

**Untersuchungen zur Rolle von L1CAM im Retinoblastom:
Expression, Funktion, Prozessierung und Signalwege**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Oliver Dräger, geb. Scheiner
aus Detmold

Datum der Abgabe Mai 2021

In Gedenken an meinen Großvater Rudolf Uhlig.

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/74917

URN: urn:nbn:de:hbz:464-20211115-093728-5

Alle Rechte vorbehalten.

"Education is not the learning of facts, but the training of the mind to think."

-Albert Einstein-

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie II, Fachbereich Neuroanatomie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Frau Professorin Dr. rer. nat. Nicole Dünker

2. Gutachter: Frau Apl. Professorin Dr. rer nat. Diana Klein

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Herr Professor Dr. med. Jürgen C. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2021

Publikationen

Busch, M., Klein, S., Große-Kreul, J., **Scheiner, O.**, Metz, K.A., Stephan, H., Dünker, N. (2019) p53, miR-34a and EMP1 — Newly Identified Targets of TFF3 Signaling in Y79 Retinoblastoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(17), 4129; <https://doi.org/10.3390/ijms20174129>

Teile dieser Doktorarbeit sind veröffentlicht:

Dräger, O., Metz, K., Busch, M. and Dünker, N. (2021) Role of L1CAM in retinoblastoma tumorigenesis: identification of novel therapeutic targets. *Mol Oncol.*, <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13054>

Tagungsbeiträge

Scheiner, O., Stephan, H., Dünker, N. (2018) The role of L1CAM in the development of chemoresistance in human retinoblastoma cell lines. Präsentation im Rahmen des BIOME-Retreats 2018 in Köln.

Scheiner, O, Busch, M., Stephan, H., Dünker, N. (2018) L1CAM knockdown influences growth behavior and chemoresistance of the human retinoblastoma cell line WERI-Rb1. Posterpräsentation im Rahmen des 17. Tag der Forschung der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen.

Dräger, O, Busch, M., Stephan, H., Dünker, N. (2019) The neuronal cell adhesion molecule L1CAM - a novel target for human retinoblastoma therapy? Posterpräsentation im Rahmen der 114. Anatomientagung in Würzburg.

Dräger, O, Busch, M., Stephan, H., Dünker, N. (2019) The neuronal cell adhesion molecule L1CAM offers new strategies for human retinoblastoma therapy. Präsentation im Rahmen des BIOME-Retreats 2019 in Bonn.

Dräger, O, Busch, M., Stephan, H., Dünker, N. (2019) L1CAM – New player in fighting retinoblastoma? Posterpräsentation im Rahmen des 18. Tag der Forschung der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen.

Dräger, O, Busch, M., Stephan, H., Dünker, N. (2020) The neuronal Cell Adhesion Molecule L1CAM - A Novel Target for Retinoblastoma Therapy? Präsentation im Rahmen des "1st BIOME Virtual Retreat - Cellular and Molecular Immunology/Infectious Diseases/Tumour and Signalling".

Dräger, O, Busch, M., Stephan, H., Dünker, N. (2020) L1CAM – New player in fighting retinoblastoma? Posterpräsentation im Rahmen des 19. Tag der Forschung der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 <i>Das Retinoblastom</i>	1
1.2 <i>Das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1CAM</i>	6
1.2.1 Struktur und biologische Funktion.....	6
1.2.2 Pathologischer Bezug	9
1.3 <i>Die Sheddasen der ADAM Familie</i>	10
1.3.1 Prozessierung von L1CAM durch Sheddasen der ADAM Familie.....	10
1.3.2 Struktur und biologische Funktion.....	12
1.4 <i>Die Rolle von microRNAs in Krebserkrankungen und bei der Expression von L1CAM</i>	13
2 Zielsetzung und Fragestellung	15
3 Material	17
3.1 <i>Gewebeproben</i>	17
3.2 <i>Zelllinien und Zellkultur</i>	17
3.3 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	18
3.4 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	20
3.5 <i>Kommerzielle Kits</i>	21
3.6 <i>Antikörper</i>	22
3.6.1 Primärantikörper	22
3.6.2 Sekundärantikörper.....	22
3.7 <i>Oligonukleotidprimer</i>	22
3.7.1 Primer für Klonierung	22
3.7.2 Primer für die quantitative Realtime Analyse	23
3.7.3 Primer für die quantitative miRNA Realtime Analyse.....	23
3.8 <i>TaqMan® Gene Expression Assays</i>	23
3.9 <i>Restriktionsenzyme</i>	23
3.10 <i>Vektoren</i>	24
3.10.1 Vektoren für die transiente Expression	24
3.10.2 Vektoren für die stabile Expression.....	24
3.11 <i>Bakterienstämme und Glycerinstocks</i>	25
3.12 <i>Zellkulturmedium</i>	25
3.13 <i>Bakterienmedien</i>	25
3.14 <i>Puffer und Lösungen</i>	26

3.15	Geräte.....	27
3.16	Software und Online Anwendungen.....	28
4	Methoden.....	29
4.1	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	29
4.1.1	Isolation von Nukleinsäuren.....	29
4.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
4.1.3	Polymerasekettenreaktion	29
4.1.4	Agarosegelelektrophorese	30
4.1.5	Restriktionsverdau	31
4.1.6	Ligation	31
4.1.7	Bakterientransformation.....	32
4.1.8	Bakterienkulturen.....	32
4.1.9	Isolation von pDNA	33
4.1.10	Klonierung der Plasmidkonstrukte zur L1CAM Überexpression	33
4.1.11	Klonierung der Plasmidkonstrukte zur miR-346 Überexpression.....	34
4.1.12	Klonierung der Plasmidkonstrukte zur miR-346 Bindestudie	35
4.1.13	Sequenzierung	36
4.1.14	Reverse Transkription	36
4.1.15	Quantitative <i>Real-time</i> -PCR Analyse	36
4.2	<i>Proteinbiochemische Methoden.....</i>	39
4.2.1	Proteinisolation aus Zelllysaten	39
4.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	39
4.2.3	Vorbereitung von Proteinproben für die SDS-PAGE	40
4.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	40
4.2.5	Western Blot und Immundetektion.....	41
4.2.6	Proteom Arrays	42
4.3	<i>Transfektion und Transduktion von Zellen.....</i>	43
4.3.1	Kultivierung der Zelllinien.....	43
4.3.2	Subkultivierung	44
4.3.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	44
4.3.4	Zellzahlbestimmung	44
4.3.5	Transiente Transfektion	45
4.3.6	Herstellung lentiviraler Partikel	46
4.3.7	Lentivirale Transduktion.....	47
4.4	<i>Funktionelle in vitro Analysen.....</i>	48
4.4.1	Zellviabilitätsmessung.....	48
4.4.2	4',6-Diamidin-Phenylindol-Zelltotassay.....	49
4.4.3	5-Bromo-2'-desoxyuridine Zellproliferationsassay.....	49
4.4.4	Wachstumskinetik	50
4.4.5	Colony Formation Assay.....	50
4.4.6	Soft Agarose Assay	51
4.4.7	Caspase Glo-3/7-Assay.....	52
4.4.8	Behandlung von sensitiven Retinoblastomzellen mit Chemotherapeutika 52	
4.4.9	Behandlung von Retinoblastomzellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat und ADAM Inhibitoren.....	52
4.4.10	miR-346 Bindestudie	53
4.5	<i>In vivo Studien.....</i>	54

4.5.1	Tumorbildung <i>in vivo</i>	55
4.5.2	<i>In vivo</i> Metastasen Modell	56
4.5.3	<i>Whole Mount</i> - Färbung von CAM Gefäßen	57
4.6	<i>Statistik</i>	58
5	Ergebnisse	59
5.1	<i>Charakterisierung von L1CAM im Retinoblastom</i>	59
5.1.1	Endogene L1CAM Expression in Retinoblastomzelllinien	59
5.2	<i>Expression von L1CAM in Patientenproben</i>	60
5.3	<i>Die Rolle von L1CAM in Retinoblastomzelllinien</i>	61
5.3.1	Etablierung eines stabilen <i>Knockdowns</i> von L1CAM in RB355 und WERI-Rb1 Zellen	62
5.3.2	Einfluss eines stabilen L1CAM <i>Knockdowns</i> auf das Zellwachstum, Proliferation, Apoptose, Zellviabilität und Koloniebildung <i>in vitro</i>	64
5.3.3	Effekte des L1CAM <i>Knockdowns</i> auf die Tumorbildung und Tumorzellmigration <i>in vivo</i>	66
5.3.4	Etablierung einer transienten Überexpression von L1CAM in Rbl-30 und RB247 Zellen	70
5.3.5	Effekte der L1CAM Überexpression auf das Zellwachstum, die Zellviabilität, der Proliferations- und Apoptoserate sowie der Koloniebildungskapazität <i>in vitro</i>	72
5.3.6	Effekte stabiler L1CAM Überexpression auf Zellviabilität, Tumorbildung und Migration von RB247 Zellen	74
5.4	<i>Untersuchung von L1CAM regulierten Genen</i>	76
5.4.1	Identifikation möglicher L1CAM Zielgene mittels Proteom Array Analysen	76
5.4.2	Untersuchung der Expression von L1CAM Zielgenen	80
5.4.3	L1CAM und Epitheliale-Mesenchymale-Transition	82
5.5	<i>Die Rolle von L1CAM bei der Entwicklung von Chemotherapieresistenzen</i>	84
5.5.1	Einfluss des L1CAM <i>Knockdowns</i> und der L1CAM Überexpression auf die Chemosensitivität von Retinoblastomzellen	85
5.5.2	Effekte des L1CAM <i>Knockdowns</i> auf Etoposid-resistente Retinoblastomzellen	87
5.6	<i>Die Rolle der Sheddases ADAM10 und ADAM17 im Retinoblastom</i>	91
5.6.1	ADAM10 und ADAM17 Expression in humanen Retinoblastomzelllinien	91
5.6.2	Aktivierung der Sheddase Aktivität durch Phorbol-12-myristat-13-acetat	93
5.6.3	Untersuchung der Prozessierung von L1CAM durch ADAM10 und ADAM17	94
5.6.4	Einfluss der Sheddase Inhibitoren auf die Zellviabilität der humanen RB-Zelllinien RB355 und Y79	96
5.7	<i>Untersuchung der Expression und der Rolle L1CAM-assoziiertes microRNAs in humanen Retinoblastomzellen</i>	98
5.7.1	Expression von L1CAM-regulierenden microRNAs in Retinoblastomzellen	98
5.7.2	Einfluss der miR-146a-5p auf die L1CAM Expression	101
5.7.3	Untersuchung der Bindung der miR-346 in der 3'-UTR von L1CAM	102

6	Diskussion	105
6.1	<i>Die Rolle von L1CAM im Retinoblastom</i>	105
6.3	<i>Die Rolle von L1CAM bei der Entstehung von Chemotherapieresistenzen</i> <i>119</i>	
6.4	<i>ADAM10 und ADAM17 vermittelte Prozessierung von L1CAM</i>	121
6.5	<i>L1CAM-assoziierte miRNAs</i>	126
6.5.1	Expression L1CAM-assoziiierter miRNAs	126
6.5.2	Regulation der L1CAM Expression durch miR-146a-5p	129
6.5.3	Bindung der miR-346 an die 3'-UTR von L1CAM	130
7	Zusammenfassung	132
8	Abstract	134
	Literaturverzeichnis	135
	Appendix	158
	Danksagung	161
	Eidesstattliche Erklärung	162

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
CAM	Chorioallantoismembran
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Chk-2	Serin/Threonin-Kinase
cm ²	Quadratcentimeter
C _T	<i>Threshold cycle</i>
ctr	<i>control</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAPT	(2S)-N-[(3,5-Difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-2-phenyl]glycine 1,1-dimethylethyl ester
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	<i>epidermal growth factor (receptor)</i>
EMT	<i>epidermal-mesenchymal transition</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
<i>Erk</i>	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
<i>et al.</i>	<i>Et alteri</i>
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FGF(R)	<i>fibroblast growth factor (receptor)</i>
FN	Fibronektin
<i>For</i>	<i>Forward</i>
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitation

G	Guanin
hGAPDH	humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>green-fluorescent protein</i>
GFR	<i>growth factor receptor</i>
h	Stunde
HDAC	Histondeacetylase
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
hrGFP	<i>humanized Renilla reniformis green fluorescent protein</i>
HRP	<i>horseraddish peroxidase</i>
IAC	intra-arterielle Chemotherapie
ICD	intrazelluläre Domäne
IF	Immunfluoeszenz
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
Lyn	Thyrosinkinase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
µM	Mikomolar
NFκB	<i>light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
MAPK	<i>mitogen-activated proteine kinase</i>
MDR	<i>multi-drug resistance</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ns	nicht signifikant
N-terminal	Amino-terminal
PAGE	Polyachrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RAF	serine/threonine-specific protein kinase
RAS	<i>Rat sarcoma</i> , G-Protein
RB	Retinoblastom
RB1/RB1	Retinoblastomprotein/ <i>Retinoblastomgen</i>
<i>Rev</i>	<i>Reverse</i>
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
<i>rcf</i>	<i>relative centrifugal force</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RQ	<i>relative quantification</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
s	Sekunde
S	Serin
SEM	<i>standard error of means</i>
Src	<i>proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T	Thymin/Threonin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF(R)	<i>transforming growth factor (receptor)</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TOPO	Topoisomerase
U	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEC	Vincristin, Etoposid, Carboplatin
WB	Western Blot
WNK1	<i>lysine deficient protein kinase 1</i>
WST-1	<i>Water-soluble tetrazolium-1</i>
Y	Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinische Eigenschaften des Retinoblastoms.	4
Abbildung 2: L1CAM Struktur und Schnittstellen.	7
Abbildung 3: Proteolytische Abspaltung der L1CAM Ektodomäne und nukleäre Translokalisierung der intrazellulären L1CAM Domäne.	11
Abbildung 4: Darstellung einer Ponceaufärbung von Proben aus dem Überstand von RB Zellkulturen.	41
Abbildung 5: Schematische Übersicht über das Chorioallantoismembran (CAM) - Modell. Abbildung modifiziert nach (Dünker & Jendrossek, 2019)	55
Abbildung 6: Endogene L1CAM Expression in gesunder humaner Retina und Retinoblastomzelllinien.	60
Abbildung 7: Vergleich der L1CAM Expression in Retinoblastomproben von Patienten nach Eukleation ohne (unbehandelt) und nach einer Chemotherapie (behandelt) im Vergleich zur Expression in humanem Retinagewebe.	61
Abbildung 8: Ermittlung der L1CAM Knockdown Effizienz nach stabiler, lentiviraler Transduktion von <i>small hairpin</i> RNA Klonen.	63
Abbildung 9: Verifizierung des stabilen, lentiviralen L1CAM Knockdowns in RB355 und WERI-Rb1 Zellen.	63
Abbildung 10: Einfluss des stabilen L1CAM Knockdowns auf das Zellwachstum, die Zellviabilität, die Proliferations- sowie der Apoptoserate von RB355 und WERI-Rb1 Zellen.	64
Abbildung 11: Einfluss des L1CAM Knockdowns auf die kontaktabhängige Koloniebildung im <i>Colony Formation Assay</i>	65
Abbildung 12: Einfluss des L1CAM Knockdowns auf die kontaktunabhängige Koloniebildung im <i>Soft Agarose Assay</i>	66
Abbildung 13: Einfluss des L1CAM Knockdowns in RB355 und WERI-Rb1 Zellen auf die Tumorbildung <i>in vivo</i>	67
Abbildung 14: Migration von GFP-markierten RB355-GFP und WERI-GFP Zellen in das untere CAM Gewebe.	69
Abbildung 16: Verifizierung der transienten Überexpression von L1CAM in Rbl-30 und RB247 Zellen.	71
Abbildung 17: Einfluss der Überexpression von L1CAM auf das Zellwachstum, die Zellviabilität, die Proliferations- sowie die Apoptoserate von Rbl-30 und RB247 Zellen.	72
Abbildung 18: Einfluss der L1CAM Überexpression auf die kontaktabhängige Koloniebildung im <i>Colony Formation Assay</i>	73
Abbildung 19: Einfluss der L1CAM Überexpression auf die kontaktunabhängige Koloniebildung im <i>Soft Agarose Assay</i>	74
Abbildung 20: Verifikation der stabilen L1CAM Überexpression in RB247 Retinoblastomzellen.	75
Abbildung 21: Effekt der stabilen L1CAM Überexpression in RB247 Zellen auf die Tumorbildungs- und Migrationskapazität <i>in vivo</i>	76
Abbildung 22: Ergebnis des Proteom Profiler™ – Human Phospho-Kinase Arrays zum Vergleich der differentiellen Phosphorylierung von RB355 L1CAM Knockdown- und Kontrollzellen.	78
Abbildung 23: Ergebnis des Proteom Profiler™ - Human XL Oncology Array zum Vergleich der differentiellen Expression onkologisch relevanter Proteine in RB355 L1CAM Knockdown- und Kontrollzellen.	79

Abbildung 24: Verifikation der differentiellen Genexpression von Ezrin, Galectin-3 und FGFb nach dem L1CAM <i>Knockdown</i> in RB355 Zellen sowie der L1CAM Überexpression in RB247 Zellen.	81
Abbildung 25: Verifikation der differentiellen Genexpression von Vimentin, N-Cadherin und EpCAM nach dem L1CAM <i>Knockdown</i> sowie nach L1CAM Überexpression in drei RB Zelllinien.	83
Abbildung 26: Vergleich der L1CAM Expression von sensitiven und Etoposid-resistenten Retinoblastomzellen.	85
Abbildung 27: Einfluss von L1CAM auf die VEC Chemoresistenz von WERI-Rb1 und RB247 Zellen.	86
Abbildung 28: Einfluss des L1CAM <i>Knockdowns</i> in RB355-Etop, WERI-Etop und Y79-Etop Zellen auf die Zellviabilität <i>in vitro</i>	88
Abbildung 29: Einfluss des L1CAM <i>Knockdowns</i> auf die Tumorbildung von Etoposid-resistenten RB Zellen <i>in vivo</i>	89
Abbildung 30: Einfluss des L1CAM <i>Knockdowns</i> in RB355-Etop, WERI-Etop und Y79-Etop Zellen auf die Tumorbildung <i>in vivo</i>	90
Abbildung 31: Endogene Expression von <i>ADAM10</i> und <i>ADAM17</i> in humanen Retinoblastomzelllinien.	91
Abbildung 32: Endogene L1CAM, <i>ADAM10</i> und <i>ADAM17</i> Expression in humanen Retinoblastomzelllinien sowie die Expression von <i>ADAM10</i> und <i>ADAM17</i> in RB Tumorproben.	92
Abbildung 33: Nachweis der L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand nach nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA).	94
Abbildung 34: Analyse der ADAM Aktivierung durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und spezifische Inhibition von <i>ADAM10</i> durch GI254023X sowie <i>ADAM17</i> durch TAPI-1 in den Retinoblastomzelllinien RB355 und Y79.	95
Abbildung 35: Inhibition endogener ADAM Aktivität durch Zugabe der spezifischen Inhibitoren GI254023X (<i>ADAM10</i>) und TAPI-1 (<i>ADAM17</i>).	96
Abbildung 36: Zellviabilität nach Behandlung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) allein oder in Kombination mit dem <i>ADAM10</i> (GI254023X) oder <i>ADAM17</i> (TAPI-1) Inhibitor.	97
Abbildung 37: Effekte der Inhibitoren GI254023X (<i>ADAM10</i>) und TAPI-1 (<i>ADAM17</i>) auf die Zellviabilität von RB Zellen.	98
Abbildung 38: Endogene Expression L1CAM-assoziiertes microRNAs in Retinoblastomzelllinien im Vergleich zur humanen Retina.	99
Abbildung 39: Relative Expression der microRNA miR-146a-5p und miR-34a in Etoposid-resistenten im Vergleich zu sensitiven Retinoblastomzellen.	101
Abbildung 40: Untersuchung des Effektes der miR-146a-5p-Überexpression auf die L1CAM Expression in WERI-Rb1 Zellen.	102
Abbildung 41: Relative Expression der microRNA miR-346 in parentalen und Etoposid-resistenten RB Zelllinien sowie Bindestudie zur mittels <i>in silico</i> Analysen prognostizierten Bindung in der 3'-UTR von L1CAM.	104

1 Einleitung

1.1 Das Retinoblastom

Das Retinoblastom (RB) ist die häufigste maligne Erkrankung des frühen Kindesalters mit einer Inzidenz von 1 zu 16.000 Lebendgeburten und umfasst 6% aller pädiatrischen Krebserkrankungen (Balmer *et al.*, 2006; Shields & Shields, 2006; Dimaras & Corson, 2019; Bornfeld *et al.*, 2020; Kaewkhaw & Rojanaporn, 2020). Weltweit treten jährlich ca. 9.000 neue Fälle auf wovon 60% der Erkrankten ein einseitiges (unilaterales) und 40%, bereits bei der Erstdiagnose, multifokale (bi-, trilaterale) Tumore zeigen (Wieland & Havers, 2006; Kivelä, 2009). In den meisten Fällen wird die Diagnose bereits vor dem fünften Lebensjahr gestellt, wobei die Überlebensrate in den entwickelten Ländern bei über 97% liegt (Bornfeld *et al.*, 2020). Das Retinoblastom tritt in zwei verschiedenen Formen auf: 1) der erblichen Form, bei der häufig beide Augen (bilateral) betroffen sind, und 2) der nicht-erblichen Form, bei der in einem Auge ein Tumor (unilateral) vorliegt (Yun *et al.*, 2011). Bei Patienten mit uni- oder bilateralem, vererbtem Retinoblastom kann zudem ein trilaterales Retinoblastom an der *Glandula pinealis* (Zirbeldrüse) auftreten (Provenzale *et al.*, 1995). Das sogenannte Pinealoblastom geht mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 58% einher (Schild *et al.*, 1993; Yamanaka *et al.*, 2019; Jong *et al.*, 2020). Der funktionelle Verlust beider Allele des Tumorsuppressorgens RB1 (*RB1*) führt zur Entstehung eines Retinoblastoms, wofür nach der von Knudson 1971 postulierten *two-hit*-Hypothese zwei Mutationsereignisse stattfinden müssen (Knudson, 1971). Der Verlust oder die Inaktivierung des ersten *RB1* Allels erfolgt entweder durch die Vererbung vom Vater oder der Mutter, die konstitutionelle Genträger sind, durch *de-novo*-Mutation während der Gametogenese oder durch eine somatische Mutation in der Retinazelle. Der Verlust des zweiten Allels erfolgt postzygotisch als somatische Mutation. (Wieland & Havers, 2006) Häufig wird das zweite Mutationsereignis durch einen Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) verursacht, welcher die Zellen homozygot bzw. hemizygot für das entsprechende Gen macht (Zhu *et al.*, 1992). Das Retinoblastomgen *RB1* liegt auf Chromosom 13 an Position 13q14.2 (Lalande *et al.*, 1984). Das vom *RB1* Gen kodierte RB1 Protein (pRB1) ist multifunktional: Es unterdrückt die Transkription durch Bindung an Histondeacetylasen (HDACs) und reguliert den Zellzyklus durch die Bindung an den Transkriptionsfaktor E2F (Flemington *et al.*, 1993; Helin *et al.*, 1993). Das Retinoblastom kann auch in

Abwesenheit von *RB1* Mutationen durch Mutationen des Transkriptionsfaktors MYCN entstehen (Rushlow *et al.*, 2013). Diese Tumore können zu einem früheren Zeitpunkt diagnostiziert werden, als solche mit einer Mutation im *RB1* Gen allein (Wang *et al.*, 1994; Sellers & Kaelin, 1997). Dimaras und Kollegen fanden zudem heraus, dass der Verlust des *RB1* Gens zunächst die Entstehung eines benignen Retinoms initiiert und zu einer gewissen genetischen Instabilität führt, welche die Veränderung weiterer tumorassoziierter Gene und letztendlich die Entstehung eines Retinoblastoms begünstigt (Dimaras *et al.*, 2012). Studien aus der Arbeitsgruppe von Brenda Gallie belegen, dass weitere Mutationen („3 hits“) notwendig sind, damit ein maligner Tumor entstehen kann (Corson & Gallie, 2007). Die Ursache, die letztendlich dazu führt, dass aus einem benignen Retinom ein malignes Retinoblastom entsteht, liegt wahrscheinlich in der Anhäufung von genetischen Veränderungen oder bisher nicht identifizierter Mutationseignisse (Dimaras *et al.*, 2008).

Ein erbliches Retinoblastom liegt bei 94% der Kinder mit sporadisch beidseitigem Retinoblastom vor wobei diese Kinder heterozygot für die *RB1* Mutation sind. Bei einer positiven Familienanamnese kann fast immer von einem erblichen Retinoblastom ausgegangen werden, wohingegen bei 5% der Patienten mit einem sporadischen bilateralen Retinoblastom ein sogenanntes somatisches Mosaik vorliegt, bei dem die erste Mutation postzygotisch aufgetreten ist. (Bornfeld *et al.*, 2020)

Als Ursprung der RB Tumorzellen wurden sowohl Vorläuferzellen von Horizontalzellen, Amakrinzellen und glialen Müllerzellen als auch Photorezeptorzellen diskutiert und somit auch die Existenz von retinalen *Precursor* Zellen (RPCs), die sich in multiple Zelltypen differenzieren können (Chen *et al.*, 2004; Ajioka *et al.*, 2007; McEvoy *et al.*, 2011; Pajovic *et al.*, 2011). Der Verlust des funktionsfähigen pRB1 in der sich entwickelnden Retina zeigt, dass nur die post-mitotischen Zapfenzellen wieder in den Zellzyklus eintreten können, somit proliferieren und resistent gegenüber Apoptose werden. Im Gegensatz dazu gehen Vorläuferzellen und Müller-Glia in die Apoptose über, wohingegen andere Zelltypen, wie retinale Ganglionzellen, Stäbchenzellen, horizontale und amakrine Interneurone sowie bipolare Nervenzellen aufgrund des pRB-Verlusts in der post-mitotischen Zellzyklusphase verbleiben. (Xu *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2018) Der zelluläre Ursprung des Retinoblastoms liegt nach neueren Erkenntnissen vermutlich in Vorläuferzellen der Zapfen-Photorezeptoren (Xu *et al.*, 2009). Heranreifende Zapfenzellen sind somit onkologisch aktiv und

unterstreichen zudem die Relevanz der zeitlichen Entwicklungsstadien der Zellen während der Tumorentstehung (Kaewkhaw & Rojanaporn, 2020).

Histologisch zeigen Retinoblastome unterschiedliche Differenzierungsstadien mit heterologer Verteilung von Homer-Wright und Flexner-Wintersteiner Rosetten (Ts'o *et al.*, 1970; Das *et al.*, 2014). Der Tumor wächst, ausgehend von der Retina, entweder endophytisch in das *Corpus vitreum* (Glaskörper), exophytisch, subretinal in Richtung der Choroidea (Lederhaut) sowie diffus innerhalb der Retina (Morgan, 1971; Girard *et al.*, 1989; Balmer *et al.*, 2006). Die wichtigsten prognostischen Faktoren für Metastasierungen sind dabei die Invasion entlang des *Nervus opticus* (Sehnerv) über die *Lamina cribrosa* (Siebbein) hinaus sowie eine choroidale Invasion von mehr als 3 mm im Durchmesser, welche die *Sclera* (Aderhaut) berührt (Sastre *et al.*, 2009; Eagle, 2013). Die Überlebensrate für Kinder mit Retinoblastomen, die sich entlang des prelaminaren, laminaren und postlaminaren *Nervus opticus* erstrecken, liegt bei >90%, 85% bzw. 60% (Stannard *et al.*, 1979; Magramm *et al.*, 1989; Chantada *et al.*, 2007). Zudem besteht das Risiko einer hämatogenen Verbreitung nach Aderhautinfiltration mit der Bildung von Metastasen in Lunge, Knochen und dem Gehirn (McLean *et al.*, 1994; Bornfeld *et al.*, 2020).

Das häufigste Anzeichen für das Bestehen eines Retinoblastoms ist die Leukokorie (siehe Abbildung 1) (Dimaras *et al.*, 2012). Der weißlich erscheinende Tumor reflektiert das Licht und verhindert die klinische Begutachtung der rötlich-erscheinenden Retina (Goddard *et al.*, 1999). Andere weniger spezifische Symptome sind zudem eine verminderte Sehleistung, ein gerötetes und gereiztes Auge und/oder die verzögerte Entwicklung des betroffenen Auges (Shields & Shields, 2004; Du & Pogoriler, 2006). Seltener Anzeichen für das Retinoblastom sind eine Uveitis, das Glaukom, eine Trübung der Linse (Katarakt) und Einblutungen in das betroffene Auge (Munier *et al.*, 2019). Zur Diagnostik wird, zusätzlich zur Anamnese und der Spiegelung des Augenhintergrunds, die Magnetresonanztomographie, Ultraschall, Fluoreszenzangiographie sowie optische Kohärenztomographie eingesetzt (Munier *et al.*, 2019; Bornfeld *et al.*, 2020). Das Retinoblastom wird mit der ICRB (*International Classification of Retinoblastoma*) sowie der TNM (T: Tumor; N: *node*, Lymphknoten; M: Metastasen) Klassifikation in Verlauf und Ausprägung beschrieben und entsprechend der jeweiligen Kategorien eingruppiert (Bornfeld *et al.*, 2020).

Das primäre Ziel der Retinoblastomtherapie liegt in der Eliminierung der Tumormasse sowie der Minimierung von Begleitschäden im angrenzenden Gewebe. Der Erhalt des

Auges und der visuellen Fähigkeit ist dabei von therapeutischer Priorität. (Munier *et al.*, 2019)

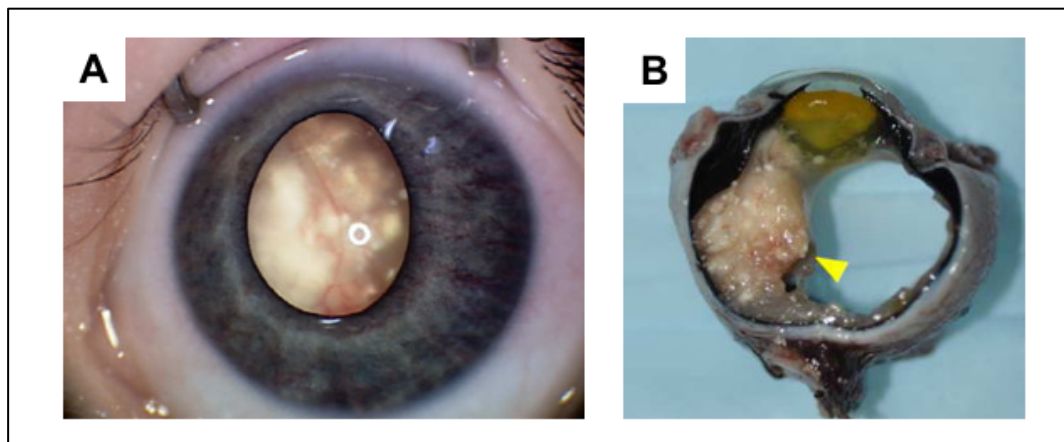


Abbildung 1: Klinische Eigenschaften des Retinoblastoms.

(A) Externe Rectam™ Aufnahme eines Retinoblastoms. Der kalzifizierte Tumor ist deutlich durch die Pupille als Reflexion zu erkennen (Leukokorie). (B) Pathologie eines enukleierten Auges mit Retinoblastom. Ein großer, kalzifizierter Tumor ist in der linken Hälfte des Auges deutlich zu erkennen (Pfeil). Abbildung modifiziert nach: (Dimaras & Corson, 2019).

Die Heilungschance bei unilateralen Retinoblastomen ohne extraokuläre Ausprägung liegt bei 85%-90% (Khelifaoui *et al.*, 1996; Chantada *et al.*, 2004). Eine adjuvante Chemotherapie wird vor allem für Erkrankungen mit Invasion entlang des *Nervus opticus* über die *Lamina cribrosa* hinaus oder bei massiver choroidaler Invasion angewendet (Uusitalo *et al.*, 2001). Die intravenöse, systemische Chemotherapie basiert auf der Verabreichung von Zytostatikakombinationen aus Vincristin, Cyclosporin, Doxorubicin (VDC), Vincristin, Etoposid, Carboplatin (VEC) oder Hybridregimen (Chantada *et al.*, 2004; Rodriguez-Galindo *et al.*, 2007). Die intraarterielle Chemotherapie (IAC) stellt eine augenerhaltende Therapieform für Patienten mit vitrealer Tumorausbreitung dar. Dabei werden über einen transfemorale Katheter die Zytostatika Melphalan, Topotecan und/oder Carboplatin direkt an den Ursprung der *Arteria ophthalmica* appliziert. (Abramson *et al.*, 2010) Die externe Strahlentherapie (*external radiation beam therapy*, ERBT) war die erste effektive, augenerhaltende Therapie für fortgeschrittene Erkrankungen. Jedoch erhöht die Bestrahlung das Risiko der Entstehung eines Sekundärtumors. (Yousef *et al.*, 2016) Die IAC wurde zunächst eingesetzt um die Effektivität der ERBT zu erhöhen und dient heute der Vermeidung der Enukleation des betroffenen Auges und der systemischen Chemotherapie (Shields *et al.*, 2014; Abramson *et al.*, 2015). Weitere Verfahren zur Tumorreduktion stellen die Laser-Photokoagulation, die Kryotherapie

sowie die Thermotheapie dar (Bakhshi *et al.*, 2012). Ein Hauptproblem der systemischen Chemotherapie stellt die subretinale und Glaskörperaussaat dar (Shields *et al.*, 2002). Es wird davon ausgegangen, dass diese Aussaat aufgrund des schlechten Penetrationsvermögens der systemisch verabreichten Zytostatika in den subretinalen und vitrealen Bereiche verbleiben, da diese Bereiche wenig vaskularisiert sind. Die periokulare Injektion der Zytostatika erlaubt die Verabreichung hoher effektiver Dosen und vermindert gleichzeitig das Auftreten von Nebenwirkungen, wie sie bei der systemischen Therapie beobachtet werden können. (Bakhshi *et al.*, 2012) Trotz der hohen Heilungschancen liegt die kumulative Inzidenz für das Auftreten von Sekundärtumoren bei ca. 35,2% der Patienten innerhalb von 40 Jahren nach der Erstdiagnose der erblichen Form des Retinoblastoms (Temming *et al.*, 2017). Untersuchungen von verschiedenen Patientenkohorten in den USA, Großbritannien und den Niederlanden zeigten, dass zudem das Risiko des Auftretens von Sekundärtumoren, wie z.B. Sarkomen, nach Bestrahlung erhöht war (Abramson *et al.*, 1984; Abramson & Frank, 1998; Mohny *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 2001; Kleinerman *et al.*, 2005). Aber auch Chemotherapeutika wie alkylierende Substanzen oder Topoisomeraseinhibitoren sind an der Entstehung von Sekundärtumoren beteiligt (Wong *et al.*, 2014). Im Jahr 2014 veröffentlichten Bartuma und Kollegen eine retrospektive Studie über einen Zeitraum von 10 Jahren zur systemischen Chemotherapie, bei der sieben von 46 untersuchten Retinoblastome Resistenzen gegenüber der VEC Therapie zeigten (Bartuma *et al.*, 2014). Pavlidou und Kollegen veröffentlichten eine Studie, bei der die höhere Prävalenz von Keimbahn-assoziierten Retinoblastomerkrankungen in Zusammenhang mit dem Versagen der IAC gebracht wurde (Pavlidou *et al.*, 2015). Ein nicht zufriedenstellendes Ansprechen der Tumore auf die verwendeten Chemotherapeutika macht es notwendig, die der Resistenzentwicklung zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen weiter zu untersuchen. Die Entwicklung von Chemotherapieresistenzen ist eine der Hauptursachen für das Versagen der Chemotherapie. Die Chemotherapieresistenz kann dabei durch eine Vielzahl von Faktoren vermittelt werden, wie zum Beispiel ein beschleunigtes Ausschleusen der Medikamente, DNA Methylierungen, Veränderungen im Zielort des Medikaments und dem Reparieren von induzierten Zellschäden (Wilson *et al.*, 2006).

Mit den schnell voranschreitenden Möglichkeiten und Technologien in der medizinisch-biologischen Forschung ist es möglich, die molekularen Mechanismen zur

Tumorentstehung, -progression und -metastasierung zu analysieren. Das Verständnis von Veränderungen auf genetischer und epigenetischer Ebene sind essenziell für die Verbesserung der Tumordiagnostik, der Tumorthherapie und der Verlaufskontrolle bei der Behandlung der Erkrankung. Es ist von großer wissenschaftlicher wie klinischer Bedeutung, dass die molekularen Veränderungen in Tumorzellen präzise kartiert werden, um neue und alternative Therapieansätze zu identifizieren sowie adjuvante Therapiekonzepte zu entwickeln. Die vorliegende Arbeit soll daher einen Beitrag zum Verständnis der veränderten molekularen und zellulären Prozesse leisten, welche den Progress des Retinoblastoms forcieren und zum Entstehen von Chemotherapieresistenzen führen.

1.2 Das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1CAM

1.2.1 Struktur und biologische Funktion

Das Zelladhäsionsmolekül L1 (*L1 cell adhesion molecule*, L1CAM, CD171) spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und bei der Entwicklung humaner Tumorerkrankungen (Arlt *et al.*, 2002; Altevogt *et al.*, 2020). Das Protein wurde erstmals in post-mitotischen Neuronen von Mäusen beschrieben (Rathjen & Schachner, 1984) und wird vom L1CAM Gen, das auf dem langen Arm des X-Chromosoms an Position Xq28 liegt, kodiert (Djabali *et al.*, 1990). Das L1CAM Molekül gehört zur L1 Familie hoch konservierter, neuronaler Adhäsionsmoleküle und umfasst insgesamt vier Mitglieder: L1CAM (Moos *et al.*, 1988), *Close Homolog of L1* (CHL1), NrCAM und Neurofascin (Maness & Schachner, 2007). L1CAM ist ein 200-220 kDa großes, die Zellmembran durchspannendes Glykoprotein aus der Familie der Immunglobuline und besteht aus sechs Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig1-6), fünf Fibronectin Typ III Domänen (FN_{III}1-5), einer Transmembrandomäne sowie einer hochkonservierten, intrazellulären Domäne (Abbildung 2) (Moos *et al.*, 1988; Kiefel *et al.*, 2012).

L1CAM kann homophile Bindungen mit benachbarten L1CAM Molekülen eingehen oder in heterophiler Weise an andere neuronale Zelladhäsionsmoleküle wie z.B. Integrine, Neurocan oder Neuropilin-1 binden. Dabei interagiert L1CAM mit verschiedenen Molekülen entweder in derselben Plasmamembran (cis) oder mit solchen von benachbarten Zellen (trans). (Schachner, 1997; Brümmendorf *et al.*, 1998; Schäfer & Altevogt, 2010). Der zytoplasmatische Teil des Moleküls ist zudem in der Lage einige Proteine des Zytoskeletts wie Ankyrin, Aktin, Spectrin oder die Ezrin-

Radixin-Moesin (ERM) Proteine zu binden (Loers & Schachner, 2007; Herron *et al.*, 2009). Zudem kann L1CAM einen Komplex mit E-Selektin bilden und so die Anheftung zirkulierender Tumorzellen an das Endothelium der Blutgefäße bewirken, was den

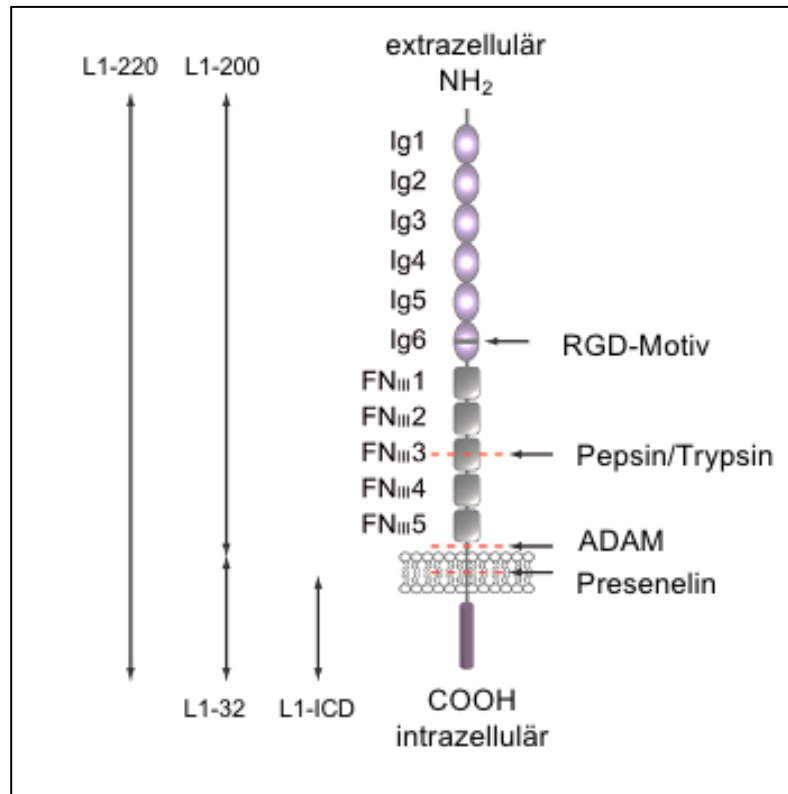


Abbildung 2: L1CAM Struktur und Schnittstellen.

L1CAM ist ein transmembranes Molekül mit sechs Immunglobulin-domänen (Ig1-6), fünf Fibronectin Typ III Domänen (FN_{III}1-3), einer transmembranen Domäne sowie einer hochkonservierten zyttoplasmatischen Domäne. Das RGD (Arg- Gly-Asp) Motiv in der sechsten Ig Domäne unterstützt die Bindung an Integrine. L1CAM kann proximal zur Plasmamembran von den Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 geschnitten werden. Diese Abspaltung der Ektodomänen resultiert in der Freisetzung eines 200 kDa großen, löslichen Ektodomänenfragments, wohingegen das 32 kDa transmembrane und intrazelluläre Fragment in der Plasmamembran verankert bleibt. In der Abbildung sind das RGD Motiv sowie die Schnittstellen für die Proteolyse mit Pfeilen markiert. Abbildung modifiziert nach: (Kiefel *et al.*, 2012).

ersten Schritt während der Metastasenbildung darstellt (Deschepper *et al.*, 2020). Über die Ig Domänen 1 bis 4 wird die statische und homophile Bindung zweier L1CAM Moleküle realisiert (Gouveia *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009). Neben der statischen Zelladhäsion spielt L1CAM jedoch auch eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Zellmotilität von Neuronen während der Embryonalentwicklung (Maness & Schachner, 2007). Während der embryonalen Entwicklung ist L1CAM beim Auswachsen (Chang *et al.*, 1987), der Adhäsion (Keilhauer *et al.*, 1985) sowie der Migration (Lindner *et al.*, 1983) der Neurone beteiligt. Zusätzlich unterstützt es den Myelinisierungsprozess

durch die Verlängerung der Schwann-Zellen entlang der Axone (Wood *et al.*, 1990) und schützt die Nervenzellen vor frühzeitiger Apoptose (Schachner, 1997; Brümmendorf *et al.*, 1998; Arlt *et al.*, 2002; Conacci-Sorrell *et al.*, 2005). In Tumoren begünstigt L1CAM die Ausbildung von Metastasen sowie die Entwicklung von Chemotherapieresistenzen (Schäfer & Altevogt, 2010; Altevogt *et al.*, 2020). Der Wechsel zwischen den verschiedenen L1CAM Bindungspartnern sowie die Abspaltung der L1CAM Ektodomäne stellen wichtige Schritte bei der Metastasierung von Tumorzellen dar. Dabei führt das Abspalten der L1CAM Ektodomäne zur Aktivierung von anderen Signalwegen wie solche, die durch eine Bindung zweier L1CAM Moleküle untereinander aktiviert werden. Eine veränderte Aktivierung der verschiedenen Signalwege wird somit nicht nur durch die differentielle Expression von L1CAM verursacht, sondern auch durch die Wechselwirkung von L1CAM mit den verschiedenen Liganden. (Kiefel *et al.*, 2012) Die direkte Wechselwirkung von L1CAM mit anderen L1CAM Molekülen oder Antikörpern induziert z.B. die Phosphorylierung der MAPK-assoziierten Kinasen 1 und 2 (Erk1/2) und führt zur Aktivierung von proliferativen Signalwegen (Schaefer *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2000). Darüber hinaus besteht ein direkter Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression von L1CAM und der Phosphorylierung von ERK1/2 (Fang *et al.*, 2020). Die Bindung von L1CAM an Integrine kann auch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFkB) führen, welcher die Zellmotilität und Invasivität fördert und die Zellproliferation anregt. Dabei führen die verschiedenen Signalmechanismen zu unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern des L1CAM Moleküls und regulieren so die Bindungseigenschaften zu verschiedenen Interaktionspartnern der intrazellulären Matrix, wie zum Beispiel an Ankyrin oder auch der bereits erwähnten ERM Proteine. (Gil *et al.*, 2003)

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) spielt eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung von Krebszellen und stellt einen Schlüsselprozess während der Entwicklung dar (Georgakopoulos-Soares *et al.*, 2020). Zudem führt die EMT zu der differentiellen Expression mesenchymaler Marker wie Vimentin und anderer Integrine, welche die Zell-Matrix-Interaktion fördern und zu einer gesteigerten Invasion und Zellmotilität führen (Thiery & Sleeman, 2006). Im Jahr 2006 wurde erstmals von Shtutman *et al.* ein Zusammenhang zwischen der L1CAM Expression und der EMT beschrieben. In der Studie konnte gezeigt werden, dass L1CAM E-Cadherin-reiche Zellverbindungen in Brustkrebszellen durchbricht und auf diese Weise eine Steigerung

der Zellmotilität verursachen kann (Shtutman *et al.*, 2006). Ebenso wurde eine gesteigerte L1CAM Expression im Bereich der Flexner-Wintersteiner und Homer-Wright-Rosetten im Retinoblastom beobachtet (Jo *et al.*, 2017) sowie in der invasiven Tumorfront von Plattenepithelkarzinomen der Vulva (Trietsch *et al.*, 2016).

Aktuelle Studien beschreiben zudem den Zusammenhang zwischen einer gesteigerten L1CAM Expression und der Entstehung von Krebsstammzellen (*cancer stem cells*, CSCs), sodass derzeit die Verwendung von L1CAM in der Therapie von CSCs untersucht wird (Giordano & Cavallaro, 2020). Die bereits identifizierte Rolle von L1CAM bei der Entstehung der CSCs macht L1CAM daher noch interessanter für die Verwendung als Ziel in der Therapie von metastasierenden und chemotherapie-resistenten Tumoren (Altevogt *et al.*, 2020).

1.2.2 Pathologischer Bezug

Die wichtige Rolle von L1CAM während der Gehirnentwicklung spiegelt sich in den klinischen Symptomen bei L1CAM Genmutationen oder Polymorphismen wider. Diese Mutationen führen zu schwerwiegenden zerebralen Störungen, die sich in geistiger Retardierung, Schizophrenie oder dem neonatalen Tod manifestieren (Jouet *et al.*, 1996). Ebenso führen Mutationen im L1CAM Gen zu x-chromosomal-assoziierten Störungen mit einem breiten pathologischen Spektrum wie Hydrocephalus (Hu *et al.*, 2019), MASA Syndrom oder Agnese des *Corpus callosum* (Bousquet *et al.*, 2021).

Neben der verbreiteten Expression im Nervensystem konnte die Expression von L1CAM in einer begrenzten Anzahl nicht-neuronaler Gewebe und Zellen wie z.B. in Leukozyten (Hubbe *et al.*, 1993) sowie in Epithelzellen des Urogenitaltraktes (Debiec *et al.*, 1998) und der Ovarien (Zecchini *et al.*, 2008) nachgewiesen werden. Viele Studien haben eine erhöhte oder abweichende Expression von L1CAM als einen wichtigen Faktor bei der Entstehung und der Progression von verschiedenen Tumorerkrankungen identifiziert (Altevogt *et al.*, 2020). So konnte eine L1CAM-abhängige Zunahme der Migrations- und Invasionskapazität in Kolonkarzinomzellen *in vitro* sowie eine gesteigerte Tumorbildung der Zellen *in vivo* gezeigt werden (Gavert *et al.*, 2005). Zudem führte die Überexpression von L1CAM zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber häufig angewandter Chemotherapeutika (Sebens Mürköster *et al.*, 2007; Sebens Mürköster *et al.*, 2009; Giordano & Cavallaro, 2020) sowie zur vermehrten Ausbildung von Kolonkarzinommetastasen *in vivo* (Gavert *et al.*, 2007).

Neben einer Vielzahl an Studien, die eine erhöhte Expression von L1CAM in humanen

Krebserkrankungen aufzeigen, so auch im Glioblastom und vielen anderen Krebsarten (ausgenommen dem pädiatrischen Neuroblastom), korreliert die Expression von L1CAM mit einer schlechten Prognose für den Verlauf der jeweiligen Erkrankung (Altevogt *et al.*, 2016; Wachowiak *et al.*, 2018). Demzufolge wird L1CAM eine vielversprechende Funktion als prognostischer Marker und als therapeutisches Ziel bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen zugesprochen (Colombo & Meldolesi, 2015; Altevogt *et al.*, 2016; Samatov *et al.*, 2016).

1.3 Die Sheddasen der ADAM Familie

1.3.1 Prozessierung von L1CAM durch Sheddasen der ADAM Familie

Zusätzlich zu der Funktion und der Expression von L1CAM in seiner membrangebundenen Form auf der Zelloberfläche, kann die Ektodomäne abgespalten werden. Das Abspalten der L1CAM Ektodomäne proximal der Zellmembran wird durch die Proteine der *a desintegrin and metalloproteinase* (ADAM) Familie vermittelt. (Mechtersheimer *et al.*, 2001) Dieser Prozess geschieht in Tumorzellen und während der Entwicklung des Nervensystems, vornehmlich durch die Proteinasen ADAM10 (Mechtersheimer *et al.*, 2001) und ADAM17 (Mechtersheimer *et al.*, 2001; Stoeck *et al.*, 2006). Dabei wird die gesamte, 200 kDa große, L1CAM Ektodomäne (L1-200) von der intrazellulären L1CAM Domäne (L1-ICD) abgespalten (Abbildung 3). Das Abspalten der Ektodomäne (engl. *ectodomain shedding*) geschieht auf der Zellmembran sowie der Oberfläche von Exosomen, die u.a. von Tumorzellen abgegeben werden (Gutwein *et al.*, 2003). Das Prozessieren von L1CAM auf der Oberfläche von Exosomen oder das endogene, konstitutive Freisetzen von der Membranoberfläche ist dabei von ADAM10 abhängig, wohingegen das durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) künstlich induzierte Abspalten von ADAM17 vermittelt wird (Mechtersheimer *et al.*, 2001; Marezky *et al.*, 2005; Stoeck *et al.*, 2006). Die Ektodomänenabspaltung ist ein wichtiger Mechanismus bei der Prozessierung von Membranoberflächenproteinen (Hooper *et al.*, 1997). Krebszellen können dadurch die homophile, statische Zelladhäsion lösen und zu einem motileren und invasiveren Phänotypen wechseln (Craig & Brady-Kalnay, 2011). Durch die proteolytische Abspaltung der Ektodomäne wird nicht nur die statische Zelladhäsion sondern auch die Veränderung intrazellulärer Signalprozesse stimuliert (Kiefel *et al.*, 2012). Das Abspalten der L1CAM Ektodomäne in das Zellkulturmedium konnte bisher bei verschiedenen Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten nachgewiesen werden

(Beer *et al.*, 1999; Gutwein *et al.*, 2000; Kalus *et al.*, 2003; Gavert *et al.*, 2005; Maretzky *et al.*, 2005; Li & Galileo, 2010). Da die lösliche Form des L1CAM Moleküls alle funktionellen Bindestellen enthält, kann dieses in einer parakrinen und autokrinen Weise an Zellen binden. Interessanterweise kann die lösliche Form in Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen (Fogel *et al.*, 2003; Gutwein *et al.*, 2003; Bondong *et al.*, 2012), im Liquor von Patienten mit Alzheimer (Strekalova *et al.*, 2006) sowie bei Patienten mit Endometriumkarzinomen im Blutserum

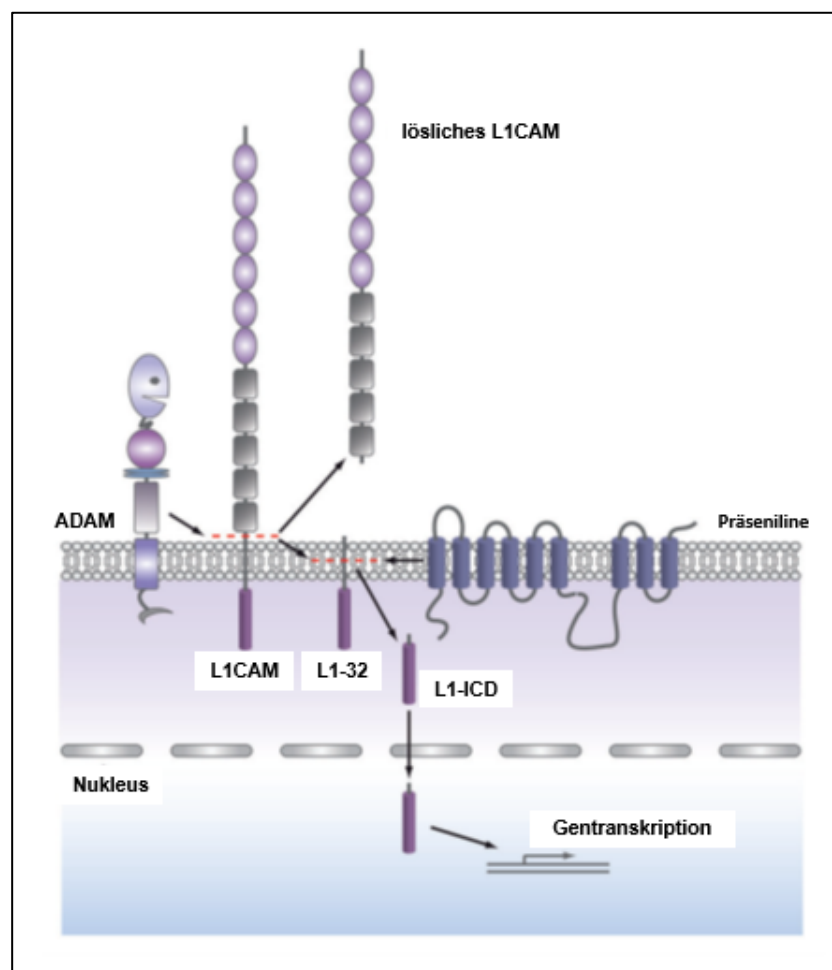


Abbildung 3: Proteolytische Abspaltung der L1CAM Ektodomäne und nukleäre Translokation der intrazellulären L1CAM Domäne.

Die ADAM-vermittelte Prozessierung von L1CAM resultiert in einer 200 kDa großen, löslichen Ektodomäne, die homophil oder heterophil mit benachbarten Zellen interagieren kann. Die verbleibende, 32 kDa große intrazelluläre Domäne (L1-32) dient als Substrat für die proteolytische Spaltung durch die γ -Sekretase Präseniline. Die aus der Spaltung resultierende 28 kDa intrazelluläre Domäne (L1-ICD) translokalisiert in den Nucleus, durch bisher unbekannte Mechanismen, und partizipiert an der transkriptionellen Regulation verschiedener Gene. Abbildung modifiziert nach: (Kiefel *et al.*, 2012).

(Pasanen *et al.*, 2017) nachgewiesen werden. Die Menge an löslichem L1CAM, wie z.B. im Blutserum, korreliert dabei nicht notwendigerweise mit der L1CAM Expression des jeweiligen Tumors (Pasanen *et al.*, 2017). In verschiedenen Studien wird

beschrieben, dass ADAM10 mit L1CAM an die invasive Front von Tumoren kolokalisiert (Gavert *et al.*, 2005). Die gleichzeitig verstärkte Expression von ADAM10 und L1CAM konnte bisher in Ovarial- und Uteruskarzinomen sowie Nierenzellkarzinomen, im Vergleich zum umliegenden Gewebe, festgestellt werden (Fogel *et al.*, 2003; Doberstein *et al.*, 2011). Das Abspalten der Ektodomäne von L1CAM resultiert in einem C-terminalen, 32 kDa Fragment, das in der Plasmamembran verankert bleibt und die intrazelluläre Domäne enthält (Lutz *et al.*, 2012). Die weitere Prozessierung der 32 kDa intrazellulären Domäne (ICD) durch die γ -Sekretase Präseniline (PS) führt zur Abspaltung einer 28 kDa großen, löslichen, intrazellulären Domäne in das Zytoplasma (Maretzky *et al.*, 2005; Riedle *et al.*, 2009), welche letztendlich in den Nukleus translokalisiert (Riedle *et al.*, 2009). Der genaue Mechanismus der Translokalisierung der L1-ICD ist bisher nicht bekannt (Schäfer & Altevogt, 2010).

1.3.2 Struktur und biologische Funktion

Strukturell bestehen Proteine der Disintegrin und Metalloproteinasen (*a desintegrin and metalloproteinase*, ADAM) Familie aus einer N-terminalen Sequenz, einer Pro-Domäne, einer katalytischen Metalloproteinasedomäne, einer Disintegrin-Domäne, einer cysteinreichen Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne (Blobel, 2005). Für das Entfernen der Pro-Domäne sind Pro-Protein Konvertasen vom Furin Typ notwendig, welche die aktive Form des ADAM Proteins generieren (Peschon *et al.*, 1998). Obwohl die verschiedenen Mitglieder der ADAM Familie ähnliche Substratspezifitäten teilen, besitzen sie bestimmte Substratpräferenzen. Die Spezifität resultiert aus der definierten Charakteristik der katalytischen Domänen, der Sensitivität gegenüber zellulärer Signale und Stimuli, der Zeit für die Prozessierung des Substrates, der subzellulären Lokalisation der Protease sowie den jeweiligen Eigenschaften der Substrate. (Zimina *et al.*, 2005; Thiel & Carpenter, 2006; Caescu *et al.*, 2009; Le Gall *et al.*, 2010) Zu den Funktionen der Sheddasen zählt das Schneiden membranständiger Proteine worüber Signalwege reguliert und das Verhalten von Zellen beeinflusst werden können. Das jeweilige Ergebnis der veränderten Signaltransduktion ist dabei immer auch vom zellulären Kontext abhängig. (Gööz *et al.*, 2006).

ADAM17 wird eng mit der Entstehung von Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht, da das Enzym Wachstumsfaktoren prozessiert, welche an der

Tumorentwicklung und dem -wachstum beteiligt sind. Ebenso ist ADAM17 an Entzündungsreaktionen beteiligt, wie sie unter anderem auch in Tumoren beobachtet werden können (Düsterhöft *et al.*, 2019; Schumacher & Rose-John, 2019). Erhöhte ADAM Expressionsraten, eingeschlossen ADAM17, sind in der Regel mit einer schlechten Verlaufsprognose für die jeweilige Erkrankung verbunden (Duffy *et al.*, 2009). So geht z.B. die erhöhte ADAM17 Expression in Brustkrebs mit einer verkürzten Überlebensrate der Patienten einher (McGowan *et al.*, 2008).

Einige Studien beschäftigten sich bereits mit verschiedenen Anwendungen der ADAM Sheddase als therapeutisches Ziel. So führte eine verringerte ADAM10 Expression, durch die Applikation von *small interfering* RNAs (siRNAs), zu einer verringerten Motilität von Glioblastomzelle (Kohutek *et al.*, 2009) und Invasivität von Hypophysen-Adenomen (Pan *et al.*, 2012). Die Verwendung von ADAM17 Inhibitoren zur Behandlung von Lungenkrebs (Saad *et al.*, 2019) oder die Applikation von Anti-ADAM17-siRNAs in Brustkrebszelllinien (Meng *et al.*, 2016) lieferten bereits vielversprechende Ergebnisse zur Behandlung der jeweiligen Erkrankung.

1.4 Die Rolle von microRNAs in Krebserkrankungen und bei der Expression von L1CAM

MicroRNAs (miRNAs, miRs) gehören zur Familie von 21-25 Nukleotiden kleinen RNAs, welche auf post-transkriptioneller Ebene die Expression von Genen regulieren können (Ambros, 2003; Lai, 2003; Bartel, 2004). Onkogene miRNAs (oncomiRs) liegen in Tumorzellen überexprimiert vor. Sie verhalten sich wie Onkogene und spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Krebserkrankungen. Die konstitutive Überexpression bestimmter miRNAs kann dabei in einer verminderten Expression von Tumorsuppressoren sowie zur Initiation und dem Progress von Krebs führen. Nach erfolgreicher Inhibition von bestimmten oncomiRs konnte eine Reduktion der Proliferationsrate, der Apoptoseinduktion sowie der Verlust des Potentials Metastasen zu bilden *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. (Sevli *et al.*, 2010; Slack & Chinnaiyan, 2019) Darüber hinaus stehen oncomiRs in Zusammenhang mit der Entwicklung von Chemotherapieresistenzen in verschiedenen Krebsarten (Ashrafizadeh *et al.*, 2021).

Tumorsuppressor miRNAs (TSMiRs) liegen in Tumorzellen, im Vergleich zum normalen Gewebe, herunterreguliert vor. Das Wiederherstellen der natürlichen Expressionsmuster der TSMiRs in Krebszellen kann zu einer Repression der

proliferativen, invasiven und metastasiven Eigenschaften der Krebszelle *in vitro* und *in vivo* führen. (Seven *et al.*, 2014)

Im Zusammenhang mit L1CAM werden verschiedene miRNAs beschrieben, bei denen eine regulative Wirkung auf das L1CAM Gen nachgewiesen werden konnte. Hou *et al.* (2012) postulierten, dass die miR-146a-5p durch ihre Bindung an die 3'-UTR von L1CAM eine direkte Hemmung der Translation in Magenkrebszellen induziert (Hou & Yin *et al.*, 2012).

Die Bindung der miR-34a führt zur Hemmung der Translation von *L1CAM* in Endometriumkarzinomzellen (Schirmer *et al.*, 2014) und reguliert die Chemosensitivität von RB Zellen über die Modulation der MAGE-A/p53 Signalkaskade (Yang *et al.*, 2019). Zudem konnte bereits die Funktion der miR-34a als Tumorsuppressor in RB Zellen nachgewiesen werden (Dalgard *et al.*, 2009). Eine indirekte Regulation von L1CAM wird durch miR-29a realisiert. MiR-29a inhibiert die Expression von *repressor element-1 silencing transcription factor* (REST) und führt zu einer verstärkten L1CAM Expression (Duan *et al.*, 2014). Zudem wird in verschiedenen humanen Krebszelllinien durch miR-21-3p die Expression von L1CAM forciert (Doberstein *et al.*, 2014).

