

Aus dem Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

der Universität Hamburg

(Direktor: Prof. Dr. med. U. Schumacher)

**Adhäsionsverhalten humaner Melanomzelllinien unter  
physiologischen Scherstress-Bedingungen  
in einem Zellfluss-Modell**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jan Christopher Michaelis

aus Hamburg

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg .

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Professor Schumacher

Prüfungsausschuss, 1. Gutachterin: Prof Brandner

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Coors

Tag der Prüfung: 30.10.2013

## **Inhalt**

1. Abkürzungsverzeichnis:.....	5
2. Fragestellung.....	6
3. Einleitung.....	7
3.1. Das maligne Melanom.....	7
3.2. Prognose.....	7
3.3. Therapie.....	8
3.4. Basismechanismen der Metastasierung.....	9
3.5. Die Zelladhäsionsmoleküle CEACAM1 und L1 .....	10
3.6. Selektine .....	12
3.7. Hyaluronsäure .....	12
4. Material und Methoden .....	14
4.1. Zelllinien .....	14
4.1.1. CEACAM1 <sup>-/-</sup> und L1 <sup>-/-</sup> Knockdown der Zelllinie FemX-I.....	14
4.2. Versuchsaufbau .....	14
4.2.1. Berechnung und Einstellung physiologischer Scherkräfte .....	16
4.3. Zellkultur.....	17
4.3.1. Detektion von Mykoplasmen-Kontamination in der Zellkultur.....	18
4.4. Beschichtung der Microslides mit rekombinanten humanen E-, P-Selektin und Hyaluronsäure.....	18
4.5. Versuchsdurchführung.....	19
4.6. Dokumentation .....	19
4.7. Auswertung.....	20
5. Ergebnisse.....	24
5.1. Einfluss der Scherkräfte.....	24
5.2. Zelllinien FemX-I, LOX und MV3 im Vergleich.....	26
5.3. FemX – Knockdown Zelllinien .....	29
5.4. P-Selektin .....	32
5.5. Vergleich Hyaluronsäure- und E-Selektin Beschichtung .....	32
6. Diskussion .....	36
6.1. Einfluss der Scherkräfte.....	36
6.2. Adhäsion an E- und P-Selektin: FemX-I, LOX und MV3 im Vergleich.....	37
6.3. FemX - Knockdownzelllinien .....	39
6.4. Adhäsionsverhalten von Melanomzellen an Hyaluronsäure.....	40
7. Zusammenfassung .....	43
8. Literaturverzeichnis.....	44

9. Lebenslauf.....	53
10. Erklärung.....	54
10. Danksagung.....	55

## 1. Abkürzungsverzeichnis:

BRAF	B-rapidly accelereated fibrosarcoma
CAM	Cell adhesion molecule
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
DPBS	Dulbecco´s phosphate buffered saline
dsRNA	Doppelstrang RNA
FCS	Fetal calf serum
HA	Hyaluronsäure
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
HPA	Helix pomatia Agglutinin
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ML-I	Mistellektin-I
NONO-NSAID	Nitric oxide (NO)-releasing nonsteroidal anti-inflammation drugs
PBS	Phosphate buffered saline
RHAMM	Receptor for HA-mediated mobility
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA-Interferenz
shRNA	small hairpin RNA
SRK	Signal regulated kinase
UV	ultraviolett
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

## 2. Fragestellung

Vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben nachgewiesen, dass die Expression der Zelladhäsionsmoleküle CEACAM1 und L1 im malignen Melanom positiv mit einer nachfolgenden Metastasierung assoziiert sind (Thies et al., 2002 a, b).

Ziel dieser Arbeit ist es, die funktionelle Bedeutung von CEACAM1 und L1 bei der Adhäsion an das Gefäßendothel weiter zu klären. Hierzu soll das Adhäsionsverhalten verschiedener, bereits auf ihre Glykokonjugatexpression und auf das jeweilige metastatische Potenzial hin charakterisierter humaner Melanomzelllinien mittels Zellflussversuchen untersucht werden. Die Kapillaren im Zellflussversuch werden mit P-Selektin und E-Selektin sowie mit Hyaluronsäure beschichtet und das Adhäsionsverhalten unter unterschiedlichen Scherstressbedingungen computergestützt analysiert. Des Weiteren soll das Adhäsionsverhalten von CEACAM1- und L1- Doppel-knockdown Zelllinien untersucht werden .

Im Speziellen soll geklärt werden:

1. Sind Zellen des malignen Melanoms unter Scherstress in der Lage autonom an Oberflächenmolekülen des Endothels anzuhaften?
2. Welche qualitative Wirkung auf die Adhäsion haben E-Selektin, P-Selektin und Hyaluronsäure auf humane Melanomzellen unter verschiedenen Scherstressbedingungen?
3. Gibt es quantitative Unterschiede in der Wirkung von E-Selektin, P-Selektin und Hyaluronsäure auf das Adhäsionsverhalten?
4. Welche Unterschiede im Adhäsionsverhalten gibt es zwischen den einzelnen Zelllinien? Korreliert dies mit der jeweiligen Expression von Glykokonjugaten?
5. Wie wirkt sich die Herunterregulation von L1 und CEACAM1 (Doppel-Knock-down) in der Zelllinie FEMX-I im Vergleich zur unveränderten Zelllinie aus?

### **3. Einleitung**

#### **3.1. Das maligne Melanom**

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor der pigmentproduzierenden Melanozyten. Aufgrund seines aggressiven Wachstums, seiner ausgeprägten Metastasierungstendenz, seines häufigen Auftretens und seiner sehr schlechten Prognose ist das maligne Melanom Gegenstand der aktuellen dermatologischen Onkologie. Die Inzidenz für das maligne Melanom verdoppelt sich ungefähr alle 10 Jahre (Lens und Dawis, 2004; Jemal et al., 2004; Cole et al., 1996). Das gilt insbesondere für stark sonnenexponierte hellhäutige Bevölkerungsgruppen (Marks und Kopf 1995). Neben UV-Strahlung werden andere Risikofaktoren diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass immunologische Faktoren (aggressive Verläufe bei immunsupprimierten Patienten) sich auf die Tumorausbreitung auswirken (Garbe et al., 2007).

#### **3.2. Prognose**

Der wichtigste Einzelfaktor für die Prognose des malignen Melanoms ist die vertikale Tumordicke nach Breslow gemessen in Millimetern. Bei einer Tumordicke unter 0,75 mm wird das Metastasierungsrisiko als gering eingestuft. Bei Patienten mit Tumordicken über 1,5 mm erwartet man ein hohes Metastasierungsrisiko. Die Prognose gilt allgemein als verschlechtert, wenn sich im Primärtumor Ulzerationen zeigen. Des Weiteren haben die Anzahl der befallenen Lymphknoten, die Tumorlokalisation und das Geschlecht Einfluss auf die Prognose. Patienten mit drei oder mehr befallenen Lymphknoten haben eine signifikant schlechtere Prognose als solche mit nur einem befallenen Lymphknoten. Zusätzlich gilt das Vorhandensein von Mikrometastasen in regionären Wächterlymphknoten als prognosebestimmend für die rezidivfreie Überlebenszeit nach operativer Exzisionsbiopsie. Patienten mit Melanomen am oberen Stamm, am Hals oder am behaarten Kopf und an den Oberarmen haben eine schlechtere Prognose. Männer haben eine signifikant ungünstigere Prognose als Frauen (Gershenwald et al., 1999). Klinische Studien haben ergeben, dass die Heraufregulation bzw. Neoexpression der Glycoconjugate CEACAM1, L1 sowie die Neoexpression HPA- und MLI- bindender Kohlenhydratreste in den Tumorzellen maligner Melanome bedeutende Marker für eine frühzeitige Metastasierung sind (Thies et al., 2002; Thies et al., 2001, Thies et al., 2007).

### 3.3. Therapie

Das maligne Melanom ist im fortgeschrittenen Krankheitsstadium durch seine ausgeprägte Therapieresistenz gekennzeichnet. Die Therapie bei fehlenden Lymphknoten- oder Fernmetastasen besteht in der Exzision des Primärtumors. Als Therapieoption beim metastasierten malignen Melanom steht die Chemo- beziehungsweise Strahlentherapie zur Verfügung, wobei die Strahlentherapie als Primärbehandlung nur bei inoperablen Befunden indiziert ist (Garbe et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass durch Interferon- $\alpha$ -Monotherapie das Sterberisiko nach fünf Jahren um 3% gesenkt wurde. Diese Verlängerung des rezidivfreien Überlebens wird als gering erachtet. Chemotherapeutika werden im Sinne einer Polychemoimmuntherapie mit Zytokinen (IFN bzw. IL2) kombiniert eingesetzt. Das führt im Vergleich zur Monotherapie zu erhöhten Remissionsraten, erhöht aber nicht die Gesamtüberlebenszeit der Patienten (Eton et al., 2002). Zum Einsatz kommt diese Therapie daher nur unter palliativen Aspekten, wie der Minderung tumorbedingter Symptome. Die Therapieresistenz und die steigende Inzidenz des malignen Melanoms machen deutlich, wie wichtig es ist, jeden Teilschritt der Metastasierung zu erforschen, um auf diesen Grundlagen neue rationale Therapieansätze zu finden.

Neue Hoffnungsträger auf dem Gebiet der Melanomtherapie sind die seit 2011 zugelassenen Medikamente Vemurafenib, welches in den Signaltransduktionsweg der BRAFV600E-Kinase eingreift und Ipilimumab, welches immunmodulierend wirkt. Vemurafenib blockiert das Enzym BRAF-V600E-Kinase. Die mutierte BRAF-V600E-Kinase induziert eine exzessive Zellteilung. Die Rate an mutierten BRAF-V600E-Kinasen beim malignen Melanom liegt bei 56% (Sosman et al., 2012). Durch eine Vemurafenib-Therapie konnten Remissionen erzielt werden, die jedoch nicht anhaltend sind. Behandelte Patienten profitieren kurzfristig sehr stark von einer Vemurafenib-Behandlung. Jedoch schließt sich nach einer starken Remission und einer steady-state-Phase von 3-8 Monaten eine extreme Tumorprogression an. Die mittlere Überlebenszeit der BRAF-V600-Kinase positiven Melanompatienten steigt durch eine Vemurafenib – Therapie von 5-8 auf 16 Monate (Sosman et al., 2012; Chapman et al., 2011). Ipilimumab bindet an das Antigen 4 auf zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLA-4). CTLA-4 sorgt bei aktivierten Lymphozyten für eine Bremsung der klonalen Expansion. Durch den CTLA-4-Antikörper wird die Immunreaktion gegen die Zellen des malignen Melanoms aufrecht erhalten. Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit malignen Melanom steigt unter Ipilimumab-Therapie um 4-8 Monate (Hodi et al., 2010). Allerdings folgt auch hier nach kurzfristigen Remissionen eine erneute Tumorprogression. Zusätzlich ist die Therapie von starken Nebenwirkungen begleitet (Fellner, 2012). Ein längerfristiger

therapeutischer Erfolg könnte eventuell erzielt werden, indem die Tumorzellen an der Extravasation gehindert würden oder zumindest die Extravasation verlangsamt würde. Dann könnten die Tumorzellen im Blut mit gezielter zytotoxischer Therapie vernichtet werden. Dies ist der experimentelle Ansatz, der in dieser Arbeit verfolgt wird.

### **3.4. Basismechanismen der Metastasierung**

Die Metastasierungskaskade läuft in sequentiell aufeinanderfolgenden Teilschritten ab, beginnend mit der Loslösung einzelner Tumorzellen von der primären Tumormasse, der Tumorzelldissoziation. Darauf folgt die Tumorinvasion in das umgebende Wirtsbindegewebe. Es folgt die Intravasation und der damit verbundene Überlebenskampf mit den Abwehrzellen des Blutes und der Verteilung im gesamten Blutstrom. Der nächste Schritt ist das Anheften der Tumorzellen an das Gefäßendothel, sowie die Extravasation. Jeder diese Teilschritte muss erfolgreich abgeschlossen sein, damit der nachfolgende Schritt durchlaufen werden kann (Hunter et al., 2008).

#### *Adhäsion*

Die Adhäsion der Tumorzellen an das Gefäßendothel ist ein bedeutender Schritt in der Metastasierungskaskade. Es ist Gegenstand der onkologischen Forschung, die verschiedenen Adhäsions-Moleküle auf Endothelzellen und Zellen des malignen Melanoms zu charakterisieren. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass E- und P- Selektine an dem Prozess beteiligt sind. (Ludwig et al., 2004; Ma et al., 2000). Zudem wurde auf der Oberfläche verschiedener Melanomzelllinien das VLA-4 Integrin ( $\alpha_4\beta_1$ ) nachgewiesen (Johnson et al., 1999). VLA-4 bindet an das vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). VCAM-1 gehört zur Immunglobulin Superfamilie. Es wird durch Entzündung induziert an der Oberfläche von Gefäßendothelien exprimiert (Hemler, 1990; Dagia et al., 2003). Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche VLA-4. Sie können im entzündlichen Gewebe an VCAM-1 haften, das an der Oberfläche des Gefäßendothels exprimiert wird (Springer 1995). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion von VLA-4 und VCAM-1 das Einwandern von humanen Melanomzellen durch entzündlich aktiviertes Endothel erleichtert (Klemke et al., 2007). Melanomzellen sind des Weiteren in der Lage, sich mit Hilfe von Granulozyten aus dem Blutstrom heraus an das Endothel zu heften. Melanomzellen bilden an ihrer Oberfläche das intercellular adhesion molecule (ICAM-1), welches an  $\beta_2$ -Integrine auf der Oberfläche von Granulozyten haftet. Die Granulozyten haben Selektinliganden, mit denen

sie in der Lage sind, an die, in entzündlichen Gefäßendothel exprimierten Selektine zu binden (Liang et al., 2005; Slattery et al., 2003). Studien von Liang und Kollegen (2008) zu Folge unterscheiden sich die Adhäsionsmechanismen des malignen Melanoms bei verschiedenen Scherkräften. Bei geringen ( $0,6 \text{ dyn/cm}^2$ ) Scherkräften wird die Adhäsion über die Bindung von VLA-4 auf der Oberfläche der Melanomzellen und der ICAM-1 auf dem Endothel erreicht. Bei höheren Scherkräften ( $2 \text{ dyn/cm}^2$ ) ist diese Bindung nicht stark genug. Eine Adhäsion wird dann über Granulozyten erreicht, deren  $\beta_2$ -Integrine und Selektin-Liganden an der Oberfläche von entzündlichem Endothel haften. Bei diesem Mechanismus kommt es zu einer Adhäsion zwischen ICAM-1 auf der Melanomzelle und  $\beta_2$ -Integrin auf den Granulozyten (Liang et al., 2008).

