M., Perez, B., Cirulli, V., McMahon, M. and Montgomery, A. M. (2004) 'Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion', *J Biol Chem* 279(28): 28880-8.
- Singh, M.**, Spoelstra, N. S., Jean, A., Howe, E., Torkko, K. C., Clark, H. R., Darling, D. S., Shroyer, K. R., Horwitz, K. B., Broaddus, R. R. et al. (2008) 'ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease', *Mod Pathol* 21(7): 912-23.
- Sivridis, E.** and Giatromanolaki, A. (2011) 'The pathogenesis of endometrial carcinomas at menopause: facts and figures', *J Clin Pathol* 64(7): 553-60.
- Slomovitz, B. M.**, Burke, T. W., Eifel, P. J., Ramondetta, L. M., Silva, E. G., Jhingran, A., Oh, J. C., Atkinson, E. N., Broaddus, R. R., Gershenson, D. M. et al. (2003) 'Uterine papillary serous carcinoma (UPSC): a single institution review of 129 cases', *Gynecol Oncol* 91(3): 463-9.
- Sonderegger, P.** and Rathjen, F. G. (1992) 'Regulation of axonal growth in the vertebrate nervous system by interactions between glycoproteins belonging to two subgroups of the immunoglobulin superfamily', *J Cell Biol* 119(6): 1387-94.
- Spagnoli, F. M.**, Cicchini, C., Tripodi, M. and Weiss, M. C. (2000) 'Inhibition of MMH (Met murine hepatocyte) cell differentiation by TGF(beta) is abrogated by pre-treatment with the heritable differentiation effector FGF1', *J Cell Sci* 113 (Pt 20): 3639-47.
- Stemmer, V.**, de Craene, B., Berx, G. and Behrens, J. (2008) 'Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin', *Oncogene* 27(37): 5075-80.
- Stoeck, A.**, Gast, D., Sanderson, M. P., Issa, Y., Gutwein, P. and Altevogt, P. (2007) 'L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells', *Gynecol Oncol* 104(2): 461-9.
- Stoeck, A.**, Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M. P., Runz, S., Le Naour, F., Gutwein, P., Ludwig, A., Rubinstein, E. and Altevogt, P. (2006) 'A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44', *Biochem J* 393(Pt 3): 609-18.
- Strahl, B. D.** and Allis, C. D. (2000) 'The language of covalent histone modifications', *Nature* 403(6765): 41-5.
- Su, X.**, Kameoka, S., Lentz, S. and Majumder, S. (2004) 'Activation of REST/NRSF target genes in neural stem cells is sufficient to cause neuronal differentiation', *Mol Cell Biol* 24(18): 8018-25.
- Suzuki, M. M.**, Kerr, A. R., De Sousa, D. and Bird, A. (2007) 'CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome', *Genome Res* 17(5): 625-31.
- Tabuchi, A.**, Yamada, T., Sasagawa, S., Naruse, Y., Mori, N. and Tsuda, M. (2002) 'REST4-mediated modulation of REST/NRSF-silencing function during BDNF gene promoter activation', *Biochem Biophys Res Commun* 290(1): 415-20.

- Takeda, Y.**, Asou, H., Murakami, Y., Miura, M., Kobayashi, M. and Uyemura, K. (1996) 'A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis', *J Neurochem* 66(6): 2338-49.
- Tao, M. H.** and Freudenheim, J. L. (2010) 'DNA methylation in endometrial cancer', *Epigenetics* 5(6): 491-8.
- Taylor, P.**, Fangusaro, J., Rajaram, V., Goldman, S., Helenowski, I. B., Macdonald, T., Hasselblatt, M., Riedemann, L., Laureano, A., Cooper, L. et al. (2012) 'REST Is a Novel Prognostic Factor and Therapeutic Target for Medulloblastoma', *Mol Cancer Ther* 11(8): 1713-23.
- Thelen, K.**, Kedar, V., Panicker, A. K., Schmid, R. S., Midkiff, B. R. and Maness, P. F. (2002) 'The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins', *J Neurosci* 22(12): 4918-31.
- Thiery, J. P.** (2002) 'Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression', *Nat Rev Cancer* 2(6): 442-54.
- Thiery, J. P.**, Acloque, H., Huang, R. Y. and Nieto, M. A. (2009) 'Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease', *Cell* 139(5): 871-90.
- Thiery, J. P.** and Sleeman, J. P. (2006) 'Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions', *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(2): 131-42.
- Thies, A.**, Schachner, M., Moll, I., Berger, J., Schulze, H. J., Brunner, G. and Schumacher, U. (2002) 'Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma', *Eur J Cancer* 38(13): 1708-16.