2 Zielsetzung und Fragestellung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Regulierung der *L1CAM* Genexpression in verschiedenen RB Zelllinien sowie mit der funktionellen Bedeutung von *L1CAM* während der Progression des Retinoblastoms und der Entwicklung von Resistenzen gegenüber standardmäßig eingesetzten Chemotherapeutika. Für die Analysen wurden verschiedene humane RB Zelllinien aus uni- und bilateralen Tumoren verwendet und mit einem Pool aus gesundem humanen Retinagewebe verschiedener Patienten verglichen. Zur Aufklärung der Rolle von *L1CAM* während der Progression des humanen Retinoblastoms wurden folgende Fragen adressiert:

- Wie ist das Expressionsmuster der *L1CAM* Expression in verschiedenen humanen RB Zelllinien und gibt es Unterschiede zur Expression in Gewebeproben gesunder humaner Retina?
- Gibt es einen Unterschied zwischen der *L1CAM* Genexpression von humanen Retinoblastomproben von Patienten vor und nach einer Chemotherapiebehandlung und wie unterscheidet sich die Genexpression der Patientenproben im Vergleich zu gesundem Retinagewebe?
- Welchen funktionellen Einfluss hat eine Regulierung der *L1CAM* Expression in den verschiedenen RB Zelllinien?
- Welchen Einfluss hat eine Regulierung der *L1CAM* Expression auf die Entwicklung von Resistenzen gegenüber standardmäßig eingesetzten Chemotherapeutika und in Etoposid-resistenten RB Zellen?
- Welche Signalwege und Proteine werden nach einer Regulierung der *L1CAM* Expression differentiell reguliert?

Nachfolgend sollte der Zusammenhang der Expression der Sheddase ADAM10 und ADAM17 im Kontext der Progression des Retinoblastoms untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten die Expressionsprofile der Sheddase in humanen RB Zelllinien untersucht und mit der Expression in gesundem humanen Retinagewebe verglichen werden. Nachfolgend sollte die Rolle der Sheddase bei der Prozessierung der *L1CAM* Ektodomäne untersucht werden und eine mögliche Blockierung dieses Mechanismus durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren untersucht werden. Aus diesen Überlegungen ergingen folgende Fragestellungen:

- Wie sind die Sheddasen ADAM10 und ADAM17 in verschiedenen humanen RB Zelllinien exprimiert?
- Wird die extrazelluläre L1CAM-Domäne ADAM10/17-vermittelt geschnitten und kann diese im Kulturüberstand der RB Zellkultur nachgewiesen werden?
- Welchen funktionellen Einfluss haben die Sheddasen ADAM10 und ADAM17 auf die Zellviabilität von humanen RB Zellen?

Abschließend sollte die Rolle der L1CAM-assoziierten miRNAs sowie eine prognostizierte Bindung der miR-346 an die 3'UTR des *L1CAM* Gens untersucht werden. Daraus leiteten sich folgende Fragestellungen ab:

- Wie ist das Expressionsmuster der L1CAM-assoziierten miRNAs in verschiedenen humanen RB Zelllinien?
- Welchen Einfluss hat die Überexpression der miR-146a-5p auf die Expression von L1CAM in RB Zelllinien?
- Gibt es einen Zusammenhang der Expression der miRNAs und der Entwicklung von Resistenzen gegenüber dem Chemotherapeutikum Etoposid?
- Bindet die miR-346 an die 3'-UTR von L1CAM und kann dadurch eine Repression der Translation von *L1CAM* vermittelt werden?

Basierend auf den gewonnenen Daten sollte die Frage adressiert werden, ob L1CAM als potentielles Ziel für die Retinoblastomtherapie und der Prävention des Auftretens von Chemotherapieresistenzen in Betracht gezogen werden kann. In diesem Kontext spielen auch die Sheddasen ADAM10 und ADAM17 eine Rolle, da diese an der Prozessierung von L1CAM direkt beteiligt sein sollen. Ebenso wurde die Rolle von miRNAs untersucht, da diese ebenfalls als Ziel der Therapie oder als Therapeutikum in nähere Betrachtung gezogen werden können.

3 Material

3.1 Gewebeproben

Für Vergleichsstudien der Genexpression wurden humane *post mortem* Retinaproben von Corneaspendern und kryokonservierter Retinoblastomproben verwendet. Die Ethikkommission der Universität Duisburg-Essen genehmigte die Verwendung der Retinaproben (Genehmigung #06-3021 vom 22. März 2006) und der Retinoblastomproben (Genehmigung #14-5836-BO vom 07. Mai 2014) für die Verwendung wissenschaftlicher Studien zum Retinoblastom. Eine schriftliche Genehmigung wurde von den Eltern oder Angehörigen der Spender eingeholt. Die Aufklärung erfolgte von den zuständigen Ärzten/innen.

Gewebe	Beschreibung/ Verwendung	Bezug
Humane Retina (unbehandelt)	Pool aus fünf Patientenproben <i>post mortem</i> nach Corneaspende (RNA-Isolation)	Uniklinikum Essen, Augenklinik
Humane Retina (unbehandelt)	Pool aus fünf Patientenproben <i>post mortem</i> nach Corneaspende (Protein-Isolation)	Uniklinikum Essen, Augenklinik
Retinoblastomproben (kryokonserviert)	Kryokonservierte Retinoblastome nach E nukleation und Präparation, bei -80°C gelagert (RNA-Isolation)	Uniklinikum Essen, Augenklinik/Institut für Pathologie

3.2 Zelllinien und Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den humanen RB Zelllinien Rbl-13, Rbl-30, RB247, RB355, , RB383, WERI-Rb1, und Y-79 (Reid *et al.*, 1974; McFall *et al.*, 1977; Griegel *et al.*, 1990; Madreperla *et al.*, 1991), sowie deren von unserer Arbeitsgruppe GFP (*green fluorescent protein*) -markierten Derivaten RB247-GFP, (diese Arbeit) RB355-GFP und WERI-GFP (Busch *et al.*, 2015) und den Etoposid-resistenten humanen RB Zelllinien RB355-Etoposid, WERI-Rb1-Etoposid und Y79-Etoposid (Busch *et al.*, 2015) gearbeitet, die freundlicherweise von Dr. H. Stephan aus der Klinik für Kinderheilkunde III des Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt wurden. Zudem wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293T (freundlicherweise bereitgestellt von Frau Prof. Royer-Pokora, Uniklinikum Düsseldorf) verwendet.

Zelllinie	Ursprung	Etablierung
HEK293T	Humane Nierenzellen	Prof. Royer-Pokora, Uniklinikum Düsseldorf
Rbl-13	Unilaterales Retinoblastom	Griegel <i>et al.</i> , 1990
Rbl-30	Unilaterales Retinoblastom	Griegel <i>et al.</i> , 1990
RB247	Bilaterales Retinoblastom	Griegel <i>et al.</i> , 1990
RB247-GFP	Bilaterales Retinoblastom	Diese Arbeit
RB355	Unilaterales Retinoblastom	Madreperla <i>et al.</i> , 1991
RB355-Etop	Unilaterales Retinoblastom	Busch <i>et al.</i> , 2015
RB355-GFP	Unilaterales Retinoblastom	Busch <i>et al.</i> , 2015
RB383	Unilaterales Retinoblastom	Griegel <i>et al.</i> , 1990
WERI-Rb1	Unilaterales Retinoblastom	McFall <i>et al.</i> , 1977
WERI-Etop	Unilaterales Retinoblastom	Busch <i>et al.</i> , 2015
WERI-GFP	Unilaterales Retinoblastom	Busch <i>et al.</i> , 2015
Y79	Unilaterales Retinoblastom	Reid <i>et al.</i> , 1974
Y79-Etop	Unilaterales Retinoblastom	Busch <i>et al.</i> , 2015
Y79-GFP	Unilaterales Retinoblastom	Busch <i>et al.</i> , 2015

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Lot. Nr.	Hersteller
Acrylamid/Bis-Lösung 30%	#161-0158	Bio-Rad, München
ADAM10 Inhibitor (GI254023X)	SML0789	Sigma-Aldrich, USA
ADAM17 Inhibitor (TAPI-1)	163847-77-6	Tocris, USA
Agarose ultrapure	16500500	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (<i>bovine serum albumin</i> , BSA)	8076.4	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	K36015201 630	Merck, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	A9518	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua ad injectabilia (20 x 10 ml)	2351744	B. Braun, Melsungen
Borsäure	6943.1	Carl-Roth, Karlsruhe
5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) ≥99,9%	B9285-50mg	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäuremonohydrat	3958.2	Carl-Roth, Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	D9542	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO), steril	D 2650	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	A487979	Merck, Darmstadt
dNTP Set 4 x 25 UMol (100 mM)	10297018	Invitrogen, Darmstadt
DNase, recombinant (rDNase)	9003-98-9	Macherey & Nagel, Düren
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 4,5 g/l Glucose	P04-04510	PAN-Biotech, Aidenbach
DMEM/F12 Pulver	8900	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Calcium und Magnesium	P04-36500	PAN-Biotech, Aidenbach
Essigsäure, 100%	3738.4	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol ≥99,8%	32205	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol vergällt	-	Apotheke Universitätsklinikum Essen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	45F-0812	Sigma-Aldrich, USA
Etoposid	458891.00.00	Teva, Ulm
Fetales Bovines Serumalbumin (FBS)	P30-3702	PAN-Biotech, Aidenbach
Formaldehyd	F8775	Sigma-Aldrich, Steinheim
FuGENE® HD	E 2311	Promega, USA
GelRed™	41003	Biotium, USA
GeneRuler 100 bp DNA-Ladder	#SM0243	Fermentas, Thermo Scientific, USA
GeneRuler 1kb DNA-Ladder	#SM0313	Fermentas, Thermo Scientific, USA
Glycerin	3783.1	Carl Roth, Aidenbach

Glycin (≥99%)	3187.3	Carl-Roth, Karlsruhe
GoTaq® G2 Hot Start Polymerase	M7401	Promega, USA
Hexadimethrinbromid (Polybrene), ≥94%	H9268-5MG	Sigma-Aldrich, Steinheim
HiPerFect® Transfektionsreagenz	151041624	QIAGEN, Hilden
Immunfluoreszenz Eindeckmedium	S3023	Dako, Dänemark
Insulin, human (10 mg/ml Lösung)	640120	PAN Biotech, Aidenbach
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	21980-032	Gibco Life Technologies, Darmstadt
Isopropanol/2-Propanol Rotipuran	6752.2	Carl-Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	08240032	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	A585773-441	Merck, Darmstadt
Kanamycin	K1876-1G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kristallviolett	42555	Merck, Darmstadt
Laemmlli (4x Sample Buffer)	#161-0737	Bio-Rad, München
LB-Agar Pulver (Lennox L Agar)	22700-025	Invitrogen, Darmstadt
LB-Broth Base (Lennox L Broth Base)	12780-052	Invitrogen, Darmstadt
L-Glutamin 200 mM (100x) liquid	25030-024	Gibco Life Technologies, Darmstadt
Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix	11791020	Thermo Scientific, USA
Magermilchpulver	T145.2	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	TA 262033814	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol, 99%	4227.1	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol, ≥99,9%	4627.2	Carl-Roth, Karlsruhe
Mineralöl	71K00846	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	3957.1	Carl-Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS), ≥99,5%	CN30.3	Carl-Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	D6750-10G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxis (NaOH), Pellets	1.06498.1000	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40 (NP40)	-	Calbiochem EMD Biosciences, USA
Normales Ziegen Serum (NGS)	X0907	Dako, Dänemark
Nuklease-freies Wasser	1312048	Ambion Life Technologies, Darmstadt
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-180 kDa)	#26616	Fermentas, Thermo Scientific, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (10-250 kDa)	#26619	Fermentas, Thermo Scientific, USA
Paraformaldehyd (PFA)	P6148-500G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin-Streptomycin	15140	Gibco Life Technologies, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	10837091001	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	P1585	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-D-Lysin Hydrobromid	P1024-10MG	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenimin (PEI), verzweigt	408727-100ML	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	K23538075	Merck, Darmstadt
2-Propanol, ≥99,8%	6752.2	Carl-Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor Tabletten (Complete)	04 693 124 001	Roche, Mannheim
Proteinase K	19131	Qiagen, Hilden
RNase Away®	A998.3	Carl-Roth, Karlsruhe
SYBR™ green PCR Mastermix	4309155	Applied Biosystems, Darmstadt
T4 DNA Ligase	EL0335	Fermentas, Darmstadt
Taq DNA-Polymerase	10342-00	Invitrogen, Darmstadt
TaqMan® Gene Expression Master Mix	4369016	Applied Biosystems, Darmstadt
Terralin® Liquid	-	Schülke & Mayr, Norderstedt
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	#161-0800	Bio-Rad, München
Tris, ≥99,3%	AE 15.2	Carl-Roth, Karlsruhe
Triton™ X-100	T8787	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau, 0,4%	15250	Gibco Life Technologies, Darmstadt

Trypsin/EDTA Lösung 0,25%	P10-023100	PAN-Biotech, Aidenbach
Tween® 20, 100 ml	P1379	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30%	8070.2	Carl-Roth, Karlsruhe
Western Bright™ Peroxide	180521-99	Advansta, USA
Western Bright™ Quantum	180521-01	Advansta, USA
Water soluble tetrazolium 1 (WST-1)	11644807001	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vincristin (sulfate salt)	V8879-1MG	Sigma-Aldrich, Steinheim
X-Gal	#R0401	Thermo-Scientific, Oberhausen

3.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Lot. Nr.	Hersteller
96-well Platte	442404	Nunc, Dänemark
96-well Platte (weiß)	136101	Nunc, Dänemark
Biopsiestanzen (8 mm)	13E26	pfm medical
Click-Tips (200 µl)	1818700	Thermo-Scientific, Finnland
Cryoröhrchen (2ml/5ml)	E309.1, E312.1	Carl-Roth, Karlsruhe
Deckgläser (Haemacytometer) 24x24mm	L191.1	Carl-Roth, Karlsruhe
Deckgläser rund 12 mm	9161064	Carl-Roth, Karlsruhe
Filterpapier-Whatman®	-	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen (GA 250 ml)	3136	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen (GA 50 ml)	3108	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gasperlen (1,25-1,55 mm)	A555.1	Carl-Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen (2 ml, 4 ml)	E309.1/E312.1	Carl-Roth, Karlsruhe
Kunststoffzentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)		Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrozellulosemembran, Protan BA83	10401396	GE Healthcare
Objektträger 76 x 26 mm, Mattrand	-	Engelbrecht, Edermünde
Objektträger, 76 x 26 mm, Superfrost	03-0060	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Parafilm „M“	PM-996	Bemis, USA
Pasteurpipetten aus Glas	7477	Brand, Wertheim
Petrischalen	GB633180	Greiner Bio One, Frickenhausen
Pipetten Cellstar® (5 ml)	F200137C	Greiner Bio One, Frickenhausen
Pipetten Cellstar® (10 ml)	F190635B	Greiner Bio One, Frickenhausen
Pipetten Cellstar® (25 ml)	F200137X	Greiner Bio One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, Safe Seal Tips mit Filter (10 µl)	770 030	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen, Safe Seal Tips mit Filter (20 µl)	770 050	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen, Safe Seal Tips mit Filter (200 µl)	770 200	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen, Safe Seal Tips mit Filter (1.000 µl)	770 400	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1.000 µl)	-	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (5ml)	5846.1	Carl-Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, für PAGE (200 µl)	028014056011	Sarstedt, Nürnberg
Polypropylen Röhrchen mit Belüftungsdeckel (10 ml)	187 262	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	-	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, safe-lock (0,5 ml)	0030 123.301	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, safe-lock (1,5 ml)	7060.1	Carl-Roth, Karlsruhe
Reaktionsplatte MicroAmp™ (96-well) für Realtime RT-PCR	N8010560	Applied Biosystems, Darmstadt

Reaktionsplatte weiß (96-well) - Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well polystyrene plates	P8616-50EA	Nunc, Dänemark
Ritips (1,25 ml)	40001-0001	Ritter Medical, Schwabmünchen
Schutzfolie MicroAmp™, für <i>Real-time</i> -PCR Platte	201709221	Applied Biosystems, Darmstadt
Skalpellsklingen, steril	4268A	Aesculap, Tuttlingen
Spritzen (20 ml)	1908193	Becton Dickinson, Spanien
Spritzen, Insulin (0,5 ml) für CAM-Assay (0,30mm/30G)	04144150	Becton Dickinson, Spanien
Sterilfilter Minisart (0,20 µl Porengröße)	340177	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter Minisart (0,45 µl Porengröße)	340175	Sartorius, Göttingen
Zellkulturplatten (6-well)	ZK65F 160	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten (24-well, 96-well)	ZK 353047, ZK 353072	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (10 cm)	664160	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	2019031.1	TPP, Schweiz
Zellstofftücher	330608	Klinisches Lager, Universitätsklinikum Essen

3.5 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Lot. Nr.	Hersteller
Caspase-Glo®3/7 Assay System	G8090	Promega, USA
DNeasy Blood & Tissue Kit,	69504	QIAGEN, Hilden
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	E1910	Promega, USA
Dual-Glo® Luciferase Assay System	E1610	Promega, USA
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	#K0530	Thermo-Scientific, USA
Proteom Profiler™ Array - Human XL Oncology Array Kit	ARY026	R&D Systems, UK
Proteom Profiler™ Array - Human XL Oncology Array Kit Lysepuffer	895943	R&D Systems, UK
miRneasy Mini Kit (50)	217004	QIAGEN, Hilden
Monarch®DNA Gel Extraction Kit	T1020G	NEB, Frankfurt a.M.
NucleoBond Xtra Midi EF	740420.10	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin® RNA II Kit	740955.250	Macherey & Nagel, Düren
Proteom Profiler™ Array – Human Phospho-Kinase Array Kit	ARY003B	R&D Systems, UK
QuantiTect Rev. Transcription Kit (200)	205313	QIAGEN, Hilden
TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing, with pCR™4-TOPO™ Vector, One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli, and PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit	1707483	Thermo Scientific, USA

3.6 Antikörper

3.6.1 Primärantikörper

Antikörper	Bezeichnung/Quelle/Verdünnung	Hersteller
anti-β-Actin	#4967 / Kaninchen, polyklonal (WB 1:10.000)	Cell Signaling Technology, USA
anti-ADAM10	#14194 / Kaninchen, monoklonal (WB 1:1.000)	Cell Signaling Technology, USA
anti-ADAM17	ab57484/ Maus, polyklonal (WB 1:1.000)	Abcam, UK
anti-BrdU	ab6326 / Ratte, monoklonal (IF 1:1.000)	Abcam, UK
anti-Desmin [D33]	#MA5-13259 / Maus, monoklonal (IF 1:20)	Invitrogen, USA
anti-Ezrin (3C12)	Sc-58758 / Maus, monoklonal (WB: 1:1.000)	Santa Cruz, USA
anti-Galectin-3 (anti Gal-3)	ab12733 / Kaninchen polyclonal (WB: 1:1.000)	Cell Signaling Technology, USA
anti-Fibronblast-Growth-Factor-2 (anti-FGFb)	ab215373 / Kaninchen, monoclonal (WB 1:1.000)	Abcam, UK
anti-L1CAM [2C2]	ab24345 / Maus, monoklonal (WB 1:1000); Bindung an die Endodomäne von L1CAM	Abcam, UK
anti-L1CAM	UJ127.11 (L4543) / Maus, monoclonal (WB 1:1.000); Bindung an die Ektodomäne von L1CAM	Sigma Aldrich, USA
anti-Vimentin	sc-6260 / Maus, monoklonal (WB: 1:1.000)	Santa Cruz, USA

3.6.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Konjugation / Verdünnung	Hersteller
Ziege anti-Ratte	Alexa-fluor® 594 (BrdU 1:1.000)	Invitrogen, USA
Ziege anti-Maus	Alexa-fluor® 594 (IF 1:1.000)	Molecular Probes, Life Technologies, Deutschland
Polyklonal Goat anti-Rabbit IgG	HRP-konjugiert (WB 1:10.000)	DAKO, Dänemark
Polyklonal Rabbit anti-Mouse IgG	HRP-konjugiert (WB 1:2.000)	DAKO, Dänemark

3.7 Oligonukleotidprimer

3.7.1 Primer für Klonierung

Bezeichnung	Sequenz* (5'-3')	Produktlänge	T _m **
miR-346	For: CGGAATTCGAATTTGGCTGCAGGTTGGA Rev: CGGGATCCGCTGACTGTGGAGGTAGGTT	253 bp	59,0°C 59,0°C
miR-346-BS	For: CGACTAGTCTGTTTTGCCAGCCCATTG Rev: CGGAGCTCTGGAGCAGAGATGGCAAAGA	249 bp	58,5°C 59,0°C

* Die unterstrichene Sequenz entspricht der jeweiligen Restriktionsstelle.

**T_m laut Primer3Plus Online-Application.

3.7.2 Primer für die quantitative Realtime Analyse

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Produktlänge	T _m *
ADAM10	For: CACGAGAAGCTGTGATTGCC Rev: TCCGGAGAAGTCTGTGGTCT	80 bp	59,6°C 59,9°C
ADAM17	For: AGGATGCTTGGGATGTGAAGA Rev: GTGAAAAGGTGTGCCAAGCA	91 bp	59,1°C 59,5°C
Basic Fibroblast-Growth-Factor (FGFb)	For: CCGTTACCTGGCTATGAAGG Rev: AAAGAAACACTCATCCGTAACACA	70 bp	59,6°C 60,0°C
EpCAM	For: TCAGAATGATGTGGACATAGCTGA Rev: CCCCATTTACTGTCAGGTCCA	104 bp	59,6°C 59,4°C
Ezrin	For: TGAGGAGAAGCGCATCACTG Rev: TTATTCTCATCTCGGGCCTGG	99 bp	60,1°C 59,3°C
Galectin-3	For: TCTTCTGGACAGCCAAGTGC Rev: TGTTATCAGCATGCGAGGCA	129 bp	60,2°C 60,1°C
GAPDH	For: ACCCACTCCTCCACCTTTGA Rev: CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT	101 bp	60,4°C 59,8°C
L1CAM	For: CCGGCATGCGTACTATGTCA Rev: CCATATAGATGGCTCTGGGGC'	72 bp	60,2°C 59,8°C
N-Cadherin	For: ATTGGACCATCACTCGGCTT Rev: CCCGAATCTGTGATTATGATGGGA	106 bp	59,4°C 60,3°C
Vimentin	For: TCTGGATTCACCTCCTCTGGT Rev: TCAAGGTCATCGTGATGCTGA	117 bp	59,9°C 59,5°C

*T_m laut Primer3Plus Online-Applikation.

3.7.3 Primer für die quantitative miRNA Realtime Analyse

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')*
5.8-S RNA	CTACGCCTGTCTGAGCGTCGCTT
hsa-miR-21-3p	CAACACCAGTCGATGGGCTGT
hsa-miR-29a-3p	TAGCACCATCTGAAATCGGTTA
hsa-miR-34a-5p	TGGCAGTGTCTTAGGTGGTTGT
hsa-miR-146a-5p	TGAGAACTGAATTCATGGGTT
hsa-miR-346	TGTCTGCCCGCATGCCTGCCTCT

*SYBR miR-Primer mit T_m=55°C geplant.

3.8 TaqMan® Gene Expression Assays

Assay	Herstellerbezeichnung	Hersteller
18S	Hs99999901_s1	Applied Biosystems, Life Technologies, Deutschland
18S (kurz)	Hs03928990_g1	
hGAPDH	Hs99999905_m1	
L1CAM	Hs01109748_m1	

3.9 Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Schnittstelle	Bestellnummer	Hersteller
Fast Digest BamHI	5'...G↓G A T C C...3' 3'...C C T A G↑G...5'	FD0054	Thermo Scientific, USA
Fast Digest BclI*	5'...A↓C T A G T...3' 3'...T G A T C↑A...5'	FD1253	
Fast Digest EcoRI	5'...G↓A A T T C...3' 3'...C T T A A↑G...5'	FD0274	

Fast Digest *KpnI* 5'...G G T A C↓C...3' FD0524
3'...C↑C A T G G...5'

Fast Digest *SacI* 5'...G A G C T↓C...3' FD1133
3'...C↑T C G A G...5'

*Isoschizomere: *SpeI*, *AhII*

3.10 Vektoren

3.10.1 Vektoren für die transiente Expression

Bezeichnung	Verwendung	Bezug
pCR@4-TOPO	Klonierung	Thermo Scientific, USA (s. Kapitel 3.5)
pCR@4-TOPO_miR-346	Klonierung	diese Arbeit (s. Kapitel 4.1.11)
pCR@4-TOPO_miR-346-BS	Klonierung	diese Arbeit (s. Kapitel 4.1.12)
pSG5	Überexpressionsvektor mit T7 Promotor	Stratagene, La Jolla, USA (Cat. No. #216201)
pcDNA3.1	Kontrollvektor für miR-146-Überexpressionsstudie	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Germany (V79020)
pCS2+_hrGFP	hrGFP Expressionsplasmid mit pSC2+ Backbone, transiente Transfektionskontrolle	Dr. A. Weise, Universitätsklinikum Essen
pcDNA3_miR-146a	Überexpression von miR-146a-5p	David Baltimore (Adgene #15092) (Taganov <i>et al.</i> , 2006)
pSG5_miR-346	Überexpression von miR-346	diese Arbeit (s. Kapitel 3.1.11)
pMIR-TK-RNL	miRNA Expressions-, Reporterplasmid, Luciferase Reporter	Jochen Irmig (Imig <i>et al.</i> , 2011)
pMIR-REPORT™_miR-346-BS	Reporterplasmid für miR-346-Bindestudien	diese Arbeit (Kapitel 4.1.12)

3.10.2 Vektoren für die stabile Expression

Bezeichnung	Verwendung	Bezug
pczVSV-G	Lentivirales Verpackungsplasmid zur Herstellung lentiviraler Partikel	Dr. H. Hanenberg, Düsseldorf
pCD/NL-BH	Lentivirales Verpackungsplasmid zur Herstellung lentiviraler Partikel	Dr. H. Hanenberg, Düsseldorf
pCL7EGwo	GFP-Expressionsvektor, eGFP-Insert mit CMV-Promotor flankiert von LTRs zur stabilen Expression von GFP	Dr. H. Hanenberg, Düsseldorf
pPRIME-CMV-Neo-FF3	Luciferase-miRNA-Insert mit CMV-Promotor flankiert von LTRs als Negativkontrolle bei stabiler Expression	Dr. S. Elledge, USA (Adgene #11665) (Stegmeier <i>et al.</i> , 2005)
pENTR4 no ccDB(686-1)	<i>Gateway® entry</i> Vektor zur Klonierung von L1CAM in pLenti CMV_Puro Dest	Dr. E. Campeau, USA (Addgene #17424) (Campeau <i>et al.</i> , 2009)
phL1A-pcDNA3	Sequenz für humanes L1CAM flankiert von <i>EcoRI</i> -Schnittstellen	Vance Lemmon Lab, USA (Adgene #12307) (Hlavin & Lemmon, 1991)

pLenti CMV_Puro Dest	Lentiviraler <i>Gateway® destination</i> Vektor zur Umklonierung von L1CAM aus pENTRY4, Negativkontrolle bei Überexpression von L1CAM	Dr. E. Campeau, USA (Addgene #17452) (Campeau <i>et al.</i> , 2009)
pLenti CMV_L1CAM	L1CAM mit CMV-Promotor flankiert von LTRs zur stabilen Expression, transiente L1CAM-Expression	diese Arbeit s. Kapitel 4.1.10
TRCN0000299624	shL1CAM#624-Klon	
TRCN0000299625	shL1CAM#625-Klon	
TRCN0000303668	shL1CAM#668-Klon	
TRCN0000303735	shL1CAM#735-Klon	
TRCN0000310751	shL1CAM#751-Klon	
TRCN0000063913	shL1CAM#913-Klon	Sigma-Aldrich, USA
TRCN0000063914	shL1CAM#914-Klon	
TRCN0000063915	shL1CAM#915-Klon	
TRCN0000063916	shL1CAM#916-Klon	
TRCN0000063917	shL1CAM#917-Klon	

3.11 Bakterienstämme und Glycerinstocks

Stamm	Bezeichnung	Hersteller
One Shot® E. coli TOP 10	-	Invitrogen, Darmstadt
MISSION® shRNA Bacterial Glycerol Stocks	SHCLNG-NM-000425	Sigma-Aldrich, USA (s. Kapitel 3.10.2)

3.12 Zellkulturmedium

Bezeichnung	Zusammensetzung
HEK293T-Vollmedium	DMEM + 10% FBS + 4mM L-Glutmin + 100 u/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
RB-Vollmedium	DMEM + 15% FBS + 4mM L-Glutmin + 100 u/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 10 µg/ml Insulin + 40 µM 2-Mercaptoethnaol
IMDM supplementiert	IMDM + 10% FBS + 100 u/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin

3.13 Bakterienmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium flüssig*	20 g LB Broth Base ad 1.000 ml Millipore H ₂ O, pH 7,5
LB-Medium fest*	32 g LB Agar ad 1.000 ml Millipore H ₂ O, pH 7,5

* Den Medien wurden für die Selektion auf Resistenzmarker 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin zugegeben.

3.14 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Blotting Puffer (1x)	100 ml 10x Towbin 200 ml Methanol ad 1.000 ml Millipore-Wasser
Borsäure/Natriumboratpuffer	50 ml 0,2 M Borsäure 42,5 ml 0,05 M Dinatriumtetraborat ad 200 ml mit Millipore-Wasser pH 8,9
<i>Phosphate-buffered saline</i> , PBS (1x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,2
Ponceau-S-Lösung	1% Essigsäure 0,5% Ponceau S
<i>Radio-Immuno-Precipitation Assay</i> (RIPA) -Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 1% Nonidet P-40 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS Frisch hinzufügen: 1x Protease Inhibitor Cocktail (Complete) 100 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 100 µl 0,1 M PMSF
Sodiumdodecylsulfat (SDS) -Laufpuffer (1x)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS pH 8,8
TBS-T (0,1%)	1xTBS 0,1% Tween®20
TBS-T (0,05%)	1xTBS 0,05% Tween®20
Towbin-Puffer (10x)	1,92 M Glycin 0,25 M Tris pH 8,6
Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer (1x)	445 mM Tris 445 mM Borsäure 0,5 M EDTA pH 8
<i>Tris- buffered saline</i> , TBS (1x)	150 mM NaCl 20 mM Tris-HCl
Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer (1x)	445 mM Tris 445 mM Borsäure 0,5 M EDTA pH 8
<i>Whole Mount</i> Waschpuffer	1x PBS 1% Triton™ X-100

3.15 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absaugvorrichtung	Univacuum XS 1	LLG Labware, Meckenheim
Analysenwaage	PM 2000	Mettler-Toledo, Giessen
Analysenwaage	Precisa 40SM 200A	Göntgen Wägetechnik, Bottrop
Binokular	Stemi DV4	Zeiss, Jena
Binokular (Doppelt mit Stativ)	SMZ1000, Digital Sight DS-2M	Nikon, Düsseldorf
CO ₂ -Inkubator (S1-Zellkultur)	HERA cell 150	Heraeus, USA
CO ₂ -Inkubator (S2-Zellkultur)	Galaxy 170S	New Brunswick (Eppendorf), USA
CO ₂ -Inkubator Dampfsterilisator (S1)	Micro Galaxy Varioklav	Nunc, USA HP Medizintechnik, Oberschleißheim
Digitalkamera (Mikroskop invers)	DMG 23K274	Imaging Source, Bremen
Einfrierblock Zellen	True North™ Chilling Jar, HS23230A	Heathrow Scientific,
Eismaschine	AF 80	Sctosman, Italien
Elektrophoresekammer	MS Choice	Kisker, Steinfurt
Fluoreszenzmikroskop	CTR 6500	Leica, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse E600	Nikon, Düsseldorf
Gefrierschrank (-20°C)	-	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80°C)	-	Oehmen Labortechnik, Essen
Geldokumentationssystem	FastGene® Blue/Green GelPic LED Box	Nippon Genetics, Düren
Heißluftsterilisator	Ecocell	Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg
Heizblock	Accubloc™ Mini 110338	Labnet, USA
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Inversmikroskop	Labovert FS	Leitz, Wetzlar
Inversmikroskop	Motic AE 20 Serie	Motic, Wetzlar
Kippschüttler	3013	GFL, Burgwedel
Kühl-Gefrierkombination (4°C/-20°C)	Diverse Modelle	Liebherr, Ochsenhausen
Kryotank	#LS750B-R	Worthington Industries, USA
Lichtquelle	KL1500 LCD	Schott, Mainz
Lumineszenz-Reader	Orion II Microplate Reader	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Lumineszenzdetektions-gerät (WB-Detektion)	Celvin S-Chemilumineszenz Imaging	Biostep, Burkhardtsdorf
Lumineszenzdetektions-gerät (CFA-Fotodokumentation)	LAS3000 Lumineszenzdetektor	Fujifilm, Japan
Luminometer	GLOMAX 20/20 - 899076	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer mit Heizplatte	RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Membranvakuumpumpe	N022AN.18	KNF Neuberger, Freiburg
Messbecher, Glas	diverse Größen	Brand, Wertheim
Messzylinder, Glas	25, 50, 100, 200, 1000, 2000 ml	Brand, Wertheim
Mikrowelle	MW 800	Lotus, Indien
Mörser	110 ml unglasiert, Porzellan	Witeg, Wertheim
Neubauer-Zählkammer	T728.1	Carl-Roth
Pipette	100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette	20-200µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette	0,5-10,0µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette	0,5-5,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus® und Pipetus® Junior	Hirschmann, Eberstedt
Realtime PCR System	7300	Applied Biosystems, USA
Rollenmischer	SRT6	Stuart, UK
Rundschüttler	Certomat®R	Sartorius, Göttingen

SDS-Page Kammer	Mini Protean II™	Bio-Rad, München
Semidry-Blot-Apparatur	Trans-Blot®SD Transfer Cell	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank	HB 2448S S1	Bio-Flow Technik, Meckenheim
Sicherheitswerkbank (Klasse II)	LaminAir®, HB2448S	Nuaire, UK
Spannungsgerät	Power Pac™ basic und HC	Bio-Rad, München
Spannungsgerät	Power Pac 300	Bio-Rad, München
Spektralphotometer	Epoch Reader	BioTek, Bad Friedrichshall
Standard pH-Meter	WTW Serie	Inolab, Weilheim
Sterilbank	Captair bio	Erlab, Frankreich
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	5415 D und 5415 R	Eppendorf, Hamburg
UV-Licht Tisch	CV2M253O	Syngene, UK
Vortex	MS2 und VF2	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	SFB354	GFL, Burgwedel
Wippschüttler	KS 125 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Zentrifuge	Certifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	5430 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Osterode

3.16 Software und Online Anwendungen

Bezeichnung	Version	Hersteller
Adobe Photoshop	CS4	Adobe Inc., USA Bildbearbeitungen
Citavi	6	Swiss Academic Software, Schweiz
Clone Manager Professional	9	Scientific & Educational Software, USA Sequenzauswertung, Oligonukleotid-Design
Gen5	1.10.8	BioTek®, Bad Friedrichshall Spektralphotometrische Auswertungen
GraphPad	Prism 4	GraphPad Software, USA Erstellung von Graphen, Statistikauswertung
IC Measure	1.0	The Imaging Source Europe GmbH, Bremen
LAS3000	V2.2	Fujifilm, Japan
Leica Application Suite	3.4	Leica, Wetzlar Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen
Micro Manager	1.4	University of California, USA Bildbearbeitung und Quantifizierung
Microsoft Office		Microsoft
Multi Gauge	V3.0	Fujifilm, Japan
NIS-Elements	3.0	Laboratory Imaging, Tschechien Fluoreszenzaufnahmen
Sequence Detection Software	1.4.0.25)	Applied Biosystems, Thermo Scientific, USA, Auswertung von Expressionsdaten
Serial Cloner	2.6.1	Franck Perez [Serial Basics], USA, Sequenzauswertung
Snap and Go	1.8.3	Biostep GmbH, Burkhardtsdorf

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Isolation von Nukleinsäuren

Für die Isolation genomischer DNA (gDNA) aus HEK293T Zellen wurde das *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben verwendet. Die gDNA wurde jeweils aus 1×10^6 Zellen gewonnen und mit 100 μl des im Kit enthaltenen Niedrigsalzpuffers von der Silicamembran eluiert.

Die Isolation von RNA aus RB Zellen, Chorioallantoismembran (CAM) -Gewebe, kryokonservierten RB Gewebeproben sowie humanem Retinagewebe wurde mit dem *NucleoSpin® RNA II Kit* (Macherey & Nagel) nach Herstellerangaben aus $2,4 \times 10^6$ Zellen bzw. 30 mg Gewebe (-pulver) durchgeführt. Die RNA wurde mit 30-40 μl von dem im Kit enthaltenen Nuklease-freiem Wasser eluiert.

Die Isolation von mikroRNA (miRNA) erfolgte mit dem *miRNeasy Mini Kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben. Die Isolation der miRNA erfolgte aus 1×10^6 Zellen, die in 40 μl Nuklease-freiem Wasser eluiert wurde.

4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (gDNA, pDNA, RNA sowie miRNA) erfolgte spektralphotometrisch mit einem Epoch Reader. Für weitere Analytik oder Klonierungsschritte wurden ausschließlich Proben mit einem Absorptionsverhältnis von A_{260} zu A_{280} von $\geq 1,8$ verwendet. Proben mit Konzentrationswerten außerhalb des linearen Messbereichs ($> 1,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden entsprechend verdünnt und erneut gemessen.

4.1.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird verwendet, um bestimmte Genbereiche zu amplifizieren. Zwei spezifische, den Genabschnitt flankierende, Oligonukleotidprimer dienen dabei der thermostabilen DNA Polymerase als Startpunkte für die Replikation des Genabschnitts. Die zyklische Wiederholung von DNA Denaturierung, Oligonukleotidhybridisierung sowie Elongation führt zur exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz.

Bei der Amplifikation der miR-346 Sequenzen sowie der Bindestelle für die miR-346 in der 3'-UTR des L1CAM Gens wurde genomische DNA aus HEK293T Zellen als

Matrize für die jeweiligen PCRs verwendet. Tabelle 1 zeigt das Pipettierschema für die PCR Ansätze.

Tabelle 1: Pipettierschema für eine Polymerasekettenreaktion.

Komponente	Finales Volumen	Finale Konzentration
Taq-Puffer (10x) w/o MgCl ₂	5 µl	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2 µl	2 mM
dNTPs (10 mM)	1 µl	0,2 mM
Primer Forward/Reverse (je 10 µM)	je 2,5 µl	0,5 µM
Taq DNA-Polymerase (5u/µl)	0,5 µl	2,5 u
DMSO	2,5 µl	5%
gDNA	Variabel	200 ng
Nuklease-freies Wasser	ad 50 µl	-

Zur Amplifikation bestimmter Genabschnitte wurde eine *Touchdown* PCR gewählt, bei der, ausgehend von der berechneten Schmelztemperatur (*melting temperature*, T_m) der Oligonukleotide, in zyklischen Abständen die Hybridisierungstemperatur (*annealing temperature*, T_A) um je ein Grad Celsius verringert wird. Vorteil dieser Methode ist eine hohe Spezifität bei der Amplifikation des gewählten Genabschnittes bei einer gleichzeitig hohen Amplifikationsrate.

Tabelle 2: Programm der durchgeführten *Touchdown*-PCR. Die Hybridisierungstemperatur berechnet sich aus der primerspezifischen Schmelztemperatur (T_m)-2°C.

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	5 min	95°C	1
Denaturierung	1 min	95°C	
Hybridisierung	1 min	$T_m+1^\circ\text{C}$	5
Elongation	1 min	72°C	
Denaturierung	1 min	95°C	
Hybridisierung	1 min	T_m	5
Elongation	1 min	72°C	
Denaturierung	1 min	95°C	
Hybridisierung	1 min	$T_m-1^\circ\text{C}$	5
Elongation	1 min	72°C	
Denaturierung	1 min	95°C	
Hybridisierung	1 min	$T_m-2^\circ\text{C}$	20
Elongation	1 min	72°C	
Finale Elongation	10 min	72°C	1
Pause	∞	4°C	

4.1.4 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese bewegt sich die negativ geladene DNA im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Die Geschwindigkeit der Bewegung hängt dabei von der Länge/Größe der DNA Fragmente, der Konformation der DNA, der Gelkonzentration sowie der angelegten Spannung ab.

In dieser Arbeit wurden 1%-ige Tris-Borat-EDTA (TBE) Agarosegele verwendet, denen 1:20.000 *GelRed*TM Nukleinsäuren-interkalierende Agens zugesetzt wurden. Alle Proben wurden mit 10x *Fast Digest Green Buffer* versetzt, sodass dieser in einer 1x Konzentration vorlag. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für 40 min in 1x TBE Puffer (Kapitel 3.14). Zur Größenkontrolle wurden die DNA Marker 100 bp *DNA Ladder* bzw. 1kb *DNA Ladder* mitgeführt. Die Detektion und Dokumentation der aufgetrennten Fragmente erfolgte mit der *FastGene*[®] *Blue/Green GelPic LED Box*.

4.1.5 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde in dieser Arbeit verwendet um spezifisch Genabschnitte für die Klonierung oder Analyse zu fragmentieren. Verwendet wurden dazu ausschließlich *Fast Digest* Restriktionsendonukleasen.

Tabelle 3: Pipettierschema für einen analytischen und einen präparativen Restriktionsverdau.

Komponente	Analytischer Verdau	Präparativer Verdau
<i>Fast Digest Green Buffer</i> (10x)	2,0 µl	5,0 µl
<i>Fast Digest</i> Enzym	0,5 µl	1,0 µl
DNA	300 ng	1 µg
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl	ad 50µl

Die Restriktion erfolgte bei 37°C im Heizblock über einen Zeitraum von 1 h (abweichend von Herstellerangaben) mit anschließender Denaturierung der Restriktionsendonukleasen durch eine 10-minütige Inkubation bei 72°C. Für die Ligation wurden die Restriktionsfragmente zunächst in einem 1%-igen Agarosegel (Kapitel 4.1.4) aufgetrennt und die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Nach der Gelelution mit dem *Monarch*[®]*DNA Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben in 10 µl Elutionspuffer wurde die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt (Kapitel 4.1.2).

4.1.6 Ligation

Bei der Ligation werden die in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennten und aus dem Gel eluierten (Kapitel 4.1.5) Restriktionsfragmente in einem Ansatz (Tabelle 4) mittels T4 DNA Ligase ligiert. Dabei werden jeweils die spezifisch geschnittenen 3'-Hydroxy-Enden mit den 5'-Phosphatenden über die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung miteinander verbunden. Zur Ligation wurden 25 ng Vektor DNA eingesetzt. Die *Insert* DNA wurde in einem fünffachen molaren Überschuss dem

Ligationsansatz zugefügt. Die einzusetzende Masse wurde anhand folgender Formel (1) bestimmt.

Tabelle 4: Pipettierschema für die Ligation von zuvor verdauter Vektor DNA und Insert DNA.

Komponente	Finales Volumen	Finale Konzentration
T4 DNA-Ligase Puffer (10x)	2,0 µl	1x
T4 DNA-Ligase (1 u/µl)	1,0 µl	1 u
Vektor-DANN	Variabel	25 ng
Insert-DANN	Variabel	5x mol. Überschuss zur Vektor-DNA
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl	-

$$Masse_{Insert} = \frac{Masse_{Vektor} \cdot Länge_{Insert}}{Länge_{Vektor}} \cdot Verhältnis \frac{Insert}{Vektor} \quad (1)$$

Die Ligation erfolgte bei 25°C für 1 h und anschließender Inkubation bei 4°C über Nacht.

4.1.7 Bakterientransformation

Nach Angaben des Herstellers wurden chemisch kompetente *One Shot® TOP10 E. coli* Zellen des *TOPO® TA Cloning® Kits for Sequencing* (Invitrogen) mit 2 µl des Ligationsansatzes transformiert. Anschließend wurden 50 µl der Bakteriensuspension mit Glasperlen auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und für 12 h bei 37°C inkubiert. Für die Selektion auf positive Klonierungsergebnisse wurden, je nach Plasmidresistenz, 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin dem LB Agar hinzugegeben. Für die Blau-weiß-Selektion wurden 35 µl X-Gal (50 mg/ml) auf die Agarplatten gegeben.

4.1.8 Bakterienkulturen

Von den Bakterienkolonien der in Kapitel 4.1.7 beschriebenen Transformationsansätzen wurden einzelne Kolonien zum Beimpfen von 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz verwendet. Die Kulturen wurden bei 37°C für 12 h auf dem Schüttler mit 140 rpm inkubiert.

Als Starterkultur wurde eine 300 ml Bakterienkultur in einem 2.000 ml Erlenmeyerkolben angelegt und für 16 h bei 37°C und 140 rpm inkubiert.

4.1.9 Isolation von pDNA

Die Isolation von pDNA erfolgte mit dem *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben. Jeweils 4 ml der 5 ml Bakterienkultur wurden nacheinander in 2 ml Reaktionsgefäßen bei 10.000 rcf für 10 min bei 4°C pelletiert. Die Plasmidisolierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Plasmide in 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

Für die Isolation größerer Plasmidmengen wurde die 300 ml Übernachtskultur zunächst bei 4.000 rcf für 30 min bei 4°C pelletiert und anschließend mit dem *Nucleo Bond™ Xtra Midi EF Kit* (Macherey & Nagel) nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Elution erfolgte in 100-200 µl Nuklease-freiem Wasser.

Die Plasmidkonzentration wurde, wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, bestimmt. Die Plasmidsuspensionen wurden bei -20°C gelagert.

4.1.10 Klonierung der Plasmidkonstrukte zur L1CAM Überexpression

Für die funktionelle Analyse von L1CAM in den verschiedenen RB Zelllinien wurde ein lentivirales Überexpressionsplasmid kloniert, welches zur stabilen, lentiviralen sowie zur transienten Expression diente. Im Folgenden sind die Schritte der Klonierung zum fertigen Plasmid beschrieben. Eine Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide ist unter Kapitel 3.10 zu finden.

Klonierung mittels Gateway® Clonase Reaktion:

- Präparativer Restriktionsverdau von 1 µg pH1A-pcDNA3 Plasmid DNA (enthält das L1CAM Genfragment) sowie Gateway® entry Vektor pRNTR4 mit EcoRI (Kapitel 4.1.5)
- Elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente und Elution der Zielbanden aus dem Agarosegel (Kapitel 4.1.4)
- Ligation von 218 ng L1CAM Genfragment mit 25 ng des pENTR4 Vektors bei 4°C über Nacht
- Transformation von kompetenten OneShot® TOP10 *E. coli* Zellen (Invitrogen) mit 1 µl des Ligationsansatzes nach Herstellerangaben (Kapitel 4.1.7) und Selektion auf Ampicillin Agarplatten (100 µg/ml) für 16 h bei 37°C
- Anlegen von 5 ml Kulturen mit selektierten Klonen (Kapitel 4.1.8) und Kultivierung für 16 h bei 37°C
- Isolation von pDNA der Kulturen und analytischer Restriktionsverdau mit 300 ng pDNA und der Restriktionsendonuklease EcoRI
- für Gateway® Clonase Reaktion: Mischen von 100 ng pENTRY_L1CAM Klone mit positivem Insertionsereignis mit 150 ng des pLentiCMV_PuroDest Vektor
- Zugabe von 2 µl des Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix
- Inkubation für 2 min bei 25°C

- Zugabe von 1 µl Proteinase K Lösung und Inkubation für 10 min bei 37°C
- Transformation von kompetenten *OneShot® TOP10 E. coli* Zellen (Invitrogen) mit 1 µl *Gateway®* Clonase Ansatz nach Herstellerangaben (Kapitel 4.1.7) und Selektion auf Ampicillin Agarplatten (100 µg/ml) für 16 h bei 37°C
- Anlegen von 5 ml Kulturen mit selektierten Klonen (Kapitel 4.1.8) und Inkubation für 16 h bei 37°C
- Isolation von pDNA der Kulturen und analytischer Restriktionsverdau mit 300 ng pDNA und der Restriktionsendonuklease *KpnI* zum Test auf positive Insertion der L1CAM Gensequenz in den pLenti CMV_PuroDest Vektor mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 4.1.4)
- Sequenzierung der pLenti CMV_L1CAM Klone mit positivem Insertionsereignis (Kapitel 4.1.13)

4.1.11 Klonierung der Plasmidkonstrukte zur miR-346 Überexpression

Für die Klonierung des Plasmids zur miR-346 Überexpression wurde zunächst die Zielsequenz der miR von der Onlineplattform miRBase (<http://www.mirbase.org>, Stand: März 2020) kopiert und mit der resultierenden Sequenz für die miRs auf der Onlineplattform ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>, Stand: März 2020) verglichen. Die Zielsequenz aus ENSEMBL dient dabei als Vorlage für den Entwurf der passenden Primer mit der Onlineanwendung Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, Stand: März 2020). Die Primer dienen dabei der Amplifikation der miR-Sequenz aus genomischer HEK293T DNA mittels *Touchdown* PCR (Kapitel 4.1.3). Für die anschließende Klonierung in den *pCR®4-TOPO* Vektor wurde den *forward* Primern jeweils eine *EcoRI* Schnittstelle und den *reverse* Primern eine *BamHI* Schnittstelle angefügt. Damit sichergestellt werden konnte, dass der Restriktionsverdau zu keiner Fragmentierung der amplifizierten Zielsequenz führt, wurde mit der NEBcutter V2.0 Onlineanwendung (<https://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/>, Stand: März 2020) auf mögliche Schnittstellen kommerziell erhältlicher Restriktionsenzyme getestet. Die verwendeten Primer sind unter Kapitel 3.7 aufgelistet.

Klonierung des miR-346 Überexpressionsvektors mittels *TOPO™TA Cloning™*:

- Nachweis der mittels *Touchdown* PCR amplifizierten Zielsequenz durch eine Agarosegelelektrophorese (Kapitel 4.1.3)
- Klonierung von 4 µl des generierten PCR Produkts in *pCR®4-TOPO* Vektor mit *TOPO™TA Cloning™ Kit for Sequencing* (Invitrogen) nach Herstellerangaben
- Selektion der Klone mit positiver Insertion der Zielsequenz auf Ampicillin Agarplatten (100 µg/ml) mit 35 µl X-Gal (50 µg/ml) für 16 h bei 37°C
- Überführen von zehn Klonen mit positivem Insertionsereignis (auf Agarplatte erkennbar durch Blau-Weiß-Selektion: Klone mit positivem Insertionsereignis)

sind aufgrund der zerstörten beta Galactosidasesequenz weiß; negative Klone mit intakter beta Galactosidasesequenz erscheinen blau) von der Agarplatte in 5 ml LB-Medium

- Inkubation für 16 h bei 37°C in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) (Kapitel 4.1.8)
- Isolation von Plasmid DNA (pDNA) (Kapitel 4.1.9) und analytischer Restriktionsverdau mit 300 ng pDNA mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* (Kapitel 4.1.5) sowie Agarosegelelektrophorese (Kapitel 4.1.4) zur Auftrennung der Restriktionsfragmente mit dem Zweck der Identifizierung positiver Insertionsereignisse (Kapitel 4.1.4)
- Präparativer Restriktionsverdau des *pCR[®]4_miR-346* sowie pSG5 Vektors mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI*
- elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente und Elution der jeweiligen Zielbanden (pSG5 *Backbone*, miR-346 Zielsequenz) aus dem Agarosegel (Kapitel 4.1.4)
- Ligation der miR-346 Zielsequenz in den pSG5 Vektor (Kapitel 4.1.6)
- Transformation chemisch kompetenter *OneShot[®] TOP10 E. coli* Zellen nach Herstellerangaben (Invitrogen) mit 0,5 µl des Ligationsansatzes und Selektion auf Ampicillin (100 µg/ml) Agarplatten für 16 h bei 37°C
- Anlegen von 5 ml Kulturen (Kapitel 4.1.8) und Inkubation für 16 h bei 37°C
- Isolation der pDNA aus den Kulturen und analytischer Restriktionsverdau von 300 ng pDNA mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI*
- Sequenzierung der Klone mit positivem Insertionsereignis (Kapitel 4.1.13)

4.1.12 Klonierung der Plasmidkonstrukte zur miR-346 Bindestudie

Um die Bindung der miR-346 an der vermuteten Bindestelle in der 3'-UTR von *L1CAM* zu überprüfen wurde ein Reporterplasmid kloniert. Die Sequenz der miR-346 Bindestelle, welche in die *multiple cloning site* (MCS) vor das Luciferase Gen des *pMIR-REPORT[®] miRNA Expressions* Vektors (Applied Biosystems) kloniert wurde, führt im Fall einer Bindung der miR-346 zu einer reduzierten Luciferase Expression. Die Expression der Luciferase wurde anschließend in einem Luciferase Assay über die Luciferaseaktivität quantifiziert.

Mittels TargetScanHuman 7.2 Onlineanwendung (http://www.targetscan.org/vert_72/, Stand: März 2020) wurde die potentielle Bindestelle der miR-346 identifiziert. Wie in Kapitel 4.1.11 beschrieben, wurden dazu passende Primer entworfen. Dem *forward* Primer wurde dabei eine *SpeI* Schnittstelle und dem *reverse*-Primer eine *SacI*-Schnittstelle für die weitere Klonierung angefügt. Die TOPO-TA Klonierung wurde analog zu dem in Kapitel 4.1.11 beschriebenen Ablauf durchgeführt. Die miR-346 Bindestelle wurde durch enzymatische Restriktion mit den Endonukleasen *SpeI* und *SacI* aus dem resultierenden *pCR[®]4-TOPO_miR-346-BS* Vektor geschnitten und in

den *pMIR-REPORT® miRNA Expressions* Vektor ligiert. Der resultierende *pMIR-REPORT®_miR-346-BS* Vektor wurde im Anschluss sequenziert (Kapitel 4.1.13).

4.1.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgreich klonierter Plasmide wurde extern von der Firma Microsynth AG mit der Sanger Methode durchgeführt. Für die Analyse wurden je 1,2 µg Plasmid-DNA in 20 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Die jeweiligen Sequenzierprimer wurden zu je 10 mM in 30 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt und in separaten Reaktionsgefäßen eingeschickt. Die Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte mit der *Clone Manager Professional (9) Software*.

4.1.14 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird einzelsträngige RNA mittels einer viralen *Reversen Transkriptase* (RT) in doppelsträngige, komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. Wie bei allen DNA-abhängigen Polymerasen wird dabei ein Primer (Oligo-dT-Primer bzw. *random hexamer* Oligonukleotide) benötigt, der den Start der Replikation der RNA-Matrize ermöglicht (Coffin, 1997).

Für die reverse Transkription von RNA wurde in dieser Arbeit das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* verwendet. Für die Synthese wurden jeweils 0,3-1,0 µg RNA (standardmäßig 1,0 µg) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde bei jeder Synthese jeweils eine Probe ohne Reverse Transkriptase angesetzt, um etwaige Kontaminationen der Lösungen auszuschließen. Nach der Synthese wurde die Proben auf eine finale Konzentration von 10 ng/µl mit Nuklease-freiem Wasser eingestellt.

Die Synthese von cDNA aus jeweils 1,0 µg microRNA (miRNA-cDNA) erfolgte mit dem *EN-miScript PCR System* nach Herstellerangaben.

Nach der Synthese wurden die Proben der cDNA und der miRNA-cDNA jeweils bei -20°C gelagert.

4.1.15 Quantitative *Real-time*-PCR Analyse

Zur Analyse der Genexpression nach reverser Transkription (Kapitel 4.1.14) wurde die quantitative *Real-time*-PCR verwendet. Bei dieser Methode werden, ähnlich wie in der PCR (Kapitel 4.1.3), die Nukleinsäuren vervielfältigt, wobei zusätzlich die gebildeten Amplifikate quantifiziert werden können. Dazu wird entweder ein DNA-interkalierender

Farbstoff (SYBRTM Green), dessen Fluoreszenz proportional zur Anzahl der gebildeten Amplifikate nach der Interkalierung zunimmt oder eine sequenzspezifische Sonde (TaqMan[®]-Sonde) verwendet. In beiden Fällen flankieren sequenzspezifische Primer den zu amplifizierenden Genabschnitt, wodurch die Replikation ermöglicht wird.

Im Fall des TaqMan[®] Assays bindet die sequenzspezifische Sonde zwischen den Oligonukleotidprimern auf dem zu amplifizierenden Genabschnitt. Die Sonde ist dabei kovalent am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, dessen Fluoreszenz durch einen am 3'-Ende gekoppelten Quencher unterdrückt ist. Während der Elongation wird von einer DNA Polymerase mit 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Fluoreszenzfarbstoff von der Sonde getrennt. Das dabei detektierbare Fluoreszenzsignal ist proportional zur Menge gebildeter Amplifikate (Thermo-Fischer Scientific, 2020).

In dieser Arbeit wurden sowohl SYBRTM Green als auch TaqMan[®] Assays zur Quantifizierung der Genexpression verwendet. Für beide Assays wurde das 7300 Real-time-PCR System verwendet.

Für den TaqMan[®] Assay wurden die in Kapitel 3.8 aufgelisteten TaqManTM Expression Assays verwendet. In die Real-time-PCR wurden jeweils 50 ng cDNA pro Probe in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt und nach Herstellerangaben mit dem TaqMan[®] Gene Expression Master Mix in technischen Duplikaten angesetzt. Die Real-time-PCR Analysen folgten alle dem in Tabelle 5 aufgelisteten Temperaturprogramm. Als interne Referenz diente in allen TaqManTM Realtime Assays die 18-S ribosomale Untereinheit.

Tabelle 5: Ablauf einer TaqMan[®] Real-time-PCR Analyse.

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Initiale Heizphase	2 min	50°C	1
Initiale Denaturierung	10 min	95°C	1
Denaturierung	15 s	95°C	40
Hybridisierung	60 s	60°C	

Für die SYBRTM Green Real-time-PCR Analysen wurden die in Abschnitt 3.7.2 aufgelisteten, sequenzspezifischen Primerpaare in einer Konzentration von 10 mM verdünnt und nach Protokoll des Herstellers mit dem SYBRTM Green PCR Master Mix angesetzt. In die Real-time-PCR Analysen wurden jeweils 10 ng cDNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt.

Tabelle 6: Ablauf einer SYBRTM Green Real-time-PCR Analyse (Primer T_m≥60°C).

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
UDG Aktivierung	2 min	50°C	1
Dual-Lock TM DNA Polymerase	2 min	95°C	1
Denaturierung	15 s	95°C	40
Hybridisierung/ Elongation	30 s	60°C	
Schmelzkurve	-	-	1

Die Real-time-PCR Analysen wurden mit dem in Tabelle 6 aufgelisteten Temperaturprofil durchgeführt. Als interne Referenz diente in allen SYBRTM Green Real-time-PCR Assays die humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (hGAPD). Für die Quantifizierung der Expression von reifen miRNAs wurde der *miScript HiSpec Buffer* aus dem *miScript PCR Starter Kit* (QIAGEN) mit sequenzspezifischen Primern (Kapitel 3.7.3) und der 5.8-S RNA als interne Kontrolle verwendet. Für die Real-time-PCR Analysen wurden 7,5 ng miRNA-cDNA eingesetzt und das Real-time-PCR Gerät entsprechend dem in Tabelle 7 gelisteten Temperaturprofil programmiert.

Tabelle 7: Ablauf einer miScript HiSpec Real-time-PCR Analyse zur Quantifizierung der miRNA Expression.

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Initiale Heizphase	15 min	95°C	1
Denaturierung	15 s	94°C	40
Hybridisierung	30 s	55°C	
Elongation	34 s	70°C	

Die Quantifizierung der Zielgenexpression erfolgte relativ zu der Expression eines internen, konstitutiv exprimierten Referenzgens mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Beim sogenannten *threshold cycle* (C_T -Wert) überschreitet die Fluoreszenz erstmals die Hintergrundfluoreszenz und stellt gleichzeitig den Übergang in die exponentielle Zunahme des Fluoreszenzsignals dar (Kück & Bunse, 2005). An der Stelle, an der die Fluoreszenzkurve der jeweiligen Probe den C_T -Wert überschreitet, wird der Probe ihr jeweiliger C_T -Wert zugeordnet. Zur Auswertung wird zunächst der C_T -Wert des Referenzgens von C_T -Wert des Zielgens subtrahiert und somit der ΔC_T -Wert analog zu Formel (2) gebildet. Im weiteren Schritt erfolgt die Subtraktion des C_T -Wertes einer festgelegten Kontrollprobe von der eigentlichen Probe (3).

$$\Delta C_T = C_T \text{Zielgen} - C_T \text{Referenzgen} \quad (2)$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{Probe} - \Delta C_T \text{Kontrolle} \quad (3)$$

Die relative Expression (*relative quantification*, RQ) wird nach dem in Formel (4) dargestellten Bezug berechnet.

$$RQ = 2^{(-\Delta\Delta C_T)} \quad (4)$$

Die Auswertung der *Realtime* Läufe erfolgte mit der *Sequence Detection Software* 1.4.0.25 (Applied Biosystems).

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Proteinisolation aus Zelllysaten

Für die Isolation von Proteinen aus Zelllysaten wurden 5×10^6 Zellen mit 900 rcf für 3 min pelletiert und in 1 ml 4°C kalten *Dulbecco's Phosphate-buffered Saline* (DPBS) resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut pelletiert und in 60 µl RIPA Lysepuffer aufgenommen (Kapitel 3.14) (Spruck *et al.*, 2006). Die Zellen wurden bei 4°C auf dem Rundschüttler mit 50 U/min für 30 min in einem 1,5 ml Kunststoffreaktionsgefäß inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 10.000 rcf und 4°C für 30 min zentrifugiert, um Verunreinigungen und Zellreste abzutrennen. Das im Überstand suspendierte Protein wurde im Anschluss quantifiziert (Kapitel 4.2.2). Die Proteinüberstände wurden bei -80°C gelagert.

4.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung des Gesamtproteingehalts der Proteinsuspensionen aus Kapitel 4.2.1 erfolgte mit dem sogenannten Bicinchinonsäure (BCA) Assay. Der Assay beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen die mit jeweils zwei Biuret-molekülen einen violetten, wasserlöslichen Farbkomplex bilden. Die Farbintensität ist dabei proportional zu der Menge des gelösten Proteins (Lottspeich & Engels, 2012).

In dieser Arbeit wurde das *BCATM Protein Assay Reagent Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proben wurden dafür in einer 96-well Platte jeweils in Duplikaten 1:10 und 1:20 mit dem RIPA Lysepuffer (Kapitel 3.14) verdünnt, der zudem als Referenz verwendet wurde. Die Detektion der Absorptionswerte erfolgte im Spektralphotometer (*Epoch Reader*) bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Absorptionswerte wurden im weiteren Verlauf auf eine BSA Standardregression mit festgelegten Proteinkonzentrationen von 25, 125, 250, 500, 750, 1.000, 1.500 und 2.000 µg/ml bezogen und konnten so zur Berechnung der jeweiligen Proteinkonzentration verwendet werden.