### **3.5. Die Zelladhäsionsmoleküle CEACAM1 und L1**

Die Expression der Zelladhäsionsmoleküle CEACAM1 und L1 korreliert mit der Metastasierung in verschiedenen hochaggressiven Tumorentitäten wie dem Kolonkarzinom, dem Ovarialkarzinom, dem Mammakarzinom und dem Melanom (Schröder et al., 2010; Siesser und Meness 2009, Schäfer und Altevogt 2010, Laak et al., 2002, Luo et al., 1999, Thies et al., 2002 a, b). Sie haben sich als Marker in der Bewertung des Metastasierungsrisikos erwiesen. CEACAM1 und L1 werden in benignen melanocytären Nävi nicht exprimiert. Es ist daher anzunehmen, dass sie funktional an der Metastasierung des malignen Melanoms beteiligt sind (Thies et al., 2002 a, b).

CEACAM1 ist ein Molekül der CEA-Genfamilie des CD66 Clusters hochglykosylierter Adhäsionsmoleküle, die der Immunglobulin-Superfamilie angehören (Thompson et al., 1991). Das Molekulargewicht von CEACAM1 wird zu mindestens 35% durch die Glykosylierung bestimmt. CEACAM1 wird im Gastrointestinaltrakt, in der Niere, der Zervix uteri, im Endometrium und der Blase exprimiert (Prall et al., 1996). Seine Expression findet sich hauptsächlich auf Granulozyten. Es wird nachweislich nur auf Lymphozyten bei T-Zell-Leukämien und auf stimulierten T-Lymphozyten exprimiert (Hanenberg et al., 1994; Kamerer et al., 1998). In einer Reihe von epithelialen Tumoren wurde CEACAM1 eine tumorsuppressive Rolle zugeschrieben (Izzi et al., 1999). Eine herunterregulierte Expression von CEACAM1 konnte beim Mammakarzinom (Riethdorf et al., 1997), beim kolorektalen Karzinom (Neumaier et al. 1993), sowie beim Prostatakarzinom (Luo et al., 1999)

nachgewiesen werden. Zudem konnte eine CEACAM1-Expression in Primärtumoren und in Metastasen von malignen Melanomen gezeigt werden. Es besteht ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der Expression von CEACAM1 und dem Risiko der Metastasierung beim malignen Melanom (Thies et al., 2002 a). Anhand von Melanomzellen, bei denen das Molekül CEACAM1 herunterreguliert wurde, soll in dieser Arbeit geklärt werden, ob das erhöhte Metastasierungsrisiko mit dem Adhäsionsverhalten der Melanomzellen assoziiert ist.

Das Zelladhäsionsmolekül L1 gehört ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie (Moos et al., 1988). Es reguliert Zellkommunikationsmechanismen im zentralen und peripheren Nervensystem (Kowitz et al., 1993; Martini, 1994). L1 vermittelt sowohl homotypische als auch heterotypische Zelladhäsion (Kadmon et al., 1990 a, b; Grumet et al., 1993; Grumet und Edelman, 1988). Die Expression von L1 wurde nicht nur in Nervengewebe sondern auch auf Lymphozyten, Granulozyten und Epithelzellen des Intestinal- und Urogenitaltraktes beschrieben (Kowitz et al., 1992; Kujat et al., 1995; Thor et al., 1987). In einem Melanommodell in immundefizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass humane Melanomzelllinien L1 exprimieren und die Expression von L1 als Marker für das Metastasierungsrisiko herangezogen werden kann (Thies et al., 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die humane Melanomzelllinie K1735-M1 L1 exprimiert und in der Lunge disseminiert, während die Melanomzelllinie K1735-C116, die L1 nicht exprimiert, nicht in der Lunge disseminiert (Linnemann et al., 1989). L1 konnte in Primärtumoren und in Metastasen von malignen Melanomen nachgewiesen werden. Es besteht ein positiv signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von L1 und dem Risiko der Metastasierung vom malignen Melanom (Thies et al., 2002 b). Die vorliegende Arbeit soll klären, ob die Zelladhäsionsmoleküle CEACAM1 und L1 funktionell an dem Prozess der Extravasation beteiligt sind und welche Liganden/Moleküle bei diesem Prozess mögliche Bindungspartner sind.

### **3.6. Selektine**

Selektine sind Zelladhäsionsmoleküle, die kalzium-abhängige Zell-zu-Zell-Interaktionen zwischen Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen vermitteln. (Sobolev et al., 2009; Renkonen et al., 2002; Kim et al., 1999; Frenette et al., 1996; Mayadas et al., 1993) Die Selektinfamilie besteht aus drei selektinen, nämlich E-, P- und L-Selektin. E- und P- Selektine werden im Endothel von Blutgefäßen exprimiert, während L-Selektin in Lymphozyten exprimiert wird. P-Selektin wird in Vesikeln gespeichert und nach Stimulation innerhalb von Sekunden in die Zellmembran eingebaut. E-Selektin wird nach Aktivierung durch Zytokine im Rahmen einer Entzündungsreaktion exprimiert, wobei nach 4-6 Stunden der Einbau in die Zellmembran erfolgt. E- und P-Selektine vermitteln die Extravasation von Lymphozyten bei Entzündungsreaktionen. Tumorzellen können diesen Extravasationsweg ebenfalls nutzen (Bird et al., 1997). Deshalb soll überprüft werden, inwieweit die Möglichkeit besteht, über die Selektine in den Metastasierungsprozess einzugreifen. Selektine werden von drei eng miteinander verbundenen Genen innerhalb von 300 kb auf Chromosom 1 bei Mensch und Maus kodiert (McEver et al., 1995; Olofsson et al. 1994; Watson et al., 1990). Für die Selektine sind in unterschiedlichen Tumorentitäten wichtige Rollen in der Metastasierungskaskade nachgewiesen worden (Barthel et al., 2007). Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass E- und P-Selektin defiziente Mäuse, denen subkutan Zellen des Kolonkarzinoms gespritzt wurden, weniger und kleinere Metastasen ausbildeten als die Wildtyp-Mäuse (Köhler et al., 2010). In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Melanomzellen unter Scherstress an E-, und P-Selektine binden.

### **3.7. Hyaluronsäure**

Hyaluronsäure (HA) ist ein Glycosaminglycan. HA ist ein wichtiger integraler Bestandteil der extrazellulären Matrix und kommt ubiquitär in fast allen Gewebearten vor. HA wird von drei speziellen HA-Synthasen in integralen Membranproteinen synthetisiert; HAS1, HAS2 und HAS3. Die HAs werden mittels ABC-Transporter aus der Zelle gebracht (Schulz et al., 2007). Auf HA findet man drei Rezeptoren; CD44, Receptor for HA-mediated mobility (RHAMM) und ICAM-1 (Hiramitsu et al., 2006). HA ist als wichtiger Bestandteil der Extrazellulären Matrix an vielen Prozessen der Tumorprogression, der Neoangiogenese und der Metastasierung von Tumoren beteiligt, wie auch z.B. der Extravasation und der Tumorzellmigration (Toole, 2004). Versuche, bei denen die Hyaluronsäure-Produktion biochemisch beeinflusst wurde, zeigen, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen dem

metastatischen Potenzial und der Hyaluronsäureproduktion beim Mammakarzinom, dem Kolonkarzinom und dem Fibrosarkom (Itano et al., 1999; Kosaki et al., 1999; Li und Heldin, 2001; Liu et al., 2001; Jacobsen et al., 2002). Eine reduzierte Hyaluronsäureproduktion führt beim Melanom zu einer reduzierten Adhäsion, Lokomotion und Lebermetastasierung (Kudo et al., 2004; Yoshihara et al., 2005; Nakazawa et al., 2006). Daher soll auch die Adhäsion von Zellen des malignen Melanoms an HA unter Scherstress untersucht werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die drei humanen malignen Melanomzelllinien FemX-I, LOX und MV3 verwendet.

Die hochmetastatische Zelllinie FemX-I weist eine starke CEACAM1-Expression und eine schwache Expression von L1 auf. Die Zelllinie LOX hat eine geringe L1-Expression und exprimiert CEACAM1 nicht (Thies et al., 2007).

Die Zelllinie MV3 weist eine schwache L1-Expression auf. CEACAM1 wird nicht exprimiert. Im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien hat MV3 das geringste Metastasierungspotenzial.

	FemX-I	LOX	MV3
L1-Expression	+	+	+
CEACAM1-Expression	+++	-	-
Metastasierungspotenzial	+++	++	+

**Tab.1: Zusammenfassende Charakterisierung der verwendeten humanen malignen Melanomzelllinien.**

Tabelle modifiziert nach Thies et al., 2007.

#### 4.1.1. CEACAM1<sup>-/-</sup> und L1<sup>-/-</sup> Knockdown der Zelllinie FemX-I

Die FemX-1- CEACAM<sup>-/-</sup> und FemX-1 L1<sup>-/-</sup> Knockdownzelllinien wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. D. Wicklein zur Verfügung gestellt. Eine genaue Beschreibung der Methodik des Knockdown-Vorgangs findet sich in Wicklein D (2012).

### 4.2. Versuchsaufbau

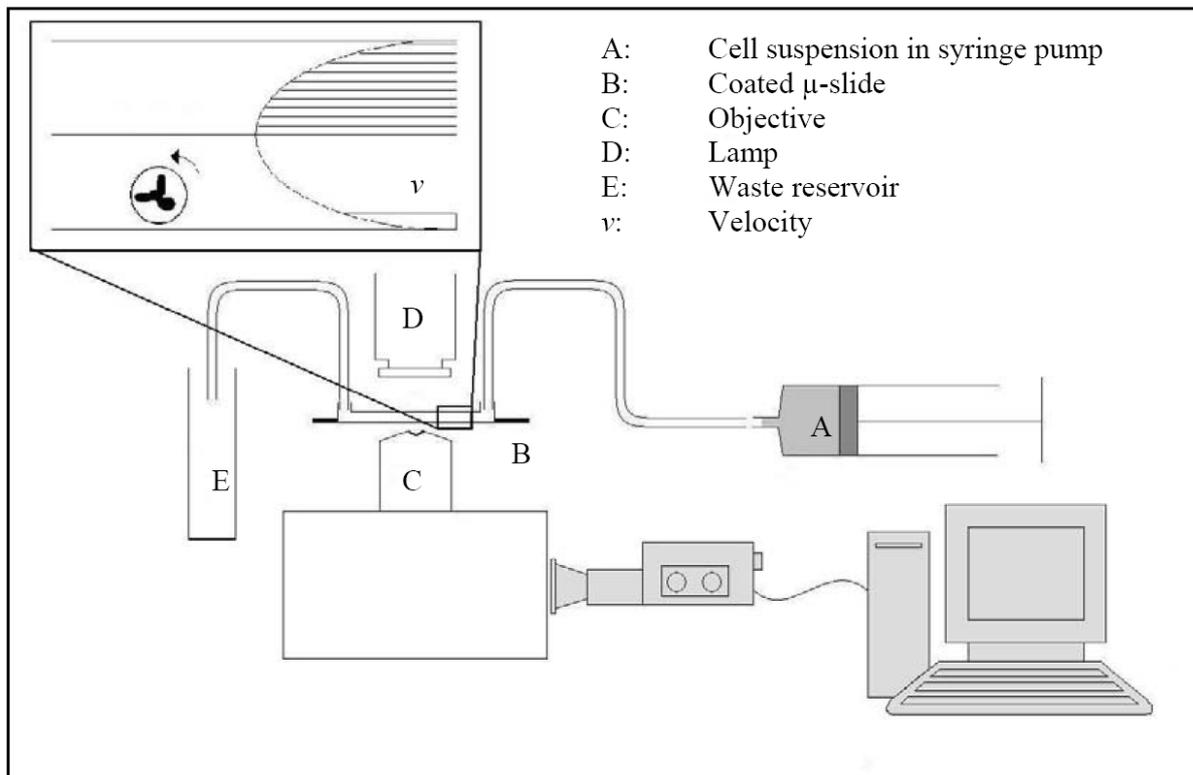
#### *Zellflussversuche*

Die Charakterisierung vom Adhäsionsverhalten unterschiedlicher hämatogener humaner Melanomzelllinien setzt einen Versuchsaufbau voraus, bei dem Melanomzellen unter dynamischen Bedingungen beobachtet werden können. Bei dem vorliegenden

Versuchsaufbau konnten physiologische Scherstressbedingungen simuliert werden. Diese entsprachen denen, die in postkapillären Venolen herrschen (Koutsiaris et al., 2007). Zusätzlich war es möglich, die Interaktionen zwischen den Zellen und dem Gefäßwandendothel sehr genau zu beobachten und zu quantifizieren.

Für die Simulation von Kapillaren wurden IBIDI Microslides IV (ibidi GmbH, D-82152 Martinsried, Germany) verwendet. Diese zeichneten sich dadurch aus, dass sie offene Mikrokapillarröhrchen besaßen, die einen rechteckigen Querschnitt von 0,4 \* 3,8 mm und eine Länge von 50 mm aufwiesen. Die Microslides wurden mit unterschiedlich beschichteten Kapillarröhrchen angeboten. Für die Beschichtung mit E- und P-Selektinen wurde die ibiTreat-Beschichtung gewählt. Für die Beschichtung mit Hyaluronat erwies sich eine Poly-Lysin-Beschichtung am geeignetsten. Die Mikrokapillarröhrchen wurden auf einem Kunststoffobjektträger aufgebracht.

Um die Zellsuspensionen durch die Kapillaren zu perfundieren, wurde eine Perfusorpumpe (kdScientific (Holliston, Massachusetts, USA), Model 100 Series) verwendet. Sie erlaubte mit unterschiedlichen Flussraten verschiedene Scherkräfte zu simulieren. Sie erzeugte in den Kapillaren eine streng laminare Strömung. Mit Hilfe eines inversen Mikroskops (Zeiss Axiovert 200, Zeiss, Oberkochen, Germany) konnte der Flussvorgang am Computerbildschirm verfolgt werden.



