

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Lehrstuhl für Biotechnologie

**Die Rolle der kleinen Rho GTPasen Rac1, Rho und Cdc42 in der  
Regulation der Motilität und Invasion von Tumorzellen mit einer  
Mutation in E-Cadherin**

Joëlle Deplazes

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

2. Priv.-Doz. Dr. B. Luber

Die Dissertation wurde am 17.12.2008 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 15.06.2009 angenommen.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. H. Höfler danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie anfertigen zu dürfen.

Großer Dank gebührt Frau PD Dr. Birgit Luber für die interessante Themenstellung und die damit verbundene Gelegenheit zur Erlernung neuer wissenschaftlicher Techniken. Ihr verdanke ich fachkompetente Betreuung und uneingeschränkte Unterstützung, die sie mir entgegenbrachte. Auf ihre Hilfe konnte ich jederzeit zählen.

Meiner Arbeitsgruppe (Anja Bremm, Rita Mateus, Stefan Heindl, Christine Hermannstädter und Margit Fuchs) bin ich äußerst dankbar für ihre freundliche und hilfsbereite Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der molekularen Pathologie für ihre Hilfsbereitschaft und für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Vor allem möchte ich mich bedanken bei Susi, Kathrin, Susanne, Catarina und Michi für die von ihnen erhaltenen Tipps, Hilfen und offenen Ohren. Bei Susi, Kathrin und Mone bedanke ich mich zusätzlich für die große Hilfe bei den Korrekturen dieser Arbeit. Dr. Sandra Rauser und Dr. Hutzler danke ich für ihre Hilfe, bei der Durchführung der Motilitätsversuche und der Immunfluoreszenz-Aufnahmen am LSM.

Herrn Prof. Dr. J. Buchner möchte ich an dieser Stelle für seine Bereitschaft danken, die Doktorarbeit als Erstprüfer zu bewerten. Frau Prof. Dr. S. Weinkauff danke ich für ihr Einverständnis den Vorsitz meiner Prüfungskommission zu übernehmen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Konstantin und meiner ganzen Familie bedanken für die seelische Unterstützung und den moralischen Zuspruch.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1	Magenkarzinom .....	3
2.2	E-Cadherin .....	5
2.2.1	Bedeutung von E-Cadherin-Mutationen für die Tumorprogression ....	6
2.2.2	E-Cadherin-Mutationen im Magenkarzinom .....	7
2.2.3	Die Rolle von E-Cadherin in der Signaltransduktion .....	9
2.3	Rho GTPasen .....	10
2.3.1	Struktur der kleinen Rho GTPasen .....	11
2.3.2	Der Rho GTPase Zyklus .....	13
2.3.3	Rho GTPasen und das Cytoskelett.....	15
2.3.4	Zell-Zell-Adhäsion.....	17
2.3.5	Zellmigration und Invasion.....	20
2.3.6	Bedeutung der Rho GTPasen Rho, Rac und Cdc42 für die Tumorprogression .....	22
2.4	Zielsetzung der Arbeit.....	25
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
3.1	Zellbiologische Methoden.....	26
3.1.1	Zelllinien .....	26
3.1.2	Vektoren.....	26
3.1.3	Kultivierung und Passagieren der MDA-MB-435-S-Zellen .....	27
3.1.4	Einfrieren von Zellen .....	27
3.1.5	Zell-Lyse .....	28
3.1.6	Reagenzien zur Proteinisolierung .....	28
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	30
3.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	30
3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE).....	31
3.2.3	Westernblot-Analyse.....	31
3.2.4	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Westernblot.....	32

3.2.5	Immunochemische Färbung.....	33
3.3	Immunfluoreszenz und Mikroskopie .....	35
3.3.1	Immunfluoreszenz Färbung.....	35
3.3.2	Immunfluoreszenz Färbung mit FITC-gekoppeltem Phalloidin .....	35
3.4	<i>Pull-down</i> Assays.....	37
3.4.1	Messung der Aktivität von Rac1 und Cdc42 durch <i>Pull-down</i> Assay.....	37
3.4.2	Immunpräzipitation.....	37
3.4.3	Messung der Aktivität von Rho durch <i>Pull-down</i> Assay.....	38
3.4.4	Die Rho und Rac Inhibitoren NSC23766, TcdBF und C3T im <i>Pull-down</i> Assay .....	39
3.5	Zell-Motilitäts- und Invasions-Versuche .....	40
3.5.1	Zell-Motilitäts-Versuche mit Rac1 und Rho Inhibitoren behandelten, <i>wt</i> und <i>del 8</i> E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen....	40
3.5.2	Invasion Assay .....	41
3.5.3	Statistik.....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1	Rac1 Lokalisation, Expression, Aktivität und Signalweiterleitung .....	43
4.1.1	Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die Expression und Lokalisation von Rac1 .....	43
4.1.2	Einfluss von E-Cadherin mit Deletion von Exon 8 auf die Aktivierung von Rac1 ( <i>outside-in signalling</i> ).....	45
4.1.3	Einfluss der verminderten Rac1 Aktivität auf die Signalweiterleitung in <i>del 8</i> E-Cadherin exprimierenden Zellen.....	47
4.2	Cdc42 Expression und Aktivität .....	49
4.2.1	Einfluss von E-Cadherin mit Deletion von Exon 8 auf die Expression und Aktivierung von Cdc42.....	49
4.3	Rho Expression und Aktivität.....	51
4.3.1	Einfluss von E-Cadherin mit Deletion von Exon 8 auf die Expression und Aktivierung von Rho.....	51
4.4	Einfluss von <i>del 8</i> E-Cadherin auf die Lokalisation von p120-Catenin ....	53
4.5	Motilität und Invasion.....	54
4.5.1	Hemmung der Aktivität von Rac1 und Rho durch Inhibitoren.....	54

4.5.2	Rolle der kleinen Rho GTPasen Rac1 und Rho bei der Zell-Motilität in E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen .....	57
4.5.3	Einfluss von E-Cadherin mit Deletion von Exon 8 auf die Zell- Invasion .....	60
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>63</b>
5.1	Effekt der E-Cadherin-Mutation auf die kleinen Rho GTPasen Rac1, Rho und Cdc42 .....	64
5.2	Durch mutiertes E-Cadherin bedingte, reduzierte Rac1 Aktivierung beeinflusst die nachgeschaltete Signalweiterleitung von Rac1 .....	69
5.3	Ein fein-reguliertes Zusammenspiel aus Rho und Rac1 Aktivität kontrolliert die Migration und Invasion der Tumorzellen.....	71
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>78</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 2.1:</b> Modell der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion .....	6
<b>Abb. 2.2:</b> Schematische Darstellung der Exonstruktur von E-Cadherin mit der im diffusen Magenkarzinom detektierten Deletion von Exon 8 .....	8
<b>Abb. 2.3:</b> Mechanismus der E-Cadherin Signaltransduktion durch die kleinen Rho GTPasen .....	10
<b>Abb. 2.4:</b> Räumliche Darstellung der strukturellen Organisation der Rho GTPasen	12
<b>Abb. 2.5:</b> Schematische Darstellung der strukturellen Organisation der Rho GTPasen Rho, Rac und Cdc42 .....	13
<b>Abb. 2.6:</b> Der GTPase Zyklus kleiner Rho GTPasen .....	14
<b>Abb. 2.7:</b> Rho GTPasen und ihre Effektorproteine .....	15
<b>Abb. 2.8:</b> Negative Regulation der Rho Aktivität durch E-Cadherin vermittelte Rac1 Aktivität .....	19
<b>Abb. 2.9:</b> Das Zusammenspiel der kleinen Rho GTPasen in der Zell-Migration.....	21
<b>Abb. 3.1:</b> Aufbau des Invasion Assays.....	41
<b>Abb. 4.1:</b> Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die Expression und Lokalisation von Rac1 .....	44
<b>Abb. 4.2:</b> Einfluss von E-Cadherin mit Deletion von Exon 8 auf die Aktivierung von Rac1 .....	46
<b>Abb. 4.3:</b> Komplexbildung von Rac1 mit dem Effektorprotein IQGAP1 .....	48
<b>Abb. 4.4:</b> Einfluss von E-Cadherin auf die Expression und Aktivierung von Cdc42	50
<b>Abb. 4.5:</b> Einfluss von E-Cadherin auf die Expression und Aktivierung von Rho ...	52
<b>Abb. 4.6:</b> Lokalisation von p120-Catenin in Abhängigkeit vom E-Cadherin-Status der Zellen .....	54
<b>Abb. 4.7:</b> Einfluss spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität der Rho GTPasen Rac1 und Rho .....	56
<b>Abb. 4.8:</b> Zell-Motilität in <i>wt</i> und <i>del 8</i> E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S-Zellen in Abhängigkeit von Rac1 und Rho Inhibitoren .....	59
<b>Abb. 4.9:</b> Einfluss von Rac1 und Rho Inhibitoren auf das invasive Verhalten von mutiertem E-Cadherin exprimierenden Zellen .....	61
<b>Abb. 5.1:</b> p120-Catenin vermittelt die negative Regulation der Rho Aktivität durch die E-Cadherin vermittelte Rac1 Aktivität.....	67

<b>Abb. 5.2:</b> Die Rolle von IQGAP1 bei der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell- Adhäsion .....	70
<b>Abb. 5.3:</b> Das Gleichgewicht zwischen der Rac1 und Rho Aktivität in beeinflusst den Phänotyp der Zelle .....	75

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 3.1:</b> Standardkurve.....	30
<b>Tabelle 3.2:</b> Lösungen zur Herstellung von Minigelen für SDS-PAGE.....	31
<b>Tabelle 3.3:</b> Antikörper Westernblot.....	34
<b>Tabelle 3.4:</b> Antikörper Immunfluoreszenz .....	36



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	auf
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes, vollentsalztes Wasser
Arp 2/3	<i>Actin-related protein 2/3</i>
AS	Aminosäure(n)
Bromphenolblau	Tetrabromphenolsulfonphthalein
bp	<b>base pair (Basenpaar)</b>
BSA	<b>bovine serum albumin</b> (Rinderserum-Albumin)
°C	Grad Celsius
C3T	<b>C3-Transferase</b>
Cdc42	<b>Cell division cycle 42</b>
Da	<b>Dalton</b>
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindiol
<i>del 8</i>	Deletion Exon 8 von E-Cadherin
DNA	<b>Deoxyribonucleic acid</b> (Desoxyribonukleinsäure)
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	<b>Ethylenediaminetetraacetic acid</b> (Ethylendiamintetraessigsäure)
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GAP	<b>GTPase activating protein</b>
GDI	<b>Guanine nucleotide dissociation inhibitor</b>
GDP	<b>Guanosindiphosphat</b>
GEF	<b>Guanine nucleotide exchange factor</b>
GTP	<b>Guanosintriphosphat</b>
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
IRSp53	<b>Insulin receptor substate p53</b>
IQGAP1	<b>IQ motif containing GTPase activating protein 1</b>
k	Kilo-
l	Liter
LIMK	<b>Lim domain containing kinase</b>
μ	mikro
m	Milli, Meter
M	molar
mDia	<b>mammalian Diaphanous protein 1</b>
min	Minute

## Abkürzungsverzeichnis

---

MLCK	<i>Myosin Light Chain Kinase</i>
Mock	Vektor-transfizierte Kontroll-Zelllinie MDA-MB-435S-pBat)
MW	<i>Molecular Weight</i> (Molekulargewicht)
n	Nano-
Na	Natrium
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
N-WASP	<i>Neural Wiskott-Aldrich-Syndrome Protein</i>
OD	Optische Dichte
p	Pico-
PAA	<b>P</b> olyacrylamid
PAK	<i>p21-Activated Kinase</i>
PKC	<b>P</b> rotein kinase <b>C</b>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rho	<i>Ras homologous (gene family)</i>
ROCK	<i>Rho-associated coiled-coil containing protein kinase</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	<b>R</b> aumtemperatur
s	Sekunde
TcdBF	<i>Toxin clostridium difficile B Serotyp F</i>
Tiam1	<i>T-lymphoma invasion and metastasis 1</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl-) aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen Sorbitan-monolaurat
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent)
WAVE	<i>WASP-like verprolin-homologous protein</i>
WT	<b>W</b> ildtyp
w/v	<i>weights per volume</i> (Gewichtsprozent)

## 1 Zusammenfassung

Die kleinen Rho GTPasen Rac1, Rho und Cdc42 sind an der Reorganisation des Actincytoskeletts beteiligt und spielen damit eine Schlüsselrolle in der Zell-Adhäsion, Zell-Migration und Zell-Invasion. Die Aktivität der Rho GTPasen wird durch E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion moduliert. Somatische E-Cadherin-Mutationen, welche die adhäsive Funktion von E-Cadherin beeinflussen, treten häufig beim diffusen Magenkarzinom auf. Durch seine Rolle in der Signaltransduktion der Rho GTPasen hat E-Cadherin einen direkten Effekt auf Signalwege, die an der Tumorentwicklung und -progression beteiligt sind. Daher stellte sich die Frage, ob tumor-assoziierte E-Cadherin Mutationen die kleinen Rho GTPasen Rac1, Rho und Cdc42 beeinflussen und ob ein Zusammenhang zwischen den Rho GTPasen und dem durch die Mutationen in E-Cadherin bedingten veränderten Phänotyp der Zellen besteht.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von E-Cadherin mit einer *in frame* Deletion von Exon 8, einer charakteristischen genetischen Alteration, die in Patienten mit diffusem Magenkarzinom identifiziert wurde, auf den Aktivierungsstatus der kleinen Rho GTPasen untersucht. Es wurden signifikant erniedrigte Rac1 Aktivitätsraten in MDA-MB-435S-Zellen beobachtet, die mit mutiertem E-Cadherin transfiziert worden waren im Vergleich zu Zellen, die das Wildtyp-Protein exprimierten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass diese Mutation das Rac1 *outside-in signalling*, d.h. den Signalfluss von adhäsiven Kontakten in die Zelle hinein, beeinflusst. IQGAP1 ist ein Effektorprotein von Rac1, das mit der GTP-gebundenen Form von Rac1 interagiert. In Übereinstimmung mit der erniedrigten Aktivität von Rac1 beim Vorliegen der E-Cadherin-Mutation war auch eine signifikant verminderte Komplexbildung zwischen Rac1 und IQGAP1 zu beobachten.

Im Gegensatz zu Rac1 wurden für Rho signifikant erhöhte Aktivitätsraten in MDA-MB-435S-Zellen beobachtet, die mit mutiertem E-Cadherin transfiziert worden waren, im Vergleich zu Zellen, die das Wildtyp-Protein exprimierten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Rac1 und Rho in MDA-MB-435S-Zellen gegensinnig durch E-Cadherin reguliert werden. Bei dem sogenannten „Bar-Sagi“ Signalweg wird Rho negativ durch aktives Rac1 unter anderem über p120-Catenin reguliert. Die kortikale Lokalisation von p120-Catenin ist dabei entscheidend für die

negative Regulation von Rho durch Rac1. Es konnte gezeigt werden, dass in Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimieren, die subzelluläre Lokalisation von p120-Catenin an den Zell-Zell-Kontakten stark vermindert ist.

Zusätzlich zu der bereits beschriebenen, durch mutiertes E-Cadherin bedingten erhöhten Zell-Motilität, konnte in dieser Arbeit auch eine erhöhte Zell-Invasion beobachtet werden. Die durch mutiertes E-Cadherin bedingte Motilitäts- und Invasionserhöhung der Tumorzellen konnte durch Rac1 und Rho Inhibitoren aufgehoben werden. Im Gegensatz zu Rac1 und Rho wurden keine signifikanten Unterschiede im Aktivierungsstatus der kleinen GTPase Cdc42 zwischen *wt* und mutiertem E-Cadherin nachgewiesen.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie die molekulare Verbindung zwischen der erniedrigten Zell-Adhäsion, der erhöhten Zell-Motilität sowie der erhöhten Zell-Invasion beim Vorliegen einer somatischen E-Cadherin-Mutation definiert. Diese Mutation verändert den zellulären Phänotyp der Tumorzelle und die kleinen Rho GTPasen Rac1 und Rho sind an der Vermittlung dieses Effekts beteiligt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Magenkarzinom

Trotz abnehmender Inzidenzzahlen gehört das Magenkarzinom aufgrund seiner schlechten Prognose zu den weltweit zweithäufigsten tumorbedingten Todesursachen (Chan, 2006; Panani, 2008; Parkin, 2001). In Deutschland stellt das Magenkarzinom mit über 18.800 geschätzten Neuerkrankungen pro Jahr einen der häufigsten malignen Tumore dar (Robert-Koch-Institut, [www.rki.de](http://www.rki.de)). Männer sind dabei, im Verhältnis etwa 3:2, etwas öfter betroffen als Frauen. Magenkrebs ist die fünfthäufigste Krebserkrankung bei Männern und bei Frauen die siebthäufigste (Robert-Koch-Institut, [www.rki.de](http://www.rki.de)). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei etwa 70 Jahren, bei Frauen bei über 75 Jahren (Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft epidemiologischer Krebsregister). Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten beim Magenkarzinom sind im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen für Männer wie für Frauen weiterhin eher schlecht und liegen bei 35 % bzw. 31 % (Robert-Koch-Institut, [www.rki.de](http://www.rki.de)). Eine Ursache für die schlechte Prognose des Magenkarzinoms ist, dass diese Krebsart im Frühstadium häufig symptomlos ist und dadurch in der Regel erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Die Aussicht auf Heilung ist dann aufgrund der begrenzten therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten gering.

Die Verteilung des Magenkarzinoms zeigt große geographische Unterschiede mit einem Häufigkeitsgipfel in Japan, vermutlich verursacht durch exogene Faktoren. Die Pathogenese des Magenkarzinoms repräsentiert somit ein klassisches Beispiel für Gen-Umwelt-Interaktionen. Als Risikofaktoren für die Entstehung eines Magenkarzinoms gelten in erster Linie Essgewohnheiten (z.B. nitrathaltige Speisen) sowie Genussgifte wie Alkohol und Nikotin. Auch bestimmte Erkrankungen des Magens, wie Typ B Gastritis, Morbus Ménétrier und die chronische Infektion mit *Helicobacter pylori*, gehen mit einem erhöhten Risiko für das Entstehen eines Magenkarzinoms einher. Zudem bestehen in 8-10 % der Fälle genetische Prädispositionen.

Histopathologisch wird das Magenkarzinom nach Laurén in diffuse und intestinale Fälle klassifiziert. Der prognostisch günstigere und besser differenzierte intestinale Typ ist ein überwiegend kompakter und gut begrenzter Tumor, der Drüsen bildet und

polypös in das Magenumen wächst. Der prognostisch ungünstigere und weniger differenzierte diffuse Typ ist ein schlecht begrenzter Tumor, der infiltrativ in die Magenwand wächst und anfällig für frühe Metastasenbildung ist. Mischformen aus beiden Typen sind möglich. Etwa 46 % aller Magenkarzinome sind dem intestinalen Typ und 37 % dem diffusen Typ zuzurechnen. Der Mischtyp (15-20 %) wird dem diffusen Typ zugeordnet.

Die molekularen Mechanismen, die dem Magenkarzinom zugrundeliegen, sind Alterationen in Tumorsuppressorgenen, Onkogenen, Regulatoren des Zellzyklus, in Zell-Adhäsionsmolekülen und DNA-Reparaturgenen. Zusätzlich trägt die genetische Instabilität der Telomerase-Aktivität zu dem vielstufigen Prozess der Karzinogenese des Magenkarzinoms bei (Panani, 2008; Tahara, 2004). Dem intestinalen und dem diffusen Type des Magenkarzinoms können dabei jeweils bestimmte Kombinationen an genetischen und epigenetischen Alterationen zugeordnet werden. Dies weist darauf hin, dass es sich bei der Tumorentstehung um unterschiedliche Signalwege handelt, die jeweils zum gut differenzierten, intestinalen Typ oder zum schlecht differenzierten, diffusen Typ führen (Tahara, 2004). Bei der Entstehung und Progression des sporadisch-diffusen Typs des Magenkarzinoms spielen Alterationen im Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin eine besondere Rolle. Neben der häufig verminderten Expression von E-Cadherin (20-90 %) (Mayer et al., 1993; Shimoyama and Hirohashi, 1991) wurden auch somatische Mutationen (41-50 %) (Becker et al., 1994) und seltener Keimbahn-Mutationen im E-Cadherin Gen (*CDH1*) (Gayther et al., 1998; Guilford et al., 1998; Keller et al., 1999; Richards et al., 1999) beobachtet, die insbesondere charakteristisch für den sporadisch diffusen Typ sind. Zusätzlich wurden für diesen Typ des Magenkarzinoms epigenetische Ereignisse wie die Promotor-Hypermethylierung des E-Cadherin Gens beschrieben (Panani, 2008). Weitere beobachtete Alterationen, die an der Karzinogenese des Magenkarzinoms beteiligt sind, betreffen die onkogene Aktivität von  $\beta$ -Catenin, Mutationen von APC und TP53, Amplifikationen im *c-Myc*-, *c-ErbB2*-, und *c-Met*-Gen, sowie Promotor-Hypermethylierung verschiedener Tumorsuppressorgene und Onkogene (Panani, 2008).

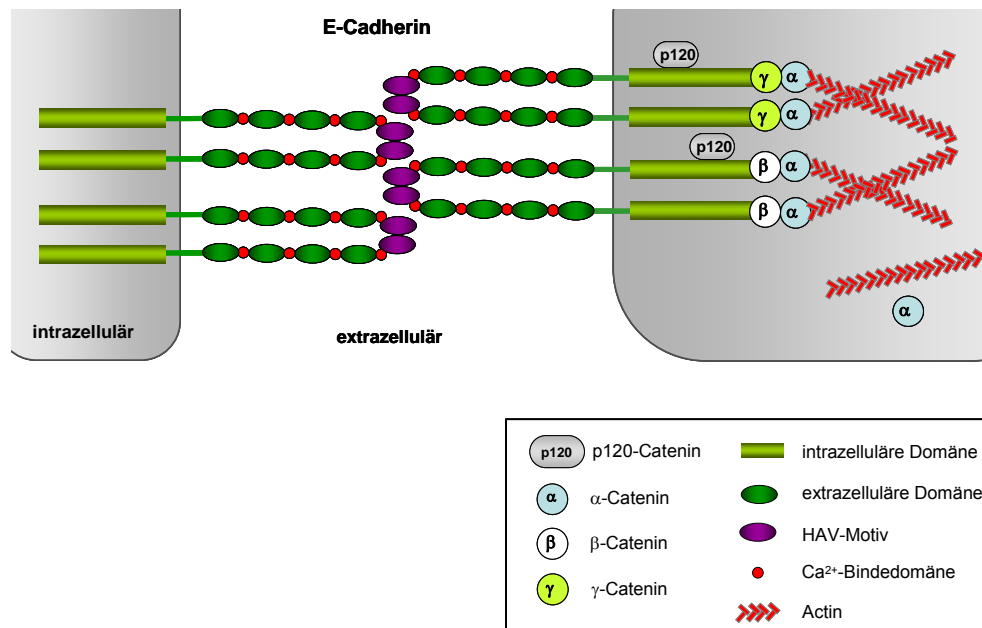
## 2.2 E-Cadherin

E-Cadherin ist ein Mitglied der Superfamilie der transmembranen Glycoproteine. Es besitzt eine Molekülmasse von 120 kD und gehört zur Familie der Cadherine, einer der fünf Hauptklassen von Adhäsionsmolekülen. Als klassisches Cadherin vermittelt E (epitheliales)-Cadherin die interzelluläre Adhäsion durch calcium-abhängige homophile Interaktion mit E-Cadherin-Molekülen benachbarter Zellen. E-Cadherin wird von epithelialen Zellen exprimiert und gehört zu den am häufigsten exprimierten Cadherinen. Strukturell zeichnen sich die klassischen Cadherine durch fünf extrazelluläre, eine Transmembran- sowie eine konservierte cytoplasmatische Domäne aus (Gumbiner, 2000; Takeichi, 1990). Die fünf extrazellulären Domänen sind in die calcium-abhängige, homophile Zell-Zell-Adhäsion der Cadherine involviert. Die ersten vier extrazellulären Domänen weisen alle im C-terminalen Bereich der Domäne je ein potentielles Calciumbindungsmotiv auf.