4.2.3 Vorbereitung von Proteinproben für die SDS-PAGE

Für die in Kapitel 4.2.4 beschriebene Auftrennung der Proteinproben wurde 30-60 µg Protein in insgesamt 30 µl RIPA Lysepuffer (Kapitel 3.14) aufgenommen und mit 10 µl 4x Laemmli Puffer, dem zuvor 10% β-Mercaptoethanol zugegeben wurden, versetzt. Im Fall der Kulturüberstände wurden 30 µl zellfreier Kulturüberstand direkt mit 4x Laemmli Puffer versetzt. Die Proben wurde im Anschluss bei 95°C für 5 min hitzedenaturiert bevor sie auf Eis abgekühlt wurden. Die fertigen Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgt mittels der denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Nach der Denaturierung der Proteinproben durch Zugabe von reduzierenden Agenzien (Dithiothreitol oder β-Mercaptoethanol), welche die Disulfidverbindungen zwischen den Thiolgruppen vorwiegend der Cysteine aufbricht sowie dem Erhitzen der Proben wird die Tertiärstruktur der Proteine zerstört (Kapitel 4.2.3). Die Zugabe von SDS während der Gelelektrophorese dient dem Maskieren der Ladungen der unterschiedlichen Aminosäureseitenketten, sodass die Proteine im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden (DAVIS, 1964). In dieser Arbeit wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Davis (DAVIS, 1964) gewählt, bei der die Probenproteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert und danach in einem Trenngel aufgetrennt werden. Zur Auftrennung wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Sammel- und Trenngel mit einer Stärke von 1,5 mm gegossen.

Tabelle 8: Komponenten der in dieser Arbeit verwendeten Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele.

Komponente	5% Sammelgel	10% Trenngel
Millipore Wasser	4.124 µl	3.961 µl
30% Acrylamid/Bis-Lösung	1.000 µl	3.333 µl
1,0 M Tris/HCl, pH 6,8	750 µl	-
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	-	2.500 µl
10% SDS	60 µl	100 µl
10% APS	60 µl	100 µl
TEMED	6 µl	6 µl

Für die Elektrophorese wurde das *Bio-Rad Laboratories Mini Protean II™* System (Bio-Rad) verwendet, das mit 1x SDS-Laufpuffer (Kapitel 3.14) befüllt wurde. Die Gele wurden mit 40 µl (Gel mit 10 Taschen) bzw. 20 µl (Gel mit 15 Taschen) der Proben

beladen. Von den molekularen Größenstandards (*PageRuler (Plus) Protein Ladder*; Fermentas) wurden jeweils 10 μ l (Gel mit 10 Taschen) bzw. 5 μ l (Gel mit 15 Taschen) aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 125 V für 90-105 min.

4.2.5 Western Blot und Immundetektion

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden beim sogenannten Western Blot (WB) die Proteine aus dem SDS Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und behalten dabei ihre vorherige Anordnung wie auf dem Gel bei. Die Proteine auf der Membran können anschließend durch die Bindung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Towbin *et al.*, 1979).

Nach dem Lauf der SDS PAGE wurden die Gele zunächst für 3 min in 1x Blotting Puffer (Kapitel 3.14) equilibriert. Die für den WB verwendeten Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden ebenfalls in 1x Blotting Puffer angefeuchtet. Für den WB wurde die *Trans-Blot®SD Transfer Cell* Apparatur verwendet. Das Blotten erfolgte bei 100 V für 1,5 h und Raumtemperatur (Proteine <180 kDa) sowie bei 60 V für 12 h und 4°C (Proteine >180 kDa).

Nach dem Blotvorgang wurde die Nitrozellulosemembran kurz mit Millipore Wasser gewaschen und zum Überprüfen des Proteintransfers für 1 min mit Ponceau S Lösung (Kapitel 3.14) inkubiert. Im Fall der analysierten Kulturüberstände wurden die Ponceaubanden auf Höhe von ca. 75 kDa als Kontrolle für die gleichmäßige Probenbeladung verwendet (Abbildung 4).

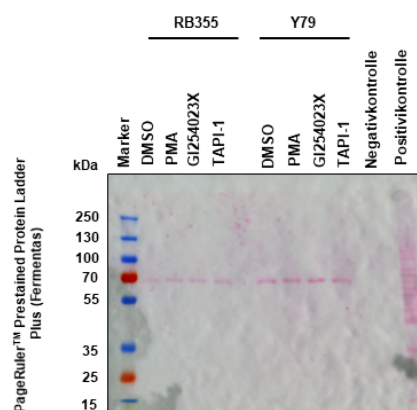


Abbildung 4: Darstellung einer Ponceaufärbung von Proben aus dem Überstand von RB Zellkulturen.

Als Ladekontrolle und für die Quantifizierung der Western Blots zum Nachweis der L1CAM Ektodomäne in Kulturüberständen wurden die Blots mit Ponceau S gefärbt und die Bandenintensität der mittels Chemilumineszenz detektierten L1CAM Banden darauf normiert. Der Blot zeigt repräsentative Proben der Quantifizierung von L1CAM im Kulturüberstand von RB Zellen, die mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder in Kombinationen von PMA mit den spezifischen ADAM10 (GI254023X) bzw. ADAM17 (TAPI-1) Inhibitoren behandelt wurden.

Durch einmaliges Waschen mit 0,1% TBS-T Puffer (Kapitel 3.14) wurde die Membran entfärbt. Um eine mögliche unspezifische Bindung der Primärantikörper zu unterbinden, wurde die Membran zunächst 60 min bei Raumtemperatur mit 20 ml des entsprechenden Block Puffers auf dem Schüttler bei 100 rpm und 25°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers unter den in Tabelle 9 gelisteten Bedingungen für 16 h bei 4°C auf einem Taumelschüttler.

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper, die jeweiligen Verdünnungen sowie die Blockier- und Verdünnungslösungen.

Antikörper	Verdünnung	Blockierlösung	Primärantikörperinkubationslösung
anti-β-Aktin	1:1.000	0,1% TBS-T + 5% BSA	0,1% TBS-T
anti-ADAM10	1:1.000	0,1% TBS-T + 5% BSA	0,1% TBS-T + 5% BSA
anti-ADAM17	1:1.000	0,1% TBS-T + 5% BSA	0,1% TBS-T + 5% BSA
anti-Ezrin	1:1.000	0,05% TBS-T + 5% Milchpulver	0,05% TBS-T + 5% Milchpulver
anti-FGfB		0,1% TBS-T + 5% Milchpulver	0,1% TBS-T + 5% Milchpulver
anti-Galectin-3	1:2.000	0,1% TBS-T + 5% Milchpulver	0,1% TBS-T + 5% Milchpulver
anti-L1CAM	1:1.000	0,05% TBS-T + 5% Milchpulver	0,05% TBS-T + 5% Milchpulver
anti-L1CAM [2C2]	1:1.000	0,1% TBS-T + 5% BSA	0,1% TBS-T + 5% BSA
anti-Vimentin	1:1.000	0,1% TBS-T + 5% BSA	0,1% TBS-T + 2% BSA

Am Folgetag wurde die Membran dreimal je 5 min (anti-L1CAM je dreimal 10 min) mit 1x TBS-T gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Kapitel 3.6.2) in 20 ml 0,1% TBS-T für 60 min bei 25°C auf einem Schüttler mit 100 rpm inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 0,5 ml *Western Bright™ Peroxide* mit 0,5 ml *Western Bright™ Quantum* nach Herstellerangaben angesetzt und auf die Membran pipettiert. Die Chemilumineszenz wurde mit einem *Celvin S Chemiluminescence Reader* (Biostep) detektiert und die *Snap and Go 1.8.3* Software ausgewertet. Die Quantifizierung der Signalintensitäten wurde mit *MicroManager 1.4* durchgeführt.

4.2.6 Proteom Arrays

Für die Untersuchung der Effekte des L1CAM *Knockdowns* auf die differentielle Phosphorylierung von Signalpeptiden sowie onkologisch relevanter Proteine wurde das *Human Phospho-Kinase Array Kit* (R&D) und das *Human XL Oncology Array Kit* (R&D) verwendet. Für das *Human Phospho Kinase Array Kit* wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen zur Proteinisolation verwendet und insgesamt 400 µg Protein eingesetzt. Für das

Human XL Oncology Array Kit wurden 1×10^7 Zellen verwendet und 100 μg Protein eingesetzt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte jeweils mit dem in Kapitel 3.2.2 beschriebenen BCA Assay unter der Verwendung des im jeweiligen Kit enthaltenen Lysepuffers nach Herstellerangaben. Mit dem jeweils im Kit enthaltenen Lysepuffers wurde, analog zu Kapitel 3.2.2, eine BSA Standardkurve pipettiert und gemessen. Die Arrays wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt und die Chemilumineszenz mit dem *Celvin S Chemiluminescence Reader* über einen Zeitraum von 30 min detektiert und mit der *Snap and Go 1.8.3* Software ausgewertet. Die Quantifizierung der Signalintensitäten wurde mit der *MicroManager 1.4* Software durchgeführt.

4.3 Transfektion und Transduktion von Zellen

4.3.1 Kultivierung der Zelllinien

Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Die Zellen wurden unter konstanten Bedingungen in CO_2 -Inkubatoren in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5% (HEK293T Zellen) bzw. 10% (RB Zellen) kultiviert. Die RB Zelllinien wurden in T25er bzw. T75er Zellkulturflaschen (FALCON) in RB-Vollmedium (Kapitel 3.12) kultiviert. Die embryonale Nierenzelllinie HEK293T wurde in 10 cm Zellkulturschalen in HEK293T-Vollmedium kultiviert (Kapitel 3.12). Tabelle 10 listet die Kultivierungsbedingungen der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien auf.

Tabelle 10: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Kultivierungsbedingungen.

Zelllinie	Kultivierungsmedium	Kulturgefäß
HEK293T	HEK293T-Vollmedium	10cm Zellkulturschale
Rbl-13	RB-Vollmedium	T25er bzw. T75er Flasche
Rbl-30	RB-Vollmedium	
RB247	RB-Vollmedium	
RB355	RB-Vollmedium	
RB355-Etop	RB-Vollmedium + 1 μM Etoposid	
RB355-GFP	RB-Vollmedium	
RB383	RB-Vollmedium	
WERI-Rb1	RB-Vollmedium	
WERI-Etop	RB-Vollmedium+ 5 μM Etoposid	
WERI-GFP	RB-Vollmedium	
Y79	RB-Vollmedium	
Y79-GFP	RB-Vollmedium	
Y79-Etop	RB-Vollmedium + 3 μM Etoposid	

4.3.2 Subkultivierung

Die RB Zelllinien wurden ab einer Konfluenz von 80% passagiert. Das Medium der Zellen wurde dabei entfernt und durch frisches, vorgewärmtes RB-Vollmedium (Kapitel 3.14) ersetzt. Je nach Dichte und Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien wurden diese 1:4 bis 1:20 verdünnt und weiterkultiviert.

Die adhärent wachsenden RB355 Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in einem Verdünnungsverhältnis von 1:4 in einer neuen Zellkulturflasche und frischem RB-Vollmedium weiterkultiviert.

Die embryonale Nierenzelllinie HEK293T wurde zum Subkultivieren zunächst mit 2-3 ml vorgewärmten DPBS gewaschen bevor sie durch Zugabe von 1 ml 0,25%-Trypsin/EDTA-Lösung enzymatisch von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst wurden. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml HEK293T-Vollmedium (Kapitel 3.14) abgestoppt und die Zellen in einem 15 ml Kunststoffzentrifugenröhrchen bei 900 rcf 3 min pelletiert. Die Zellen wurde für die Weiterkultivierung in frischem HEK293T-Vollmedium auf eine neue 10 cm Zellkulturschale in einem Verdünnungsverhältnis von 1:20 ausgesät.

4.3.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für die dauerhafte Lagerung von Zellkulturen wurden 1×10^7 Zellen in 1 ml FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden im Anschluss schrittweise (ca. $1^\circ\text{C}/\text{h}$) in einem Isopropanolbad auf -80°C heruntergekühlt bevor sie zur dauerhaften Lagerung bei -196°C in flüssigem Stickstoff überführt wurden.

Zum Auftauen wurden die Zellen kurzzeitig bei 37°C erwärmt und anschließen in 10 ml vorgewärmten RB-Vollmedium aufgenommen und bei 900 rcf für 3 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml vorgewärmten RB-Vollmedium (Kapitel 3.14) aufgenommen und für 24 h kultiviert. Am Folgetag wurde das Medium erneut gewechselt, um verbleibendes DMSO und abgestorbene Zellen zu entfernen.

4.3.4 Zellzahlbestimmung

Mittel Neubauer Zählkammer und Trypanblauausschlussfärbung erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl sowie des prozentualen Anteils toter Zellen in der Kultur. Dazu wurden jeweils 10 μl 0,4% Trypanblaulösung mit 10 μl Zellsuspension

vermischt. Die ungefärbten, vitalen Zellen wurden in jeweils vier Großquadraten im inversen Durchlichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde mit Formel (5) bestimmt.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Gesamtzellzahl}}{4} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad (5)$$

Für die Bestimmung des prozentualen Anteils toter Zellen wurde zusätzlich die Zahl der Trypanblau-positiven Zellen ermittelt und auf die Gesamtzellzahl normiert.

4.3.5 Transiente Transfektion

Mit Hilfe der transienten Transfektion kann die plasmidvermittelte Expression eines bestimmten Gens in Zielzellen erreicht werden. In dieser Arbeit wurde die transiente Transfektion gewählt, um eine Überexpression von L1CAM in Rbl-30 und RB247 Zellen sowie der miR-146a-5p in RB355, WERI-Rb1 und Y79 Zellen zu erzielen. Die RB Zelllinien wurden (gemäß Tabelle 11) 24 h vor der Transfektion in entsprechender Zellzahl in 2 ml RB-Vollmedium ohne Penicillin/Streptomycin in 6-well Platten ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert.

Tabelle 11: Auflistung der zelllinienspezifischen Transfektionsbedingungen mit *FuGENE[®]HD* Transfektionsreagenz (Promega).

Zelllinie	Zellzahl	Transfektionskomplexe
Rbl-30	4x10 ⁵	<i>FuGENE[®]HD</i> :pDNA (5:1) w/v
RB247	3x10 ⁵	<i>FuGENE[®]HD</i> :pDNA (5:1) w/v
RB355	5x10 ⁵	<i>FuGENE[®]HD</i> :pDNA (4:1) w/v
WERI-Rb1	5x10 ⁵	<i>FuGENE[®]HD</i> :pDNA (4:1) w/v
Y79	5x10 ⁵	<i>FuGENE[®]HD</i> :pDNA (4:1) w/v

Am Folgetag wurden pro Vertiefung der 6-well Platte 4 µg Plasmid DNA mit *FuGENE[®]HD* Transfektionsreagenz (Promega) in einem Gesamtvolumen von 200 µl DMEM ohne Zusätze gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Transfektionskomplexe zu den Zellen gegeben, sodass die Plasmide in einer Konzentration von 2 µg/ml vorlagen.

Die angesetzten Transfektionskomplexe wurden durch Vortexen vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. 50 µl der Transfektionsansätze wurden jeweils zu den Zellen pipettiert und für 48 h bei Standardbedingungen inkubiert bevor die Zellen analysiert wurden.

4.3.6 Herstellung lentiviraler Partikel

Für den stabilen Knockdown bzw. die Überexpression von L1CAM in den RB Zelllinien wurden die Zellen mit lentiviralen Partikeln behandelt. Im Folgenden ist die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Lentiviren beschrieben und in Tabelle 12 gelistet.

Tabelle 12: Auflistung der in dieser Arbeit hergestellten, lentiviralen Partikel.

Lentivirus	verwendetes Expressionsplasmid	integrierendes Gen und Resistenz	Verwendung
Lentivirus_FF3	pPRIME-CMV-Neo-FF3	Firefly Luciferase	shRNA gegen <i>Firefly Luciferase</i> , Negativkontrolle bei <i>Knockdown</i> -Versuchen
Lentivirus_shL1#624	TRCN0000299624	shRNA gegen L1CAM, Puromycinresistenz	L1CAM- <i>Knockdown</i>
Lentivirus_shL1#625	TRCN0000299625	shRNA gegen L1CAM, Puromycinresistenz	L1CAM- <i>Knockdown</i>
Lentivirus_shL1#668	TRCN0000303668	shRNA gegen L1CAM, Puromycinresistenz	L1CAM- <i>Knockdown</i>
Lentivirus_shL1#735	TRCN0000303735	shRNA gegen L1CAM, Puromycinresistenz,	L1CAM- <i>Knockdown</i>
Lentivirus_shL1#751	TRCN0000310751	shRNA gegen L1CAM, Puromycinresistenz	L1CAM- <i>Knockdown</i>
Lentivirus_shL1#913	TRCN0000063913	shRNA gegen L1CAM, Puromycinresistenz	L1CAM- <i>Knockdown</i>
Lentivirus_shL1#914	TRCN0000063914	shRNA gegen L1CAM, Puromycinresistenz	L1CAM- <i>Knockdown</i>
Lentivirus_shL1#915	TRCN0000063915	shRNA gegen L1CAM, Puromycinresistenz	L1CAM- <i>Knockdown</i>
Lentivirus_shL1#916	TRCN0000063916	shRNA gegen L1CAM, Puromycinresistenz	L1CAM- <i>Knockdown</i>
Lentivirus_shL1#917	TRCN0000063917	shRNA gegen L1CAM, Puromycinresistenz	L1CAM- <i>Knockdown</i>
Lentivirus_leer	pLenti CMV_Puro Dest	Puromycinresistenz	Negativkontrolle bei Überexpression von L1CAM
Lentivirus_L1CAM	pLenti CMV_L1CAM	L1CAM, Puromycinresistenz	Überexpression von L1CAM
Lentivirus_eGFP	pCL7EGwo	GFP	GFP-Expression

Herstellung lentiviraler Partikel:

- Aussäen von 6×10^6 HEK293T Zellen in 10 ml HEK293T Vollmedium auf 10 cm Zellkulturplatten und Kultivierung bei Standardbedingungen für 24 h
- Austausch des HEK293T Vollmediums durch 4 ml DMEM mit 15% FBS
- Aufnahme von jeweils 6 μ g lentiviraler Verpackungs- und Replikationsplasmide pCD/NL-BH, pczVSV-G (Kapitel 3.10.2) sowie des jeweiligen Expressionsplasmids in DMEM ohne Zusätze in 1ml Gesamtvolumen
- Zugabe von 45 μ l Polyethylenimin (PEI) Stammlösung (1 mg/ml) je Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen DMEM ohne Zusätze

- Mischen des PEI Ansatzes mit der Plasmidsuspension (insgesamt 18 µg Plasmid DNA) mittels Vortexer für 20s und Inkubation für 30 min bei 25°C
- Zugabe von 2 ml PEI/DNA Lösung und Inkubation für 24 h bei 10% CO₂ und 37°C
- Ersetzen des Kulturmediums durch 10 ml supplementierten IMDM Medium (Kapitel 3.13)
- Filtrieren der Kulturüberstände mittels Spritzenfilter (0,45 µm Porengröße) und Aliquotieren der Überstände zu je 3 ml in 4 ml Kryoröhrchen
- Lagerung der Virusüberstände bei -80°C

4.3.7 Lentivirale Transduktion

Bei der lentiviralen Transduktion wird, anders als bei transienten Transfektion, das Zielgen stabil aber ungerichtet in das Genom der Zielzelle integriert. In dieser Arbeit wurde die stabile Transduktion verwendet, um einen dauerhaften *Knockdown* von *L1CAM* in den verschiedenen RB Zelllinien zu erreichen sowie eine stabile Überexpression von *L1CAM* zu erzielen.

Lentivirale Transduktion:

- Aussäen von $1,75 \times 10^7$ RB Suspensionszellen in insgesamt 15 ml RB Vollmedium in T25er Flaschen bzw. $1,75 \times 10^7$ adhärenente RB355 Zellen in 20 ml RB-Vollmedium in T75er Flasche und Kultivierung für 24 h bei Standardbedingungen

Transduktion von Suspensionszellen:

- Zentrifugation der Zellsuspension bei 900 rcf für 3 min in 50 ml Kunststoffzentrifugenröhrchen und Verwerfen der Kulturüberstände
- Aufnahme des Zellpellets in 12 ml Lentivirussuspension mit 60 µl Hexadimethrinbromidstammlösung (1 mg/ml Polybrene in 0,9% NaCl)
- Überführen der Suspensionszellen in T25er Flaschen und Inkubation für 24 h
- Zugabe von 24 ml RB-Vollmedium und Inkubation der Zellen für 48 h unter Standardbedingungen
- Zentrifugation der Zellsuspension bei 900 rcf für 3 min und Austausch des Zellkulturmediums durch 20 ml RB-Vollmedium
- Inkubation in T25er Flaschen für 72 h bei Standardbedingungen

Transduktion adhärenenter RB Zellen:

- Zentrifugation der Kulturüberstände (enthält nicht abgesetzte Zellen) bei 900 rcf für 3 min
- Aufnahme des Zellpellets in 12 ml Lentivirussuspension mit 60 µl Hexadimethrinbromidstammlösung (1 mg/ml Polybrene in 0,9% NaCl)
- Überführen der Virussuspension mit den Zellen in T75er Flasche mit bereits adhärenierten Zellen und Inkubation für 24 h
- Zugabe von 24 ml RB-Vollmedium und Inkubation für 48 h unter Standardbedingungen

- Entfernen des Zellkulturmediums von den adhären Zellen und Austausch des Zellkulturmediums durch 20 ml RB-Vollmedium
- Verwerfen nicht abgesetzter oder bereits abgelöster Zellen
- Inkubation für 72 h bei Standardbedingungen

- Ermittlung der Effizienz des *Knockdowns* bzw. der Überexpression mittels *Real-time*-PCR und Ansetzen der funktionellen *in vitro* und *in vivo* Versuche

Im Fall der WERI-Rb1 Zellen wurde nach der lentiviralen Transduktion eine fünftägige Selektion durch Zugabe von 0,3 µg/ml Puromycin in das Zellkulturmedium durchgeführt. Der Kontrollansatz von Lentivurs_FF3 behandelten Zellen wurde in dieser Zeit in RB-Vollmedium ohne Puromycin kultiviert. Für die Vergleichbarkeit von Kontrollzellen und *Knockdown* Zellen nach der Puromycinselektion wurden die *Knockdown* Zellen weitere 72 h in RB-Vollmedium ohne Puromycin kultiviert. Somit konnten etwaige Effekte der Puromycinbehandlung auf die Zellviabilität und Apoptoserate minimiert werden.

Zur lentiviralen Transduktion mit dem Ziel der L1CAM Überexpression wurden die RB247 Zellen wie im oberen Abschnitt beschrieben transduziert. Nach der Transduktion und der 72 stündigen Inkubation in RB-Vollmedium wurden die Zellen einer 14-tägigen Behandlung mit 0,5 µg/ml Puromycin unterzogen. Das Medium wurde in dieser Zeit zweimal wöchentlich (dienstags, freitags) erneuert. Nach der Transduktion und der Selektion wurden die Zellkulturen jeweils auf drei verschiedene Zellkulturflaschen aufgeteilt und getrennt voneinander kultiviert. Aus den drei Flaschen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten/Passagen Zellproben genommen, um eine stabile Expression von L1CAM nachweisen zu können.

4.4 Funktionelle *in vitro* Analysen

4.4.1 Zellviabilitätsmessung

Für die kolorimetrische Messung der Zellviabilität wurde in dieser Arbeit der WST-1 (*water soluble tetrazolium 1*) Assay verwendet. Bei diesem Assay wird die enzymatische Spaltung des im Wasser löslichen Tetrazoliumsalzes (WST-1 Reagenz) zu einem wasserunlöslichen Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysiert. Das ausgefallene Formazan bewirkt einen Farbumschlag, der photometrisch messbar ist (Peskin & Winterbourn, 2000).

- Aussäen von 4×10^4 Zellen in 100 µl RB-Vollmedium je Vertiefung in eine 96-well Platte

- Inkubation für 48h bis 72 h bei Standardbedingungen
- Zugabe von 10 µl der WST-1 Gebrauchslösung zu jeder Vertiefung
- Quantifizierung in Abständen von 30 min, 60 min und 120 min im Spektralphotometer (*EpochReader*, BioTek®) durch Detektion der maximalen Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm

4.4.2 4',6-Diamidin-Phenylindol-Zelltotassay

Zur Detektion von Apoptose wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) behandelt. Der Farbstoff lagert sich an die DNA an, sodass die Chromatinstruktur fluoreszenzmikroskopisch beurteilt werden kann. Apoptotische Zellen zeigen dabei eine kondensierte Chromatinstruktur sowie bereits abgeschnürte Vesikel (*apoptotic bodies*) (Collins *et al.*, 1997).

- Aussäen von 1×10^4 Zellen auf Poly-D-Lysin-beschichtete 12 mm Deckgläschen in 100 µl RB-Vollmedium
- Inkubation für 12 h bei Standardbedingungen (Poly-D-Lysin Beschichtung der Deckgläschen: Auslegen der einzelnen Deckgläschen in Vertiefungen einer 24-well Platte und Inkubation mit 500 µl Poly-D-Lysin Lösung (10 µg/ml in PBS) für 60 min bei 4°C; einmaliges Waschen der Deckgläschen mit PBS)
- Überführen der Deckgläschen mit abgesetzten Zellen in eine 24-well Platte
- Fixieren der Zellen mit 500 µl 4% PFA für 60 min bei 4°C
- Dreimaliges Waschen der Deckgläschen mit jeweils 500 µl PBS
- Eindecken mit Eindeckmedium (DAKO mit 2 µg/ml DAPI) auf Objektträger
- Trocknen der Objektträger für 24 h bei 4°C im Dunkeln
- Auswertung von sechs Objektträger je Experiment und Auszählung von mindestens 500 Zellen pro Objektträger

4.4.3 5-Bromo-2'-desoxyuridine Zellproliferationsassay

Die Bestimmung der Zellproliferation wurde durch die Interkalierung von 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU) in die replizierende DNA bestimmt. Anstelle der Base Thymin wird während der S2 Phase des Zellzyklus das Thymidin Analogon BrdU in die DNA eingebaut, welches durch einen spezifischen, monoklonalen Antikörper detektiert werden kann (Gratzner, 1982; Wynford-Thomas & Williams, 1986; deFazio *et al.*, 1987).

- Aussäen von 1×10^4 Zellen auf Poly-D-Lysin beschichtete 12 mm Deckgläschen (Beschichtung analog zu Kapitel 4.4.2) in 100 µl RB-Vollmedium supplementiert mit 10 µM BrdU und Inkubation für 4 h bei Standardbedingungen
- Fixierung für 60 min bei 4°C in 4% PFA
- dreimaliges Waschen der Deckgläschen mit PBS
- Permeabilisierung der Zellen in 300 µl PBS mit 1% Triton™ X-100 für 30 min bei 25°C
- Denaturierung der DNA für 60 min bei 37°C durch Inkubation der Deckgläschen in 300 µl 2 M Salzsäure

- Neutralisation der Salzsäure durch Inkubation der Deckgläschen in 300 μ l Borsäure/Natriumboratpuffer (Kapitel 3.14) für 15 min bei 25°C und anschließend dreimaliges Waschen mit PBS
- Blockierung unspezifischer Bindestellen des Primärantikörpers durch Inkubation in 500 μ l Block Puffer (1x PBS, 0,3% Triton, 4% Bovines Serumalbumin (BSA), 5% *Normal Goat Serum* (NGS)) für 60 min bei 25°C
- Verdünnung des Primärantikörpers gegen BrdU im Verhältnis 1:1.000 in Antikörperverdünnungslösung I (1x PBS, 4% BSA, 1% NGS)
- Inkubation in einer feuchten Kammer für 16 h bei 4°C
- dreimaliges Waschen mit PBS zum Entfernen überschüssiger Primärantikörper
- Inkubation mit einem Alexa- fluor[®]594-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1.000 in PBS, Invitrogen) für 60 min bei 25°C im Dunkeln
- Dreimaliges Waschen der Deckgläschen mit PBS
- Eindecken mit Eindeckmedium (DAKO mit 2 μ g/ml DAPI) auf Objektträger

Für die Auswertung wurden pro Ansatz jeweils sechs Objektträger wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben ausgezählt.

4.4.4 Wachstumskinetik

Zur Bestimmung der Wachstumskinetik wurden 1×10^5 Rbl-30 bzw. RB247 und 3×10^5 RB355 bzw. WERI-Rb1 Zellen in 500 μ l RB-Vollmedium in jeweils eine Vertiefung einer 24-*well* Platte in Triplikaten ausgesät. Die vitalen sowie tote Zellen wurden mit der Trypanblauausschlussfärbung alle 24 h über einen Zeitraum von 96 h mit der Neubauer Zählkammer gezählt (Kapitel 4.3.4).

4.4.5 Colony Formation Assay

Der *Colony Formation Assay* diente der Untersuchung der kontaktabhängigen Bildung von Kolonien aus vereinzelt Tumorzellen. Dabei wurde die Koloniebildungskapazität der L1CAM *Knockdown* Zellen bzw. der L1CAM-überexprimierenden Zellen mit den jeweiligen Kontrollen verglichen.

- Aussäen von 5.000 Zellen je Vertiefung in 2 ml RB-Vollmedium auf Poly-D-Lysin beschichtete 6-*well* Platten (Beschichtung analog zu Kapitel 4.4.2) und Inkubation für drei Wochen bei Standardbedingungen
- zweimal wöchentlich Medienwechsel
- Vollständiges Entfernen des Kulturmediums von den Zellen und Waschen der Zellen mit DPBS
- Inkubation der Zellen in 1 ml Kristallviolettlösung (0,25 g Kristallviolett in 10 ml ddH₂O, 10 ml Formaldehyd, 80 ml Methanol) bei Raumtemperatur für 1 h
- Entfernen der Kristallviolettlösung und Waschen mit Millipore-Wasser
- Fotodokumentation der Platten im LAS3000 Lumineszenzdetektor und Quantifizierung der Koloniedichte mit Hilfe der *Mikro-Manager* 1.4 Software

4.4.6 Soft Agarose Assay

Der *Soft Agarose Assay* diente in dieser Arbeit dem Vergleich der kontaktunabhängigen Koloniebildung von L1CAM *Knockdown* Zellen und L1CAM-überexprimierenden Zellen in Bezug zu den jeweiligen Kontrollzellen.

Es wurde 2x-konzentriertes, gebrauchsfertiges DMEM/F12 Medium angesetzt, steril filtriert und 1:1 mit jeweils 1% bzw. 0,7% Agarose gemischt. Dabei wurden alle Komponenten zuvor auf 37°C erwärmt. Für die untere Agaroseschicht wurden je Vertiefung einer 6-well Platte 2 ml der 0,5%-igen Basis-Agarose-DMEM/F12-Mischung pipettiert. Für die obere Soft-Agaroseschicht wurden zunächst 5.000 Zellen in 1 ml des DMEM/F12-Medium aufgenommen, mit 1 ml der 0,7%-igen Agarose versetzt und anschließend auf die ausgehärtete, Basis-Agarose pipettiert.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Agarosemischungen für den *Soft-agarose-Assay*.

Bezeichnung	Zusammensetzung
2xDMEM/F12-Medium, steril filtriert	1 g DMEM/F12 Pulver 0,4 g NaHCO ₃ ad 50 ml ddH ₂ O
2xDMEM/F12-Medium, gebrauchsfertig, steril filtriert	19,5 ml 2xDMEM/F12 5 ml FBS 0,5 ml Penicillin/Streptomycin 50 µl Insulin 50 µl 2-Mercaptoethanol
Basis-Agarose, 0,5%	2x-gebrauchsfertiges DMEM/F12-Medium 1%-Agarose in ddH ₂ O (autoklaviert)
Soft-Agarose, 0,35%	2x-gebrauchsfertiges DMEM/F12-Medium 0,7%-Agarose in ddH ₂ O (autoklaviert)

Am Folgetag wurden in jede Vertiefung der 6-well Platte 200 µl RB-Vollmedium pipettiert und die Ansätze für drei Wochen bei Standardbedingungen inkubiert. Zweimal pro Woche wurden 200 µl RB-Vollmedium auf die Ansätze gegeben. Die Koloniebildungseffizienz wurde durch manuelles Auszählen von Einzelzellen und koloniebildenden Zellen in sechs Sichtfeldern je Ansatz bestimmt. Die Größe einzelner Kolonien wurde mit dem Nikon Eclipse TS2 Mikroskop und der *IC Measure* Software (1.0) bestimmt. Je Ansatz wurden acht Kolonien vermessen und die Fläche dokumentiert.

4.4.7 Caspase Glo-3/7-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde der Caspase-Glo[®]3/7-Assay verwendet. Dazu wurden 9×10^4 Zellen in 300 μl RB-Vollmedium in einer 24-*well* Platte ausgesät und 24 h bei Standardbedingungen inkubiert. Am Folgetag wurden 80 μl der Zellsuspension in je eine Vertiefung einer weißen 96-*well* Platte (Nunc) pipettiert und mit 80 μl des Caspase-Glo[®]3/7-Reagenz vermischt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 2 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Lumineszenz im Lumineszenz-Reader Orion II Microplate Reader quantifiziert.

4.4.8 Behandlung von sensitiven Retinoblastomzellen mit Chemotherapeutika

Für die Untersuchung der Effekte der *L1CAM* Expression auf die Sensitivität gegenüber der Chemotherapeutika Vincristin, Etoposid und Cisplatin wurden jeweils 4×10^4 RB-Zellen in 100 μl RB-Vollmedium je Vertiefung einer 96-*well* Platte mit verschiedenen Konzentrationen der o.g. Chemotherapeutika behandelt. Die verwendeten Konzentrationen können dem Ergebnisteil dieser Arbeit entnommen werden. Nach 72 h Inkubation wurde ein Zellviabilitäts Assay, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Absorptionswerte der behandelten Zellen auf die jeweiligen Werte unbehandelter Kontrollgruppen bezogen.

4.4.9 Behandlung von Retinoblastomzellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat und ADAM Inhibitoren

Um die Effekte der Sheddasen ADAM10 und ADAM17 auf das Schneiden der *L1CAM* Ektodomäne untersuchen zu können, wurden RB355 und Y79 RB Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und der spezifischen ADAM Inhibitoren behandelt.

Um die optimale Konzentration von PMA herauszufinden, die zu einer gesteigerten Aktivierung der Sheddaseaktivität führt und eine detektierbare Menge der *L1CAM* Ektodomäne im Kulturüberstand bewirkt, wurden die RB Zellen mit PMA im Konzentrationsbereich von 25 nM bis 500 nM behandelt. Dazu wurden am Vortag der Behandlung 2×10^6 Zellen in einer 6-*well* Platte in 2 ml DMEM ohne Zusätze ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Zellen durch Zentrifugation bei 10.000 rcf für 15 min vom Überstand abgetrennt. 30 μl des zellfreien Kulturüberstands wurden anschließend mit

10 µl 4x Laemmli Puffer vermischt und für 5 min bei 95°C hitzedenaturiert. Die Proben wurden in der SDS Polyachrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und die spezifischen L1CAM Banden im Western Blot detektiert.

Für die Untersuchung der spezifischen ADAM Aktivität wurden die RB Zellen unter den oben genannten Bedingungen ausgesät und am Folgetag mit 50 nM (RB355) bzw. 500 nM (Y79) PMA für 30 min behandelt. Anschließend wurden 2 µM des spezifischen ADAM10 Inhibitors (GI254023X) bzw. 5 µM des spezifischen ADAM17 Inhibitors (TAPI-1) zu den Ansätzen pipettiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit DMSO, das Lösungsmittel der ADAM Inhibitoren und von PMA, behandelt. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Kulturüberstände sowie die Zellpellets gesammelt und für die Analyse mittels Western Blot aufgearbeitet.

Um die endogene Aktivität der ADAMs untersuchen zu können wurden die Zellen zu den oben genannten Bedingungen ausgesät und am Folgetag mit 2 µM und 5 µM der jeweiligen Inhibitoren behandelt. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Kulturüberstände sowie die Zellpellets gesammelt und für die Analyse mittels Western Blot aufgearbeitet.

4.4.10 miR-346 Bindestudie

Für die Untersuchung der Bindung von miR-346 an die vermutete Bindestelle in der 3'-UTR von *L1CAM* wurden (siehe Kapitel 4.1.11 und 4.1.12) die benötigten Überexpressions- und Reporterplasmide kloniert. Anschließend wurden die Plasmide in HEK293T Zellen transfiziert und die Aktivität der exprimierten Luciferase in einem Luciferase Assay quantifiziert.

Zur miRNA-346 Bindestudie wurden am Vortag der Transfektion 2×10^5 HEK293T Zellen je Vertiefung einer 24-well Platte in 500 µl HEK293T-Vollmedium ohne Penicillin/Streptomycin ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden die Transfektionskomplexe gemäß Tabelle 14 in DMEM ohne Zusätze angesetzt. Es wurden insgesamt 1 µg DNA (jeweils 0,2 µg der pMIR-Plasmide und 0,8 µg der pSG5-Plasmide) mit 3 µl *FuGENE*[®]*HD* je Ansatz vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die verschiedenen Transfektionsansätze wurden jeweils in technischen Duplikaten angesetzt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der *Fugene*[®]*HD* Transfektionsansätze für die miR-346-Bindestudie.

Ansatz	1	2	3	4	5
<i>FuGENE</i> [®] <i>HD</i> : DNA- Verhältnis (3:1)	0,2 µg pMIR_miR- 346-BS + 0,8 µg pSG5_miR- 346	0,2 µg pMIR + 0,8 µg pSG5	0,2 µg pMIR + 0,8 µg pSG5_miR- 346	0,2 µg pMIR_miR- 346-BS +0,8 µg pSG5	1,0 µg pCS2+_hrGFP

Die Zellen wurden insgesamt 48 h bei Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese einmal mit 500 µl DPBS gewaschen. Der Luciferase Assay wurde mit dem *Dual-Luciferase*[®] *Reporter Assay System* nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Detektion wurde das Luminometer GLOMAX 20/20 verwendet.

4.5 *In vivo* Studien

Zur Untersuchung der Invasivität, Metastasierung und Tumorbildung wurde der in der Arbeitsgruppe etablierte *in ovo* Chorioallantoismembran (CAM) Assay gewählt (Zijlstra *et al.*, 2002; Cimpean *et al.*, 2008; Ribatti, 2014, 2016; Ribatti *et al.*, 2020; Ribatti, 2021). Bei diesem Assay werden Tumorzellen direkt auf die CAM befruchteter Hühnereier appliziert (Abbildung 5) und erhalten Anschluss an das Gefäßsystem des Hühnchens, sodass innerhalb von 7 Tagen Inkubationszeit ein solider Tumor wachsen kann. Werden GFP-markierte Zellen in das venöse Gefäßsystem des Hühnerembryos injiziert, können diese an anderer Stelle der CAM oder in den Organen des Embryos Spontanmetastasen bilden oder aus dem Gefäßsystem in umliegendes CAM-Gewebe migrieren (Extravasation), was über Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie oder quantitativer *Real-time*-PCR nachgewiesen werden kann. Abbildung 5 zeigt eine schematische Übersicht des Modells.

Für den Assay wurden bereits befruchtete Hühnereier vom Brinkschulte GmbH & Co. KG Geflügelzucht (Senden, Deutschland) bezogen und bis zum Start der Bebrütungszeit für maximal 7 Tage bei 15°C gelagert. Zum Start der Bebrütung wurden die Eier in einen Inkubator bei 37,8°C und 60% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Eier wurden automatisch fünfmal täglich über einen Zeitraum von je 30 min gewendet.

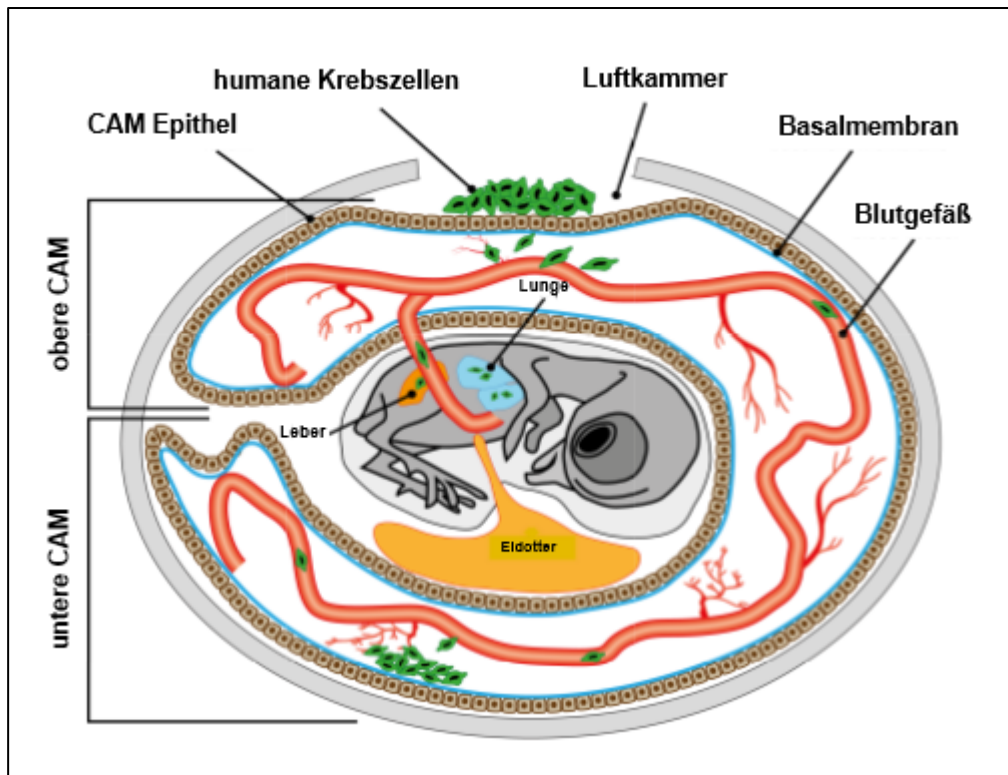


Abbildung 5: Schematische Übersicht über das Chorioallantoismembran (CAM) -Modell. Abbildung modifiziert nach (Dünker & Jendrossek, 2019).

4.5.1 Tumorbildung *in vivo*

Für die Untersuchung der Tumorbildung der RB Zelllinien wurde das oben beschriebene CAM Modell verwendet.

Inokulation der RB Zellen auf die CAM:

- Untersuchung der Hühnereier auf eine erfolgreiche Befruchtung an Entwicklungstag (E) 10 mittels Durchleuchtung mit einer starken Lichtquelle
- Markierung der Lage der CAM Gefäße mit einem Bleistift in Form eines 1 cm² großen Quadrates
- Bohren eines Lochs mit einer spitzen Schere an der stumpfen Eiseite, an der sich die Luftkammer befindet (ermöglicht das Absinken der CAM)
- Auffräsen der Eischale mit einem Rotationsschleifgerät entlang des markierten Quadrats
- Entfernen der Eischale mitsamt der Eihaut (Schalenhaut), sodass die intakte CAM absinken kann
- Anrauen der CAM Oberfläche über dem CAM Gefäß mit einem Wattestäbchen
- Inokulation von 1×10^6 Zellen zuvor aufgenommen in 50 μ l DPBS auf die CAM (für die Behandlungsversuche wurden die Zellen zuvor in DPBS mit entsprechender Konzentration des Chemotherapeutikums aufgenommen)
- Inkubation der Eier für 15 min bei 25°C
- Verschließen der Öffnung und des Lochs am stumpfen Eiende mit einem Klebestreifen
- Inkubation der Eier für weitere 7 Tage bis zum E17 ohne Wenden

Präparation der CAM Tumore und Quantifizierung von Tumorgroße und Gewicht:

- Kühlen der Eier an E17 für 15 min auf Eis (Betäubung des Embryos)
- Aufschneiden der Eier längsseitig mit einer Schere
- Entnahme des Embryos mitsamt dem Dottersack aus dem Ei und Tötung durch Dekapitation (Kontrolle auf korrekte Entwicklung des Embryos, Eier mit toten oder missgebildeten Embryonen wurde von der Auswertung ausgeschlossen)
- Spülen der Eihälfte, mit der durch den Klebestreifen verschlossenen Öffnung, mit DPBS
- Fotodokumentation der entstandenen Tumore von der Eiinnenseite mit dem Binokular SMZ1000 und der NIS Elements 3.22.15 Software
- Präparation des Tumors und Bestimmung von Tumorgroße sowie Tumorgewicht

4.5.2 *In vivo* Metastasen ModellInjektion von RB Zellen in CAM Gefäße:

- Markierung der Haupt-CAM-Gefäße an Entwicklungstag (E) 12 (wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben)
- Öffnen der Eischale (ohne die Luftkammer anzustechen, sodass die CAM nicht absinkt und die weiße Eihaut beim Entfernen der Schale intakt bleibt)
- Auftropfen von 30 μ l Mineralöl auf die Eihaut, um diese transparent zu machen (das darunter liegende CAM Gefäß wird dadurch gut sichtbar)
- Injektion von 1×10^6 GFP-markierte RB355 und WERI-Rb1 L1CAM *Knockdown* und Kontrollzellen sowie RB247 L1CAM Überexpressionszellen (siehe Kapitel 4.4.7) in 50 μ l DMEM ohne Zusätze in das CAM Gefäß unter dem Binokular Stemi DV4 mittels 30 G Einmalinsulinspritze
- Verschließen der Öffnung mit einem Klebestreifen
- Inkubation der Eier für weitere sechs Tage ohne Wenden

Präparation der CAM Stanzen:

- Öffnen der Eier an E18 wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben (Untersuchen der oberen Eihälfte mit der Öffnung für die Injektion auf Tumore oder Blutungen)
- Entnahme von jeweils sechs Stanzen (Eischale mit CAM) aus der unteren Eihälfte mit einer sterilen 8 mm Biopsiestanze (pfm medical)
- Abziehen der CAM mit einer desinfizierten Pinzette (Desinfektionsreihe: 10 M NaOH, Ethanol absolut und autoklaviertem Millipore-Wasser) von der Eischale/-haut
- Überführen der CAM Gewebestanden in eine 24-well Platte mit 500 μ l DPBS und Lagerung auf Eis bis zur weiteren Analyse
- Untersuchung der CAM Stanzen unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TS2) auf GFP-positive, grün-fluoreszierende Zellen (waren in mindestens drei der sechs Stanzen fluoreszierende Zellen detektierbar, wurde dieser Versuchsansatz zur weiteren Analytik verwendet)
- Lagerung der CAM Gewebestanden bei -80°C

Quantifizierung des Migrationspotentials der RB Zellen:

- Pulverisierung des CAM Gewebes in flüssigem Stickstoff mit einem Handmörser
- Isolation von RNA aus 30 mg des Gewebepulvers mit dem *NucleoSpin® RNA II Kit* (Macherey & Nagel) nach Herstellerangabe und Elution der RNA in 40 µl Nuklease-freies Wasser
- Umschreiben der isolierten RNA in cDNA (vgl. Kapitel 4.1.15)
- Erstellen einer Standardkurve mit bestimmten Verhältnissen von Zell RNA und CAM RNA gemäß Tabelle 15 und Umschreiben der gemischten RNA Proben in cDNA

Tabelle 15: Zusammensetzung der Standardkurve aus Zell RNA und CAM RNA.

Anteil Zell RNA	Anteil unbehandelter CAM RNA
0%	100% (1 µg)
0,01% (0,1 ng)	99,99% (999,9 ng)
0,05% (0,5 ng)	99,95% (999,5 ng)
0,1% (1 ng))	99,9% (999 ng)
1% (10 ng)	99% (990 ng)
5% (50 ng)	95% (950 ng)
10% (100 ng)	90% (900 ng)
20% (200 ng)	80% (800 ng)
100% (1 µg)	0%

Für die *Real-time-PCR* wurden die *TaqMan™* Assays zur Quantifizierung von humaner Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (hGAPDH) und der 18-S ribosomalen Untereinheit (18S), welche als interne Kontrolle dient, verwendet (Kapitel 2.8). Die *Real-time-PCR* wurde wie in Kapitel 4.1.15 beschrieben pipettiert und programmiert. Zur Auswertung wurden zunächst in Excel die C_T -Werte für die Standardkurve gegen die jeweiligen Konzentrationen der Zell RNA aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Anhand der resultierenden Geradengleichung konnte die Menge an hGAPDH in der jeweiligen CAM Probe in ng bzw. pg ermittelt werden.

4.5.3 Whole Mount- Färbung von CAM Gefäßen

Repräsentative CAM Stenzen von RB355-GFP Zellen, die mit pLenti_FF3-Kontrollvirus behandelt wurden, wurden für *Whole Mount* Färbungen (engl. *whole mount staining*) von CAM Gefäßen eingesetzt. Auf diese Weise konnte die Extravasation der RB Zellen in das umliegende CAM Gewebe dargestellt und bewiesen werden.

- Inkubation der zuvor präparierten CAM Stanzen für 12 h in je 500 μ l 4% PFA bei 4°C auf einem Schüttler mit 120 rpm in einer 24-well Platte
- Waschen der CAM Stanzen dreimal je 30 min in 500 μ l *Whole Mount* Waschpuffer (Kapitel 2.14) bei 25°C auf einem Schüttler mit 120 rpm
- Behandlung der CAM Stanzen mit 500 μ l Blockierlösung (PBS mit 3% BSA) für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 120 rpm
- Inkubation der CAM Stanzen mit dem anti-Desmin [D33] -Primärantikörper, 1:20 in PBS mit 3% BSA verdünnt, und Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer
- Einmaliges Waschen mit *Whole Mount* Waschpuffer für 10 min bei 25°C auf einem Schüttler mit 120 rpm
- Dreimaliges Waschen der CAM Stanzen für je 30 min in 500 μ l *Whole Mount* Waschpuffer mit 20% FBS bei 25°C auf einem Schüttler bei 120 rpm
- Inkubation der CAM Stanzen mit dem Alexa-fluor® 594 -anti-mouse Sekundärantikörper (1:1.000 in PBS verdünnt) über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit 120 rpm
- Dreimaliges Waschen der Stanzen mit *Whole Mount* Waschpuffer für je 30 min bei 25°C auf einem Schüttler mit 120 rpm
- Eindecken der Stanzen auf Objektträger mit Eindeckmedium und 24x24 mm Deckgläschen

4.6 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens in technischen Triplikaten durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde mit der GraphPad Prism 6 Software durchgeführt. Die Datensätze repräsentieren die Standardabweichung (*standard error of means*, \pm SEM) von mindestens drei unabhängigen Versuchsreihen unabhängiger RB-Zellkulturen. Die Ergebnisse wurden mit dem studentischen t-Tests (paarig, unpaarig) oder *one-way ANOVA* mit Newman-Keuls *Post-test* analysiert. Statistische Signifikanz wurde bei einem Wahrscheinlichkeitswert (p-value) von $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) oder $p < 0,001$ (***) angenommen. Für die Wachstumskurven wurde ein Permutationstest mit der Online-Application *compareCurves* (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/compareCurves/>, Stand März 2020) durchgeführt.

5 Ergebnisse

Entsprechend der Zielsetzung ist der Ergebnisteil dieser Arbeit in drei Abschnitte gegliedert. Der erste Abschnitt befasst sich mit der Rolle von L1CAM in verschiedenen RB Zelllinien und in Patientenproben. Durch die Regulation der L1CAM Expression sollte die Rolle von L1CAM auf funktioneller Ebene mittels verschiedener *in vitro* und *in vivo* Analysen charakterisiert werden. Daran anschließend wurde die L1CAM-vermittelte Regulation von Zielgenen und Signalwegskomponenten mittels Proteom Array Analysen untersucht. Im zweiten Abschnitt wurde die Rolle der Sheddasen ADAM10 und ADAM17 bei der Prozessierung von L1CAM sowie deren Einfluss auf die Zellviabilität untersucht. Im letzten Abschnitt wird die Rolle der miRNAs 34a und 146a-5p auf die Expression von L1CAM sowie die Bindung der miR-346 an einer *in silico* prognostizierten Stelle in der 3'-UTR von L1CAM beschrieben.

5.1 Charakterisierung von L1CAM im Retinoblastom

5.1.1 Endogene L1CAM Expression in Retinoblastomzelllinien

Vor der funktionellen Untersuchung von L1CAM wurde zunächst die Expression des *L1CAM* Gens in verschiedenen humanen RB Zelllinien untersucht.

Die Expression von *L1CAM* variiert innerhalb der analysierten Zelllinien (Abbildung 6A). Im Vergleich zur gesunden humanen Retina zeigen die Zelllinien RB355 und WERI-Rb1 eine signifikant stärkere Expression von *L1CAM*. Die *L1CAM* Expression liegt im Gegensatz dazu in den Zelllinien Rbl-13, Rbl-30, RB247 und Y79 im Vergleich zur humanen Retina signifikant verringert vor. Die Zelllinie RB383 zeigt keinen signifikanten Unterschied der L1CAM Expression im Vergleich zur humanen Retina. Western Blot Analysen (Abbildung 6B) spiegeln die in der *Real-time* PCR gewonnenen Expressionsdaten auf Proteinebene mit Ausnahme von WERI-Rb1 und Y79 Zellen wider. Es konnte eine deutliche Überexpression von L1CAM in den Proteinproben aus RB355 Zelllysaten sowie eine deutlich verringerte Expression in Rbl-13, Rbl-30, RB247 Zellen im Vergleich zum gesunden humanen Retina Probenpool nachgewiesen werden.

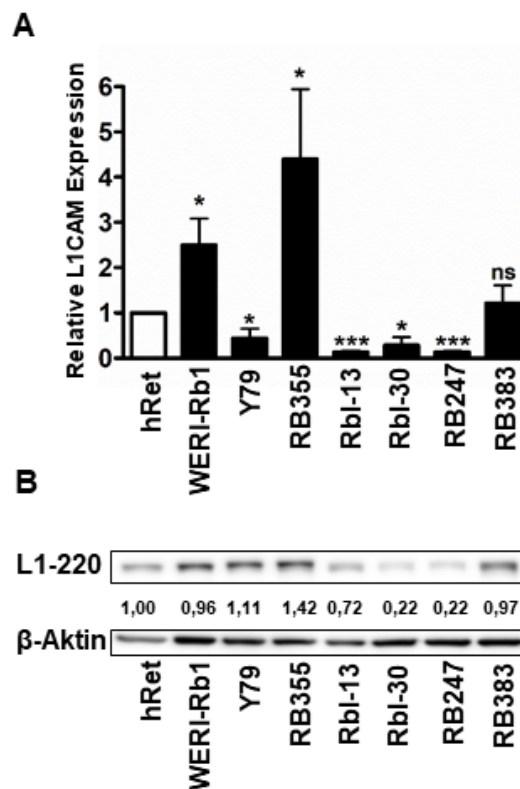


Abbildung 6: Endogene L1CAM Expression in gesunder humaner Retina und Retinoblastomzelllinien.

Darstellung der endogenen L1CAM Expression nach Analyse mittels quantitativer *Real-time*-PCR (A) und Western Blot (B). In der quantitativen *Real-time*-PCR wurde die Expression von *L1CAM* auf die Expression der 18S ribosomalen Untereinheit (interne Kontrolle) normiert und auf die Expression der humanen Retina (hRet) bezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen RNA Analysen. Die Proteinexpression von L1CAM wurde mittels Western Blot Analyse ermittelt und auf die Expression von beta-Aktin (β -Aktin) bezogen. Die humane Retina diente als Referenz und wurde gleich 1.0 gesetzt. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur humanen Retina berechnet mit dem paarigen studentischen t-Test.

5.2 Expression von L1CAM in Patientenproben

Für die Untersuchung der *L1CAM* Expression in humanen Retinaprobe wurde RNA aus kryokonservierten RB Patiententumoren isoliert. Anschließend wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR die relative *L1CAM* Expression von Tumoren, die keine Vorbehandlung mit Chemotherapeutika erhielten mit Probenmaterial von Patienten nach einer Chemotherapiebehandlung in Bezug zu gesundem humanen Retinagewebe verglichen. In Abbildung 7 ist die *L1CAM* Expressionen der unbehandelten und behandelten Patientenproben im Vergleich zur Expression in gesundem humanen Retinagewebe dargestellt. Nach der Chemotherapiebehandlung der Patienten liegt die Expression von *L1CAM* im Vergleich zu den unbehandelten Patienten signifikant verringert vor. Die Expression von *L1CAM* ist in unbehandelten

RB Tumorproben im Vergleich zur humanen Retina signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu besteht kein signifikanter Unterschied in der *L1CAM* Expression in humanem Retinagewebe und den behandelten RB Tumorproben. Die vorgelegten Patientendaten zeigen deutlich, dass *L1CAM* eine Rolle im Retinoblastom einnimmt. Im Vergleich zur heterogenen Expression von *L1CAM* in den unterschiedlichen RB Zelllinien weisen die untersuchten Patientenproben im Mittel eine verstärkte *L1CAM* Expression im Vergleich zur humanen Retina auf. Basierend auf diesen Daten sollte im Folgenden die Rolle von *L1CAM* im Retinoblastom und die Effekte einer Regulation von *L1CAM* unter anderem auf die Apoptoserate, Proliferation, Tumorbildung und Tumorzellmigration untersucht werden.

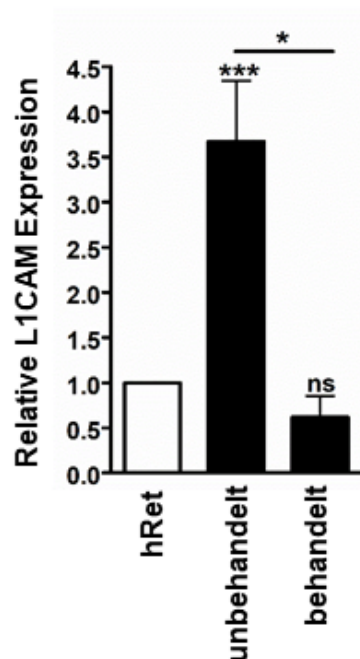


Abbildung 7: Vergleich der *L1CAM* Expression in Retinoblastomproben von Patienten nach Enukleation ohne (unbehandelt) und nach einer Chemotherapie (behandelt) im Vergleich zur Expression in humanem Retinagewebe.

Quantifizierung der *L1CAM* Expression in unbehandelten ($n=13$) und mit einer Chemotherapie behandelten ($n=3$) Retinoblastom Patientenproben mittels quantitativer *Real-time-PCR*. Die Expression von *L1CAM* in den Tumorproben wurde auf die Expression in gesunder humaner Retina (hRet) (Probenpool: $n=5$) normiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von unabhängigen Patientenproben. ns $p>0,05$; * $p<0,05$ oder *** $p<0,001$ statistisch signifikanter Unterschied ermittelt durch *one-way ANOVA* mit Newman-Keuls *post test*.

5.3 Die Rolle von *L1CAM* in Retinoblastomzelllinien

Um zu untersuchen welche biologische Funktion *L1CAM* in RB Zelllinien hat, wurde entweder die Expression von *L1CAM* herunterreguliert (*engl. Knockdown*) oder *L1CAM* wurde überexprimiert (*engl. Overexpression*). Anschließend wurden

funktionelle *in vitro* und *in vivo* Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein stabiler, lentiviraler *Knockdown* von L1CAM in RB355 und WERI-Rb1 Zellen durchgeführt. Eine transiente Überexpression von *L1CAM* wurde in Rbl-30 und RB247 Zellen etabliert. Für Langzeituntersuchungen der Effekte von L1CAM auf das Tumorwachstum und die Tumorzellmigration *in vivo* wurde eine stabile Überexpression von L1CAM in RB247 Zellen etabliert.

5.3.1 Etablierung eines stabilen *Knockdowns* von L1CAM in RB355 und WERI-Rb1 Zellen

Um einen stabilen *Knockdown* von *L1CAM* zu etablieren wurden RB355 und WERI-Rb1 Zellen mit Lentiviren behandelt, welche die Sequenz für eine *small hairpin* RNA (*shRNA*) stabil in das Genom der Zielzelle integrieren können. Die exprimierte *shRNA* interferiert mit der L1CAM mRNA und führt letztendlich zum Abbau des L1CAM Gentranskripts. Die RB Zelllinien wurden zunächst mit Lentiviren behandelt, welche jeweils unterschiedliche *shRNA* Sequenzen gegen die L1CAM mRNA tragen. Der *shRNA* Klon mit der jeweils besten *Knockdown* Effizienz wurde mittels quantitativer *Real-time-PCR* identifiziert und für die weiteren funktionellen Untersuchungen verwendet. Die hergestellten und getesteten Lentiviren können dem Methodenteil in Kapitel 4.4.6 entnommen werden. Als Referenz wurde jeweils der Lentivirus_FF3 unter Verwendung des pPRIME-CMV-Neo-FF3 Vektor hergestellt. Der FF3 Lentivirus führt zur stabilen Expression einer *shRNA* gegen die *Firefly-Luciferase* und dient somit als Kontrollviruspartikel (ctr) für die Transduktion, da in humanen Zellen keine direkte Wirkung auf ein exprimiertes Gen erwartet wird.

Wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben, liegt die L1CAM Expression in den RB355 sowie WERI-Rb1 Zellen im Vergleich zu den anderen RB Zelllinien erhöht vor. Daher wurden die RB355 sowie WERI-Rb1 Zellen für die Etablierung eines stabilen, lentiviralen *Knockdowns* von *L1CAM* gewählt. Für die Etablierung des *Knockdowns* von L1CAM wurden jeweils fünf *shRNA* Klone getestet (Abbildung 8A). Der *shRNA* Klon #668 führte in den WERI-Rb1 Zellen, nach zusätzlicher Selektion mit 0,3 µg/ml Puromycin über fünf Tage, zu einer *Knockdown* Effizienz von 86%. In den RB355 Zellen führte die Transduktion mit *shRNA* Klon #914 zu einer signifikanten Reduktion der L1CAM Expression von 84%, ohne dass eine Selektion mit Puromycin durchgeführt werden musste. Der *shRNA* Klon #915 führte in den RB355 Zellen zu dem stärksten *Knockdown*, da in der Zellprobe keine L1CAM Expression mehr detektiert werden

konnte, jedoch blieben nach der Transduktion zu wenig vitale Zellen für das Ansetzen funktioneller Versuche übrig, sodass auf den *shRNA* Klon #914 zurückgegriffen wurde (Abbildung 8).

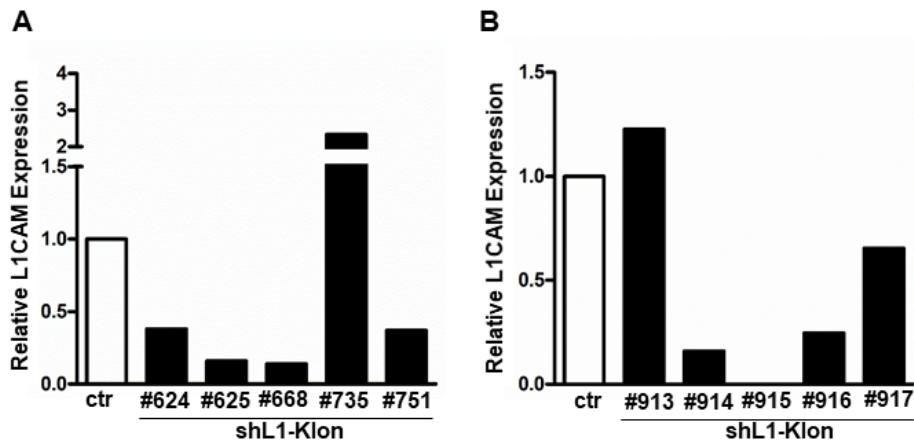


Abbildung 8: Ermittlung der L1CAM *Knockdown* Effizienz nach stabiler, lentiviraler Transduktion von *small hairpin* RNA Klonen.