**Abbildung 1: Versuchsaufbau zur Durchführung der computergestützten Analyse des Adhäsionsverhaltens der Melanomzellen.** Abbildung modifiziert nach Richter et al., 2011.

#### 4.2.1. Berechnung und Einstellung physiologischer Scherkräfte

Die physiologischen Scherkräfte variieren im menschlichen Körper von  $2,8 \text{ dyn/cm}^2$  in großlumigen postkapillären Venulen bis zu  $95,5 \text{ dyn/cm}^2$  in kleineren Kapillaren. Der Mittelwert für die physiologische Scherkraft liegt bei  $15,4 \text{ dyn/cm}^2$  (Koutsiaris et al., 2007). Da das maligne Melanom sowohl in Gefäßabschnitten des Niederdrucksystems als auch in Gebieten mit höheren Scherkräften metastasiert, wie zum Beispiel im Gehirn, wurden Scherkräfte von  $3,95 \text{ dyn/cm}^2$  bis  $23,84 \text{ dyn/cm}^2$  in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Um mit dem Modell möglichst genau klinische/physiologische Vorgänge widerzuspiegeln, wurden in den Kapillaren physiologische Scherkräfte eingestellt. *In vivo* können Scherkräfte anhand von Zentralgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser mit Hilfe des Hagen-Poiseuillschen Gesetzes berechnet werden. Um diese gewünschten Scherkräfte mit der Perfusorpumpe einzustellen, wurden die Scherkräfte anhand der Navier-Stokes-Gleichung in Flussraten umgerechnet.

$$\tau = \frac{6\phi\eta}{bh^2} \quad \tau = [\text{dyn/cm}^2]$$

$\tau$ : Scherkraft

$\eta$ : Viskosität

$\phi$ : Flussrate

$b$ : Kapillarbrette

$h$ : Kapillarröhe

Die entsprechenden Werte für Kapillarröhe und Kapillarbrette wurden vom Hersteller übernommen. Von dem Nährmedium (RPMI 1640, GIBCO) wurde angenommen, dass es eine Viskosität von  $\eta = 0.01 \frac{\text{dyn}\cdot\text{s}}{\text{cm}^2}$  bei 22°C hat. In den vorliegenden Versuchen wurde mit den Flussraten 10,00 ml/min, 18,5 ml/min und 60,4 ml/min gearbeitet. Die entsprechenden Scherkräfte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Flussrate in ml/min	Scherkraft in dyn/cm <sup>2</sup>
10	3,95
18,5	7,30
60,4	23,84

**Tab.2: Übersicht über die verwendeten Scherkräfte in den Zellflussversuchen.**

### 4.3. Zellkultur

Für die Zellflussversuche wurden die humanen Melanomzelllinien FemX-I, LOX, MV3, sowie die FemX-I Doppel-Knock-Down-Varianten FemX-I CEACAM1<sup>-/-</sup> und FemX-I LI<sup>-/-</sup> verwendet.

Die Zelllinien wurden in RPMI 1640 – Medium + L-Glutamin (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und Penicillin/Streptomycin in einer befeuchteten Atmosphäre bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Für die Verwendung im Versuch wurden die Zellen mit DPBS gespült und für 9 Minuten mit 5 ml Cell Dissociation Buffer (IBCO, Invitrogen) inkubiert, damit sie vom Kulturflaschenboden entnommen werden konnten. Mit Hilfe einer Zentrifuge wurden die Zellen vom Cell Dissociation Buffer getrennt und mit 5 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen manuell gezählt, um zu gewährleisten, dass in jedem Versuch eine konstante Anzahl von 130.000 Zellen pro milliliter Medium vorhanden war. Die bereits durch die Zählung ermittelte Menge an Zellsuspension wurde daraufhin mit 40 ml Nährmedium vermischt. Diese Menge wurde auf die bereits vorinkubierte (mit Medium) Perfusorspritze aufgezogen.

#### **4.3.1. Detektion von Mykoplasmen-Kontamination in der Zellkultur**

Zur Überprüfung der Zellkultur auf Kontamination durch Mykoplasmen wurde das VenorGeM®. Mykoplasmen-Detektionskit (Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland), auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion, eingesetzt. Der Test ist zum Nachweis der typischerweise als Kontamination in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmenspezies geeignet und wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Vor Beginn der Versuche wurden die Zelllinien auf Mykoplasmenbefall getestet. Alle Zelllinien, die in unseren Versuchen verwendet wurden, waren frei von Mykoplasmen.

#### **4.4. Beschichtung der Microslides mit rekombinanten humanen E-, P-Selektin und Hyaluronsäure**

Zur Beschichtung der Kanäle wurden rekombinantes humanes E- und P- Selektin Fc-Chimere (R&D Systems) jeweils zum einen auf 5 µg/ml (E-Selektin) zum anderen auf 50 µg/ml (P-Selektin) mit DPBS (GIBCO, Invitrogen) verdünnt.

Die Microslides wurden daraufhin mit jeweils 25 µl der Selektinlösung gefüllt und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Kontrolle wurden unspezifische Bindungsstellen in den Kapillaren mit 10% FCS – Lösung für ebenfalls mindestens 30 Minuten inkubiert. Damit wurde pro Versuch jede Tumorzelllinie durch drei beschichtete Kapillaren perfundiert, jeweils eine mit E- und P-Selektin- und eine mit FCS- Beschichtung.

Zur Beschichtung der Kanäle mit Hyaluronat wurden IBIDI- $\mu$ -Slides (L-Lysin-Beschichtung) verwendet. Die Hyaluronsäure (Hyaluronic acid sodium, Salt from Rooster Comb, Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Sternheim Deutschland) wurde 1 mg/ml in PBS gelöst. Für die Kontrolle wurde BSA (Bovine Serum albumin, pH 7,0, PAA Laboratories GmbH Basching, Österreich) einprozentig in PBS gelöst. Beides wurde in die Kapillare pipettiert (40  $\mu$ l pro Kapillare) und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

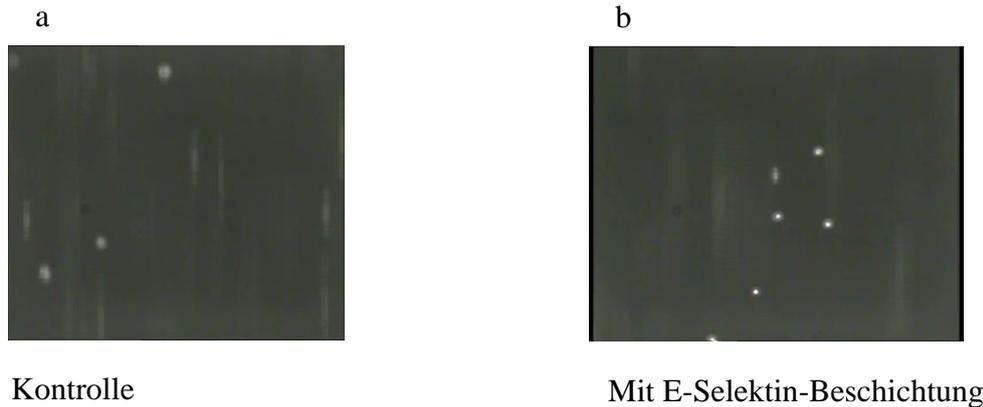
#### **4.5. Versuchsdurchführung**

Die Perfusorspritze mit der Zellsuspension (S.17) wurde in die Versuchsanordnung eingebracht. Zunächst wurde die Flussrate von 10,0 [ml/min] an der Perfusorpumpe eingestellt, dann wurde im zweiten Durchlauf die Flussrate von 18,5 [ml/min] eingestellt, anschließend wurde die Flussrate von 60,4 [ml/min] eingestellt. Die Beobachtungen, die am Mikroskop gemacht wurden, wurden notiert. Daraufhin wurde das Bild, das im Mikroskop entstand und auf den Computer in Echtzeit übertragen wurde, für 1,5 min aufgezeichnet. Ein Versuch bestand aus der Untersuchung des Adhäsionsverhaltens einer Zelllinie in Kombination mit den drei Beschichtungen und den drei unterschiedlichen Flussraten. Jeder Versuch wurde sechs Mal unabhängig voneinander wiederholt.

#### **4.6. Dokumentation**

Die Zellflussversuche konnten nicht während der Durchführung quantitativ ausgewertet werden, da die Flussgeschwindigkeiten zu hoch und die später noch erläuterten Ergebnisse wie Zellrollen oder Tethering, ein wiederholtes ruckartiges Adhären und wieder Losreißen von Zellen an den Kapillarwänden, im zur Verfügung stehenden Blickfeld zu kurz zu sehen waren. Durchführung und Auswertung wurden daher getrennt voneinander vorgenommen und die Rollvorgänge selbst wurden vorerst digital (CapImage, Dr. Zeintl, Heidelberg) aufgenommen und gespeichert.

An die räumliche Auflösung der Darstellung wurde dabei keine hohe Anforderung gestellt, da keine morphologischen Strukturen untersucht wurden. Vielmehr war ein großes Bildfeld zur Untersuchung einer möglichst langen Wegstrecke und eine hohe zeitliche Auflösung von mindestens 25 Bildern pro Sekunde (fps) notwendig, um Rollvorgänge und Tethering wirklichkeitstreu abzubilden.



**Abbildung 2: Bildfeld der Kamera während der Versuche.** Die Kontrolle (a) zeigt Zellen als unscharfe weiße Flecken. Die Zellen adhärten nicht, sondern flossen ungebremst durch das Bildfeld. Bei E-Selektin-Beschichtung (b) waren an der Oberfläche haftende Zellen als scharfe weiße Punkte zu erkennen. Sie hafteten an der Oberfläche der Microslides.

Bei den Versuchen wurde eine Analogkamera verwendet (Sony, CX-77CE CCD-Video-Kamera), die mit ihrem 2/3'' Chip und einer Aufnahmefrequenz von 25 fps den Anforderung an ein möglichst großes Bildfeld entsprach. Die Kamera übertrug die Bilder direkt an einen DVD-Video-Recorder (Panasonic, LQ-MD800E). Erst danach wurde das analoge Signal über einen Framedriver (Frame Grabber Board Imagination PXC 200) digitalisiert und stand für weitere Auswertungen am Computer zur Verfügung.

#### 4.7. Auswertung

Die Auswertung wurde in zwei Teile gegliedert. Zum einen wurden die Ergebnisse auf das unterschiedliche Adhäsionsverhalten der Tumorzellen bei verschiedenen Beschichtungen und Scherkräften hin untersucht. Zum anderen wurden die einzelnen Zelllinien vergleichend untersucht. Qualitativ wurde das Adhäsionsverhalten folgendermaßen bewertet:

1. Feste „**Adhäsion**“ wurde als bewegungsloses Verharren einer Zelle am Kapillarboden für wenigstens 10 Sekunden definiert.
2. Spezifisches selektinvermitteltes „**Zellrollen**“ wurde als Rollgeschwindigkeit  $v = 0,001 - 0,015$  mm/s definiert. Zwischen dem spezifischen selektinvermittelten und dem unspezifischen strömungsvermittelten Rollen kann leicht durch Variation der Scherkräfte unterschieden werden. Bei  $0,55$  dyn/cm<sup>2</sup> tritt ein häufiges Zellrollen auch

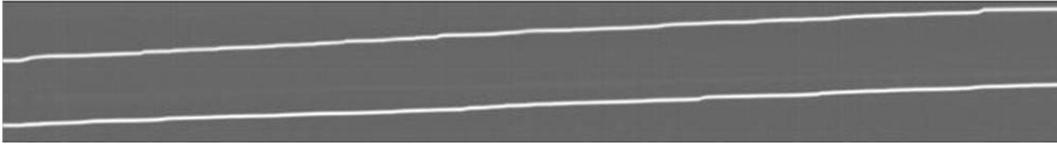
in der Kontrollkapillare auf, welches jedoch durch Erhöhung der Scherkräfte auf 5,0 dyn/cm<sup>2</sup> völlig verschwindet und sich damit als unspezifisches strömungsvermitteltes Rollen ausweist. Das selektinvermittelte Rollen ist langsamer als das strömungsvermittelte, tritt jedoch erst bei physiologischen Scherkräften > 1dyn/cm<sup>2</sup> auf und schließt sich nach Steigerung der Scherkräfte an die feste Adhärenz der Tumorzelle an den Untergrund bei unphysiologisch niedrigen Scherkräften an (Dimitroff, 2004).

3. „**Tethering**“ definiert einen Bewegungszustand, der sich auf dem Bildschirm als wiederholtes ruckartiges Adhärenzen und wieder Losreißen von Zellen am Kapillarboden darstellt. Die Bewegungsgeschwindigkeit liegt beim Tethering immer höher als beim Rollen. Es liegt stets eine Geschwindigkeit von  $v < 0.015$  mm/s vor. Das Tethering stellt sich in den unten beschriebenen Line-Shift-Diagrammen dar (S. 21).

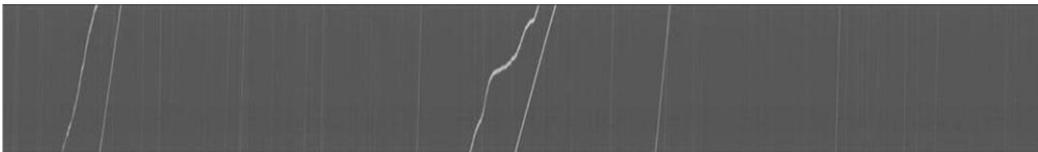
Die Auswertung wurde mit dem Computerprogramm CapImage (Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) vorgenommen. Um die Geschwindigkeiten fließender Zellen zu messen, wurden bei diesem Programm Line-Shift-Diagramme erstellt. Hierbei wurde in jedem Bildfeld, eine Hilfslinie in Richtung des Zellflusses von dem Punkt, an dem eine Zelle das erste Mal im Bildfeld auftaucht, bis zum Punkt ihres Verschwindens gezogen. Daraufhin wurde die Aufnahme abgespielt und die gerade betrachtete Zelle lief entlang der Hilfslinie durch das Bildfeld. Gleichzeitig wurde das Line-Shift-Diagramm erstellt, dessen x-Achse die Untersuchungszeit oder Länge der Aufnahme, hier 1,5 Minuten, und die y-Achse die Länge der untersuchten Strecke (Länge der Hilfslinie oder des Bildfeldes) darstellte. Das Programm setzte nun zeitlich aufeinander folgende Abbildungen der Länge der Hilfslinien und der Breite eines Bildpunktes nebeneinander. Da die Kamera 25 Bilder pro Sekunde erzeugte, deckten 2250 nebeneinander gesetzte Bildpunkte den Untersuchungszeitraum von 1,5 Minuten ab. Eine Zelle, die sich zum Zeitpunkt  $t = 0$  am Anfang der Hilfslinie befand, erzeugte an deren Anfang eine Weißfärbung. Bewegte sich die Zelle geradlinig gleichförmig weiter, wanderte auch die Weißfärbung Richtung Ende der Hilfslinie. Setzte man nun die Hilfslinien in zeitlicher Abfolge nebeneinander, so ergab die Weißfärbungen eine Gerade, die mit einer bestimmten Steigung diagonal durch das Line-Shift-Diagramm verläuft. Die Steigung der Geraden repräsentiert dabei mit  $v = s/t$  die Geschwindigkeit der erfassten Zelle. Eine Zelle, die im Verlauf der Beobachtung fest adhärenzte, erzeugte in dem Diagramm eine horizontale Linie. Ein Tethering stellte sich im Diagramm als treppenförmiger Graph dar, wobei die

Steigung dieser Bewegung sehr viel steiler war als bei Zellen, die eine Rollbewegung durchführten.