Die konservierte cytoplasmatische Domäne von E-Cadherin interagiert mit einer Reihe von Proteinen, die E-Cadherin mit dem Actincytoskelett verbinden (Onder et al., 2008) (Abb. 2.1). Zu diesen Proteinen gehören auch die Catenine  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und p120. Die juxtamembrane Region der intrazellulären Domäne von E-Cadherin interagiert mit p120-Catenin, die distale Region interagiert mit  $\beta$ -Catenin und/oder  $\gamma$ -Catenin (Plakoglobin), die wiederum an  $\alpha$ -Catenin binden. Zusammen bilden sie so den cytoplasmatischen Zell-Adhäsions-Komplex (auch Cadherin-Catenin-Komplex), welcher entscheidend für die Bildung von extrazellulären Zell-Zell-Adhäsionen ist (Grunwald, 1993; Gumbiner, 2000; Takeichi, 1990).  $\alpha$ -Catenin verbindet den Cadherin-Catenin-Komplex mit dem F-Actin des Cytoskeletts (Abe and Takeichi, 2008) und führt so zur Bildung einer vollständigen Adhärenzverbindung. Bisher wurde angenommen, dass  $\alpha$ -Catenin über das Actin-bindende Molekül EPLIN (*epithelial protein lost in neoplasm*) an das F-Actin des Cytoskeletts bindet (Abe and Takeichi, 2008). Neuere Studien deuten allerdings darauf hin, dass die Interaktionen zwischen dem Cadherin-Catenin-Komplex und dem Actincytoskelett komplexer und dynamischer sind als bisher angenommen (Weis and Nelson, 2006).

Adhärenzverbindungen dieser Art kommen in epithelialen Zellen vor und werden als Adhäsionsgürtel bezeichnet. Sie verleihen den Zellen Polarität und Festigkeit in Gewebeverbänden. Der Verlust dieser E-Cadherin-haltigen Adhärenzverbindungen - und damit der Verlust der interzellulären Kontakte - ist einer der ersten Schritte in der metastatischen Dissemination von Tumorzellen und wurde mit der malignen

Progression epithelialer Tumore assoziiert (Behrens and Birchmeier, 1994; Bracke et al., 1996).



**Abb. 2.1: Modell der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion**

E-Cadherin Moleküle besitzen in ihrer extrazellulären Domäne ein Histidin-Alanin-Valin (HAV)-Motiv, von dem man annimmt, dass es in Abhängigkeit von Ca<sup>2+</sup> mit dem HAV-Motiv des E-Cadherins der benachbarten Zelle interagiert. Neuere Studien weisen darauf hin, dass es sich um einen sehr flexiblen Bindungsmechanismus handelt bei dem es zwischen den Enden der extrazellulären Domänen von E-Cadherin sowohl zu *cis*- als auch *trans*- Interaktionen kommt. Durch dieses *Clustern* der Cadherine und durch die Interaktion des cytoplasmatischen Zell-Adhäsions-Komplexes, der aus α-, β-, γ- und p120-Catenin besteht, mit dem Actincytoskelett wird die Zell-Zell-Adhäsion gestärkt. Modifiziert nach Cavallaro und Christofori, 2004.

### 2.2.1 Bedeutung von E-Cadherin-Mutationen für die Tumorprogression

E-Cadherin ist für die Differenzierung, die strukturelle Integrität sowie für die Polarität verschiedener Gewebe außerordentlich wichtig. Der Verlust seiner physiologischen Funktion durch Mutation oder eine verminderte Expression korreliert mit der Fähigkeit der Tumorzellen zu infiltrieren und zu metastasieren (Birchmeier and Behrens, 1994; Hirohashi, 1998; Takeichi, 1993).

Eine Vielzahl von Studien belegt den Zusammenhang zwischen der Expression von E-Cadherin und der Ausprägung eines differenzierten Phänotyps sowie dem Verlust der Invasivität (Frixen et al., 1991; Vleminckx et al., 1991; Watabe et al., 1994). So konnte gezeigt werden, dass die Wiederherstellung eines funktionsfähigen Cadherin-



Catenin-Komplexes z.B. durch die forcierte E-Cadherin-Expression, zur Revision des invasiven, mesenchymalen Phänotyps in einen epithelialen Phänotyp kultivierter Tumorzellen führt (Birchmeier, 1994; Vleminckx et al., 1991).

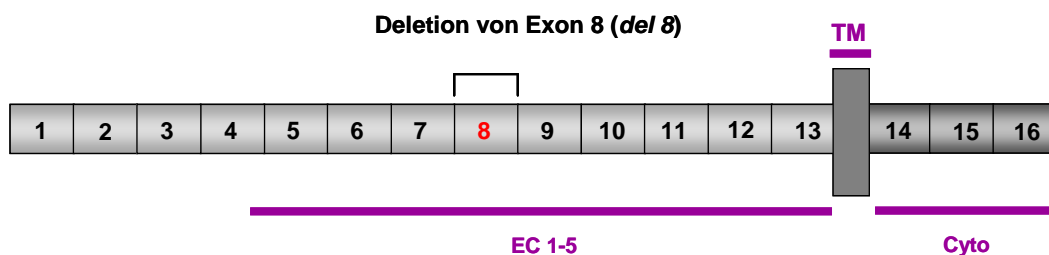
Zudem konnte in verschiedenen Tumorarten eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von E-Cadherin und dem invasiven Tumorwachstum, sowie der Gesamtüberlebenszeit (*overall survival*) der Patienten nachgewiesen werden (Oka et al., 1993; Schipper et al., 1991; Umbas et al., 1994). Aufgrund dieser Eigenschaften wird E-Cadherin, sowohl in Tumorzelllinien als auch in *in vivo* Tumormodellsystemen, als Invasions- und Tumorsuppressor angesehen (Birchmeier, 1994; Frixen et al., 1991; Vleminckx et al., 1991).

In humanen Tumoren kann der Verlust oder die Reduktion der E-Cadherin Expression durch eine Vielzahl genetischer Alterationen verursacht sein, wie z.B. durch somatische Mutationen, chromosomale Deletionen und Inaktivierung des *CDH1*-Promotors durch DNA-Hypermethylierung oder durch negativ regulierende Transkriptionsfaktoren. Mutationen im E-Cadherin Gen wurden bereits in Tumorzelllinien, in primären Tumoren und Metastasen vieler verschiedener Tumorarten (Becker et al., 1994; Berx et al., 1998; Birchmeier and Behrens, 1994; Hirohashi, 1998; Van Aken et al., 2001) einschließlich Magen- und Brustkarzinomen (Bukholm et al., 1998; Shino et al., 1995; Zschiesche et al., 1997) nachgewiesen.

### **2.2.2 E-Cadherin-Mutationen im Magenkarzinom**

Somatische E-Cadherin-Mutationen wurden für das diffuse Magenkarzinom, das lobuläre Mammakarzinom, das Endometrium- und Ovarialkarzinom sowie für das Schilddrüsenkarzinom beschrieben (Becker et al., 1994; Becker et al., 1993; Berx et al., 1998; Muta et al., 1996). Inaktivierende Mutationen treten allerdings nur in diffusen Magenkarzinomen und lobulären Mammakarzinomen gehäuft auf (Berox et al., 1998). Bei den somatischen E-Cadherin-Mutationen, die in ca. 50 % der diffusen Magenkarzinome auftreten, handelt es sich hauptsächlich um *Splice site*-Mutationen und *in frame*-Deletionen (Becker et al., 1994; Muta et al., 1996; Tamura et al., 1996). Die Mehrzahl dieser Mutationen ist in den Exons 8-9 lokalisiert. Diese Mutations-*Hotspot*-Region liegt innerhalb der zweiten und dritten extrazellulären Domäne von E-Cadherin und betrifft die Calciumbindestellen, die essentiell für die intakte calcium-vermittelte Zell-Adhäsion sind (Becker et al., 1994; Handschuh et al., 1999).

Im Zellsystem mit humanen MDA-MB-435S-Karzinomzellen führen diese beim diffusen Magenkarzinom detektierten Mutationen (Deletionen der Exons 8 oder 9) (Abb. 2.2) in E-Cadherin zu verminderter Zell-Adhäsion (Funktionsverlust) und zu erhöhter Zell-Motilität und Invasion (Funktionsgewinn) im Vergleich zum Wildtyp (*wt*) E-Cadherin-Protein. Die Tumorzellen mit den somatischen Mutationen weisen zudem auch eine Beeinträchtigung der proliferations-suppressiven Wirkung von E-Cadherin auf (Fricke et al., 2004). Alle diese funktionellen Veränderungen spielen eine wichtige Rolle in der Tumor- und Metastasenbildung. Neben somatischen Mutationen belegen Keimbahnmutationen im E-Cadherin Gen, die bei der familiären Form des diffusen Magenkarzinoms auftreten, dass genetische Alterationen im E-Cadherin Gen an der Karzinogenese des Magenkarzinoms beteiligt sind. E-Cadherin spielt demnach besonders im Magenkarzinom eine Rolle als Tumorsuppressor (Gayther et al., 1998; Guilford et al., 1998; Keller et al., 1999; Richards et al., 1999).



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der Exonstruktur von E-Cadherin mit der im diffusen Magenkarzinom detektierten Deletion von Exon 8

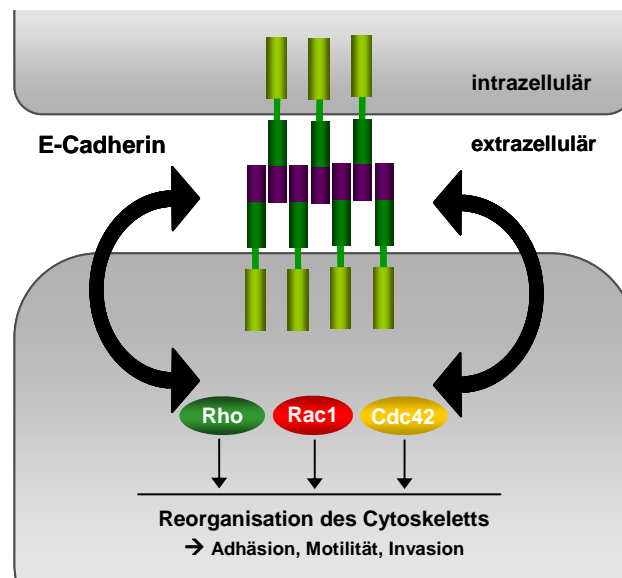
EC 1-5: Extrazelluläre Domäne 1-5, Cyto: Cytoplasmatische Domäne, TM: Transmembran-Domäne

### 2.2.3 Die Rolle von E-Cadherin in der Signaltransduktion

Zusätzlich zu seiner Funktion als Zell-Adhäsionsmolekül moduliert E-Cadherin auch zahlreiche Signaltransduktionswege indem es, wie alle klassischen Cadherine, als Zelloberflächenrezeptor fungiert, der durch Zell-Zell-Adhäsion aktiviert wird (Charrasse et al., 2002; Kovacs et al., 2002; Nakagawa et al., 2001; Noren et al., 2001).

Die homophile Interaktion der Ektodomäne von E-Cadherin reguliert neben der Signalweiterleitung der Rezeptor-Tyrosinkinase und Komponenten des WNT-Signalweges auch die intrazelluläre Signalweiterleitung der Familie der kleinen Rho GTPasen (Goodwin et al., 2003). Rho GTPasen sind an der Reorganisation des Actincytoskeletts beteiligt und spielen damit eine Schlüsselrolle in der Zell-Adhäsion, Zell-Migration und Zell-Invasion. Neben diesen Effekten der E-Cadherin-vermittelten Zell-Adhäsion auf die Aktivität der Rho GTPasen (*outside-in signalling*), wirken auch die Rho GTPasen auf die Adhärenzverbindungen ein (*inside-out signalling*) (Braga and Yap, 2005; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Schwartz, 2004). Es handelt sich also um eine bidirektionale Regulation (Abb. 1.3).

Durch seine Rolle in der Signaltransduktion der Rho GTPasen hat E-Cadherin einen direkten Effekt auf Signalwege, die an der Tumorentwicklung und -progression beteiligt sind. Ein Verlust der E-Cadherin-Funktion, und damit einhergehend ein Verlust der Regulation der Rho GTPasen-Signalübertragung, kann zur Erlangung eines motilen und invasiven Phänotyps führen, was einen wichtigen Schritt in der Tumorentwicklung und Metastasierung darstellt. Seine Funktion als Invasions- und Tumorsuppressor vermittelt E-Cadherin also nicht nur indem es als Zell-Adhäsionsmolekül die Integrität der Zellen im Gewebe gewährleistet (und damit Metastasierung und Invasion verhindert), sondern zusätzlich indem es als Rezeptormolekül ein komplexes Netz aus zahlreichen Signalwegen moduliert, die, im Falle ihrer Deregulierung, an der Metastasierung und Progression von Tumoren beteiligt sind (Onder et al., 2008).



**Abb. 2.3: Mechanismus der E-Cadherin Signaltransduktion durch die kleinen Rho GTPasen**

Der genaue Wirkungsmechanismus der E-Cadherin Signaltransduktion durch die kleinen Rho GTPasen Rho, Rac1 und Cdc42 ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Rac1 und Cdc42 in einer Reihe von Zelltypen durch E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Kontakte aktiviert werden, wohingegen Rho inaktiviert wird. Diese Regulation ist jedoch bidirektional, da auch die kleinen Rho GTPasen auf die Adhärenzverbindungen einwirken können.

### 2.3 Rho GTPasen

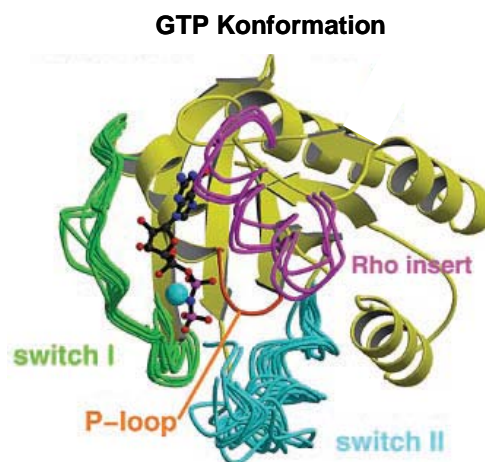
Die kleinen Guanin-Nukleotid-bindenden Proteine der Familie der Rho GTPasen besitzen ein Molekulargewicht von 21 kDa und gehören zu einer der fünf Untergruppen (Ras, Ran, Rab, Arf/Sar1 und Rho) der Ras (*rat sarcoma*)-Superfamilie. Wie die meisten Mitglieder der Ras Superfamilie agieren die Rho GTPasen als intrazelluläre Schalterproteine, die zwischen einer aktiven GTP (Guanosin-triphosphat)-gebundenen und einer inaktiven GDP (Guanosindiphosphat)-gebundenen Konformation wechseln. Die monomeren Rho (*ras homologous*) Proteine sind wichtige Regulatoren der Signaltransduktion, indem sie Signale ausgehend von den Rezeptoren zu den Effektoren weiterleiten und so verschiedenste Zellfunktionen beeinflussen. Die Rho GTPasen werden ubiquitär exprimiert und liegen hoch konserviert in den verschiedenen Organismen von Eukaryonten über Pflanzen bis zum Säugetier vor (Boureux et al., 2007). Im menschlichen Genom wurden bisher über 20 Gene ermittelt, die für die Proteine der Rho-Familie kodieren (Bernards and Settleman, 2005; Jaffe and Hall, 2005; Ridley, 2006). Die kleinen Rho GTPasen können aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenzidentität in acht

Unterfamilien (Rac, Rho, Cdc42, Rnd, RhoBTB, RhoH, RhoU/V und RhoD/F) mit jeweils mehreren Mitgliedern unterteilt werden (Boureux et al., 2007). So sind beispielsweise RhoA, RhoB und RhoC (mit einer Sequenzidentität von ca. 85% untereinander) die Mitglieder der Rho Unterfamilie während Rac1, Rac2, Rac3 und RhoG (ca. 88% Sequenzidentität untereinander) die Rac Unterfamilie bilden. Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit haben die Rho GTPasen unterschiedliche zelluläre Funktionen. Die am besten charakterisierten GTPasen der Rho-Familie RhoA, Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) und Cdc42 (*cell division cycle 42*) gehören zu den klassischen Rho GTPasen und sind Regulatoren des Cytoskeletts, die neben der dynamischen Reorganisation des Actincytoskeletts (Aspenstrom et al., 2004; Govek et al., 2005; Murphy et al., 1999) auch die Actomyosin-Kontraktilität und die Dynamik der Microtubuli regulieren (Jaffe and Hall, 2005). Zusätzlich zu der Reorganisation des Cytoskeletts, womit sie die Zell-Adhäsion, Zellmigration, Zellpolarität, Zellteilung sowie die Endo- und Exocytose beeinflussen (Etienne-Manneville and Hall, 2002), regulieren die Rho GTPasen auch weitere fundamentale zelluläre Vorgänge wie die Transkriptionsaktivität, die Proliferation, die Apoptose, die Zelldifferenzierung sowie den Zellzyklus (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997).

### 2.3.1 Struktur der kleinen Rho GTPasen

Die Familie der kleinen Rho GTPasen besitzt eine 21 kDa große G-Domäne, die aus 6  $\beta$ -Faltblättern, welche von 5  $\alpha$ -Helices umgeben sind, besteht. Die katalytische G-Domäne, die allen Mitgliedern der Ras-Superfamilie gemeinsam ist, bildet die grundsätzliche Voraussetzung für die Nukleotidbindung (Interaktion mit GDP und GTP) und die Hydrolyse von GTP zu GDP und Pi (GTPase-Aktivität) (Vetter and Wittinghofer, 2001). Die kleinen Rho GTPasen besitzen eine Sequenzidentität der GTPase-Domäne von 40 bis 95 % innerhalb der Familie (Wennerberg und Der, 2004). Strukturell unterscheiden sich die Rho Proteine von den anderen GTPasen der Ras-Superfamilie durch das sogenannte *Rho-Insert* (Abb. 2.4), das aus einer zusätzlichen  $\alpha$ -Helix besteht, welche zwischen dem fünften  $\beta$ -Faltblatt und der vierten  $\alpha$ -Helix in der GTPase Domäne liegt (Valencia et al., 1991). Die kleinen GTPasen enthalten N-terminal konservierte Motive, die u.a. für die Nukleotid-Bindung, die intrinsische GTPase-Aktivität und für den Nukleotidaustausch-

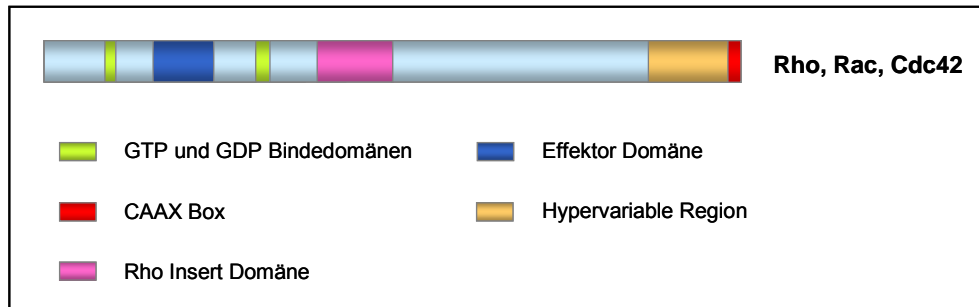
induzierten Konformationswechsel notwendig sind. Diese hoch konservierten Bereiche, die für die Bindung von Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*, GDIs), von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs), von GTPase-aktivierenden Proteinen (*GTPase activating proteins*, GAPs) und von Effektorproteinen notwendig sind, überlappen mit den sogenannten *switch I*- und *switch II*-Regionen (Dvorsky and Ahmadian, 2004), mit denen die kleinen Rho GTPasen ihre katalytische Funktion ausüben (Milburn et al., 1990).



**Abb. 2.4: Räumliche Darstellung der strukturellen Organisation der Rho GTPasen**

Die kleinen Rho Proteine besitzen das sogenannte *Rho-Insert* (13 Aminosäuren) und weisen untereinander eine starke Homologie auf. Sie verfügen über konservierte Motive zu denen auch die *switch I*- und *switch II*-Regionen gehören. Dies sind notwendig für die GTP/GDP-Bindung sowie für die GTPase Aktivität. Modifiziert nach Vetter und Wittinghofer, 2001.

Die beiden variablen Regionen (*switch*-Regionen) verändern abhängig vom gebundenen Nukleotid (GTP oder GDP) ihre Konformation. Neben dem N-terminalen Bereich, der u.a. die Nukleotidbindung und die Aktivität der Rho GTPasen durch den „switch“-Mechanismus reguliert, spielt auch der C-Terminus eine wichtige Rolle für die Funktion der kleinen Rho GTPasen. Nahezu alle GTPasen der Rho-Familie besitzen an ihrem C-Terminus ein konserviertes Cystein, welches Bestandteil der sogenannten *CAAX-Box* (C, Cystein; A, aliphatische AS; X, beliebige AS) (Abb. 2.5) ist und das nach posttranslationaler Modifizierung isoprenyliert vorliegt (Hakoshima et al., 2003). Die Isoprenylierung ermöglicht die Assoziation der Rho GTPase mit der Membran. Die subzelluläre Lokalisation an der Membran ist Voraussetzung für die biologische Funktion der GTPasen (Michaelson et al., 2001).