Darstellung der relativen *L1CAM* Expression in WERI-Rb1 (A) und RB355 (B) Zellen nach lentiviraler Transduktion eines *small hairpin* RNA Klonen gegen *L1CAM* (*shL1*) im Vergleich zu Zellen, die mit einem Kontrollvirus behandelt wurden (*ctr*). Die Analyse der *L1CAM* Expression in WERI-Rb1 erfolgte nach zusätzlicher, fünftägiger Selektion mit 0,3 µg/ml Puromycin. Der *Knockdown* von *L1CAM* ist anhand einer repräsentativen Transduktion dargestellt (n=1).

Die *Knockdown* Effizienz wurde nach jeder Transduktion der RB Zellen mittels quantitativer *Real-time*-PCR und anhand repräsentativer Proteinproben ermittelt. In den RB355 und den WERI-Rb1 Zellen konnte eine signifikante Reduktion der *L1CAM* Expression beobachtet werden (**Abbildung 9A**). Die *L1CAM* Proteinexpression lag bei RB355 sowie WERI-Rb1 Zellen nach *L1CAM Knockdown* nachweislich verringert vor (**Abbildung 9B**).

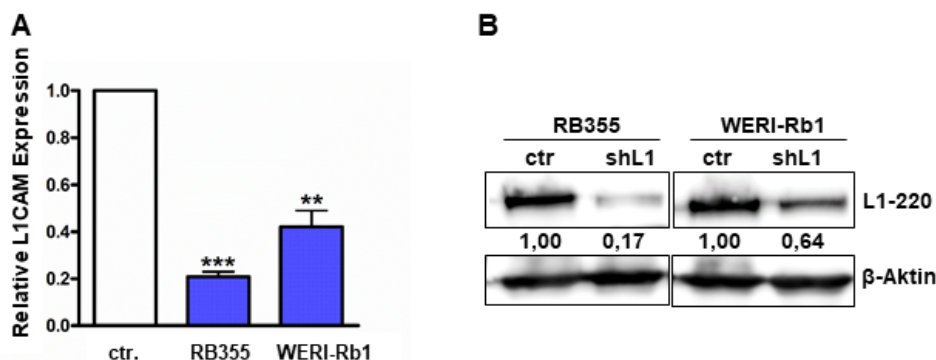


Abbildung 9: Verifizierung des stabilen, lentiviralen *L1CAM Knockdowns* in RB355 und WERI-Rb1 Zellen.

Der erfolgreiche *Knockdown* von *L1CAM* (*shL1*) wurde im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln (*ctr*) behandelt wurden mittels quantitativer *Real-time*-PCR (A) und Western Blot (B) verifiziert. Im Western Blot wurde das gesamte *L1CAM* Molekül (*L1-220*) und als Ladekontrolle beta Aktin (β -Aktin) detektiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von fünf unabhängigen RNA Analysen. *** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistischer signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

5.3.2 Einfluss eines stabilen L1CAM *Knockdowns* auf das Zellwachstum, Proliferation, Apoptose, Zellviabilität und Koloniebildung *in vitro*

Um die Auswirkung des stabilen L1CAM *Knockdowns* auf das Verhalten von RB355 und WERI-Rb1 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in Proliferations-, Viabilitäts- und Apoptoseassays sowie für Untersuchungen des Zellwachstums eingesetzt. Zusätzlich wurden die Zellen auf ihre kontaktabhängige und kontaktunabhängige Koloniebildungskapazität im *Colony Formation Assay* und dem *Soft Agarose Assay*

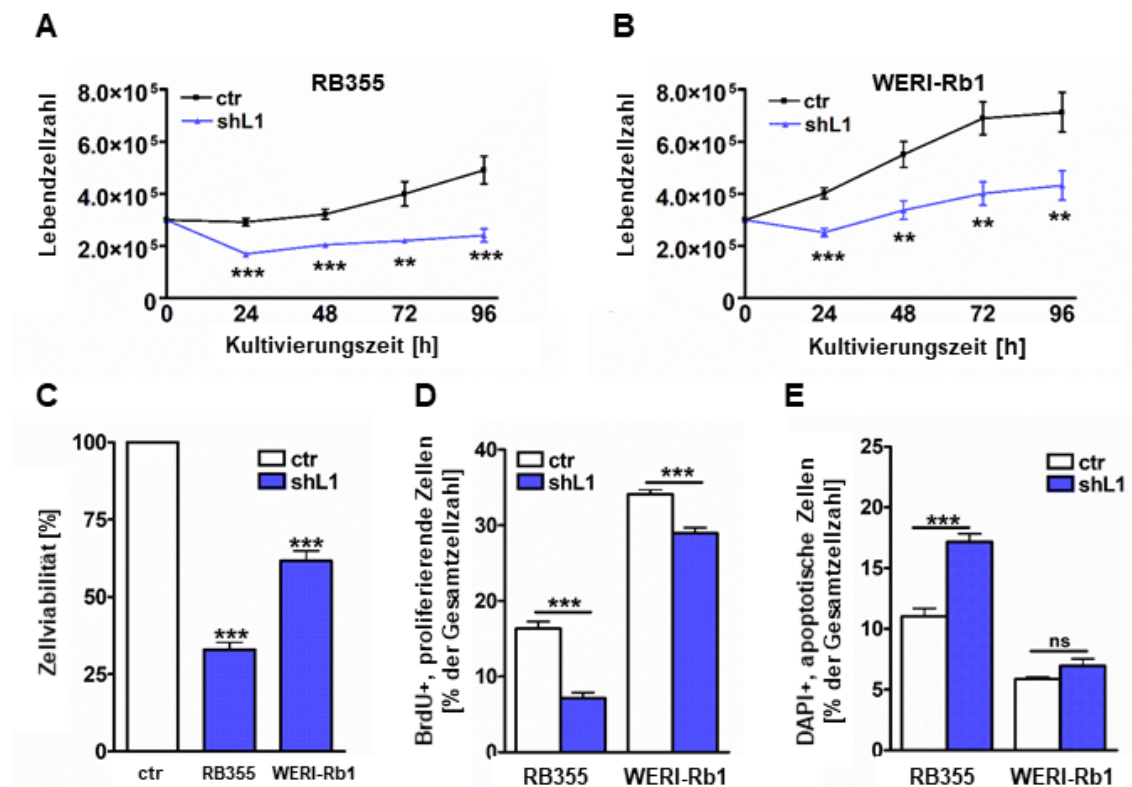


Abbildung 10: Einfluss des stabilen L1CAM *Knockdowns* auf das Zellwachstum, die Zellviabilität, die Proliferations- sowie der Apoptoserate von RB355 und WERI-Rb1 Zellen.

Der stabile, lentivirale *Knockdown* von L1CAM (shL1) führte zu einer signifikanten Reduktion der Wachstumsrate von RB355 (A) und WERI-Rb1 (B) Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln (ctr) behandelt wurden. Die Zellviabilität der RB Zellen wurde 2 h nach Zugabe der WST-1 Reagenz bestimmt (C). Die Proliferationsrate wurde fluoreszenzmikroskopisch nach immunocytochemischer Färbung mit BrdU bestimmt und mit der Gesamtzellzahl korreliert (D). Der Anteil apoptotischer Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch nach DAPI-Färbung auf die Gesamtzellzahl normiert (E). Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen. ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den paarigen und unpaarigen studentischen t-Test bzw. dem Permutationstest.

untersucht. Für die funktionellen Versuche wurden ausschließlich Zellansätze eingesetzt, die eine L1CAM *Knockdown* Effizienz von mindestens 40% erreichten.

Ein stabiler *Knockdown* von L1CAM führte in RB355 und WERI-Rb1 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Wachstumsrate (Abbildung 10A). Zudem zeigten die

L1CAM *Knockdown* Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen zunächst einen negativen Verlauf der Wachstumskurve in den ersten 24 h. Von den RB355 Zellen sind in diesem Zeitverlauf ca. 50% der eingesetzten Zellen abgestorben, sodass die nachfolgende Zellpopulation sich in ihrer Gesamtzellzahl innerhalb der 96-stündigen Kultivierung nicht wieder der Ausgangszellzahl von 3×10^5 annähern konnte.

Die Zellviabilität wurde nach dem *Knockdown* von L1CAM mittels WST-1 Assay ermittelt. In *shL1*-RB355 und *shL1*-WERI-Rb1 Zellen konnte nach einer Inkubationszeit von 48 h eine signifikante Verringerung der Zellviabilität beobachtet werden (Abbildung 10C).

Der an der Gesamtzellzahl gemessene Anteil proliferierender Zellen wurde mittels BrdU Proliferations Assay bestimmt (Abbildung 10D). Nach dem *Knockdown* von L1CAM konnte in RB355 und WERI-Rb1 eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate nachgewiesen werden.

Ein stabiler *Knockdown* von L1CAM führte dahingegen zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate in RB355 Zellen (Abbildung 10E). In WERI-Rb1 Zellen führte der L1CAM *Knockdown* zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate,

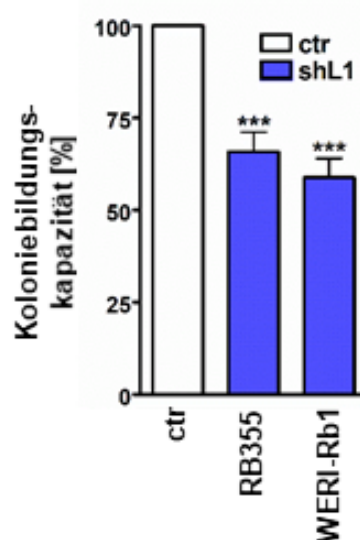


Abbildung 11: Einfluss des L1CAM *Knockdowns* auf die kontaktabhängige Koloniebildung im *Colony Formation Assay*.

Für den Nachweis der kontaktabhängigen Koloniebildung wurden RB355 bzw. WERI-Rb1 Zellen über einen Zeitraum von drei Wochen kultiviert. Die Koloniedichten der L1CAM *Knockdown* Zellen (*shL1*) und der Kontrollzellen (*ctr*) wurden mit der Micro Manager 1.4 Software quantifiziert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchsansätzen. *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

jedoch war der Prozentsatz toter (Trypanblau positiver) Zellen in der Zellkultur zu allen getesteten Zeitpunkten signifikant erhöht (Appendix Abbildung 1). Zur Ermittlung der

kontaktabhängigen und kontaktunabhängigen Koloniebildungskapazität der RB Zelllinien nach dem L1CAM *Knockdown* wurden die Zellen in den *Colony Formation Assay* und den *Soft Agarose Assay* eingesetzt. Die Koloniedichte lag im Vergleich zu den Kontrollzellen in L1-defizienten RB Zellen signifikant verringert vor und zwar um 34,2% (RB355) bzw. 41,1% in (WERI-Rb1) (Abbildung 11A).

Mittels *Soft Agarose Assay* ließ sich die kontaktunabhängige Koloniebildungskapazität der Tumorzellen bestimmen. Für die Zelllinien RB355 und WERI-Rb1 konnte eine signifikante Reduktion der Koloniebildungskapazität (Abbildung 12A) sowie der mittleren Koloniegröße (Abbildung 12B) beobachtet werden.

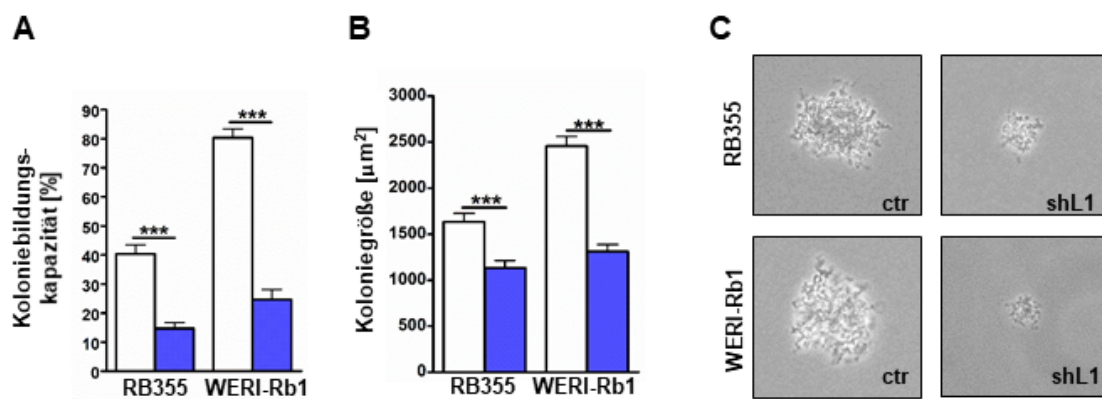


Abbildung 12: Einfluss des L1CAM *Knockdowns* auf die kontaktunabhängige Koloniebildung im *Soft Agarose Assay*.

Für den Nachweis der kontaktunabhängigen Koloniebildung wurden RB355 bzw. WERI-Rb1 Zellen in *Soft Agarose* ausplattiert und über einen Zeitraum von drei Wochen kultiviert. Der Anteil koloniebildender L1CAM *Knockdown* Zellen (shL1) und Kontrollzellen (ctr) wurde mit der Gesamtzellzahl korreliert (A) sowie die Koloniegröße (B) bestimmt. Zudem wurden repräsentative Durchlichtaufnahmen von Kolonien in der *Soft Agarose* (C) in 100x Vergrößerung aufgenommen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchsansätzen. *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den unpaarigen studentischen t-Test.

5.3.3 Effekte des L1CAM *Knockdowns* auf die Tumorbildung und Tumorzellmigration *in vivo*

Das Chorioallantoismembran (CAM) Modell nach Zijlstra (Zijlstra *et al.*, 2002) wurde gewählt, um die Effekte eines L1CAM *Knockdowns* auf die Tumorbildung *in vivo* sowie die Tumorzellmigration zu untersuchen. Zudem sollte die Migration und Invasivität der Tumorzellen in das CAM Gewebe nach der intravenösen Injektion in das CAM Gefäßsystem dargestellt und quantifiziert werden.

Abbildung 13 zeigt repräsentative CAM Tumore *in situ* (Abbildung 13A, linke Spalte) und nach der Präparation (Abbildung 13A, rechte Spalte). Es konnte kein signifikanter

Effekt auf die Tumorbildung beobachtet werden (Abbildung 11B). Die Größen- und Gewichtbestimmung von RB355 und WERI-Rb1 Zellen nach dem *Knockdown* von L1CAM im Vergleich zu Zellen, die mit dem Kontrollvirus behandelt wurden, zeigten jedoch eine signifikante Reduktion des Tumorgewichts (Abbildung 13C) sowie der Tumorgroße (Abbildung 13D).

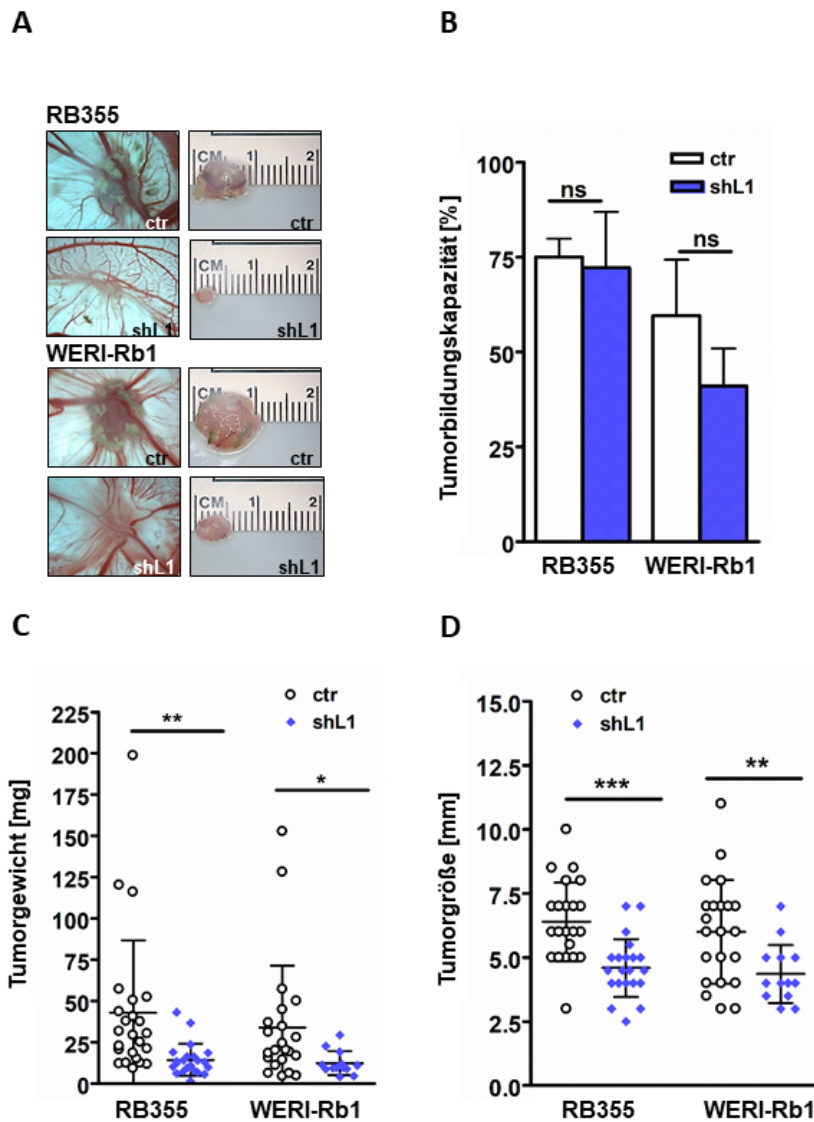


Abbildung 13: Einfluss des L1CAM *Knockdowns* in RB355 und WERI-Rb1 Zellen auf die Tumorbildung *in vivo*.

Vergleich der Tumorbildungskapazität von RB355 und WERI-Rb1 Zellen nach L1CAM *Knockdown* (shL1) im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln (ctr) behandelt wurden. Transduzierte RB Zellen wurden an Entwicklungstag (E)10 auf die Chorioallantoismembran (CAM) appliziert und für sieben Tage inkubiert. An E17 wurden die Tumore *in situ* fotodokumentiert (A, linke Spalte) und nach der Präparation die Größe (in cm) ermittelt (A, rechte Spalte). Quantifizierung von Tumorbildungskapazität (B), Tumorgewicht (C) und Tumorgroße (D) von CAM Tumoren. Die *Scatter-Dotplots* und Balkendiagramme mit Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den unpaarigen studentischen t-Test.

Im Mittel wurde die Tumorgröße durch den L1CAM *Knockdown* um 27,4% (RB355) bzw. 28,2% (WERI-Rb1) verringert. Das Tumorgewicht wurde im Mittel um 63,7% (RB355) und 87,7% (WERI-Rb1) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen verringert. Für die Untersuchung der Effekte des L1CAM *Knockdowns* auf die Tumorzellmigration bzw. der Extravasation der Tumorzellen aus dem CAM Gefäßsystem *in vivo* wurden GFP-markierte RB355-GFP und die WERI-GFP Zellen nach der Transduktion mit einer 0,5 ml Insulinspritze in das CAM Gefäßsystem injiziert. Nach fünf Tagen Inkubation wurde die untere CAM präpariert. Für den Nachweis, dass sich die GFP-markierten RB Zellen in dem unteren CAM Gewebe anreichern bzw. lokalisiert sind, wurden zu jedem Versuchsansatz fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dokumentiert. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die Injektion erfolgreich war und die Ansätze für die weitere Analytik geeignet waren. Bereits bei der Betrachtung der CAM Ausschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten Unterschiede in der Anzahl der GFP-positiven RB Zellen festgestellt werden. Es waren deutlich weniger fluoreszierende Zellen in den *Knockdown* Ansätzen nachweisbar als in den jeweiligen Kontrollansätzen (Appendix Abbildung 2). Die Gesamtanzahl der CAM Stanzen, in denen GFP-markierte RB Zellen nachweisbar waren, lag signifikant verringert vor (Abbildung 14A). Um eine genauere Lokalisation der GFP-markierten RB Zellen im CAM Gewebe zu ermöglichen, wurden die Gefäßsysteme ausgewählter CAM Stanzen mittels Immunfluoreszenz gegen Hühnchen-Desmin immunocytochemisch markiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Abbildung 14B zeigt ausgewählte CAM Stanzen mit GFP-markierten und mit den Kontrollviruspartikeln behandelten WERI-GFP Zellen nach der Immunfluoreszenzfärbung. Die Extravasation der RB Zellen ist in Abbildung 14B deutlich erkennbar. Um einen quantitativen Vergleich des Migrationspotentials der RB Zellen mit und ohne L1CAM *Knockdown* treffen zu können, wurde der Gehalt an humaner Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (hGAPDH) in den CAM Stanzen mittels quantitativer *Real-time*-PCR ermittelt. In den CAM Stanzen konnte eine signifikante Reduktion des Gehaltes an hGAPDH nach L1CAM *Knockdown* in RB355-GFP und WERI-GFP Zellen detektiert werden (Abbildung 14C und 14D).

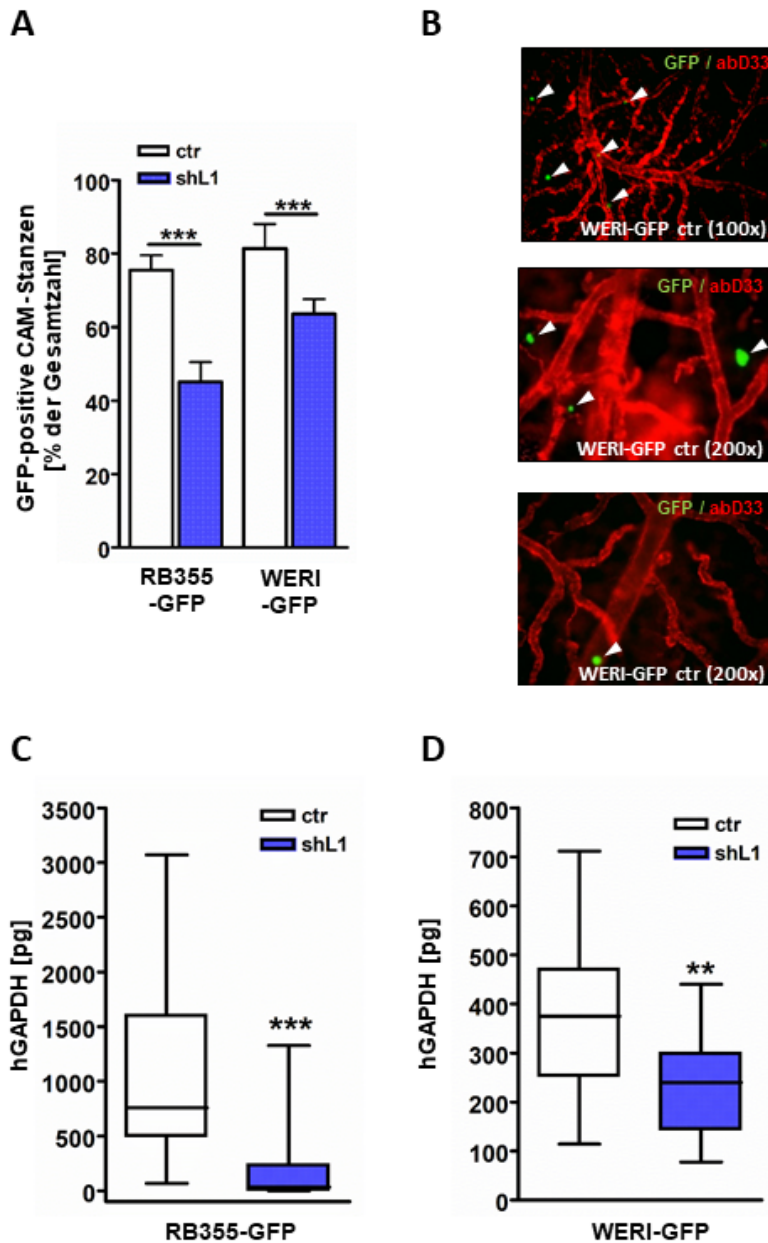


Abbildung 14: Migration von GFP-markierten RB355-GFP und WERI-GFP Zellen in das untere CAM Gewebe.

Quantifizierung der Migrationskapazität von GFP-markierten RB-Zellen nach dem *Knockdown* von L1CAM (shL1) im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln (ctr) transduziert wurden. (A) Prozentualer Anteil von CAM Stenzen in denen GFP-markierte RB Zellen detektiert werden konnten. (B) Lokalisation von GFP-markierten WERI-Rb1 Zellen (WERI-GFP) im unteren CAM Gewebe in 100x bzw. 200x Vergrößerung. (C, D) Quantifizierung des Gehalts an humaner Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (hGAPDH) im unteren CAM Gewebe mittels quantitativer *Real-time-PCR*. Die *Box-Whiskers-Plots* repräsentieren den Median sowie die Maximal- und Minimalwerte von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen mit mindestens 5 technischen Replikaten. Größenstandard: 64 μm . ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den unpaarigen studentischen t-Test.

5.3.4 Etablierung einer transienten Überexpression von L1CAM in Rbl-30 und RB247 Zellen

Für die transiente Überexpression von L1CAM wurden Rbl-30 und RB247 Zellen mit dem pLenti CMV_L1CAM Vektor (L1OE) bzw. dem leeren Expressionsvektor pLenti CMV_Puro Dest (ctr) transfiziert. Um eine möglichst effektive Transfektion der Zellen zu erzielen, mussten zunächst die Transfektionsbedingungen angepasst werden. Zu diesem Zweck wurde das GFP Expressionsplasmid pCS2+_hrGFP verwendet, um die Transfektionseffizienz qualitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilen zu können. Die Transfektionen erfolgten zunächst in 2 ml Ansätzen mit 4×10^5 Zellen. Für die Transfektion der RB Zelllinien wurde das Transfektionsreagenz *FuGENE*[®]HD (Promega) verwendet und verschiedene *FuGENE*[®]HD:pDNA-Verhältnisse (3:1; 4:1; 5:1) sowie verschiedene pDNA Mengen (0,2 µg; 0,6 µg; 1,0 µg) getestet (Appendix Abbildung 3A und B). Die RB247 Zellen wurden zudem hinsichtlich der verwendeten Zellzahlen (1×10^5 ; 2×10^5 ; 3×10^5) optimiert (Appendix Abbildung 3C). Generell ergab sich aus den Vorversuchen ein optimales *FuGENE*[®]HD:pDNA-Verhältnis von 5:1 bei

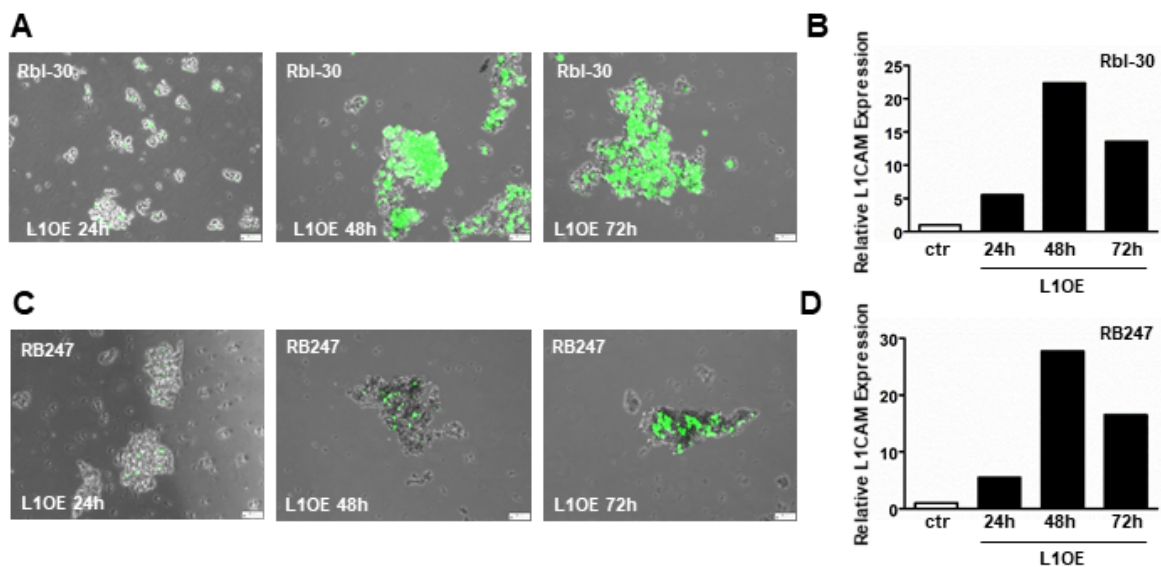


Abbildung 15: Etablierung der L1CAM Überexpression in Rbl-30 und RB247 Zellen.

Zunahme der GFP Fluoreszenz nach Transfektion von Rbl-30 Zellen mit dem GFP Expressionsvektor pCS2+_hrGFP nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit (A). Nachweis der L1CAM Überexpression ermittelt durch quantitative *Real-time*-PCR Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion von Rbl-30 Zellen mit pLenti CMV_L1CAM (B). Zunahme der GFP Fluoreszenz nach Transfektion von RB247 Zellen mit dem GFP Expressionsvektor pCS2+_hrGFP nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit (C). Nachweis der L1CAM Überexpression ermittelt durch quantitative *Real-time*-PCR Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion von Rbl-30 Zellen mit pLenti CMV_L1CAM (D). Die Aufnahmen zeigen Zellkulturen in 100x Vergrößerung. Größenstandard: 64 µm. Die Überexpression von L1CAM zu den verschiedenen Zeitpunkten ist anhand einer repräsentativen Transfektion dargestellt (n=1).

einer eingesetzten pDNA Menge von 4 µg. Dabei wurden 4×10^5 Rbl-30 Zellen und 3×10^5 RB247 Zellen in die jeweilige Transfektion pro 2 ml Ansatz eingesetzt. Für die Ermittlung des optimalen Zeitpunkts für die stärkste L1CAM Überexpression wurden die Zellen nach den ermittelten Bedingungen transfiziert und nach 24 h, 48 h und 72 h Zellproben für die RNA Isolation und die Quantifizierung der L1CAM Expression mittels *Real-time*-PCR entnommen. Für beide Zelllinien konnte nach 48 h die stärkste L1CAM Überexpression ermittelt werden (Abbildung 15B und D). Die nachfolgenden funktionellen Versuche wurden dementsprechend 48 h nach der Transfektion angesetzt.

Die erfolgreiche Überexpression von L1CAM wurde nach jeder Transfektion mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Aus fünf unabhängigen Versuchsansätzen konnte für beide untersuchten Zelllinien eine signifikante Überexpression von L1CAM 48 h nach der Transfektion nachgewiesen werden (Abbildung 16A). Die erfolgreiche L1CAM Überexpression wurde zusätzlich anhand repräsentativer Proteinproben mittels Western Blot Analyse bestimmt und zeigt eine deutliche Zunahme der L1CAM Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 16B).

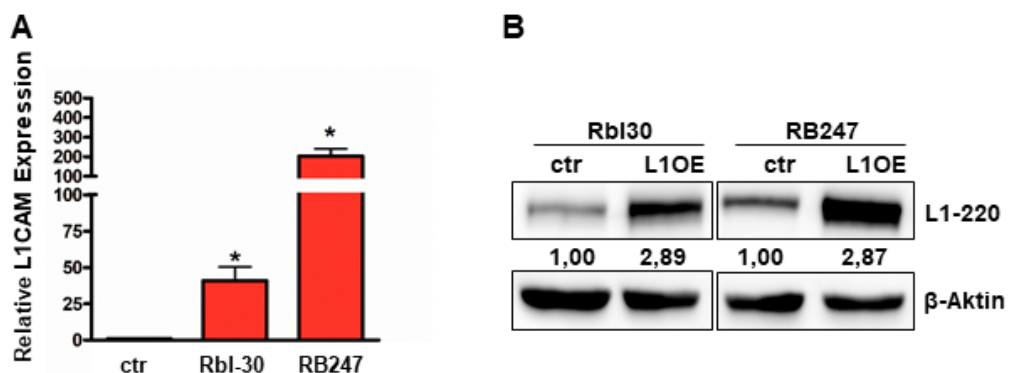


Abbildung 16: Verifizierung der transienten Überexpression von L1CAM in Rbl-30 und RB247 Zellen.

Für die Verifizierung der transienten Überexpression von L1CAM (L1OE) wurden Rbl-30 und RB247 Zellen mit dem pLenti CMV_L1CAM Vektor transfiziert. Als Referenz dienten Zellen, die mit leerem Kontrollplasmid pLenti CMV_Puro Dest (ctr) transfiziert wurden. Die erfolgreiche Überexpression von L1CAM wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR (A) und Western Blot (B) verifiziert. Im Western Blot wurde das gesamte L1CAM Molekül (L1-220) und als Ladekontrolle beta Aktin (β -Aktin) detektiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen RNA Analysen normiert auf die Kontrolle. * $p < 0,05$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

5.3.5 Effekte der L1CAM Überexpression auf das Zellwachstum, die Zellviabilität, der Proliferations- und Apoptoserate sowie der Koloniebildungskapazität *in vitro*

Für die Untersuchung der Auswirkungen der transienten Überexpression von L1CAM auf das Verhalten von Rbl-30 und RB247 Zellen, wurden die Zellen für Proliferations-, Viabilitäts- und Apoptose Assays sowie für Zellwachstumskurven eingesetzt. Zudem wurden die Zellen auf ihre kontaktabhängige und kontaktunabhängige Koloniebildungskapazität im *Colony Formation Assay* und dem *Soft Agarose Assay*

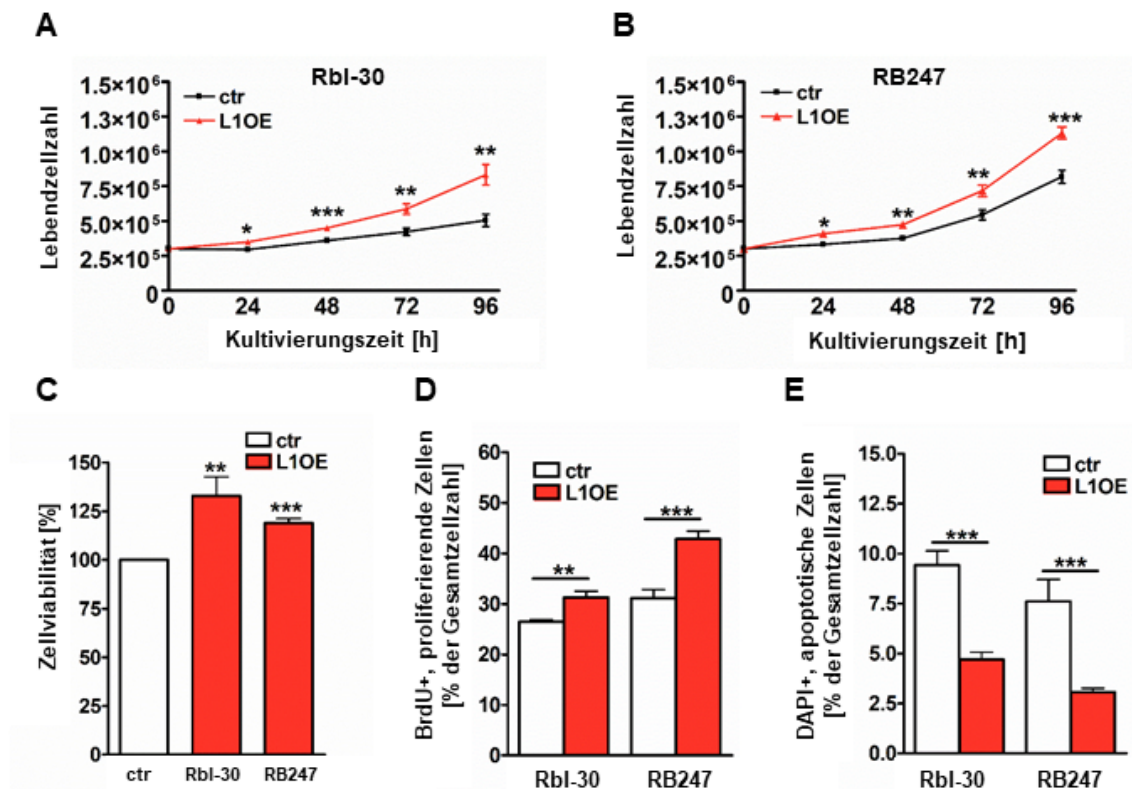


Abbildung 17: Einfluss der Überexpression von L1CAM auf das Zellwachstum, die Zellviabilität, die Proliferations- sowie die Apoptoserate von Rbl-30 und RB247 Zellen.

Die transiente Überexpression von L1CAM (L1OE) führte zu einer signifikanten Steigerung der Wachstumsrate von Rbl-30 (A) und RB247 (B) Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit dem leeren Kontrollvektor pLenti CMV_Puro Dest (ctr) transfiziert wurden. Die Zellviabilität der RB Zellen wurde 48 h nach der Transfektion und 2 h nach Zugabe der WST-1 Reagenz bestimmt (C). Die Proliferationsrate wurde fluoreszenzmikroskopisch nach BrdU-Immuncytochemie bestimmt und mit der Gesamtzellzahl korreliert (D). Der Anteil apoptotischer Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch nach DAPI-Färbung und Auszählung pyknotischer Nuklei auf die Gesamtzellzahl normiert (E). Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den paarigen und unpaarigen studentischen t-Test bzw. dem Permutationstest.

untersucht. Für die funktionellen Versuche wurden ausschließlich Zellansätze eingesetzt, die eine Überexpression mit einem *Fold Change* von mindestens 25-fach (Rbl-30) bzw. 150-fach (RB247) in der *Real-time-PCR* zeigten.

Die transiente Überexpression von L1CAM führte in Rbl-30 und RB247 Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Wachstumsrate zu allen untersuchten Zeitpunkten (Abbildung 17A und 17B). Die Zellviabilität lag nach der Überexpression von L1CAM im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erhöht vor (Abbildung 17C). Ebenso lag der prozentuale Anteil proliferierender Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erhöht vor (Abbildung 17D). Eine transiente Überexpression von L1CAM führte dahingegen zu einer signifikanten Verringerung der Apoptoserate in Rbl-30 und RB247 Zellen (Abbildung 17E).

Zur Ermittlung der kontaktabhängigen und kontaktunabhängigen Koloniebildungskapazität von RB Zellen nach der Überexpression von L1CAM wurden die Zellen in den *Colony Formation Assay* und den *Soft Agarose Assay* untersucht.

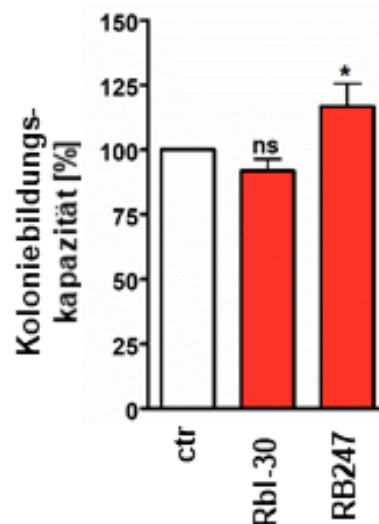


Abbildung 18: Einfluss der L1CAM Überexpression auf die kontaktabhängige Koloniebildung im *Colony Formation Assay*.

Für den Nachweis der kontaktabhängigen Koloniebildung wurden RB Zellen über einen Zeitraum von drei Wochen kultiviert. Die Koloniedichten der L1CAM-überexprimierenden Zellen (L1OE) und der Kontrollzellen (ctr) wurden mit der Micro Manager 1.4 Software quantifiziert und anschließend miteinander korreliert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchsansätzen. ns $p > 0,05$ oder * $p < 0,05$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

Die Koloniedichte lag bei L1CAM-überexprimierenden Rbl-30 Zellen unverändert und bei RB247 Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen signifikant erhöht vor (Abbildung 18A).

Für die Zelllinien Rbl-30 und RB247 wurde eine signifikante Steigerung der Koloniebildungskapazität (Abbildung 19A) sowie der mittleren Koloniegröße

(Abbildung 19B) im *Soft Agarose* Assay beobachtet. Repräsentative Mikroskopiebilder der Kolonien in *Soft Agarose* (Abbildung 19C) unterstreichen die Ergebnisse der Quantifizierungen von Koloniegröße und -bildungskapazität.

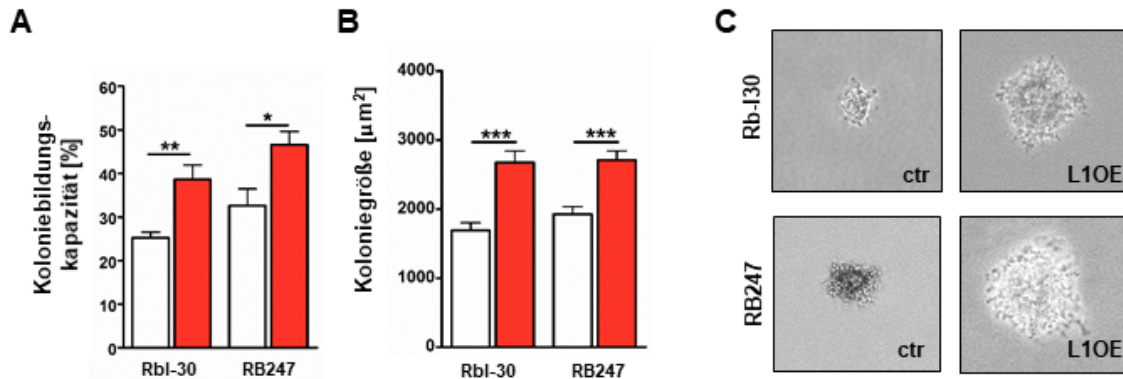


Abbildung 19: Einfluss der L1CAM Überexpression auf die kontaktunabhängige Koloniebildung im *Soft Agarose* Assay.

Für den Nachweis der kontaktunabhängigen Koloniebildung wurden Rbl-30 und RB247 Zellen in *Soft Agarose* ausplattiert und über einen Zeitraum von drei Wochen kultiviert. Der Anteil koloniebildender L1CAM-überexprimierender Zellen (L1OE) und Kontrollzellen (ctr) wurde mit der Gesamtzellzahl korreliert (A) sowie die Koloniegröße (B) bestimmt. Zudem wurden repräsentative Durchlichtaufnahmen von Kolonien in der *Soft Agarose* (C) in 100x Vergrößerung aufgenommen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchsansätzen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den unpaarigen studentischen t-Test.

5.3.6 Effekte stabiler L1CAM Überexpression auf Zellviabilität, Tumorbildung und Migration von RB247 Zellen

Um das Tumorstadium *in vivo* nach L1CAM Überexpression über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können, wurden RB247 Zellen mit dem pLenti CMV_L1CAM Virus (L1OE) und dem pLenti CMV_Puro Dest Virus (ctr) transduziert. Die somit erreichte stabile Überexpression von L1CAM wurde mittels *Real-time*-PCR und Western Blot Analysen nachgewiesen (Abbildung 20A und 20B). Im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte in RB247 Zellen eine 450%-ige L1CAM Überexpression nachgewiesen werden. Auf Proteinebene zeigte die L1CAM Überexpressionszelllinie eine Steigerung der L1CAM Proteinexpression um 381%.

Nach der L1CAM Überexpression konnte eine signifikante Steigerung der Zellviabilität von 22,5%, im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden (Abbildung 20C).

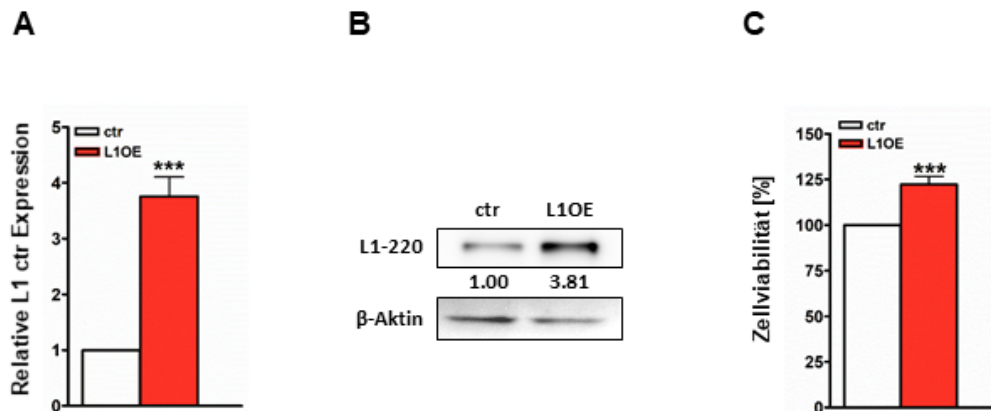


Abbildung 20: Verifikation der stabilen L1CAM Überexpression in RB247 Retinoblastomzellen.

Die stabile, lentivirale Überexpression von L1CAM (L1OE) in RB247 Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln (ctr) transduzierten RB247 Zellen, verifiziert mittels *Real-time*-PCR (A) und Western Blot (B). Im Western Blot wurde das gesamte L1CAM Molekül (L1-220) und als Ladekontrolle beta Aktin (β -Aktin) detektiert. Die Steigerung der Zellviabilität (C) nach der L1CAM Überexpression wurde nach 48 h Inkubationszeit und 2 h nach Zugabe der WST-1 Reagenz bestimmt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchen. *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

Die Tumorbildungs- und Migrationskapazität wurde nach der L1CAM Überexpression mittels *in vivo* CAM Assay untersucht. Nach dem Applizieren der Tumorzellen auf die CAM an E10 konnten nach sieben weiteren Tagen Inkubationszeit die CAM Tumore hinsichtlich Größe, Gewicht und Tumorbildungskapazität untersucht werden. Bei den L1CAM-überexprimierenden Zellen konnte im Vergleich zu Kontrollzellen eine signifikante Zunahme der Tumorgöße und des Tumorgewichtes nachgewiesen werden (Abbildung 21A bis D). Die L1CAM Überexpression führte in RB247 Zellen zu einer um 35,5% erhöhten Tumorgöße und einem um 86,4% erhöhten Tumorgewicht. Zusätzlich wurde die Migrationskapazität nach L1CAM Überexpression in GFP-markierten RB247-GFP Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden RB247-GFP Zellen nach der Transduktion zur Überexpression von L1CAM in das CAM Gefäßsystem injiziert und nach fünftägiger Inkubationszeit die Tumorzellmigration in die untere CAM mittels quantitativer *Real-time*-PCR untersucht. Die Migrationskapazität der L1CAM-überexprimierenden Zellen wurde im Vergleich zu den Zellen, die mit den Kontrollviruspartikeln transduziert wurden, nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 21E).

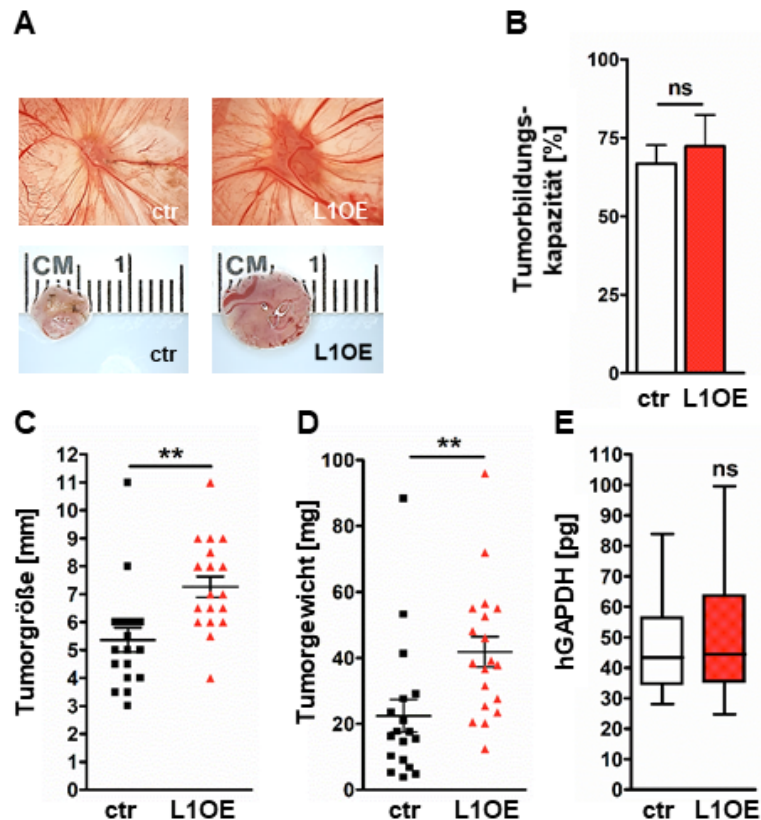


Abbildung 21: Effekt der stabilen L1CAM Überexpression in RB247 Zellen auf die Tumorbildungs- und Migrationskapazität *in vivo*.

Vergleich der Tumorbildungskapazität der RB247 Zellen nach der L1CAM Überexpression (L1OE) im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln (ctr) behandelt wurden. Transduzierte RB Zellen wurden an Entwicklungstag (E) 10 auf die Chorioallantoismembran (CAM) appliziert und für sieben Tage inkubiert. An E17 wurden die Tumore *in situ* fotodokumentiert (A, obere Reihe) und nach der Präparation die Größe (in cm) ermittelt (A, untere Reihe). Quantifizierung von Tumorbildungskapazität (B), Tumorgewicht (C) und Tumorgöße (D) von CAM Tumoren. (E) Quantifizierung des Gehalts an humaner Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (hGAPDH) im unteren CAM Gewebe mittels quantitativer *Real-time*-PCR. Balkendiagramm und *Scatter-Dotplots* mit Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen. Der *Box-Whiskers-Plot* repräsentiert den Median sowie die Maximal- und Minimalwerte von zwei unabhängigen Versuchsansätzen mit mindestens vier technischen Replikaten. ns $p > 0,05$ oder $**p < 0,01$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den unpaarigen studentischen t-Test.

5.4 Untersuchung von L1CAM regulierten Genen

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Untersuchung der Gene, welche durch die Regulation von L1CAM differentiell reguliert werden, beschrieben. Ziel dieser Untersuchung war die Identifizierung von weiteren möglichen Zielgenen, welche bei der Therapie des Retinoblastoms eine Rolle spielen könnten.

5.4.1 Identifikation möglicher L1CAM Zielgene mittels Proteom Array Analysen

Für die Untersuchung der Aktivierung bzw. Deaktivierung von Signalmolekülen durch differentielle Phosphorylierung wurde ein Proteom Profiler™ Array – Human Phospho-Kinase Array Kit verwendet. Auf diese Weise konnten Proteine identifiziert werden, die

potentiell das Zellverhalten beeinflussen und so an der Regulation von Apoptose, Zellproliferation sowie Zellwachstum beteiligt sein könnten.

Für den Array wurden RB355 Zellen mit einem stabilen L1CAM *Knockdown* und RB355 Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln transduziert wurden, miteinander verglichen. Die *Knockdown* Effizienz, quantifiziert mittels *Real-time-PCR* Analyse, lag bei den verwendeten RB355 Zellen bei 77,4%.

Nach der Entwicklung der Membranen konnten Proteine identifiziert werden, die einen veränderten Phosphorylierungsgrad nach dem L1CAM *Knockdown*, im Vergleich zu den Kontrollzellen aufzeigten (Abbildung 22A). Für die Auswertung der in Abbildung 22 gezeigten Chemilumineszenz-Reaktion wurde der Mittelwert der Pixeldichte der Duplikat-Protein-*Spots* mit der Micro Manager 1.4 Software ermittelt und mit der mittleren Pixeldichte der Referenzspots (membranspezifischer Mittelwert aus den jeweiligen Referenzspots) korreliert. Anschließend wurden die relativen Pixeldichten der *Knockdown* Probenspots auf die relativen Pixeldichten der Kontrollprobenspots normiert (doppelte Normierung). Für die Auftragung und Auswertung der in Abbildung 22B aufgezeigten Proben wurden nur Probenpaare (jeweils *Knockdown*- und die zugehörigen Kontroll-*Spots*) verwendet, von denen eines der Paare eine mittlere Pixeldichte von 5.000.000 überschritt und die prozentuale Differenz der Probenpaare >10% war.

Anhand der oben genannten Analysekriterien konnten insgesamt zehn differentiell-phosphorylierte Proteine identifiziert werden (Abbildung 22). Eine verringerte Phosphorylierung nach dem L1CAM *Knockdown* im Vergleich zu der Kontrolle konnte bei den folgenden Proteinen detektiert werden: Glykogensynthase-Kinase 3 alpha/beta (GSK-3 α/β) an Serinrest (S) 21 und 9, *cAMP-responsive element binding protein* (CREB) an S133, Tyrosinkinase Lyn (Lyn) an Tyrosinrest (Y) 397, *signal transducer and activator of transcription 2* und (STAT2) an Y694 sowie STAT6 an Y641 und p53 an S392. Eine gesteigerte Phosphorylierung nach L1CAM *Knockdown* im Vergleich zu der Kontrolle konnte bei den folgenden Proteinen nachgewiesen werden: *lysine deficient protein kinase 1* (WNK1) an Threonin (T) 60, Phospholipase-C-Gamma 1 (PLC- γ 1) an Y783 und Protein-Tyrosin-Kinase 2 (PYK2) an Y402.

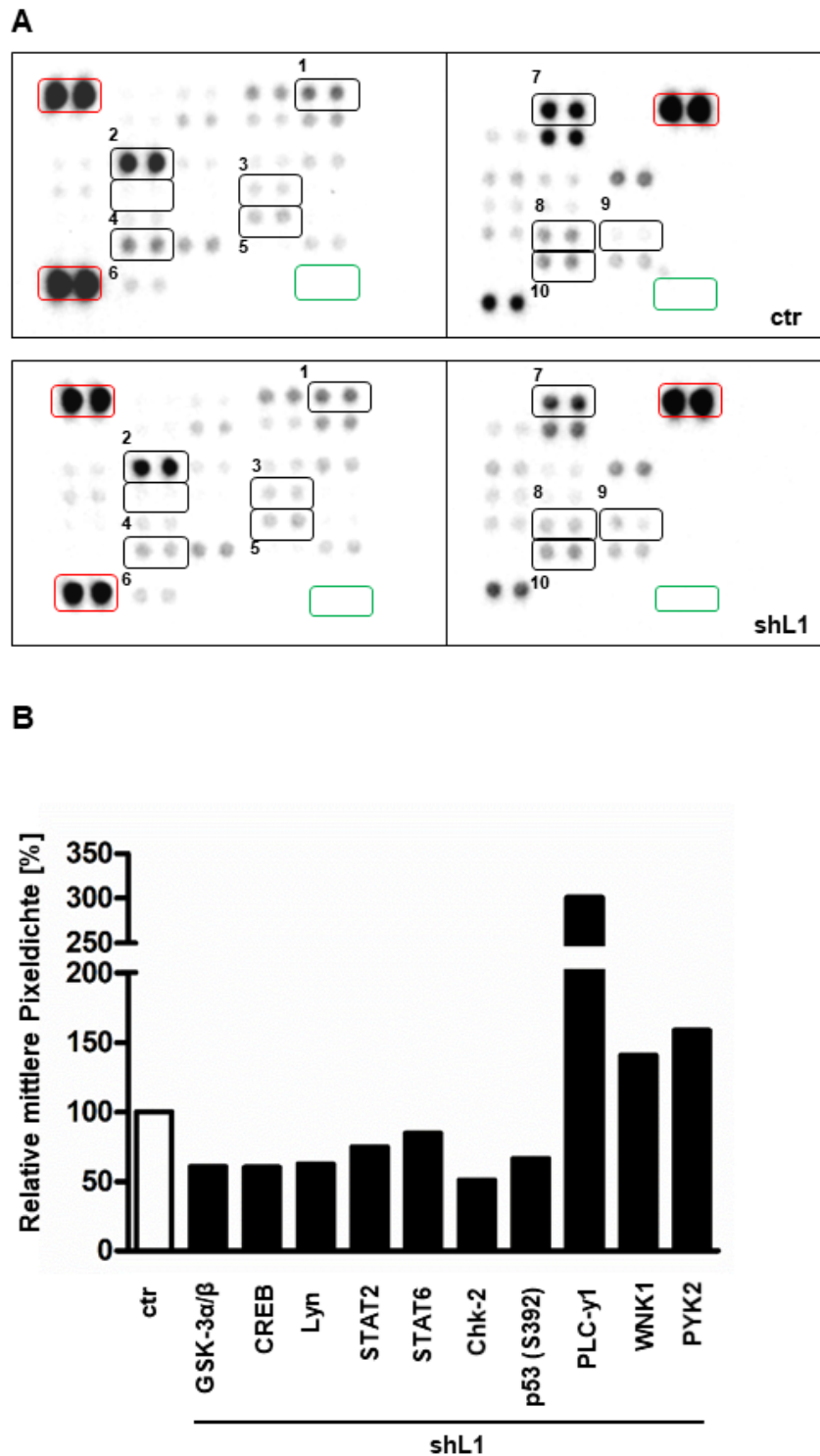


Abbildung 22: Ergebnis des Proteom Profiler™ – Human Phospho-Kinase Arrays zum Vergleich der differentiellen Phosphorylierung von RB355 L1CAM Knockdown- und Kontrollzellen.

(A) Darstellung der Chemilumineszenz Reaktion der Phosphokinase Array Membranen. Die grünen Markierungen kennzeichnen die Negativkontrollen (PBS), die roten Markierungen die Positivkontrollen/Referenzkontrollen. Die schwarzen Markierungen kennzeichnen Proteine mit im Vergleich zur Kontrolle verändertem Phosphorylierungsgrad: GSK-3α/β [1], CREB [2], Lyn [3], STAT2 [4], STA6 [5], Chk-2 [6], p53 an Serinrest (S) 392 [7], PLC-γ1 [8], WNK1 [9], PYK2 [10]. (B) Quantifizierung des Chemilumineszenzsignals mittels MicroManager 1.4 Software und Berechnung der relativen prozentualen Unterschiede zwischen den mit Kontrollviruspartikeln transduzierten (ctr) und L1CAM Knockdown (shL1) RB355 Zellen.

Zusätzlich zu der Analyse der differentiellen Phosphorylierung potentieller L1CAM Zielproteine wurden mit den gleichen Proben mittels Proteom Profiler™ Array - Human XL Oncology Array Kit onkologisch relevante Gene untersucht.

Nach der densitometrischen Auswertung der Membranen konnten Unterschiede in der Expression verschiedener onkologisch relevanter Proteine festgestellt werden (Abbildung 23A und 22B).

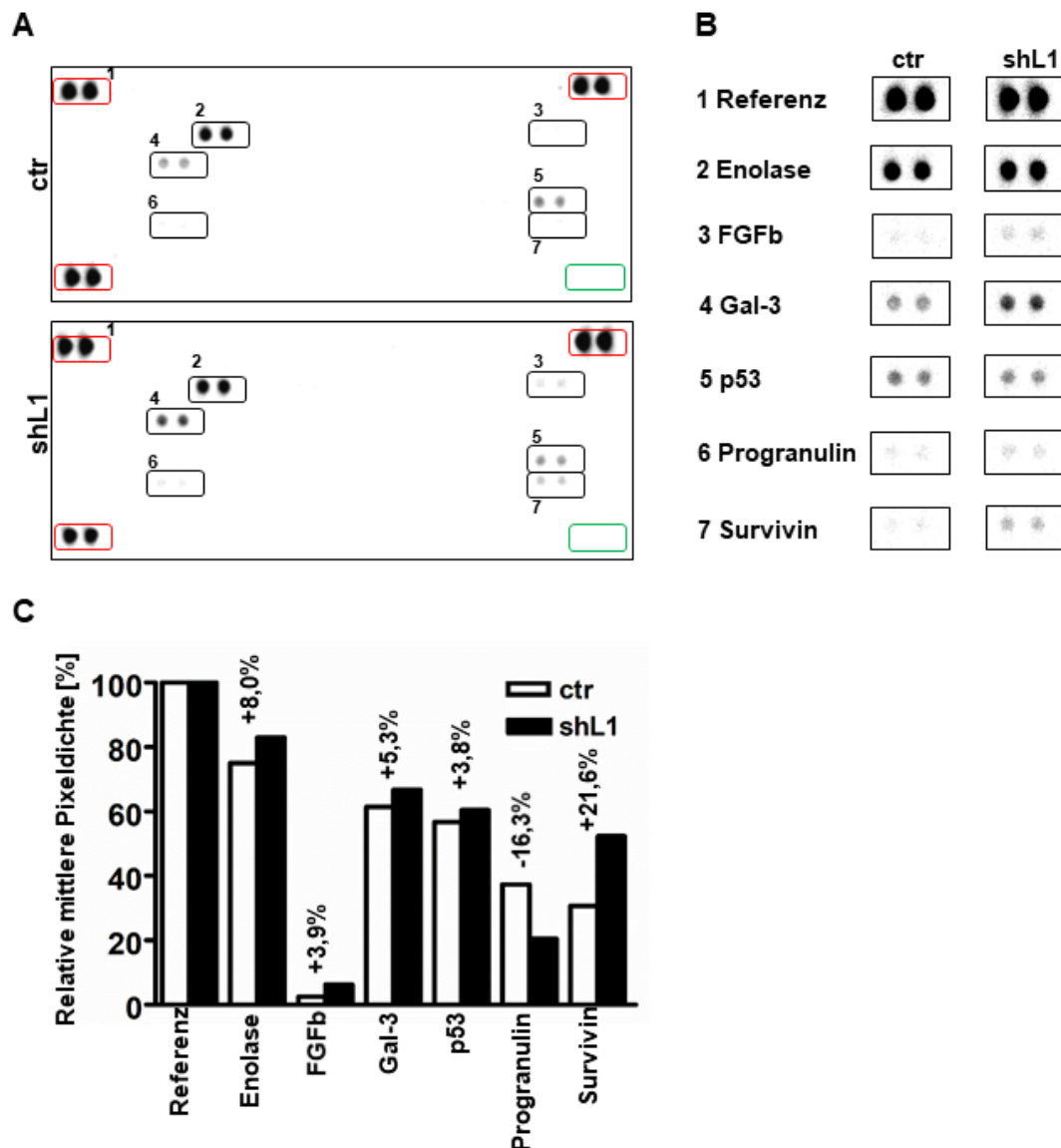


Abbildung 23: Ergebnis des Proteom Profiler™ - Human XL Oncology Array zum Vergleich der differentiellen Expression onkologisch relevanter Proteine in RB355 L1CAM *Knockdown*- und Kontrollzellen.

(A, C) Darstellung der Chemilumineszenzreaktion der *Human XL Oncology Array* Membranen. Die grünen Markierungen kennzeichnen die Negativkontrollen (PBS) und die roten Markierungen die Positivkontrollen. Die schwarzen Markierungen kennzeichnen Proteine mit deutlicher, im Vergleich zur Kontrolle (ctr) veränderter Expression der L1CAM *Knockdown* RB355 Zellen: Referenz (1), Enolase (2), Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGFB)(3), Galektin-3 (Gal-3)(4), p53 (4), Progranulin (6), Survivin (7). (C) Quantifizierung des Chemilumineszenzsignals mittels MicroManager 1.4 Software und Berechnung der relativen prozentualen Unterschiede zwischen Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln transduziert wurden (ctr) und L1CAM *Knockdown* (shL1) RB355 Zellen.

Nach dem *Knockdown* von L1CAM konnten im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöhte Expressionsraten für folgende Proteine nachgewiesen werden: Enolase, Fibroblastenwachstumsfaktors 2 (FGFb), Galektin-3 (Gal-3), p53 und Survivin. Die Progranulin Expression ist im Vergleich zu den Kontrollzellen nach L1CAM *Knockdown* verringert (Abbildung 23C). Die im Onkotarget Array gezeigte deutliche Zunahme der Survivin und verringerte Progranulin Expression, ließ sich nicht mittels *Real-time*-PCR bestätigen (Daten nicht gezeigt).