### Zellrollen



### Tethering



### Adhäsion



**Abbildung 3: Line-Shift-Diagramme.** Dargestellt sind die für die drei Bewegungszustände typischen Bilddarstellungen der Zellbewegungen. Zu erkennen an einem Graphen mit relativ geringer Steigung für das Zellrollen, einem treppenförmigen Graphen mit großer Steigung für das Tethering und einer horizontalen Linie für die Adhäsion.

Um jede einzelne Zelle zu erfassen, die im Bildfeld erscheint, wurde nicht nur eine einzige, sondern ein Gitter von 55 gleichmäßig über das Bildfeld verteilter Hilfslinien erzeugt, sodass pro Versuch 55 Line-Shift-Diagramme erzeugt wurden. In den Line-Shift-Diagrammen ließ sich jede einzelne Zelle zählen und einem der drei Bewegungszustände zuordnen.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogramms GraphPadPrism, Version 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA) durchgeführt. Untersucht wurden:

- 1) Unterschiede bezüglich des Adhäsionsverhaltens der verschiedenen Zelllinien auf jeweils P- und E-Selektin und Hyaluronsäure,
- 2) unterschiede des Adhäsionsverhaltens der Zelllinien bei unterschiedlichen Scherkräften,

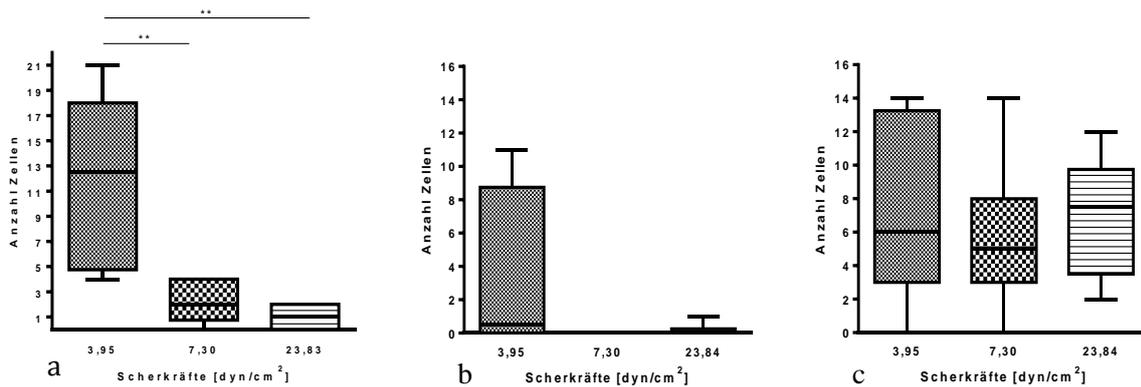
3) der Einfluss des Knockdown der Adhäsionsmoleküle CEACAM1 und L1 in der Zelllinie FemX-I, durchgeführt im Vergleich zur Ursprungszelllinie FemX-I.

Ob sich statistisch signifikante Unterschiede im Adhäsionsverhalten der verschiedenen Zelllinien zeigten, wurde mit Hilfe des one way ANOVA mit nachfolgendem Dunn's Post-Test ermittelt. P-Werte  $< 0.05$  galten als statistisch signifikant.

## 5. Ergebnisse

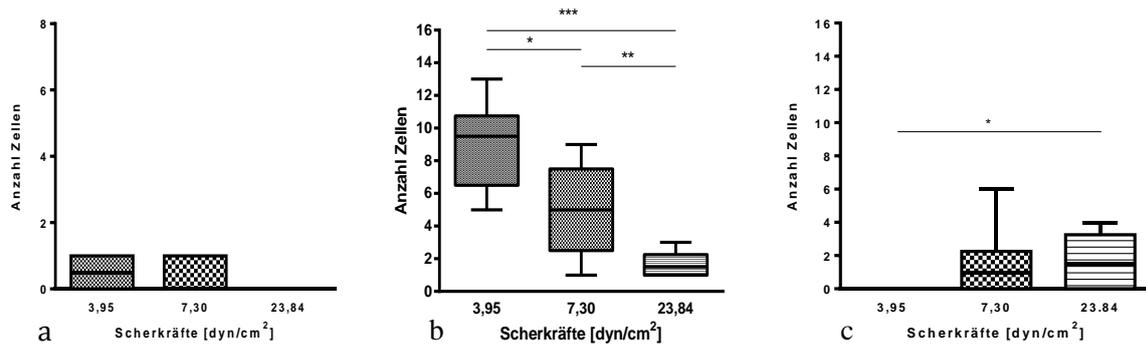
### 5.1. Einfluss der Scherkräfte

Zunächst wurde untersucht, ob unterschiedliche Scherkräfte sich auf das Adhäsionsverhalten der Melanomzellen auswirken. In den meisten Fällen zeigten sich bei steigender Scherkraft signifikant weniger positive Ereignisse der unterschiedlichen Bewegungszustände. Diese Versuchsreihe wurde mit der E-Selektin Beschichtung durchgeführt.



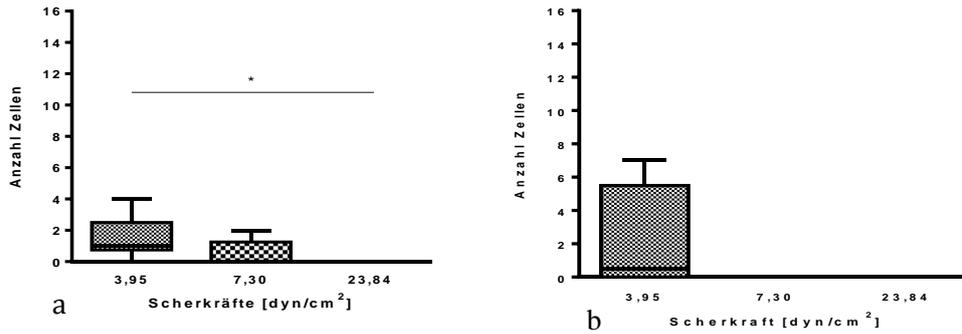
**Abbildung 4: Einfluss der Scherkräfte auf das Adhäsionsverhalten der Zelllinie FemX-I.** Bewegungszustände a) Adhäsion b) Tethering und c) Zellrollen. Den Bewegungszustand Adhäsion erreichen signifikant mehr Zellen bei einer Scherkraft von 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] als bei den Scherkräften 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] und 23,83 [dyn/cm<sup>2</sup>]. Bei den Bewegungszuständen Tethering und Zellrollen hatte die Scherkraft keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Zellen.

Die Adhäsion der Zelllinie FemX-I sank signifikant mit steigender Scherkraft (3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] vs. 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>],  $p = 0,0063$ ; 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] vs. 23,83 [dyn/cm<sup>2</sup>],  $p = 0,0029$ ) (a). Bei den Bewegungszuständen Tethering (b) und Zellrollen (c) bestand kein quantitativ zu erfassender signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten bei unterschiedlichen Scherkräften.



**Abbildung 5: Einfluss der Scherkräfte auf das Adhäsionsverhalten der Zelllinie LOX.** Betrachtet wurden die Bewegungszustände a) Adhäsion b) Zellrollen und c) Tethering. Den Bewegungszustand Tethering erreichten signifikant mehr Zellen bei einer Scherkraft von 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] als bei der Scherkraft 23,83 [dyn/cm<sup>2</sup>] (c). Bei dem Bewegungszustand Adhäsion hatte die Scherkraft keinen signifikanten Einfluss auf das Adhäsionsverhalten (a). Bei dem Bewegungszustand Zellrollen nahm die Adhäsion mit steigender Scherkraft kontinuierlich signifikant ab (b). Den Bewegungszustand Tethering erreichten bei einer Scherkraft von 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] signifikant mehr Zellen als bei der Scherkraft von 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] (b).

Bei der Zelllinie LOX hatten steigende Scherkräfte keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion (P-Werte für 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] vs 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] = 0,6109; 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] vs 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] = 0,756). Die Zelllinie LOX zeigte signifikant mehr Zellrollen bei einer Scherkraft von 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] als bei 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] ( $p = 0,0103$ ) und signifikant mehr Zellrollen bei 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] als bei 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] ( $p = 0,0452$ ). Es erreichten signifikant mehr Zellen den Bewegungszustand Tethering nach der Steigerung der Scherkraft von 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] auf 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>], ( $p = 0,0134$ ) (c).

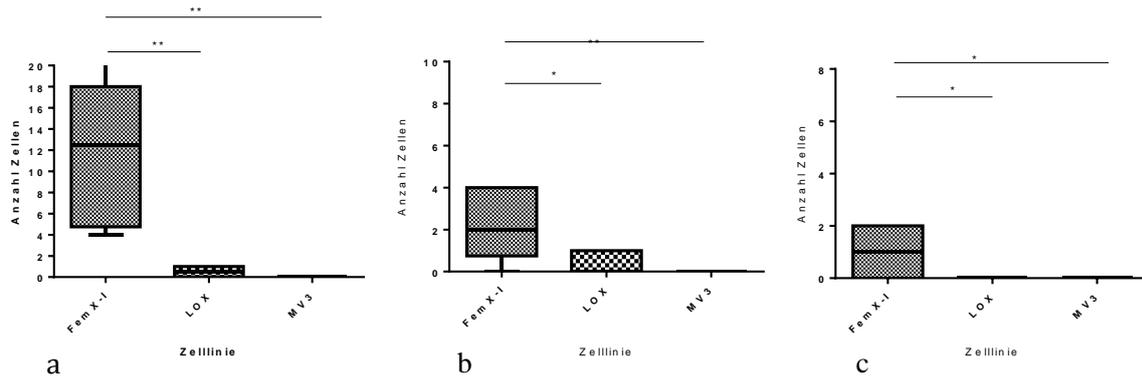


**Abbildung 6: Einfluss der Scherkräfte auf das Adhäsionsverhalten der Zelllinie MV3.** Betrachtet wurden die Bewegungszustände a) Zellrollen und b) Tethering. Den Bewegungszustand Adhäsion erreichte keine Zelle der Zelllinie MV3. Den Bewegungszustand Zellrollen erreichten signifikant mehr Zellen bei einer Scherkraft von 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] als bei 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] (a). Die Scherkraft hat keinen signifikanten Einfluss auf das Tethering der Zelllinie MV3 (b).

Die Zelllinie MV3 zeigte bei keiner Scherkraft die Aktion Adhäsion an E-Selektin-Beschichtung. MV3-Zellen erreichten bei der Scherkraft 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] signifikant häufiger den Bewegungszustand Zellrollen als bei 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] ( $p = 0,0237$ ). Bei dem Bewegungszustand Tethering hatte die Scherkraft keinen signifikanten Einfluss auf das Adhäsionsverhalten, ( $p = 0,1136$  für den Vergleich 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] mit 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] und 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>]).

## 5.2. Zelllinien FemX-I, LOX und MV3 im Vergleich

Anschließend wurden die Zelllinien FemX-I, LOX und MV3 miteinander verglichen. Zunächst wurden die Anzahl der Zellen verglichen, die den Bewegungszustand Adhäsion erreichten.



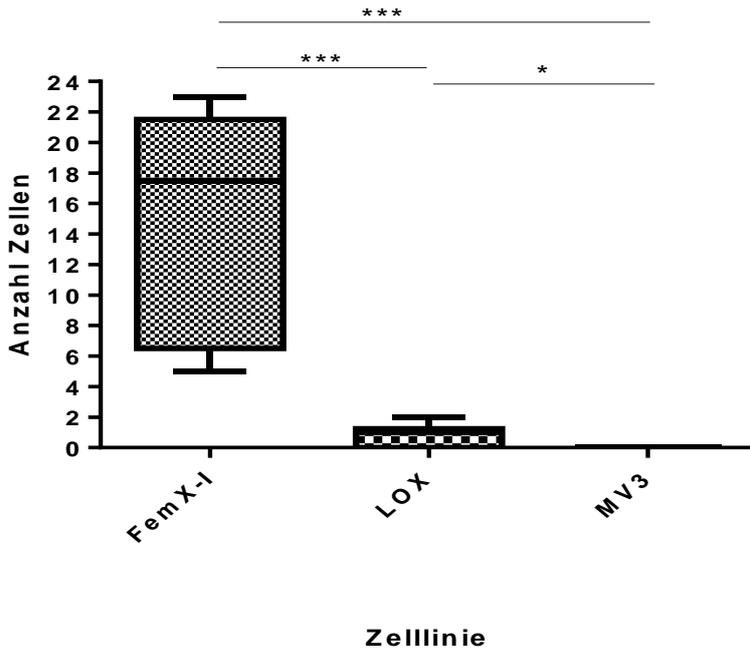
**Abbildung 7: Adhäsion auf E-Selektin:** Zelllinien im Vergleich. Die Graphen zeigen die Ergebnisse bei Scherkräften von a) 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>], b) 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] und c) 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>]. Zellen der Zelllinie FemX-I erreichten bei allen drei Scherkräften signifikant häufiger den Bewegungszustand Adhäsion als Zellen der Zelllinien LOX und MV3. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien LOX und MV3.