**Abb. 2.5: Schematische Darstellung der strukturellen Organisation der Rho GTPasen Rho, Rac und Cdc42**

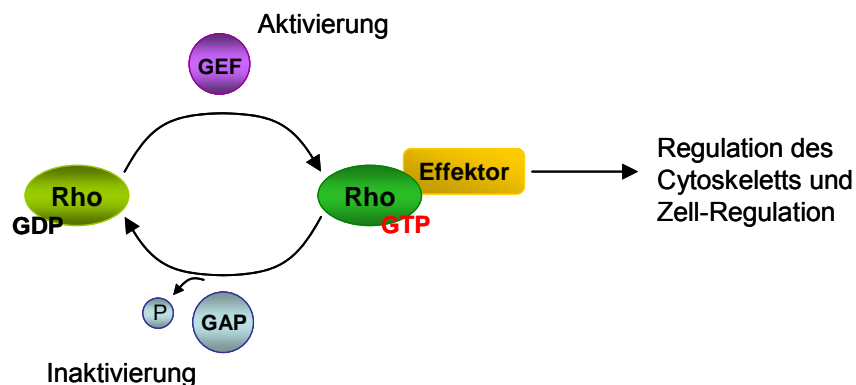
Die kleinen Rho GTPasen Rho, Rac und Cdc42 besitzen eine ähnliche Proteinstruktur, die aus verschiedenen Domänen besteht. Diese sind verantwortlich für die spezifische Interaktion mit GDP und GTP und für die GTPase-Aktivität, welche gebundenes GTP zu GDP und Pi hydrolysiert. Zusätzlich besitzen sie eine Effektor Domäne, über welche die kleinen GTPasen mit ihren nachgeschalteten Effektoren interagieren. In der hypervariablen Region besitzen die kleinen Rho GTPasen Rho, Rac und Cdc42 Sequenzidentität von 52% (Rho-Cdc42) bis 73 % (Rac1-Cdc42) untereinander. Modifiziert nach Vega und Ridley, 2008.

### 2.3.2 Der Rho GTPase Zyklus

Rho GTPasen sind Guanin-Nukleotid-bindende Proteine, die als intrazelluläre Schalterproteine agieren und zwischen ihrer inaktiven GDP-gebundenen und ihrer aktiven GTP-gebundenen Konformation wechseln (Hall, 1990) (Abb. 2.6). Nur in ihrer aktiven GTP-gebundenen Konformation interagieren die GTPasen mit ihren zahlreichen Effektormolekülen und regulieren über diese eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen. Das Vorkommen dieser beiden Zustände wird durch die Aktivität der drei regulatorischen Faktoren GAP, GEF und GDI bestimmt. In der ruhenden Zelle liegt die Rho GTPase überwiegend in der inaktiven GDP-gebundenen Form in einem Komplex mit GDI im Cytosol vor. Rho GDIs verhindern die spontane Ablösung von GDP und stabilisieren so die inaktive Konformation. Zudem verhindern sie die Interaktion mit der Plasmamembran, die für die Aktivierung der Rho GTPasen notwendig ist (Carpenter et al., 1999; Hansen and Nelson, 2001). Die Aktivierung der Rho GTPasen erfolgt meist über Oberflächenrezeptoren wie z.B. Cytokine, Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Adhäsionsrezeptoren (Kjoller and Hall, 1999).

Zur Aktivierung der GTPasen müssen diese an die Membranen transportiert werden, wo eine Dissoziation des GDI-GTPase-Komplexes stattfindet. Die GTP-GDP Austauschreaktion findet in den sogenannten *switch I*- und *switch II*-Domänen statt

und wird von GEFs (z.B. Tiam1, Vav2) reguliert. Diese binden an den GTPase/GDI Komplex, begünstigen das Ablösen von GDP und fördern so das Binden von GTP (dessen Gehalt in der Zelle um das 10 fache höher ist als der von GDP) an die „leeren“ Bindungsstellen. Die aktive GTP-gebundene Konformation der Rho GTPasen ist mit der Zellmembran assoziiert, wo sie mit ihren spezifischen Effektormolekülen interagiert und über diese ihre vielfältigen zellulären Funktionen ausübt. Bis heute sind über 50 Effektoren für Rho, Rac und Cdc42 beschrieben worden, bei welchen es sich hauptsächlich um Proteinkinasen (Serin /Threonin Kinasen und Tyrosin Kinasen), Lipidkinasen, Phospholipasen, Oxidasen und Gerüstproteine handelt (Jaffe and Hall, 2005). Die Weiterleitung des Signals bleibt solange aufrechterhalten, bis es zur Hydrolyse des Rho GTPase/GTP-Komplexes kommt. Die Hydrolyse wird durch GAPs katalysiert, die die intrinsische GTPase Aktivität stimulieren und die GTP-gebundene aktive Konformation der Rho GTPase in ihre inaktive GDP-gebundene Konformation konvertieren.



**Abb. 2.6: Der GTPase Zyklus kleiner Rho GTPasen**

Rho GTPasen fungieren als intrazelluläre binäre Schalter, die zwischen einer GTP-gebundenen aktiven Form und einer GDP-gebundenen inaktiven Form wechseln und Signaltransduktionswege regulieren. Die Aktivität der Rho GTPasen wird dabei durch die GEFs, die GAPs und GDIs bestimmt. Bis heute sind ca. 80 verschiedene GAPs und 70 verschiedene GEFs im humanem Genom identifiziert worden (Heasman and Ridley, 2008). Modifiziert nach Malliri und Collard, 2003.

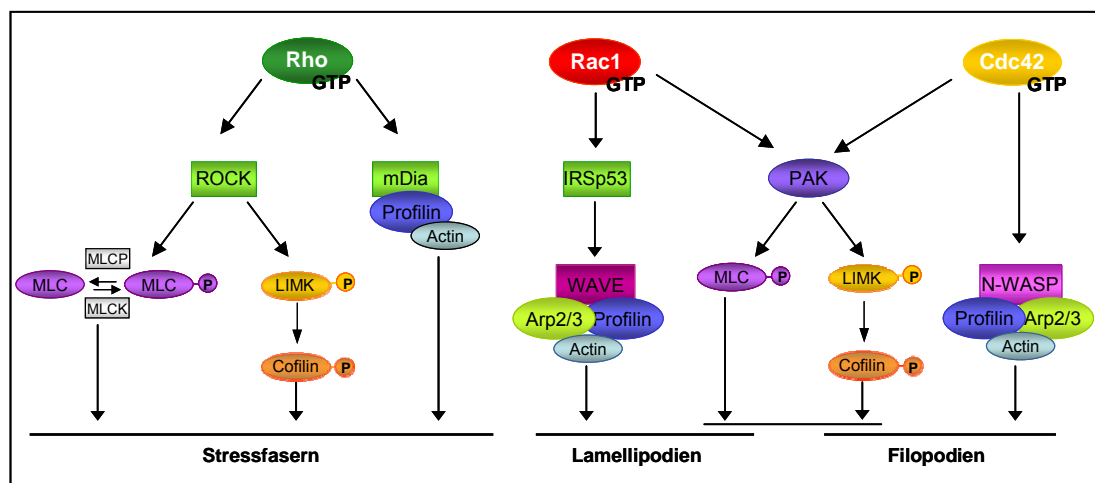
Zusätzlich zu den regulatorischen Faktoren (GAPs, GEFs und GDIs), die die Aktivität der Rho GTPasen bestimmen, können auch Mutationen und bakterielle Toxine die Aktivität der kleinen GTPasen beeinflussen. So resultieren bestimmte Punktmutationen in der Sequenz der Rho GTPasen in einer entweder konstitutiv aktiven Form (z.B. Cdc42V12, RacL61, RhoV14) - durch Inhibierung der GTPase



Aktivität - oder in einer dominant negativen Form (z.B. Cdc42N17, RacN17 und RhoN17) durch Inhibierung der Interaktion mit ihren nachgeschalteten Effektoren (Heasman and Ridley, 2008). Daneben können bakterielle Toxine spezifische Rho GTPasen durch Ribosylierung oder Glykosylierung kovalent modifizieren und sie dadurch (z.T. irreversibel) inhibieren (Lerm et al., 2000).

### 2.3.3 Rho GTPasen und das Cytoskelett

Neben einer Vielzahl von weiteren physiologischen Funktionen wie der Regulation der Gentranskription und des Zellzyklus, der Proliferation, der Apoptose und der Zelldifferenzierung ist die bekannteste und am besten charakterisierte Funktion der Rho Proteine die Regulation und Umstrukturierung des Cytoskeletts. Obwohl sowohl Rho, als auch Rac1 und Cdc42 an der Reorganisation des Cytoskeletts beteiligt sind, üben sie unterschiedliche Effekte auf die Zellmorphologie und Zell-Motilität aus (Sorokina and Chernoff, 2005; Wennerberg and Der, 2004). (Abb. 2.7)



**Abb. 2.7: Rho GTPasen und ihre Effektorproteine**

Durch Rho, Rac1 und Cdc42 aktivierte Signaltransduktionswege, die zur Reorganisation des Actincytoskeletts und damit zur Bildung von Stressfasern (Rho), Lamellipodien (Rac1) und Filopodien (Cdc42) beitragen. Modifiziert nach Bishop und Hall, 2000.

Rho reguliert das Actincytoskelett, indem es die Actin-Myosin-Kontraktion und die Actinpolymerisation vermittelt. Darüber steuert Rho die Bildung von Stressfasern und die Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten (zelluläre Strukturen, an die die extrazelluläre Matrix mittels Integrinen an das Actincytoskelett gekoppelt ist) welche wiederum die Zellform, die Zell-Matrix-Adhäsion und die Zell-Motilität bestimmen

(Wennerberg and Der, 2004). Die beiden Rho Effektorproteine ROCK (*Rho-associated coiled coil kinase*), eine Serin/Threonin-Kinase und mDia (*mammalian Diaphanous protein 1*), ein Protein aus der Formin-Familie, spielen Schlüsselrollen in der Regulation des Actincytoskeletts (Ishizaki et al., 2001; Wasserman, 1998). Über ROCK inaktiviert Rho die MLC (*Myosin-Light-Chain*)-Phosphatase durch die Phosphorylierung des Enzyms. Zusätzlich kann ROCK MLC auch direkt phosphorylieren (Riento and Ridley, 2003). Hierdurch liegen mehr leichte Ketten in den Myosinmolekülen phosphoryliert vor, wodurch die Myosinaktivität zunimmt. Dies führt wiederum zur verstärkten Actin-Myosin-Interaktion und zu einer vermehrten Ausbildung von kontraktilen Actin-Stressfasern und schließlich zur Zellkontraktion (Kawano et al., 1999). Ein weiteres Substrat von ROCK ist die LIM-Kinase (*LIM domain kinase*), die ihrerseits Cofilin durch Phosphorylierung inhibiert (Maekawa et al., 1999). Das Fragmentierungsprotein Cofilin ist danach nicht mehr in der Lage Actin zu depolymerisieren, was letztlich zur Stabilisierung der Actinfilamente führt (DesMarais et al., 2005). Die Aktivierung des RhoA Effektorproteins mDia führt zu dessen Interaktion mit dem G-Actin-bindenden Protein Profilin. Profilin fördert die Polymerisation von G-Actin und führt so schließlich zur Ausbildung und Elongation von Actinfilamenten. Zusätzlich verhindert die Bindung von mDia am Plusende der Actinfilamente eine Anlagerung von „capping“-Proteinen (z. B. Gelsolin), die die Actinpolymerisation verhindern (Bishop and Hall, 2000). Über einen unbekanntem Mechanismus bewirkt die Aktivierung von mDia durch Rho auch die Stabilisierung der Microtubuli (Raftopoulou and Hall, 2004).

Die Regulation des Actincytoskeletts durch Rac erfolgt durch die Bindung von aktiviertem Rac über IRSp53 (*insuline receptor substate p53*) an das Effektorprotein WAVE (*Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein*), welches dadurch aktiviert wird. Nach Anlagerung des Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*)-Komplexes an WAVE kommt es zur Actinnukleation und Actinpolymerisation (Schwartz, 2004), was zur Ausbildung von Lamellipodien (flachen Ausstülpungen der Zellmembran) und Membrankräuselungen (*membrane ruffles*) führt. Lamellipodien befinden sich am Leitsaum der wandernden Zelle und bestehen aus netzwerkartig polymerisiertem Actinfilamenten. Sie sind in der Lage neue, adhäsive Kontakte zu initiieren und treiben die Zelle bei der Zellmigration voran (Ehrlich et al., 2002; Jacinto et al., 2000; Vasioukhin et al., 2000).

Auch die durch Cdc42 regulierte Reorganisation des Actincytoskeletts erfolgt über ein Mitglied der Wiskott-Aldrich Syndrom Protein Familie. Die direkte Interaktion von Cdc42 mit seinem Effektor N-WASP (*neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*) führt hingegen nach Assoziation des Arp2/3-Komplexes zur Ausbildung von dünnen, fingerförmigen Ausstülpungen der Plasmamembran, den Filopodien (Small et al., 2002). Filopodien bestehen aus Bündeln von Actinfilamenten, die durch actin-bindende Proteine vernetzt sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Cdc42 mit mDia interagiert, wodurch es zur Elongation von parallelen Actinfilamenten kommt (Olson, 2003; Villalonga and Ridley, 2006). Über die Aktivierung der aPKC (*atypical protein kinase C*) im Par6/aPKC-Komplex reguliert Cdc42 die Polarität der Zellen in der zielgerichteten Migration (Etienne-Manneville and Hall, 2001).

Weitere Effektorproteine von Rac und Cdc42, die an der Regulation des Cytoskeletts beteiligt sind, sind Serin/Threonin-Kinasen (z. B. PAK, *p21-activated kinase*), Actin-assoziierte Proteine (z. B. IQGAP1, *IQ motif containing GTPase activating protein 1*) und Lipidkinasen (z. B. PI3-Kinase). Die Aktivierung der LIM-Kinase erfolgt durch das Rac1 und Cdc42 Effektorprotein PAK. Neben dem Actincytoskelett regulieren Rac1 und Cdc42 über PAK auch die Organisation der Mikrotubuli, indem aktiviertes PAK den Mikrotubuli-Destabilisierungsfaktor Op18/Stathmin phosphoryliert und dadurch inhibiert, was zur Verlängerung der Mikrotubuli-Enden führt.

### **2.3.4 Zell-Zell-Adhäsion**

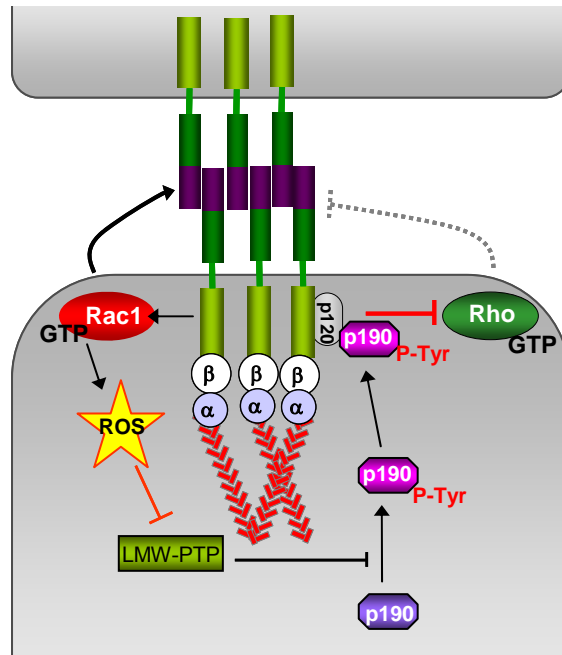
In Epithelzellen regulieren die kleinen GTPasen der Rho Familie über das Actincytoskelett die Etablierung und Aufrechterhaltung der Adhärenzverbindungen, die für die Barrierefunktion des Epithels und die Etablierung einer apical-basolateralen Zellpolarität notwendig sind (Braga, 2000; Fukata and Kaibuchi, 2001). Rac1 reguliert dabei im Zusammenspiel mit Rho und Cdc42 die Bildung und Stabilisierung des Zell-Adhäsions-Komplexes. So konnte in zahlreichen Studien an Epithelzellen gezeigt werden, dass Rac1 und Cdc42 durch die homophile E-Cadherin Bindung an den Zell-Adhäsions-Komplex rekrutiert und aktiviert werden (Braga et al., 1997; Kim et al., 2000; Nakagawa et al., 2001; Noren et al., 2001). Rac1 kolokalisiert mit E-Cadherin an Adhärenzverbindungen und wird in das Cytosol transloziert, wenn die E-Cadherin vermittelte Zell-Adhäsion durch Calciumentzug

verloren geht (Nakagawa et al., 2001). Der genaue Wirkmechanismus der Rac1 Aktivierung durch E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion ist noch nicht vollständig geklärt. So konnte eine Rolle für die PI3-Kinase und den Rac1-spezifischen Aktivator Tiam1 in einigen (Cavallaro and Christofori, 2004; Hordijk et al., 1997; Vivanco and Sawyers, 2002) aber nicht in allen (Ehrlich et al., 2002; Nakajima et al., 2001) Studien gezeigt werden. Die widersprüchlichen Ergebnisse beruhen dabei wahrscheinlich auf der Verwendung unterschiedlicher Zelltypen und Versuchsbedingungen. Aktiviertes Rac1 und Cdc42 üben, durch Regulierung der lokalen Aktivität des Arp2/3 Komplexes (Pollard and Borisy, 2003; Yamada and Nelson, 2007), Umstrukturierungen des Actincytoskeletts aus, die mit der E-Cadherin-vermittelten Kontaktbildung assoziiert sind und zu deren Stabilisierung führen (Hordijk et al., 1997; Noren et al., 2003; Takaishi et al., 1997). Neben den Effekten der E-Cadherin-vermittelten Zell-Adhäsion auf die Aktivität der Rho GTPasen (*outside-in signalling*), wirken die Rho GTPasen also ihrerseits auf die Adhärenzverbindungen ein (*inside-out signalling*) (Fukata and Kaibuchi, 2001). Dies deutet darauf hin, dass es sich um einen bidirektionalen Signalweg (*positive feedbackloop*) zwischen E-Cadherin und den Rho GTPasen handelt, der zur Erhaltung und Stabilisierung der Adhärenzverbindungen beiträgt.

Einen weiteren Effekt auf die Zell-Zell-Adhäsion üben aktiviertes Rac1 und Cdc42 über das Effektormolekül IQGAP1 aus. Das Actin-bindende Protein IQGAP1 reguliert die E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion negativ, indem es mit  $\beta$ -Catenin interagiert und  $\alpha$ -Catenin aus dem Zell-Adhäsions-Komplex verdrängt. In seiner GTP-gebundenen aktiven Form verhindert Rac1 bzw. Cdc42 die Bindung von IQGAP1 an  $\beta$ -Catenin und stabilisiert somit die Cadherin-vermittelte Zell-Adhäsion (Fukata et al., 1999).

Im Gegensatz zu Rac1 und Cdc42 wird die Aktivität von Rho durch homophile E-Cadherin Interaktion inhibiert (Lampugnani et al., 2002; Noren et al., 2001). Der Wirkungsmechanismus beruht darauf, dass Rho GTPasen sich gegenseitig regulieren (Nobes and Hall, 1995a). So wurde gezeigt, dass Rac1 als Gegenspieler von Rho agieren kann und in der Lage ist, über den sogenannten „Bar-Sagi“ Signalweg (Abb. 2.8), die Rho Signalweiterleitung zu inhibieren (Niessen and Yap, 2006; Nimnual et al., 2003). Der *Crosstalk* zwischen den beiden Rho GTPasen wird dabei über p120-Catenin vermittelt (Wildenberg et al., 2006). Das durch die homophile Interaktion von E-Cadherin aktivierte Rac1, verursacht die Translokation von

p190RhoGAP, einem GTPase aktivierenden Protein, an die Zell-Zell-Kontakte, wo es über die Interaktion mit p120-Catenin an den Zell-Adhäsions-Komplex bindet. Durch seine kortikale Lokalisation an der Zellmembran ist p190RhoGAP in der Lage an sein Substrat Rho zu binden, wodurch es zur Hydrolyse von GTP zu GDP und damit zur Inaktivierung von Rho kommt.



**Abb. 2.8: Negative Regulation der Rho Aktivität durch E-Cadherin vermittelte Rac1 Aktivität**

Durch Zell-Zell-Adhäsion aktiviertes Rac1 inhibiert Rho über den „Bar-Sagi“ Signalweg, der über die Generierung von ROS (*reactive oxygen species*) und anschließender Inaktivierung der LMW-PTP (*low molecular weight phosphatase*) zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von p190RhoGAP (p190) führt. Dies bewirkt die Translokation von p190RhoGAP, einem Inaktivator von Rho an die Zell-Zell-Kontakte, wo es über die Interaktion mit p120-Catenin (p120) an den Zell-Adhäsions-Komplex bindet. Durch seine kortikale Lokalisation ist phosphoryliertes p190RhoGAP in der Lage, membranständiges GTP-gebundenes Rho zu inaktivieren und somit die Rho Signalweiterleitung zu inhibieren. Modifiziert nach Niessen und Yap, 2006.

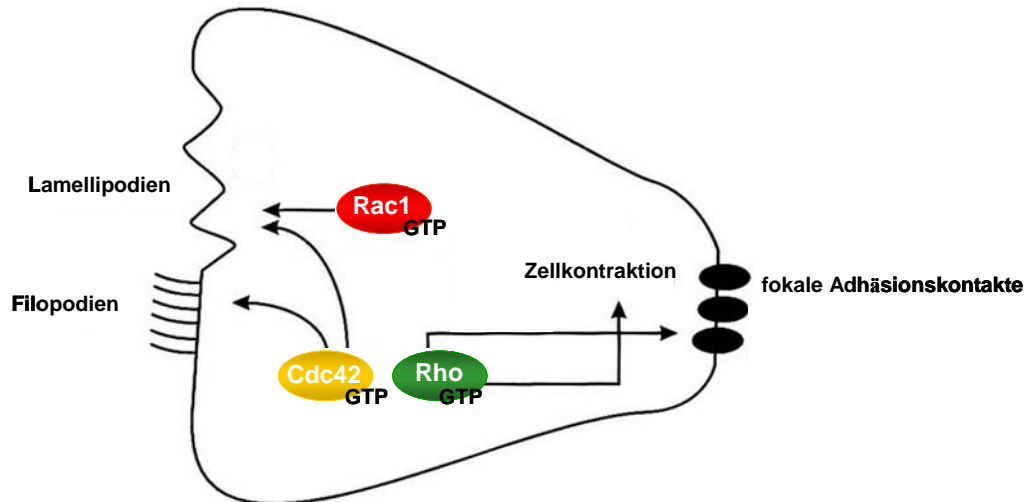
Die Effekte der kleinen Rho GTPasen auf das Actincytoskelett, das an diversen Aspekten der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt ist, beruhen auf einem feinregulierten Zusammenspiel von E-Cadherin vermittelter Zell-Adhäsion und der durch Rho GTPasen regulierten Migration. Diese Effekte sind zum Teil gegensätzlich und scheinen stark abhängig vom untersuchten Zelltyp und Zellkontext zu sein.