5.4.2 Untersuchung der Expression von L1CAM Zielgenen

Um die Proteom Array Daten zu verifizieren und somit mögliche Zielgene von L1CAM zu identifizieren wurde die Expression von Galectin-3 (Gal-3) und des Fibroblastenwachstumsfaktors 2 (*fibroblast growth factor basic*, FGFb) nach L1CAM *Knockdown* bzw. dessen Überexpression mittels *Real-time*-PCR (Abbildung 24A und C) und Western Blot (Abbildung 24B und D) analysiert. Zusätzlich wurde auch die Expression von Ezrin, eines bekannten L1CAM Zielproteins (Guo *et al.*, 2017) untersucht. Ebenso wurden Gal-3 und FGFb bereits als Zielgene von L1CAM bzw. dessen Bindepartner im Zusammenhang mit anderen Krebsentitäten beschrieben (Probstmeier *et al.*, 1995; Díez-Revuelta *et al.*, 2010; Mohanan *et al.*, 2013; van der Maten *et al.*, 2019). Daher sollte an dieser Stelle der Zusammenhang der L1CAM Regulation und der differentiellen Expression dieser Zielgene im Retinoblastom verifiziert werden.

Die Expression von Gal-3 und FGFb nach L1CAM *Knockdown* zeigte, anders als im Onkotarget Array beobachtet, keine eindeutige Regulation auf Proteinebene im Western Blot (Abbildung 24B). Für die Proteinexpression von Ezrin hingegen konnte nach dem L1CAM *Knockdown* eine Reduktion um 55,0% nachgewiesen werden.

Obwohl die Verifikation nicht das gleiche Ergebnis hinsichtlich der Proteinexpression von Gal-3 und FGFb nach dem L1CAM *Knockdown* erzielte wie die Onkotarget Array Analyse der untersuchten Zielgene sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Überexpression von L1CAM den zum *Knockdown* gegenteiligen Effekt auf die RNA- bzw. Proteinexpression hervorruft. Zu diesem Zweck wurde die Expression von Ezrin, Gal-3 und FGFb in RB247 L1CAM-überexprimierenden Zellen analysiert. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von L1CAM zu einer erhöhten mRNA sowie Proteinexpression von Ezrin, Gal-3 und FGFb im Vergleich zu den mit den Kontrollviruspartikeln behandelten Zellen führte.

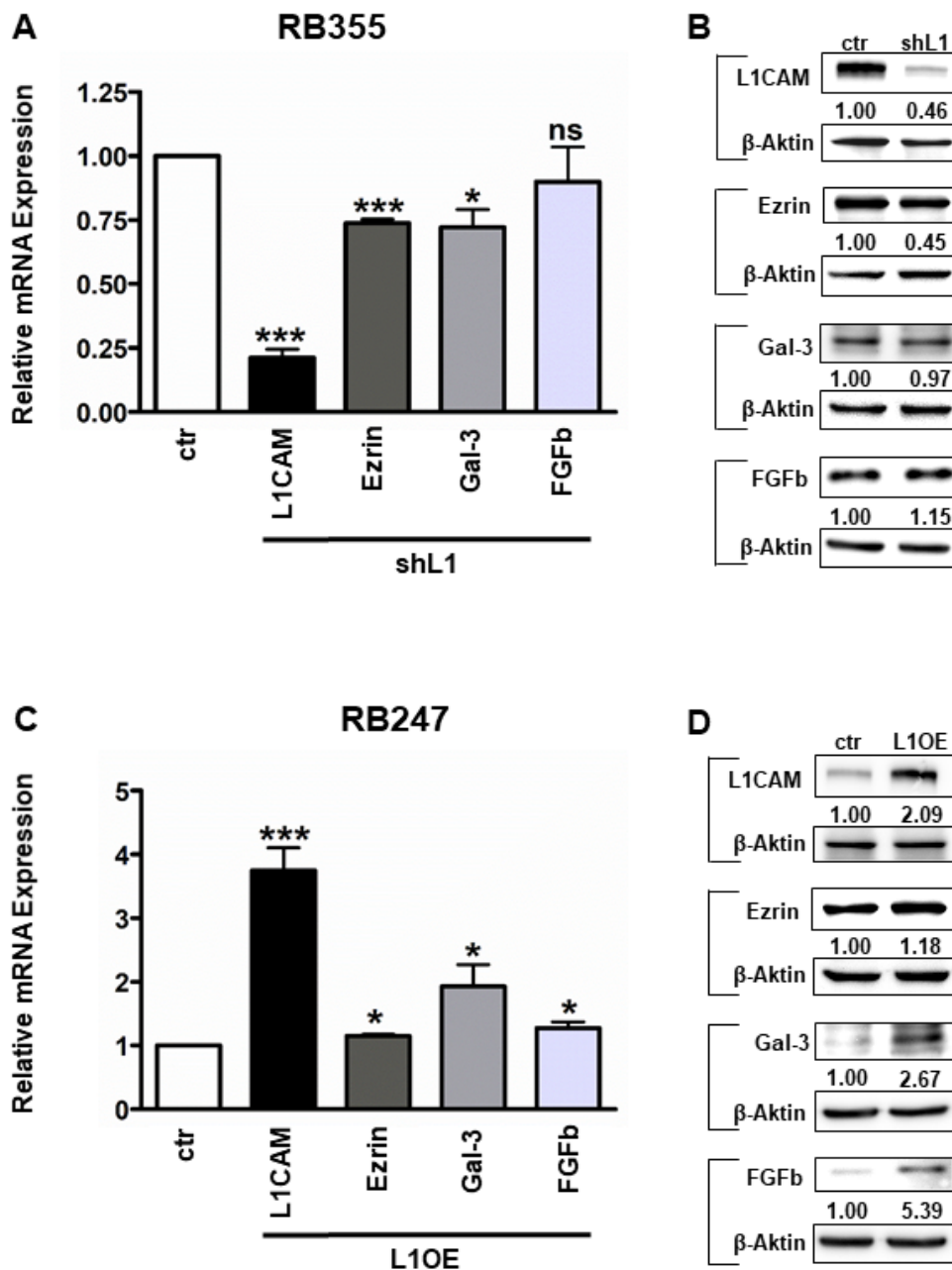


Abbildung 24: Verifikation der differentiellen Genexpression von Ezrin, Galectin-3 und FGFB nach dem L1CAM Knockdown in RB355 Zellen sowie der L1CAM Überexpression in RB247 Zellen.

Relative Genexpression von L1CAM, Ezrin, Galectin-3 (Gal-3) und Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGFB) nach dem *Knockdown* von L1CAM (shL1) in RB355 Zellen und der Überexpression von L1CAM (L1OE) in RB247 Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln (ctr) transduziert wurden. Die Genexpression wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR (A, C) und die Proteinexpression mittels Western Blot Analyse (B, D) verifiziert. Als Ladekontrolle diente beta Aktin (β -Aktin). Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens fünf unabhängigen Zellanalysen. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

5.4.3 L1CAM und Epitheliale-Mesenchymale-Transition

Die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) ist ein Schlüsselprozess während der Entwicklung von Geweben (Kiefel *et al.*, 2012). Für die Untersuchung der Effekte einer veränderten L1CAM Expression in RB Zellen auf die EMT wurde die Regulation der mesenchymalen EMT Marker Vimentin und N-Cadherin sowie des epithelialen Markers *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) untersucht.

Nach dem L1CAM *Knockdown* in RB355 und WERI-Rb1 Zellen und der Überexpression in RB247 Zellen wurde die Expression der EMT Marker mittels quantitativer *Real-time*-PCR untersucht (Abbildung 25A-C). Die Vimentin Expression ist nach L1CAM *Knockdown* signifikant verringert, aber nach L1CAM Überexpression nicht signifikant erhöht. Für die EMT Marker N-Cadherin und EpCAM ist keine signifikante Veränderung der Expression nach dem L1CAM *Knockdown* und der Überexpression in den untersuchten Zelllinien zu beobachten.

Auf Basis der Expressionsuntersuchungen mittels quantitativer *Real-time*-PCR wurde die Proteinexpression von Vimentin untersucht. Nach L1CAM *Knockdown* in RB355 und WERI-Rb1 Zellen konnte eine 9%-ige (RB355) bzw. 59%-ige (WERI-Rb1) Verringerung der Vimentin Expression detektiert werden. Die Überexpression von L1CAM in RB247 Zellen führte zu einer 65%-igen Erhöhung der Vimentin Proteinexpression (Abbildung 25D).

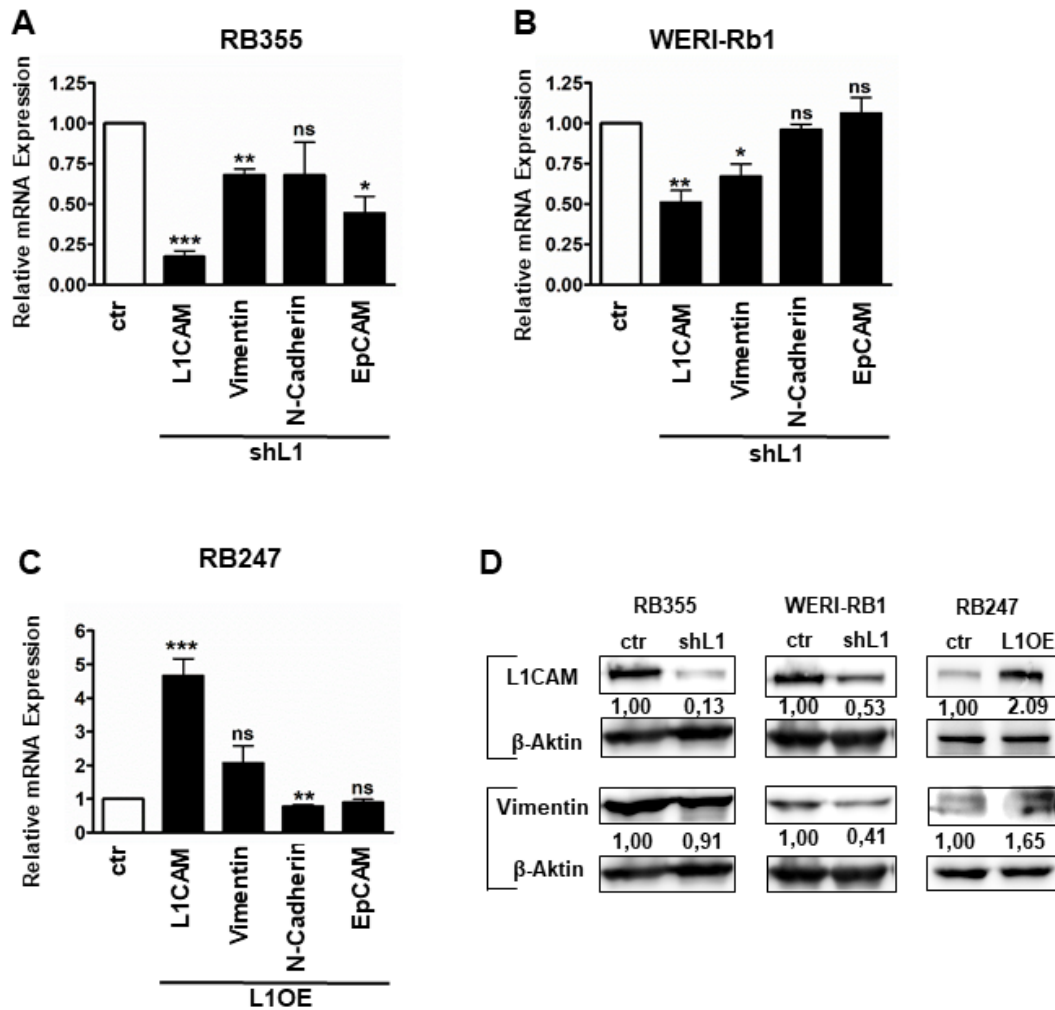


Abbildung 25: Verifikation der differentiellen Genexpression von Vimentin, N-Cadherin und EpCAM nach dem L1CAM Knockdown sowie nach L1CAM Überexpression in drei RB Zelllinien.

Relative Genexpression von L1CAM, Vimentin, N-Cadherin und EpCAM in RB355 und WERI-Rb1 Zellen nach L1CAM *Knockdown* (shL1) in RB355 und WERI-Rb1 sowie nach L1CAM Überexpression (L1OE) in RB247 Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die Genexpression wurde mittels quantitativer *Real-time-PCR* (A-C) sowie die L1CAM bzw. Vimentin Proteinexpression mittels Western Blot Analyse (D) verifiziert. Im Western Blot wurde das gesamte L1CAM Molekül (L1CAM), Vimentin und als Ladekontrolle beta Aktin (β -Aktin) detektiert. Die Bandenintensität wurde mit der MicroManager 1.4 Software quantifiziert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens fünf unabhängigen Zellanalysen. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

5.5 Die Rolle von L1CAM bei der Entwicklung von Chemotherapieresistenzen

Um die Rolle von L1CAM bei der Entstehung von Chemotherapieresistenzen genauer untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit zunächst die Expression von L1CAM in bereits Etoposid-resistenten Zellen im Vergleich zu den sensitiven Zellen mittels *Real-time*-PCR und Western Blot quantifiziert, um etwaige Unterschiede der L1CAM Expression feststellen zu können.

Um einen Effekt der L1CAM Regulation auf die Sensitivität der RB Zellen nachzuweisen, wurden parentale RB Zelllinien nach dem *Knockdown* bzw. der Überexpression von L1CAM mit verschiedenen Konzentrationen von Vincristin, Etoposid und Cisplatin behandelt und die Zellviabilität, im Vergleich zu den jeweils behandelten Kontrollzellen, ermittelt. Die in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika wurden gewählt, da Vincristin, Etoposid und Carboplatin in der VEC-Kombinationstherapie standardmäßig zur Behandlung des Retinoblastoms angewendet werden (zur Übersicht: (Fabian *et al.*, 2017)). Zudem wird eine Resistenzentwicklung gegen die systemische Chemotherapie häufig bei anderen Krebsarten und in Zusammenhang mit der Überexpression von L1CAM beobachtet (Sebens Mürkoster *et al.*, 2007; Held-Feindt *et al.*, 2012).

Im Anschluss wurde ein stabiler L1CAM *Knockdown* in bereits Etoposid-resistenten RB Zellen etabliert und die Auswirkung auf die Zellviabilität sowie die Tumorbildung *in vivo* nach der erneuten Behandlung mit Etoposid untersucht.

Die Expression von *L1CAM* wurde in den Etoposid-resistenten Zelllinien mittels quantitativer *Real-time*-PCR ermittelt und auf die Expression der jeweiligen sensitiven Zelllinien normiert. Die Expression von *L1CAM* lag in den resistenten RB355-Etop Zellen im Vergleich zu den sensitiven Zellen signifikant erhöht vor. In den Zelllinien WERI-Etop und Y79-Etop lag die *L1CAM* Expression im Vergleich zu den sensitiven Zellen signifikant geringer vor (Abbildung 26A).

Für die Untersuchung und den Vergleich der L1CAM Proteinexpression wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Auf Proteinebene zeigten die RB355-Etop Zellen eine schwächere L1CAM Expression als die sensitiven RB355 Zellen. Die Etoposid-resistenten WERI-Etop Zellen zeigten eine um 75,0% verringerte Expression von L1CAM verglichen mit den sensitiven WERI-Rb1 Zellen. In den Y79-Etop Zellen lag die Expression des L1CAM Proteins im Vergleich zu den sensitiven Y79 Zellen um 2,0% erhöht vor (Abbildung 26B).

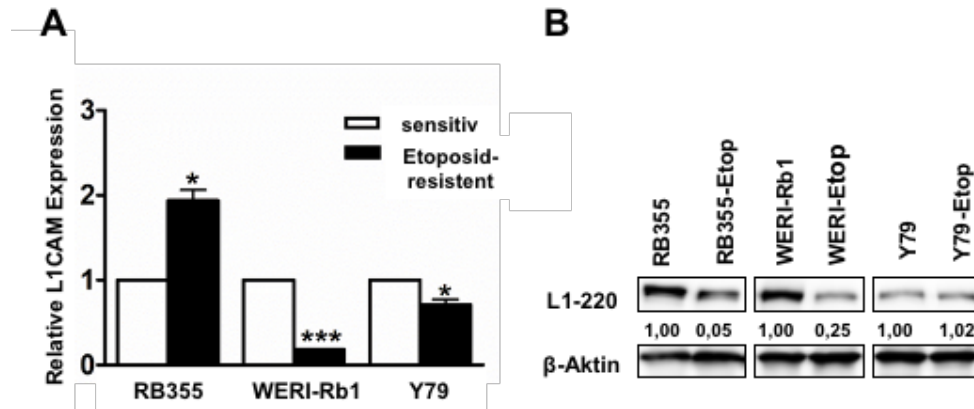


Abbildung 26: Vergleich der L1CAM Expression von sensitiven und Etoposid-resistenten Retinoblastomzellen.

(A) Relative L1CAM Expression der Etoposid-resistenten Zellen im Vergleich zu sensitiven Retinoblastomzelllinien ermittelt durch quantitative *Real-time*-PCR. (B) L1CAM Proteinexpression in Etoposid-resistenten Retinoblastomzelllinien im Vergleich zu sensitiven Zelllinien ermittelt durch Western Blot Analysen. Im Western Blot wurde das gesamte L1CAM Molekül (L1-220) und als Ladekontrolle beta Aktin (β -Aktin) detektiert. Die Balken und die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Analysen. * $p < 0,05$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

5.5.1 Einfluss des L1CAM *Knockdowns* und der L1CAM Überexpression auf die Chemosensitivität von Retinoblastomzellen

Um den Einfluss von L1CAM auf die Chemotherapieresistenz zu untersuchen wurden WERI-Rb1 Kontroll- und L1CAM *Knockdown* Zellen bzw. RB247 Kontroll- und L1CAM Überexpressionszellen mit verschiedenen Konzentrationen der Chemotherapeutika Vincristin, Etoposid oder Cisplatin behandelt und im Anschluss die Zellviabilitäten bestimmt.

Für WERI-Rb1 Zellen war bei der Behandlung mit Vincristin und Etoposid eine signifikante Verringerung der Zellviabilität nach L1CAM *Knockdown* und Behandlung mit den Chemotherapeutika nachweisbar (Abbildung 27A und B). Eine Behandlung mit Cisplatin nach dem *Knockdown* von L1CAM in WERI-Rb1 Zellen führte nur bei einer Konzentration von 5 μ M und 10 μ M zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (Abbildung 27C). Die L1CAM-überexprimierenden RB247 Zellen zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Zellviabilität nach der zusätzlichen Behandlung mit Vincristin (Abbildung 27D). Für Etoposid konnten nach der L1CAM Überexpression keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellviabilität, ausgenommen bei einer Konzentration von 0,1 μ M, beobachtet werden. Die Überexpression von L1CAM und die anschließende Behandlung mit Cisplatin führte in RB247 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der

Zellviabilität, ausgenommen die Behandlung mit Konzentrationen von 10 μM bzw. 100 μM .

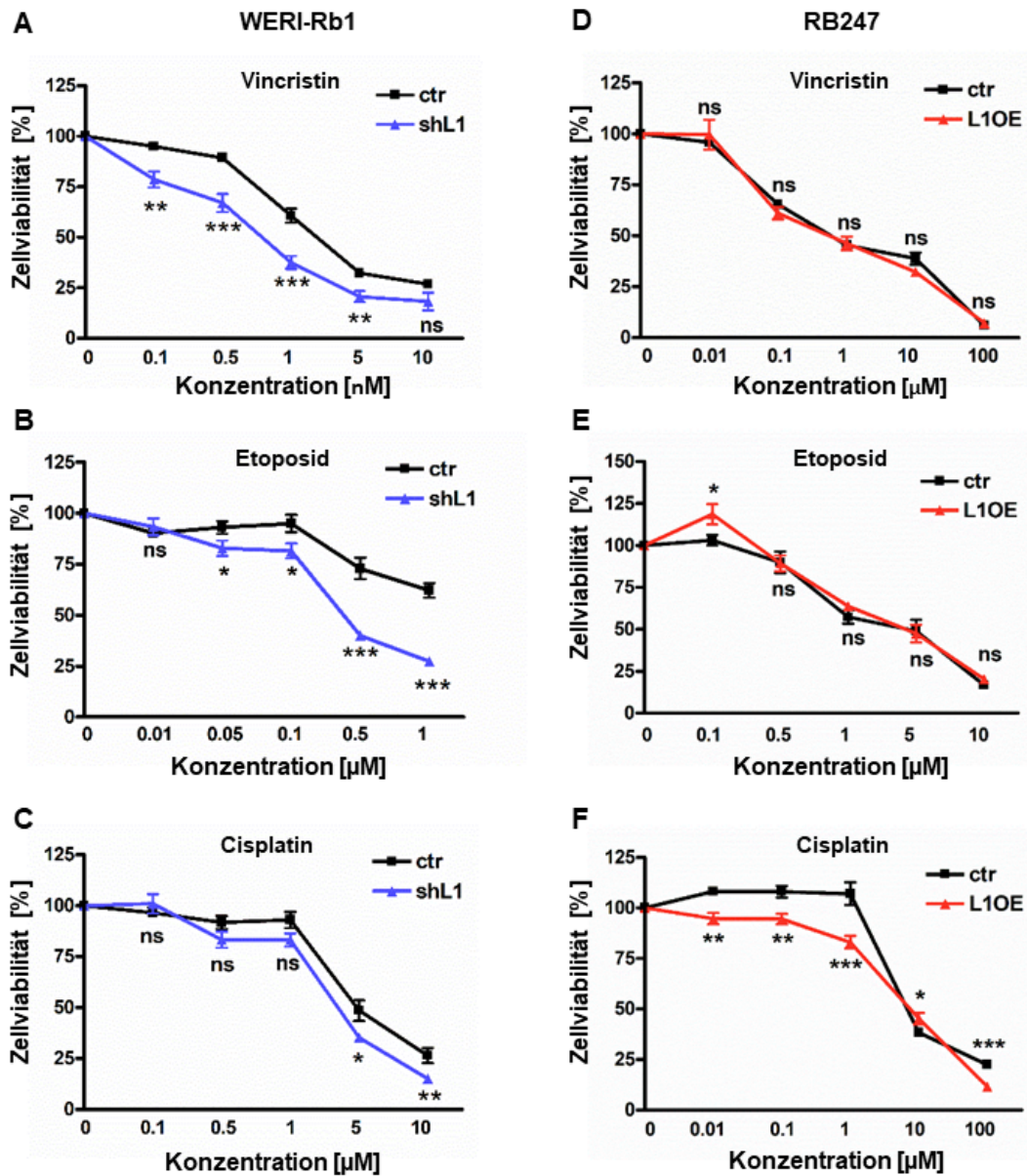


Abbildung 27: Einfluss von L1CAM auf die Chemoresistenz von WERI-Rb1 und RB247 Zellen.

Zellviabilitäten der WERI-Rb1 Kontrollzellen (ctr) und der L1CAM *Knockdown* Zellen (shL1) bzw. der RB247 Kontrollzellen (ctr) und der L1CAM Überexpressionszellen (L1OE) nach der Behandlung mit den angezeigten Konzentrationen von Vincristin, Cisplatin und Etoposid. Die Zellviabilität wurde 72 h nach der Zugabe der Zytostatika mittels WST-1 Assay bestimmt. Punkte und Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchsansätzen. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt durch den unpaarigen studentischen t-Test.

5.5.2 Effekte des L1CAM *Knockdowns* auf Etoposid-resistente Retinoblastomzellen

Um die Rolle von L1CAM bei der Entstehung von Chemotherapieresistenzen weiter zu untersuchen, wurde in Etoposid-resistenten RB Zellen die Expression von L1CAM durch die Etablierung eines lentiviralen *Knockdowns* verringert. Der erfolgreiche L1CAM *Knockdown* wurde für jeden Versuchsansatz mittels quantitativer *Real-time-PCR* (Abbildung 28A) und Western Blot (Abbildung 28B) verifiziert.

Um einen Einfluss des L1CAM *Knockdowns* auf die Chemotherapieresistenz der RB Zellen nachweisen zu können, wurden die transduzierten Zellen mit der jeweiligen Etoposidkonzentration behandelt, mit denen sie unter normalen Kultivierungsbedingungen behandelt werden. Der Vergleich von Etoposid-behandelten Kontrollzellen mit Etoposid-behandelten L1CAM *Knockdown* Zellen zeigte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität (Abbildung 28C-E). Somit führte eine zusätzliche Behandlung mit Etoposid nach L1CAM *Knockdown* zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität von RB Zelllinien.

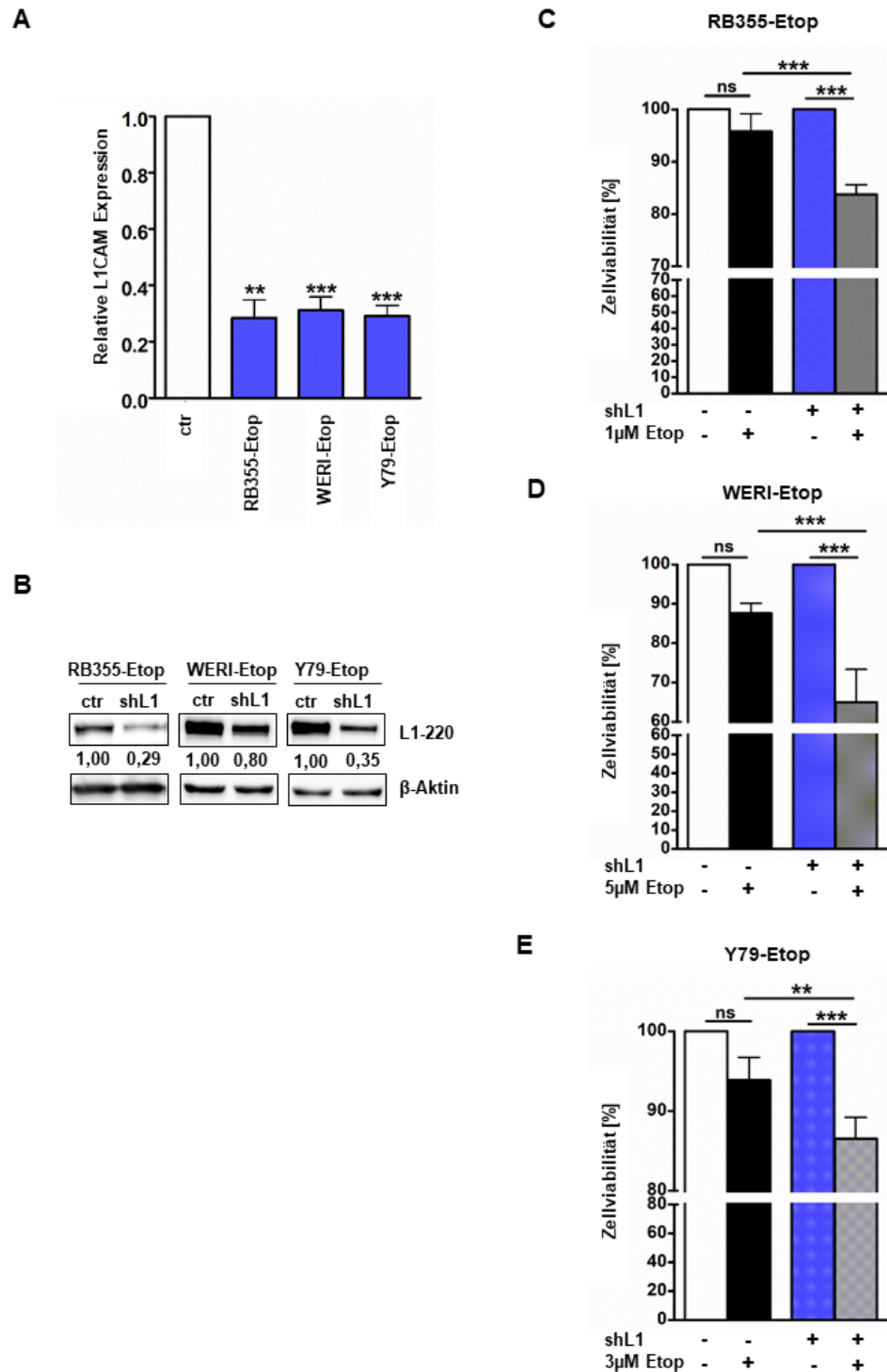


Abbildung 28: Einfluss des L1CAM *Knockdowns* in RB355-Etop, WERI-Etop und Y79-Etop Zellen auf die Zellviabilität *in vitro*.

A, B Verifizierung des stabilen, lentiviralen L1CAM *Knockdown* mittels quantitativer *Real-time*-PCR von mindestens drei unabhängigen Transduktionen (A) und mittels Western Blot Analyse (B). Im Western Blot wurde das gesamte L1CAM Molekül (L1-220) und als Ladekontrolle beta Aktin (β -Aktin) detektiert. (C-E) Nach *Knockdown* von L1CAM (shL1 +) in RB 355-Etop (C), WERI-Etop (D) und Y79-Etop Zellen (E) wurde die Zellviabilität im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln (shL1, -) behandelt wurden, nach 72-stündiger Inkubationszeit mit den jeweiligen Etoposidkonzentrationen mittels WST-1 Assay bestimmt. Die mit der jeweiligen Kultivierungskonzentration von Etoposid behandelten Ansätze (Etoposid, +) wurden auf die jeweils unbehandelten Ansätze (Etoposid, -) normiert. Die Balkendiagramme repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchsansätzen. ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test bzw. *one-way* ANOVA mit Newman-Keuls *post test*.

Um den Einfluss des L1CAM *Knockdowns* auf die Tumorbildung der Etoposid-resistenten RB Zellen *in vivo* zu untersuchen wurden diese zusätzlich mit Etoposid behandelt und auf die Chorioallantoismembran von 10 Tage alten Hühnerembryonen inokuliert. Abbildung 29 zeigt repräsentative Aufnahmen der Tumormessung nach der Präparation (Abbildung 29, linke Spalte) und die CAM Tumore *in situ* (Abbildung 29 rechte Spalte). Im CAM Assay konnte eine signifikante Reduktion der CAM Tumorgröße (Abbildung 30A, C, E) sowie des Tumorgewichts (Abbildung 30B, D, F) nach dem L1CAM *Knockdown* und der zusätzlichen Behandlung mit Etoposid beobachtet werden. Dahingegen konnte kein signifikanter Unterschied in der Tumorbildungsrate nachgewiesen werden (Appendix Abbildung 4). Somit führte der *Knockdown* von L1CAM und die zusätzliche Behandlung mit Etoposid in allen drei RB Zelllinien zu signifikant kleineren und leichteren Tumoren, was die zuvor ermittelten Ergebnisse der Zellviabilitätsbestimmung widerspiegelte.

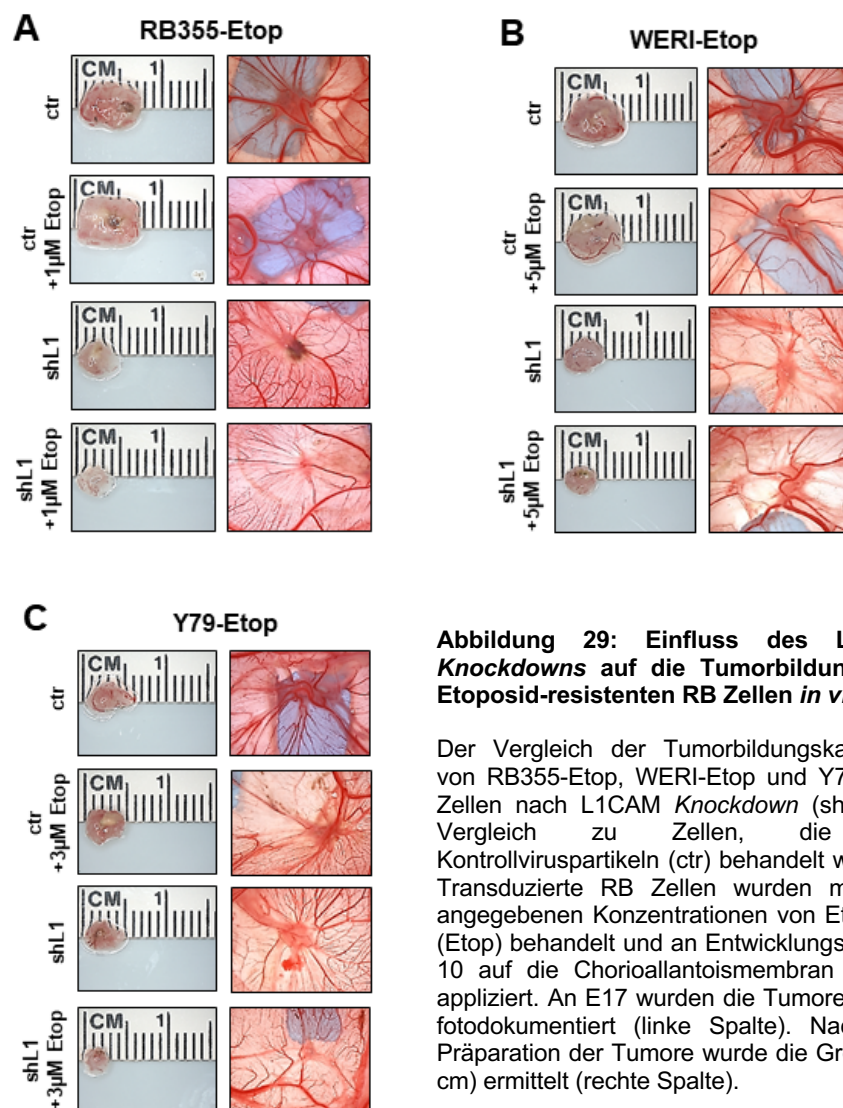


Abbildung 29: Einfluss des L1CAM *Knockdowns* auf die Tumorbildung von Etoposid-resistenten RB Zellen *in vivo*.

Der Vergleich der Tumorbildungskapazität von RB355-Etop, WERI-Etop und Y79-Etop Zellen nach L1CAM *Knockdown* (shL1) im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln (ctr) behandelt wurden. Transduzierte RB Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Etoposid (Etop) behandelt und an Entwicklungstag (E) 10 auf die Chorioallantoismembran (CAM) appliziert. An E17 wurden die Tumore *in situ* fotodokumentiert (linke Spalte). Nach der Präparation der Tumore wurde die Größe (in cm) ermittelt (rechte Spalte).

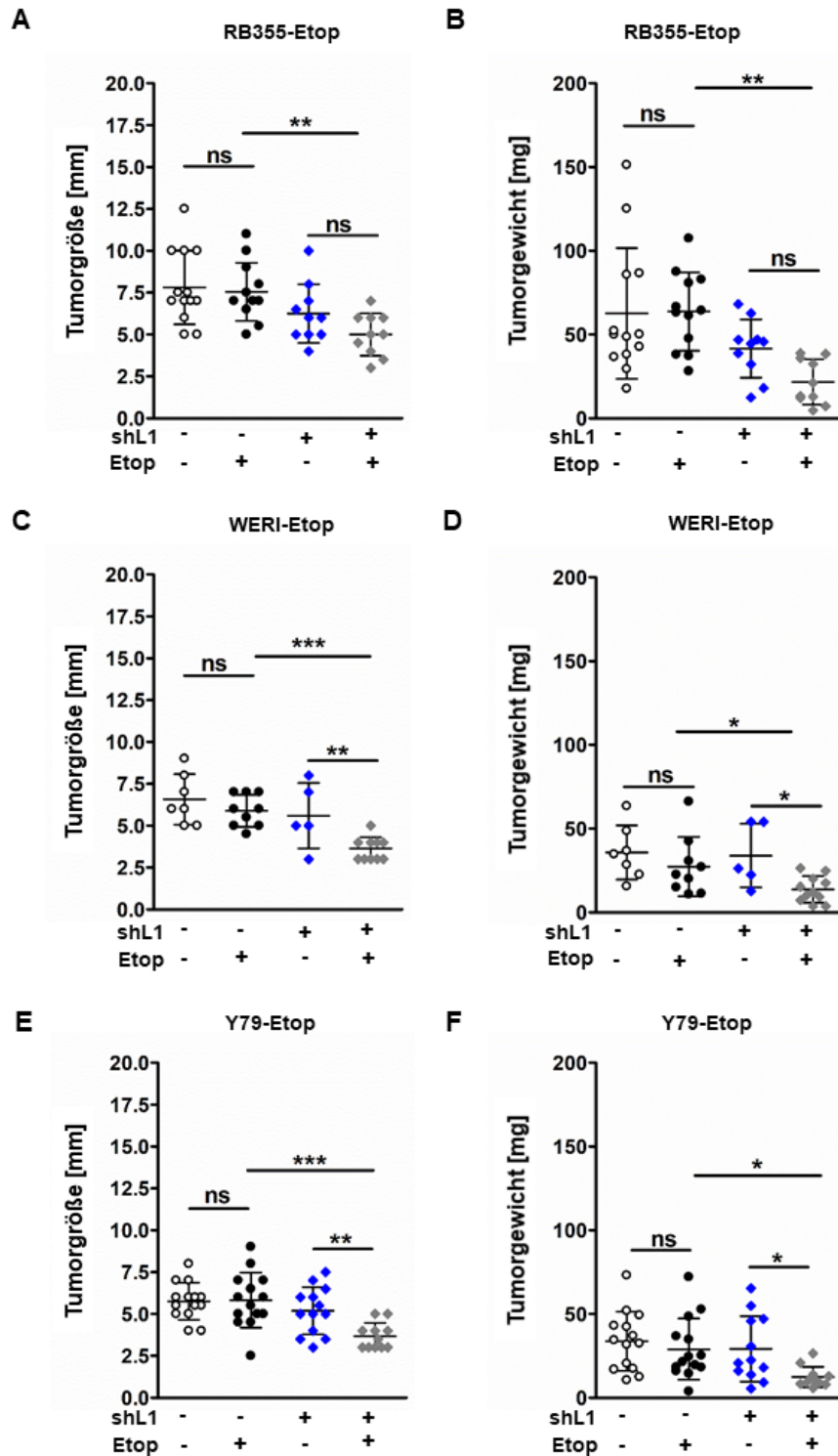


Abbildung 30: Einfluss des L1CAM Knockdowns in RB355-Etop, WERI-Etop und Y79-Etop Zellen auf die Tumorbildung *in vivo*.

Vergleich der Tumorbildungskapazität von RB355-Etop, WERI-Etop und Y79-Etop Zellen nach L1CAM *Knockdown* (shL1, +) im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln behandelt wurden (shL1, -). Transduzierte RB Zellen wurden mit der jeweiligen Kultivierungskonzentration von Etoposid (Etop, +) behandelt und an Entwicklungstag (E) 10 auf die Chorioallantoismembran (CAM) appliziert. An E17 wurden die Tumore präpariert und die Größe (A, C, E) sowie das Tumorgewicht (B, D, F) ermittelt. Die *Scatter-Dotplots* mit Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied ermittelt durch *one-way ANOVA* mit Newman-Keuls *post test*.

5.6 Die Rolle der Sheddasen ADAM10 und ADAM17 im Retinoblastom

Um die Funktion der Sheddasen ADAM10 und ADAM17 bei der Prozessierung von L1CAM und deren Rolle bei der Tumorprogression des Retinoblastoms besser verstehen zu können, wurde zunächst die Expression dieser Gene mittels quantitativer *Real-time-PCR* und mittels Western-Blot Analyse untersucht. Für die Untersuchung der L1CAM Prozessierung wurde die Sheddase Aktivität durch selektive Inhibitoren gehemmt und der Einfluss auf die Zellviabilität untersucht. Zusätzlich wurde die Prozessierung von L1CAM durch die Sheddasen in den RB Zelllinien RB355 und Y79 nachgewiesen.

5.6.1 ADAM10 und ADAM17 Expression in humanen Retinoblastomzelllinien

Für die Quantifizierung der *ADAM10* und *ADAM17* Genexpression wurden die Zellproben von fünf unabhängigen Kulturen verwendet und auf die Expression in humaner Retina bezogen. Die Sheddase *ADAM10* lag im Vergleich zur humanen Retina in allen untersuchten Zelllinien signifikant stärker exprimiert vor (Abbildung 31A). Die *ADAM17* mRNA lag im Vergleich zur humanen Retina bei den Zelllinien WERI-Rb1, Y79, Rbl-30, RB247 sowie RB383 signifikant hochreguliert vor. In den Zelllinien RB355 und Rbl-13 lag die Expression von *ADAM17* nicht signifikant verändert vor (Abbildung 31B).

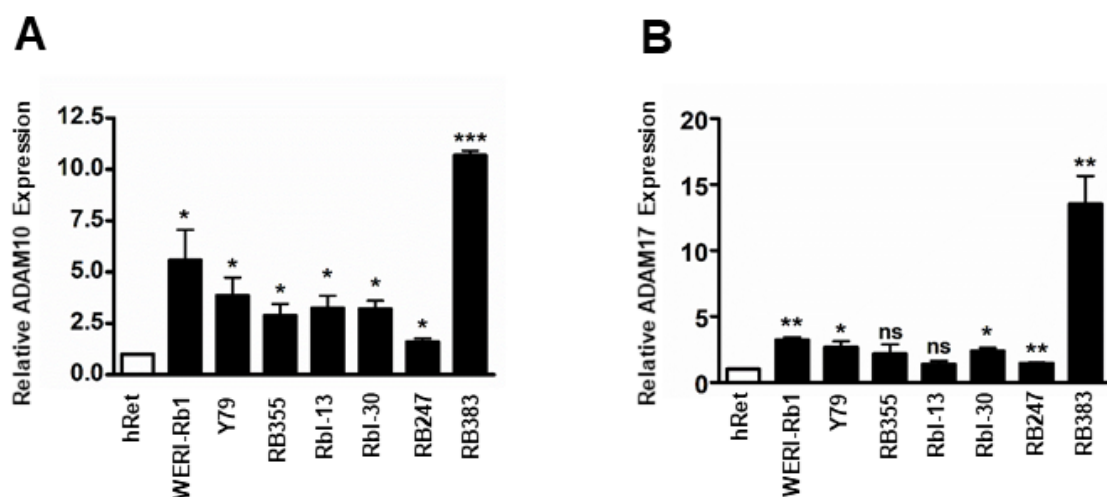


Abbildung 31: Endogene Expression von *ADAM10* und *ADAM17* in humanen Retinoblastomzelllinien.

Endogene *ADAM10* (A) und *ADAM17* (B) Expression in humanen Retinoblastomzelllinien im Vergleich zur humanen Retina (hRet). Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen RNA Analysen mittels quantitativer *Real-time-PCR*. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur humanen Retina ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

Zur Untersuchung der ADAM10 und ADAM17 Proteinexpression mittels Western Blot wurden Antikörper gewählt, die sowohl die aktive Form der Sheddasen als auch die inaktive pro-Form detektieren können. Um die Sheddaseaktivität und die Menge der L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand innerhalb der getesteten Zelllinien besser miteinander korrelieren zu können, wurden jeweils gleich viele Zellen ausgesät und für die Analyse mittels Western Blot die gleichen Volumina zellfreien Kulturüberstand eingesetzt.

Für die Sheddase ADAM10 konnte in den Zelllinien WERI-Rb1, Y79, RB355, Rbl-13, RB247 und RB383 die inaktive pro-Form des Proteins nachgewiesen werden, bei den Zelllinien RB247 und RB383 zusätzlich auch eine Bande auf Höhe der prozessierten, aktiven Form. Für die Sheddase ADAM17 wurde in den Zelllinien WERI-Rb1, Y79, RB355, Rbl-30, RB247 und RB383 die inaktive pro-Form sowie die prozessierte, aktive Form des Proteins detektiert. Die L1CAM Ektodomäne war mittels Western Blot im Kulturüberstand der Zelllinien RB355 und WERI-Rb1 deutlich erkennbar.

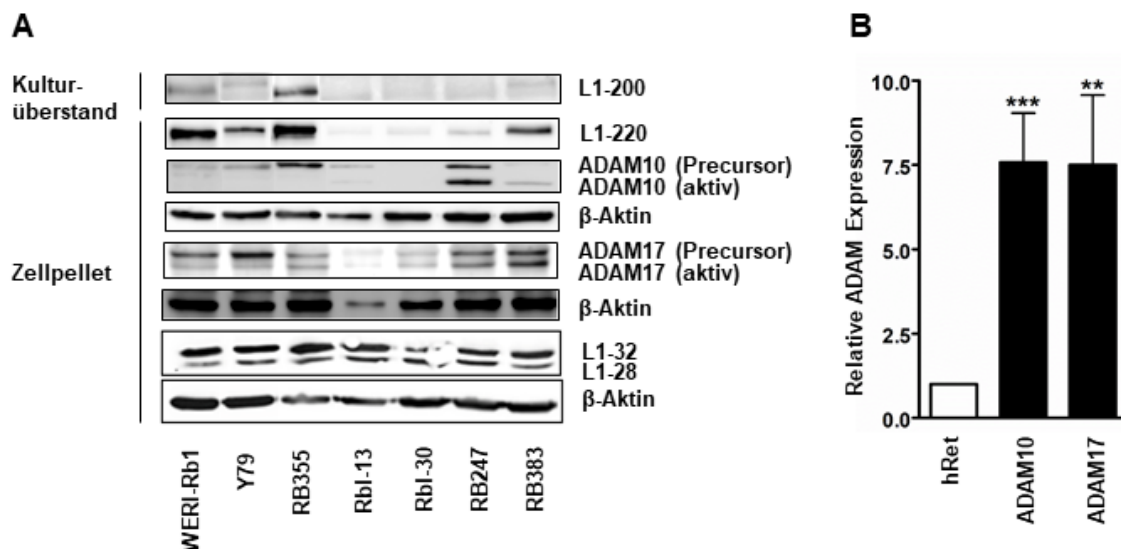


Abbildung 32: Endogene L1CAM, ADAM10 und ADAM17 Expression in humanen Retinoblastomzelllinien sowie die Expression von ADAM10 und ADAM17 in RB Tumorproben.

(A) Eine endogene Abspaltung von L1CAM und das Vorhandensein der löslichen L1-200 Ektodomäne im Kulturüberstand konnte deutlich in WERI-Rb1, Y79 und RB355 Zellen nachgewiesen werden. Die analysierten Retinoblastomzelllinien zeigten unterschiedliche Expressionsmuster für den *Precursor* (inaktive Form) und die aktive Form von ADAM10 und ADAM17. Durch die Detektion der L1CAM Endodomäne lassen sich die nach der ADAM Prozessierung entstehenden L1CAM Spezies (L1-220/200: gesamtes L1-Molekül; L1-32: membranständige L1CAM Endodomäne nach Abspalten der 200 kDa L1CAM Ektodomäne; L1-28: intrazelluläre, lösliche L1CAM Endodomäne nach Abspaltung von der Transmembrandomäne durch die γ -Sekretase Presenelin) nachweisen. Als Ladekontrolle diente beta Aktin (β -Aktin). (B) Endogene ADAM10 und ADAM17 Expression in humanen RB Tumorproben im Vergleich zur humanen Retina (hRet). Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von RNA Analysen unabhängiger RB Tumorproben (n=16) im Vergleich zur humanen Retina (Probenpool: n=5) mittels quantitativer *Real-time*-PCR. **p<0,01 oder ***p<0,001 statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur humanen Retina ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

Im Kulturüberstand der Zelllinie RB383 konnte eine schwach sichtbare Bande auf Höhe von 200 kDa nachgewiesen werden. Bei den Zelllinien Y79, Rbl-13, Rbl-30 und RB247 war dahingegen kein Signal detektierbar. Die Expression des 220 kDa, membranständigen L1CAM Proteins konnte im Proteinüberstand aus den Lysaten der Zelllinien WERI-Rb1, Y79, RB355, und RB383 deutlich gezeigt werden. Die Zelllinien Rbl-13, Rbl-30 und RB247 zeigten eine geringere L1-220 Bandenintensität (Abbildung 32A). Bei der Analyse von kryokonservierten RB Tumorproben von Patienten konnte eine signifikante Überexpression sowohl von ADAM10 als auch von ADAM17 im Vergleich zu gesundem humanen Retinagewebe nachgewiesen werden (Abbildung 32B). Der Vergleich der ADAM10 und ADAM17 Expression von unbehandelten Tumoren mit Proben von RB Tumoren, die vor der E nukleation mit einer Polychemotherapie behandelt wurden, zeigte keinen signifikanten Unterschied (Daten nicht gezeigt).

5.6.2 Aktivierung der Sheddase Aktivität durch Phorbol-12-myristat-13-acetat

Für die Untersuchung der Aktivität von ADAM10 und ADAM17 wurden die adhären te Zelllinie RB355 und die Suspensionszelllinie Y79 mit verschiedenen Konzentrationen des Sheddaseaktivators Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) behandelt und die 200 kDa große L1CAM Ektodomäne nach 48 h Inkubationszeit mittels Western Blot im zellfreien Kulturüberstand nachgewiesen. Bei den adhären ten RB355 Zellen konnte im Western Blot eine deutliche Zunahme der Bandenintensität von L1CAM im Kulturüberstand bereits nach einer Behandlung mit 25 nM PMA nachgewiesen werden (Abbildung 33A). Für die Suspensionszelllinie Y79 konnte eine deutliche Steigerung der L1CAM Bandenintensität nach einer Behandlung mit 100 nM PMA nachgewiesen werden (Abbildung 33B). Zudem konnte für beide Zelllinien gezeigt werden, dass bereits die Behandlung mit DMSO (Dimethylsulfoxid), dem Lösungsmittel für PMA, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine Zunahme der L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand bewirkt. Deshalb wurde im Folgenden nicht auf die unbehandelten, sondern auf die DMSO-behandelten Zellen normiert. Als Negativkontrolle wurde DMEM Kultivierungsmedium ohne Zusätze eingesetzt, in dem keine L1CAM Ektodomäne nachgewiesen werden konnte.

Um für weitere Untersuchungen der ADAM Aktivität eine ausreichende Steigerung der L1CAM Bandenintensität nachweisen zu können wurden für die folgenden Versuche PMA Konzentrationen von 50 nM (RB355) und 500 nM (Y79) gewählt.

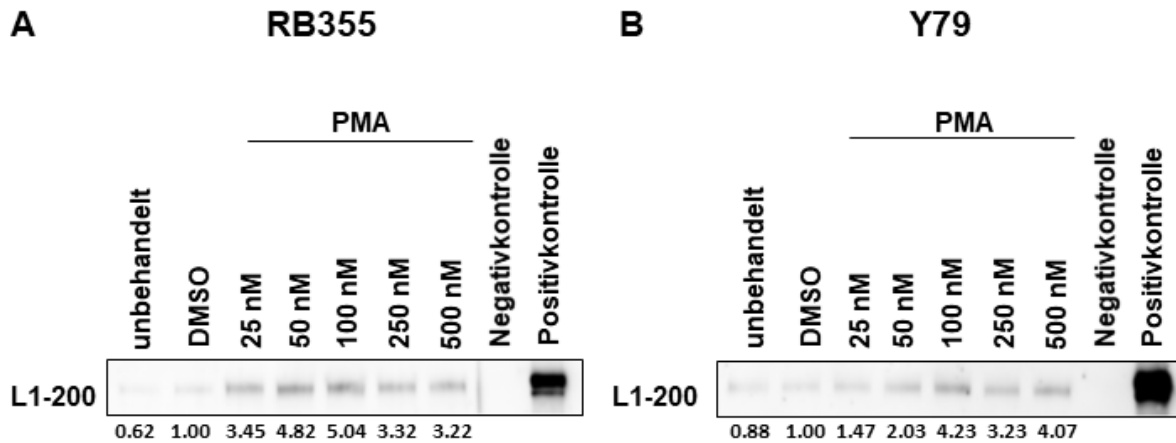


Abbildung 33: Nachweis der L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand nach nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA).

Für die Untersuchung der Steigerung der ADAM Aktivität durch PMA wurden 1×10^6 Zellen mit den jeweiligen Konzentrationen PMA behandelt und nach 48 h Inkubationszeit die Kulturüberstände gesammelt. Für die DMSO behandelte Kontrolle wurden Zellen mit dem gleichen Volumen DMSO behandelt, wie bei den PMA-behandelten Zellen als Lösungsmittel eingesetzt wurde. Als Negativkontrolle diente das Kultivierungsmedium (DMEM). Als Positivkontrolle für den L1CAM Western Blot dienten 25 μ g Protein aus HeLa Zellysat.

5.6.3 Untersuchung der Prozessierung von L1CAM durch ADAM10 und ADAM17

Für die Untersuchung der Prozessierung von L1CAM durch die Sheddasen ADAM10 und ADAM17 wurden adhärenente RB355 und die Suspensionszelllinie Y79 mit spezifischen Inhibitoren behandelt. Für die Untersuchung der ADAM10 Sheddaseaktivität wurde der ADAM10 spezifische Inhibitor GI254023X verwendet, für die Untersuchung der ADAM17 Sheddaseaktivität der ADAM17-Inhibitor TAPI-1. Die Zellen wurden zunächst für 30 min mit der jeweiligen Konzentration PMA und anschließend für 48 h mit den spezifischen ADAM Inhibitoren behandelt. Die jeweiligen Konzentrationen der verwendeten Inhibitoren wurden vorab durch die Behandlung der Zellen nach vorheriger PMA Stimulation ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Die Behandlung mit 50 nM PMA führte bei den adhärenenten RB355 Zellen zu einer signifikanten Zunahme der L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand. Die Behandlung mit 50 nM PMA in Kombination mit 2 μ M GI254023X oder 5 μ M TAPI-1 führte in beiden Fällen zu einer signifikanten Reduktion der Konzentration der L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand (Abbildung 34A und C). In Y79 Zellen führte die Behandlung mit 2 μ M GI254023X und 5 μ M TAPI-1, in Kombination mit 500 nM PMA, zu einer signifikanten Reduktion der L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand (Abbildung 34B und D). Somit konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung von L1CAM sowohl durch ADAM10 als auch durch ADAM17 geschieht.

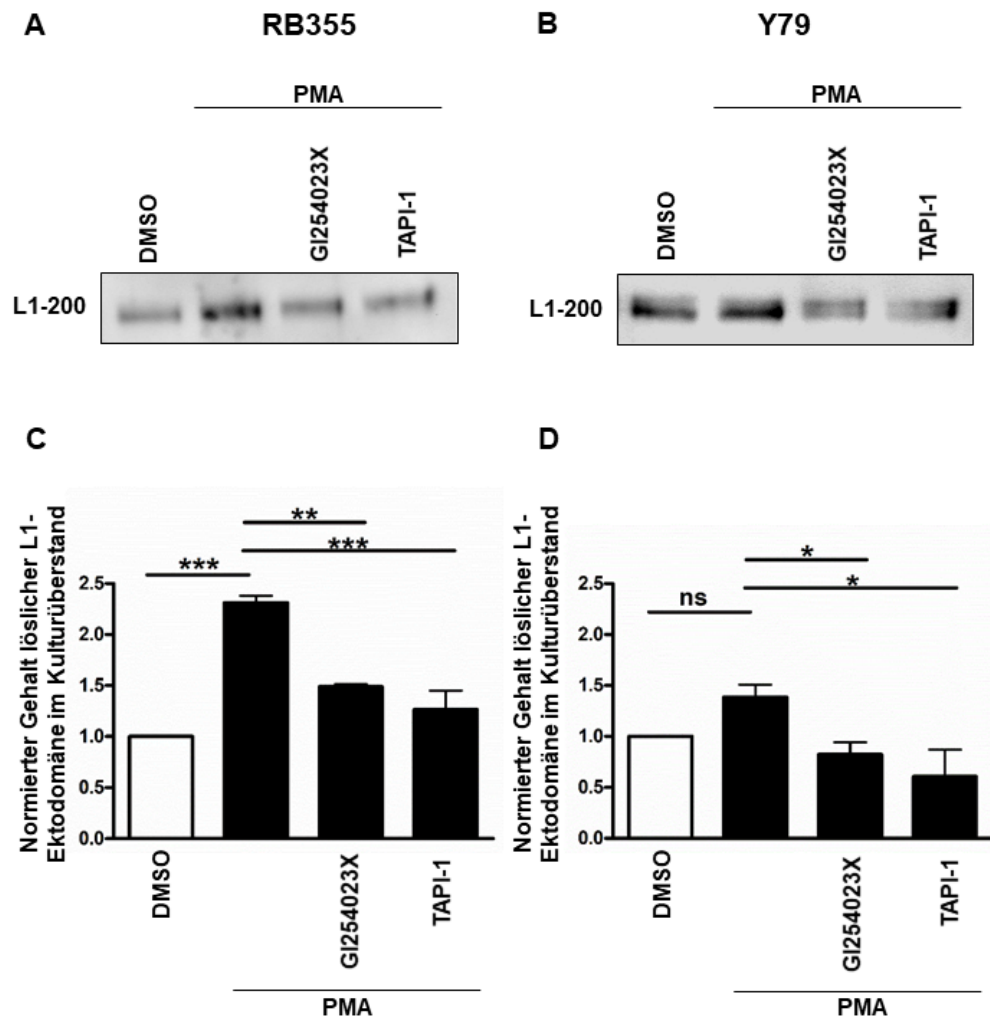


Abbildung 34: Analyse der ADAM Aktivierung durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und spezifische Inhibition von ADAM10 durch GI254023X sowie ADAM17 durch TAPI-1 in den Retinoblastomzelllinien RB355 und Y79.

(A, B) Repräsentative Western Blots zeigen die Aktivierung der L1CAM Prozessierung durch PMA Behandlung und die Inhibition der L1CAM Prozessierung durch spezifische ADAM10 (GI254023X) und ADAM17 (TAPI-1) Inhibitoren. Die Inhibitoren (2 μM GI254023X, 5 μM TAPI-1) wurden nach 30-minütiger Inkubation mit PMA (RB355: 50 μM ; Y79: 500 μM) zugegeben und die Kulturüberstände nach weiteren 48 h Inkubationszeit gesammelt. (C, D) Die Quantifizierung der L1CAM Ektodomäne (L1-200) im Kulturüberstand zeigt eine signifikante Aktivierung der L1CAM Prozessierung durch die Behandlung mit PMA (RB355) sowie die signifikante Inhibition durch die spezifischen ADAM10 und ADAM17 Inhibitoren (RB355 und Y79). ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ermittelt durch *one-way ANOVA* mit *Newman-Keuls post-test*.

Für die Untersuchung der Effekte der spezifischen ADAM Inhibitoren auf die endogene ADAM Aktivität, ohne vorherige Aktivierung durch PMA, wurden RB355 und Y79 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren behandelt und nach 48 h Inkubationszeit die Zellpellets sowie der Kulturüberstand gesammelt. Die Proteinproben aus dem Zellpellet sowie der Kulturüberstand wurden hinsichtlich des L1CAM Gehaltes mittels Western Blot Analyse untersucht (Abbildung 35).

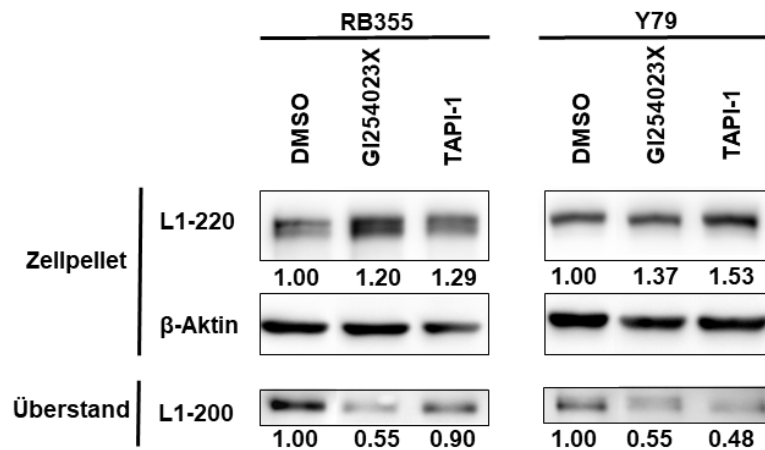


Abbildung 35: Inhibition endogener ADAM Aktivität durch Zugabe der spezifischen Inhibitoren GI254023X (ADAM10) und TAPI-1 (ADAM17).

Exemplarische Western Blots zeigen die Hemmung der L1CAM Prozessierung durch die Zugabe von jeweils 5 μM der spezifischen ADAM10 (GI254023X) und ADAM17 (TAPI-1) Inhibitoren nach 48 h Inkubationszeit. Im Western Blot wurde das gesamte L1CAM Molekül (L1-220) und als Ladekontrolle beta Aktin (β -Aktin) im Zelllysate sowie die lösliche L1CAM Ektodomäne (L1-200) im Kulturüberstand detektiert.

Nach Zugabe der ADAM Inhibitoren GI254023X und TAPI-1 konnte eine deutliche Zunahme der Bandenstärke von L1CAM in Proteinproben aus Zelllysaten mittels Western Blot nachgewiesen werden. Zudem konnte nach der Zugabe der Inhibitoren im Vergleich zu den Kontrollzellen eine Reduktion der L1CAM Bandenstärke in den Kulturüberstandproben beobachtet werden. Die endogene Prozessierung von L1CAM in den RB Zelllinien RB355 und Y79 geschieht somit ebenfalls und analog zur Prozessierung nach PMA Stimulation über die Sheddasen ADAM10 und ADAM17.

5.6.4 Einfluss der Sheddase Inhibitoren auf die Zellviabilität der humanen RB-Zelllinien RB355 und Y79

In vorangegangenen Studien konnte bereits ein Effekt des ADAM10 Inhibitors GI254023X auf die Proliferation und Apoptose von Myelomzellen nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2015). Da auf diese Weise bereits ein Zusammenhang zwischen der Hemmung der Sheddasen und der Zellproliferation gezeigt wurde, sollte in dieser Arbeit der Einfluss der Sheddaseinhibitoren GI254023X und TAPI-1 auf die Zellviabilität von RB355 und Y79 Zellen zu untersucht werden. Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass die Behandlung der Brustkrebszelllinie MCF-7 mit PMA zu einer gesteigerten Proliferation führte (Babu *et al.*, 2019).

Die Behandlung mit PMA für insgesamt 48 h führte in beiden getesteten Zelllinien zu einer signifikanten Steigerung der Zellviabilität. Ausschließlich die simultane Behandlung der Zellen mit PMA und 5 μM TAPI-1 führte bei den RB355 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (Abbildung 36). Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit PMA und GI254023X führte zu keiner signifikanten Veränderung der Zellviabilität im Vergleich zur PMA Behandlung allein.