- Tischler, V.**, Pfeifer, M., Hausladen, S., Schirmer, U., Bonde, A. K., Kristiansen, G., Sos, M. L., Weder, W., Moch, H., Altevogt, P. et al. (2011) 'L1CAM protein expression is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer', *Mol Cancer* 10: 127.
- Treubert, U.** and Brummendorf, T. (1998) 'Functional cooperation of beta1-integrins and members of the Ig superfamily in neurite outgrowth induction', *J Neurosci* 18(5): 1795-805.
- Tripathi, M. K.**, Misra, S. and Chaudhuri, G. (2005a) 'Negative regulation of the expressions of cytokeratins 8 and 19 by SLUG repressor protein in human breast cells', *Biochem Biophys Res Commun* 329(2): 508-15.
- Tripathi, M. K.**, Misra, S., Khedkar, S. V., Hamilton, N., Irvin-Wilson, C., Sharan, C., Sealy, L. and Chaudhuri, G. (2005b) 'Regulation of BRCA2 gene expression by the SLUG repressor protein in human breast cells', *J Biol Chem* 280(17): 17163-71.
- Tsutsumi, S.**, Morohashi, S., Kudo, Y., Akasaka, H., Ogasawara, H., Ono, M., Takasugi, K., Ishido, K., Hakamada, K. and Kijima, H. (2011) 'L1 Cell adhesion molecule (L1CAM) expression at the cancer invasive front is a novel prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma', *J Surg Oncol* 103(7): 669-73.
- Tsuzuki, T.**, Izumoto, S., Ohnishi, T., Hiraga, S., Arita, N. and Hayakawa, T. (1998) 'Neural cell adhesion molecule L1 in gliomas: correlation with TGF-beta and p53', *J Clin Pathol* 51(1): 13-7.
- Turner, F. E.**, Broad, S., Khanim, F. L., Jeanes, A., Talma, S., Hughes, S., Tselepis, C. and Hotchin, N. A. (2006) 'Slug regulates integrin expression and cell proliferation in human epidermal keratinocytes', *J Biol Chem* 281(30): 21321-31.

- Uchikado, Y.**, Natsugoe, S., Okumura, H., Setoyama, T., Matsumoto, M., Ishigami, S. and Aikou, T. (2005) 'Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma', *Clin Cancer Res* 11(3): 1174-80.
- Vanhaecke, T.**, Papeleu, P., Elaut, G. and Rogiers, V. (2004) 'Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view', *Curr Med Chem* 11(12): 1629-43.
- Viebahn, C.** (1995) 'Epithelio-mesenchymal transformation during formation of the mesoderm in the mammalian embryo', *Acta Anat (Basel)* 154(1): 79-97.
- Vits, L.**, Van Camp, G., Coucke, P., Franssen, E., De Boulle, K., Reyniers, E., Korn, B., Poustka, A., Wilson, G., Schrandt-Stumpel, C. et al. (1994) 'MASA syndrome is due to mutations in the neural cell adhesion gene L1CAM', *Nat Genet* 7(3): 408-13.
- Vogt, M.**, Munding, J., Gruner, M., Liffers, S. T., Verdoodt, B., Hauk, J., Steinstraesser, L., Tannapfel, A. and Hermeking, H. (2011) 'Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas', *Virchows Arch* 458(3): 313-22.
- von Burstin, J.**, Eser, S., Paul, M. C., Seidler, B., Brandl, M., Messer, M., von Werder, A., Schmidt, A., Mages, J., Pagel, P. et al. (2009) 'E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex', *Gastroenterology* 137(1): 361-71, 371 e1-5.
- von Rahden, B. H.**, Stein, H. J., Feith, M., Puhlinger, F., Theisen, J., Siewert, J. R. and Sarbia, M. (2006) 'Overexpression of TGF-beta1 in esophageal (Barrett's) adenocarcinoma is associated with advanced stage of disease and poor prognosis', *Mol Carcinog* 45(10): 786-94.
- Vos, Y. J.**, de Walle, H. E., Bos, K. K., Stegeman, J. A., Ten Berge, A. M., Bruining, M., van Maarle, M. C., Elting, M. W., den Hollander, N. S., Hamel, B. et al. (2010) 'Genotype-phenotype correlations in L1 syndrome: a guide for genetic counselling and mutation analysis', *J Med Genet* 47(3): 169-75.
- Wachowiak, R.**, Fiegel, H. C., Kaifi, J. T., Quaas, A., Krickhahn, A., Schurr, P. G., Erttmann, R., Schachner, M., Kluth, D., Sauter, G. et al. (2007) 'L1 is associated with favorable outcome in neuroblastomas in contrast to adult tumors', *Ann Surg Oncol* 14(12): 3575-80.