### 2.3.5 Zellmigration und Invasion

Die Zellmigration ist eine wichtige Voraussetzung physiologischer Prozesse wie der embryonalen Entwicklung (Morphogenese), der Wundheilung und der Immunabwehr. Sie ist aber auch entscheidend an pathologischen Prozessen wie der Tumorentwicklung beteiligt (Ridley, 2001). So ist die Erlangung eines motilen und invasiven Phänotyps ein wichtiger Schritt in der Tumorprogression. Für diesen Schritt ist die Aufhebung der Zell-Zell-Kontakte, der Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) und der Zell-Matrix Interaktionen und schließlich die Bewegung der Zelle nötig. Das Actincytoskelett ist maßgeblich an diesen Vorgängen beteiligt und wird durch die Rho GTPasen reguliert. Rho, Rac1 und Cdc42 modulieren dabei eine Vielzahl von Signalwegen die mit der Umstrukturierung des Cytoskeletts, der Zell-Adhäsion und der Zellmigration assoziiert sind (Malliri and Collard, 2003; Sander and Collard, 1999). Die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen ist eine direkte Folge der Deregulierung dieser Signalwege (Baugher et al., 2005).

Migrierende Zellen durchlaufen vier verschiedene Phasen während der Fortbewegung: die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien am Leitsaum der Zelle, die Etablierung neuer Zell-Matrix-Interaktion, die Kontraktion der Zelle und das Zurückziehen des Zellkörpers (Lauffenburger and Horwitz, 1996).

Wie bereits geschildert vermittelt aktives Rac - das am Leitsaum der migrierenden Zelle lokalisiert ist - aber auch Cdc42 zum einen durch Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (Pollard and Borisy, 2003) zum anderen durch die Aktivierung der LIM-Kinase (Edwards et al., 1999), die Bildung von Actinfilamenten bzw. die Actinpolymerisation am vorderen Ende der migrierenden Zelle und schiebt dadurch den Leitsaum der Membran vorwärts (Bar-Sagi and Hall, 2000; Jaffe and Hall, 2005). Rho hingegen generiert am hinteren Ende der Zelle die Actomyosin Kontraktilität durch ROCK vermittelte MLC-Phosphorylierung, wodurch der Zellkörper nach vorne bewegt wird (Jaffe and Hall, 2005; Riento and Ridley, 2003). Zusätzlich sind alle drei GTPasen an der Zell-Matrix-Adhäsion, also an der Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten, beteiligt (Nobes and Hall, 1995b; Ridley and Hall, 1992a, 1992b).



**Abb. 2.9: Das Zusammenspiel der kleinen Rho GTPasen in der Zell-Migration**

Rac1 und Cdc42 bilden Lamellipodien am vorderen Ende der Zelle aus, wodurch der Leitsaum der Zelle vorwärts geschoben wird. Cdc42 vermittelt zusätzlich die Ausbildung von Filopodien und spielt eine Rolle in der Polarisierung der migrierenden Zelle. Der Zellkörper wird durch die Rho vermittelte Zellkontraktion nach vorne bewegt. Durch Inhibition von Rho werden die fokalen Adhäsionskontakte am hinteren Ende der Zelle aufgehoben. Schließlich löst sich die Retraktionsfaser der Zelle vom Substrat ab und wird nachgezogen. Modifiziert nach Bar-Sagi und Hall, 2000.

Die Invasion von epithelialen Tumoren wird initiiert, wenn die Integrität des Epitheliums verloren geht und maligne Zellen die Basallamina durchbrechen und in das darunterliegende Stroma einwandern (Vega and Ridley, 2008).

An dem Prozess der Zell-Invasion ist zusätzlich zu den Veränderungen der Zell-Zell- und der Zell-Matrix-Adhäsion sowie der Zellmigration auch die proteolytische Umstrukturierung der extrazellulären Matrix beteiligt (Guo and Giancotti, 2004; Mareel and Leroy, 2003). Die Proteolyse der EZM, u.a. durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs), erlaubt es den Zellen die Basallamina zu durchdringen. Es konnte gezeigt werden, dass die Rho Proteine neben der Zellmigration auch die Expression von Genen regulieren, die an der Proteolyse der EZM beteiligt sind (Ridley, 2004). So erhöht Rac1 beispielsweise die Expression der Metalloprotease Inhibitoren TIMP1 und 2 in renalen Karzinomzellen und inhibiert dadurch die Invasion *in vitro* (Engers et al., 2001).

Der Rac1 Aktivator Tiam1 und konstitutiv aktives Rac (RacV12) unterdrücken - vermutlich durch Zunahme der adhäsiven Eigenschaften - die Invasion epithelialer Zellen (Hordijk et al., 1997). Andererseits konnte gezeigt werden, dass beide Proteine

die Invasion von T-Lymphozyten induzieren (Habets et al., 1994; Michiels et al., 1995). Eine Reihe von Publikationen zeigt, dass die Rho/ROCK Signalübertragung an vielen Aspekten der Tumorzell dissemination beteiligt ist. Sie ist notwendig für die Invasion von Tumorzellen durch amöboide Bewegung in eine dreidimensionale Matrix (Sahai and Marshall, 2002a) und für das Durchbrechen der Basallamina (Itoh et al., 1999). Die Effekte der Rho GTPasen auf das Cytoskelett und damit auf die Migration und Invasion sind stark abhängig vom Zelltyp und Zellkontext.

### **2.3.6 Bedeutung der Rho GTPasen Rho, Rac und Cdc42 für die Tumorprogression**

Rho GTPasen sind Signalmoleküle, die an der präzisen Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind. Im Falle ihrer Deregulierung sind sie in verschiedene Aspekte der Tumorentwicklung, wie z.B. der Invasion, Metastasierung, Dedifferenzierung und der Angiogenese involviert (Gomez del Pulgar et al., 2005). Im Laufe der Tumorprogression, bei der es zum Übergang von normalen zu malignen Zellen kommt, werden invasive und migratorische Fähigkeiten erworben, durch welche die Tumorzellen metastasieren können (Lozano et al., 2003). Die kleinen Rho GTPasen sind in verschiedene Stufen der zellulären Transformation involviert, unter anderem in Veränderungen des Adhäsionsstatus der Tumorzellen (Lozano et al., 2003). Studien haben gezeigt, dass mehrere Rho GTPasen, darunter auch Rho, Rac und Cdc42 an dem invasiven Verhalten und verstärkten metastatischen Potential von Tumorzellen beteiligt sind, und dass dies mit einer erhöhten Expression (auf mRNA-Ebene und/oder auf Protein-Ebene) und Aktivität in einer Vielzahl von menschlichen Tumoren korreliert (Aronheim et al., 1998; Gomez del Pulgar et al., 2005; Gouw et al., 2005).

Beispiele hierfür sind die Überexpression von RhoA, RhoC (Kleer et al., 2002; van Golen et al., 2000) und Cdc42 (Olson and Sahai, 2008) beim Mammakarzinom, die Hochregulation von Rac1 beim Mammakarzinom (Fritz et al., 2002; Schnelzer et al., 2000) und Prostatakarzinom (Olson and Sahai, 2008), die verstärkte Expression von RhoA (Fritz et al., 2002) und einer *splice* Variante von Rac1, Rac1b (Jordan et al., 1999) beim Colonkarzinom, von RhoA und Rac2 (Abraham et al., 2001) bei Kopf- und Halstumoren, von RhoA (Fritz et al., 2002) bei Lungentumoren sowie von RhoC



beim Melanom (Clark et al., 2000), beim duktalem Pankreasadenokarzinom (Suwa et al., 1998) sowie beim Magenkarzinom (Kondo et al., 2004).

Die Expression und/oder Aktivität von RhoA und RhoC ist häufig in menschlichen Tumoren erhöht (Abraham et al., 2001; Gomez del Pulgar et al., 2005). Zudem konnte eine Beteiligung von RhoA an fast allen Stadien der Tumorentwicklung nachgewiesen werden (Vega and Ridley, 2008). Auf der anderen Seite scheinen einige Mitglieder der Rho Familie bei manchen Tumorarten eine Rolle als Tumorsuppressor zu spielen, da sie in diesen deletiert, mutiert oder herabreguliert sind (Vega and Ridley, 2008). So ist RhoB in Tumoren häufig herabreguliert (Gomez del Pulgar et al., 2005) und seine Expression korreliert invers mit der Aggressivität des Tumors (Huang and Prendergast, 2006).

Im Gegensatz zu den drei Isoformen der Ras GTPase (Ki-Ras, N-Ras und Ha-Ras), bei denen in 15 % aller menschlichen Tumoren aktivierende Mutationen vorliegen, wurden in Rho Proteinen bisher nur sehr selten solche Mutationen detektiert (Vega and Ridley, 2008). Zu den bis heute bekannten tumorassoziierten Mutationen gehört, neben RhoH, mutiert im B-Zell Lymphom (Aspenstrom et al., 2007), Rac1b, das eine erhöhte Expression in kolorektalen Karzinomen (Jordan et al., 1999) und in Brusttumoren (Gomez del Pulgar et al., 2005) zeigt. Rac1b ist eine *splice* Variante von Rac1, die aufgrund eines verstärkten intrinsischen Nukleotidaustausches, einer reduzierten intrinsischen Hydrolyseaktivität und einer verminderten Sensibilität gegenüber der Inhibition durch GDI konstitutiv aktiv ist.

Neben den Rho Proteinen wurden auch Komponenten der Rho GTPasen-Signalübertragung, wie z.B. einige Rho Regulatoren (GEFs, GAPs und GDIs) als Proto-Onkogene in humanen Tumoren identifiziert (Gomez del Pulgar et al., 2005). Es gibt Hinweise, dass die Effektoren PAK-1 und ROCK die Tumordinvasivität beeinflussen (Li and Lim, 2003). So konnte gezeigt werden, dass die verstärkte Expression oder Aktivität von ROCK oder MLCK und deren nachgeschalteten Signalwegen mit der Migration der Tumorzellen *in vitro* sowie der Invasion und Tumorprogression *in vivo* korreliert (Clark et al., 2000; Itoh et al., 1999; Kaneko et al., 2002; Sahai et al., 2001).

Die Rho GTPasen sind an nahezu allen Aspekten der Tumorprogression beteiligt. Obwohl sie durch eine Vielzahl zellulärer Prozesse (z.B. durch die Gentranskription, Zellteilung, Zellüberleben etc.) an der Krebsentwicklung beteiligt sein können,

tragen sie als Regulatoren des Cytoskeletts wohl vor allem zur Migration und Invasion der Krebszellen bei (Vega and Ridley, 2008).

Einer der ersten Schritte, die zur metastatischen Dissemination von Tumorzellen führen, ist die Aufhebung der E-Cadherin vermittelten Adhärenzverbindungen. Da die Bildung von E-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Adhäsion mit der Reorganisation des Actincytoskeletts assoziiert ist, welche durch die kleinen GTPasen reguliert wird, sind Kenntnisse über Veränderungen dieses feinregulierten Gleichgewichts während der zellulären Transformation wichtig im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapien (Lozano et al., 2003).

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Mutationen in E-Cadherin spielen eine wichtige Rolle beim Magenkarzinom und sind mit einem erhöhten Migrations- und Invasionspotential von Tumorzellen assoziiert. Die Wirkmechanismen hierfür sind noch nicht genauer geklärt. Die kleinen Rho GTPasen Rac1, Rho und Cdc42 sind an der Reorganisation des Actincytoskeletts beteiligt und spielen damit eine Schlüsselrolle bei der Zell-Adhäsion, -Migration und -Invasion.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob Mutationen in E-Cadherin, welche mit dem diffusen Magenkarzinom assoziiert sind, die kleinen Rho GTPasen Rac1, Rho und Cdc42 beeinflussen. Zudem soll überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Rho GTPasen und dem durch mutiertes E-Cadherin bedingten veränderten Phänotyp der Tumorzellen (verminderte Zell-Adhäsion und erhöhte Zell-Motilität) besteht.

Die spezifischen Ziele dieser Arbeit waren:

- Die Untersuchung des Einflusses von E-Cadherin auf die Expression und die Aktivität der Rho GTPasen Rac1, Rho und Cdc42.
- Die Ermittlung einer Korrelation zwischen der Rho GTPase Aktivität und dem motilen und invasiven Phänotyp der Tumorzellen.
- Die Analyse des Effekts von Inhibitoren von Rho GTPasen auf die migratorischen und invasiven Fähigkeiten der Zellen. Die eingesetzten Hemmstoffe zur Inhibition von Rac1 waren das Toxin B von *Clostridium difficile* und zur Inhibition von Rho die C3-Transferase von *Clostridium botulinum*.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Zellbiologische Methoden**

##### **3.1.1 Zelllinien**

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um die humane, E-Cadherin-negative MDA-MB-435S-Zelllinie (American Type Culture Collection (ATCC) No. HTM-129™, Rockville, USA).

Da zu Beginn der Studien keine geeigneten Magenkarzinom-Zelllinien vorlagen wurde die MDA-MB-435S-Zelllinie verwendet, die bereits Jahrzehnte lang als gängiges Mammakarzinom-Modell etabliert waren. Neue Untersuchungen von Rae et al. (2007) bestätigen Beobachtungen aus der Literatur (Ellison et al., 2002; Ross et al., 2000) die darauf hinweisen, dass die MDA-MB-435S-Zelllinie von einem okkulten Melanom und nicht wie bisher angenommen vom Mammakarzinom der Patientin abgeleitet sein könnte. Allerdings hat dieser Sachverhalt keinen Einfluss auf die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche, da die wichtigste Voraussetzung für das verwendete Zell-Modell war, dass es zum einen bereits gut etabliert ist und zum anderen, dass es sich dabei um eine E-Cadherin negative, epitheliale Zelllinie handelt.

##### **3.1.2 Vektoren**

Die E-Cadherin-negative MDA-MB-435S-Zelllinie wurden mit dem pBATEM-Vektor transfiziert der entweder kein Insert (Kontroll-Zelllinie) oder Wildtyp (*wt*) bzw. mutierte E-Cadherin-cDNA enthielt. Bei der mutierten E-Cadherin-cDNA handelt es sich um eine Deletionsmutante von E-Cadherin (Deletion Exon 8, *del 8*). Die verwendeten Klone wurden freundlicherweise von Frau Dr. G. Handschuh zur Verfügung gestellt. Die Referenzsequenz des E-Cadherin-cDNA Inserts ist bei NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) unter der Zugangsnummer Z 13009 zu finden.

### 3.1.3 Kultivierung und Passagieren der MDA-MB-435-S-Zellen

Die mit E-Cadherin-cDNA oder Vektor pBATEM transfizierten klonalen Tochterzelllinien (Handschuh et al., 1999) wurden in *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM, Gibco Invitrogen cell culture, Paisley, UK) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, PAN Biotech, Aidenbach) und 0,5 % Penicillin-Streptomycin (10,000 units/ml Penicillin G/10,000µg/ml Streptomycin Sulphat, Gibco Invitrogen cell culture, Paisley, UK) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Erreichten die Zellen eine 95 % ige Konfluenz (alle 3-4 Tage), wurden sie passagiert. Unter der Sterilbank wurde das Vollmedium mit Hilfe einer Vakuum-Pumpe abgesaugt und die Zellen einmal mit vorgewärmten PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen. Danach wurden 0,5 ml Trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) auf die Zellen gegeben, der Überstand wieder abgesaugt und die Zellen für ca. 2-5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in frischem, vorgewärmtem Vollmedium resuspendiert. Zur Weiterkultivierung wurden 0,5 ml der Zellsuspension entnommen und in einer neuen Kulturflasche mit 4,5 ml frischem Vollmedium überführt. Dem Vollmedium der transfizierten MDA-MB-435-S-Zellen wurde zusätzlich das Selektionsantibiotikum 600 mg/l Geneticin (G418 Sulfat, Gibco Invitrogen cell culture, Paisley, UK) hinzugefügt um zu gewährleisten, dass nur die mit der entsprechenden E-Cadherin cDNA transfizierten Zellen überleben. Für Experimente wurde der Rest der Zellen in ein 50 ml Falcon übertragen. Davon wurden 50 µl entnommen, um die Anzahl der Zellen in einem Zellzählgerät (Coulter, München) zu bestimmen.

### 3.1.4 Einfrieren von Zellen

Um das „Altern“ der in Dauerkultur gehaltenen Zelllinien zu vermeiden wurden nach ca. 25 Passagen neue Zellen aufgetaut. Der Vorrat an frischen Zellen wurde gewährleistet, indem die frisch aufgetauten Zellen nach so wenigen Passagen wie möglich wieder eingefroren und in flüssigem Stickstoff (-186°C) gelagert wurden. Dazu wurden die Zellen in Schalen (Ø 15 cm) ausgelegt und bis zur 90 % igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen, trypsinisiert, in 10 ml Vollmedium aufgenommen und für 5 min bei 310 g

(4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 2-3 ml Einfriermedium (80 % (v/v) Vollmedium, 10 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO (Serva, Heidelberg)) resuspendiert. Die Zellen wurden auf 2-3 Cryoröhrchen aufgeteilt, 4 h bei -20°C eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.1.5 Zell-Lyse

Je nach experimenteller Fragestellung wurden die Zellen unterschiedlich kultiviert. Um Proteine in Form von Zell-Lysaten zu gewinnen, wurden die Zellen bei 4°C, 2 x mit erwärmten PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen, für 1 min mit 200 µl Lysepuffer (1 x L-CAM-, Pierce - oder FISCH-Lysepuffer) bei 4°C inkubiert und mit einem Zellschaber geerntet. Die Lysate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, kurz gevortext und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 15 min bei 16.000 rcf (4°C) abzentrifugiert und die Überstände, die die Proteine enthalten, in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert. Falls die Proteinlysate später in einem *Pull-down* Experiment eingesetzt werden sollten wurden sie schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. So konnte die aktive Form der Proteine konserviert werden. Der Gesamtproteingehalt wurde anhand eines 5 µl Aliquots jeder Probe bestimmt.

### 3.1.6 Reagenzien zur Proteinisolierung

<b><u>10 x L-CAM Lysepuffer</u></b>	140 mM	NaCl (Merck, Darmstadt)
	47 mM	KCl (Merck, Darmstadt)
	7 mM	MgSO <sub>4</sub> (Fluka, Neu-Ulm)
	12 mM	CaCl <sub>2</sub> (Sigma, Deisenhofen)
	10 mM	HEPES, pH 7,4 (Sigma, Deisenhofen)

Puffer wurde bei RT gelagert

<b><u>1 x L-CAM Lysepuffer</u></b>	10 % (v/v)	10 x l-CAM Lysepuffer
	1 % (v/v)	Triton X-100 (Merck, Darmstadt)
	2 mM	PMSF (Sigma, Deisenhofen)
	2 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Sigma, Deisenhofen)
	19 µg / ml	Aprotinin (Sigma, Deisenhofen)
	20 µg / ml	Leupeptin (Sigma, Deisenhofen)
	10 mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> x 10 H <sub>2</sub> O (Sigma, Deisenhofen)
	10 mM	NaF (Sigma, Deisenhofen)

Puffer wurde vor der Zell-Lyse frisch zubereitet und auf Eis aufbewahrt

<b><u>5 x FISCH Lysepuffer</u></b>	10 % (w/v)	Glycerin (Merck, Darmstadt)
	2 mM	MgCl <sub>2</sub> (Merck, Darmstadt)
	100 mM	NaCl (Merck, Darmstadt)
	1 % (w/v)	NP-40 (Fluka, Neu-Ulm)
	50 mM	Tris, pH 7,5

Puffer wurde bei 4°C gelagert

### **1 x FISCH Lysepuffer (Rho Pull-down Experiment):**

Der 5 x FISCH Lysepuffer wurde mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt und anschließend mit 10 % w/v Glycerin versetzt. Protease- und Phosphatase- Inhibitoren wurden in den gleichen Konzentrationen wie bei 1 x L-CAM Puffer hinzugegeben. Der Puffer wurde vor der Zell-Lyse frisch zubereitet und auf Eis aufbewahrt.

### **Pierce Lysepuffer (Rac1 Pull-down Experiment):**

Dem Lysepuffer von Pierce (Pierce Biotechnology, Bonn) wurden Protease- und Phosphatase-Inhibitoren in den gleichen Konzentrationen wie beim 1 x L-CAM Puffer hinzugegeben. Der Puffer wurde vor der Zell-Lyse frisch zubereitet und auf Eis aufbewahrt.

### 3.2 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Konzentration der gewonnenen Proteinlösung wurde die Methode nach Bradford (1967) (Bradford, 1976) angewandt. Die Methode der Proteinkonzentrations-Bestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an positiv geladene Reste der Proteine im sauren Milieu. Dadurch wird das Maximum des Absorptionsspektrums bei Proteinbindungen von 465 nm auf 595 nm geändert, was sich in einem Farbumschlag (proportional zur Proteinkonzentration) von rotbraun nach blau äußert. Dafür wurde das Färbereagens *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (BioRad, München) im Verhältnis 1:5 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt. Mit Hilfe des 1:10 mit H<sub>2</sub>O bidest verdünnten *Bio Rad Protein-Standard II* (1,48 mg BSA/ml, Biorad, München) wurde eine Eichkurve erstellt (s. Tabelle 2.1). Zu 995 µl verdünntem *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* wurden 5 µl jeder Proteinprobe gegeben (Verdünnung 1:200), kurz gevortext und die Ansätze für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration photometrisch im UV/Vis Spectrophotometer DU® 530 (Beckman) bei 595 nm gemessen. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe der erstellten Eichkurve gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes in Excel errechnet.

**Tabelle 3.1: Standardkurve**

Probe	Protein Assay Dye Reagent Konzentrat (1:5 in H <sub>2</sub> O bidest)	Protein Standard II [1,48 mg BSA/ml] (1:10 in H <sub>2</sub> O bidest)	Protein [µg]
1	990 µl	10 µl	1,48
2	970 µl	30 µl	4,44
3	950 µl	50 µl	7,40
4	930 µl	70 µl	10,36



### 3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht durch SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE nach Laemmli, 1970 (Laemmli, 1970) ) wurde das *Mini-PROTEAN® 3 Cell System* (Biorad, München) benutzt. Das hierfür verwendete denaturierende Gel bestand aus einem Sammelgel das 5 % Acrylamidmix (40 % Acrylamid/Bis 37,5:1, Biorad, München) enthielt und einem, je nach Molekulargewicht des aufzutrennenden Proteins, 7,5 %, 12,5 % oder 15 % Acrylamidmix enthaltenden Trenngel. Die Zell-Lysate wurden mit 5x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. In der Regel wurden 15-20 µl Proteinlösung in jede Proben tasche geladen. Als Größenstandard wurden 3,5 µl *Dual Color Precision Plus Protein™ Standard* (Biorad, München) geladen. Der Gel-Lauf in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer wurde bei einer Spannung von 80 V gestartet bis die Lauffront vom Sammelgel ins Trenngel übergelaufen war. Danach wurde der Lauf bei 100 - 120 V fortgesetzt. Die Elektrophorese wurde bei RT durchgeführt.