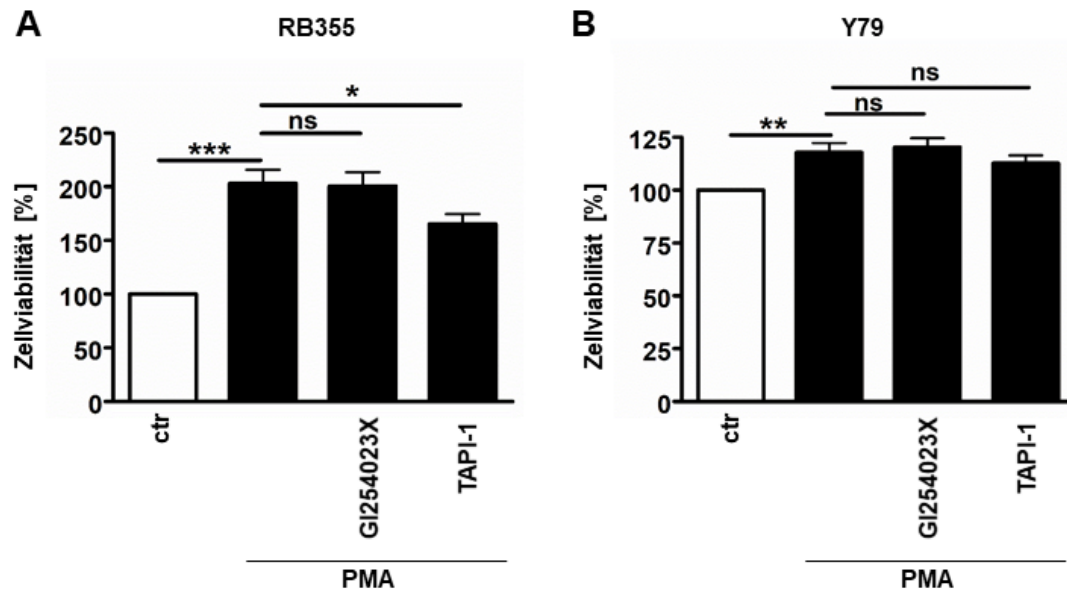


Abbildung 36: Zellviabilität nach Behandlung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) allein oder in Kombination mit dem ADAM10 (GI254023X) oder ADAM17 (TAPI-1) Inhibitor.

Zellviabilitäten nach PMA Behandlung und der Zugabe spezifischer ADAM10 (GI254023X) und ADAM17 (TAPI-1) Inhibitoren quantifiziert mittels WST-1 Assay. Die Inhibitoren (2 μM GI254023X, 5 μM TAPI-1) wurden nach 30 min Inkubation mit PMA (RB355: 50 μM ; Y79: 500 μM) zugegeben und die Zellviabilität nach 48 h Inkubationszeit gemessen. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) ermittelt durch *one-way ANOVA* mit *Newman-Keuls post-test*.

Um die isolierte Wirkung der ADAM Inhibitoren auf die Zellviabilität zu testen, wurden die Zellen ohne eine PMA Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen von GI254023X und TAPI-1 behandelt. Ein signifikanter Effekt auf die Zellviabilität konnte im Vergleich zur DMSO Kontrolle nur bei den RB355 Zellen nach einer Behandlung von 10 μM TAPI-1 und einer Inkubationsdauer von 48 h festgestellt werden. Für die restlichen getesteten Konzentrationen konnte kein signifikanter Effekt auf die Zellviabilität zum untersuchten Zeitpunkt nachgewiesen werden (Abbildung 37).

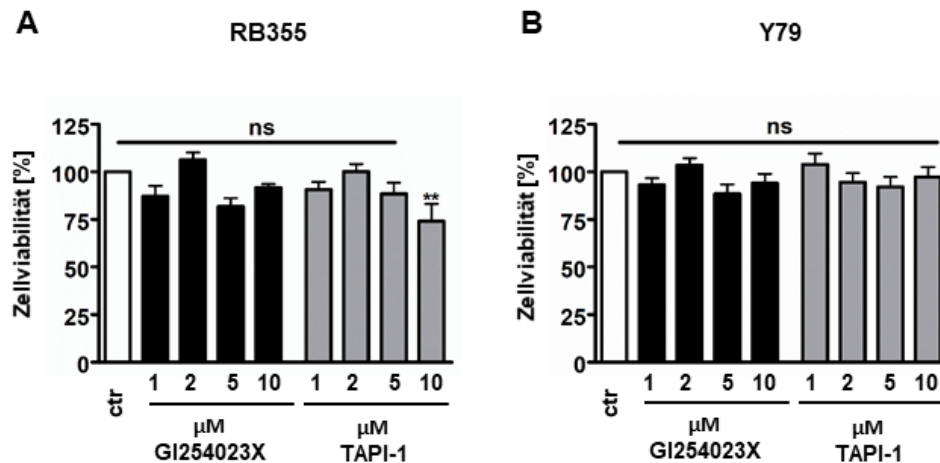


Abbildung 37: Effekte der Inhibitoren GI254023X (ADAM10) und TAPI-1 (ADAM17) auf die Zellviabilität von RB Zellen.

Zellviabilität nach Zugabe spezifischer ADAM10 (GI254023X) und ADAM17 (TAPI-1) Inhibitoren quantifiziert mittels WST-1 Assay. Die Zellen wurden mit den angezeigten Inhibitorkonzentrationen für 48 h behandelt und die Zellviabilität mittels WST-1 Assay quantifiziert. ns $p > 0,05$ oder $**p < 0,01$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) ermittelt durch *one-way ANOVA* mit *Newman-Keuls post-test*.

5.7 Untersuchung der Expression und der Rolle L1CAM-assoziiierter microRNAs in humanen Retinoblastomzellen

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss verschiedener miRNAs (miRs) auf die Expression von L1CAM im Retinoblastom betrachtet. Zunächst wurde die relative Expression von bereits in anderen Tumorentitäten bekannten L1CAM-regulierenden miRs in den unterschiedlichen RB Zelllinien untersucht und mit der jeweiligen Expression in humanem Retinagewebe verglichen. Zusätzlich wurde die Bindung der miR-346 an die, mittels *in silico* Analysen prognostizierte, Bindestelle in der 3'-UTR von L1CAM untersucht.

5.7.1 Expression von L1CAM-regulierenden microRNAs in Retinoblastomzellen

Im Folgenden sollte gezeigt werden, ob die bekannten L1CAM-regulierenden miRs miR-146a-5p, miR-34a, miR-29a-3p und miR-21-3p ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von L1CAM im RB haben, wie es bereits für andere Tumorentitäten beschrieben wurde (Hou & Yin *et al.*, 2012; Doberstein *et al.*, 2014; Duan *et al.*, 2014; Schirmer *et al.*, 2014). Dazu wurde zunächst die Expression der miRs mittels quantitativer *Real-time-PCR* in verschiedenen humanen RB Zelllinien im Vergleich zur humanen Retina untersucht.

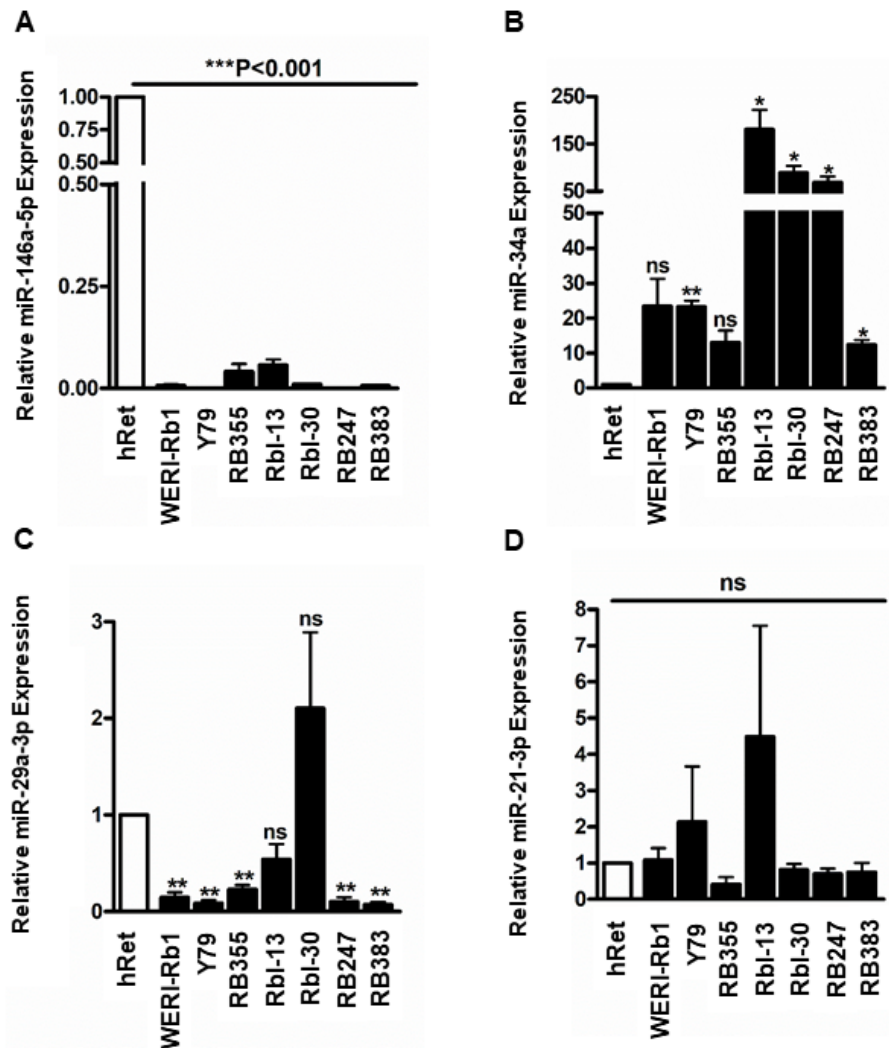


Abbildung 38: Endogene Expression L1CAM-assoziierter microRNAs in Retinoblastomzelllinien im Vergleich zur humanen Retina.

Endogene microRNA (miR) Expression in humanen Retinoblastomzelllinien im Vergleich zur humanen Retina (hRet) nach Analyse mittels quantitativer *Real-time*-PCR. Die Expression der miRs wurde auf die Expression der 5.8S ribosomalen Untereinheit, als interne Kontrolle normiert und auf die Expression der humanen Retina bezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen miRNA Analysen. Die humane Retina diente als Referenz und wurde gleich 1,0 gesetzt. ns $p>0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$ oder *** $p<0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur humanen Retina ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

Die Expression der miR-146a-5p ist in allen getesteten RB Zelllinien im Vergleich zur humanen Retina signifikant herunterreguliert (Abbildung 38A). Im Vergleich zur humanen Retina lag die miR-34a in allen getesteten Zelllinien, ausgenommen WERI-Rb1 und RB355, signifikant stärker exprimiert vor (Abbildung 38B). MiR-29a-3p lag im Vergleich zur humanen Retina in den Zelllinien WERI-Rb1, Y79, RB355, RB247 und RB383 signifikant herunterreguliert vor. In den Zelllinien Rbl-13 und Rbl-30 lag die miR-29a-3p im Vergleich zur humanen Retina dahingegen nicht signifikant reguliert vor (Abbildung 38C). Die miR-21-3p lag in allen getesteten Zelllinien nicht signifikant

reguliert vor (Abbildung 38D). Die L1CAM Proteinexpression ist in allen sensitiven RB Zelllinien, außer RB355 und Y79, im Vergleich zur humanen Retina geringer (vgl. Abbildung 6). Eine hemmende Wirkung der miR-34a auf die L1CAM Expression kann in allen untersuchten RB Zelllinien vermutet werden, da diese in RB Zellen stärker exprimiert als im humanen Retinagewebe vorlag. Da die miR-146a-5p in allen untersuchten RB Zelllinien im Vergleich zur humanen Retina signifikant geringer exprimiert vorlag, konnte eine Regulatorische Wirkung auf die L1CAM Expression in den Zelllinien RB355 und Y79 vermutet werden, da in diesen Zelllinien eine verringerte miR-146-5p Expression mit einer gesteigerten L1CAM Expression einhergeht. Für die miR-29a-3p und 21-3p kann, aufgrund der nicht signifikant unterschiedlichen Expression im Vergleich zur humanen Retina, dahingegen keine Regulation auf die L1CAM Expression anhand der ermittelten miR Expressionsdaten vermutet werden. Um im Folgenden zu untersuchen, ob die nachgewiesene reduzierte L1CAM Proteinexpression in den Etoposid-resistenten RB355-Etop und WERI-Etop Zellen (vgl. Abbildung 26), potentiell durch miRNAs reguliert wird, wurde die Expression der bereits bekannten, L1CAM-regulierenden miRNAs miR-34a und miR-146a-5p (Dalgard *et al.*, 2009; Hou & Yin *et al.*, 2012) mittels *Real-time-PCR* Analyse untersucht. Sowohl die miR-146a-5p als auch die miR-34a lagen in WERI-Rb1 und Y79 Etoposid-resistenten RB Zellen im Vergleich zu den sensitiven Zellen signifikant stärker exprimiert vor. In den RB355-Etop Zellen konnte im Vergleich zu den sensitiven Zellen keine signifikante Veränderung der miR-34a und miR-146a-5p Expression festgestellt werden (Abbildung 39). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Reduktion der L1CAM Expression in den Etoposid-resistenten RB Zelllinien möglicherweise durch die gleichzeitig erhöhte Expression der untersuchten miRNAs reguliert wird.

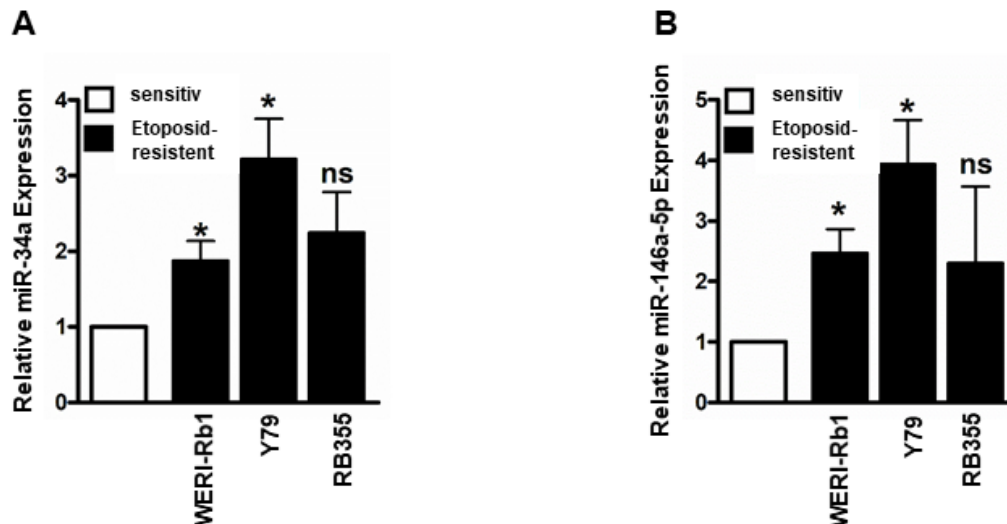


Abbildung 39: Relative Expression der microRNA miR-146a-5p und miR-34a in Etoposid-resistenten im Vergleich zu sensitiven Retinoblastomzellen

Endogene microRNA (miR) Expression in humanen, Etoposid-resistenten Retinoblastomzelllinien, im Vergleich zu sensitiven Zellen, nach Analyse mittels quantitativer *Real-time*-PCR. Die Expression der miRs wurde auf die Expression der 5.8S ribosomalen Untereinheit, als interne Kontrolle normiert und auf die Expression der sensitiven Zellen bezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen miRNA Analysen. Die sensitiven Zellen dienten als Referenz und wurden gleich 1,0 gesetzt. ns $p > 0,05$ oder * $p < 0,05$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur humanen Retina ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

5.7.2 Einfluss der miR-146a-5p auf die L1CAM Expression

Da die Hemmung der L1CAM Expression durch die miR-146a-5p bereits in anderen Tumorentitäten nachgewiesen wurde (Hou & Yin *et al.*, 2012), sollte in der vorliegenden Arbeit diese Regulation im Retinoblastom gezeigt werden. Um den Einfluss der miR-146a-5p auf die Expression von L1CAM zu untersuchen wurde diese in RB355, WERI-Rb1 und Y79 RB Zellen überexprimiert. Der Einfluss auf die L1CAM Proteinexpression wurde mittels Western Blot Analyse untersucht. Nach der Optimierung der Transfektionsbedingungen konnte für die Zelllinien WERI-Rb1 (Abbildung 40A), RB355 und Y79 (Daten nicht gezeigt) eine signifikante Überexpression der miR-146a-5p erzielt werden. Eine gleichzeitige Reduktion der L1CAM Proteinexpression konnte ausschließlich in WERI-Rb1 Zellen gezeigt werden (Abbildung 40B und C). In den Zelllinien RB355 und Y79 konnte nach der erfolgreichen Überexpression der miR-146a-5p zu keinem der getesteten Zeitpunkte (24h, 48h, 72h, 96h und 120h) eine signifikante Regulation der L1CAM Proteinexpression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit findet eine Regulation der L1CAM Expression über die miR-146a-5p ausschließlich in WERI-Rb1 Zellen, nicht aber in RB355 und

Y79 Zellen, statt. Die Regulation der L1CAM Expression über die miR-146a-5p ist somit zelllinienspezifisch.

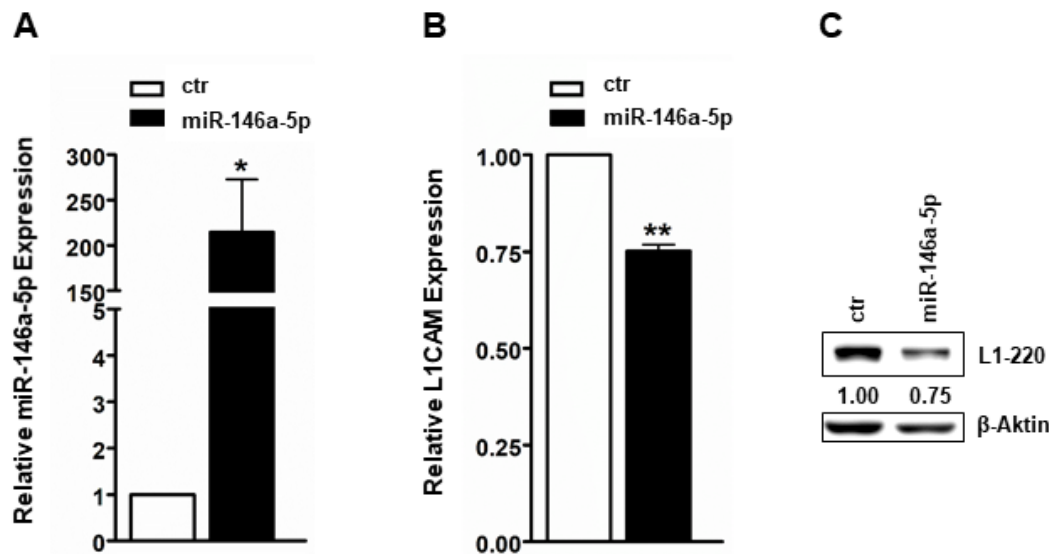


Abbildung 40: Untersuchung des Effektes der miR-146a-5p-Überexpression auf die L1CAM Expression in WERI-Rb1 Zellen.

(A) Nachweis der erfolgreichen miR-146a-5p Überexpression in WERI-Rb1 Zellen 72 h nach transienter Transfektion mit dem Expressionsplasmid pcDNA3_miR-146a im Vergleich zu Zellen die mit dem Kontrollplasmid pcDNA3.1 transfiziert wurden. (B) Die Überexpression der miR-146a-5p führt zur signifikanten Reduktion der L1CAM Proteinexpression. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Analysen. Die Kontrollzellen dienten als Referenz und wurden gleich 1,0 gesetzt. * $p < 0,05$ oder ** $p < 0,01$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur humanen Retina ermittelt durch den unpaarigen studentischen t-Test.

5.7.3 Untersuchung der Bindung der miR-346 in der 3'-UTR von L1CAM

MicroRNA Array Analysen (Vorarbeiten durch die Arbeitsgruppe von Frau Professorin Dünker) ergaben, dass eine erhöhte Expression der miR-346 in Etoposid-resistenten RB Zellen im Vergleich zu den sensitiven Zellen vorlag. Daher wurde zunächst die Expression der miR-346 in verschiedenen Etoposid-resistenten RB Zelllinien im Vergleich zu den sensitiven Zellen mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Eine signifikant stärkere miR-346 Expression konnte nach drei unabhängigen Expressionsanalysen nur in Etoposid-resistenten WERI-Etop, nicht aber in RB355-Etop und Y79-Etop Zellen, im Vergleich zu den jeweils sensitiven Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 41A). Da in der Etoposid-resistenten RB Zelllinie WERI-Etop die L1CAM Proteinexpression geringer vorliegt als in den sensitiven Zellen wurde ein Zusammenhang zwischen der miR-346 Expression und der Hemmung der L1CAM Proteinexpression vermutet.

Um eine mögliche Regulation der L1CAM Expression durch die miR-346 nachzuweisen wurde zunächst eine *in silico* Analyse durchgeführt. Auf diese Weise konnte eine potentielle Bindestelle der miR in der 3'UTR von L1CAM identifiziert werden. Die Analyse ergab eine Bindestelle in der 3'-UTR von L1CAM (Abbildung 41B). Im Folgenden wurde für die miR Bindestudie zunächst ein Reporterplasmid mit der prognostizierten miR-346 Bindestelle sowie ein miR-346 Überexpressionplasmid kloniert. Die Bindung der miR-346 an die prognostizierte Bindestelle wurde mittels Luciferase Assay untersucht. Es konnte jedoch keine Bindung der miR-346 an der prognostizierten Bindestelle in der 3'-UTR von L1CAM mittels Luciferase Assay nachgewiesen werden (Abbildung 41C).

Zusätzlich wurde die miR-346 Expression in den sensitiven RB Zelllinien im Vergleich zur humanen Retina untersucht. Die miR-346 lag in der RB Zelllinie Y79 im Vergleich zur humanen Retina signifikant geringer und in Rbl-30 signifikant stärker exprimiert vor. Im Vergleich zur humanen Retina lag die Expression der miR-346 in den Zelllinien WERI-Rb1, RB355, Rbl-13, RB247 und RB383 nicht reguliert vor (Abbildung 41D).

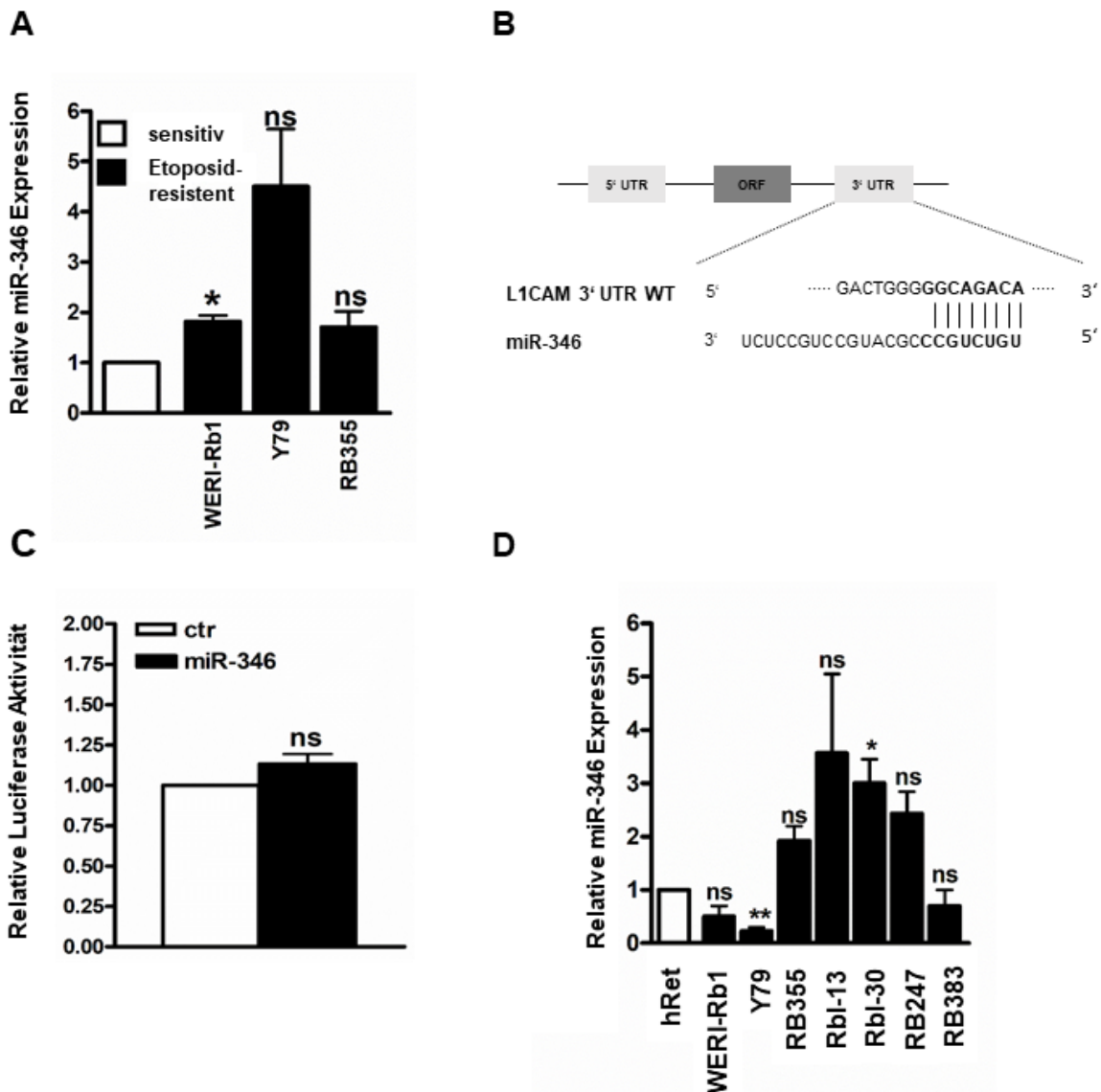


Abbildung 41: Relative Expression der microRNA miR-346 in parentalen und Etoposid-resistenten RB Zelllinien sowie Bindestudie zur mittels *in silico* Analysen prognostizierten Bindung in der 3'-UTR von L1CAM.

(A) Expression der miR-346 in Etoposid-resistenten RB Zelllinien im Vergleich zu parentalen Zellen, nach Analyse mittels quantitativer *Real-time* PCR. (B) Prognostizierte Bindestelle in der wildtyp 3'UTR von L1CAM (L1CAM 3' UTR WT). (C) Relative Luciferaseaktivität gemessen in HEK293T Zellen nach der Kotransfektion von Reporterplasmid und miR-346 Überexpressionsplasmid (miR-346) im Vergleich zur basalen Luciferaseaktivität des Reporterplasmids (ctr). (D) Darstellung der endogenen microRNA-346 (miR-346) Expression in humanen Retinoblastomzelllinien im Vergleich zur humanen Retina (hRet) nach Analyse mittels quantitativer *Real-time*-PCR. Für die Expressionsanalysen wurden die Werte der jeweiligen miR-346 Expressionen auf hRet bzw. die jeweils sensitive Zellen normiert. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$ oder ** $p < 0,01$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur humanen Retina ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

6 Diskussion

Um das Zelladhäsionsmolekül L1CAM als mögliches Ziel in der Therapie des Retinoblastoms zu etablieren, wurde seine Rolle für das Tumorzellwachstum, die Tumorzellproliferation, Tumorprogression sowie Migration untersucht. Ein weiterer Aspekt der Untersuchungen war die Frage nach der Rolle von L1CAM bei der Entwicklung von Chemotherapieresistenzen und die Fragestellung, ob ein L1CAM *Knockdown* Etoposid-resistente RB Zellen gegen Etoposid resensitivieren kann. Darüber hinaus wurde die ADAM-vermittelte Prozessierung von L1CAM sowie die miRNA-vermittelte post-transkriptionelle Regulation der L1CAM Expression im Retinoblastom untersucht.

6.1 Die Rolle von L1CAM im Retinoblastom

Neben der Bedeutung von L1CAM während der Embryonalentwicklung neuronaler Gewebe, spielt L1CAM eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und der Progression verschiedener Krebsarten, wobei eine erhöhte L1CAM Expression mit fortgeschrittenen Tumorstadien, Metastasierung und einer schlechten Prognose für den Verlauf der jeweiligen Krebserkrankung assoziiert ist (Fogel *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2013; Berger *et al.*, 2016; Hua *et al.*, 2016; Tangen *et al.*, 2017).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der L1CAM Proteingehalt in den untersuchten RB Zelllinien WERI-Rb1, Y79 und RB383 im Vergleich zu den Zelllinien Rb1-13, Rb1-30 und RB247 erhöht vorliegt. Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden stimmen mit den Ergebnissen aus einer vorangegangenen Studien überein, welche eine differentielle Expression von L1CAM in Y79 und SNOUT-Rb1 Zellen aufzeigen konnte (Jo *et al.*, 2017).

Zusätzlich zur Untersuchung der L1CAM Expression in RB Zelllinien, wurde die Expression in primären Retinoblastomtumorproben untersucht. Es konnte eine signifikant stärkere Expression von L1CAM in unbehandelten Patientenproben im Vergleich zu gesundem humanen Retinagewebe festgestellt werden. Interessanterweise wurde im Vergleich zu unbehandelten Tumoren eine signifikante Reduktion der L1CAM Expression in Patientenproben festgestellt, die vor der E nukleation mit einer Chemotherapie behandelt wurden. Passend zu den Beobachtungen in der vorliegenden Dissertation wurde bereits gezeigt, dass die Expression von L1CAM in Regionen des Retinoblastoms mit kompakter

Tumorzellendichte im Vergleich zum umliegenden Gewebe erhöht war (Jo *et al.*, 2017). Zudem wurde die erhöhte Expression von L1CAM bereits in einer Vielzahl weiterer, humaner Krebsentitäten beschrieben und konnte mit einer verschlechterten Prognose für den jeweiligen Verlauf der Erkrankung in einen Zusammenhang gebracht werden (Bondong *et al.*, 2012; Altevogt *et al.*, 2016; Altevogt *et al.*, 2020). Darüber hinaus geht eine gesteigerte L1CAM Expression im humanen Kolonkarzinom mit einer erhöhten Proliferationsrate einher (Gavert *et al.*, 2008).

Eine Reduktion der L1CAM Expression nach der Chemotherapie im Tumorgewebe könnte damit zusammenhängen, dass nach der Behandlung die Zellen in einen Zellzyklusarrest oder die Apoptose eintreten und nachfolgend die Genexpression vermindert ist. Zudem konnte in der vorliegenden Dissertation bereits gezeigt werden, dass einige z.B. Etoposid-resistente Tumorzelllinien weniger L1CAM exprimieren als solche die sensitiv auf das Zytostatikum reagieren. Darüber hinaus zeigten Cisplatin-resistente RB Zelllinien ebenfalls eine verminderte L1CAM Expression im Vergleich zu den sensitiven Ursprungszellen (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass einige, resistente Tumorzelllinien nicht weiter auf die Behandlung reagieren und einen aggressiveren Phänotypen darstellen als vergleichsweise die jeweils sensitiven Zellen (Busch *et al.*, 2018) würde die Entscheidung der Ärzte für die Enukleation der betroffenen Augen als finale Therapieoption erklären.

Die verstärkte Expression in den untersuchten Tumorproben im Vergleich zu gesundem humanen Retinagewebe gibt einen ersten Hinweis auf die wichtige Rolle von L1CAM bei der Progression des Retinoblastoms. Um zu untersuchen welche zellulären Effekte die Expression von L1CAM in Retinoblastomzellen einnimmt wurden Überexpressions- und *Knockdown* Versuche durchgeführt. Auf diese Weise konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass eine verminderte L1CAM Expression in WERI-Rb1 und RB355 Zellen zu einem verminderten Zellwachstum, einer verringerten Proliferationsrate sowie Koloniebildungskapazität und einer erhöhten Apoptoserate, im Vergleich zu den Kontrollzellen, führt. Die Überexpression von L1CAM führte in Rb1-30 und RB247 Zellen zu gegenläufigen Effekten. Die erzielten Ergebnisse decken sich mit Daten einer Studie, bei der die L1CAM Überexpression einen positiven Einfluss auf die Proliferation von SNOUT-Rb1 Zellen und einen negativen Effekt auf die Proliferation nach dem L1CAM *Knockdown* in Y79 Zellen hatte (Jo *et al.*, 2017). Weitere Studien zeigten, dass eine gesteigerte L1CAM Expression im humanen Kolonkarzinom mit einer erhöhten Proliferationsrate einherging (Gavert

et al., 2008). Ebenso besteht eine Korrelation zwischen der verstärkten L1CAM Expression und einer schlechten Prognose für den Verlauf des Endometriumkarzinoms (Corrado *et al.*, 2018) sowie dem gesteigerten Tumorwachstum von Magenkrebs (Ito *et al.*, 2014).

In dieser Arbeit konnte nicht nur gezeigt werden, dass nach dem L1CAM *Knockdown* die Apoptoserate in RB Zellen steigt und nach der L1CAM Überexpression sinkt, sondern auch eine signifikante Steigerung der Caspase-3/7 Aktivität in Folge des *Knockdowns* von L1CAM in WERI-Rb1 Zellen ermittelt werden (vgl. Appendix Abbildung 5). Somit läuft die L1CAM-induzierte Apoptose über die Effektorcaspasen 3 und 7 ab. In Gliomazellen konnte bereits eine Erhöhung der Caspase-8 Aktivität in Folge des *Knockdowns* von L1CAM nachgewiesen werden (Held-Feindt *et al.*, 2012), was bereits auf die Caspase-abhängige Apoptose L1CAM-defizienter Zellen in anderen Krebsentitäten hinweist.

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich die Größe der Zellkolonien nach L1CAM *Knockdown* und Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen verändert. So bilden RB355 Zellen nach dem *Knockdown* von L1CAM kleinere Kolonien als die Kontrollzellen. Die Überexpression von L1CAM in Rbl-30 und RB247 Zellen führte auch hier zu den gegenteiligen Effekten. Eine verstärkte kontaktunabhängige Koloniebildungskapazität konnte in der vorgelegten Dissertation nach der Überexpression von L1CAM in Rbl-30 und RB247 Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten passen zu den Ergebnissen einer Studie in der die Überexpression von L1CAM in SNOUT-Rb1 Zellen ebenfalls zu einer verstärkten kontaktunabhängigen Koloniebildungskapazität im *Soft Agarose Assay* führte (Jo *et al.*, 2017).

In der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass eine verringerte Expression von L1CAM in RB Zellen zu signifikant kleineren und leichteren Tumoren *in vivo* führte, wohingegen die Überexpression von L1CAM zu einer erhöhten Tumorgroße und zur Ausbildung schwererer Tumore im Vergleich zu den Kontrollzellen führte. In Übereinstimmung mit den dokumentierten Ergebnissen, führte die Überexpression von L1CAM in SNOUT-Rb1 Zellen nach der Injektion in die Augenhöhle immundefizienter Mäuse zu schwereren und größeren Tumoren im Vergleich zu den Kontrollzellen (Jo *et al.*, 2017). Des Weiteren führte der *Knockdown* von L1CAM zu einer signifikanten Verringerung der Tumorbildungskapazität von Prostatakarzinomzellen (Hung *et al.*, 2002) und durch die Verabreichung eines anti-L1CAM-Antikörpers wurde das

Tumorzellen im Mausmodell erfolgreich reduziert (Bao *et al.*, 2008). Ebenfalls passend zu den Daten der vorliegenden Arbeit geht die Überexpression von L1CAM mit einer verstärkten Progression von Ovarialkarzinomzellen einher (Gast *et al.*, 2005; Gast *et al.*, 2008) und durch die Behandlung von Ovarialkarzinomen mit Wirkstoffgekoppelten anti-L1CAM-Antikörpern konnte eine Reduktion des Tumorwachstums beobachtet werden (Lindenblatt *et al.*, 2018).

Im Vergleich zu Kontrollzellen führte der *Knockdown* von L1CAM, wie in der vorliegenden Dissertation beschrieben, zu einer signifikanten Reduktion der Migrationsrate von WERI-GFP und RB355-GFP Zellen im *in vivo* CAM Modell. Die Überexpression von L1CAM führte dahingegen zu keiner signifikanten Veränderung in der Migrationsrate von RB247-GFP Zellen. Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten wird die Verbindung von einer gesteigerten L1CAM Expression mit einer gesteigerten Tumorzellinvasivität, -motilität und -metastasierung in verschiedenen neuronalen und nicht-neuronalen Krebserkrankungen postuliert (Kiefel *et al.*, 2012; van der Maten *et al.*, 2019). Es konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von L1CAM das Metastasierungspotential von T-Zell-Lymphomen sowie -Karzinomen reduziert, was mit einer verringerten Invasivität *in vitro* und einer verringerten Bildung von Metastasen *in vivo* einhergeht (Weinspach *et al.*, 2014). Der *Knockdown* von L1CAM führte zu einer verminderten Zellmigration im Pankreaskarzinom (Ben *et al.*, 2014) und in Prostatakarzinomzellen (Hung *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu erhöht die Überexpression von L1CAM die Migrationskapazität von Ovarialkarzinomzellen (Gast *et al.*, 2005) sowie Magenkrebszellen (Chen *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurde der Zusammenhang zwischen der L1CAM Expression und der Metalloproteinase-abhängigen Tumorzellmigration im Pankreaskarzinom (Na'ara *et al.*, 2019) sowie im Gallengangkarzinom (Kim *et al.*, 2017) beschrieben.

Ausgehend von den in dieser Arbeit erhobenen Expressionsdaten von L1CAM in den untersuchten RB Zelllinien, Patientenproben und den Ergebnissen der L1CAM Regulation spielt L1CAM im Retinoblastom eine entscheidende Rolle als Zielgen für die Therapie. Die Reduktion von L1CAM führte zu einer signifikanten Reduktion der Tumorbildungs- und Tumorzellmigrationskapazität. Obgleich die Expression von L1CAM zelllinienspezifisch ist konnte eine signifikante Überexpression von L1CAM in RB Tumorproben im Vergleich zu gesundem Retinagewebe nachgewiesen werden. Die Behandlung mit einer Chemotherapie führte dabei zu signifikant geringeren

L1CAM Expressionen, im Vergleich zu den unbehandelten Tumoren. Bei Patienten, die eine Überexpression von L1CAM im Retinoblastom im Vergleich zur humanen Retina zeigen, könnte daher zum Beispiel die Verwendung von anti-L1CAM-Antikörpern (Arlt *et al.*, 2006) oder die shRNA-vermittelte Reduktion der L1CAM Expression Anwendung finden (Bao *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurde bereits ein L1CAM-basierter Therapieansatz unter Verwendung von *chimeric antigen receptor* (CAR) T-cells in präklinischen *in vitro* Studien erprobt (Andersch *et al.*, 2019), was die wissenschaftliche Bedeutung der molekularen Grundlagenforschung zu L1CAM im Retinoblastom der vorgelegten Dissertation unterstreicht.

6.2 L1CAM-regulierte Gene und Signalwege

Um zu untersuchen, welche Signalwege den in der vorliegenden Dissertation beobachteten Effekten des L1CAM *Knockdowns* oder der Überexpression auf die Proliferation, die Apoptose und das Tumorzellwachstum sowie die Migration von RB Zelllinien zugrunde liegen, wurden Protein Array Analysen durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass nach dem *Knockdown* von L1CAM in RB355 Zellen die Proteine GSK-3 β , CREB, Lyn, STAT2, STAT6, Chk-2, p53 (an S392) vermindert und die Proteine PLC- γ 1, WNK1 und PYK2 stärker phosphoryliert als in den Kontrollzellen vorlagen. Zusätzlich zu den mittels Onkotarget Array Analysen nachgewiesenen Proteinen Enolase, Progranulin, Survivin sowie p53, wurde die Expression der Proteine Ezrin (Guo *et al.*, 2017), FGFb (Zecchini *et al.*, 2008) und Gal-3 (Probstmeier *et al.*, 1995), welche bereits in der Literatur und in Zusammenhang mit anderen Krebsentitäten als L1CAM-reguliert beschrieben sind, untersucht. Darüber hinaus konnte in der vorgelegten Dissertation der EMT Marker Vimentin als potentiell L1CAM-reguliert identifiziert werden.

Nach der L1CAM Überexpression konnte eine verstärkte Expression der Proteine Ezrin, Gal-3 und FGFb in RB247 Zellen beobachtet werden. Zudem stehen die Beobachtungen, wie in der vorgelegten Dissertation gezeigt, einer verminderten Proliferation, dem Tumorwachstum und die Apoptose nach dem L1CAM *Knockdown* in einem Zusammenhang mit Beobachtungen in anderen Krebsentitäten nach der Regulation von Ezrin, Gal-3 und FGFb.

So konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne von L1CAM sowie das gesamte L1CAM Molekül mit Ezrin, ein Mitglied der

Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Familie, interagiert (van der Maten *et al.*, 2019). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von L1CAM direkt die Transkription von Ezrin im oralen Plattenepithelkarzinom beeinflusst (Guo *et al.*, 2017). In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Ezrin Expression nach L1CAM *Knockdown* verringert und nach der Überexpression von L1CAM erhöht ist. Eine erhöhte Expression von Ezrin führt dabei zu einer verstärkten Metastasierung und dem Wachstum von Tumoren (Song *et al.*, 2020). Diese Tatsache untermauert die Hypothese, dass L1CAM über die *Downstream* Regulation von Ezrin die bereits beschriebenen Effekte auf die Tumorprogression, wie sie in der vorliegenden Dissertation beobachten werden konnten, vermitteln könnte. Analog zu den in dieser Dissertation beschriebenen erhöhten Proliferationsrate von Rbl-30 und RB247 Zellen nach der L1CAM Überexpression, führte eine erhöhte Ezrin Expression zu einer erhöhten Zellproliferationsrate im Ovarialkarzinom (Horwitz *et al.*, 2016). Dahingegen führte eine verminderte Ezrin Expression im kolorektalem Karzinom zu einer ebenfalls verminderten Zellviabilität und Migrationskapazität (Leiphrakpam *et al.*, 2014), was sich mit den Beobachtungen in dieser Arbeit, nämlich einer verminderten Zellviabilität und Migrationskapazität nach L1CAM *Knockdown* in RB355 und WERI-Rb1 Zellen deckt. Die Bindung von L1CAM an Ezrin, welche in der invasiven Tumorfront von kolorektalen Karzinomen verstärkt eingegangen wird, führt zu einer gesteigerten Proliferation, Invasion und Metastasierung der Tumorzellen (van der Maten *et al.*, 2019) bedingt durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Kiefel *et al.*, 2012). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Zellen, die L1CAM überexprimieren, die IL-1 β Expression heraufregulieren, was einen direkten Induktor für die Expression von NF- κ B darstellt. Dadurch wird NF- κ B-abhängig die Zellproliferation gefördert. (Kiefel *et al.*, 2011) Eine gesteigerte, jedoch nicht-signifikant erhöhte IL-1 β Expression konnte auch nach der Überexpression von L1CAM in RB247 Zellen, sowie die verminderte Expression nach L1CAM *Knockdown* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen haben gezeigt, dass auch die Reduktion der Ezrin Expression zu einer verringerten IL-1 β Sekretion und einer verminderten Zellinvasion mit gleichzeitig verringerter NF- κ B Aktivität führt (Kiefel *et al.*, 2012). Zusätzlich zu den von Kiefel *et al.* (2011) postulierten Wechselwirkungen von L1CAM mit Integrinen und Ezrin konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass im Retinoblastom die Expression von Ezrin durch eine veränderte Expression von L1CAM beeinflusst wird.

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte L1CAM Expression zu einer erhöhten Galectin-3 (Gal-3) Expression führte. Der *Knockdown* von L1CAM führte zum gegenteiligen Effekt. Mehrere bereits publizierte Studien belegten, dass das β -Galaktosidase-bindende Protein Gal-3 mit L1CAM interagiert (Probstmeier *et al.*, 1995; Díez-Revuelta *et al.*, 2010; Bockhorn *et al.*, 2014). Eine verminderte Gal-3 Expression führte in humanen Brustkrebszellen zu signifikant reduzierten Zellwachstums-, Koloniebildungs- und Koloniewachstumsraten *in vitro* sowie Tumorwachstumsraten *in vivo* (Takenaka *et al.*, 2004), was sich mit den Beobachtungen nach dem L1CAM *Knockdown* in WERI-Rb1 und RB355 Zellen, nämlich einer verminderten Tumorwachstumsrate *in vivo* deckt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von Gal-3 zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation und Invasion sowie einer Erhöhung der Apoptoserate von oralen Plattenepithelkarzinomzellen führte (Fang *et al.*, 2018). Ebenso steht Gal-3 in einem engen Zusammenhang mit einer schlechten Verlaufsprognose von kolorektalen Karzinomen (Wang *et al.*, 2019). Gal-3 konnte bereits als eine Komponente des Wnt Signalweges identifiziert werden und bildet, zusammen mit der Glykogensynthase-Kinase 3 beta (GSK-3 β) einen Komplex, der die Aktivierung von Zellzyklusproteinen des Wnt Signalweges beeinflusst (Shimura *et al.*, 2005). Die verringerte Phosphorylierung von GSK-3 β konnte in dieser Arbeit mittels Phosphokinase Array nach dem L1CAM *Knockdown* in RB355 Zellen bestätigt werden, was schlussfolgernd wiederum zu einer verringerten Phosphorylierung und somit Aktivität von Gal-3 führen würde (Shimura *et al.*, 2005). Die GSK-3 β -abhängige Phosphorylierung von Gal-3, bewirkt die Komplexbildung mit Axin und β -Catenin (Shimura *et al.*, 2005) und reguliert neben dem Glykogen Metabolismus, die Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Ikeda *et al.*, 1998). Es konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass L1CAM ein Zielgen des Wnt/ β -Catenin Signalweges ist und in diesem Zusammenhang die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms verstärkt (Cheriyamundath & Ben-Ze'ev, 2020), was in umgekehrter Weise den Beobachtungen einer verringerten Migrationsrate nach L1CAM *Knockdown* in der vorliegenden Dissertation entspricht. Zusammenfassend deuten die erzielten Ergebnisse darauf hin, dass Gal-3 sowie GSK-3 β Bausteine der L1CAM-vermittelten Signaltransduktion sind.

Eine erhöhte Expression von FGF Isoformen, die Liganden des Fibroblastenwachstumsrezeptors (FGFR) sind, wurde bereits in Zusammenhang mit einer gesteigerten Tumorzellproliferation in verschiedenen Krebsentitäten gebracht

und steht so z.B. in enger Verbindung mit der Entstehung des Prostatakarzinoms (Labanca *et al.*, 2020). In den hier untersuchten RB Zelllinien wurde gezeigt, dass die beschriebene pro-proliferative Wirkung nach der L1CAM Überexpression sowie die mit dem L1CAM *Knockdown* verringerte Migration und die gleichzeitig gesteigerte Apoptoserate, den Effekten nach veränderter FGFb Expression in anderen Tumorentitäten entsprechen (Xiao *et al.*, 2008; Zecchini *et al.*, 2008; Kostas *et al.*, 2018). In der vorliegenden Dissertation konnte die Beobachtung einer gesteigerten FGFb Expression nach dem *Knockdown* von L1CAM in RB355 Zellen im Onkotarget Array nicht nachgewiesen werden. Es wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass eine gesteigerte FGFb Expression zu einer ebenfalls gesteigerten Proliferation von WERI-Rb1 und Y79 Zellen führte (Cebulla *et al.*, 2008), was mit den Beobachtungen einer gesteigerten Proliferation und erhöhter Tumorstadiumsrate nach L1CAM Überexpression in Rbl-30 und RB247 Zellen, wie in der vorgelegten Dissertation gezeigt, einhergeht. Im Umkehrschluss würde ein L1CAM *Knockdown* zu einer gleichzeitig verminderten FGFb Expression führen, was sich hier in RB355 Zellen nach dem L1CAM *Knockdown* jedoch nicht verifizieren ließ.

Die Aktivierung ähnlicher Signalwegkomponenten von L1CAM und FGFR konnte bereits in epithelialen Ovariakarzinomzellen beobachtet werden (Zecchini *et al.*, 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass L1CAM, sowie die lösliche L1CAM Ektodomäne, die Motilität und Proliferation von Gliomzellen über die Bindung an den FGFR vermittelt. Mit der Aktivierung des FGFR und des PI3K/AKT Signalwegs ist der Schutz vor Apoptose verbunden (Dailey *et al.*, 2005; Lemmon & Schlessinger, 2010). Zudem kann die Aktivierung des FGFR die Signaltransduktion über die Proteine RAS, RAF und MAPK initiieren. Dieser Signalweg ist während der Zellproliferation und -differenzierung aktiv (Dorey & Amaya, 2010). FGFb stellt einen direkten Liganden des FGFR dar (Rusnati *et al.*, 1996). Die möglicherweise verstärkte Aktivierung des FGFR (in dieser Arbeit nicht untersucht) durch vermehrt exprimiertes FGFb würde schlussfolgernd zu einer erhöhten Zellproliferation, einer verringerten Apoptose und erhöhten Migration, führen, was sich mit den Beobachtungen nach der Überexpression von L1CAM in dieser Arbeit deckt. Zudem konnten im Phosphokinase Array die verminderte Phosphorylierung der FGFR Signalwegkomponenten ERK1/2 und c-Jun N-terminale Kinase (JNK) nachgewiesen werden, was zu einer verminderten Signaltransduktion führt (Daten nicht gezeigt). Die pro-proliferative Wirkung und die gesteigerte Migration sowie verringerte Apoptose nach der L1CAM Überexpression,

wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet, steht in Einklang mit einer gesteigerten FGFb Expression in vorangegangenen Studien im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Xiao *et al.*, 2008). Schlussfolgernd deuten die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation darauf hin, dass auch die FGFb Expression in RB Zellen durch L1CAM reguliert wird.

Im Phosphokinase Array wurden, neben den bereits beschriebenen mit Ezrin, FGFb und Gal-3 interagierenden Signalproteinen, weitere Proteine identifiziert, welche in Zellproliferation-fördernde Signalwege eingegliedert werden können. Nach dem *Knockdown* von L1CAM in RB355 waren die Signalpeptide STAT2, STAT6, Lyn, CREB im Vergleich zu der Kontrolle geringer phosphoryliert.

In Pankreaskarzinomzellen wurde die Aktivierung von NF- κ B, neben der bereits beschriebenen Interaktion von Ezrin und L1CAM, über den L1CAM/STAT Signalweg beschrieben (Zuo *et al.*, 2018). In der vorgelegten Dissertation konnte eine verringerte Phosphorylierung von STAT2 und STAT6 nach L1CAM *Knockdown* in RB355 Zellen nachgewiesen werden. Eine geringere Phosphorylierung der beiden STAT Proteine führte, analog zu den Effekten des in dieser Arbeit durchgeführten L1CAM *Knockdowns*, in Pankreaskarzinomzellen zu einer verminderten Zellproliferation und -viabilität (Zuo *et al.*, 2018). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung der STAT Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und der Progression von Tumorerkrankungen einnimmt (Brooks & Putoczki, 2020), was sich mit den Beobachtungen einer L1CAM Überexpression, wie sie in dieser Dissertation gemacht wurden, decken würde.

In der Phosphokinase Array Analyse der vorliegenden Arbeit konnte eine verringerte Phosphorylierung der nicht-Rezeptor Protein Tyrosinkinase (PTK) Lyn nach L1CAM *Knockdown* in RB355 Zellen nachgewiesen werden. Lyn moduliert die Interaktion von membrangebundenen Wachstumsfaktorrezeptoren mit intrazellulären Integrinen sowie mit Proteinen des Zytoskeletts (Thomas & Brugge, 1997). In leukämischen Zellen führte die Behandlung mit antisense Oligonukleotiden gegen Lyn mRNA bereits zu einer verringerten Proliferation (Roginskaya *et al.*, 1999). Zudem konnte beobachtet werden, dass Lyn in Kolonkarzinomzelllinien verstärkt exprimiert wird, die Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika über den bereits beschriebenen PI3K/AKT Signalweg reguliert (Bates *et al.*, 2001) und als Zielgen in der Therapie des Prostatakarzinoms verwendet werden kann (Goldenberg-Furmanov *et al.*, 2004).

Zusammen mit der in der Literatur beschriebenen Signalwirkung von Lyn würde der verringerte Phosphorylierungsgrad, der nach dem L1CAM *Knockdown* detektiert werden konnte, zu einer verringerten Proliferationsrate und einer gesteigerten Apoptoserate führen, was den beobachteten Effekten in dieser Arbeit nach L1CAM *Knockdown* in RB355 und WERI-Rb1 Zellen entspricht. Die verringerte L1CAM Expression verringert die bereits beschriebene Integrininteraktion und die Wechselwirkung mit dem GFR (Thomas & Brugge, 1997). Schlussfolgernd würde daraus eine verminderte Phosphorylierung von Lyn resultieren. Um diesen Zusammenhang zu beweisen, müssten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Lyn-abhängigen Signaltransduktion durch z.B. die Überexpression oder den *Knockdown* von Lyn in RB Zellen angeschlossen werden.

Neben STAT2, STAT6 und Lyn zeigte die Analyse des Phosphokinase Arrays nach dem *Knockdown* von L1CAM in RB355 Zellen eine verminderte Phosphorylierung des *cAMP response element-binding protein* (CREB). Der Transkriptionsfaktor CREB spielt eine entscheidende Rolle beim *Toll-Like-Receptor* (TLR) Signalweg und reguliert Entzündungsreaktionen sowie die Immunantwort (Wen *et al.*, 2010). Dabei aktivieren die MAPK wiederum die MSK1 und MSK2 Proteine über die ERK1/2 Signalpeptide, sodass die Phosphorylierung von CREB induziert wird (Ananieva *et al.*, 2008). CREB Bindestellen wurden in den Promotorregionen verschiedener Gene wie Bcl-2, Egr-1 und den MAPK identifiziert, die in die Regulation der Zellproliferation, -differenzierung und -überleben involviert sind (Impey *et al.*, 2004). Demnach könnte die Dephosphorylierung von CREB in den untersuchten RB Zellen nach dem L1CAM *Knockdown* die anti-proliferativen Effekte bewirken, wie sie in den vorherigen Abschnitten der vorliegenden Dissertation bereits beschrieben wurden.

In Folge von DNA Schäden, z.B. durch zellulären Stress, wird der Tumorsuppressor p53 stabilisiert und bewirkt den Zellzyklus Arrest oder den Übergang der Zellen in die Apoptose. Chk-2 phosphoryliert p53 und ermöglicht somit den p53-abhängigen Zellzyklusarrest in der G1-Phase oder die Apoptose. (Hirao *et al.*, 2002) Mittels Phosphokinase Array konnte in der vorliegenden Dissertation nach L1CAM *Knockdown* in RB355 Zellen eine geringere Phosphorylierung von Chk-2 und p53 (an Serin 392, nicht aber an Serin 46 und Serin 15) detektiert werden. Im Onkotarget Array wurde zudem eine erhöhte Expression von p53 nach dem *Knockdown* von L1CAM in RB355 Zellen beobachtet. Ein geringerer Phosphorylierungsgrad von Chk-2 und p53 würde eine Reduktion der Apoptoserate erwarten lassen, was jedoch nach L1CAM

Knockdown in den funktionellen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte. Eine Aussage über die L1CAM-abhängige Aktivierung der intrinsischen oder extrinsischen Apoptosewege über p53 bzw. Chk-2 lässt sich anhand der beobachteten Phosphorylierungsmuster im Phosphokinase Array nicht eindeutig treffen und müsste im Anschluss an die vorgelegte Dissertation weiter untersucht werden.

Zusätzlich zu den beschriebenen, verminderten Phosphorylierungen lagen nach dem *Knockdown* von L1CAM in RB355 Zellen die Proteine PLC- γ 1, WNK1 und PYK im Vergleich zu der Kontrolle stärker phosphoryliert vor.

Die Phospholipase C gamma 1 (PLC- γ 1) ist an Migrations- und Invasionsprozesse von Krebszellen beteiligt (Lattanzio *et al.*, 2013). Es konnte zudem bereits gezeigt werden, dass die Inhibition von PLC- γ 1 zum Zelltod von Lungenkrebszellen führte (Lu *et al.*, 2020). Die Aktivierung von PLC- γ 1 durch Phosphorylierung an Tyrosin (Y) 1253 und Y783 wird als Marker für die Metastasierung bei Brustkrebs diskutiert (Lattanzio *et al.*, 2019). Im Phosphokinase Array konnte nach dem L1CAM *Knockdown* in RB355 Zellen eine stärkere Phosphorylierung von PLC- γ 1 an Y783 detektiert werden, was auf eine Aktivierung von Proliferations- und Migrationsprozessen hindeuten würde (Jang *et al.*, 2018). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von PLC- γ 1 zur Caspase-3-unabhängigen Aktivierung von Autophagie und letztendlich zum Zelltod führte (Lu *et al.*, 2020), was sich ebenfalls nicht mit den Beobachtungen aus der vorgelegten Dissertation einer L1CAM-induzierten und Caspase-3/7-abhängigen Apoptose deckt. Da in den funktionellen Untersuchungen nach dem L1CAM *Knockdown*, anders als in der Literatur beschrieben, eine verstärkte Apoptose und verminderte Proliferation sowie Migration beobachtet wurde, kann jedoch keine eindeutige Aussage zur Funktion von PLC- γ 1 in den RB Zellen getroffen werden.

Die WNK1 (*with-no-lysine* (K)-1) Proteinkinase sowie die WNK1-assoziierten Proteine besitzen einen regulatorischen Einfluss auf die Angiogenese während der Tumorentwicklung und haben einen verstärkenden Einfluss auf die, bereits in den vorherigen Abschnitten der vorgelegten Dissertation beschriebene, NF- κ B, TGF- β und PI3K/Akt Signalwege, welche letztendlich die Zellproliferation steigern (Gallolu Kankanamalage *et al.*, 2018). Darüber hinaus führte der *Knockdown* von WNK1 zu einer verminderten Migration von krebsassoziierten Fibroblasten (*cancer-associated fibroblasts*, CAFs) beim Lungenkrebs (Hsu *et al.*, 2016). Nach dem *Knockdown* von L1CAM in RB355 Zellen konnte eine verstärkte Phosphorylierung von WNK1 an Threonin (T) 60 beobachtet werden. Die stärkere Phosphorylierung von WNK1 an T60

würde demnach zu einer verstärkten Signaltransduktion über NF- κ B, TGF- β und PI3K/Akt und somit erhöhten Proliferationsrate führen (Gallolu Kankanamalage *et al.*, 2018), was sich nicht mit einer verminderten Proliferation nach L1CAM *Knockdown*, wie in der vorgelegten Dissertation nachgewiesen, deckt. Die L1CAM-abhängige Phosphorylierung von WNK1 im Retinoblastom müsste daher im Anschluss an die vorgelegte Dissertation verifiziert werden um eine gesicherte Aussage über dessen Funktion im RB treffen zu können.

In der vorgelegten Dissertation wurde gezeigt, dass nach dem L1CAM *Knockdown* in RB355 Zellen die Pyruvatkinase PYK2 stärker phosphoryliert als in den Kontrollzellen vorlag. Eine stärkere Phosphorylierung würde z.B. über die Aktivierung des bereits im oberen Abschnitt beschriebenen Wnt/ β -Catenin Signalkaskade zu einer gesteigerten Proliferation führen (Logan & Nusse, 2004; Means, 2019), was sich nicht mit der in der vorliegenden Dissertation nachgewiesenen verringerten Proliferations- und Tumorwachstumsrate nach L1CAM *Knockdown* deckt. Somit müsste im Anschluss an die vorgelegte Dissertation die Phosphorylierung von PYK2 nach L1CAM *Knockdown* verifiziert werden, um die Rolle bei der Tumorentstehung im Retinoblastom sicher beschreiben zu können. Die erhöhte Expression von PYK2 wurde bereits im Zusammenhang mit einer verstärkten Proliferation, Migration von Zellen sowie der Entwicklung von Chemotherapieresistenzen verschiedener Krebsentitäten beschrieben (Shen & Guo, 2018), was eine genauere Untersuchung im Retinoblastom als mögliches therapeutisches Ziel interessant macht.

Es konnte in der vorgelegten Dissertation beobachtet werden, dass nach dem *Knockdown* von L1CAM in RB355 und WERI-Rb1 Zellen, neben der verminderten Proliferations- und Tumorwachstumsrate, eine verminderte Migration der Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen vorlag. In früheren Studien wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von L1CAM in Zellen nahe der invasiven Tumorfront und der Umwandlung vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotypen beschrieben (Kiefel *et al.*, 2012). Daher wurde vermutet, dass L1CAM einen Einfluss auf die Migration der RB Zellen durch die Beeinflussung der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) haben könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde die Expression der mesenchymalen Marker Vimentin, N-Cadherin sowie des epithelialen Markers EpCAM untersucht. Eine verstärkte Expression der mesenchymalen Marker und verringerte Expression des epithelialen

Markers würde dabei auf eine EMT hindeuten. Nach dem *Knockdown* von L1CAM wurde aufgrund der Beobachtung einer verminderten Migration eine verminderte EpCAM sowie eine erhöhte Vimentin und N-Cadherin Expression erwartet. Für die untersuchten EMT Marker N-Cadherin und EpCAM konnte dahingegen nicht die erwartete Regulation der Expression nach L1CAM Überexpression bzw. *Knockdown* im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen beobachtet werden.

Der EMT Marker Vimentin ist in Zellen mit mesenchymalen Phänotyp heraufreguliert und induziert einen motileren Phänotypen (Liu *et al.*, 2015). Da die Migrationsrate nach dem L1CAM *Knockdown* in RB355 Zellen signifikant verringert ist und Vimentin signifikant schwächer exprimiert vorliegt als in den Kontrollzellen, könnte Vimentin als ein von L1CAM reguliertes Zielgen, welches an der Migration der RB Zellen beteiligt ist, betrachtet werden. Um diese Hypothese zu untermauern, müssten im Folgenden weitere Versuche bezüglich der L1CAM-regulierten und/oder Vimentin-abhängigen EMT im Retinoblastom erfolgen. Zudem ist die Expression von L1CAM im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom positiv mit der Expression von Vimentin, β -Catenin und dem Transkriptionsfaktor Slug aber z.B. negativ mit E-Cadherin korreliert (Tischler *et al.*, 2011). Darüber hinaus bewirkt L1CAM die Induktion der EMT im Endometriumkarzinom (Chen *et al.*, 2018).

Der EMT Marker N-Cadherin wird in Verbindung mit der gesteigerten Motilität und Invasivität von Tumorzellen gebracht und steht in Verbindung mit der Progression von Brust- (Nagi *et al.*, 2005) und kolorektalen Krebserkrankungen (Yan *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit was die N-Cadherin Expression nach der Überexpression von L1CAM in RB247 Zellen signifikant verringert. In dieser Arbeit konnte jedoch keine signifikante Regulation nach dem L1CAM *Knockdown* beobachtet werden. Es lässt sich somit kein Zusammenhang zwischen der Regulation der L1CAM Expression und der nachfolgenden, L1CAM-abhängigen Regulation der N-Cadherin Expression in den untersuchten RB Zelllinien nachweisen.

In der vorgelegten Dissertation wurde die L1CAM-abhängige Regulation der Expression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls (engl. *Epithelial Cell Adhesion Molecule*) EpCAM untersucht. EpCAM ist ein Zelloberflächenmolekül, das im Kolonkarzinom und anderen epithelialen Karzinomen überexprimiert vorliegt (Osta *et al.*, 2004). Der L1CAM *Knockdown* führte nur in RB355 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der EpCAM Expression. In RB247 und WERI-Rb1 Zellen führte die

Regulation von L1CAM dahingegen zu keiner signifikanten Veränderung der EpCAM Expression. Mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten kann kein Zusammenhang zwischen der Regulation von L1CAM und der EpCAM Expression hergestellt werden. Anhand der in dieser Arbeit untersuchten EMT Marker kann einzig die L1CAM-abhängige Regulation der Vimentin Expression in einem Zusammenhang mit der verminderten Zellmigration nach dem L1CAM *Knockdown* gebracht werden.