Die Zellen der Zelllinie FemX-I adhärten signifikant häufiger an E-Selektin als Zellen der Zelllinien LOX ( $p = 0,0021$ ) und MV3 ( $p = 0,0015$ ) bei einer Scherkraft von 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>]. Zwischen den Ergebnissen aus LOX und MV3 bestanden keine signifikanten Unterschiede (a).

Die Zellen der Zelllinie FemX-I adhärten signifikant häufiger als Zellen der Zelllinien LOX ( $p = 0,0236$ ) und MV3 ( $p = 0,0078$ ) bei einer Scherkraft von 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>]. Zwischen den Ergebnissen aus LOX und MV3 bestanden keine signifikanten Unterschiede (b).

Auch bei einer Scherkraft von 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] adhärten die Zellen der Zelllinie FemX-I signifikant häufiger als Zellen der Zelllinien LOX ( $p = 0,0493$ ) und MV3 ( $p = 0,0493$ ) bei einer Scherkraft von. Zwischen den Ergebnissen aus LOX und MV3 bestanden keine signifikanten Unterschiede (c).

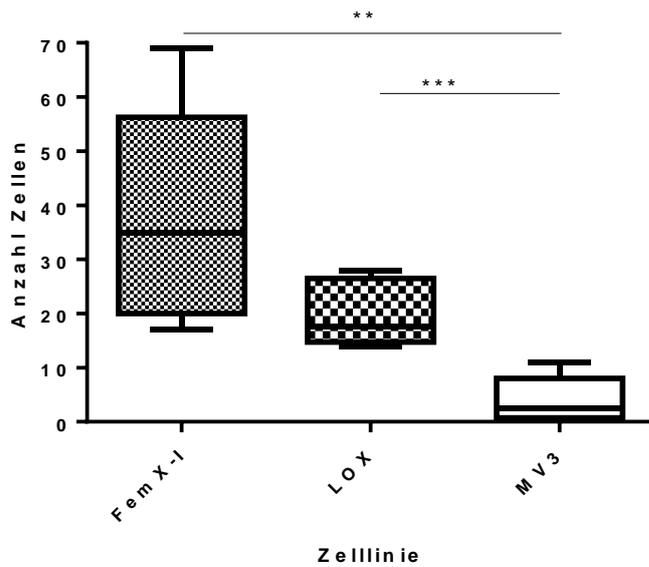
Anschließend wurden für jede einzelne Zelllinie jeweils die Ergebnisse aus a), b), und c) addiert, um die Summe aller Adhäsionszustände jeder Zelllinie bei jedem Scherstress vergleichen zu können.



**Abbildung 8: Zelllinien im Vergleich.** Es wurden die positiven Ergebnisse aus dem Bewegungszustand Adhäsion bei den drei Scherkräften 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>], 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] und 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] summiert. Zellen der Zelllinie FemX-I adhärten signifikant häufiger als Zellen der Zelllinien LOX und MV3. LOX-Zellen adhärten signifikant häufiger als MV3-Zellen.

Die Zellen der Zelllinie FemX-I adhärten signifikant häufiger als Zellen der Zelllinie LOX ( $p = 0,0009$ ) und Zellen der Zelllinie MV3 ( $p = 0,0006$ ). Zellen der Zelllinie LOX adhärten signifikant häufiger als Zellen der Zelllinie MV3 ( $p = 0,0219$ ).

Anschließend wurde die Summe aller drei unterschiedlichen adhäsiven Qualitäten als „Gesamtadhäsion“ für jede Zelllinie berechnet und verglichen.

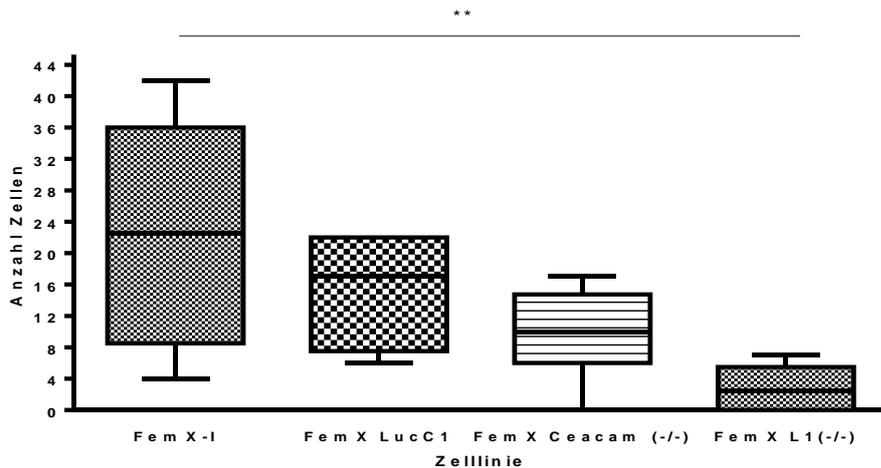


**Abbildung 9: Summe der drei Adhäsionszustände (Gesamtadhäsion) der Unterschiedlichen Zelllinien.** Der Graph zeigt die Summe der Bewegungszustände Adhäsion, Zellrollen und Tethering und den drei Scherkräften 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>], 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] und 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] bei E-Selektin-Beschichtung. Zellen der Zelllinie FemX-I adhärten signifikant häufiger als Zellen der Zelllinie MV3. Die Zelllinie LOX wies signifikant mehr Gesamtadhäsion als die Zelllinie MV3 auf.

Die Zellen der Zelllinie FemX-I adhärten in der Summation der drei Adhäsionszustände signifikant häufiger als Zellen der Zelllinie MV3 ( $p = 0,0019$ ). Zellen der Zelllinie LOX adhärten signifikant häufiger als Zellen der Zelllinie MV3 ( $p = 0,0004$ ). Zwischen FemX-I und LOX bestand gerade kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0513$ ). Tendenziell weist die Zelllinie LOX aber eine deutlich geringere Adhäsion auf als FemX-I, die jedoch knapp keine Signifikanz erreicht.

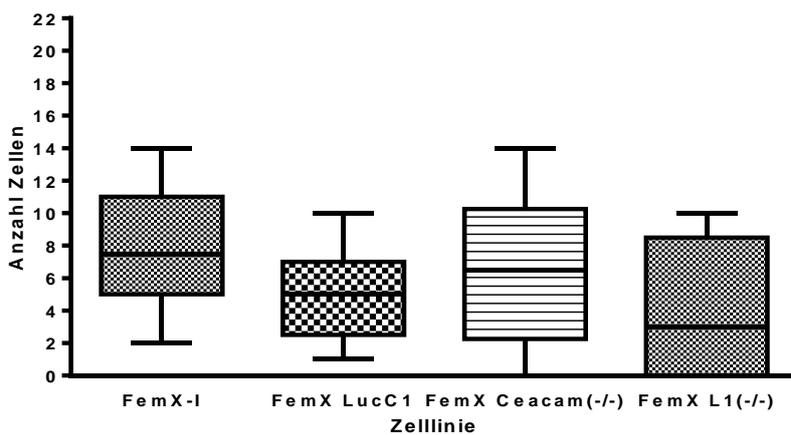
### 5.3 FemX – Knockdown Zelllinien

Quantitative Erfassung des Adhäsionsverhaltens von FemX-I im Vergleich zu den FemX-Zelllinien mit (a.) CEACAM (-/-) Knockdown und (b.) mit L1(-/-) Knockdown:



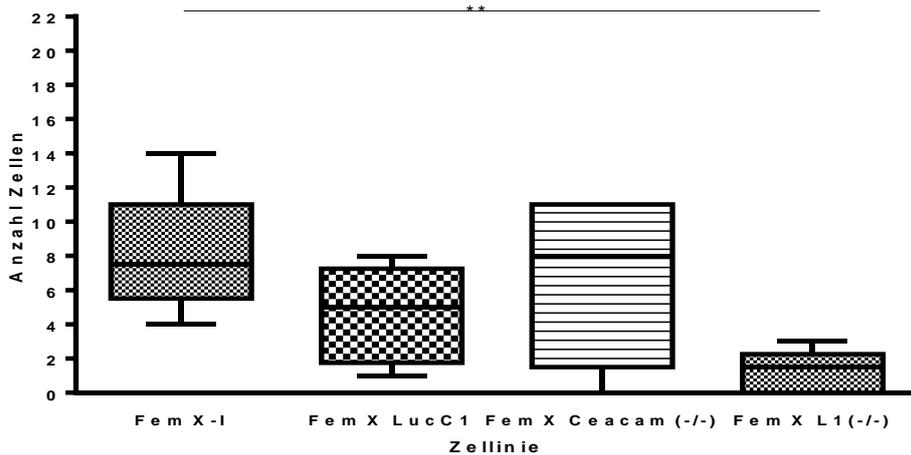
**Abbildung 10: Einfluss von CEACAM1 und L1 Knockdown (-/-) auf die Gesamtadhäsion bei der Scherkraft 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>].** Es wurden die positiven Ergebnisse aus Adhäsion, Zellrollen und Tethering bei E-Selektin-Beschichtung summiert. Es bestand ein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten zwischen den Zelllinien FemX-I und der Zelllinie FemX L1 (-/-).

Das Adhäsionsverhalten der vier Zelllinien wurde miteinander verglichen, indem die Summe aus Adhäsion, Rolling und Tethering gebildet wurde. Es zeigte sich bei einer Scherkraft von 3,95 [dyn/cm] und E-Selektin-Beschichtung ein signifikanter Unterschied zwischen FemX-I und FemX L1(-/-) ( $p = 0,0079$ ). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollzelllinie FemX LucC1 und der Ursprungszelllinie ( $p = 0,2963$ ).



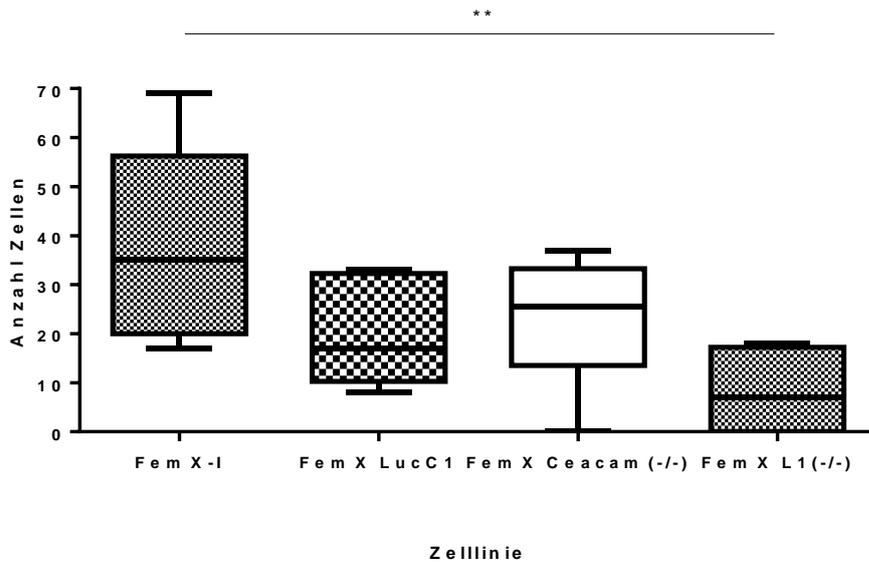
**Abbildung 11: Einfluss von CEACAM1 und L1 Knockdown (-/-) auf die Gesamtadhäsion bei der Scherkraft 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>].** Es wurden die positiven Ergebnisse aus Adhäsion, Zellrollen und Tethering bei der Scherkraft 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] und E-Selektin-Beschichtung summiert. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen.

Bei der Betrachtung der vier Zelllinien und aller positiver Ergebnisse, dass heißt Adhäsion, Rolling und Tethering, zeigten sich bei einer Scherkraft von 7,30 [dyn/cm] und E-Selektin-Beschichtung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien.



**Abbildung 12: Einfluss von CEACAM1 und L1 Knockdown (-/-) auf die Gesamtadhäsion bei der Scherkraft 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>].** Es wurden die positiven Ergebnisse aus Adhäsion, Zellrollen und Tethering bei der Scherkraft 23,84[dyn/cm<sup>2</sup>] und E–Selektin-Beschichtung summiert. FemX L1 (-/-) zeigte signifikant weniger Adhäsion als die Ursprungszellen.

Bei der Betrachtung der vier Zelllinien und aller positiver Ereignisse, dass heißt Adhäsion, Rolling und Tethering zeigte sich, dass bei einer Scherkraft von 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] und E-Selektin-Beschichtung FemX L1(-/-) Zellen signifikant weniger adhärten als FemX-I-Zellen ( $p = 0,0011$ ).



**Abbildung 13: Einfluss von CEACAM1 und L1 Knockdown (-/-) auf die Gesamtadhäsion bei der Summation der Scherkräfte.** Es wurden die positiven Ergebnisse aus Adhäsion, Zellrollen und Tethering bei den Scherkräften 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>], 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] und 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] bei E-Selektin-Beschichtung summiert. Die Zelllinie FemX L1 (-/-) adhärte signifikant weniger als die Ursprungszelllinie.

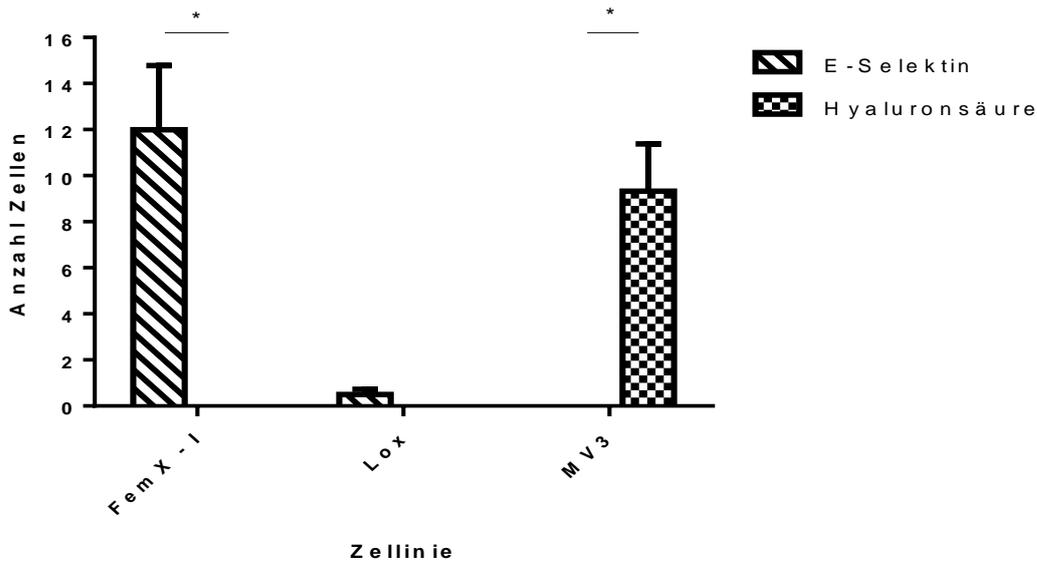
Die Analyse aus der Summe positiver Ereignisse aus allen Versuchen ergab, dass das Adhäsionsverhalten der Zelllinie FemX L1(-/-) signifikant geringer ist als das der Ursprungszelllinie FemX-I ( $p = 0,0061$ ).