**Tabelle 3.2: Lösungen zur Herstellung von Minigelen für SDS-PAGE.**

	<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel</u>		
	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %
1 M Tris, pH 6,8	2,85 ml	-	-	-
1.5 M Tris, pH 8,8	-	3,74 ml	3,74 ml	3,74 ml
40 % Acrylamid/Bis	630 µl	2,8 ml	3,75 ml	4,69 ml
10 % SDS	25 µl	75 µl	75 µl	75 µl
10 % APS	40 µl	90 µl	90 µl	90 µl
TEMED	4 µl	9 µl	9 µl	9 µl
H <sub>2</sub> O	2,85 ml	8,3 ml	7,34 ml	6,4 ml
<b>Gesamt</b>	<b>3 ml</b>	<b>5 ml</b>	<b>5 ml</b>	<b>5 ml</b>

### 3.2.3 Westernblot-Analyse

Nachdem die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt wurden, erfolgte die Übertragung der Proteine auf Nitrocellulose- (Schleicher & Schuell, Dassel) oder PVDF-Membranen (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) im Nassblot-Verfahren (*Mini Trans-Blot Cell System*, Biorad, München). Dazu wurde das Gel auf eine mit Transferpuffer befeuchtete Membran überführt und auf jede Seite je ein mit

Transferpuffer getränktes Whatman-Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) sowie ein getränkter Schwamm gelegt. Bei Verwendung einer PVDF-Membran wurde diese vorher mit Methanol für wenige Sekunden aktiviert, anschließend für 1 min mit Wasser gespült und danach 1 min in Transferpuffer equilibriert. Der Stapel mit dem Gel wurde luftblasenfrei in eine Kassette eingeklemmt und das *Sandwich* mit der Gelseite in Richtung Anode in der vertikalen Blotkammer, in der sich eiskalter Transferpuffer sowie ein Kühlaggregat befanden, befestigt. Der Transfer wurde für 60 min bei 100 V durchgeführt.

### 3.2.4 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Westernblot

#### 5 x Laemmli-Puffer

60 mM	1,25 M Tris/HCl, pH 6,8
8,7 % (v/v)	Glycerol (Merck, Darmstadt)
720 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen)
2 % (w/v)	SDS (UBS Corporation, Cleveland, OH, USA)
80 $\mu$ g/ml	Bromphenolblau (Sigma)

bei RT für 2 h auf dem Schüttler gelöst, Aliquots bei 4°C gelagert

#### 10x SDS-PAGE-Laufpuffer:

25 mM	Tris base (UBS Corporation, Cleveland, OH, USA)
192 mM	Glycin (Merck, Darmstadt)
1 % (v/v)	20 % SDS Lösung (AppliChem, Darmstadt)

bei RT gelagert

#### 10 x Transferpuffer

25 mM	Tris base (UBS Corporation, Cleveland, OH, USA)
192 mM	Glycin (Merck, Darmstadt)
1 % (v/v)	20 % SDS Lösung (AppliChem, Darmstadt)

bei RT gelagert

1 x Transferpuffer:

100 ml 10 x Transferpuffer, 200 ml Methanol, 700 ml H<sub>2</sub>O bidest. Bei 4°C gelagert

10 x TBS-Puffer:

50 mM Tris base, pH 8,0 (UBS Corporation, Cleveland, OH, USA)

150 mM NaCl (Merck, Darmstadt)

mit konz. HCl auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren und bei RT lagern

1 x TBST:

890 ml H<sub>2</sub>O bidest., 100 ml 10 x TBS, 10 ml 10% Tween-20 (entspr. 0,1 % (v-v))

10 % Tween:

5 ml 100 % Tween-20 (Merck, Darmstadt)

45 ml H<sub>2</sub>O

Bei 4°C gelagert

10 % APS

5g Ammoniumpersulfat (Sigma, Deisenhofen)

50 ml H<sub>2</sub>O

Aliquots bei -20°C gelagert

### **3.2.5 Immunochemische Färbung**

Nach dem Transfer wurde die Membran für mindestens 1 h bei RT mit einer Blocklösung (je nach Antikörper entweder 3 % BSA/TBST oder 5 % bzw. 10 % Magermilchpulver/TBST) inkubiert. Durch die Proteine in der Blocklösung wurden die Bindestellen der Membran abgesättigt, wodurch unspezifisches Binden des Antikörpers an die Membran verringert wurde. Der jeweilige Primärantikörper wurde in der Blocklösung verdünnt und die Membran darin ÜN bei 4°C auf einem Taumelschüttler inkubiert. Nach der Erstantikörperinkubation wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1 x TBST gewaschen. Dann wurde der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (in 5 % Magermilchpulver/TBST verdünnt) zugegeben und für mindestens 1 h bei 4°C inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit TBST,

um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran zur Signaldetektion mit einem Chemilumineszenzsubstrat für Western-Blot-Analysen inkubiert. Es wurde entweder mit dem *Enhanced Chemoluminescence System* (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) für 5 min oder mit einem selbst hergestellten ECL (Lösung 1:250 mM Luminol (Sigma, Deisenhofen), 400  $\mu$ M *p-Coumaric acid* (Sigma, Deisenhofen), 100 mM Tris-HCl pH 8,6, Lösung 2: 0,15 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt), 100 mM Tris-HCl pH 8,6) für 2 min inkubiert. Zur Detektion der Banden wurden Röntgenfilme (*Hyperfilm ECL*; Amersham, Braunschweig) unterschiedlich lange (1 sek. bis ÜN) aufgelegt und anschließend entwickelt. Die densitometrische Analyse der Filme wurde mit *Scion Image Software* von Scion Corporation (Frederick, USA) durchgeführt.

**Tabelle 3.3: Antikörper Westernblot**

<b>Primäre Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Blockierung</b>
mAK Maus-Anti- <b>E-Cadherin</b> Clone 36 (# C20820) BD Transduction Laboratories, Heidelberg	1:5000	5 % MP
mAK Maus-Anti- <b>Rac1</b> (# 610651) BD Transduction Laboratories, Heidelberg	1:2000	3 % BSA
mAK Maus-Anti- <b>Rac1</b> (# 89856D) Pierce Biotechnology, Bonn	1:2000	3 % BSA
mAK Maus-Anti- <b>Rac1</b> Klon 23A8 (# 05-389) Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA	1:2500	Blockierung: 10 % MP, 1. Ak Inkubation: 5 % MP
mAK Maus-Anti- <b>Rho</b> (A, B, C) (# 610990) BD Transduction Laboratories, Heidelberg	1:250	3 % BSA
mAK Maus-Anti- <b>Cdc42</b> (# 89857D) Pierce Biotechnology, Bonn	1:250	3% BSA
mAK Maus-Anti- <b>IQGAP1</b> (# 610611) BD Transduction Laboratories, Heidelberg	1:1000	3 % BSA
mAK Maus-Anti- <b><math>\alpha</math>-Tubulin</b> Antibody (# T-9026) Sigma, Deisenhofen	1:30.000	3 % BSA

<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Blockierung</b>
Ziege-Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt (# 12-348) Amersham, Braunschweig	1:20.000	5 % MP

### 3.3 Immunfluoreszenz und Mikroskopie

#### 3.3.1 Immunfluoreszenz Färbung

Für die Immunfluoreszenz wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in 6-well-Platten auf Deckgläschen in Vollmedium ausgesät und für 2-3 Tage bei  $37^\circ\text{C}/5\%$  (v/v)  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS (+  $\text{Ca}^{2+}$ , +  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und je nach Primärantikörper entweder 10 min mit Methanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) (Merck, Darmstadt) oder 30 min mit  $4\%$  (v/v) Formaldehyd (Merck, Darmstadt) bei RT fixiert. Die mit Formaldehyd inkubierten Zellen wurden zusätzlich 30 sek. mit Aceton ( $-20^\circ\text{C}$ ) (Merck, Darmstadt) permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und mit monoklonalen Primärantikörpern für 2 bis 4 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen für 1 h mit einem FITC-gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper (Zymed, San Francisco, CA, USA) lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) und einmal mit  $\text{H}_2\text{O}$  demin. gewaschen. Auf Objektträger wurde ein Tropfen *Vectashield mounting medium* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) aufgetropft - um eine längere Haltbarkeit der Fluoreszenzintensität zu gewähren - und die Deckgläschen mit der Seite auf der die Zellen gewachsen waren nach unten auf den Tropfen gelegt. Der Rand des Deckgläschens wurde mit Klarlack bestrichen und für 30 min trocknen gelassen. Die Proben wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Für die mikroskopische Analyse der Zellen stand ein Zeiss LSM 510 Mikroskop (Zeiss, Jena) zur Verfügung.

#### 3.3.2 Immunfluoreszenz Färbung mit FITC-gekoppeltem Phalloidin

Das filamentöse F-Actin des Cytoskeletts wurde mit FITC-gekoppeltem Phalloidin (Sigma Aldrich, Braunschweig) nachgewiesen. Hierfür wurden die Zellen mit  $4\%$  (v/v) Formaldehyd für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  fixiert, dreimal mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und die Aldehydgruppen mit  $50\text{ mM NH}_4\text{Cl}$  (Sigma, Deisenhofen) für 10 min geblockt. Nach abermaligem Waschen wurden die Zellen für 15-30 min mit  $5\%$  BSA geblockt und anschließend für 1 h mit einem Mix aus  $5\text{ mM EGTA}$  (Sigma, Deisenhofen),  $5\text{ mM MgSO}_4$  (Fluka, Neu-Ulm), FITC-gekoppeltem Phalloidin in der Verdünnung 1:500 und PBS, lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dreimal für 5 min mit PBS-Tween  $0,5\%$  gewaschen und die

Deckgläschen auf Objektträger mit einem Tropfen *Vectashield mounting medium* überführt und mikroskopisch analysiert.

**Tabelle 3.4: Antikörper Immunfluoreszenz**

<b>Primäre Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Fixierung/Permeabilisierung</b>
mAK Maus-Anti- <b>Rac</b> Klon 23A8 (# 05-389) Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA	1:250	4 % FA Aceton (BSA/Saponin)
mAK Maus-Anti- <b>IQGAP1</b> (# 610611) BD Transduction Laboratories, Heidelberg	1:300	4 % FA Aceton
mAK Maus-Anti- <b>p120-Catenin</b> (# P2732) Sigma, Deisenhofen	1:100	4 % FA 0,2%TritonX/PBS

<b>Sekundäre Antikörper und Farbstoffe</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Protokoll</b>
Ziege-Anti-Maus IgG, FITC-gekoppelt (#81-6511) Zymed, San Francisco, CA, USA	1:500	entspr. 1. AK
<b>Phalloidin</b> , FITC-gekoppelt (P5282) Sigma, Deisenhofen	1:500	s. 3.3.2
<b>DAPI</b> (#D8417) Sigma, Deisenhofen	1:2000	Methanol

### 3.4 Pull-down Assays

#### 3.4.1 Messung der Aktivität von Rac1 und Cdc42 durch Pull-down Assay

Für die Messung der Aktivität von Rac1 und Cdc42 in *wt* oder mutiertes E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Schale ausgelegt und für 24 h in DMEM mit 10 % FCS inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 200  $\mu$ l Lysepuffer (Pierce Biotechnology, Bonn) - dem kurz vor der Anwendung Phosphatase- und Proteaseinhibitoren hinzugefügt wurden (s. Tabelle) - lysiert, in Reaktionsgefäße überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 15 min bei 16000 x g (4°C) abzentrifugiert und die Überstände (mit Ausnahme eines Aliquots von 5  $\mu$ l je Probe zur Proteinkonzentrationsbestimmung) in neue Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Messung der Aktivität von Rac1 bzw. Cdc42 wurde ein GST-Pak1-PBD Pull-down Assay (*EZ-Detect™ Rac1/Cdc42 Activation Kit*, Pierce Biotechnology, Bonn) durchgeführt. In diesem Kit wird das Proteinlysate (500  $\mu$ g-1000  $\mu$ g) zusammen mit 20  $\mu$ g eines GST-Fusionsprotein, das die p21-Bindedomäne (PBD) der humanen *p21-activated kinase* (PAK) enthält (ein Effektorprotein von Rac1 und Cdc42), inkubiert um spezifisch aktives Rac1 und Cdc42 zu präzipitieren. Nach 1 h Inkubation bei 4°C auf dem Rotator wurden die Proben für 30 sek. bei 7000 x g zentrifugiert und 3-mal mit 400  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen. Danach wurde das gebundene aktive Rac1/Cdc42 mit 50  $\mu$ l Elutionspuffer für 5 min bei 95°C gekocht und durch anschließende Zentrifugation eluiert. Der Pull-down Assay wurde entsprechend den Instruktionen des Herstellers ausgeführt. Die präzipitierte, aktive GTPase wurde mit dem entsprechenden Antikörper durch Westernblot-Analyse nachgewiesen.

#### 3.4.2 Immunpräzipitation

Die analytische Immunpräzipitation mittels „*Catch and Release v2.0 Reversible Immunoprecipitation System*“ der Firma Upstate (nun Millipore) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Untersuchung der Interaktion von Rac1 mit seinem Effektorprotein IQGAP1 wurden Vektor transfizierte MDA-MB-435S Zellen sowie mit *wt* oder mutiertes E-Cadherin transfizierten Zellen bei einer Dichte von

$2 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Schale ausgelegt und für 24 h in 10 % FCS DMEM kultiviert. Anschließend wurden Zellen in 10 cm Schalen mit 200  $\mu$ l 1 x L-CAM Lysepuffer versetzt und mit einem Zellschaber abgekratzt. Nach Überführung in ein Reaktionsgefäß wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert und danach 15 min bei 16.000 x g bei 4°C zentrifugiert. 5  $\mu$ l des Überstands wurden zur Proteinbestimmung entnommen, der Rest wurde im flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Immunpräzipitation bei -80°C gelagert.

Für die Immunpräzipitation wurden 500  $\mu$ g Proteinlysate und 3  $\mu$ g monoklonaler Antikörper gegen Rac1 (BD Transduction Laboratories, Heidelberg) eingesetzt. Im Anschluss daran wurden nicht-komplexierende Proteine in mehreren Waschschrritten (3 x 400  $\mu$ l Waschpuffer) entfernt. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch 5-minütige Inkubation mit 20  $\mu$ l eines denaturierenden Elutionspuffers bei 95°C. Die Präzipitation von Rac1 erfolgte für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad. Für die nachfolgende Westernblot-Analyse der eluierten Immunkomplexe wurden anti-Rac1 (Pierce Biotechnology, Bonn) und anti-IQGAP1 Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet.

### **3.4.3 Messung der Aktivität von Rho durch *Pull-down* Assay**

Für die Messung der Aktivität von Rho in Vektor transfizierten, sowie in *wt* oder mutiertes E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro 10-cm Schale ausgelegt und für 24 h in DMEM mit 10 % FCS inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 200  $\mu$ l 1 x FISCH-Lysepuffer lysiert. Zur Messung der Aktivität von Rho wurde ein GST-Rhotekin-RBD *Pull-down* Assay (*Rho Assay Reagent*, Upstate nun Millipore, Schwalbach) durchgeführt. Ein GST-Fusionsprotein, das die Rho-Bindedomäne (RBD) des Rhotekin Proteins aus der Maus enthält, wird eingesetzt um spezifisch aktives Rho zu präzipitieren. Der Rho *Pull-down* Assay wurde (mit Ausnahme des verwendeten Lysepuffers) entsprechend den Instruktionen des Herstellers ausgeführt. Das präzipitierte, aktive Rho wurde durch Westernblot-Analyse nachgewiesen.



#### **3.4.4 Die Rho und Rac Inhibitoren NSC23766, TcdBF und C3T im *Pull-down* Assay**

Für die Messung der Aktivität von Rho und Rac1 nach Behandlung mit Inhibitoren wurden die bereit beschriebenen *Pull-down* Experimente durchgeführt. Hierfür wurde der kommerziell erhältliche spezifische Rac1 Inhibitor NSC23766 (Calbiochem, Schwalbach), der Rac1 Inhibitor TcdBF (Toxin B von *Clostridium difficile*, wurde freundlicherweise von Dr. H. Genth zur Verfügung gestellt), sowie der Rho Inhibitor C3-Transferase (C3T, Exoenzyme C3, *Clostridium botulinum*; Calbiochem, Schwalbach) eingesetzt.

Es wurden jeweils  $3,75 \times 10^6$  Vektor transfizierte, sowie *wt* oder mutiertes E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen pro 10 cm Schale ausgelegt. Nach 2 h Kultivierung wurden die Inhibitoren, NSC23766 (50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M), TcdBF (7,5 ng/ml) und C3T (6  $\mu$ g/ml), hinzugefügt und nach weiteren 5 h Kultivierung wurden die Zellen (wie in 3.1.10 und 3.1.13 beschrieben) lysiert und die *Pull-down* Experimente, (entsprechend der Protokolle der Hersteller s.o.), durchgeführt.

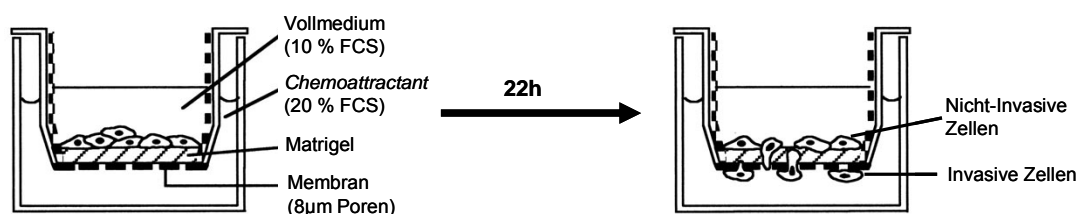
### 3.5 Zell-Motilitäts- und Invasions-Versuche

#### 3.5.1 Zell-Motilitäts-Versuche mit Rac1 und Rho Inhibitoren behandelten, *wt* und *del 8* E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen

Je  $2 \times 10^5$  *wt* oder mutiertes E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf Collagen I-beschichteten (100 µg/ml, Sigma, Deisenhofen 1 h bei 37°C) Zellkulturpetrischalen mit Glasboden (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) ausgesät und 2 h bei 37°C/5 % (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach zweistündiger Kultivierung der Zellen wurde der Rac1-Inhibitor TcdBF in einer Endkonzentration von 0,4 ng/ml oder der Rho Inhibitor C3T in einer Endkonzentration von 6 µg/ml zugegeben. Die Motilität der Zellen wurde mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 100 M (Zeiss, Jena) mit angeschlossenem Zeiss CTI Controller als CO<sub>2</sub>-Inkubationssystem (Zeiss, Jena) und einem beheizbaren Mikroskop-Tisch mit Lufttemperierung untersucht. Phasenkontrastbilder wurden alle 3 min über einen Zeitraum von 7 h mit einem Axiovert Laser Scanning Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena) mit einem PNF 20 x/0,4 PH2 Objektiv und einem Helium-Neon Laser bei 543 nm im Transmissionsmodus aufgenommen. 60 Zellen je Klon wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten analysiert und der Prozentsatz der motilen Zellen, welche ihr Ausgangsfeld innerhalb des Beobachtungszeitraumes vollständig verlassen haben, in einem Gesichtsfeld ermittelt. Sich teilende Zellen oder solche die sich vom Substrat ablösen wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Morphologisch äußert sich die Wirkung des Rac1 Inhibitors TcdBF durch Zellabrunden und bei längeren Inkubationszeiten (>5 h) auch durch Ablösen der Zellen vom Substrat. Aus diesem Grund wurde vor der Applikation des Inhibitors im Motilität-Versuch eine Kinetik mit TcdBF durchgeführt, um den morphologischen Effekt von TcdBF in Abhängigkeit der Zeit und Konzentration festzustellen. Für die Experimente Motilität-Versuche wurden die Konzentrationen an TcdBF eingesetzt, bei der sich der Grossteil der Zellen am Ende der Versuchszeit (nach 7 h) noch nicht vom Substrat abgelöst hatte. Die Konzentration für C3T wurde der Literatur entnommen. Das Mikroskop und die Software wurden freundlicherweise von Herrn Dr. P. Hutzler (Helmholtz Zentrum München, Institut für Pathologie, Neuherberg) zur Verfügung gestellt.

### 3.5.2 Invasion Assay

Zur Untersuchung der Zell-Invasion in Vektor transfizierten, mit *wt* oder mutiertem E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen, sowie zur Untersuchung des Einflusses der Rac1 und Rho Inhibitoren auf das invasive Verhalten wurde der Invasion Assay *BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber* (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet. Dazu wurde die benötigte Anzahl an Einsätzen (*Falcon Cell Culture Inserts*), die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden langsam auf RT akklimatisiert. Erwärmtes DMEM wurde in die Einsätze und in die Vertiefungen einer 24-well-Platte (*Falcon TC Companion Plate*) gegeben und die Matrigel Matrix in den Einsätzen für 2 h rehydriert. Anschließend wurden  $750\ \mu\text{l}$  20 % FCS DMEM, das als *Chemoattractant* diente, in die Vertiefungen gegeben. In die Einsätze wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen in  $500\ \mu\text{l}$  10 % FCS DMEM pipettiert, und die Einsätze mit den Zellen wurden in die Vertiefungen mit dem 20 % FCS DMEM gesetzt. Nach einstündiger Kultivierung der Zellen wurden die Rac1 und Rho Inhibitoren hinzugegeben. Wie bereits für die Motilitäts-Versuche beschrieben (siehe 3.5.1), wurde die Konzentration des Rac1 Inhibitors TcdBF vor der Applikation im Invasion Assay in einer Kinetik optimiert. Daher wurde der Rac1 Inhibitor in einer Endkonzentration von  $0,2\ \text{ng/ml}$  zugegeben. Der Rho Inhibitor C3T wurde in einer Endkonzentration von  $6\ \mu\text{g/ml}$  zugegeben. Nach insgesamt 22 h Kultivierung bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 % (v/v)  $\text{CO}_2$  wurden die nicht-invasiven Zellen entfernt und die invasiven Zellen, die durch die mit Matrigel Matrix beschichtete Membran hindurch gewandert waren, für 10 min mit Methanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) (Merck, Darmstadt) fixiert und die Zellkerne anschließend mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt und ausgezählt. Der Invasion Assay wurde entsprechend den Instruktionen des Herstellers ausgeführt.



**Abb. 3.1: Aufbau des Invasion Assays**

In Anwesenheit des *Chemoattractants* wandern invasive Zellen durch eine mit Matrigel Matrix beschichtete PET-Membran. Die Matrigel Matrix verhindert das Migrieren von nicht-invasiven Zellen durch die Membran.

### 3.5.3 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS Version 16.0 in Zusammenarbeit mit Frau Dipl. Math. R. Busch (Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie) durchgeführt.