- Wagoner, M. P.**, Gunsalus, K. T., Schoenike, B., Richardson, A. L., Friedl, A. and Roopra, A. (2010) 'The transcription factor REST is lost in aggressive breast cancer', *PLoS Genet* 6(6): e1000979.
- Wang, S. L.**, Kutsche, M., DiSciullo, G., Schachner, M. and Bogen, S. A. (2000) 'Selective malformation of the splenic white pulp border in L1-deficient mice', *J Immunol* 165(5): 2465-73.
- Wang, S. P.**, Wang, W. L., Chang, Y. L., Wu, C. T., Chao, Y. C., Kao, S. H., Yuan, A., Lin, C. W., Yang, S. C., Chan, W. K. et al. (2009) 'p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug', *Nat Cell Biol* 11(6): 694-704.
- Wang, Z.**, Wade, P., Mandell, K. J., Akyildiz, A., Parkos, C. A., Mrsny, R. J. and Nusrat, A. (2007) 'Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug', *Oncogene* 26(8): 1222-30.
- Watanabe, H.**, Mizutani, T., Haraguchi, T., Yamamichi, N., Minoguchi, S., Yamamichi-Nishina, M., Mori, N., Kameda, T., Sugiyama, T. and Iba, H. (2006) 'SWI/SNF complex is essential for NRSF-mediated suppression of neuronal genes in human nonsmall cell lung carcinoma cell lines', *Oncogene* 25(3): 470-9.

- Watanabe, Y.**, Kameoka, S., Gopalakrishnan, V., Aldape, K. D., Pan, Z. Z., Lang, F. F. and Majumder, S. (2004) 'Conversion of myoblasts to physiologically active neuronal phenotype', *Genes Dev* 18(8): 889-900.
- Weber, M.** and Schubeler, D. (2007) 'Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark', *Curr Opin Cell Biol* 19(3): 273-80.
- Weidle, U. H.**, Eggle, D. and Klostermann, S. (2009) 'L1-CAM as a target for treatment of cancer with monoclonal antibodies', *Anticancer Res* 29(12): 4919-31.
- Weidner, N.**, Blesch, A., Grill, R. J. and Tuszynski, M. H. (1999) 'Nerve growth factor-hypersecreting Schwann cell grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate central nervous system axons in a phenotypically appropriate manner that correlates with expression of L1', *J Comp Neurol* 413(4): 495-506.
- Westbrook, T. F.**, Hu, G., Ang, X. L., Mulligan, P., Pavlova, N. N., Liang, A., Leng, Y., Maehr, R., Shi, Y., Harper, J. W. et al. (2008) 'SCFbeta-TRCP controls oncogenic transformation and neural differentiation through REST degradation', *Nature* 452(7185): 370-4.
- Westbrook, T. F.**, Martin, E. S., Schlabach, M. R., Leng, Y., Liang, A. C., Feng, B., Zhao, J. J., Roberts, T. M., Mandel, G., Hannon, G. J. et al. (2005) 'A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST', *Cell* 121(6): 837-48.
- Whittard, J. D.**, Sakurai, T., Cassella, M. R., Gazdoui, M. and Felsenfeld, D. P. (2006) 'MAP kinase pathway-dependent phosphorylation of the L1-CAM ankyrin binding site regulates neuronal growth', *Mol Biol Cell* 17(6): 2696-706.
- Wolff, J. M.**, Frank, R., Mujoo, K., Spiro, R. C., Reisfeld, R. A. and Rathjen, F. G. (1988) 'A human brain glycoprotein related to the mouse cell adhesion molecule L1', *J Biol Chem* 263(24): 11943-7.
- Wolterink, S.**, Moldenhauer, G., Fogel, M., Kiefel, H., Pfeifer, M., Luttgau, S., Gouveia, R., Costa, J., Endell, J., Moebius, U. et al. (2010) 'Therapeutic antibodies to human L1CAM: functional characterization and application in a mouse model for ovarian carcinoma', *Cancer Res* 70(6): 2504-15.
- Workman, J. L.** and Kingston, R. E. (1998) 'Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation', *Annu Rev Biochem* 67: 545-79.
- Wu, H.**, Chen, Y., Liang, J., Shi, B., Wu, G., Zhang, Y., Wang, D., Li, R., Yi, X., Zhang, H. et al. (2005a) 'Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis', *Nature* 438(7070): 981-7.