#### 5.4. P-Selektin

Keine der untersuchten Zelllinien zeigte an P-Selektin bei keiner der drei verschiedenen Scherkräfte irgendeine Form der Adhäsion.

#### 5.5. Vergleich Hyaluronsäure- und E-Selektin Beschichtung

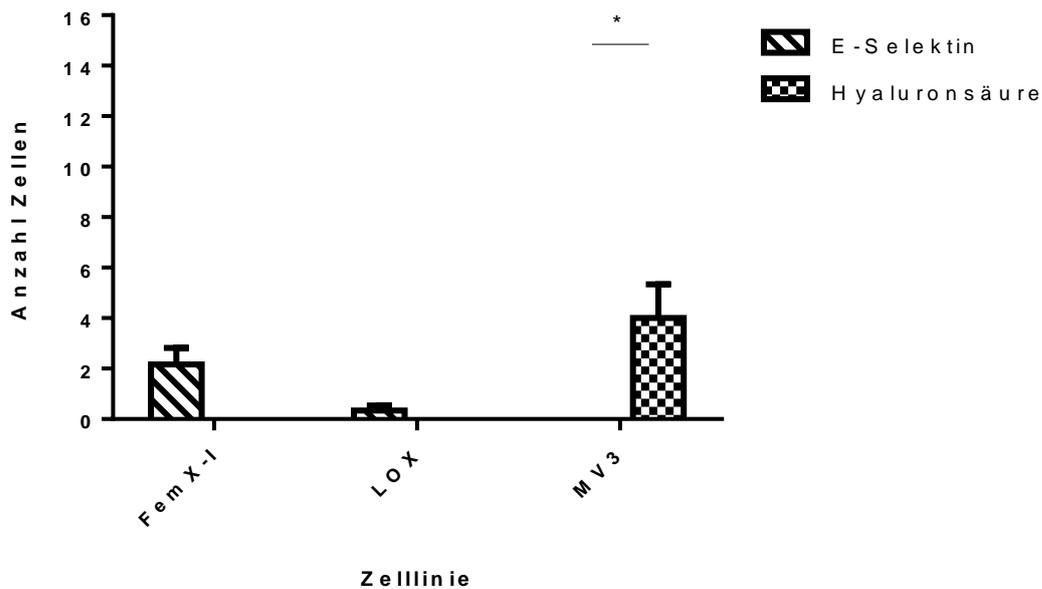
Die Versuche mit Hyaluronsäure – Beschichtungen wurden vergleichend analysiert mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit E-Selektin – Beschichtung. Betrachtet wurde der Bewegungszustand Adhäsion bei einer Scherkraft von 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>]



**Abbildung 14: Vergleichende Untersuchung der Adhäsion von Melanomzellen an E-Selektin und Hyaluronsäure.** Der Graph zeigt die Zelllinien FemX-I, Lox und MV3 im Vergleich. Analysiert wurde der Bewegungszustand Adhäsion bei E-Selektin-Beschichtung im Vergleich zu Hyaluronsäure-Beschichtung bei einer Scherkraft von 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>]. Zellen der Zelllinie MV3 erreichten als einzige den Bewegungszustand Adhäsion auf Hyaluronsäure.

MV3 war im Vergleich zu den anderen Zelllinien die einzige, die signifikant an Hyaluronsäure adhärierte. Im Vergleich hafteten MV3 Zellen signifikant stärker an Hyaluronsäure als an E-Selektin ( $p = 0,0010$ ). FemX-I Zellen hingegen adhärierten signifikant stärker an E-Selektin als an Hyaluronsäure ( $p = 0,0015$ ).

Nach Erhöhung der Scherkraft auf 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] zeigten sich folgende Ergebnisse:



**Abbildung 15: Vergleichende Untersuchung der Adhäsion von Melanomzellen an E-Selektin und Hyaluronsäure.** Der Graph zeigt die Zelllinien FemX-I, LOX und MV3 im Vergleich. Analysiert wurde der Bewegungszustand Adhäsion bei E-Selektin-Beschichtung im Vergleich zu Hyaluronsäure-Beschichtung bei einer Scherkraft von 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>]. Die Zelllinie MV3 adhärte signifikant häufiger an Hyaluronsäure als an E-Selektin. Die Zelllinien FemX-I und LOX adhärten an E-Selektin, nicht aber an Hyaluronsäure.

Die MV3-Zellen adhärten bei einer Scherkraft von 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] signifikant häufiger an Hyaluronsäure als an E-Selektin ( $p = 0,0138$ ). Die LOX- und FemX-I-Zellen adhärten nicht auf Hyaluronsäure und nur gering auf E-Selektin. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

	FemX-I	LOX	MV3	Fem-X Luc C1	FemX Ceacam (-/-)	FemX L1 (-/-)
Metastatisches Potenzial	+++	++	+	n.T	n.T	n.T
L1 Expression	+	+	+	+	+	-
CEACAM1 Expression	+++	-	-	+++	-	+++
Adhäsion E-Selektin 3,95 [dyn/cm <sup>2</sup> ]	+++	+	-	+++	++	+
Adhäsion E-Selektin 7,30 [dyn/cm <sup>2</sup> ]	++	++	+	++	++	+
Adhäsion E-Selektin 23,84 [dyn/cm <sup>2</sup> ]	+	+	-	+	+	+
Adhäsion Hyaluronsäure	-	-	+++	-	-	-

**Tab. 3: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zur Charakterisierung der untersuchten Zelllinien.**

n.T.= noch nicht abschließend im Tierversuch getestet.

## **6. Diskussion**

Das malignen Melanom weist weltweit eine steigende Inzidenz auf (Freise und Schadendorf 2009). Bei eingetretener Fernmetastasierung ist die Prognose für den Patienten fast immer infaust, da bestehende Therapien die mediane Überlebensdauer der Patienten nicht entscheidend verlängern können oder nach kurzer Remissionsdauer extrem progressive Verläufe nach sich ziehen (Fellner, 2012). Daher ist es wichtig, die molekularen Mechanismen einzelner Schritte der Metastasierung weitergehend zu untersuchen, um aus diesen Ergebnissen neue Therapiestrategien erarbeiten zu können.

Einer der Metastasen-limitierenden Teilschritte der Metastasierungskaskade ist die Extravasation (McCathy et al., 1991). Ziel dieser Arbeit war es daher, die Mechanismen der Adhäsion der Melanomzellen an das Gefäßendothel genauer zu untersuchen, um Rückschlüsse ziehen zu können, welches wichtige Adhäsionsmoleküle für diesen Teilschritt sind. Nur durch das Anheften der Zellen an das Endothel ist das maligne Melanom in der Lage, den Blutstrom zu verlassen, um eine Fernmetastase zu bilden. Könnte man therapeutisch die Adhäsion der Melanomzellen verhindern, so würden sie im Blutstrom verbleiben und vom Immunsystem der Patienten, beziehungsweise durch gezielte Therapeutika, eliminiert werden können. Die Metastasierungskaskade wäre damit unterbrochen.

### **6.1. Einfluss der Scherkräfte**

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass Zellen des malignen Melanoms bei Scherkräften von  $3,95 \text{ [dyn/cm}^2\text{]}$ , wie sie in postkapillären Venolen herrschen, bis hin zu  $20,84 \text{ [dyn/cm}^2\text{]}$ , wie sie zum Beispiel in Gefäßen des zentralen Nervensystems herrschen, in der Lage sind am Gefäßendothel zu haften. Mit steigender Scherkraft verringerte sich die Zahl der FemX-I - Zellen, die fest am Kapillarröhrchen hafteten- also Adhäsion durchführen. Bei E-Selektin – Beschichtung und einer Scherkraft von  $7,95 \text{ [dyn/cm}^2\text{]}$  hafteten noch 18% der Tumorzellen, während bei  $20,84 \text{ [dyn/cm}^2\text{]}$  nur noch 8,3% der Tumorzellen hafteten, verglichen mit der Scherkraft  $3,95 \text{ [dyn/cm}^2\text{]}$ . Wir haben bewusst relativ hohe Scherkräfte untersucht, weil maligne Melanome nicht nur beispielsweise in die Leber metastasieren, wo im Parenchym sehr geringe Scherkräfte herrschen, sondern unter anderem auch in das ZNS, in dem höhere Scherkräfte vorhanden sind. Zusätzlich konnten wir nachweisen, dass Melanomzellen selbstständig in der Lage sind, unter Scherstress an das E-Selektin des Gefäßendothels zu haften und auch bei höheren Scherkräften (mehr als  $2 \text{ dyn/cm}^2$ ) nicht grundsätzlich auf die

Hilfe von Granulozyten und deren Selektin-Liganden angewiesen sind, wie es von Liang et al. (2008) beschrieben wurde.

Dies zeigt, dass Zellen des malignen Melanoms praktisch im ganzen Körper an das Gefäßendothel anhaften, aus dem Blutgefäß extravadiere und Fernmetastasen bilden können. Dies entspricht der klinischen Erfahrung. Das in dieser Arbeit erstellte Zellflussmodell spiegelt somit gut die klinische Situation wider.

## **6.2. Adhäsion an E- und P-Selektin: FemX-I, LOX und MV3 im Vergleich**

Die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe zeigen, dass die Zellen der drei Zelllinien FemX-I, LOX und MV3 an E-Selektin adhären, wohingegen bei keinem der Versuche mit P-Selektin beschichteten Microslides ein messbares Adhäsionsverhalten registriert werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass Melanomzellen das an der Oberfläche von Endothelzellen exprimierte E-Selektin, nutzen können um autonom aus dem Blutgefäß zu extravadiere. Dies stellt einen möglichen therapeutischen Ansatz dar, denn E-Selektin wird vermehrt in Entzündungsarealen exprimiert. Cheng und Kollegen (2012) haben bereits ausführlich die Effekte von NONO-NSAID (nitric oxide (NO•)-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs) und NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs) auf das Adhäsionsverhalten von malignen Melanomen beschrieben. NONO-NSAID's hemmen demnach den  $\beta$ -1-Integrin vermittelten Adhäsionsweg der Melanomzellen via ICAM1 (Cheng et al., 2012). Ebenso hemmen die NSAID die Expression von E-Selektin (Zhou et al., 2005). Eine gezielte therapeutische Hemmung der Entzündungsreaktion könnte genutzt werden, um das metastatische Potenzial der Melanomzellen herabzusetzen. Auch in anderen Karzinomen der Haut (Spinaliom) konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit entzündungshemmenden Medikamenten erfolgreich antimetastatisch eingesetzt werden kann.

Eine Bindung an P-Selektin spielt für die Metastasierung dieser drei Melanomzelllinien (gewonnen aus humanen Lymphknoten- und Organmetastasen) keine Rolle.

Das Adhäsionsverhalten der getesteten Zelllinien FemX-I, LOX und MV3 ist quantitativ und qualitativ sehr unterschiedlich und charakteristisch. Zellen der Zelllinie FemX-I adhären signifikant häufiger bei einer Scherkraft von 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] an E-Selektin beschichteten Microslides als Zellen der Zelllinien LOX. LOX adhären im Vergleich zu FemX-I nur

7,69% so häufig (Abbildung 6a), beziehungsweise 15,85% so häufig bei der Scherkraft 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] (Abbildung 6b). Bei der Scherkraft 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] zeigte nur FemX-I Adhäsion. MV3 zeigte bei keinem der Versuche Adhäsion. Noch deutlichere Ergebnisse lieferte die Summation der Ergebnisse aus den Versuchen mit unterschiedlichen Scherkräften. Addiert man die Zellen, die bei 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>], bei 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] und bei 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] den Bewegungszustand Adhäsion erreichten, verringert sich die Zahl der adhärierenden LOX-Zellen auf 5,49% im Vergleich zu den FemX-I-Zellen. Insgesamt zeigte also FemX-I bei allen Scherkräften die stärkste Adhäsion. Der Zustand Adhäsion ist die qualitativ stärkste Form der Interaktion zwischen bewegten Zellen und dem Endothel unter Flussbedingungen. Er ist der letzte Schritt vor der aktiven Extravasation (Hunter et al., 2008). Wir konnten zeigen, dass Zellen der Zelllinie FemX-I auch bei sehr hohen Scherkräften in der Lage sind, autonom am Gefäßendothel zu haften. FemX-I wurde in vorangegangenen Arbeiten im Mausmodell auf sein metastatisches Potenzial untersucht. Nach subkutaner Injektion von Tumorzellen und späterer Exzision des Primärtumors, bildeten sich solide Fernmetastasen unter anderem in der Leber, in der Nierenkapsel, im Bindegewebe des Mediastinums, dem abdominalen Fettgewebe, im Gehirn, in Lymphknoten und in der Lunge der Mäuse (Thies et al., 2009). Die Zelllinie FemX-I wies in den vergleichenden Tierversuchen das höchste Metastasierungspotenzial auf (Thies et al., 2007). In den vorliegenden Zellflussversuchen zeigte diese Zelllinie auch den höchsten Grad der Adhäsion. Hieraus lässt sich schließen, dass die besonders große Fähigkeit der FemX-I-Zellen zur Adhäsion an das Gefäßendothel ihnen also einen großen Metastasierungs-vorteil verschafft. Des Weiteren unterstützten diese Ergebnisse die Hypothese, dass die Extravasation eine der metastasenbestimmenden Schritte der Metastasierung ist.