Um den Einfluss der Rac1 und Rho Inhibitoren auf die Invasivität und Motilität der verschiedenen Zelllinien statistisch auszuwerten wurde eine Varianzanalyse mit zwei Faktoren (Zelllinie und Behandlung) angewendet. Der *Post Hoc* Test für die Aktivität und Expression der verschiedenen Proteine wurde mit dem LSD (*least significant difference*)-Test durchgeführt. Die Signifikanz wurde als 5% beidseitig festgelegt. Es wurden nur signifikante p-Werte oder p-Werte die einen Trend zeigten in den Diagrammen im Ergebnisteil angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Rac1 Lokalisation, Expression, Aktivität und Signalweiterleitung

#### 4.1.1 Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die Expression und Lokalisation von Rac1

Rac1 ist an der Regulation der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakte beteiligt und kolokalisiert mit E-Cadherin an den Adhärenzverbindungen (Akhtar et al., 2000; Braga, 1999). Um den Einfluss von *wt* und mutiertem E-Cadherin mit einer somatischen Deletion von Exon 8 in MDA-MB-435S-Karzinomzellen auf die Expression und Lokalisation von Rac1 funktionell zu untersuchen, wurden Westernblot- und Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Die Laufgeschwindigkeit von *del 8* E-Cadherin unterscheidet sich von der des 120 kDa *wt* E-Cadherin-Proteins in der Gelelektrophorese. *del 8* E-Cadherin zeigt eine geringere molekulare Masse als *wt* E-Cadherin und zusätzliche kleinere Fragmente einer Grösse von etwa 80 kDa, die sehr wahrscheinlich Degradationsprodukte darstellen (Handschuh et al., 1999).

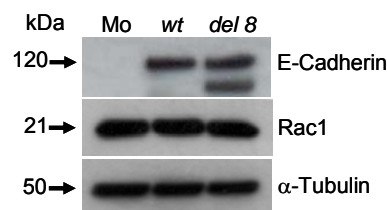
Die Westernblot-Analysen ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Expression von Rac1 in *wt*, *del 8* E-Cadherin oder Vektor-transfizierten MDA-MB-435S Zellen (Abb. 4.1 A, B). Im Gegensatz dazu konnte durch Immunfluoreszenz-Analyse gezeigt werden, dass die somatische Mutation die subzelluläre Lokalisation von Rac1 beeinflusst (Abb. 4.1 C).

Die Lokalisation von Rac1 verhält sich dabei ähnlich wie die Lokalisation von E-Cadherin in *wt* und mutiertes E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S-Karzinomzellen. In früheren Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass E-Cadherin in *wt* exprimierenden Zellen an lateralen Zell-Zell-Kontaktstellen lokalisiert ist (Handschuh et al., 1999; Lubber et al., 2000). In Zellen mit einer somatischen Mutation, die zu erniedrigter Zell-Zell-Adhäsion führt, wurde mutiertes E-Cadherin in den residualen Zell-Zell-Kontakten und zusätzlich vermehrt im Cytoplasma detektiert (Lubber et al., 2000). Durch die verminderte Anzahl an Zell-Zell-Kontakten in *del 8* Zellen wurde das Protein also zum Teil ins Cytosol transloziert. Zudem konnte durch FACS-Analyse eine geringere Lokalisation von mutiertem E-Cadherin

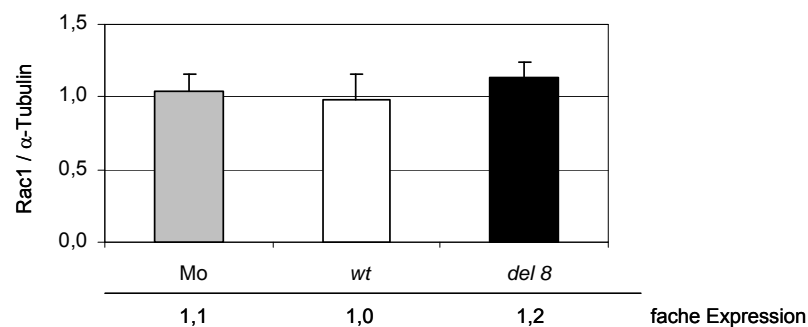
an der Zelloberfläche im Vergleich zu *wt* E-Cadherin nachgewiesen werden (Bremm et al., 2008).

Immunfluoreszenz-Analysen von Rac1 zeigten, dass Rac1 in *wt* Zellen an den lateralen Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist (Abb. 4.1 C-b). In *del 8* Zellen hingegen wurde Rac1 in den punktförmigen Kontaktbereichen und zusätzlich im Cytoplasma detektiert (Abb. 4.1 C-c). In Vektor-transfizierten (Mo) Zellen war Rac1 ebenfalls, ähnlich wie in den *del 8* Zellen, neben den Kontaktstellen auch vermehrt im Cytoplasma lokalisiert (Abb. 4.1 C-a).

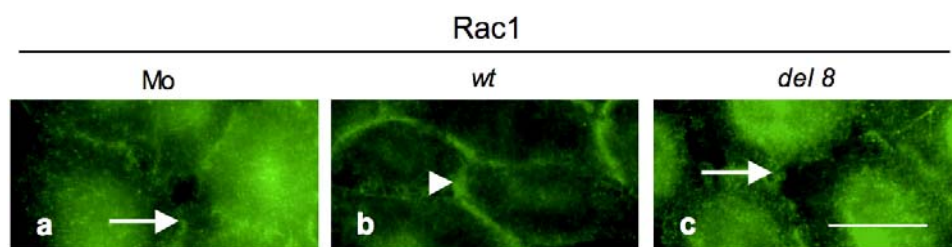
A



B



C



**Abb. 4.1: Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die Expression und Lokalisation von Rac1**

(A) Die Expression von *wt* oder mutiertem E-Cadherin mit einer Deletion von Exon 8 in MDA-MB-435S-Zellen wurde durch Westernblot-Analyse untersucht. Die Expression von Rac1 wurde in Vektor-transfizierten (Mo), *wt* oder *del 8* E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S-Transfektanten analysiert.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. (B) Die Blots wurden durch densitometrische Analyse unter Verwendung der *Scion Image Software* quantifiziert. Die mittlere Expressionsstärke von Rac1 wurde aus drei unabhängigen Experimenten errechnet und auf die Expression von  $\alpha$ -Tubulin

bezogen. Die Balken in Abbildung A und B repräsentieren den Mittelwert + der Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *Post Hoc* Tests. (C) Die Immunfluoreszenz-Analyse von MDA-MB-435S-Transfektanten, die entweder den Vektor oder *wt* bzw. *del 8* E-Cadherin exprimierten, wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen Rac1 und FITC-konjugiertem anti-Maus IgG ausgeführt. Die Pfeilspitze zeigt auf die Rac1 Lokalisation an einer Zell-Zell-Kontaktstelle in der *wt* E-Cadherin-Transfektante. Die Pfeile markieren die Expression von Rac1 an einem residualen Kontaktpunkt in *Mo* und *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen. Der Maßbalken entspricht 25  $\mu\text{m}$ .

Die Kollokalisierung von Rac1 und E-Cadherin in *del 8* E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S-Zellen weist darauf hin, dass die Mutations-bedingt veränderte Lokalisation von E-Cadherin auch die Lokalisation von Rac1 beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde die Expressionsstärke von Rac1 nicht durch die E-Cadherin-Mutation beeinflusst.

### **4.1.2 Einfluss von E-Cadherin mit Deletion von Exon 8 auf die Aktivierung von Rac1 (*outside-in signalling*)**

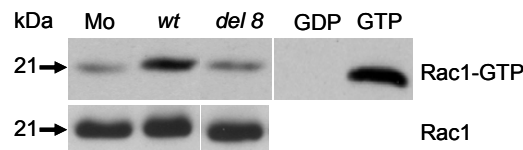
Neben seiner Funktion als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül moduliert E-Cadherin auch die Signaltransduktion der kleinen Rho GTPasen und es konnte bereits gezeigt werden, dass homophile E-Cadherin Interaktion die Rac1 Aktivierung erhöht (Kraemer et al., 2007; Noren et al., 2001). Aktiviertes Rac1 übt seinerseits wichtige Funktionen in der Reorganisation des Actincytoskeletts aus, die mit der E-Cadherin-vermittelten Kontaktbildung assoziiert sind und zu deren Stabilisierung beitragen (Hordijk et al., 1997; Takaishi et al., 1997).

In einem *pull-down* Experiment wurde untersucht, ob die somatische Mutation in E-Cadherin einen Effekt auf die Rac1 Aktivität hat. In Übereinstimmung mit der Literatur war die Rac1 Aktivität in *wt* E-Cadherin Transfektanten (1,0-fach) signifikant höher ( $p=0,015$ ) verglichen mit den E-Cadherin-negativen parental MDA-MB-435S-Zellen (0,6-fach) (Abb. 4.2 A, B). Die Expression der Deletionsmutante hingegen war verglichen mit *wt* E-Cadherin mit einer signifikant geringeren Aktivität (0,5-fach) von Rac1 assoziiert ( $p=0,006$ ) (Abb. 4.2 A, B).

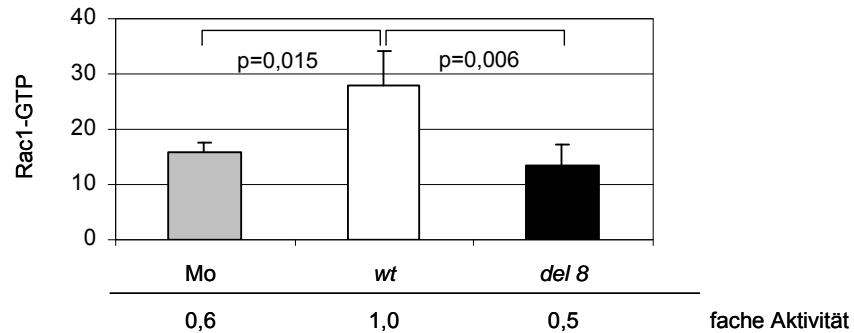
Eine kinetischen Untersuchung der Rac1 Aktivität ergab, dass der Unterschied in der Aktivierung von Rac1 in *wt* und *del 8* Zellen bereits 3 h nach dem Auslegen auftritt und über 24h hin bestehen bleibt (Daten nicht gezeigt).

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Expression von E-Cadherin mit einer Deletion von Exon 8, die in unseren Zellen zu einer reduzierten Zell-Adhäsion führt, auch die Fähigkeit von E-Cadherin vermindert, Rac1 durch homophile E-Cadherin Interaktion zu aktivieren. Das bedeutet, dass in *del 8* Zellen das *outside-in signalling*, also die Aktivierung von Rac1 durch E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion, beeinflusst wird.

**A**



**B**



**Abb. 4.2: Einfluss von E-Cadherin mit Deletion von Exon 8 auf die Aktivierung von Rac1**

(A) Ein nicht-radioaktiver Assay wurde zur Messung der Aktivität von Rac1 durch Affinitätspräzipitation von Rac1-GTP mit der p21-Bindedomäne von *p21-activated kinase* (PAK) eingesetzt, gefolgt von der Detektion von Rac1 durch Westernblot-Analyse (Benard et al., 1999). Die „GTP“-Kontrolle repräsentiert die aktivierte, GTP-gebundene Form von Rac1, während „GDP“-Kontrolle die inaktive, GDP-gebundene Form von Rac1 darstellt. (B) Die Blots wurden durch densitometrische Analyse unter Verwendung der *Scion Image Software* quantifiziert. Die mittlere Aktivität von Rac1 wurde aus drei unabhängigen Experimenten errechnet. Die Balken in B repräsentieren den Mittelwert + der Standardabweichung. Die statistische Auswertung wurde mit dem *Post Hoc* Test durchgeführt. Mo: Vektor transfizierte Kontroll-Zelllinie MDA-MB-435S-pBat.



#### **4.1.3 Einfluss der verminderten Rac1 Aktivität auf die Signalweiterleitung in *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen**

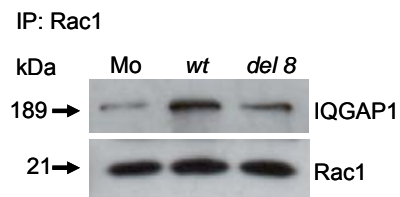
Im aktiven GTP-gebundenen Zustand interagiert die kleine Rho GTPase Rac1 mit einer Vielzahl von Effektorproteinen, die wiederum zur Aktivierung einer noch größeren Anzahl verschiedener Signalwege führt. Welche Signalwege dabei aktiviert werden, ist abhängig vom Zelltyp und vom zellulären Kontext. Ein Effektorprotein von Rac1 ist das Gerüstprotein IQGAP1. IQGAP1 besitzt neben Bindungsstellen für Rac1, Cdc42 und E-Cadherin auch solche für Actin, wodurch es die Verbindung zwischen Rac1 und dem Actincytoskelett schafft. IQGAP1 spielt damit vermutlich eine entscheidende Rolle in der Adhäsion, Polarität und Migration der Zelle (Noritake et al., 2005).

Mit Hilfe einer Immunpräzipitation wurde die Interaktion von Rac1-GTP mit IQGAP1 untersucht. Dabei sollte festgestellt werden, ob die durch die Mutation in E-Cadherin bedingte schwache Aktivierung von Rac1 einen Einfluss auf die Signalweiterleitung hat. Entsprechend der geringeren Aktivität von Rac1 in Vektor-transfizierten Zellen und beim Vorliegen der E-Cadherin-Mutation, wurde eine signifikante Reduktion (Mo:  $p=0,004$  und *del 8*:  $p=0,019$ ) der Komplexbildung zwischen Rac1 und IQGAP1 im Vergleich zu *wt* E-Cadherin beobachtet (Abb. 4.3 A, B). Durch Westernblot-Analysen wurden Unterschiede in der Expressionsstärke von IQGAP1 in den verschiedenen Zelllinien detektiert. Im Vergleich zu *del 8* E-Cadherin transfizierten Zellen sowie Vektor-transfizierten MDA-MB-435S Zellen wiesen die *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen eine signifikant höhere Expression (Mo:  $p=0,024$  und *del 8*:  $p=0,029$ ) von IQGAP1 auf (Abb. 4.3 C, D).

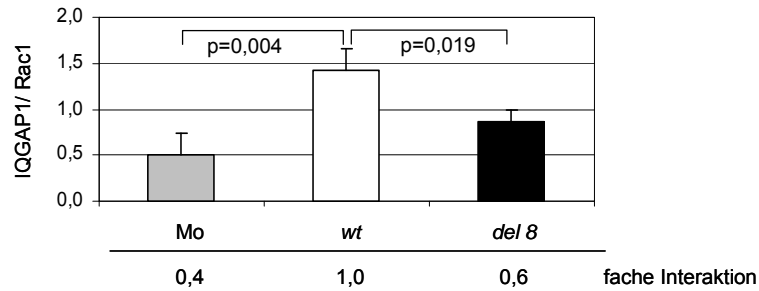
Immunfluoreszenz-Analysen ergaben, dass IQGAP1 in *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen an Zell-Zell-Kontaktstellen lokalisiert war, während es in *del 8* E-Cadherin-Transfektanten und Vektor-Transfektanten zusätzlich in den Lamellipodien detektiert werden konnte (Abb. 4.3 D).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die geringere Aktivität von Rac1 in *del 8* Zellen eine reduzierte Bindung des Effektorproteins IQGAP1 an Rac1 verglichen mit *wt* Zellen zur Folge hat. Somit wird die nachgeschaltete Signalweiterleitung von Rac1 durch das Vorliegen von mutiertem E-Cadherin beeinflusst.

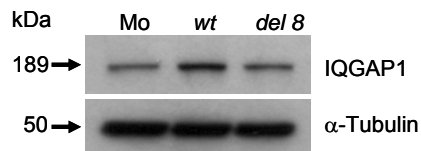
**A**



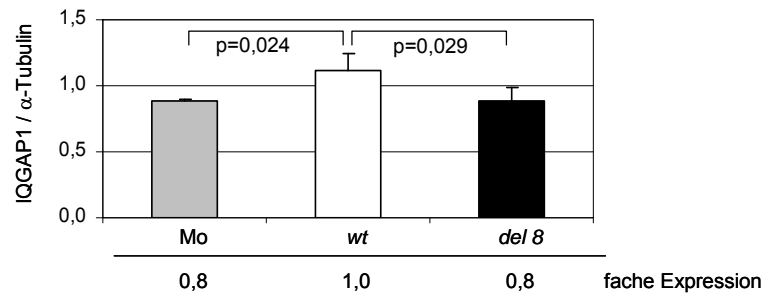
**B**



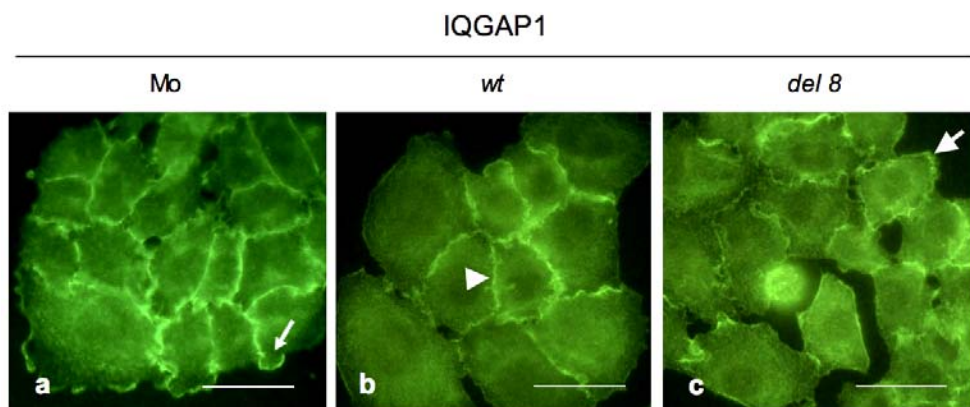
**C**



**D**



**E**



**Abb. 4.3: Komplexbildung von Rac1 mit dem Effektorprotein IQGAP1**

(A, B) Zellextrakte von Vektor-transfizierten, *wt* oder *del 8* E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S-Transfektanten wurden mit anti-Rac1 Antikörper immunpräzipitiert. Nachfolgend wurde der Rac1-GTP-IQGAP1-Komplex durch Westernblot-Analyse mit anti-IQGAP1 Antikörper detektiert.

(C, D) Die Expression von IQGAP1 wurde in Vektor-transfizierten, *wt* oder *del 8* E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S-Transfektanten untersucht. Als Ladungskontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin. (B, D) Die Blots wurden durch densitometrische Analyse unter Verwendung der *Scion Image Software* quantifiziert. Die Balken in Abbildung B und D repräsentieren den Mittelwert + der Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mit dem *Post Hoc Test* durchgeführt. (E) Dargestellt sind MDA-MB-435S Zellen, die mit *wt* E-Cadherin, *del 8* E-Cadherin oder Vektor transfiziert sind. Die Zellen wurden auf Glas-Objektträger ausgesät, zwei Tage kultiviert und mit monoklonalem IQGAP1-Antikörper und einem FITC-gekoppelten Sekundär-Antikörper inkubiert. Die Pfeilspitze zeigt auf IQGAP1, das in einem Zell-Zell-Kontakt lokalisiert ist (*wt*, b). Der Pfeil zeigt auf IQGAP1, das in einem Lamellipodium detektiert wurde (*Mo*, a und *del 8*, c). Die Meßbalken entsprechen 50  $\mu$ m.

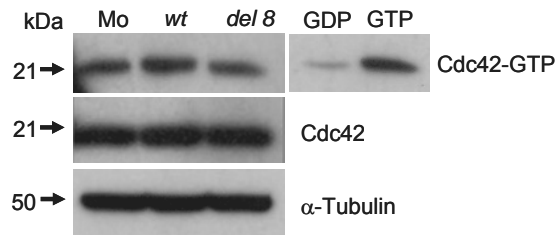
## 4.2 Cdc42 Expression und Aktivität

### 4.2.1 Einfluss von E-Cadherin mit Deletion von Exon 8 auf die Expression und Aktivierung von Cdc42

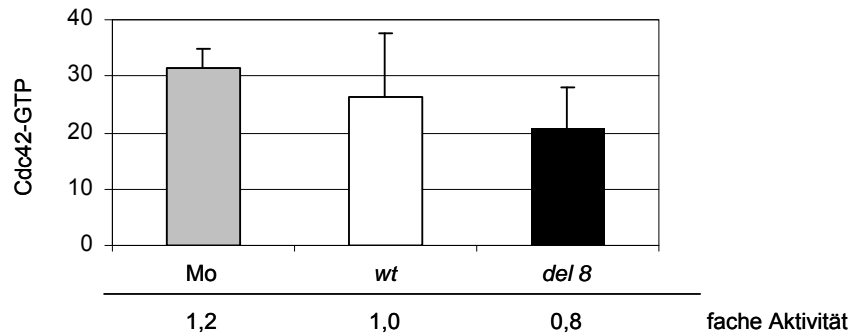
Wie die kleine Rho GTPase Rac1 ist auch Cdc42 an der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion beteiligt (Kim et al., 2000; Kraemer et al., 2007). Daher wurde der Einfluss von E-Cadherin mit einer somatischen Mutation auf die Expression und Aktivität von Cdc42 untersucht. Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse zeigten, dass weder die Expression von *wt* noch die von mutiertem E-Cadherin einen signifikanten Effekt auf die Expression von Cdc42 ausübt (Abb. 4.5 A, C). Ebenso wenig war ein signifikanter Effekt der beiden E-Cadherin Varianten auf die Cdc42 Aktivität im *pull-down* Experiment zu sehen (Abb. 4.5 A, B).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität von Cdc42 in unserem Zellsystem nicht durch E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion beeinflusst wird. Die Rho GTPase Cdc42 ist damit in unserem Zellsystem auch nicht an der durch die Mutation bedingten, verminderten Zell-Zell-Adhäsion und verstärkten Zell-Motilität beteiligt.

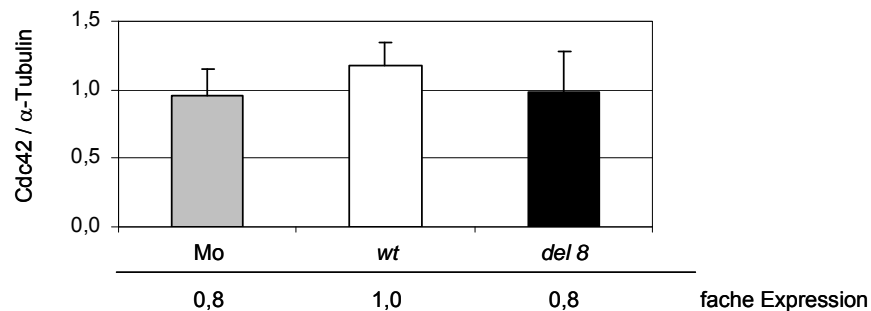
A



B



C



**Abb. 4.4: Einfluss von E-Cadherin auf die Expression und Aktivierung von Cdc42**

(A) Es wurde der gleiche nicht-radioaktive Assay zur Messung der Aktivität von Cdc42 eingesetzt wie bei der Messung der Aktivität von Rac1 (s. Text Abb. 4.2), da beide Rho GTPasen mit der p21-Bindedomäne von *p21-activated kinase* (PAK) interagieren. Die Detektion von aktivem Cdc42 sowie der Nachweis der Expression von Cdc42 erfolgte durch Westernblot-Analyse. (B, C) Die Blots wurden durch densitometrische Analyse unter Verwendung der *Scion Image Software* quantifiziert. Die mittlere Aktivität von Cdc42 wurde aus drei unabhängigen Experimenten errechnet. Die Expression von Cdc42 wurde auf  $\alpha$ -Tubulin bezogen. Die Balken in Abbildung C repräsentieren den Mittelwert + der Standardabweichung. Die statistische Auswertung wurde mit dem *Post Hoc Test* durchgeführt.