Neben der im vorherigen Kapitel beschriebenen Rolle von L1CAM im Retinoblastom konnten die bereits in der Literatur als durch L1CAM reguliert beschriebenen Proteine Ezrin, Gal-3 und FGFb als mögliche, weitere Ziele in der RB Tumorthherapie identifiziert werden. Da der *Knockdown* bzw. die Hemmung dieser Proteine in anderen Krebsentitäten zu einer vielversprechenden Reduktion der Tumorgröße und des Tumorzellmigrationspotentials führten (Kato, 2016; Friedman *et al.*, 2020; Luk *et al.*, 2020; Xi & Tang, 2020), wäre eine weitere Untersuchung der Effekte nach der Regulierung dieser Proteine im Retinoblastom von wissenschaftlichem Interesse. Zusätzlich konnte in der vorgelegten Dissertation gezeigt werden, dass eben diese Proteine durch den L1CAM *Knockdown* schwächer exprimiert werden, was die anti-proliferative Wirkung von L1CAM möglicherweise verstärkt bzw. überhaupt verursacht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Komponenten des bereits in Zusammenhang mit L1CAM und in der Literatur beschriebene Krebs-assoziierten NF- κ B (Kiefel *et al.*, 2010), Wnt/ β -Catenin (Shkurnikov *et al.*, 2016; Cheriyaundath & Ben-Ze'ev, 2020), STAT (Zuo *et al.*, 2018) sowie PI3K/Akt (Jo *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2021) Signalweges nach L1CAM *Knockdown* im Vergleich zu den Kontrollen vermindert phosphoryliert vorlagen. Da diese Signalwege in Tumorzellen verstärkt aktiviert vorliegen, würde eine adjuvante Behandlung mit z.B. Inhibitoren eine weitere Therapieoption darstellen, was im Anschluss an die vorgelegte Dissertation ebenfalls genauer untersucht werden könnte.

Es konnte in der vorgelegten Dissertation deutlich gezeigt werden, dass die Regulierung der L1CAM Expression eine Vielzahl von Signalwegen in RB Zellen beeinflusst, die sich ihrerseits überschneiden und zum Gesamtergebnis der beobachteten Effekte auf die Proliferation, die Apoptose, dem Tumorwachstum sowie der Tumorzellmigration führen. Basierend auf den Daten der vorgelegten Dissertation könnten diese Signalwege vertieft auf mögliche, weitere Ziele in der gerichteten Retinoblastomtherapie untersucht werden.

6.3 Die Rolle von L1CAM bei der Entstehung von Chemotherapieresistenzen

Nachdem die anti-tumorigenen Effekte des L1CAM *Knockdowns* in verschiedenen RB Zelllinien gezeigt wurden und die signifikant verringerte L1CAM Expression in Retinoblastompatienten nach der Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika nachgewiesen wurde, konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass ein *Knockdown* von L1CAM möglicherweise zur Resensitivierung von Zytostatika-resistenten RB Zellen beitragen kann.

Die Behandlung von Krebserkrankungen mit Zytostatika ist heute immer noch eine große Herausforderung in der Onkologie, da starke Nebenwirkungen während der Behandlung auftreten können und resistente Tumorzellen nicht weiter auf das initial verwendete Zytostatikum ansprechen. So konnte in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass Etoposid-resistente RB Zellen ein aggressiveres Wachstum aufweisen als die sensitiven Ursprungszellen, was sich in einer gesteigerten Proliferationsrate und einer gesteigerten Tumorbildungskapazität niederschlug (Busch *et al.*, 2018). Die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien ist daher notwendig, um die Entstehung von Chemotherapie-resistenzen zu vermeiden und alternative Behandlungen von Zytostatika-resistenten Tumorzellen zu finden. Die Behandlung von WERI-Rb1 Zellen mit Etoposid und Vincristin nach L1CAM *Knockdown* führte in der vorgelegten Dissertation zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die auf den *Knockdown* von L1CAM folgende Behandlung mit Cisplatin zeigte in zwei von fünf untersuchten Konzentrationen eine signifikante Verringerung der Zellviabilität. Eine Überexpression von L1CAM in RB247 Zellen führte wider Erwarten zu keiner signifikanten Erhöhung der Zellviabilität gegenüber Etoposid, Cisplatin oder Etoposid. Die L1CAM Überexpression führte in RB247 nach der Behandlung mit Cisplatin sogar bei drei von fünf getesteten Konzentrationen widererwarten zu einer Reduktion der Zellviabilität.

Der *Knockdown* von L1CAM in bereits Etoposid-resistenten RB355-Etop, WERI-Etop und Y79-Etop Zellen gefolgt von der Wiederbehandlung mit Etoposid führte *in vitro* bei allen drei RB Zelllinien zu einer reduzierten Zellviabilität. Zusätzlich, konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von L1CAM das Tumorstadium von Etoposid-resistenten RB Zellen *in vivo* signifikant verringern kann, wohingegen die Tumorbildungskapazität nicht signifikant beeinflusst wird (vgl. Appendix Abbildung 4). Die Zellen in denen L1CAM herunterreguliert wurde und welche zusätzlich mit Etoposid behandelt wurden zeigten eine signifikante Reduktion von Tumorgröße und

Tumorgewicht, im Vergleich zu den mit den gleichen Konzentrationen von Etoposid behandelten Kontrollzellen. Andere Studien konnten bereits einen Zusammenhang zwischen der Überexpression von L1CAM und dem Auftreten von Radio- und Chemoresistenzen im Neuroblastom (Rached *et al.*, 2016) sowie dem Pankreaskarzinom (Sebens Mürköster *et al.*, 2007; Sebens Mürköster *et al.*, 2009) herstellen. Zudem konnte eine vom Transkriptionsfaktor Twist abhängige Verstärkung der L1CAM Signaltransduktion mit einer gesteigerten Cisplatinresistenz im Ovarialkarzinom in Verbindung gebracht werden (Roberts *et al.*, 2016). Weiterführend zu einer bereits postulierten und gesteigerten Resistenz nach der L1CAM Überexpression in SNOUT-Rb1 Zellen sowie der verringerten Resistenz von Y79 Zellen nach L1CAM *Knockdown* und kurzzeitiger, additiver Behandlung mit Chemotherapeutika (Jo *et al.*, 2017), konnte in dieser Arbeit der Effekt von L1CAM auf die Langzeitresistenz von RB Zellen gegen Etoposid aufgezeigt werden. Es ist bereits bekannt, dass L1CAM die Tumorzellen nicht nur vor Apoptose schützt, sondern auch mit der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verbunden ist (Sebens Mürköster *et al.*, 2007; Stoeck *et al.*, 2007; Sebens Mürköster *et al.*, 2009; Held-Feindt *et al.*, 2012). Dabei sind verschiedenste Apoptose-assoziierte Proteine an der Entwicklung der sog. *Multi-Drug-Resistance* (MDR) beteiligt (Chang, 2003; Chen *et al.*, 2009; Fletcher *et al.*, 2010). Die L1CAM-assoziierte MDR ist so z.B. an eine differentielle Regulation der ATP-bindenden Kasette (*ATP-binding cassette*, ABC) -Proteine gekoppelt, welche das Ausschleusen der Zytostatika aus der Zelle erhöhen und somit die Zelle vor der Apoptose-induzierenden Wirkung schützen (Jo *et al.*, 2017).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Reduktion von L1CAM mit anschließender Etoposid-Behandlung zu einer verminderten Zellviabilität und zur Bildung von kleineren bzw. leichteren Tumoren *in vivo* führt. Für eine klinische Relevanz der verminderten Zellviabilität im Sinne einer Resensitivierung müsste der Effekt des L1CAM *Knockdowns* mit anschließender Etoposidbehandlung synergistisch oder additiv sein oder sich die Einzelwirkungen potenzieren, was nicht der Fall ist. Es besteht somit kein nachweisbarer Effekt des L1CAM *Knockdowns* auf die Chemosensitivität Etoposid-resistenter RB Zellen.

6.4 ADAM10 und ADAM17 vermittelte Prozessierung von L1CAM

Um L1CAM in der Klinik als Biomarker für die Diagnostik oder Verlaufskontrolle während der Behandlung des Retinoblastoms verwenden zu können, ist neben der Kenntnis der Expression und Funktion bzw. der Rolle von L1CAM im Retinoblastom auch das Wissen über die Prozessierung des membranständigen L1CAM Moleküls z.B. für die therapeutische Adressierung durch Antikörper relevant. In der vorgelegten Dissertation wurde daher untersucht, wie L1CAM in RB Zellen prozessiert wird und welche L1CAM Spezies im Retinoblastom detektierbar sind. Die L1CAM Ektodomäne wird vornehmlich durch die Shedassen ADAM10 und ADAM17 abgespalten, wodurch ein 200-kDa L1CAM Fragment entsteht. Dieses lösliche L1CAM Fragment ist in der Lage mit benachbarten L1CAM Molekülen, Integrinen oder Rezeptoren in *cis* und/oder *trans* zu interagieren. (Kiefel *et al.*, 2012)

Die Analyse der ADAM Expression in RB Zelllinien im Vergleich zur humanen Retina zeigte eine verstärkte Expression von ADAM10 und ADAM17, ausgenommen die Expression von ADAM17 in RB355 und Rbl-30 Zellen. Zudem zeigte die Analyse von 16 unabhängigen RB Tumorproben im Vergleich zur humanen Retina eine signifikant stärkere Expression sowohl von ADAM10 als auch ADAM17. Eine gesteigerte Expression von ADAM10 konnte bereits in früheren Studien z.B. im Kolonkarzinom (Mochizuki *et al.*, 2020) sowie eine gesteigerte ADAM17 Expression in Tumorproben von Brustkrebspatienten (Shen *et al.*, 2016) beobachtet werden. Dabei geht z.B. eine gesteigerte ADAM10 Expression mit einer schlechten Verlaufsprognose für die Erkrankung von Blasenkrebspatienten einher (Fu *et al.*, 2014). Darüber hinaus konnte eine Koexpression von L1CAM und ADAM10 bereits im Uteruskarzinom nachgewiesen werden (Fogel *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl L1CAM als auch ADAM10 und ADAM17 in den untersuchten RB Tumorproben im Vergleich zur humanen Retina überexprimiert vorlagen, sodass diesen Proteinen eine entscheidende Rolle im RB zugeschrieben werden kann. Die Shedassen ADAM10 und ADAM17 können daher aufgrund ihrer verstärkten Expression im RB Tumorgewebe als ein weiteres mögliches Ziel in der Therapie des RB in Betracht gezogen werden. Um darüber hinaus die Rolle der ADAMs im Retinoblastom besser verstehen zu können wurden nachfolgend zu den Expressionsuntersuchungen die domänenspezifische Expression von L1CAM mittels Western Blot der verschiedenen RB Zelllinien analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Proteinexpression von ADAM10 und ADAM17 ebenso zelllinienspezifisch wie

die Prozessierung der L1CAM Ektodomäne durch die Sheddasen ist. Die durch die Sheddasen ADAM10 und ADAM17 abgespaltene, 200 kDa L1CAM Ektodomäne konnte deutlich im Kulturüberstand der RB Zelllinien RB355, WERI-Rb1 und Y79 nachgewiesen werden. Bei diesen drei RB Zelllinien konnte zum einen eine deutliche L1CAM Proteinexpression nachgewiesen werden und zum anderen die Expression der inaktiven ADAM10 und ADAM17 Precursor sowie die aktive ADAM17 Isoform. Widererwarten konnte bei den untersuchten RB383 Zellen, bei denen eine deutliche L1CAM Proteinexpression sowie die aktive ADAM10 und ADAM17 Isoform detektierbar war, keine lösliche L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass eine erhöhte Menge der aktiven ADAM Isoformen in RB383 Zellen nicht zwangsläufig zu einer gesteigerten L1CAM Prozessierung und damit verstärkten Detektion im Kulturüberstand der RB Zelllinien führt, lässt die Vermutung zu, dass neben der Expression und Aktivierung der ADAMs auch andere Regulationsmechanismen an der ADAM-abhängige L1CAM Prozessierung beteiligt sind. Anders herum führte eine Expression der ADAM10 Precursor in WERI-Rb1, Y79 und RB355 Zellen zu einer detektierbaren Menge löslicher L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand. Es konnte bereits gezeigt werden, dass neben der Expression der inaktiven und aktiven Form der ADAMs auch die zelluläre Lokalisation eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Sheddaseaktivität und somit der Prozessierung der Zielmoleküle spielt (Lorenzen *et al.*, 2016). Daher kann vermutet werden, dass die in dieser Dissertation gezeigte Menge an löslicher L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand möglicherweise ein Resultat komplexer Regulationsmechanismen zum einen der L1CAM Expression selber und zum anderen aus der Expression der ADAMs, deren Aktivierung sowie der zellulären Lokalisation (intrazellulär oder membranständig) und der Verteilung innerhalb der Plasmamembran ist.

Zusätzlich zu der bereits beschriebenen 200 kDa L1CAM Ektodomäne konnte bei der Untersuchung der Proteinproben des humanen Retinagewebes mittels Western Blot eine 85 kDa Bande (L1-85) detektiert werden, nicht aber in den untersuchten RB Zelllinien (Daten nicht gezeigt), die den residualen, membranständigen Anteil der Plasmin/Trypsin-vermittelten Abspaltung der L1CAM Ektodomäne in der dritten Fibronectindomäne (FN_{III}) darstellt (Gutwein *et al.*, 2003; Kiefel *et al.*, 2012). An dieser Stelle enthält L1CAM die Konsensussequenz QRKHSKRHIH die durch Plasmin geschnitten werden kann (Long *et al.*, 2001; Mechtersheimer *et al.*, 2001). Das

Detektieren der 85 kDa Domäne ist ein Zeichen für membranständiges L1CAM, da diese Domäne nicht im Kulturüberstand detektiert werden kann (Gutwein *et al.*, 2003). Somit könnte L1CAM in der gesunden humanen Retina, nicht aber in RB Tumorzellen, durch Plasmin prozessiert werden. Einige Studien konnten zeigen, dass die in der Zellmembran verbleibende 32 kDa Domäne von L1CAM ein Resultat der regulierten intramembranen Proteolyse (engl. *regulated intramembrane proteolysis*, RIP) ist (Kiefel *et al.*, 2012). So führte z.B. die Behandlung von Ovarialkarzinomzellen mit dem γ -Sekretaseinhibitor DAPT zur Akkumulation der 32 kDa Bande von L1CAM. Damit konnte im weiteren Verlauf gezeigt werden, dass die Prozessierung des 32 kDa Fragments durch die γ -Sekretase Presenelin zur Freisetzung einer 28 kDa, löslichen Domäne (L1-28) in das Zytoplasma führt (Maretzky *et al.*, 2005; Riedle *et al.*, 2009), welche letztendlich in den Nukleus translozieren kann (Riedle *et al.*, 2009). Durch diese Translokation kann letztendlich eine NF- κ B-abhängige Proliferationssteigerung vermittelt werden (Kiefel *et al.*, 2012). Mittels Western Blot konnte in allen getesteten RB Zelllinien sowie im Zelllysate der humanen Retina sowohl die 32 kDa als auch die 28 kDa L1CAM Domäne nachgewiesen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass L1CAM in den RB Zellen und der Retina unterschiedlich prozessiert wird.

Nachdem der zelllinienspezifische Unterschied der ADAM Expression und der Prozessierung von L1CAM nachgewiesen wurde, sollte im Folgenden die ADAM10- und ADAM17-abhängige Prozessierung von L1CAM durch die Behandlung mit spezifischen Inhibitoren untersucht werden. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, ob L1CAM durch die Sheddasen ADAM10 und ADAM17 gleichermaßen oder nur von einer der beiden Sheddasen geschnitten wird.

Für die Untersuchung der ADAM-abhängigen Abspaltung der L1CAM Ektodomäne wurde zunächst die Aktivierung der ADAM Aktivität durch die Behandlung der Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) untersucht. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation der RB Zelllinien RB355 und Y79 mit PMA zu einer signifikanten Steigerung der Menge an löslicher L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand von Y79 und RB355 führte. Analog zu der in der vorliegenden Dissertation beobachteten Zunahme der Menge an L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand nach PMA Behandlung konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass durch die Behandlung die ADAM17 Zelloberflächenexpression induziert (Soond *et al.*, 2005) und z.B. die Aktivität für das ADAM-abhängige Prozessieren der Metalloproteinase Meprin verstärkt werden konnte (Herzog *et al.*,

2014). Die zur PMA Stimulation zusätzliche Hemmung der Sheddasen mit den jeweils spezifischen Inhibitoren GI254023X (ADAM10) und TAPI-1 (ADAM17) führte in beiden Fällen zu einer Reduktion der Menge an löslicher L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ADAM10 und ADAM17 im Retinoblastom gleichermaßen eine Rolle bei der PMA-stimulierten Prozessierung von L1CAM spielen. Die spezifischen Inhibitoren wurden in dieser Arbeit gewählt um die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 getrennt beurteilen zu können. Der Inhibitor GI254023X ist dabei deutlich effektiver in der Hemmung der ADAM10 Aktivität (IC₅₀ von 5,3 nM für rekombinantes ADAM10) als der ADAM17 Aktivität (IC₅₀ von 541 nM für rekombinantes ADAM17) (Scholz *et al.*, 2007). Der Breitbandmetalloproteaseinhibitor TAPI-1 ist bei der Untersuchung der in dieser Arbeit relevanten ADAMs, ADAM17-spezifisch (Tocris Bioscience, 2020). Die Hemmung der endogenen Sheddaseaktivität, ohne vorherige PMA Stimulation, mit den jeweils spezifischen Inhibitoren führte ebenfalls in beiden Fällen zu einer Reduktion der Menge an löslicher L1CAM Ektodomäne im Kulturüberstand und der Zunahme der Menge an gesamten L1-220 im Zellysate. Damit konnte bestätigt werden, dass neben der PMA-stimulierten auch eine endogene ADAM10 und ADAM17 Aktivität in den untersuchten RB Zelllinien besteht. Nach der Behandlung der Zellen mit PMA konnte eine signifikante Steigerung der Zellviabilität in RB355 und Y79 Zellen detektiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung von Melanomzellen zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation über die Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade führte (Jørgensen *et al.*, 2005). Eine anschließende Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Inhibitoren führte jedoch zu keiner signifikanten Verminderung der Zellviabilität, mit Ausnahme der Zelllinie RB355 nach Zugabe von 10 µM TAPI-1. Eine Verwendung der Inhibitoren in den verwendeten Konzentrationen zur Reduktion der Zellproliferation und evtl. des Tumorwachstums in Folgeversuchen erscheint, ausgenommen für die Verwendung von 10 µM TAPI-1, als nicht zielführend. Die Relevanz der in dieser Dissertation untersuchten Sheddasen für das Wachstum der RB Tumore wird durch die bereits in anderen Krebsentitäten durchgeführten Studien deutlich hervorgehoben. So konnte bereits gezeigt werden, dass im Gliom die Zunahme der löslichen L1CAM Ektodomäne durch die Hochregulation von ADAM10 bedingt ist und die lösliche L1CAM Ektodomäne wurde im Aszitespunktat von Patienten mit Ovarial- oder Kolonkarzinomen gefunden (Fogel *et al.*, 2003; Gutwein *et al.*, 2005; Gavert *et al.*, 2007). In Zusammenhang mit der L1CAM Ektodomäne konnte

in vielen Krebsarten eine stimulierende Wirkung auf die Zellmigration und –invasion (van der Maten *et al.*, 2019) beobachtet werden. So führte z.B. die Behandlung von Glioblastomzellen mit exosomal gebundenem L1CAM zur Stimulation der Proliferation und Migration (Pace *et al.*, 2019). Darüber hinaus führte im Glioblastom die Interaktion der L1CAM Ektomdomäne mit $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$ Integrinen zu einer Aktivierung der Signalpeptide FAK und FGFR1 und somit zur Stimulation der Proliferation (Shtutman *et al.*, 2006; Mohanan *et al.*, 2013). Darüber hinaus kann die Entwicklung von Lungen- (Saad *et al.*, 2019; Saad *et al.*, 2020) und Kolorektumkarzinomen (Schmidt *et al.*, 2018) in einen Zusammenhang mit der Aktivierung von ADAM17 gebracht werden. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die siRNA-vermittelte, negative Regulation von ADAM17 zu einer verminderten Migration und Invasion von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen führte (Lv *et al.*, 2014). Zudem konnte ein anti-tumoraler Effekt nach der Behandlung von Brustkrebszelllinien mit einem anti-ADAM17 Antikörper (Caiazza *et al.*, 2015) und ein vermindertes Wachstum von humanen Kolonkarzinomxenotransplantaten durch Behandlung mit einem anti-ADAM10 Antikörper beobachtet werden (Atapattu Mudiyansele, Lakmali Saman Kumari Atapattu, 2017). Interessanterweise kann zudem die Aktivierung von membrangebundenen Rezeptoren durch die Sheddasen-vermittelte Prozessierung, wie z.B. die des *epidermal growth factor receptor*, EGFR, durch EGFR-Liganden entweder zur gesteigerten Proliferation oder Apoptose führen, je nachdem welche weiteren Signalwege angeschlossen sind. Die Inhibierung der Rezeptoren kann wiederum durch die Hemmung der Sheddasen bewirkt werden (Jackson *et al.*, 2003; Blobel, 2005).

In einem ersten Vorversuch konnte bereits gezeigt werden, dass auch in RB355 Zellen die Migration *in vivo* durch die Inhibierung von ADAM10 und ADAM17 mittels spezifischer Inhibitoren reduziert werden kann (Daten nicht gezeigt). In klinischen Studien wurde jedoch eine hepatotoxische Wirkung der ADAM Inhibitoren nachgewiesen (Dreymueller *et al.*, 2015), wodurch die Implementierung der Inhibitoren als potentielle medikamentöse Behandlung des Retinoblastoms in der Klinik nicht zielführend erscheint. Die Verwendung der selektiven Inhibitoren für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Prozessierung von L1CAM und der Identifikation welche der Sheddasen daran beteiligt ist, war an dieser Stelle dennoch sinnvoll. Auf diese Weise konnte nämlich die Wirkung der einzelnen Sheddasen getrennt voneinander untersucht werden. Die Durchführung von shRNA-vermittelten

Knockdown Versuchen würde an die in dieser Dissertation dokumentierten Beobachtungen anknüpfen, um die Wirkung der ADAM Sheddase auf die Zellviabilität, Proliferation, Apoptose, das Wachstum und die Migration genauer untersuchen zu können. Die Untersuchung des shRNA-vermittelten *Knockdown* von ADAM10 und ADAM17 führte in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe bereits zu vielversprechenden Ergebnissen in Bezug auf die Reduktion der Zellviabilität von Y79 und RB355 Zellen.

Das Potential der ADAMs als Ziel in der Retinoblastomtherapie eine Anwendung zu finden ist aufgrund der bereits erhobenen Daten dieser Arbeit und vorangegangener Studien (Saad *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020; Saad *et al.*, 2020; Xiang *et al.*, 2020) vielversprechend, sodass weitere Untersuchungen zur Rolle der ADAM Sheddase im Retinoblastom von wissenschaftlichem Interesse sind.

6.5 L1CAM-assozierte miRNAs

Durch microRNAs (miRs) können post-transkriptionelle Regulationsprozesse der Genexpression und damit auch die Kontrolle von Tumorwachstum und Metastasen kontrolliert werden (Bhaumik *et al.*, 2008; Nicoloso *et al.*, 2009). Neben der bereits beschriebenen Prozessierung von L1CAM durch die ADAM Sheddase besitzen miRs direkte regulatorische Wirkung auf die L1CAM Expression weshalb diese als mögliche Ziele in der L1CAM-basierten Retinoblastomtherapie vermutet wurden. Daher wurde in der vorliegenden Dissertation die Expression von L1CAM-regulierenden miRs in verschiedenen RB Zelllinien sowie die direkte Wirkung der miR-146a-5p auf die Expression von L1CAM in WERI-Rb1 Zellen untersucht. Des Weiteren wurde die Bindung der miR-346 an eine *in silico* prognostizierte Bindestelle in der 3'-UTR von L1CAM untersucht.

6.5.1 Expression L1CAM-assoziierter miRNAs

Um zu untersuchen, welche miRNAs eine potentielle Rolle bei der Regulation von L1CAM im Retinoblastom haben können, wurde zunächst die Expression der L1CAM-assozierten miRNAs in den verschiedenen Retinoblastomzelllinien im Vergleich zur humanen Retina mittels quantitativer *Real-time*-PCR untersucht. MiR-21-3p (Doberstein *et al.*, 2014) und miR-29a-3p (Duan *et al.*, 2014) werden als stimulierend für die Expression von L1CAM beschrieben, miRNAs 34a (Schirmer *et al.*, 2014) und 146a-5p (Hou & Yin *et al.*, 2012) sollen hingegen die Expression von L1CAM hemmen.

MiR-146a-5p liegt in allen untersuchten RB Zelllinien im Vergleich zur humanen Retina signifikant herunterreguliert vor. Dagegen liegt miR-34a in den meisten der untersuchten RB Zelllinie signifikant stärker exprimiert vor als in der humanen Retina. Im Vergleich zur humanen Retina liegen miR-29a-3p und miR-21-3p in den untersuchten RB Zelllinien differentiell exprimiert vor. Im Vergleich dazu zeigten die RB Zelllinien RB355 und Y79 im Vergleich zur humanen Retina eine stärkere L1CAM Proteinexpression. Ebenso konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass WERI-Rb1 und RB355 Zellen, die eine geringere miR-146a-5p Expression zeigen, eine erhöhte L1CAM mRNA Expression aufweisen. Da die Bindung von miR-146a-5p in der 3'-UTR von L1CAM bereits nachgewiesen wurde (Hou & Yin *et al.*, 2012) könnte daher die Expression der miR-146a-5p in WERI-Rb1 und RB355 Zellen zu einer verminderten L1CAM Expression führen. Für die Zelllinien Y79, Rbl-13, Rbl-30, RB247 und RB383 besteht dagegen kein Zusammenhang zwischen der verminderten miR-146a-5p Expression und einer verminderten Expression von L1CAM, da in diesen Zelllinien L1CAM im Vergleich zur humanen Retina schwächer exprimiert vorliegt.

Es wurde bereits eine Hemmung der L1CAM Expression durch die Bindung von miR-34a in der 3'-UTR von L1CAM beschrieben (Schirmer *et al.*, 2014). In den meisten der untersuchten Zelllinien lag miR-34a im Vergleich zur humanen Retina signifikant stärker exprimiert vor (ausgenommen WERI-Rb1 und RB355). Im Vergleich zur humanen Retina lag dabei die L1CAM Expression in den Zelllinien Y79, Rbl-13, Rbl-30, RB247 und RB383 vermindert vor, sodass hier eine Regulation der L1CAM Expression durch die signifikant erhöhte miR-34a Expression vorliegen könnte. In den Zelllinien WERI-Rb1 und RB355 ist dahingegen die miR-34a im Vergleich zur humanen Retina nicht signifikant reguliert, wobei hier gleichzeitig eine erhöhte L1CAM Expression vorliegt. Die Regulation der L1CAM Expression durch miR-34a im Retinoblastom könnte im Anschluss an diese Arbeit z.B. durch die Behandlung der RB Zellen mit miR-34a Inhibitoren untersucht werden.

Duan *et al.* (2014) beschrieben die miR-29a-3p als Inhibitor für den RE-1 *silencing factor* (REST), dessen Inhibition wiederum die Expression von L1CAM verstärkt (Duan *et al.*, 2014). Ein direkter Zusammenhang der miR-29a-3p Expression und der endogenen Expression von L1CAM in den untersuchten RB Zelllinien lässt sich anhand der ermittelten Daten der vorgelegten Dissertation nicht treffen. Da die miR-29a-3p im Vergleich zur humanen Retina in allen untersuchten RB Zelllinien, ausgenommen Rbl-13 und Rbl-30, signifikant schwächer exprimiert vorliegt kann eine

stimulierende Wirkung auf die L1CAM Expression und damit auf die Proliferation und das Tumorstadium, wie ebenfalls in der vorliegenden Dissertation gezeigt, nur in den Zelllinien WERI-Rb1 und RB355 angenommen werden. Da aber in früheren Studien bereits gezeigt werden konnte, dass miR-29a-3p im Endometriumkarzinom Apoptose induziert und die Invasion der Tumorzellen hemmt (Jiang *et al.*, 2018), ist diese miR ein potentiell interessantes, neues miRNA-basiertes Ziel der Retinoblastomtherapie, welches im Anschluss an diese Arbeit durch die transiente Überexpression der miR oder die Transfektion von miR-29a-3p *mimics* weiter untersucht werden könnte. Zudem passt der Zusammenhang zwischen der allgemein verringerten miR-29a-5p Expression in den RB Zelllinien im Vergleich zur humanen Retina, da so in den RB Zelllinien die miR-29a keine Apoptose induzieren kann.

Eine starke, positive Korrelation von L1CAM und miR-21-3p Expression konnte in Patientenkohorten renaler, endometrialer und ovarialer Krebserkrankungen nachgewiesen werden (Doberstein *et al.*, 2014). MiR-21-3p liegt in den untersuchten RB Zelllinien dagegen nicht einheitlich reguliert vor. Anhand der erhobenen Daten kann keine Korrelation der miR-21a-3p Expression und der Expression von L1CAM festgestellt werden, da eine erhöhte miR-21-3p Expression nicht mit einer gesteigerten L1CAM Expression korreliert und umgekehrt.

Zusätzlich zu den Untersuchungen der miRNAs im Hinblick auf die Expression in den verschiedenen RB Zelllinien im Vergleich zur humanen Retina wurde die Expression der miR-34a und der miR-146a-5p in sensitiven und Etoposid-resistenten RB Zellen untersucht. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die miR-34a und -146a-5p in den Etoposid-resistenten WERI-Etop und Y79-Etop Zellen signifikant stärker exprimiert vorliegen als in den sensitiven Ursprungszellen. Zudem konnte in den Zelllinien RB355-Etop und WERI-Etop, eine deutliche Reduktion des L1CAM Proteingehalts im Vergleich zu den sensitiven Ursprungszellen festgestellt werden, was möglicherweise auf eine negative Regulation der L1CAM Expression in Etoposid-resistenten RB Zellen durch die miRs 34a und/oder 146a-5p hindeutet. Um den Zusammenhang der verstärkten miR-34a und miR-146a-5p Expression in Etoposid-resistenten Zellen mit der L1CAM Expression untersuchen zu können, würde an die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsuntersuchungen, die Behandlung der Zellen mit spezifischen miRNA-Inhibitoren anknüpfen. Auf diese Weise ließen sich die miRNAs selektiv hemmen und der Effekt auf die L1CAM Proteinexpression im Western Blot darstellen. Zusätzlich könnte im Anschluss an diese Arbeit eine Hemmung der

miR-34a durchgeführt werden, um die Effekte auf Proliferation, Zellviabilität und der Entwicklung der Etoposidresistenz zu untersuchen. So konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass die Überexpression der miR-34a eine signifikante Steigerung der Sensitivität gegenüber Etoposid, Cisplatin und Vincristin bewirkt (Busch *et al.*, 2019), was für die Untersuchung der Anwendung von miR-34a Inhibitoren zur Behandlung des Retinoblastoms spricht. Die mögliche Regulation der L1CAM Expression durch die Überexpression der miR-146a-5p wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

6.5.2 Regulation der L1CAM Expression durch miR-146a-5p

In einer Studie von Hou *et al.* wurde im Luciferase Assay bereits die Bindung der miR-146a-5p an die 3'-UTR von L1CAM gezeigt (Hou & Xie *et al.*, 2012). Da die miR-146a-5p in allen untersuchten RB Zelllinien im Vergleich zur humanen Retina schwächer exprimiert vorliegt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine verstärkte Expression von miR-146a-5p die Expression von L1CAM in RB Zellen verringert. In der vorgelegten Dissertation wurde gezeigt, dass die Überexpression von miR-146a-5p ausschließlich in WERI-Rb1, nicht aber in RB355 und Y79 Zellen, zu einer signifikanten Verringerung der L1CAM Proteinexpression führt.

Funktionell konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression der miR-146a-5p in Y79 und WERI-Rb1 Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate führt (Liu *et al.*, 2020). Zudem steht eine veränderte Expression der miR-146a-5p in einem engen Zusammenhang mit der Progression verschiedener Krebserkrankungen (Bhaumik *et al.*, 2008; Jazdzewski *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Hurst *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Mei *et al.*, 2011; Paik *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass L1CAM ein Ziel von miR-146a in Magenkrebs darstellt und durch diese negativ reguliert wird, was zu einer verminderten Metastasierung führt (Hou & Yin *et al.*, 2012). Zudem ist miR-146a in Magenkrebszellen herunterreguliert, was mit einer erhöhten Tumorgröße und generell schlechten Verlaufsprognose für die Erkrankung des Patienten assoziiert ist (Hou & Xie *et al.*, 2012). Im Magenkrebs steht eine verringerte miR-146a Expression nachweislich in Zusammenhang mit der Metastasierung in Lymphknoten und der Migration in das venöse Gefäßsystem (Tchernitsa *et al.*, 2010; Kogo *et al.*, 2011). Ebenso wirkt miR-146a hemmend auf die Ausbildung von Metastasen im Brustkrebs (Hurst *et al.*, 2009), Gliom (Mei *et al.*, 2011) sowie NK/T Zell Lymphomen (Paik *et al.*, 2011).

Der *Knockdown* von L1CAM in RB Zelllinien führte, wie in dieser Arbeit beschrieben, zu einer erhöhten Apoptoserate. Analog dazu konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression der miR-146a-5p in RB Zellen ebenfalls zu einer erhöhten Apoptoserate führte (Liu *et al.*, 2020). Da die negative Regulation der L1CAM Expression durch die miR-146a-5p jedoch ausschließlich in WERI-Rb1 Zellen nachgewiesen werden konnte, besteht kein allgemeingültiger Zusammenhang zwischen der Überexpression der miR-146a-5p und der Hemmung der L1CAM Expression im Retinoblastom und der damit von Liu *et al.* (2020) beobachteten Steigerung der Apoptoserate von RB Zellen. Somit müssen die pro-apoptotischen Effekte der miR-146a-5p Überexpression (Liu *et al.*, 2020) über andere Signalwege reguliert werden als solche, die durch den *Knockdown* von L1CAM induziert werden.

6.5.3 Bindung der miR-346 an die 3'-UTR von L1CAM

Bei der Untersuchung der differentiellen Expression verschiedener, onkologisch-relevanter miRs mittels miRNA Array Analyse (Vorarbeiten durch AG Dünker) konnte eine Überexpression der miR-346 in Etoposid-resistenten, im Vergleich zu parentalen, RB Zellen nachgewiesen werden.

Im Anschluss an die Array Analysen wurde die Expression der miR-346 in RB Zelllinien zunächst in Bezug zur Expression in humanem Retinagewebe und anschließend in Bezug von sensitiven zu Etoposid-resistenten RB Zellen mittels quantitativer *Real-time*-PCR untersucht. Bei der Expression der miR-346 ist keine einheitliche Tendenz der Expression in den untersuchten RB Zelllinien im Vergleich zur humanen Retina zu erkennen. Nur in WERI-Etop Zellen ist die miR-346 signifikant stärker exprimiert als in den jeweiligen sensitiven Ursprungszellen. In diesen Zellen lag auch die L1CAM Proteinexpression im Vergleich zu den parentalen Zellen verringert vor. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass die Expression der miR-346 an der post-translationalen Repression der L1CAM Expression beteiligt sein könnte. Für den Nachweis der Bindung der miR-346 in der 3'-UTR von L1CAM wurde daher zunächst eine *in silico* Analyse durchgeführt, die eine mögliche Bindestelle ergab. Nachfolgend wurde zur funktionellen Untersuchung der miR-346 Bindung an die prognostizierte Bindestelle in der 3'-UTR von L1CAM ein Reporter- und miR-346 Überexpressionsplasmid kloniert. Die Bindung der miR-346 an die Bindestelle in der L1CAM-3'-UTR konnte im Luciferase Assay jedoch nicht bestätigt werden. Die miR-346 hat somit keine direkte regulatorische Wirkung auf die L1CAM Expression. Die

miR-346 wurde jedoch bereits in vorangegangenen Studien in Zusammenhang mit verschiedenen Krebsentitäten beschrieben. So wurde miR-346 bereits in Brustkrebszelllinien als Tumorinduktor identifiziert, da die Überexpression durch eine miR-346 *mimic in vitro* zu einer gesteigerten Docetaxel-Resistenz und gesteigerten Zellproliferation führte (Yang *et al.*, 2017). Ebenso bewirkt die Überexpression der miR-346 das Zellwachstum sowie die Invasivität von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom- (Sun *et al.*, 2016) und Leberzellkarzinomzellen (Guo *et al.*, 2018). In einem ersten Vorversuch unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass eine miR-346 Überexpression in Y79 Zellen zu einer gesteigerten Zellviabilität führt, ohne dabei die Proteinexpression von L1CAM signifikant zu beeinflussen (Daten nicht gezeigt). Eine Hemmung der miR-346 durch Inhibitoren könnte deren positiven Effekt auf die Zellviabilität von Y79 Zellen umkehren, was im Anschluss an diese Arbeit und in Hinblick auf weitere neue Ziele für die Retinoblastomtherapie weiter untersucht werden könnte.

7 Zusammenfassung

Das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1CAM liegt in einer Vielzahl von Krebserkrankungen stärker exprimiert vor als in gesundem Gewebe und ist daher ein vielversprechendes Ziel für neue Therapieansätze. Eine Überexpression von L1CAM geht im Allgemeinen mit fortgeschrittener Tumorerkrankung und schlechter Prognose für den Verlauf der Erkrankung einher. Die vorliegende Dissertationsschrift beschreibt die Rolle von L1CAM im Retinoblastom (RB), der am häufigsten auftretenden, malignen Augenerkrankung des frühen Kindesalters. Es wurden in RB Zelllinien, Patientenproben sowie chemosensitiven und resistenten RB Zellen unterschiedliche Expressionsmuster von L1CAM nachgewiesen. Der Lentivirus-vermittelte L1CAM *Knockdown* führte zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptose sowie einer Reduktion der Zellviabilität, der Proliferation, dem Zellwachstum und der Koloniebildungskapazität, wohingegen L1CAM-überexprimierende RB Zellen gegenteilige Effekte aufzeigten. Es wurde eine signifikant verringerte Tumorbildungs- und migrationskapazität im Chorioallantoismembran (CAM) Assay nach dem *Knockdown* von L1CAM nachgewiesen. Eine stabile L1CAM Überexpression verstärkte die Tumorbildung, hatte aber keine Auswirkung auf das Migrationspotential *in vivo*. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein L1CAM *Knockdown* die Zellviabilität von Etoposid-resistenten RB Zellen *in vitro* sowie das Tumorbildungspotential *in vivo* verringert. Die untersuchten L1CAM Sheddasen ADAM10 und ADAM17 sind beide gleichermaßen differentiell in RB Zelllinien exprimiert und es konnte eine ADAM-abhängige Prozessierung von L1CAM detektiert werden. Die lösliche L1CAM Ektodomäne konnte im Kulturüberstand von RB355, WERI-Rb1 und Y79 Zellen nachgewiesen werden, was dessen Rolle bei der Tumorzellproliferation und der Signaltransduktion unterstreicht. Ebenso konnten die Proteine Ezrin, Galectin-3 und FGFb als Zielgene von L1CAM in RB Zellen identifiziert werden. Des Weiteren konnte eine erhöhte Vimentin Expression in L1-überexprimierenden RB247 Zellen nachgewiesen werden, was auf die Rolle von L1CAM während der EMT hindeuten könnte. Die Überexpression von miR-146a-5p führte in einer von drei untersuchten RB Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der L1CAM Proteinexpression. Eine Bindung der miR-346 an eine *in silico* prognostizierten Bindestelle in der 3'-UTR von L1CAM konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend stellen

L1CAM, dessen Zielgene Ezrin, Galectin-3 und FGFb sowie die Shedassen ADAM10 und ADAM17 mögliche Ziele für neue RB Therapien dar.

8 Abstract

The neuronal cell adhesion molecule L1CAM is differentially expressed in a variety of human cancers and a promising target for novel cancer therapies. Overexpression of L1CAM is associated with advanced cancer stages and a poor prognosis for the patients' course of disease. The doctoral thesis presented focuses on the role of L1CAM in retinoblastoma (RB), the most common malignant intraocular childhood tumor. Differential expression patterns for L1CAM in RB cell lines were observed, both in parental and chemoresistant cell lines as well as in patient samples. Lentiviral *L1CAM* knockdown induced apoptosis and reduced cell viability, proliferation, growth and colony formation capacity of RB cells, while *L1CAM* overexpressing RB cells showed exact opposite effects. Decreased tumorigenic and migration potential of RB cells *in vivo* were revealed by chicken chorioallantoic membrane (CAM) assays. Stable overexpression of L1CAM increased the tumorigenic potential of RB247 cells *in vivo* but had no effect on migration capacity. Moreover, *L1CAM* depletion decreased the tumorigenic potential and cell viability of etoposide resistant RB cell lines upon etoposide treatment *in vitro* and *in vivo*. Both L1CAM sheddases, ADAM10 and ADAM17, were found to be likewise differentially expressed in the RB cell lines investigated. Hence, an involvement in L1CAM processing in RB cells could be verified. The soluble L1CAM ectodomain was found in cell culture supernatants of RB355, WERI-Rb1 and Y79 cells suggesting a role in tumor cell proliferation and signaling. Besides, ezrin, galectin-3 and FGFb as L1CAM downstream signaling target genes in RB cells. Furthermore, vimentin expression is increased upon L1-overexpression, indicating the role of L1CAM in EMT-associated cellular processes in RB. Overexpression of miR-146a-5p significantly downregulate L1CAM levels in WERI-Rb1 but not in RB355 and Y79 RB cell lines. Binding studies of miR-346 at the *in silico* proposed binding site in the 3'-UTR of L1CAM could not be verified by luciferase assays. Summing up, one can state that L1CAM, its signaling targets ezrin, gal-3, FGFb and its processing sheddases are potential novel targets for future therapeutic RB approaches.

Literaturverzeichnis

- Abramson, D.H., Dunkel, I.J., Brodie, S.E., Marr, B. & Gobin, Y.P. (2010) Superselective ophthalmic artery chemotherapy as primary treatment for retinoblastoma (chemosurgery). *Ophthalmology*, 117(8), 1623–1629. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2009.12.030>.
- Abramson, D.H., Shields, C.L., Munier, F.L. & Chantada, G.L. (2015) Treatment of Retinoblastoma in 2015: Agreement and Disagreement. *JAMA Ophthalmology*, 133(11), 1341–1347. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.3108>.
- Ajioka, I., Martins, R.A.P., Bayazitov, I.T., Donovan, S., Johnson, D.A. & Frase, S. et al. (2007) Differentiated horizontal interneurons clonally expand to form metastatic retinoblastoma in mice. *Cell*, 131(2), 378–390. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.036>.
- Altevogt, P., Ben-Ze'ev, A., Gavert, N., Schumacher, U., Schäfer, H. & Sebens, S. (2020) Recent insights into the role of L1CAM in cancer initiation and progression. *International Journal of Cancer*, 147(12), 3292–3296. Available from: <https://doi.org/10.1002/ijc.33177>.
- Altevogt, P., Doberstein, K. & Fogel, M. (2016) L1CAM in human cancer. *International Journal of Cancer*, 138(7), 1565–1576. Available from: <https://doi.org/10.1002/ijc.29658>.
- Ambros, V. (2003) MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*, 113(6), 673–676. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00428-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00428-8).
- Ananieva, O., Darragh, J., Johansen, C., Carr, J.M., McIlrath, J. & Park, J.M. et al. (2008) The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nature Immunology*, 9(9), 1028–1036. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni.1644>.
- Andersch, L., Radke, J., Klaus, A., Schwiebert, S., Winkler, A. & Schumann, E. et al. (2019) CD171- and GD2-specific CAR-T cells potently target retinoblastoma cells in preclinical in vitro testing. *BMC Cancer*, 19(1), 895. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6131-1>.
- Arlt, A., Vorndamm, J., Mürköster, S., Yu, H., Schmidt, W.E. & Fölsch, U.R. et al. (2002) Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 62(3), 910–916.
- Arlt, M.J., Novak-Hofer, I., Gast, D., Gschwend, V., Moldenhauer, G., Grünberg, J., Honer, M., Schubiger, P.A., Altevogt, P., Krüger, 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. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1818>
- Ashrafizadeh, M., Zarrabi, A., Orouei, S., Kiavash, H., Hakimi, A. & Amirhossein, Z. et al. (2021) MicroRNA-mediated autophagy regulation in cancer therapy: The role in chemoresistance/chemosensitivity. *European Journal of Pharmacology*, 892, 173660. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173660>.
- Atapattu Mudiyansele, Lakmali Saman Kumari Atapattu (2017) *Development of ADAM10 antibodies to target oncogenic cell surface receptor signalling*. Monash University. Available from: <https://doi.org/10.4225/03/58ACE2B21AC98>.
- Babu, R.L., Naveen Kumar, M., Patil, R.H., Kiran Kumar, K.M., Devaraju, K.S. & Ramesh, G.T. et al. (2019) Forskolin and Phorbol 12-myristate 13-acetate modulates the expression pattern of AP-1 factors and cell cycle regulators in

- estrogen-responsive MCF-7 cells. *Genes & Diseases*, 6(2), 159–166. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.12.001>.
- Bakhshi, S., Meel, R. & Radhakrishnan, V. (2012) Current therapy and recent advances in the management of retinoblastoma. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 33(2), 80. Available from: <https://doi.org/10.4103/0971-5851.99731>.
- Balmer, A., Zografos, L. & Munier, F. (2006) Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene*, 25(38), 5341–5349. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209622>.
- Bao, S., Wu, Q., Li, Z., Sathornsumetee, S., Wang, H. & McLendon, R.E. et al. (2008) Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Research*, 68(15), 6043–6048. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1079>.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–297. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5).
- Bartuma, K., Pal, N., Kosek, S., Holm, S. & All-Ericsson, C. (2014) A 10-year experience of outcome in chemotherapy-treated hereditary retinoblastoma. *Acta Ophthalmologica*, 92(5), 404–411. Available from: <https://doi.org/10.1111/aos.12282>.
- Bates, R.C., Edwards, N.S., Burns, G.F. & Fisher, D.E. (2001) A CD44 survival pathway triggers chemoresistance via lyn kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt in colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 61(13), 5275–5283.
- Beer, S., Oleszewski, M., Gutwein, P., Geiger, C. & Altevogt, P. (1999) Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 16), 2667–2675.
- Ben, Q., An, W., Fei, J., Xu, M., Li, G. & Li, Z. et al. (2014) Downregulation of L1CAM inhibits proliferation, invasion and arrests cell cycle progression in pancreatic cancer cells in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(4), 785–790. Available from: <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1519>.
- Berger, A.H., Brooks, A.N., Wu, X., Shrestha, Y., Chouinard, C. & Piccioni, F. et al. (2016) High-throughput Phenotyping of Lung Cancer Somatic Mutations. *Cancer Cell*, 30(2), 214–228. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.022>.
- Bhaumik, D., Scott, G.K., Schokrpur, S., Patil, C.K., Campisi, J. & Benz, C.C. (2008) Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*, 27(42), 5643–5647. Available from: <https://doi.org/10.1038/onc.2008.171>.
- Blobel, C.P. (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(1), 32–43. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrm1548>.
- Bockhorn, J., Prat, A., Chang, Y.-F., Liu, X., Huang, S. & Shang, M. et al. (2014) Differentiation and loss of malignant character of spontaneous pulmonary metastases in patient-derived breast cancer models. *Cancer Research*, 74(24), 7406–7417. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1188>.
- Bondong, S., Kiefel, H., Hielscher, T., Zeimet, A.G., Zeillinger, R. & Pils, D. et al. (2012) Prognostic significance of L1CAM in ovarian cancer and its role in constitutive NF- κ B activation. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 23(7), 1795–1802. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr568>.
- Bornfeld, N., Lohmann, D., Bechrakis, N.E. & Biewald, E. (2020) Retinoblastom. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*,

- 117(4), 389–402. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00347-020-01081-x>.
- Bousquet, I., Bozon, M., Castellani, V., Touraine, R., Piton, A. & Gérard, B. et al. (2021) X-linked partial corpus callosum agenesis with mild intellectual disability: identification of a novel L1CAM pathogenic variant. *Neurogenetics*. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10048-020-00629-y>.
- Brooks, A.J. & Putoczki, T. (2020) JAK-STAT Signalling Pathway in Cancer. *Cancers*, 12(7). Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers12071971>.
- Brümmendorf, T., Kenwrick, S. & Rathjen, F.G. (1998) Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Current Opinion in Neurobiology*, 8(1), 87–97. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(98\)80012-3](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(98)80012-3).
- Busch, M., Klein, S., Große-Kreul, J., Scheiner, O., Metz, K. & Stephan, H. et al. (2019) p53, miR-34a and EMP1-Newly Identified Targets of TFF3 Signaling in Y79 Retinoblastoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17). Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms20174129>.
- Busch, M., Papior, D., Stephan, H. & Dünker, N. (2018) Characterization of etoposide- and cisplatin-chemoresistant retinoblastoma cell lines. *Oncology Reports*, 39(1), 160–172. Available from: <https://doi.org/10.3892/or.2017.6100>.
- Busch, M., Philippeit, C., Weise, A. & Dünker, N. (2015) Re-characterization of established human retinoblastoma cell lines. *Histochemistry and Cell Biology*, 143(3), 325–338. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1285-z>.
- Caescu, C.I., Jeschke, G.R. & Turk, B.E. (2009) Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *The Biochemical Journal*, 424(1), 79–88. Available from: <https://doi.org/10.1042/BJ20090549>.
- Caiazza, F., McGowan, P.M., Mullooly, M., Murray, A., Synnott, N. & O'Donovan, N. et al. (2015) Targeting ADAM-17 with an inhibitory monoclonal antibody has antitumour effects in triple-negative breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 112(12), 1895–1903. Available from: <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.163>.
- Campeau, E., Ruhl, V.E., Rodier, F., Smith, C.L., Rahmberg, B.L. & Fuss, J.O. et al. (2009) A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PloS One*, 4(8), e6529. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006529>.
- Cebulla, C.M., Jockovich, M.-E., Piña, Y., Boutrid, H., Alegret, A. & Kulak, A. et al. (2008) Basic fibroblast growth factor impact on retinoblastoma progression and survival. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(12), 5215–5221. Available from: <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1668>.
- Chang, G. (2003) Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Letters*, 555(1), 102–105. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01085-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01085-8).
- Chang, S., Rathjen, F.G. & Raper, J.A. (1987) Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. *The Journal of Cell Biology*, 104(2), 355–362. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.104.2.355>.
- Chantada, G., Fandiño, A., Dávila, M.T.G., Manzitti, J., Raslawski, E. & Casak, S. et al. (2004) Results of a prospective study for the treatment of retinoblastoma. *Cancer*, 100(4), 834–842. Available from: <https://doi.org/10.1002/cncr.11952>.
- Chantada, G.L., Casco, F., Fandiño, A.C., Galli, S., Manzitti, J. & Scopinaro, M. et al. (2007) Outcome of patients with retinoblastoma and postlaminar optic nerve invasion. *Ophthalmology*, 114(11), 2083–2089. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2007.01.012>.
- Chen, D., Livne-bar, I., Vanderluit, J.L., Slack, R.S., Agochiya, M. & Bremner, R. (2004) Cell-specific effects of RB or RB/p107 loss on retinal development implicate an

- intrinsically death-resistant cell-of-origin in retinoblastoma. *Cancer Cell*, 5(6), 539–551. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.05.025>.
- Chen, D.-I., Zeng, Z.-I., Yang, J., Ren, C., Wang, D.-s. & Wu, W.-j. et al. (2013) L1cam promotes tumor progression and metastasis and is an independent unfavorable prognostic factor in gastric cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 6, 43. Available from: <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-43>.
- Chen, J., Gao, F. & Liu, N. (2018) L1CAM promotes epithelial to mesenchymal transition and formation of cancer initiating cells in human endometrial cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(3), 2792–2797. Available from: <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5747>.
- Chen, K.G., Valencia, J.C., Gillet, J.-P., Hearing, V.J. & Gottesman, M.M. (2009) Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(6), 740–749. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00630.x>.
- Chen, L.-L., Fan, G.-Q., Zhang, Z.-Y., Zhang, B.-Y., Yan, Z.-L. & Li, H.-J. et al. (2015) Effect of ADAM10 Inhibitor GI254023X on Proliferation and Apoptosis of Multiple Myeloma H929 Cells and Its Possible Mechanisms. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*, 23(6), 1628–1632. Available from: <https://doi.org/10.7534/j.issn.1009-2137.2015.06.019>.
- Cheriyamundath, S. & Ben-Ze'ev, A. (2020) Wnt/ β -Catenin Target Genes in Colon Cancer Metastasis: The Special Case of L1CAM. *Cancers*, 12(11). Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers12113444>.
- Cimpean, A.M., Ribatti, D. & Raica, M. (2008) The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. *Angiogenesis*, 11(4), 311–319. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9117-1>.
- Coffin, J.M. (Ed.) (1997) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY).
- Collins, J.A., Schandi, C.A., Young, K.K., Vesely, J. & Willingham, M.C. (1997) Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 45(7), 923–934. Available from: <https://doi.org/10.1177/002215549704500702>.
- Colombo, F. & Meldolesi, J. (2015) L1-CAM and N-CAM: From Adhesion Proteins to Pharmacological Targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(11), 769–781. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.08.004>.
- Conacci-Sorrell, M., Kaplan, A., Raveh, S., Gavert, N., Sakurai, T. & Ben-Ze'ev, A. (2005) The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation. *Cancer Research*, 65(24), 11605–11612. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2647>.
- Corrado, G., Laquintana, V., Loria, R., Carosi, M., Salvo, L. de & Sperduti, I. et al. (2018) Endometrial cancer prognosis correlates with the expression of L1CAM and miR34a biomarkers. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 37(1), 139. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0816-1>.
- Corson, T.W. & Gallie, B.L. (2007) One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 46(7), 617–634. Available from: <https://doi.org/10.1002/gcc.20457>.
- Craig, S.E.L. & Brady-Kalnay, S.M. (2011) Cancer cells cut homophilic cell adhesion molecules and run. *Cancer Research*, 71(2), 303–309. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2301>.
- Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A. & Basilico, C. (2005) Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(2), 233–247. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.007>.
- Dalgard, C.L., Gonzalez, M., deNiro, J.E. & O'Brien, J.M. (2009) Differential microRNA-34a expression and tumor suppressor function in retinoblastoma cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(10), 4542–4551. Available from: <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3520>.
- Das, D., Bhattacharjee, K., Barthakur, S.S., Tahiliani, P.S., Deka, P. & Bhattacharjee, H. et al. (2014) A new rosette in retinoblastoma. *Indian Journal of Ophthalmology*, 62(5), 638–641. Available from: <https://doi.org/10.4103/0301-4738.129786>.
- DAVIS, B.J. (1964) DISC ELECTROPHORESIS. II. METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 404–427. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x>.
- Debiec, H., Christensen, E.I. & Ronco, P.M. (1998) The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 143(7), 2067–2079. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.143.7.2067>.
- deFazio, A., Leary, J.A., Hedley, D.W. & Tattersall, M.H. (1987) Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 35(5), 571–577. Available from: <https://doi.org/10.1177/35.5.3549891>.
- Deschepper, F.M., Zoppi, R., Pirro, M., Hensbergen, P.J., Dall'Olio, F. & Kotsias, M. et al. (2020) L1CAM as an E-selectin Ligand in Colon Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21). Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21218286>.
- Díez-Revuelta, N., Velasco, S., André, S., Kaltner, H., Kübler, D. & Gabius, H.-J. et al. (2010) Phosphorylation of adhesion- and growth-regulatory human galectin-3 leads to the induction of axonal branching by local membrane L1 and ERM redistribution. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 5), 671–681. Available from: <https://doi.org/10.1242/jcs.058198>.
- Dimaras, H. & Corson, T.W. (2019) Retinoblastoma, the visible CNS tumor: A review. *Journal of Neuroscience Research*, 97(1), 29–44. Available from: <https://doi.org/10.1002/jnr.24213>.
- Dimaras, H., Khetan, V., Halliday, W., Orlic, M., Prigoda, N.L. & Piovesan, B. et al. (2008) Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Human Molecular Genetics*, 17(10), 1363–1372. Available from: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn024>.
- Dimaras, H., Kimani, K., Dimba, E.A.O., Gronsdahl, P., White, A. & Chan, H.S.L. et al. (2012) Retinoblastoma. *Lancet (London, England)*, 379(9824), 1436–1446. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61137-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61137-9).
- Dimitrakopoulos, F.-I.D., Kottorou, A.E., Kalofonou, M. & Kalofonos, H.P. (2020) The Fire Within: NF-κB Involvement in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, 80(19), 4025–4036. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3578>.
- Djabali, M., Mattei, M.G., Nguyen, C., Roux, D., Demengeot, J. & Denizot, F. et al. (1990) The gene encoding L1, a neural adhesion molecule of the immunoglobulin family, is located on the X chromosome in mouse and man. *Genomics*, 7(4), 587–593. Available from: [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(90\)90203-7](https://doi.org/10.1016/0888-7543(90)90203-7).
- Doberstein, K., Bretz, N.P., Schirmer, U., Fiegl, H., Blaheta, R. & Breunig, C. et al. (2014) miR-21-3p is a positive regulator of L1CAM in several human carcinomas. *Cancer Letters*, 354(2), 455–466. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.020>.
- Doberstein, K., Pfeilschifter, J. & Gutwein, P. (2011) The transcription factor PAX2 regulates ADAM10 expression in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 32(11),

- 1713–1723. Available from: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr195>.
- Dorey, K. & Amaya, E. (2010) FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 137(22), 3731–3742. Available from: <https://doi.org/10.1242/dev.037689>.
- Dreymueller, D., Uhlig, S. & Ludwig, A. (2015) ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 308(4), L325-43. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00294.2014>.
- Du, W. & Pogoriler, J. (2006) Retinoblastoma family genes. *Oncogene*, 25(38), 5190–5200. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209651>.
- Duan, P., Sun, S., Li, B., Huang, C., Xu, Y. & Han, X. et al. (2014) miR-29a modulates neuronal differentiation through targeting REST in mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 9(5), e97684. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097684>.
- Duffy, M.J., McKiernan, E., O'Donovan, N. & McGowan, P.M. (2009) Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(4), 1140–1144. Available from: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1585>.
- Dünker, N. & Jendrossek, V. (2019) Implementation of the Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Model in Radiation Biology and Experimental Radiation Oncology Research. *Cancers*, 11(10), 1499. Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers11101499>.
- Düsterhöft, S., Lokau, J. & Garbers, C. (2019) The metalloprotease ADAM17 in inflammation and cancer. *Pathology, Research and Practice*, 215(6), 152410. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.04.002>.
- Eagle, R.C., JR (2013) The pathology of ocular cancer. *Eye (London, England)*, 27(2), 128–136. Available from: <https://doi.org/10.1038/eye.2012.237>.
- Fabian, I.D., Johnson, K.P., Stacey, A.W., Sagoo, M.S. & Reddy, M.A. (2017) Focal laser treatment in addition to chemotherapy for retinoblastoma. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6, CD012366. Available from: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012366.pub2>.
- Fang, Q.-X., Zheng, X.-C. & Zhao, H.-J. (2020) L1CAM is involved in lymph node metastasis via ERK1/2 signaling in colorectal cancer. *American Journal of Translational Research*, 12(3), 837–846.
- Fang, Z., Qiu, F., Zhao, J.-F., Sun, Q., Qiao, B. & Li, G.-H. et al. (2018) Role and mechanism of Galectin-3 gene in proliferation, invasion, and apoptosis of oral squamous cell carcinoma. *Hua xi kou qiang yi xue za zhi = Huaxi kouqiang yixue zazhi = West China journal of stomatology*, 36(4), 404–409. Available from: <https://doi.org/10.7518/hxkq.2018.04.011>.
- Flemington, E.K., Speck, S.H. & Kaelin, W.G., JR (1993) E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(15), 6914–6918. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.15.6914>.
- Fletcher, J.I., Haber, M., Henderson, M.J. & Norris, M.D. (2010) ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews. Cancer*, 10(2), 147–156. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrc2789>.
- Fogel, M., Gutwein, P., Mechttersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A. & Smirnov, A. et al. (2003) L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet (London, England)*, 362(9387), 869–875. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14342-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14342-5).
- Friedman, L.A., Ring, K.L. & Mills, A.M. (2020) LAG-3 and GAL-3 in Endometrial

- Carcinoma: Emerging Candidates for Immunotherapy. *International Journal of Gynecological Pathology : Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 39(3), 203–212. Available from: <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000608>.
- Fu, L., Liu, N., Han, Y., Xie, C., Li, Q. & Wang, E. (2014) ADAM10 regulates proliferation, invasion, and chemoresistance of bladder cancer cells. *Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(9), 9263–9268. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2201-9>.
- Gallolu Kankanamalage, S., Karra, A.S. & Cobb, M.H. (2018) WNK pathways in cancer signaling networks. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 16(1), 72.
- Gast, D., Riedle, S., Issa, Y., Pfeifer, M., Beckhove, P. & Sanderson, M.P. et al. (2008) The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies. *Oncogene*, 27(9), 1281–1289. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210747>.
- Gast, D., Riedle, S., Schabath, H., Schlich, S., Schneider, A. & Issa, Y. et al. (2005) L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *International Journal of Cancer*, 115(4), 658–665. Available from: <https://doi.org/10.1002/ijc.20869>.
- Gavert, N., Ben-Shmuel, A., Raveh, S. & Ben-Ze'ev, A. (2008) L1-CAM in cancerous tissues. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(11), 1749–1757. Available from: <https://doi.org/10.1517/14712598.8.11.1749>.
- Gavert, N., Conacci-Sorrell, M., Gast, D., Schneider, A., Altevogt, P. & Brabletz, T. et al. (2005) L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *The Journal of Cell Biology*, 168(4), 633–642. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.200408051>.
- Gavert, N., Sheffer, M., Raveh, S., Spaderna, S., Shtutman, M. & Brabletz, T. et al. (2007) Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Research*, 67(16), 7703–7712. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0991>.
- Georgakopoulos-Soares, I., Chartoumpakis, D.V., Kyriazopoulou, V. & Zaravinos, A. (2020) EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 499. Available from: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00499>.
- Gil, O.D., Sakurai, T., Bradley, A.E., Fink, M.Y., Cassella, M.R. & Kuo, J.A. et al. (2003) Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. *The Journal of Cell Biology*, 162(4), 719–730. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.200211011>.
- Giordano, M. & Cavallaro, U. (2020) Different Shades of L1CAM in the Pathophysiology of Cancer Stem Cells. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5). Available from: <https://doi.org/10.3390/jcm9051502>.
- Girard, B., Le Hoang, P., D'Hermies, F., Quere, M.A. & Rousselie, F. (1989) Diffuse infiltrating retinoblastoma. *Journal francais d'ophtalmologie*, 12(5), 369–381.
- Goddard, A.G., Kingston, J.E. & Hungerford, J.L. (1999) Delay in diagnosis of retinoblastoma: risk factors and treatment outcome. *The British Journal of Ophthalmology*, 83(12), 1320–1323. Available from: <https://doi.org/10.1136/bjo.83.12.1320>.
- Goldenberg-Furmanov, M., Stein, I., Pikarsky, E., Rubin, H., Kasem, S. & Wygoda, M. et al. (2004) Lyn is a target gene for prostate cancer: sequence-based inhibition induces regression of human tumor xenografts. *Cancer Research*, 64(3), 1058–

1066. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2420>.
- Göoz, M., Göoz, P., Luttrell, L.M. & Raymond, J.R. (2006) 5-HT_{2A} receptor induces ERK phosphorylation and proliferation through ADAM-17 tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE) activation and heparin-bound epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) shedding in mesangial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21004–21012. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M512096200>.
- Gouveia, R.M., Gomes, C.M., Sousa, M., Alves, P.M. & Costa, J. (2008) Kinetic analysis of L1 homophilic interaction: role of the first four immunoglobulin domains and implications on binding mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(42), 28038–28047. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M804991200>.
- Gratzner, H.G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science (New York, N.Y.)*, 218(4571), 474–475. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.7123245>.
- Griegel, S., Hong, C., Frötschl, R., Hülser, D.F., Greger, V. & Horsthemke, B. et al. (1990) Newly established human retinoblastoma cell lines exhibit an "immortalized" but not an invasive phenotype in vitro. *International Journal of Cancer*, 46(1), 125–132. Available from: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910460123>.
- Guo, J.-C., Xie, Y.-M., Ran, L.-Q., Cao, H.-H., Sun, C. & Wu, J.-Y. et al. (2017) L1CAM drives oncogenicity in esophageal squamous cell carcinoma by stimulation of ezrin transcription. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 95(12), 1355–1368. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1595-4>.
- Guo, Y., He, X., Zhang, M., Qu, Y., Gu, C. & Ren, M. et al. (2020) Reciprocal control of ADAM17/EGFR/Akt signaling and miR-145 drives GBM invasiveness. *Journal of Neuro-Oncology*, 147(2), 327–337. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03453-4>.
- Guo, Z., Li, J., Sun, J., Sun, L., Zhou, Y. & Yu, Z. (2018) miR-346 Promotes HCC Progression by Suppressing Breast Cancer Metastasis Suppressor 1 Expression. *Oncology Research*, 26(7), 1073–1081. Available from: <https://doi.org/10.3727/096504017X15145088802439>.
- Gutwein, P., Mechtersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Gast, D. & Joumaa, S. et al. (2003) ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(2), 292–294. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.02-0430fje>.
- Gutwein, P., Oleszewski, M., Mechtersheimer, S., Agmon-Levin, N., Krauss, K. & Altevogt, P. (2000) Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 15490–15497. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.20.15490>.
- Gutwein, P., Stoeck, A., Riedle, S., Gast, D., Runz, S. & Condon, T.P. et al. (2005) Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(7), 2492–2501. Available from: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1688>.
- He, Y., Jensen, G.J. & Bjorkman, P.J. (2009) Cryo-electron tomography of homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule L1. *Structure (London, England) : 1993*, 17(3), 460–471. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.01.009>.
- Held-Feindt, J., Schmelz, S., Hattermann, K., Mentlein, R., Mehdorn, H.M. & Sebens, S. (2012) The neural adhesion molecule L1CAM confers chemoresistance in human glioblastomas. *Neurochemistry International*, 61(7), 1183–1191. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.08.011>.
- Helin, K., Harlow, E. & Fattaey, A. (1993) Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Molecular and Cellular Biology*, 13(10), 6501–6508. Available from: <https://doi.org/10.1128/mcb.13.10.6501>.
- Herron, L.R., Hill, M., Davey, F. & Gunn-Moore, F.J. (2009) The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules. *The Biochemical Journal*, 419(3), 519–531. Available from: <https://doi.org/10.1042/BJ20082284>.
- Herzog, C., Haun, R.S., Ludwig, A., Shah, S.V. & Kaushal, G.P. (2014) ADAM10 is the major sheddase responsible for the release of membrane-associated meprin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(19), 13308–13322. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.559088>.
- Hirao, A., Cheung, A., Duncan, G., Girard, P.-M., Elia, A.J. & Wakeham, A. et al. (2002) Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner. *Molecular and Cellular Biology*, 22(18), 6521–6532. Available from: <https://doi.org/10.1128/mcb.22.18.6521-6532.2002>.
- Hlavin, M.L. & Lemmon, V. (1991) Molecular structure and functional testing of human L1CAM: An interspecies comparison. *Genomics*, 11(2), 416–423. Available from: [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90150-d](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90150-d).
- Hooper, N.M., Karran, E.H. & Turner, A.J. (1997) Membrane protein secretases. *The Biochemical Journal*, 321 (Pt 2)(Pt 2), 265–279. Available from: <https://doi.org/10.1042/bj3210265>.
- Horwitz, V., Davidson, B., Stern, D., Tropé, C.G., Tavor Re'em, T. & Reich, R. (2016) Ezrin Is Associated with Disease Progression in Ovarian Carcinoma. *PloS One*, 11(9), e0162502. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162502>.
- Hou, Z., Xie, L., Yu, L., Qian, X. & Liu, B. (2012) MicroRNA-146a is down-regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 29(2), 886–892. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12032-011-9862-7>.
- Hou, Z., Yin, H., Chen, C., Dai, X., Li, X. & Liu, B. et al. (2012) microRNA-146a targets the L1 cell adhesion molecule and suppresses the metastatic potential of gastric cancer. *Molecular Medicine Reports*, 6(3), 501–506. Available from: <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.946>.
- Hsu, Y.-L., Hung, J.-Y., Chiang, S.-Y., Jian, S.-F., Wu, C.-Y. & Lin, Y.-S. et al. (2016) Lung cancer-derived galectin-1 contributes to cancer associated fibroblast-mediated cancer progression and immune suppression through TDO2/kynurenine axis. *Oncotarget*, 7(19), 27584–27598.
- Hu, S., Wang, L., Liu, N. & Kong, X. (2019) Analysis of L1CAM gene mutation in pedigrees with X-linked genetic hydrocephalus. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*, 36(5), 465–467. Available from: <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2019.05.012>.
- Hua, T., Liu, S., Xin, X., Jin, Z., Liu, Q. & Chi, S. et al. (2016) Prognostic significance of L1 cell adhesion molecule in cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 7(51), 85196–85207. Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13236>.
- Hubbe, M., Kowitz, A., Schirmacher, V., Schachner, M. & Altevogt, P. (1993) L1 adhesion molecule on mouse leukocytes: regulation and involvement in endothelial cell binding. *European Journal of Immunology*, 23(11), 2927–2931. Available from: <https://doi.org/10.1002/eji.1830231130>.
- Hung, G., Colton, J., Fisher, L., Oppenheimer, M., Faudoa, R. & Slattery, W. et al.