- Wu, J.**, Yang, J. and Klein, P. S. (2005b) 'Neural crest induction by the canonical Wnt pathway can be dissociated from anterior-posterior neural patterning in *Xenopus*', *Dev Biol* 279(1): 220-32.
- Xiong, Y.**, Dowdy, S. C., Xue, A., Shujuan, J., Eberhardt, N. L., Podratz, K. C. and Jiang, S. W. (2005) 'Opposite alterations of DNA methyltransferase gene expression in endometrioid and serous endometrial cancers', *Gynecol Oncol* 96(3): 601-9.
- Yamasaki, M.**, Thompson, P. and Lemmon, V. (1997) 'CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease', *Neuropediatrics* 28(3): 175-8.
- Yan, H.**, Choi, A. J., Lee, B. H. and Ting, A. H. (2011) 'Identification and functional analysis of epigenetically silenced microRNAs in colorectal cancer cells', *PLoS One* 6(6): e20628.

- Yang, J.** and Weinberg, R. A. (2008) 'Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis', *Dev Cell* 14(6): 818-29.
- Yang, M.**, Adla, S., Temburni, M. K., Patel, V. P., Lagow, E. L., Brady, O. A., Tian, J., Boulos, M. I. and Galileo, D. S. (2009) 'Stimulation of glioma cell motility by expression, proteolysis, and release of the L1 neural cell recognition molecule', *Cancer Cell Int* 9: 27.
- Yang, Y.**, Wang, L. L., Li, Y. H., Gao, X. N., Liu, Y. and Yu, L. (2012) 'Effect of CpG island methylation on microRNA expression in the k-562 cell line', *Biochem Genet* 50(1-2): 122-34.
- Yi, R.**, Qin, Y., Macara, I. G. and Cullen, B. R. (2003) 'Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs', *Genes Dev* 17(24): 3011-6.
- Yi, T. Z.**, Guo, J., Zhou, L., Chen, X., Mi, R. R., Qu, Q. X., Zheng, J. H. and Zhai, L. (2011) 'Prognostic value of E-cadherin expression and CDH1 promoter methylation in patients with endometrial carcinoma', *Cancer Invest* 29(1): 86-92.
- Yip, P. M. and Siu, C. H.** (2001) 'PC12 cells utilize the homophilic binding site of L1 for cell-cell adhesion but L1-alpha5beta3 interaction for neurite outgrowth', *J Neurochem* 76(5): 1552-64.
- Yip, P. M.**, Zhao, X., Montgomery, A. M. and Siu, C. H. (1998) 'The Arg-Gly-Asp motif in the cell adhesion molecule L1 promotes neurite outgrowth via interaction with the alpha5beta3 integrin', *Mol Biol Cell* 9(2): 277-90.
- Zecchini, S.**, Bianchi, M., Colombo, N., Fasani, R., Goisis, G., Casadio, C., Viale, G., Liu, J., Herlyn, M., Godwin, A. K. et al. (2008) 'The differential role of L1 in ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelium', *Cancer Res* 68(4): 1110-8.
- Zhang, K.**, Chen, D., Jiao, X., Zhang, S., Liu, X., Cao, J., Wu, L. and Wang, D. (2011a) 'Slug enhances invasion ability of pancreatic cancer cells through upregulation of matrix metalloproteinase-9 and actin cytoskeleton remodeling', *Lab Invest* 91(3): 426-38.
- Zhang, K.**, Chen, D., Wang, X., Zhang, S., Wang, J., Gao, Y. and Yan, B. (2011b) 'RNA Interference Targeting Slug Increases Cholangiocarcinoma Cell Sensitivity to Cisplatin via Upregulating PUMA', *Int J Mol Sci* 12(1): 385-400.
- Zhang, K.**, Zhang, B., Lu, Y., Sun, C., Zhao, W., Jiao, X., Hu, J., Mu, P., Lu, H. and Zhou, C. (2011c) 'Slug inhibition upregulates radiation-induced PUMA activity leading to apoptosis in cholangiocarcinomas', *Med Oncol* 28 Suppl 1: S301-9.
- Zhao, X.** and Siu, C. H. (1995) 'Colocalization of the homophilic binding site and the neuritogenic activity of the cell adhesion molecule L1 to its second Ig-like domain', *J Biol Chem* 270(49): 29413-21.
- Zhou, B. P.**, Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M. and Hung, M. C. (2004) 'Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition', *Nat Cell Biol* 6(10): 931-40.
- Zhou, H. Y.** and Wong, A. S. (2006) 'Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells', *Endocrinology* 147(5): 2557-66.
- Zuccato, C.**, Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Timmusk, T. et al. (2003) 'Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes', *Nat Genet* 35(1): 76-83.