### 4.3 Rho Expression und Aktivität

#### 4.3.1 Einfluss von E-Cadherin mit Deletion von Exon 8 auf die Expression und Aktivierung von Rho

Da die Bildung E-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Adhäsion mit der Reorganisation des Actincytoskeletts assoziiert ist, die durch die kleinen GTPasen reguliert wird, wurde der Einfluss von E-Cadherin mit einer somatischen Mutation auf die Expression und Aktivität von Rho untersucht. Im Gegensatz zu Rac1 wird die Aktivität der kleinen GTPase Rho durch homophile E-Cadherin Interaktion inhibiert (Arthur et al., 2002). Der Wirkmechanismus beruht darauf, dass aktiviertes Rac1 Rho negativ über p120-Catenin und p190RhoGAP reguliert. Damit trägt Rac1 zu der durch homophile E-Cadherin Interaktion verminderten Rho Aktivität bei (Wildenberg et al., 2006).

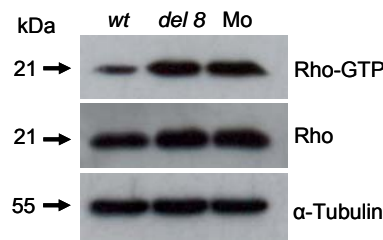
Um zu untersuchen, ob die Deletion von Exon 8 in E-Cadherin - und die damit assoziierte erniedrigte Rac1 Aktivität - einen Einfluss auf die Expressionsstärke und die Aktivität von Rho hat, wurden Westernblot-Analysen mit Lysaten aus *wt* und *del 8* E-Cadherin oder Vektor-transfizierten Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expressionsstärke von Rho nicht durch die somatische Mutation beeinflusst wird (Abb. 4.5 A, C). Im Gegensatz dazu konnte im *pull-down* Experiment gezeigt werden, dass die Rho Aktivität durch E-Cadherin vermittelte Zell-Adhäsion vermindert wird (Abb. 4.6 B). Verglichen mit *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen waren die Vektor-transfizierten MDA-MB-435S Zellen mit einer signifikant höheren Aktivität von Rho ( $p < 0,001$ ) (2,7-fach) assoziiert. Interessanterweise resultierte die Expression der Deletionsmutante ebenfalls in einer signifikant höheren Rho Aktivität ( $p < 0,001$ ) (2,2-fach) verglichen mit *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen. Auf der anderen Seite führte die Mutation in Exon 8 ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Rho Aktivität in *del 8* Zellen verglichen mit den Vektor-transfizierten Zellen ( $p = 0,017$ ).

In Übereinstimmung mit der Literatur wurde die Rho Aktivität durch homophile Interaktion von *wt* E-Cadherin vermindert. Die Expression der Deletionsmutante hingegen, die u.a. zu einer reduzierten Zell-Adhäsion führt, vermindert die Fähigkeit von E-Cadherin Rho zu inhibieren verglichen mit dem *wt* Protein.

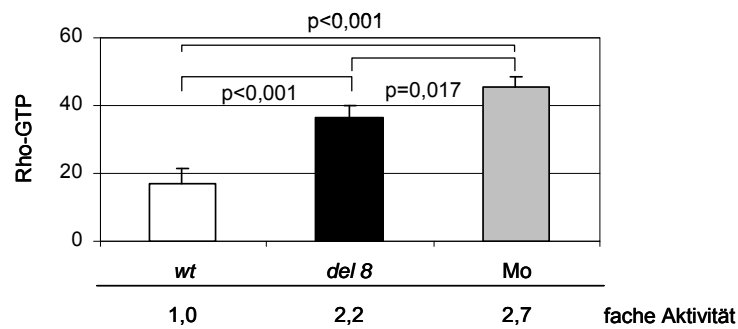
Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die intrazelluläre Signalweiterleitung von E-Cadherin zu einem verminderten Rho Aktivierungsstatus

und zu einem erhöhten Rac1 Aktivierungsstatus in *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen aber nicht in *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen führt. Rho und Rac1 werden in dem angewandten Zellsystem durch E-Cadherin gegenläufig reguliert und diese Regulation wird durch die Mutation in E-Cadherin beeinträchtigt. Der Antagonismus zwischen der Rac1 und Rho Aktivität wird vermutlich über den sogenannten „Bar-Sagi“ Signalweg in Abhängigkeit von p120-Catenin gesteuert.

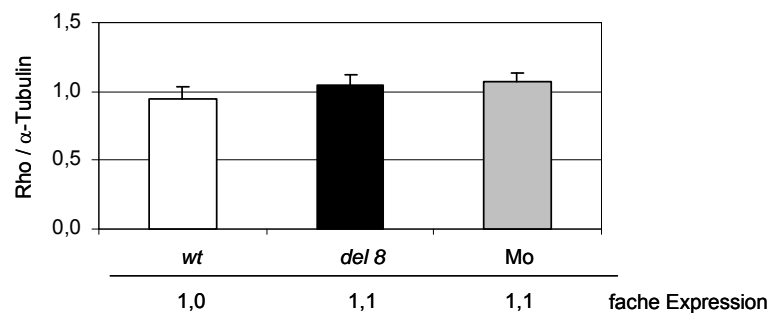
**A**



**B**



**C**



**Abb. 4.5: Einfluss von E-Cadherin auf die Expression und Aktivierung von Rho**

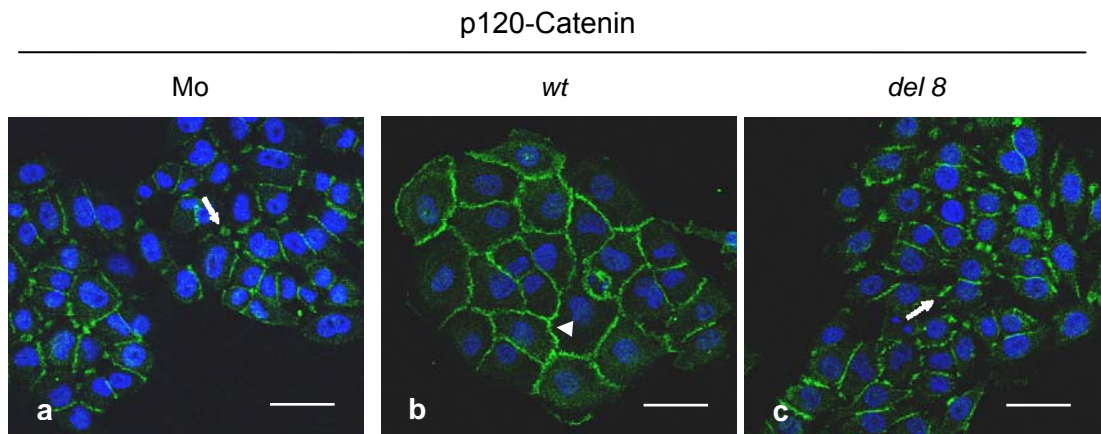
(A) Die Expression und Aktivierung von Rho wurde in Vektor-transfizierten, *wt* oder *del 8* E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S-Zellen untersucht. Ein nicht-radioaktiver Assay wurde zur Messung der Aktivität von Rho durch Affinitätspräzipitation von Rho-GTP mit der Rho-Bindedomäne (RBD) von Rhotekin eingesetzt. Die Detektion von aktivem Rho erfolgte durch Westernblot-Analyse. (B, C) Die Blots wurden durch densitometrische Analyse unter Verwendung der *Scion Image Software* quantifiziert. Die Expression von Rho wurde auf  $\alpha$ -Tubulin bezogen. Die Balken in B und C repräsentieren den Mittelwert + Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mit dem *Post Hoc* Test durchgeführt.

#### 4.4 Einfluss von *del 8* E-Cadherin auf die Lokalisation von p120-Catenin

In einer Vielzahl von Zelltypen wird die Rho Aktivität negativ durch Rac1 über den sogenannten „Bar-Sagi“ Signalweg reguliert. Der Antagonismus zwischen Rac1 und Rho wird dabei über p120-Catenin vermittelt. Aktiviertes Rac1 induziert die Translokation von p190RhoGAP zum Cadherin-Catenin-Komplex, wo es mit p120-Catenin interagiert und die Inhibierung der Rho Signalweiterleitung bewirkt (Wildenberg, 2006). Die subzelluläre Lokalisation von p120-Catenin ist dabei entscheidend für den Rac1-Rho-*Crosstalk*, da es die kortikale Lokalisation von p190RhoGAP unterstützt (Wildenberg et al., 2006).

Der Einfluss der Deletionsmutante auf die subzelluläre Lokalisation von p120-Catenin wurde durch Immunfluoreszenz-Analyse untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass p120-Catenin entsprechend *wt* E-Cadherin, mit dem es am Cadherin-Catenin-Komplex interagiert, an den lateralen Zell-Zell-Kontaktstellen lokalisiert ist. In *del 8* exprimierenden Tumorzellen, die eine verminderte Zell-Zell-Adhäsion aufweisen, wurde p120-Catenin an den residualen Zell-Zell-Kontakten detektiert. In Vektor-transfizierten Zellen ähnelte die Lokalisation von p120-Catenin der Lokalisation des Proteins in *del 8* Zellen stark. Allerdings war das p120-Catenin-Signal in diesen Zellen nochmal schwächer im Vergleich zu den *del 8* Zellen.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die verminderte negative Regulation von Rho durch Rac1 (über „Bar-Sagi“ Signalweg) in Zellen die mutiertes E-Cadherin exprimieren nicht nur durch den niedrigen Rac1 Aktivierungsstatus verursacht wird, sondern zusätzlich durch die verminderte subzelluläre Lokalisation von p120-Catenin an den Zell-Zell-Kontakten bedingt ist.



**Abb. 4.6: Lokalisation von p120-Catenin in Abhängigkeit vom E-Cadherin-Status der Zellen**

Die Immunfluoreszenz-Analyse von MDA-MB-435S-Transfektanten, die entweder den Vektor oder *wt* und *del 8* E-Cadherin exprimierten, wurde mit einem monoklonalen Antikörpern gegen p120-Catenin und FITC-konjugiertes anti-Maus IgG ausgeführt. Die Pfeilspitze zeigt auf das p120-Catenin-Signal an einer Zell-Zell-Kontaktstelle in der *wt* E-Cadherin-Transfektante. Die Pfeile markieren die Expression von p120-Catenin an einem residualen Kontaktpunkt in Mo und *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen. Die Maßbalken entsprechen 50  $\mu\text{m}$ .

## 4.5 Motilität und Invasion

### 4.5.1 Hemmung der Aktivität von Rac1 und Rho durch Inhibitoren

Um die Rolle der kleinen Rho GTPasen bei der Zellmigration und Invasion zu analysieren wurde zunächst die Wirkung der beiden Rac1 Inhibitoren NSC23766 und Toxin B Serotyp F (TcdBF), sowie die Wirkung des Rho Inhibitors C3-Transferase (C3T) auf die Aktivität von Rac1 und Rho untersucht.

Der Rac1 Inhibitor NSC23766 ist eine Zell-permeabilisierende Substanz, die spezifisch den Austausch von Rac1-GDP zu Rac1-GTP inhibiert, indem sie die Interaktionen von Rac1 mit seinen spezifischen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren Tiam1 und Trio inhibiert.

Toxin B des Serotyps F von *Clostridium difficile* (Stamm1470) (TcdBF) ist eine Glykosyltransferase die Rac1 (nicht Rho oder Cdc42) kovalent modifiziert. Die Glykosylierungsstelle von Rac1 ist innerhalb der Effektor-Region des Rho Proteins lokalisiert und führt zum Verlust der Bindung zwischen Effektor und Regulator. Durch die beeinträchtigte Rac1 Signalweiterleitung bewirkt TcdBF eine Reorganisation des Actincytoskeletts, was zur Abrundung und *Cluster*-Bildung der Zellen führt.



Die C3-Transferase (Exoenzym, 25 kD) aus *Clostridium botulinum* inhibiert spezifisch Rho-GTP (RhoA, B, C) durch ADP-Ribosylierung an Asparagin 41 (Vogelsgesang et al., 2007). Durch die Ribosylierung von Rho konnte keine Beeinflussung der GTP-Hydrolyse bzw. der Nukleotidbindung festgestellt werden. Auch die Effektor-Interaktion wird nicht blockiert (Genth et al., 2003; Sehr et al., 1998). Es kommt jedoch zur Inhibition des GEF-katalysierten Nukleotidaustausches und dadurch zu einer Anreicherung von inaktivem Rho im GDI Komplex (Fujihara et al., 1997; Genth et al., 2003; Sehr et al., 1998).

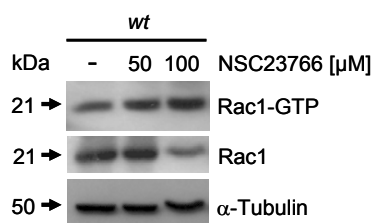
Die inhibitorische Wirkung der Hemmstoffe auf die Aktivität von Rac1 und Rho wurde in den entsprechenden *pull-down* Experimenten gefolgt von Westernblot-Analysen nachgewiesen (Abb. 4.8 B, D).

Der kommerziell erhältliche Rac1 Inhibitor NSC23766 zeigte im *pull-down* Experiment keine inhibitorische Wirkung in unseren Zellen (Abb. 4.8 A). Dies zeigt, dass die Aktivierung der kleinen Rho GTPase Rac1 in unserem Zellsystem nicht über die beiden Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren Tiam1 oder Trio erfolgt. Rac1 scheint damit in der Signalkaskade nicht PI3K-PIP3-Tiam1/Trio nachgeschaltet zu sein. Im Gegensatz zu NSC23766 führte die Behandlung mit dem Rac1 Inhibitor TcdBF (7,5 ng/ml) zum vollständigen Verlust der Rac1 Aktivität, sowohl in *wt* und *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen, als auch in den Vektor-transfizierten Kontroll-Zellen (Abb 4.8 B). Daher wurde in den nachfolgenden Motilitäts- und Invasions- Experimenten der Rac1 Inhibitor TcdBF verwendet.

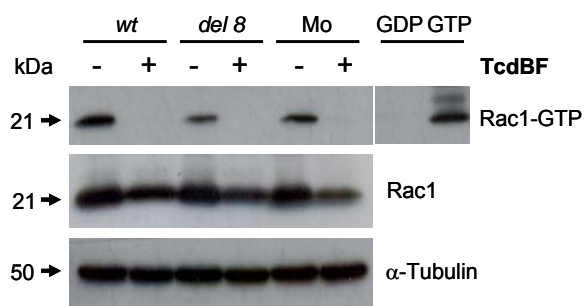
Durch Immunfluoreszenz-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen F-Actin konnte zusätzlich die Wirkung des TcdBF Inhibitors auf das Actincytoskelett (Abrunden und *clustering* der Zellen) bestätigt werden (Abb. 4.8 C). Eine Konzentrationskinetik mit TcdBF (10 ng/ml – 0,1 ng/ml) zur Untersuchung des morphologischen Effekts auf die Zellen zeigte, dass selbst sehr geringe Konzentrationen von 0,1 ng/ml des Toxins ausreichen um nach einem Zeitraum von 24 h zur Abrundung und zum Ablösen der Zellen vom Substrat zu führen (Daten nicht gezeigt).

Die Vektor-transfizierten MDA-MB-435S-Zellen weisen den höchsten Aktivierungsstatus von Rho auf. Die Behandlung dieser Zellen mit dem Rho Inhibitor C3T führte zu einer starken Reduktion der Rho Aktivität in diesen Zellen (Abb. 4.8 D).

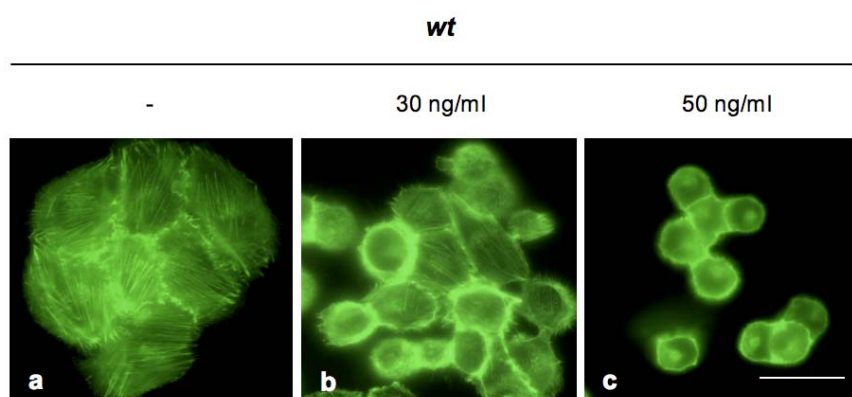
A



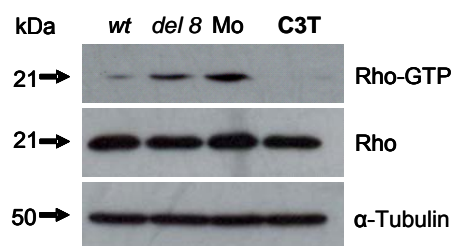
B



C



D



**Abb. 4.7: Einfluss spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität der Rho GTPasen Rac1 und Rho**

(A) Der Einfluss des spezifischen Inhibitors NSC23766 auf die Aktivität von Rac1 wurde in *wt* Zellen durch Affinitätspräzipitation von Rac1-GTP mit der p21-Bindedomäne von *p21-activated kinase* (PAK) untersucht. Hierfür wurden die Zellen 2 h nach dem Auslegen für 5 h mit 50 oder 100  $\mu$ M NSC23766 inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte *wt* Zellen. (B) Zur Untersuchung der Wirkung von TcdBF (wurde freundlicherweise von Dr. H. Genth, Hannover zur Verfügung gestellt) auf die Aktivität von Rac1 wurden *wt* und *del 8* E-Cadherin exprimierende Zellen sowie Vektor-transfizierte MDA-MB-435S-Zellen 2 h nach dem Auslegen für 5 h mit 7,5 ng/ml TcdBF inkubiert.

(C) *wt* exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach zwei Tagen mit TcdBF (b: 30 oder c: 50 ng/ml) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenz-Analyse mit FITC-konjugiertem Phalloidin ausgeführt. Der Meßbalken repräsentiert 50 µm. (D) Der Einfluss von C3T auf die Rho Aktivität wurde in Vektor-transfizierten MDA-MB-435S-Zellen durch Affinitätspräzipitation von Rho-GTP mit dem Fusionsprotein GST-Rhotekin-RBD (Rho-Bindedomäne) untersucht. Hierfür wurden Vektor-transfizierte MDA-MB-435S Zellen nach 2h Kultivierung mit 6 µg/ml C3T versetzt und für weitere 5 h inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Detektion von Rho erfolgte durch Westernblot-Analyse.

#### **4.5.2 Rolle der kleinen Rho GTPasen Rac1 und Rho bei der Zell-Motilität in E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen**

Um die Bedeutung der kleinen Rho GTPasen Rac1 und Rho in der durch E-Cadherin-Mutation vermittelten erhöhten Zell-Motilität (Abb. 4.9 B) zu untersuchen, wurden der Rac1 Inhibitor TcdBF (0,4 ng/ml) und der Rho Inhibitor C3T (6 µg/ml) in Zell-Motilitäts-Versuchen (*time lapse laser scanning microscopy*) in einer Temperatur- und CO<sub>2</sub>-kontrollierten Inkubations-Kammer eingesetzt.

Die Motilitäts-Experimente zeigten, dass der Rac1 Inhibitor TcdBF die Motilität *wt* E-Cadherin exprimierender Zellen leicht erhöht (Abb. 4.9 C). Der Effekt von TcdBF auf die Motilität der *wt* Zellen war dabei nicht signifikant. Im Gegensatz dazu bewirkte die Zugabe des Rac1 Inhibitors in *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen eine signifikante Reduktion der Zell-Motilität (p=0,007). Der Prozentsatz motiler, *del 8* E-Cadherin exprimierender Zellen sank damit auf den Prozentsatz motiler, *wt* E-Cadherin exprimierender Zellen ab (Abb. 4.9 C).

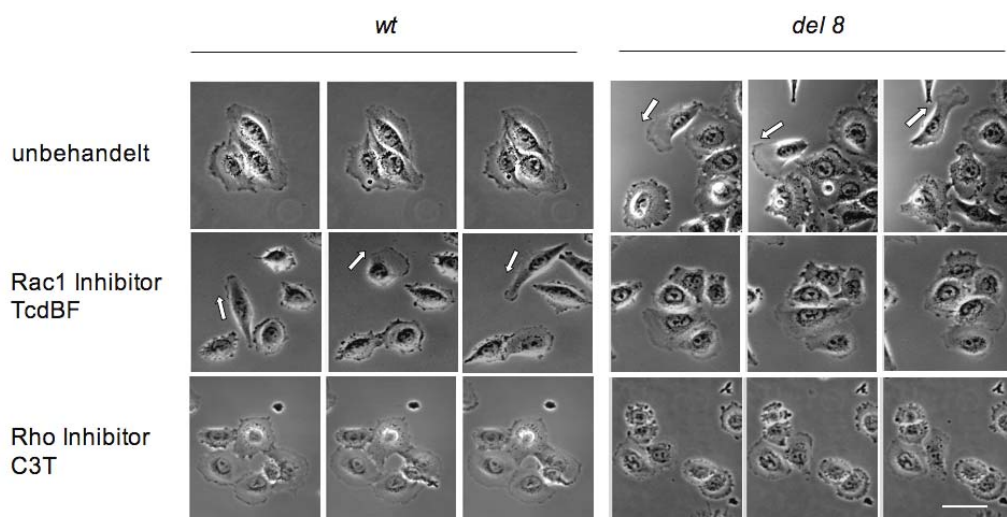
Die mit TcdBF behandelten *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen bildeten weiterhin Lamellipodien aus und zeigten *membrane ruffling*. Allerdings verursachte der Inhibitor bei den Zellen eine verminderte (bzw. weniger statische) Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte (Abb. 4.9 A). Mit TcdBF behandelte *del 8* E-Cadherin exprimierende Zellen zeigten keine auffälligen morphologischen Veränderungen (Abb. 4.9 A).