- (2002) Immunohistochemistry study of human vestibular nerve schwannoma differentiation. *Glia*, 38(4), 363–370. Available from: <https://doi.org/10.1002/glia.10077>.
- Hurst, D.R., Edmonds, M.D., Scott, G.K., Benz, C.C., Vaidya, K.S. & Welch, D.R. (2009) Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Research*, 69(4), 1279–1283. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3559>.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S. & Kikuchi, A. (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *The EMBO Journal*, 17(5), 1371–1384. Available from: <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1371>.
- Imig, J., Motsch, N., Zhu, J.Y., Barth, S., Okoniewski, M. & Reineke, T. et al. (2011) microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic Acids Research*, 39(5), 1880–1893. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1043>.
- Impey, S., McCorkle, S.R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J.M., Yochum, G.S. & Boss, J.M. et al. (2004) Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*, 119(7), 1041–1054. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.032>.
- Jackson, L.F., Qiu, T.H., Sunnarborg, S.W., Chang, A., Zhang, C. & Patterson, C. et al. (2003) Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *The EMBO Journal*, 22(11), 2704–2716. Available from: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg264>.
- Jang, H.-J., Suh, P.-G., Lee, Y.J., Shin, K.J., Cocco, L. & Chae, Y.C. (2018) PLCγ1: Potential arbitrator of cancer progression. *Advances in Biological Regulation*, 67, 179–189. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.11.003>.
- Jazdzewski, K., Murray, E.L., Franssila, K., Jarzab, B., Schoenberg, D.R. & La Chapelle, A. de (2008) Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(20), 7269–7274. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0802682105>.
- Jiang, T., Sui, D., You, D., Yao, S., Zhang, L. & Wang, Y. et al. (2018) MiR-29a-5p inhibits proliferation and invasion and induces apoptosis in endometrial carcinoma via targeting TPX2. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 17(10), 1268–1278. Available from: <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1475829>.
- Jo, D.H., Lee, K., Kim, J.H., Jun, H.O., Kim, Y. & Cho, Y.-L. et al. (2017) L1 increases adhesion-mediated proliferation and chemoresistance of retinoblastoma. *Oncotarget*, 8(9), 15441–15452. Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14487>.
- Jong, M.C. de, Kors, W.A., Moll, A.C., Graaf, P. de, Castelijns, J.A. & Jansen, R.W. et al. (2020) Screening for Pineal Trilateral Retinoblastoma Revisited: A Meta-analysis. *Ophthalmology*, 127(5), 601–607. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.10.040>.
- Jørgensen, K., Skrede, M., Cruciani, V., Mikalsen, S.-O., Slipicevic, A. & Flørenes, V.A. (2005) Phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate promotes anchorage-independent growth and survival of melanomas through MEK-independent activation of ERK1/2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(1), 266–274. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.143>.
- Jouet, M., Strain, L., Bonthron, D. & Kenwrick, S. (1996) Discordant segregation of Xq28 markers and a mutation in the L1 gene in a family with X linked hydrocephalus. *Journal of Medical Genetics*, 33(3), 248–250. Available from:

- <https://doi.org/10.1136/jmg.33.3.248>.
- Kaewkhaw, R. & Rojanaporn, D. (2020) Retinoblastoma: Etiology, Modeling, and Treatment. *Cancers*, 12(8). Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers12082304>.
- Kalus, I., Schnegelsberg, B., Seidah, N.G., Kleene, R. & Schachner, M. (2003) The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10381–10388. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M208351200>.
- Katoh, M. (2016) FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(1), 3–15.
- Katoh, M. & Katoh, M. (2006) FGF signaling network in the gastrointestinal tract (review). *International Journal of Oncology*, 29(1), 163–168.
- Keilhauer, G., Faissner, A. & Schachner, M. (1985) Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature*, 316(6030), 728–730. Available from: <https://doi.org/10.1038/316728a0>.
- Khelifaoui, F., Validire, P., Auperin, A., Quintana, E., Michon, J. & Pacquement, H. et al. (1996) Histopathologic risk factors in retinoblastoma: a retrospective study of 172 patients treated in a single institution. *Cancer*, 77(6), 1206–1213.
- Kiefel, H., Bondong, S., Erbe-Hoffmann, N., Hazin, J., Riedle, S. & Wolf, J. et al. (2010) L1CAM-integrin interaction induces constitutive NF-kappaB activation in pancreatic adenocarcinoma cells by enhancing IL-1beta expression. *Oncogene*, 29(34), 4766–4778. Available from: <https://doi.org/10.1038/onc.2010.230>.
- Kiefel, H., Bondong, S., Hazin, J., Ridinger, J., Schirmer, U. & Riedle, S. et al. (2012) L1CAM: a major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adhesion & Migration*, 6(4), 374–384. Available from: <https://doi.org/10.4161/cam.20832>.
- Kiefel, H., Pfeifer, M., Bondong, S., Hazin, J. & Altevogt, P. (2011) Linking L1CAM-mediated signaling to NF-kB activation. *Trends in Molecular Medicine*, 17(4), 178–187. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.11.005>.
- Kim, H., Hwang, H., Lee, H. & Hong, H.J. (2017) L1 Cell Adhesion Molecule Promotes Migration and Invasion via JNK Activation in Extrahepatic Cholangiocarcinoma Cells with Activating KRAS Mutation. *Molecules and Cells*, 40(5), 363–370. Available from: <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2282>.
- Kivelä, T. (2009) The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: retinoblastoma, an issue of birth and death. *The British Journal of Ophthalmology*, 93(9), 1129–1131. Available from: <https://doi.org/10.1136/bjo.2008.150292>.
- Knudson, A.G., JR (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(4), 820–823. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820>.
- Kogo, R., Mimori, K., Tanaka, F., Komune, S. & Mori, M. (2011) Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(13), 4277–4284. Available from: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2866>.
- Kohutek, Z.A., diPierro, C.G., Redpath, G.T. & Hussaini, I.M. (2009) ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(14), 4605–4615. Available from: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5126-08.2009>.
- Kostas, M., Lampart, A., Bober, J., Wiedlocha, A., Tomala, J. & Krowarsch, D. et al. (2018) Translocation of Exogenous FGF1 and FGF2 Protects the Cell against

- Apoptosis Independently of Receptor Activation. *Journal of Molecular Biology*, 430(21), 4087–4101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.08.004>.
- Kück, U. & Bunse, A. (2005) *Praktikum der Molekulargenetik: Mit 40 Tabellen*. Springer: Berlin.
- Labanca, E., Vazquez, E.S., Corn, P.G., Roberts, J.M., Wang, F. & Logothetis, C.J. et al. (2020) Fibroblast growth factors signaling in bone metastasis. *Endocrine-Related Cancer*, 27(7), R255-R265. Available from: <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0472>.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. Available from: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lai, E.C. (2003) microRNAs: runts of the genome assert themselves. *Current Biology : CB*, 13(23), R925-36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.11.017>.
- Lalande, M., Dryja, T.P., Schreck, R.R., Shipley, J., Flint, A. & Latt, S.A. (1984) Isolation of human chromosome 13-specific DNA sequences cloned from flow sorted chromosomes and potentially linked to the retinoblastoma locus. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 13(4), 283–295. Available from: [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(84\)90073-6](https://doi.org/10.1016/0165-4608(84)90073-6).
- Lattanzio, R., Iezzi, M., Sala, G., Tinari, N., Falasca, M. & Alberti, S. et al. (2019) PLC-gamma-1 phosphorylation status is prognostic of metastatic risk in patients with early-stage Luminal-A and -B breast cancer subtypes. *BMC Cancer*, 19(1), 747.
- Lattanzio, R., Piantelli, M. & Falasca, M. (2013) Role of phospholipase C in cell invasion and metastasis. *Advances in Biological Regulation*, 53(3), 309–318. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2013.07.006>.
- Le Gall, S.M., Marezky, T., Issuree, P.D.A., Niu, X.-D., Reiss, K. & Saftig, P. et al. (2010) ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 22), 3913–3922. Available from: <https://doi.org/10.1242/jcs.069997>.
- Leiphrakpam, P.D., Rajput, A., Mathiesen, M., Agarwal, E., Lazenby, A.J. & Are, C. et al. (2014) Ezrin expression and cell survival regulation in colorectal cancer. *Cellular Signalling*, 26(5), 868–879. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.014>.
- Lemmon, M.A. & Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>.
- Li, Y. & Galileo, D.S. (2010) Soluble L1CAM promotes breast cancer cell adhesion and migration in vitro, but not invasion. *Cancer Cell International*, 10, 34. Available from: <https://doi.org/10.1186/1475-2867-10-34>.
- Li, Y., Vandenboom, T.G., Wang, Z., Kong, D., Ali, S. & Philip, P.A. et al. (2010) miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 70(4), 1486–1495. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2792>.
- Lin, S.-L., Chiang, A., Chang, D. & Ying, S.-Y. (2008) Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(3), 417–424. Available from: <https://doi.org/10.1261/rna.874808>.
- Lindenblatt, D., Terraneo, N., Pellegrini, G., Cohrs, S., Spycher, P.R. & Vukovic, D. et al. (2018) Combination of lutetium-177 labelled anti-L1CAM antibody chCE7 with the clinically relevant protein kinase inhibitor MK1775: a novel combination against human ovarian carcinoma. *BMC Cancer*, 18(1), 922. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4836-1>.
- Lindner, J., Rathjen, F.G. & Schachner, M. (1983) L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature*, 305(5933), 427–430. Available from: <https://doi.org/10.1038/305427a0>.
- Liu, C.-Y., Lin, H.-H., Tang, M.-J. & Wang, Y.-K. (2015) Vimentin contributes to

- epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, 6(18), 15966–15983. Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3862>.
- Liu, X.-M., Li, X.-F. & Li, J.-C. (2020) MiR-146a functions as a potential tumor suppressor in retinoblastoma by negatively regulate neuro-oncological ventral antigen-1. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. Available from: <https://doi.org/10.1002/kjm2.12337>.
- Loers, G. & Schachner, M. (2007) Recognition molecules and neural repair. *Journal of Neurochemistry*, 101(4), 865–882. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04409.x>.
- Logan, C.Y. & Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 781–810.
- Loh, C.-Y., Chai, J.Y., Tang, T.F., Wong, W.F., Sethi, G. & Shanmugam, M.K. et al. (2019) The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*, 8(10). Available from: <https://doi.org/10.3390/cells8101118>.
- Long, K.E., Asou, H., Snider, M.D. & Lemmon, V. (2001) The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 1285–1290. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M006658200>.
- Lorenzen, I., Lokau, J., Korpys, Y., Oldefest, M., Flynn, C.M. & Künzel, U. et al. (2016) Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. *Scientific Reports*, 6, 35067. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep35067>.
- Lottspeich, F. & Engels, J.W. (Eds.) (2012) *Bioanalytik*, 3rd edition. Springer Spektrum: Berlin, Heidelberg.
- Lu, X., Fu, H., Chen, R., Wang, Y., Zhan, Y. & Song, G. et al. (2020) Phosphoinositide specific phospholipase Cy1 inhibition-driven autophagy caused cell death in human lung adenocarcinoma A549 cells in vivo and in vitro. *International Journal of Biological Sciences*, 16(8), 1427–1440.
- Luk, H.-M., Wang, D.-Y., Xie, L.-L., Liu, X.-Y., Xu, G.-C. & Lu, H.-W. (2020) Expression and clinical significance of Gal-3 and NFκB pathway-related factors in epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 13(5), 1197–1205.
- Lutz, D., Wolters-Eisfeld, G., Joshi, G., Djogo, N., Jakovcevski, I. & Schachner, M. et al. (2012) Generation and nuclear translocation of sumoylated transmembrane fragment of cell adhesion molecule L1. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(21), 17161–17175. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346759>.
- Lv, X., Li, Y., Qian, M., Ma, C., Jing, H. & Wen, Z. et al. (2014) ADAM17 silencing suppresses the migration and invasion of non-small cell lung cancer. *Molecular Medicine Reports*, 9(5), 1935–1940. Available from: <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2029>.
- Madreperla, S.A., Bookstein, R., Jones, O.W. & Lee, W.H. (1991) Retinoblastoma cell lines Y79, RB355 and WERI-Rb27 are genetically related. *Ophthalmic Paediatrics and Genetics*, 12(1), 49–56. Available from: <https://doi.org/10.3109/13816819109023085>.
- Magrath, I., Abramson, D.H. & Ellsworth, R.M. (1989) Optic nerve involvement in retinoblastoma. *Ophthalmology*, 96(2), 217–222. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(89\)32910-1](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(89)32910-1).
- Maness, P.F. & Schachner, M. (2007) Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature Neuroscience*, 10(1), 19–26. Available from:

- <https://doi.org/10.1038/n1827>.
- Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C. & Hartmann, D. et al. (2005) L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Molecular and Cellular Biology*, 25(20), 9040–9053. Available from: <https://doi.org/10.1128/MCB.25.20.9040-9053.2005>.
- McEvoy, J., Flores-Otero, J., Zhang, J., Nemeth, K., Brennan, R. & Bradley, C. et al. (2011) Coexpression of normally incompatible developmental pathways in retinoblastoma genesis. *Cancer Cell*, 20(2), 260–275. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.005>.
- McFall, R.C., Sery, T.W. & Makadon, M. (1977) Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. *Cancer Research*, 37(4), 1003–1010.
- McGowan, P.M., McKiernan, E., Bolster, F., Ryan, B.M., Hill, A.D.K. & McDermott, E.W. et al. (2008) ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 19(6), 1075–1081. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm609>.
- McLean, I.W., U.S. & Universities Associated for Research and Education in Pathology (1994) *Tumors of the Eye and Ocular Adnexa*. Armed Forces Institute of Pathology.
- Means, A.L. (2019) PYK2 at the Intersection of Signaling Pathways in Pancreatic Cancer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 8(4), 651–652. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.08.007>.
- Mechtersheimer, S., Gutwein, P., Agmon-Levin, N., Stoeck, A., Oleszewski, M. & Riedle, S. et al. (2001) Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *The Journal of Cell Biology*, 155(4), 661–673. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.200101099>.
- Mei, J., Bachoo, R. & Zhang, C.-L. (2011) MicroRNA-146a inhibits glioma development by targeting Notch1. *Molecular and Cellular Biology*, 31(17), 3584–3592. Available from: <https://doi.org/10.1128/MCB.05821-11>.
- Meng, X., Hu, B., Hossain, M.M., Chen, G., Sun, Y. & Zhang, X. (2016) ADAM17-siRNA inhibits MCF-7 breast cancer through EGFR-PI3K-AKT activation. *International Journal of Oncology*, 49(2), 682–690. Available from: <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3536>.
- Mochizuki, S., Ao, T., Sugiura, T., Yonemura, K., Shiraishi, T. & Kajiwara, Y. et al. (2020) Expression and Function of a Disintegrin and Metalloproteinases in Cancer-Associated Fibroblasts of Colorectal Cancer. *Digestion*, 101(1), 18–24. Available from: <https://doi.org/10.1159/000504087>.
- Moerlooze, L. de, Spencer-Dene, B., Revest, J.M., Hajihosseini, M., Rosewell, I. & Dickson, C. (2000) An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 127(3), 483–492.
- Mohan, V., Temburni, M.K., Kappes, J.C. & Galileo, D.S. (2013) L1CAM stimulates glioma cell motility and proliferation through the fibroblast growth factor receptor. *Clinical & Experimental Metastasis*, 30(4), 507–520. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9555-4>.
- Moos, M., Tacke, R., Scherer, H., Teplow, D., Früh, K. & Schachner, M. (1988) Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature*, 334(6184), 701–703. Available from: <https://doi.org/10.1038/334701a0>.
- Morgan, G. (1971) Diffuse infiltrating retinoblastoma. *The British Journal of Ophthalmology*, 55(9), 600–606. Available from:

- <https://doi.org/10.1136/bjo.55.9.600>.
- Munier, F.L., Beck-Popovic, M., Chantada, G.L., Cobrinik, D., Kivelä, T.T. & Lohmann, D. et al. (2019) Conservative management of retinoblastoma: Challenging orthodoxy without compromising the state of metastatic grace. "Alive, with good vision and no comorbidity". *Progress in Retinal and Eye Research*, 73, 100764. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.05.005>.
- Na'ara, S., Amit, M. & Gil, Z. (2019) L1CAM induces perineural invasion of pancreas cancer cells by upregulation of metalloproteinase expression. *Oncogene*, 38(4), 596–608. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0458-y>.
- Nagi, C., Guttman, M., Jaffer, S., Qiao, R., Keren, R. & Triana, A. et al. (2005) N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant--invasive micropapillary carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, 94(3), 225–235. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10549-005-7727-5>.
- Nakajima, S., Doi, R., Toyoda, E., Tsuji, S., Wada, M. & Koizumi, M. et al. (2004) N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(12 Pt 1), 4125–4133. Available from: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0578-03>.
- Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S. & Calin, G.A. (2009) MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 293–302. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrc2619>.
- Osta, W.A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M. & Hannun, Y.A. et al. (2004) EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Research*, 64(16), 5818–5824. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0754>.
- Pace, K.R., Dutt, R. & Galileo, D.S. (2019) Exosomal L1CAM Stimulates Glioblastoma Cell Motility, Proliferation, and Invasiveness. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16). Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms20163982>.
- Paik, J.H., Jang, J.-Y., Jeon, Y.K., Kim, W.Y., Kim, T.M. & Heo, D.S. et al. (2011) MicroRNA-146a downregulates NFκB activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(14), 4761–4771. Available from: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0494>.
- Pajovic, S., Corson, T.W., Spencer, C., Dimaras, H., Orlic-Milacic, M. & Marchong, M.N. et al. (2011) The TAg-RB murine retinoblastoma cell of origin has immunohistochemical features of differentiated Muller glia with progenitor properties. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(10), 7618–7624. Available from: <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7989>.
- Pan, Y., Han, C., Wang, C., Hu, G., Luo, C. & Gan, X. et al. (2012) ADAM10 promotes pituitary adenoma cell migration by regulating cleavage of CD44 and L1. *Journal of Molecular Endocrinology*, 49(1), 21–33. Available from: <https://doi.org/10.1530/JME-11-0174>.
- Pasanen, A., Loukovaara, M., Tuomi, T. & Bützow, R. (2017) Preoperative Risk Stratification of Endometrial Carcinoma: L1CAM as a Biomarker. *International Journal of Gynecological Cancer : Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, 27(7), 1318–1324. Available from: <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000001043>.
- Patel, M., Horgan, P.G., McMillan, D.C. & Edwards, J. (2018) NF-κB pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Translational Research : the*

- Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 197, 43–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.02.002>.
- Pavlidou, E., Burris, C., Thaug, C., Scheimberg, I., Kingston, J. & Hungerford, J.L. et al. (2015) Anterior Segment Seeding in Eyes With Retinoblastoma Failing to Respond to Intraocular Artery Chemotherapy. *JAMA Ophthalmology*, 133(12), 1455–1458. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.2861>.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W. & Lee, D.C. et al. (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5392), 1281–1284. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1281>.
- Peskin, A.V. & Winterbourn, C.C. (2000) A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 293(1-2), 157–166. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(99\)00246-6](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(99)00246-6).
- Probstmeier, R., Montag, D. & Schachner, M. (1995) Galectin-3, a beta-galactoside-binding animal lectin, binds to neural recognition molecules. *Journal of Neurochemistry*, 64(6), 2465–2472. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64062465.x>.
- Provenzale, J.M., Weber, A.L., Klintworth, G.K. & McLendon, R.E. (1995) Radiologic-pathologic correlation. Bilateral retinoblastoma with coexistent pinealoblastoma (trilateral retinoblastoma). *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 16(1), 157–165.
- Rached, J., Nasr, Z., Abdallah, J. & Abou-Antoun, T. (2016) L1-CAM knock-down radiosensitizes neuroblastoma IMR-32 cells by simultaneously decreasing MycN, but increasing PTEN protein expression. *International Journal of Oncology*, 49(4), 1722–1730. Available from: <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3625>.
- Rathjen, F.G. & Schachner, M. (1984) Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *The EMBO Journal*, 3(1), 1–10.
- Reid, T.W., Albert, D.M., Rabson, A.S., Russell, P., Craft, J. & Chu, E.W. et al. (1974) Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(2), 347–360. Available from: <https://doi.org/10.1093/jnci/53.2.347>.
- Ribatti, D. (2014) The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Experimental Cell Research*, 328(2), 314–324. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.06.010>.
- Ribatti, D. (2016) The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mechanisms of Development*, 141, 70–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.05.003>.
- Ribatti, D. (2021) The CAM assay in the study of the metastatic process. *Experimental Cell Research*, 400(2), 112510. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112510>.
- Ribatti, D., Annese, T. & Tamma, R. (2020) The use of the chick embryo CAM assay in the study of angiogenic activity of biomaterials. *Microvascular Research*, 131, 104026. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104026>.
- Riedle, S., Kiefel, H., Gast, D., Bondong, S., Wolterink, S. & Gutwein, P. et al. (2009) Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *The Biochemical Journal*, 420(3), 391–402. Available from: <https://doi.org/10.1042/BJ20081625>.
- Roberts, C.M., Tran, M.A., Pitruzzello, M.C., Wen, W., Loeza, J. & Dellinger, T.H. et al. (2016) TWIST1 drives cisplatin resistance and cell survival in an ovarian cancer

- model, via upregulation of GAS6, L1CAM, and Akt signalling. *Scientific Reports*, 6, 37652. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep37652>.
- Rodriguez-Galindo, C., Chantada, G.L., Haik, B.G. & Wilson, M.W. (2007) Treatment of retinoblastoma: current status and future perspectives. *Current Treatment Options in Neurology*, 9(4), 294–307. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11940-007-0015-4>.
- Roginskaya, V., Zuo, S., Caudell, E., Nambudiri, G., Kraker, A.J. & Corey, S.J. (1999) Therapeutic targeting of Src-kinase Lyn in myeloid leukemic cell growth. *Leukemia*, 13(6), 855–861. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401429>.
- Rushlow, D.E., Mol, B.M., Kennett, J.Y., Yee, S., Pajovic, S. & Thériault, B.L. et al. (2013) Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: genomic, gene expression, and clinical studies. *The Lancet. Oncology*, 14(4), 327–334. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70045-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70045-7).
- Rusnati, M., Dell'Era, P., Urbinati, C., Tanghetti, E., Massardi, M.L. & Nagamine, Y. et al. (1996) A distinct basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGF receptor interaction distinguishes urokinase-type plasminogen activator induction from mitogenicity in endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 7(3), 369–381. Available from: <https://doi.org/10.1091/mbc.7.3.369>.
- Saad, M.I., McLeod, L., Yu, L., Ebi, H., Ruwanpura, S. & Sagi, I. et al. (2020) The ADAM17 protease promotes tobacco smoke carcinogen-induced lung tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 41(4), 527–538. Available from: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz123>.
- Saad, M.I., Rose-John, S. & Jenkins, B.J. (2019) ADAM17: An Emerging Therapeutic Target for Lung Cancer. *Cancers*, 11(9). Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers11091218>.
- Samatov, T.R., Wicklein, D. & Tonevitsky, A.G. (2016) L1CAM: Cell adhesion and more. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 51(2), 25–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2016.05.001>.
- Sastre, X., Chantada, G.L., Doz, F., Wilson, M.W., de Davila, Maria T G & Rodríguez-Galindo, C. et al. (2009) Proceedings of the consensus meetings from the International Retinoblastoma Staging Working Group on the pathology guidelines for the examination of enucleated eyes and evaluation of prognostic risk factors in retinoblastoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133(8), 1199–1202. Available from: <https://doi.org/10.1043/1543-2165-133.8.1199>.
- Schachner, M. (1997) Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(5), 627–634. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(97\)80115-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(97)80115-9).
- Schaefer, A.W., Kamiguchi, H., Wong, E.V., Beach, C.M., Landreth, G. & Lemmon, V. (1999) Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 37965–37973. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.37965>.
- Schäfer, M.K.E. & Altevogt, P. (2010) L1CAM malfunction in the nervous system and human carcinomas. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 67(14), 2425–2437. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0339-1>.
- Schild, S.E., Scheithauer, B.W., Schomberg, P.J., Hook, C.C., Kelly, P.J. & Frick, L. et al. (1993) Pineal parenchymal tumors. Clinical, pathologic, and therapeutic aspects. *Cancer*, 72(3), 870–880. Available from: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930801\)72:3<870::aid-cnrc2820720336>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930801)72:3<870::aid-cnrc2820720336>3.0.co;2-x).
- Schirmer, U., Doberstein, K., Rupp, A.-K., Bretz, N.P., Wuttig, D. & Kiefel, H. et al. (2014) Role of miR-34a as a suppressor of L1CAM in endometrial carcinoma. *Oncotarget*, 5(2), 462–472. Available from:

- <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1552>.
- Schmid, R.S., Pruitt, W.M. & Maness, P.F. (2000) A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), 4177–4188. Available from: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04177.2000>.
- Scholz, F., Schulte, A., Adamski, F., Hundhausen, C., Mittag, J. & Schwarz, A. et al. (2007) Constitutive expression and regulated release of the transmembrane chemokine CXCL16 in human and murine skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(6), 1444–1455. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700751>.
- Schumacher, N. & Rose-John, S. (2019) ADAM17 Activity and IL-6 Trans-Signaling in Inflammation and Cancer. *Cancers*, 11(11). Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers11111736>.
- Sebens Mürköster, S., Kötteritzsch, J., Geismann, C., Gast, D., Kruse, M.-L. & Altevogt, P. et al. (2009) alpha5-integrin is crucial for L1CAM-mediated chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma. *International Journal of Oncology*, 34(1), 243–253.
- Sebens Mürköster, S., Werbing, V., Sipos, B., Debus, M.A., Witt, M. & Grossmann, M. et al. (2007) Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 26(19), 2759–2768. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210076>.
- Sellers, W.R. & Kaelin, W.G., JR (1997) Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 15(11), 3301–3312. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.11.3301>.
- Seven, M., Karatas, O.F., Duz, M.B. & Ozen, M. (2014) The role of miRNAs in cancer: from pathogenesis to therapeutic implications. *Future Oncology (London, England)*, 10(6), 1027–1048. Available from: <https://doi.org/10.2217/fon.13.259>.
- Sevli, S., Uzumcu, A., Solak, M., Ittmann, M. & Ozen, M. (2010) The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 13(3), 208–217. Available from: <https://doi.org/10.1038/pcan.2010.21>.
- Shen, H., Li, L., Zhou, S., Yu, D., Yang, S. & Chen, X. et al. (2016) The role of ADAM17 in tumorigenesis and progression of breast cancer. *Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5418-y>.
- Shen, T. & Guo, Q. (2018) Role of Pyk2 in Human Cancers. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 24, 8172–8182.
- Shields, C.L., Honavar, S.G., Shields, J.A., Demirci, H., Meadows, A.T. & Naduvilath, T.J. (2002) Factors predictive of recurrence of retinal tumors, vitreous seeds, and subretinal seeds following chemoreduction for retinoblastoma. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 120(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11934319/>.
- Shields, C.L., Lally, S.E., Leahey, A.M., Jabbour, P.M., Caywood, E.H. & Schwendeman, R. et al. (2014) Targeted retinoblastoma management: when to use intravenous, intra-arterial, periocular, and intravitreal chemotherapy. *Current Opinion in Ophthalmology*, 25(5), 374–385. Available from:

- <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000091>.
- Shields, C.L. & Shields, J.A. (2004) Diagnosis and management of retinoblastoma. *Cancer Control : Journal of the Moffitt Cancer Center*, 11(5), 317–327. Available from: <https://doi.org/10.1177/107327480401100506>.
- Shields, C.L. & Shields, J.A. (2006) Basic understanding of current classification and management of retinoblastoma. *Current Opinion in Ophthalmology*, 17(3), 228–234. Available from: <https://doi.org/10.1097/01.icu.0000193079.55240.18>.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Fukumori, T., Tsutsumi, S., Okada, K. & Hogan, V. et al. (2005) Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Research*, 65(9), 3535–3537. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0104>.
- Shkurnikov, M.Y., Knyazev, E.N., Wicklein, D., Schumacher, U., Samatov, T.R. & Tonevitskii, A.G. (2016) Role of L1CAM in the Regulation of the Canonical Wnt Pathway and Class I MAGE Genes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 160(6), 807–810.
- Shtutman, M., Levina, E., Ohouo, P., Baig, M. & 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 Research*, 66(23), 11370–11380. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2106>.
- Singh, H.P., Wang, S., Stachelek, K., Lee, S., Reid, M.W. & Thornton, M.E. et al. (2018) Developmental stage-specific proliferation and retinoblastoma genesis in RB-deficient human but not mouse cone precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(40), E9391-E9400. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1808903115>.
- Slack, F.J. & Chinnaiyan, A.M. (2019) The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell*, 179(5), 1033–1055. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.017>.
- Sokolova, O. & Naumann, M. (2017) NF- κ B Signaling in Gastric Cancer. *Toxins*, 9(4). Available from: <https://doi.org/10.3390/toxins9040119>.
- Song, Y., Ma, X., Zhang, M., Wang, M., Wang, G. & Ye, Y. et al. (2020) Ezrin Mediates Invasion and Metastasis in Tumorigenesis: A Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 588801. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.588801>.
- Soond, S.M., Everson, B., Riches, D.W.H. & Murphy, G. (2005) ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 11), 2371–2380. Available from: <https://doi.org/10.1242/jcs.02357>.
- Spruck, C., Sun, D., Fiegl, H., Marth, C., Mueller-Holzner, E. & Goebel, G. et al. (2006) Detection of low molecular weight derivatives of cyclin E1 is a function of cyclin E1 protein levels in breast cancer. *Cancer Research*, 66(14), 7355–7360. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3240>.
- Stannard, C., Lipper, S., Sealy, R. & Sevel, D. (1979) Retinoblastoma: correlation of invasion of the optic nerve and choroid with prognosis and metastases. *The British Journal of Ophthalmology*, 63(8), 560–570. Available from: <https://doi.org/10.1136/bjo.63.8.560>.
- Stegmeier, F., Hu, G., Rickles, R.J., Hannon, G.J. & Elledge, S.J. (2005) A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37), 13212–13217. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0506306102>.
- Stoeck, A., Gast, D., Sanderson, M.P., Issa, Y., Gutwein, P. & Altevogt, P. (2007) L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*, 104(2), 461–469. Available from:

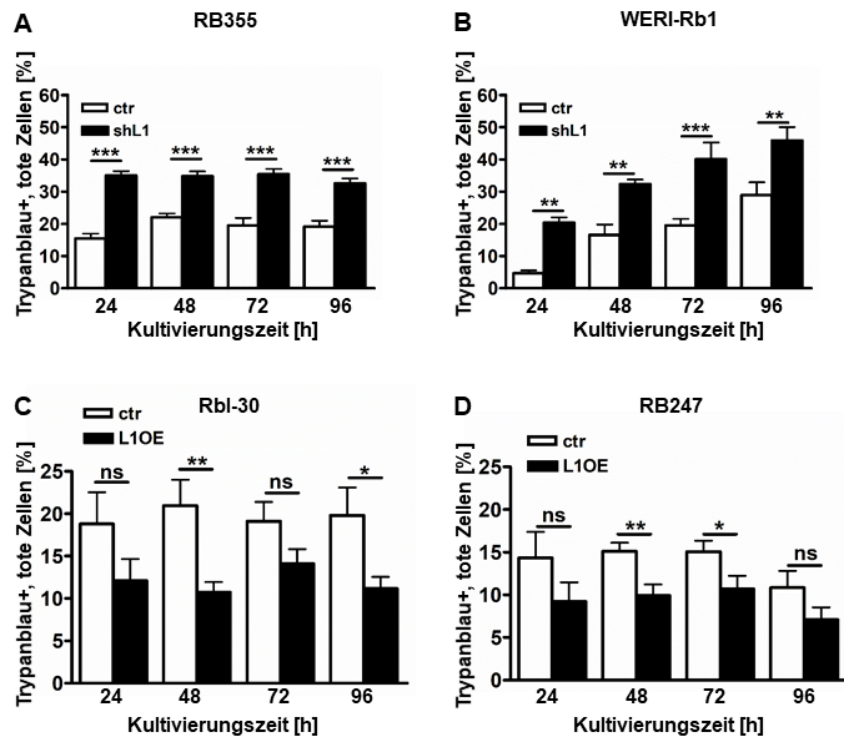
- <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.08.038>.
- Stoeck, A., Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M.P., Runz, S. & Le Naour, F. et al. (2006) A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *The Biochemical Journal*, 393(Pt 3), 609–618. Available from: <https://doi.org/10.1042/BJ20051013>.
- Strekalova, H., Buhmann, C., Kleene, R., Eggers, C., Saffell, J. & Hemperly, J. et al. (2006) Elevated levels of neural recognition molecule L1 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease and other dementia syndromes. *Neurobiology of Aging*, 27(1), 1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.11.013>.
- Sun, C.-C., Li, S.-J., Yuan, Z.-P. & Li, D.-J. (2016) MicroRNA-346 facilitates cell growth and metastasis, and suppresses cell apoptosis in human non-small cell lung cancer by regulation of XPC/ERK/Snail/E-cadherin pathway. *Aging*, 8(10), 2509–2524. Available from: <https://doi.org/10.18632/aging.101080>.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J. & Baltimore, D. (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12481–12486. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>.
- Takenaka, Y., Fukumori, T., Yoshii, T., Oka, N., Inohara, H. & Kim, H.-R.C. et al. (2004) Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Molecular and Cellular Biology*, 24(10), 4395–4406. Available from: <https://doi.org/10.1128/mcb.24.10.4395-4406.2004>.
- Tangen, I.L., Kopperud, R.K., Visser, N.C., Staff, A.C., Tingulstad, S. & Marcickiewicz, J. et al. (2017) Expression of L1CAM in curettage or high L1CAM level in preoperative blood samples predicts lymph node metastases and poor outcome in endometrial cancer patients. *British Journal of Cancer*, 117(6), 840–847. Available from: <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.235>.
- Taniguchi, K. & Karin, M. (2018) NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews. Immunology*, 18(5), 309–324. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>.
- Tchernitsa, O., Kasajima, A., Schäfer, R., Kuban, R.-J., Ungethüm, U. & Györffy, B. et al. (2010) Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression. *The Journal of Pathology*, 222(3), 310–319. Available from: <https://doi.org/10.1002/path.2759>.
- Temming, P., Arendt, M., Viehmann, A., Eisele, L., Le Guin, Claudia H D & Schündeln, M.M. et al. (2017) Incidence of second cancers after radiotherapy and systemic chemotherapy in heritable retinoblastoma survivors: A report from the German reference center. *Pediatric Blood & Cancer*, 64(1), 71–80. Available from: <https://doi.org/10.1002/pbc.26193>.
- Teven, C.M., Farina, E.M., Rivas, J. & Reid, R.R. (2014) Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes & Diseases*, 1(2), 199–213. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.09.005>.
- Thermo-Fischer Scientific (2020) *TaqMan Gene Expression Assay solutions - Proven performance for fast, reliable results*. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/taqman-gex-brochure.pdf> [Accessed August 2020].
- Thiel, K.W. & Carpenter, G. (2006) ErbB-4 and TNF-alpha converting enzyme localization to membrane microdomains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350(3), 629–633. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.095>.
- Thiery, J.P. & Sleeman, J.P. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-

- mesenchymal transitions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(2), 131–142. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrm1835>.
- Thomas, S.M. & Brugge, J.S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13, 513–609. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.513>.
- Tischler, V., Pfeifer, M., Hausladen, S., Schirmer, U., Bonde, A.-K. & Kristiansen, G. et al. (2011) L1CAM protein expression is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer*, 10, 127. Available from: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-127>.
- Tocris Bioscience (2020) *TAPI 1 Supplier* | CAS 163847-77-6 | *TAPI1* | *Tocris Bioscience* [Accessed 22 October 2020].
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>.
- Trietsch, M.D., Oonk, M.H.M., Hawinkels, L.J.A.C., Bor, R., van Eendenburg, J.D.H. & Ivanova, Z. et al. (2016) Prognostic value and clinicopathologic characteristics of L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in a large series of vulvar squamous cell carcinomas. *Oncotarget*, 7(18), 26192–26205. Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8353>.
- Ts'o, M.O., Zimmerman, L.E. & Fine, B.S. (1970) The nature of retinoblastoma. I. Photoreceptor differentiation: a clinical and histopathologic study. *American Journal of Ophthalmology*, 69(3), 339–349. Available from: [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(70\)92263-4](https://doi.org/10.1016/0002-9394(70)92263-4).
- Turner, N. & Grose, R. (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 10(2), 116–129. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrc2780>.
- Uusitalo, M.S., van Quill, K.R., Scott, I.U., Matthay, K.K., Murray, T.G. & O'Brien, J.M. (2001) Evaluation of chemoprophylaxis in patients with unilateral retinoblastoma with high-risk features on histopathologic examination. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 119(1), 41–48.
- van der Maten, M., Reijnen, C., Pijnenborg, J.M.A. & Zegers, M.M. (2019) L1 Cell Adhesion Molecule in Cancer, a Systematic Review on Domain-Specific Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17). Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms20174180>.
- Wachowiak, R., Krause, M., Mayer, S., Peukert, N., Suttikus, A. & Müller, W.C. et al. (2018) Increased L1CAM (CD171) levels are associated with glioblastoma and metastatic brain tumors. *Medicine*, 97(38), e12396. Available from: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000012396>.
- Wang, C., Zhou, X., Ma, L., Zhuang, Y., Wei, Y. & Zhang, L. et al. (2019) Galectin-3 may serve as a marker for poor prognosis in colorectal cancer: A meta-analysis. *Pathology, Research and Practice*, 215(10), 152612. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152612>.
- Wang, J.Y., Knudsen, E.S. & Welch, P.J. (1994) The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Advances in Cancer Research*, 64, 25–85. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60834-9](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60834-9).
- Wang, X., Tang, S., Le, S.-Y., Lu, R., Rader, J.S. & Meyers, C. et al. (2008) Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One*, 3(7), e2557. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002557>.
- Weinspach, D., Seubert, B., Schaten, S., Honert, K., Sebens, S. & Altevogt, P. et al.

- (2014) Role of L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in the metastatic cascade: promotion of dissemination, colonization, and metastatic growth. *Clinical & Experimental Metastasis*, 31(1), 87–100. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10585-013-9613-6>.
- Wen, A.Y., Sakamoto, K.M. & Miller, L.S. (2010) The role of the transcription factor CREB in immune function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(11), 6413–6419. Available from: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001829>.
- Wieland, R. & Havers, W. (2006) Retinoblastome. In: Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeyer, C. & Ritter, J. (Eds.) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, pp. 823–828.
- Wilson, T.R., Longley, D.B. & Johnston, P.G. (2006) Chemoresistance in solid tumours. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 17 Suppl 10, x315-24. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl280>.
- Wong, J.R., Morton, L.M., Tucker, M.A., Abramson, D.H., Seddon, J.M. & Sampson, J.N. et al. (2014) Risk of subsequent malignant neoplasms in long-term hereditary retinoblastoma survivors after chemotherapy and radiotherapy. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(29), 3284–3290. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.7844>.
- Wood, P.M., Schachner, M. & Bunge, R.P. (1990) Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(11), 3635–3645. Available from: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-11-03635.1990>.
- Wynford-Thomas, D. & Williams, E.D. (1986) Use of bromodeoxyuridine for cell kinetic studies in intact animals. *Cell and Tissue Kinetics*, 19(2), 179–182. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1986.tb00728.x>.
- Xi, M. & Tang, W. (2020) Knockdown of Ezrin inhibited migration and invasion of cervical cancer cells in vitro. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 34, 2058738420930899.
- Xiang, Y., Liu, L., Wang, Y., Li, B., Peng, J. & Feng, D. (2020) ADAM17 promotes the invasion of hepatocellular carcinoma via upregulation MMP21. *Cancer Cell International*, 20, 516. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01556-6>.
- Xiao, D., Wang, K., Zhou, J., Cao, H., Deng, Z. & Hu, Y. et al. (2008) Inhibition of fibroblast growth factor 2-induced apoptosis involves survivin expression, protein kinase C alpha activation and subcellular translocation of Smac in human small cell lung cancer cells. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 40(4), 297–303. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00401.x>.
- Xu, X.L., Fang, Y., Lee, T.C., Forrest, D., Gregory-Evans, C. & Almeida, D. et al. (2009) Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell*, 137(6), 1018–1031. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.051>.
- Xu, X.L., Singh, H.P., Wang, L., Qi, D.-L., Poulos, B.K. & Abramson, D.H. et al. (2014) Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours. *Nature*, 514(7522), 385–388. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature13813>.
- Yamanaka, R., Hayano, A. & Takashima, Y. (2019) Trilateral retinoblastoma: A systematic review of 211 cases. *Neurosurgical Review*, 42(1), 39–48. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10143-017-0890-4>.
- Yan, X., Yan, L., Liu, S., Shan, Z., Tian, Y. & Jin, Z. (2015) N-cadherin, a novel prognostic biomarker, drives malignant progression of colorectal cancer. *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 2999–3006. Available from:

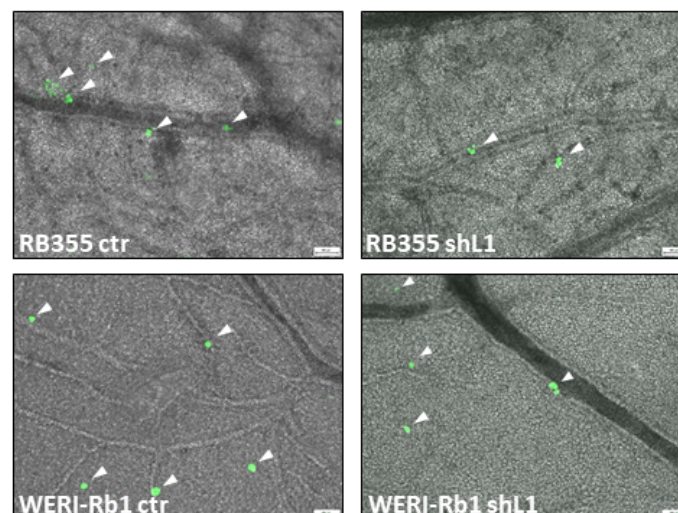
- <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3687>.
- Yang, F., Luo, L.-J., Zhang, L., Wang, D.-D., Yang, S.-J. & Ding, L. et al. (2017) MiR-346 promotes the biological function of breast cancer cells by targeting SRCIN1 and reduces chemosensitivity to docetaxel. *Gene*, 600, 21–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.11.037>.
- Yang, G., Fu, Y., Lu, X., Wang, M., Dong, H. & Li, Q. (2019) miR-34a regulates the chemosensitivity of retinoblastoma cells via modulation of MAGE-A/p53 signaling. *International Journal of Oncology*, 54(1), 177–187. Available from: <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4613>.
- Yousef, Y.A., Soliman, S.E., Astudillo, P.P.P., Durairaj, P., Dimaras, H. & Chan, H.S.L. et al. (2016) Intra-arterial Chemotherapy for Retinoblastoma: A Systematic Review. *JAMA Ophthalmology*, 134(5), 584–591. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.0244>.
- Yun, J., Li, Y., Xu, C.-T. & Pan, B.-R. (2011) Epidemiology and Rb1 gene of retinoblastoma. *International Journal of Ophthalmology*, 4(1), 103–109. Available from: <https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2011.01.24>.
- Zecchini, S., Bianchi, M., Colombo, N., Fasani, R., Goisis, G. & Casadio, C. et al. (2008) The differential role of L1 in ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelium. *Cancer Research*, 68(4), 1110–1118. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2897>.
- Zhao, X., Liu, S., Chen, X., Zhao, J., Li, F. & Zhao, Q. et al. (2021) L1CAM overexpression promotes tumor progression through recruitment of regulatory T cells in esophageal carcinoma. *Cancer Biology & Medicine*. Available from: <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0182>.
- Zhu, X., Dunn, J.M., Goddard, A.D., Squire, J.A., Becker, A. & Phillips, R.A. et al. (1992) Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 59(4), 248–252. Available from: <https://doi.org/10.1159/000133261>.
- Zijlstra, A., Mellor, R., Panzarella, G., Aimes, R.T., Hooper, J.D. & Marchenko, N.D. et al. (2002) A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Research*, 62(23), 7083–7092.
- Zimina, E.P., Bruckner-Tuderman, L. & Franzke, C.-W. (2005) Shedding of collagen XVII ectodomain depends on plasma membrane microenvironment. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34019–34024. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M503751200>.
- Zuo, C., Hong, Y., Qiu, X., Yang, D., Liu, N. & Sheng, X. et al. (2018) Celecoxib suppresses proliferation and metastasis of pancreatic cancer cells by down-regulating STAT3 / NF-κB and L1CAM activities. *Pancreatology : Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et Al.]*, 18(3), 328–333. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pan.2018.02.006>.

Appendix



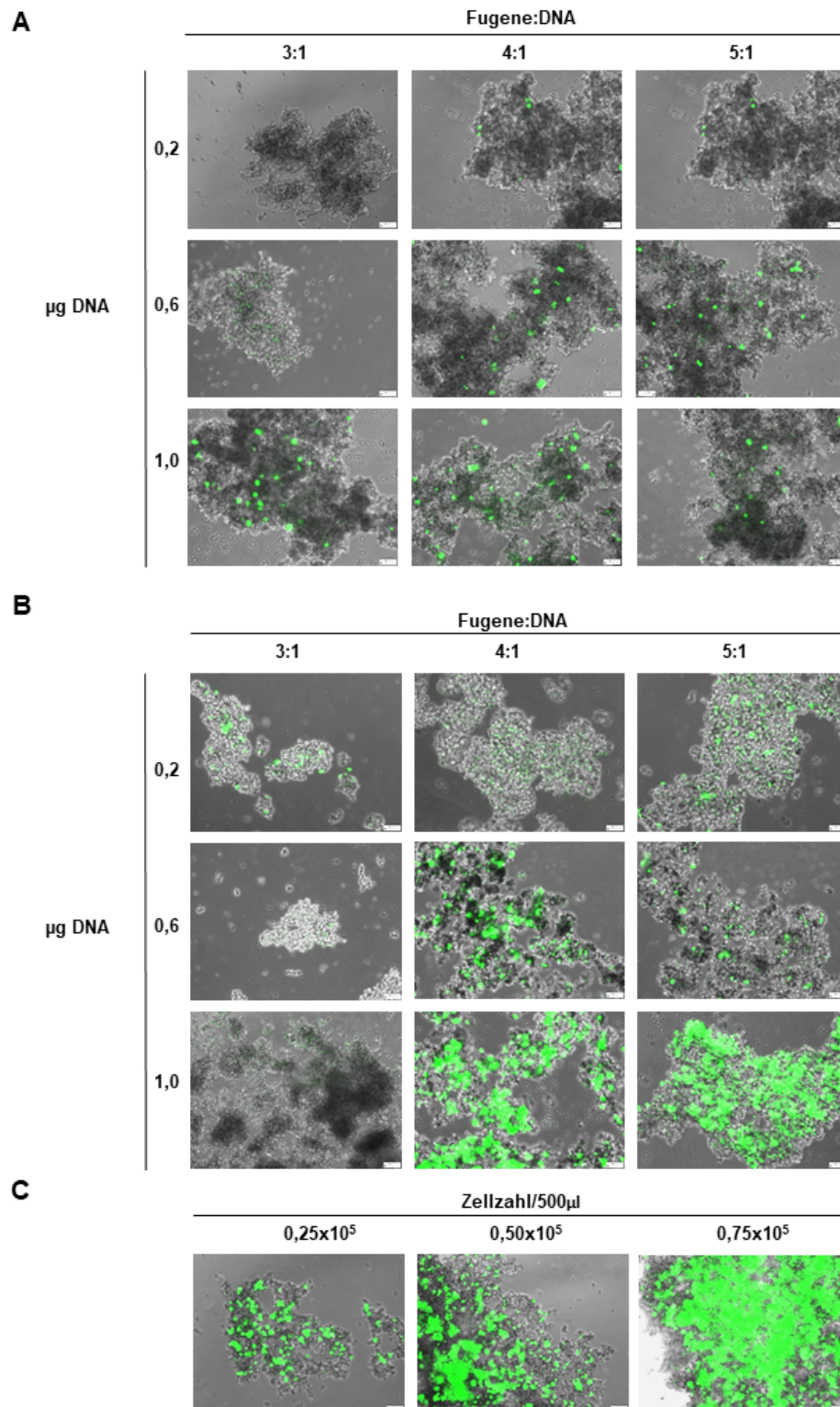
Appendix Abbildung 1: Effekte eines L1CAM *Knockdowns* (shL1) und einer L1CAM Überexpression (L1OE) auf das Zellüberleben verschiedener humaner Retinoblastomzelllinien

Prozentualer Anteil toter Zellen ermittelt durch Trypanblauausschlussfärbung zu unterschiedlichen Zeitpunkten, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Die Balkendiagramme mit Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied ermittelt durch einen unpaarigen studentischen t-Test.



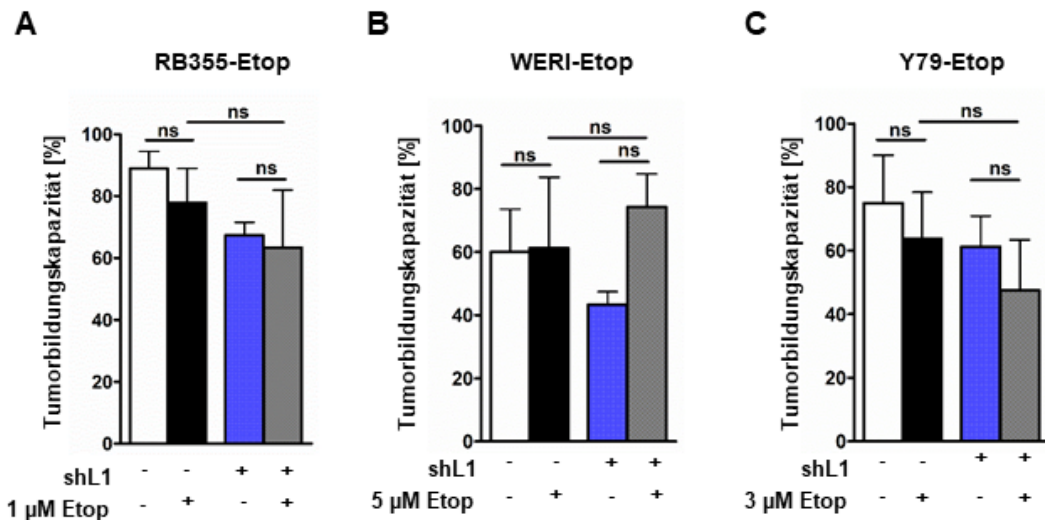
Appendix Abbildung 2: Repräsentative Mikroskopieaufnahmen von grün fluoreszierenden, GFP-markierten RB Zellen in der unteren Chorioallantoismembran.

Repräsentative Mikroskopiebilder von CAM Stanzen nach der CAM-Venen Injektion von RB355-GFP und WERI-GFP RB L1CAM *Knockdown* (shL1) Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen (ctr). Vergrößerung: 100x; Maßstabsbalken: 64 μ m.



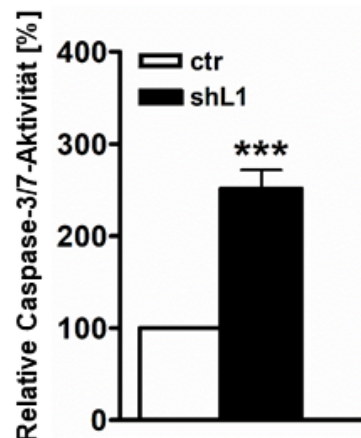
Appendix Abbildung 3: Etablierung der transienten Transfektion von Rbl-30 und RB247 Zellen mit Fugene HD (Promega).

Detektion der GFP Fluoreszenz 72 h nach der Transfektion von Rbl-30 (B) und RB247 Zellen (A, C) mit dem GFP Expressionsplasmid pCS2+_hrGFP zu unterschiedlichen Bedingungen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Maßstabsbalken: 64 µm.



Appendix Abbildung 4: Tumorbildungskapazität von Etoposid-resistenten RB Zellen nach L1CAM *Knockdown* und simultaner Behandlung mit Etoposid.

Der Vergleich der Tumorbildungskapazität der RB355-Etop, WERI-Etop und Y79-Etop Zellen nach L1CAM *Knockdown* (shL1, +) im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln behandelt wurden (shL1, -). Transduzierte RB Zellen wurden mit der jeweiligen Kultivierungskonzentration von Etoposid (Etop, +) behandelt und an Entwicklungstag (E) 10 auf die Chorioallantoismembran (CAM) appliziert. An E17 wurden die Tumore präpariert und die Tumorförmigkeit (Anzahl inokulierter Eier/Anzahl Tumore) bestimmt. Die Balkendiagramme mit Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen. ns $p > 0,05$ statistisch signifikanter Unterschied ermittelt durch den unpaarigen studentischen t-Test.



Appendix Abbildung 5: Caspase-3/7-Aktivität in WERI-Rb1-Zellen nach L1CAM *Knockdown*.

Relative Caspase-3/7 Aktivität nach L1CAM (shL1) *Knockdown* im Vergleich zu WERI-Rb1 Zellen, die mit Kontrollviruspartikeln (ctr) transduziert wurden. Das Balkendiagramm mit Fehlerbalken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchsansätzen *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied ermittelt durch den paarigen studentischen t-Test.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Personen danken, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Einen großen Dank richte ich an erster Stelle an Frau Professorin Dr. rer. nat. Nicole Dünker. Zum einen dafür, dass Sie mir die Chance bot meine Promotion unter ihrer Aufsicht durchzuführen und zum anderen für die Auswahl des spannenden Dissertationsthemas. Zudem danke ich für die unermüdliche Unterstützung während meiner Laborarbeit und die vielen anregenden Diskussionen während der zahlreichen AG Meetings. Sie haben mir mit der Promotion die Möglichkeit gegeben einen tieferen Einblick in das Fach der Neuroanatomie sowie der biomedizinischen Forschung zu bekommen. Darüber hinaus haben Sie einen entscheidenden Teil zur Entwicklung meiner beruflichen Persönlichkeit beigetragen. Dafür bin ich sehr dankbar.

Einen weiteren Dank richte ich an Frau PD Dr. rer. nat. Maike Busch die mit Ihrer unerschütterlichen Geduld so manche Fragen und Irrungen während der Laborarbeit und der Verfassung dieser Dissertation beseitigt hat.

Ein großer Dank richtet sich auch an Dagmar Gioé für die Aufklärung so mancher, verlorengangener Bestellungen und die Organisation wichtiger Formalitäten. Nicht zuletzt danke ich an dieser Stelle Ursula Gerster und Anja Bollmeier für die unermüdliche Arbeit in der Zellkultur sowie die unzähligen cDNA-Synthesen und *Real-time*-PCRs. Ebenso danke ich Natalia Miroschnikov und Annika Hubert für Ihre Unterstützung und motivierenden Gespräche während der Arbeitszeit im Labor und der Pausen. Zudem danke ich Dr. Harald Stephan für die Bereitstellung der RB Zellkulturen und Herrn Prof. Dr. Klaus Metz für die Bereitstellung des RB Probenmaterials.

Während meiner Promotionsphase habe ich durch P. Dräger den besten Rückhalt erhalten, den man sich zum Gelingen eines Vorhabens wie dem Erstellen einer Doktorarbeit vorstellen kann. Vielen Dank für die Ablenkung vom Laboralltag an den Wochenenden, den Urlaubstagen und die stetige Versorgung mit gutem Essen. Ebenso danke ich meinen Eltern, die mir auf dem Lebensweg die nötigen Werkzeuge mitgegeben haben um erfolgreich zu sein und für die Unterstützung in allen Lebenslagen. Ebenso danke ich meinen Freunden, ganz besonders A. Thiele und C. Curdt, die trotz der in den letzten Jahren wenigen gemeinsamen Zeit an unserer Freundschaft festhielten und mich immer motivierend unterstützten.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchungen zur Rolle von L1CAM im Retinoblastom: Expression, Funktion, Prozessierung und Signalwege“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Oliver Dräger, M.Sc. befürworte.

Essen, den _____.

Prof. Dr. rer. nat. Nicole Dünker

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____.

Oliver Dräger, M.Sc.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____.

Oliver Dräger, M. Sc.