Auch in den großen quantitativen Unterschieden des Adhäsionsverhaltens der Zelllinien MV3 und LOX sehen wir die Ergebnisse aus den Tiermodellversuchen bestätigt (Thies et al., 2007). FemX-I hatte hier das größte, LOX etwas weniger, MV3 das geringste metastatische Potenzial. Lungenmetastasen wurden von allen drei Zelllinien gebildet. Dieses Ergebnis bestätigt sich in unseren Versuchen. Bei der Betrachtung der Summe der Ergebnisse bei unterschiedlichen Scherkräften und den drei Bewegungszuständen (Abbildung 8) zeigte sich, dass FemX-I, LOX und MV3 Adhäsionsverhalten zeigten. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien sind deutlich geringer als bei den isolierten Betrachtungen. Zwischen LOX und FemX-I besteht kein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten. Daraus lässt sich folgern, dass das höhere metastatische Potenzial der Zelllinie FemX-I aus dessen Fähigkeit stammt, auch bei sehr hohen Scherkräften fest am Gefäßendothel zu haften. Dazu sind LOX

und MV3 nicht in der Lage. MV3 und LOX interagierten nur bei geringeren Scherkräften mit den beschichteten Mikroslices.

### **6.3. FemX - Knockdownzelllinien**

Um die Hypothese vorheriger Arbeiten unserer Arbeitsgruppe aufzugreifen, die Expression der Zelladhäsionsmoleküle CEACAM1 und L1 unterstütze funktionell die Metastasierung, wurden in dieser Arbeit vergleichend zu den normalen FemX-I Zellen auch Zellen auf ihr Adhäsionsverhalten untersucht, bei denen die Expression von CEACAM1 und L1 genetisch herunterreguliert wurde. Dazu wurde die Zelllinie FemX-I verwendet, die ein sehr hohes metastatisches Potenzial hat.

FemX L1<sup>-/-</sup>, bei denen das Zelladhäsionsmolekül L1 herunterreguliert wurde, zeigte eine signifikant geringere Adhäsion an E-Selektin als die Ursprungszelllinie FemX-I. Dies zeigte sich bei der Summation aller Adhäsionszustände an E-Selektin, sowohl bei der geringsten Scherkraft von 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] als auch bei der stärksten Scherkraft von 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>]. Kontrollen zeigten, dass dies nicht an dem Einbringen des Vektors (RNAi-Ready pSIREN-RetroQ) lag. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede im Adhäsionsverhalten zwischen den Ursprungszellen der Zelllinie FemX-I und der Kontrollzelllinie FemX LucC1. Die zu erkennende leichte Verringerung des Adhäsionsverhaltens der Kontrollzelllinie im Vergleich zur Ursprungszelllinie erklärt sich durch die Verwendung von Puromycin zur Selektion der genveränderten Zellen in der Zellkultur (Wicklein, 2012).

Wir konnten durch die vorliegenden Versuche somit nachweisen, dass für die E-Selektin vermittelte Adhäsion von Zellen des malignen Melanoms am Gefäßendothel unter Scherstress das Zelladhäsionsmolekül L1 eine entscheidende Rolle spielt. Folglich besitzt L1 Bindungsstellen für E-Selektin, welche für das Adhäsionsverhalten von Melanomzellen im Gefäßendothel von entscheidender Bedeutung sind. L1 wurde in vorangegangenen Arbeiten als Marker für die Prognose des malignen Melanoms charakterisiert. L1 ist an vielen weiteren Teilschritten der Metastasierungskaskade beteiligt. Es ist beschrieben worden, dass L1 die Integrin-gesteuerte Migration von Melanomzellen erleichtert (Fogel et al., 2003). Gleiches gilt für die transepitheliale Migration von Melanomzellen über avβ3-Integrine (Hubbe et al., 1993). Es ist bewiesen worden, dass L1 die Signal-regulated-kinase (SRK) aktiviert und somit die Expression verschiedener Genprodukte induziert, die die Beweglichkeit, die Invasivität und das Wachstum der Zellen erhöhen. Diese Genprodukte sind avβ3-Integrine, kleine

GTPasen und Proteinasen (Gavert et al., 2005). L1 ist folglich in der Metastasierungskaskade ein funktionell sehr zentrales Molekül.

CEACAM1 scheint dagegen bei der Selektin-vermittelten Adhäsion von FemX-I-Zellen an das Gefäßendothel eine geringere Rolle zu spielen. Das besonders hohe Metastasierungspotenzial der Zelllinie FemX-I kann nicht aus dem CEACAM1-vermittelten Adhäsionsverhalten unter Scherstress erklärt werden. Das Adhäsionsverhalten der Zelllinie FemX-CEACAM1<sup>-/-</sup> unterschied sich nämlich nicht signifikant von der Ursprungszelllinie FemX-I und der Kontrollzelllinie FemX-LucC1 (Abbildungen 9-12). CEACAM1 vermittelt in der Metastasierungskaskade und im Wachstum des Primärtumors sehr viele Teilschritte. Es ist eine erhöhte Expression von CEACAM1 an der Invasionsfront von invasiv wachsenden Tumoren nachgewiesen worden. An dieser Stelle vermittelt CEACAM1 heterotrophe Interaktion mit Matrixproteinen. Dadurch verbessert CEACAM1 die Fähigkeit der Melanome zu invasivem Wachstum und zur Migration (Ebrahimnejad et al., 2004). CEACAM1 besitzt die Fähigkeit Angiogenesefaktoren zu bilden, sodass die Neoangiogenese von Blut- und Lymphgefäßen in die Metastase erleichtert wird (Garbe et al., 2007, Bogenrieder and Herlyn, 2003). CEACAM1 hat des Weiteren Einfluss auf die Immunabwehr. Melanomzellen, die CEACAM1 auf ihrer Oberfläche exprimieren, sind in der Lage, dem Angriff durch NK-Zellen zu entkommen (Markel et al., 2006). Auch wenn wir durch diese Arbeit keine direkte Verbindung zwischen CEACAM1 und der Adhäsion am Endothel als Teilschritt der Metastasierungskaskade nachweisen konnten, ist gezeigt worden, dass CEACAM1 an diversen anderen Schritten der Metastasierung funktionell beteiligt ist und sich daraus sein prognostischer Wert für das maligne Melanom ergibt, der aber vermutlich nicht durch Adhäsion an das Endothel über Selektine bedingt ist.

#### **6.4. Adhäsionsverhalten von Melanomzellen an Hyaluronsäure**

Die Ergebnisse unserer Versuche zeigen, dass Zellen der Zelllinie MV3 an Hyaluronsäure beschichteten Oberflächen haften. Bei der Scherkraft 3,95 [dyn/cm<sup>2</sup>] erreichten Zellen der Zelllinie MV3 Adhäsion. An E-Selektin beschichteten Microslides hafteten die MV3-Zellen nicht, wohingegen sie an Hyaluronsäure Adhäsion durchführten (Abbildung 13). MV3-Zellen zeigten auch bei höheren Scherkräften von 7,30 [dyn/cm<sup>2</sup>] die qualitativ stärkste Form des Anhaftens, Adhäsion (Abbildung 14). Die Zelllinien FemX-I und LOX hafteten nicht an Hyaluronsäure. Bei der Scherkraft 23,84 [dyn/cm<sup>2</sup>] adhärte keine der drei Zelllinien mehr an Hyaluronsäure. Dies zeigt, dass Hyaluronsäure in sehr viel geringerem Maße als E-

Selektin die Adhäsion von Melanomzellen und zwar sowohl quantitativ als auch qualitativ vermittelt.

Die von uns verwendeten Zelllinien wurden in vorangegangenen Versuchen auf die Expression von HPA und ML-I bindenden Glykokonjugaten sowie auf die Expression von CEACAM1 und L1 hin untersucht. MV3 weist sehr viele ML-I Bindungsstellen auf, mehr als FemX-I und LOX. Die MV3-Zellen erkennen über die ML-I-Moleküle Galaktosereste (Thies et al., 2008), die in Hyaluronsäure enthalten sind. Dies erklärt das Adhäsionsverhalten von MV3-Zellen an Hyaluronsäure.

Hyaluronsäure ist ein wichtiges Molekül der extrazellulären Matrix. Es ist sehr verbreitet im gesamten menschlichen Körper und ist an vielen Teilschritten der Metastasierungskaskade beteiligt (Toole, 2004). Auch der Zelllinie MV3 konnte ein hohes Metastasierungspotenzial nachgewiesen werden. Unsere Versuche konnten zeigen, dass Hyaluronsäure ebenfalls an dem Teilschritt der Adhäsion am Gefäßendothel beteiligt ist. Dies unterstützt die These, dass Hyaluronsäure funktionell beteiligt ist an der Metastasierung des malignen Melanoms.

Mit den Ergebnissen unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass die Adhäsion als Teilschritt in der Metastasierungskaskade vermutlich sehr wichtig ist und sehr eng mit dem Metastasierungspotenzial korreliert ist. Wir haben nachgewiesen, dass mit steigender Scherkraft quantitativ weniger Melanomzellen adhärirten, aber selbst bei sehr hohen Scherkräften einzelne Zellen aus dem Blutstrom gebremst werden und adhäririeren können. Das maligne Melanom ist also auch bei hohen Scherkräften in der Lage, direkt (ohne die Mithilfe von Granulozyten) an das Gefäßendothel zu adhäririeren. Zudem konnte gezeigt werden, dass das durch entzündlichen Reiz im Gefäßendothel exprimierte E-Selektin funktionell am Adhäsionsprozess beteiligt ist. Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass das Zelladhäsionsmolekül L1 funktionell die Adhäsion an das E-Selektin des Endothels vermittelt. Wir haben nachgewiesen, dass Hyaluronsäure an der Adhäsion von Melanomzellen an das Gefäßendothel beteiligt ist.

Unsere Untersuchungsergebnisse beweisen die Beteiligung von L1 und E-Selektin an dem außerordentlich wichtigen Teilschritt der Extravasation. Ein möglicher therapeutischer Ansatz, der sich aus diesen Ergebnissen ergibt, ist demnach die medikamentöse Entzündungshemmung, um eine Expression von E-Selektin im Gefäßendothel zu verringern. Ein weiterer Ansatz könnte ein zielgerichteter L1-Antikörper sein, da das

Zelladhäsionsmolekül L1 maßgeblich an der Adhäsion beteiligt ist. Diese neuen Möglichkeiten für Therapieansätze könnten in dem hier erarbeiteten klinisch relevanten Zellflussmodell untersucht werden.

## 7. Zusammenfassung

Die Adhäsion von Tumorzellen an das Gefäßendothel und die nachfolgende Extravasation gilt als ein entscheidender Teilschritt der hämatogenen Metastasierung des malignen Melanoms.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Melanomzellen in der Lage sind, unter Scherstress an Moleküle des Gefäßendothels zu haften. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Zelladhäsionsmoleküle CEACAM1 und L1, welche beide positiv mit der Melanommetastasierung in klinischen Studien korreliert sind, funktionell an diesem Prozess beteiligt sind.

Das Adhäsionsverhalten dreier verschiedener Melanomzelllinien (FemX-I, LOX und MV3), mit unterschiedlichem metastatischem Potenzial und unterschiedlich starker Expression von CEACAM1 und L1 wurde in einem Zellflussmodell analysiert und mittels one-way ANOVA und nachfolgendem Dunn's Post-Test vergleichend ausgewertet. Für jede Zelllinie wurden die drei Adhäsionszustände Rolling, Tethering und Adhäsion an jeweils E- und P-Selektin und Hyaluronsäure bei unterschiedlichen Scherkräften ( $3,95 - 23,84 \text{ dyn/cm}^2$ ) untersucht. Für die Zelllinie FemX-I wurden CEACAM1- und L1-Knockdown-Zelllinien hergestellt und ihr entsprechendes Adhäsionsverhalten mit dem der Ursprungszelllinie verglichen.

Die statistischen Analysen zeigten, dass alle drei Zelllinien an E-Selektin adhären. Mit steigender Scherkraft nahm die Adhäsion qualitativ und quantitativ ab ( $p = 0,0029$ ). FemX-I adhärte am stärksten, gefolgt von LOX und MV3. Die L1-Knockdownzellen adhärten signifikant ( $p = 0,0079$ ) weniger an E-Selektin als die Ursprungszelllinie. Zwischen CEACAM1-Knockdownzellen und der Ursprungszelllinie konnte kein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten festgestellt werden. Die MV3-Zellen hafteten signifikant an Hyaluronsäure ( $p = 0,0010$ ), wohingegen für LOX und FemX-I Zellen keinerlei Adhäsion an Hyaluronsäure nachweisbar war. Ebenso fand sich keine Adhäsion an P-Selektin.

Das gefundene adhäsive Potenzial der Zelllinien korrespondiert mit dem metastatischen Potenzial dieser Zelllinien *in vivo*. Diese Ergebnisse unterstreichen somit, welche wichtige Rolle die Adhäsion der Tumorzellen an das Gefäßendothel bei der Metastasierung spielen. L1 vermittelt hierbei die Adhäsion der Melanomzellen an das im Gefäßendothel exprimierte E-Selektin. Die vorliegenden Ergebnissen bieten somit die Grundlage für neue rationale Therapieansätze, die in dem hier erarbeiteten klinisch relevanten Zellflußmodell weiterführend untersucht werden können.

## 8. Literaturverzeichnis

Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, Dimitroff CJ (2007) Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 11:1473–1491

Bird M, Foster M, Priest R, Malhotra R (1997) Selectins: physiological and pathophysiological roles. *Biochem Soc Trans* 25: 1199–206

Bogenrieder T, Herlyn M (2003) Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 22: 6524-6536

Chapman P, Hauschild A, Robert C, Haanen, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day S, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont A, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur G (2011) Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med* 364: 2507-2516

Cheng H, Mollica MY, Lee SH, Wang L, Velázquez-Martínez CA, Wu S (2012) Effects of nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NONO-NSAIDs) on melanoma cell adhesion. *Toxicol Appl Pharmacol* 264: 161-166

Cole BF, Gelber RD, Kirkwood JM, Goldhirsch A, Barylak E, Borden E (1996) Quality-of-life-adjusted survival analysis of interferon alfa-2b adjuvant treatment of high-risk resected cutaneous melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 14: 2666-2673

Dagia NM, Goetz DJ (2003) A proteasome inhibitor reduces concurrent, sequential, and long-term IL-1  $\beta$ - and TNF- $\alpha$ -induced ECAM expression and adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: 813-822

Ebrahimnejad A, Streichert T, Nollau P, Horst AK, Wagener C (2004) CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *AmJ Pathol* 165: 1781-1787

Eton O, Legha SS, Bedikian AY, Lee JJ, Buzaid AC, Hodges C, Ring SE, Papadopoulos NE, Plager C, East MJ, Zhan F, Benjamin RS (2002) Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 20: 2045-2052

Fellner (2012) Ipilimumab (Yervoy) Prolongs Survival In Advanced Melanoma Serious Side Effects and a Hefty Price Tag May Limit Its Use. *Pharmacy and Therapeutics* 37: 503-511

Fogel M, Gutwein P, Mechtersheimer S (2003) L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362: 869-875

Freise J, Schadendorf D (2009) Palliative Therapie des malignen Melanoms im Stadium IV. *Onkologie* 15: 767-776

Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD (1996) Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins, *Cell* 84: 563-574

Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R (2007) Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: diagnosis and surveillance of melanoma. *Melanoma Res* 17: 393-399

Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M (2008) Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: diagnosis and surveillance of melanoma. *Melanoma Res* 18: 61-67

Gershenwald JE, Thompson W, Manfield PE (1999) Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol* 17: 450-457

Grumet M, Edelmann GM (1988) Neuro-glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanisms. *J Cell Biol* 106: 487-503

Grumet M, Friedlander DR, Edelmann GM (1993) Evidence for binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhes Commun* 1: 177-190

Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, Ben-Ze'ev A (2005) L1, a novel target of beta-catenin signalling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* 168: 633-642

Hanenberg H, Baumann M, Quentin I, Nagel G, Grosse-Wilde H, von Kleist S, Göbel U, Burdach S, Grunert F (1994) Expression of the CEA gene family members NCA-50/90 and

NCA-160 (CD66) in childhood acute lymphoblastic leukemias (ALLs) and in cell lines of B-cell origin. *Leukemia* 8: 2127-2133

Hemler ME (1990) VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 8: 365-400

Hiramitsu T, Yasuda T, Shimizu M, Julovi SM, Kakinuma T, Akiyoshi M, Yoshida M, Nakamura T (2006) Intercellular adhesion molecule-1 mediates the inhibitory effects of hyaluronan on interleukin-1b induced matrix metalloproteinase production in rheumatoid synovial fibroblasts via down-regulation of NF- $\kappa$ B and p38. *Rheumatology* 45: 824-832

Hodi FS, O'Day S, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh A, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok J, Weber J, Tian J, Yellin M, Nichol G, Hoos A, Urba WJ (2010) Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl Med* 363: 711-723

Hubbe M, Kowitz A, Schirmacher V, Schachner M, Altevogt P (1993) L1 adhesion molecule on mouse leukocytes: Regulation and involvement in endothelial cell binding. *Eur J Immunol* 23: 2927-2931

Hunter K, Crawford N, Alsarraj J (2008) Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res* 10 (Suppl 1) S2

Itano N, Yamada Y, Yoshida M, Kimata K (1999) Cancer metastasis and extracellular matrix. *Gan To Kagaku Ryoho* 26: 1663-1668

Izzi L, Turbide C, Houde C, Kunath T, Beauchemin N (1999) Cis-determinans in the cytoplasmic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene* 18: 5563-5572

Jacobsen A, Rahmanian M, Rubin K, Heldin P (2002) Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affect the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors. *Int J Cancer* 102: 212-219

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghfoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ (2004) Cancer Statistics 2004. *CA Cancer J Clin.* 54: 8-29

Johnson PJ (1999) Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18: 345-357

Kadmon G, Kowitz A, Aktevoigt P, Schachner M (1990a) Functional cooperation between the natural adhesion molecule L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J Cell Biol* 110: 209-218

Kadmon G, Kowitz A, Aktevoigt P, Schachner M (1990b) The natural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependend cell-cell interactions. *J Cell Biol* 110: 193-208

Kamerer R, Hahn S, Singer B, Luo JS, von Kleist S (1998) Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobuline superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in t cell activation. *Eur J Immunol* 28: 3664-3674

Kim YJ, Borsig L, Hui-Ling H, Varki NM, Varki A. (1999) Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium. *Am J Pathol* 155: 461-472

Klemke M, Weschenfelder T, Konstantin MH, Samstag Y (2007) High affinity interaction of integrin  $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J Cell Physiol* 212: 368-374

Köhler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U (2010) E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first *in vivo* evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer* 102: 602-618

Kosaki R, Watanabe K, Yamaguchi Y (1999) Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan – synthase HAS 2 enhances anchorage – independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res* 59:1141-1145

Koutsiaris AG, Tachmitzi SV, Batis N, Kotoula MG, Karabatsas CH, Tsironi E, Chatzoulis DZ (2007) Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules *in vivo*. *Biorheology* 44: 375–386

Kowitz A, Kadmon G, Eckert M, Schirmacher V, Schachner M, Altevogt P (1992) Expression and function of natural adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur J Immunol* 22: 1199-1205

Kowitz A, Kadmon G, Verschueren H, Remels L, De Baetselier P, Hubbe M, Schachner M, Schirmacher V, Altevogt P (1993) Expression on L1 adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 11: 419-429

Kudo D, Kon A, Yoshihara S, Kakizaki I, Sasaki M, Endo M, Takagaki K (2004) Effect of a hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, on B16F-10 melanoma cell adhesion and locomotion. *Biochem Biophys Res Commun* 321:789-799

Kujat R, Miragall F, Krause D, Dermietzel R, Wrobel KH (1995) Immunolocalization of the natural cell adhesion molecule L1 in non-proliferating epithelial cells of the male urogenital tract. *Histochem Cell Biol* 103: 311-321

Laak E, Nikbakht H, Peters A (2002) Expression of CEACAM1 in adenocarcinoma of the lung: A factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol* 20: 4279-4284

Lens MB, Dawes M. Global (2004) Perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 150:179–185

Li Y, Heldin P (2001) Hyaluron production increases the malignant properties of mesothelioma cells. *Br J Cancer* 85:600-607

Liang S, Slattery M, Dong C (2005) Shear stress and shear rate differentially affect the multi-step process of leukocyte-facilitated melanoma adhesion. *Exp Cell Res* 310: 282-292

Liang S, Hoskins M, Khanna P, Kunz R, Dong C (2008) Effect of the Tumor-Leukocyte Microenvironment on Melanoma-Neutrophil Adhesion to the Endothelium in Shear Flow. *Cell Mol Bioeng* 1: 189-200

Linnemann D, Raz A, Bock E (1989) Differential expression of cell adhesion molecules in variants of K1735 melanoma cells differing in metastatic capacity. *Int J Cancer* 43: 709-712

Liu N, Gao F, Han Z, Xu X, Underhill CB, Zhang L (2001) Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of tsu prostate cancer cells. *Cancer Res* 61:5207-5214

Ludwig JR, Boehme B, Podda M, Henschler R, Jager E, Tandi C, Boehncke WH, Zollner MT, Kaufmann R, Gille J (2004) Endothelial P-Selektin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res* 64: 2743-2750

Luo J, Paranya G, Bischoff J (1999) Noninflammatory expression of E-selectin is regulated by cell growth. *Blood* 93: 3785-3791.

Luo W, Tapolsky M, Early K, Wood CG, Wilson DR, Logothetis CJ, Lin SH (1999) Tumor-suppressiv activity of CD66a in prostate cancer. *Cancer Gene Ther* 6: 313-321

Ma YQ, Geng JG (2000) Heparan sulfate-like proteoglycans mediate adhaesion of human malignant Melanoma A375 cells to P-selectin under flow. *J Immunol* 165: 558-565

Markel G, Seidman R, Stern N, Cohen-Sinai T, Izhaki O, Katz G, Besser M, Treves AJ, Blumberg RS, Loewenthal R, Mandelboim O, Orenstein A, Schachter J (2006) Inhibition of human tumor-infiltrating lymphocyte effector functions by the homophilic carcinoembryonic cell adhesion molecule 1 interactions. *J Immunol* 177: 6062-6071

Marks R, Kopf AW (1995) Cancer of the skin in the next century. *Int J Dermatol* 34: 445-447

Martini R (1994) Expression and functional roles of natural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 23: 1-28

Mayadas T. N., Johnson R. C., Rayburn H., Hynes R. O., Wagner D. D (1993) Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74: 541-554

McEver R. P., Moore K. L., Cummings R. D (1995) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 270: 11025-11028

McCarthy JB, Skubitz AP, Iida J, Moorradian, DL, Wilke MS, Furcht LT (1991) Tumor cell adhesive mechanisms and their relationship to metastasis. *Semin Cancer Biol* 2: 155-167

Moos M, Tacke R, Scheerer H, Teplow D, Fruth K, Schachner M (1988) Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334: 701-703

Nakazawa H, Yoshihara S, Kudo D, Morohashi H, Kakizaki I, Kon A, Takagaki K, Sasaki M (2006) 4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 57:165-170

Neumaier M, Paululat S, Chan A, Matthaes P, Wagener C (1993) Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci* 90: 10744-10748

- Olofsson M, Arfos KE, Ramezani L, Wolitzky BA, Butcher EC, von Adrian U (1994) E-selectin mediates leukocyte rolling in interleukin-1-treated rabbit mesentery venules, *Blood* 84: 2749-2758
- Prall F, Neumaier M, Haubeck HD, Drzeniek Z, Helmchen U, Löning T, Wagener C (1996) CD66a (BGP), an adhesion molecule of carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 44:35-41
- Renkonen J., Tynninen O., Häyry P., Paaronen T., Renkonen R (2002) Glycosylation might provide endothelial zip codes for organ-specific leukocyte traffic into inflammatory sites. *A J Pathol* 161: 543-550
- Riethdorf L, Lisboa BW, Henkel U, Löning C, Naumann M, Wagener C (1997) Differential expression of CD66a (BGP), a cell adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, in benign, premalignant, and malignant lesions of the human mammary gland. *J Histochem Cytochem* 45: 957-963
- Schäfer MK, Altevogt P (2010) L1CAM malfunction in the nervous system and human carcinomas. *Cell Mol Life Sci* 67: 2425–2437
- Schröder C, Schumacher U (2010) The transcription factor Fra-2 promotes mammary tumour progression by changing the adhesive properties of breast cancer cells. *Eur J Cancer* 46: 1650-1660
- Schulz T, Schumacher U, Prehm P (2007) Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP. *J Biol Chem* 282: 20999-21004
- Siesser PF, Maness PF (2009) L1 cell adhesion molecules as regulators of tumor cell invasiveness. *Cell Adh Migr* 3: 275–277
- Slattery MJ, Dong C (2003) Neutrophils influence melanoma adhesion and migration under flow conditions. *Int J Cancer* 106: 713-722
- Sobolev O, Stern P, Lacy-Hulbert A, Hynes RO (2009) Natural killer cells require selectins for suppression of subcutaneous tumors. *Cancer Res* 69: 2531-2539

Sosman J, Kim K, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick A, Weber J, McArthur G, Hutson T, Moschos S, Flaherty K, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Ravi K, Amaravadi M, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Ribas A (2012) Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *N Engl J Med* 366:707-714

Springer TA (1995) Traffic signals for lymphocyte recirculation. *Annu Rev Physiol* 57: 827-872

Thies A, Moll I, Berger J, Schumacher U (2001) Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. *Br J Cancer* 84: 819-823

Thies A, Moll I, Berger J, Wagener C, Brümmer J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U (2002a) CEACAM1 Expression in Cutaneous Malignant Melanoma Predicts the development for Metastatic Disease. *J Clin Oncol* 20: 2530-2536

Thies A, Schachner M, Moll, I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U (2002b) Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Can* 38: 1708-1716

Thies A, Mauer S, Fodstad O, Schumacher U. (2007) Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *Br J Cancer* 96: 609–616

Thies A, Dautel P, Meyer A, Pfüller U, Schumacher U (2008) Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model. *Br J Cancer* 98: 106-112

Thies A, Peldschus K, Ittrich H, Adam G, Altevogt P, Wagener C, Schumacher U (2009) Magnetic resonance imaging of melanoma metastases in a clinical relevant human melanoma xenograft scid mouse model. *Cancer Letters* 274: 194-200

Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W (1991) Carcioembryonic gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5: 344-366

Thor G, Probstmeier R, Schachner M (1987) Charakterization of the cell adhesion molecules L1 und N-CAM and J1 in the mouse intestine. *EMBO J* 6: 2581-2586

Toole B. P (2004) Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev* 4: 528-539

Watson M L, Kingsmore S F, Johnston G I, Siegelmann MH, Le Beau MM, Lemons RS, Bora NS, Howard TA, Weissman IL, McEver RP, Seldin M F (1990) Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J Exp Med* 172: 263-272

Wicklein D (2012) RNAi Technology to Block the Expression of Molecules Relevant to Metastasis: The Cell Adhesion Molecule CEACAM1 as an Instructive Example. *Metastasis Research Protocols (Methods in Molecular Biology)* Vol 878, Humana Press, New York, USA, Pp 241-250

Yoshihara S, Kon a, Kudo D, Nakazawa H, Kakizaki I, Sasaki M, Endo M, Takagaki K (2005) A hyaluronan synthase suppressor, 4 – methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. *FEBS Lett* 579: 2722-2726

Zhou L, Chourmouzis E, Fung-Leung WP, Lau CY (2005) Tepoxalin blocks neutrophil migration into cutaneous inflammatory sites by inhibiting Mac-1 and E-selectin expression. *Europ J Immunol* 26: 120-129

## **9. Lebenslauf**

-aus datenschutzrechtlichen Gründen gestrichen

## **10. Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht. Ich versichere, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

## **10. Danksagung**

Mein Dank richtet sich besonders an Frau Dr. Anka Dahl für die Überlassung des Themas und für die hervorragende inhaltliche Einarbeitung. Ich danke ihr für die Betreuung bei der Durchführung und beim Schreiben der Arbeit.

Ich danke Herrn Professor Schumacher für die Erlaubnis, die labortechnischen Einrichtungen seines Instituts zu nutzen und für die freundlichen Anregungen, die er in fachlichen Gesprächen gegeben hat.

Ich danke Frau Dr. Christine Schröder für die technische Einarbeitung in die Zellkultur und die Flussversuche.

Besonderen Dank richte ich an Herrn Dr. Daniel Wicklein für die Bereitstellung der FemX-Knockdownzellen.

Ich danke für die technische Unterstützung und die Bereitstellung der Zellen und Chemikalien den technischen Mitarbeitern, besonders Frau Renate Gerke und Frau Christine Knies.

Für die mentale Unterstützung und den motivierenden Zuspruch bedanke ich mich bei meiner Frau Anna und meinen Eltern.