In *del 8* Zellen führte die Behandlung mit dem Rho Inhibitor ebenfalls, wie die Behandlung mit dem Rac1 Inhibitor, zu einer signifikanten Reduktion der Zell-Motilität (p<0,001). In *wt* Zellen hingegen führte die Zugabe des Rho Inhibitors C3T nur zu einer schwachen Abnahme der Zell-Motilität (Abb. 4.9 C). Wie schon bei der

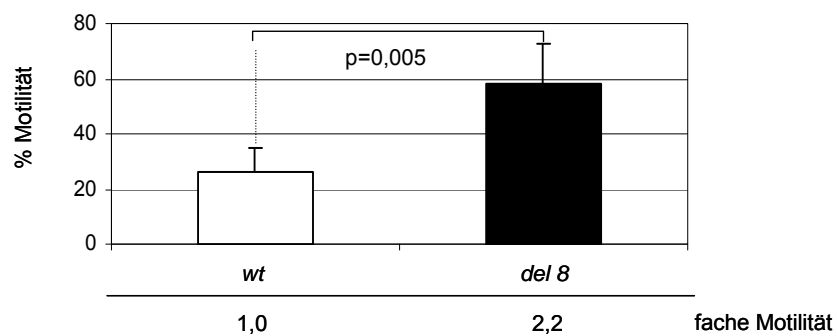
Behandlung mit dem Rac1 Inhibitor, konnte auch bei der Behandlung mit dem Rho Inhibitor kein signifikanter Effekt auf die Zell-Motilität der *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen beobachtet werden. Der Rho Inhibitor C3T zeigte keine auffälligen Auswirkungen auf die Zellmorphologie der E-Cadherin exprimierenden Zellen (Abb. 4.9 A).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass nur die durch E-Cadherin-Mutation hervorgerufene Erhöhung der Zell-Motilität sensitiv gegenüber Rac1 und Rho Inhibitoren ist. Dagegen hatten die beiden Inhibitoren keinen signifikanten Einfluss auf die basale Zell-Motilität der *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen. Dies zeigt, dass die durch die Mutation in E-Cadherin veränderte Signalweiterleitung der Rho GTPasen Rac1 und Rho an der durch mutiertes E-Cadherin vermittelt erhöhten Zell-Motilität beteiligt ist.

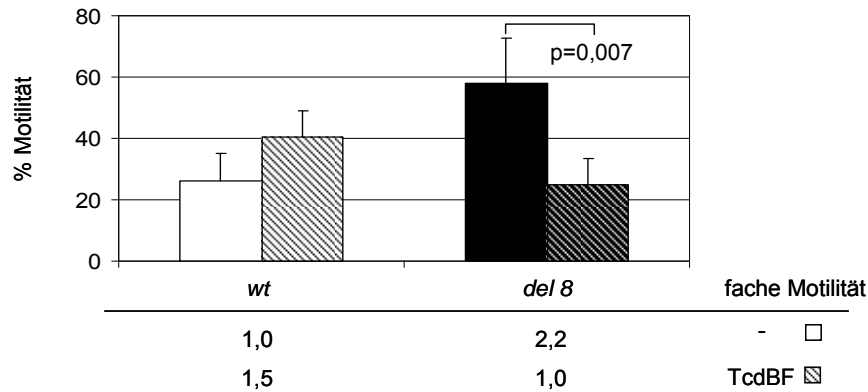
**A**



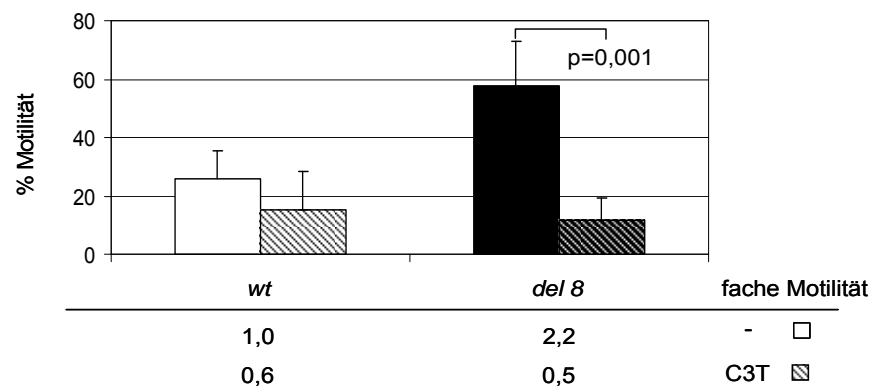
**B**



C



D



**Abb. 4.8: Zell-Motilität in *wt* und *del 8* E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S-Zellen in Abhängigkeit von Rac1 und Rho Inhibitoren**

(A) *wt* und *del 8* E-Cadherin exprimierende MDA-MB-435S-Zellen wurden auf Collagen I-beschichteten Schälchen mit Glasboden ausgelegt. Nach einer Kultivierung von 2 h wurde der Rac1 Inhibitor TcdBF (0,4 ng/ml) bzw. der Rho Inhibitor C3T (6 µg/ml) zu den Zellen hinzugegeben und das Motilität-Experiment gestartet. Die Phasenkontrast-Bilder wurden automatisch in 3-minütigen Intervallen mit einem Axiovert Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 über einen Zeitraum von 7 h aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Bilder von der Zellmorphologie der beiden Zelllinien jeweils unbehandelt und nach Zugabe der Inhibitoren. Die Pfeile markieren die Laufrichtung motiler Zellen. Der Meßbalken entspricht 50 µm (B) In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion von Exon 8 in E-Cadherin die migratorischen Fähigkeiten von Tumorzellen signifikant erhöht (Fuchs et al., 2002; Handschuh et al., 1999). (C) Vergleich des Prozentsatzes motiler Zellen von unbehandelten und mit TcdBF behandelten *wt* und *del 8* Zellen. (D) Vergleich des Prozentsatzes motiler Zellen von unbehandelten und mit C3T behandelten *wt* und *del 8* Zellen. (C, D) Die Balken in Abbildung C und D repräsentieren den Mittelwert + der Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mit dem *Post Hoc* Test (B) und mit Hilfe einer Varianzanalyse mit zwei Faktoren (C, D) durchgeführt.

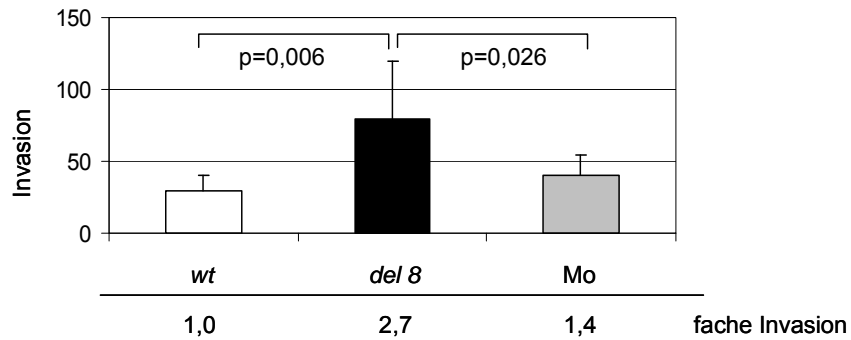
### 4.5.3 Einfluss von E-Cadherin mit Deletion von Exon 8 auf die Zell-Invasion

Die Familie der Rho GTPasen reguliert die Organisation und Umstrukturierung des Actincytoskeletts, das an diversen Aspekten der Zell-Invasion beteiligt ist. Zur Untersuchung des Einflusses der somatischen Mutation in E-Cadherin auf die Zell-Invasion und um die Korrelation zwischen dem Phänotyp Invasion und der Aktivität von Rac1 und Rho in *wt* oder *del 8* E-Cadherin transfizierten MDA-MB435S-Zellen zu bestimmen, wurden Invasions Assays mit Inhibitoren von Rac1 und Rho durchgeführt.

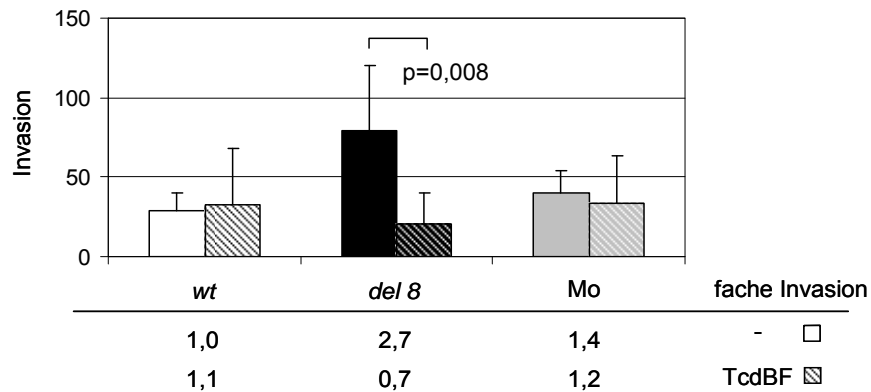
Die *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen zeigten im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen eine schwache Abnahme in ihrem invasiven Verhalten (Abb. 4.10 A). Der Effekt von *wt* E-Cadherin auf die Invasivität der Zellen war im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen allerdings nicht signifikant. Hingegen konnte gezeigt werden, dass die somatische Mutation einen starken Einfluss auf die Invasivität der *del 8* Zellen besitzt. In unbehandelten Zellen zeigte sich eine signifikant höhere Invasivität in *del 8* Zellen, sowohl verglichen mit *wt* Zellen ( $p=0,006$ ), als auch mit Vektor-transfizierten Zellen ( $p=0,026$ ). Analog zur Zell-Motilität vermittelt mutiertes E-Cadherin eine erhöhte Zell-Invasivität (Abb. 4.10 A). Beide Inhibitoren (TcdBF und C3T) zeigten eine reduzierende Wirkung auf das invasive Verhalten der *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen (Abb. 4.10 B, C). Die Invasivität der mit dem Rac1 Inhibitor TcdBF behandelten *del 8* Zellen war dabei signifikant reduziert ( $p=0,008$ ). In *del 8* Zellen, die mit dem Rho Inhibitor C3T behandelt wurden, konnte ein Trend zur reduzierten Invasivität ( $*p=0,066$ ) beobachtet werden. Hingegen veränderte sich das invasive Verhalten der *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen und Vektor-transfizierten Zellen nach Zugabe der Inhibitoren kaum (Abb. 4.10 B, C).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse des Invasions Assays, dass sowohl der Rac1 als auch der Rho Inhibitor der durch E-Cadherin-Mutation vermittelten Erhöhung der Zell-Invasivität entgegen wirken. Dies zeigt, dass die durch die Mutation in E-Cadherin veränderte Signalweiterleitung der Rho GTPasen Rac1 und Rho an der durch mutiertes E-Cadherin vermittelt erhöhten Zellinvasivität beteiligt ist.

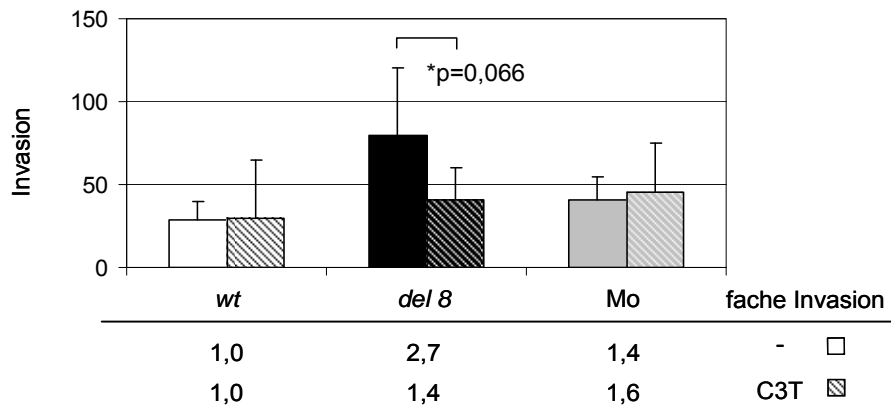
A



B



C



**Abb. 4.9: Einfluss von Rac1 und Rho Inhibitoren auf das invasive Verhalten von mutiertem E-Cadherin exprimierenden Zellen**

(A) *wt* oder *del 8* E-Cadherin exprimierende MDA-MB-435S-Transfektanten sowie Vektor-transfizierte Zellen wurden in *BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chambers* ausgelegt. Nach einer Kultivierung von 1 h wurde der Rac1 Inhibitor TcdBF (0,2 ng/ml) bzw. der Rho Inhibitor C3T (6 µg/ml) zu den Zellen hinzugegeben. Nach insgesamt 22 h wurde die Invasivität der Zellen bestimmt, indem die Zellen, die durch die Matrigel™ Matrix hindurch gewandert waren, gezählt wurden. (B, C) Beide Inhibitoren (TcdBF und C3T) zeigten eine stark reduzierende Wirkung auf das invasive Verhalten in *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen. In *wt* E-Cadherin exprimierenden und Vektor-transfizierten Zellen hingegen blieb das invasive Verhalten nach Zugabe der Inhibitoren

nahezu unverändert. Der Mittelwert der Anzahl der invasiven Zellen wurde aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils aus einem dreifachen Ansatz bestanden, errechnet. Die Balken in A, B und C repräsentieren den Mittelwert + Standardabweichung. Die statistische Auswertung wurde mit dem *Post Hoc* Test (A) und mit Hilfe einer Varianzanalyse mit zwei Faktoren (B, C) durchgeführt.



## 5 Diskussion

Zur Familie der Rho GTPasen zählen wichtige Regulatoren der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion, welche in verschiedene Aspekte der Krebsentstehung involviert sind, wie z.B. der Proliferation, der Motilität, der Invasion und der Metastasierung. Diese Regulation ist jedoch bidirektional, denn es konnte gezeigt werden, dass in einer Vielzahl epithelialer Zellen Rac1 und Cdc42 durch E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Kontakte aktiviert werden (Braga et al., 1997; Kim et al., 2000; Nakagawa et al., 2001; Noren et al., 2001), wohingegen Rho inaktiviert wird (Lampugnani et al., 2002; Noren et al., 2001). Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass E-Cadherin in Tumoren häufig herabreguliert oder mutiert ist, und dass diese Tumor-spezifischen Alterationen mit invasivem Tumorwachstum assoziiert sind (Berx et al., 1998; Birchmeier and Behrens, 1994). Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob tumor-assoziierte E-Cadherin-Mutationen die Expression, Lokalisation und Aktivierung der Rho GTPasen Rac1, Cdc42 und Rho beeinflussen und damit über die Modulation dieser Regulatoren des Cytoskeletts, Einfluss auf das adhäsive und motile Verhalten der Tumorzellen haben. Beim diffusen Magenkarzinom treten somatische E-Cadherin-Mutationen bevorzugt in einer Mutations-*Hotspot*-Region auf, welche die Exons 8 und 9 umfasst. Diese Mutationen sind auf der einen Seite mit einem Funktionsverlust (Reduktion der Zell-Zell-Adhäsion und Beeinträchtigung der tumor-suppressiven Funktion von E-Cadherin) und auf der anderen Seite mit einem Funktionsgewinn (Erhöhung der zellulären Motilität und der proteolytischen Eigenschaften von Tumorzellen) assoziiert (Fuchs et al., 2005; Fuchs et al., 2002; Fuchs et al., 2004; Handschuh et al., 1999; Kremer et al., 2003). In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen von E-Cadherin mit einer somatischen *in-frame* Deletion von Exon 8, die ursprünglich in einem Patienten mit einem diffusen Magenkarzinom detektiert worden war (Becker et al., 1994), auf die Rho GTPasen-Signalübertragung untersucht. Diese Deletion führt zu dem Verlust eines potentiellen Calciumbindungsmotivs in der extrazellulären Domäne von E-Cadherin (Handschuh et al., 1999; Handschuh et al., 2001); Calciumbindung ist jedoch essentiell für die Funktion und Proteaseresistenz von E-Cadherin (Leckband and Prakasam, 2006). Diese E-Cadherin-Mutation beeinflusst daher die Struktur und die Stabilität des Proteins aufgrund der verminderten Calciumbindung.

### 5.1 Effekt der E-Cadherin-Mutation auf die kleinen Rho GTPasen Rac1, Rho und Cdc42

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Rac1 in den *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen durch E-Cadherin-basierte Zell-Zell-Adhäsion signifikant erhöht wird. Die Expression von mutiertem E-Cadherin in den MDA-MB-435S Zellen hingegen führte nicht zu einer signifikant erhöhten Rac1 Aktivität. Die Exon 8 Deletion beeinflusst die Aktivierung von Rac1 also negativ. Dies weist darauf hin, dass das *outside-in signalling* von E-Cadherin, d.h. der Signalfluss von adhäsiven Kontakten in die Zelle hinein, durch die Mutation betroffen ist. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturberichten überein, dass Rac1 in verschiedenen Zelltypen durch homophile E-Cadherin-Interaktion aktiviert wird (Fukuyama et al., 2006; Goodwin et al., 2003; Wang et al., 2006). Zudem zeigen mehrere Studien, dass Mutationen in E-Cadherin die Fähigkeit Rac1 zu aktivieren beeinträchtigen oder auch vollständig inhibieren. So inhibiert beispielsweise eine Mutation in der cytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin, die die Bindung von p120-Catenin verhindert, die E-Cadherin vermittelte Aktivierung von Rac1 (Goodwin et al., 2003). Des Weiteren verhindert eine Punktmutation (ED134AL) in der Calciumbindestelle von E-Cadherin und eine weitere Mutation, bei der die gesamte cytoplasmatische Domäne von E-Cadherin fehlt, ebenfalls die E-Cadherin-basierte Aktivierung von Rac1 (Wang et al., 2006). Zudem weisen Zellen mit den genannten Mutationen eine stark verminderte E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion (Goodwin et al., 2003; Wang et al., 2006) bzw. Zell-Matrix-Adhäsion (Wang et al., 2006) auf.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Rac1 Aktivität durch *wt* E-Cadherin, nicht aber durch mutiertes E-Cadherin, mit einer Deletion in Exon 8 erhöht wird. Dies stimmt mit in der Literatur berichteten Beobachtungen überein, dass die E-Cadherin-basierte Rac1 Aktivierung durch verschiedene Mutationen in E-Cadherin beeinflusst wird, welche die Fähigkeit des Adhäsionsmoleküls, Zell-Zell-Kontakte auszubilden, vermindern oder sogar ganz aufheben. Jedoch sind weder die molekularen Wirkungsmechanismen der Cadherin vermittelten Rac1 Signaltransduktion vollständig erforscht, noch ihr Beitrag zur Cadherin-Funktion genau geklärt. Eine anerkannte Hypothese ist, dass die Cadherin-aktivierte Rac1 Signalweiterleitung zur Stabilisierung der Adhäsionskontakte beiträgt (Yap and Kovacs, 2003). Zusätzlich werden durch die lokale Hochregulation der Membrandynamik zum einen neue Zell-Zell-Kontakte initialisiert und zum anderen

die bestehenden Kontakte expandiert (Nelson, 2008). Zudem wurde postuliert, dass die Rac1 Aktivierung die Endozytose von E-Cadherin inhibiert und so das Adhäsionsmolekül an der Zellmembran stabilisiert (Izumi et al., 2004). Dies würde eine Erklärung für die, verglichen mit dem Wildtyp Protein, reduzierte Lokalisation von mutiertem E-Cadherin an der Zelloberfläche liefern, die durch die verstärkte Internalisierung verursacht wird (Bremm et al., 2008).

Die intrazelluläre Lokalisation von Rac1 in *del 8* Zellen unterstützt die Beobachtung, dass die Mutation in E-Cadherin einen Effekt auf das *outside-in signalling* der kleinen Rho GTPase Rac1 besitzt. So ist Rac1 in *del 8* Zellen, die eine erniedrigte Zell-Zell-Adhäsion aufweisen, zwar an den residualen Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, konnte aber zusätzlich vermehrt im Cytoplasma detektiert werden (verglichen mit den *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen). Nur aktives GTP-gebundenes Rac1 ist an der Zellmembran lokalisiert, wo es mit seinen Effektormolekülen interagiert. Der durch mutiertes E-Cadherin bedingte niedrige Rac1 Aktivierungsstatus hat daher eine vermehrte Lokalisation von inaktivem Rac1 im Cytoplasma der Zelle zur Folge, da weniger aktives Rac1 an die Zellmembran transloziert wird.

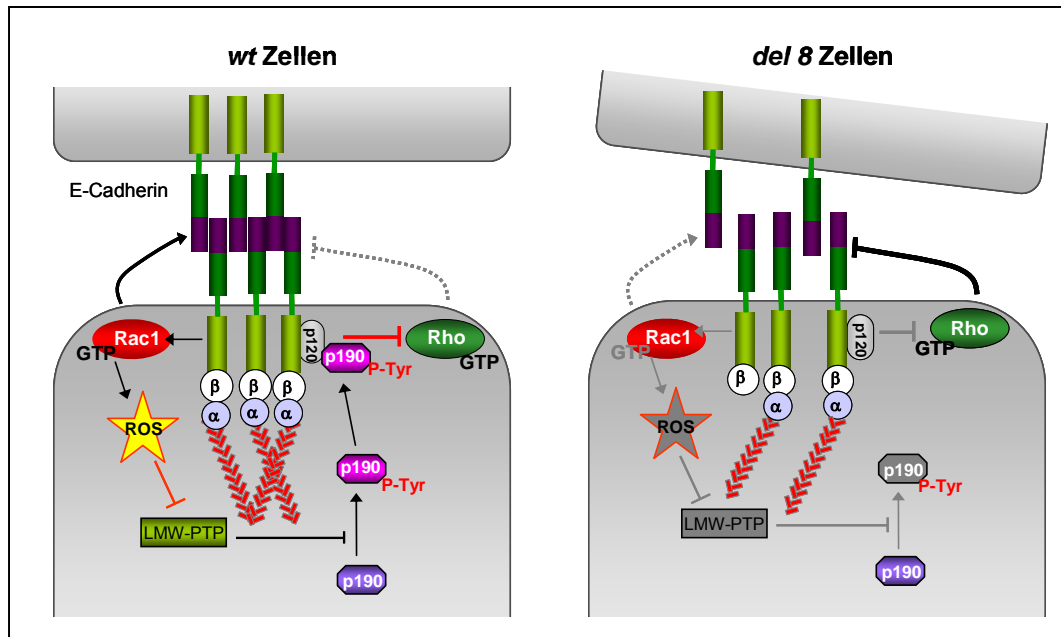
Desweiteren wurde der Effekt von E-Cadherin auf die Aktivität von Rho gemessen. Die Aktivität von Rho wurde durch *wt* E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion signifikant vermindert, verglichen mit Vektor-transfizierten Zellen. Diese Ergebnisse stimmen mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein, dass die Rho Aktivität in verschiedenen Zelltypen durch homophile E-Cadherin Interaktion vermindert wird (Lampugnani et al., 2002; Noren et al., 2001). Durch die Mutation in E-Cadherin wurde hingegen die Fähigkeit zur Aktivierung von Rho signifikant erhöht, verglichen mit dem *wt* Protein. Dies weist darauf hin, dass auch im Fall von Rho, die durch Zell-Zell-Adhäsion aktivierte intrazelluläre Signalweiterleitung von E-Cadherin, das *outside-in signalling*, durch die Mutation (direkt oder indirekt) betroffen ist. Die Exon 8 Deletion beeinflusst die Aktivierung von Rac1 negativ, wohingegen es die Aktivierung von Rho positiv beeinflusst. Damit ist gezeigt, dass in unserem Zellsystem Rac1 und Rho gegenläufig durch E-Cadherin reguliert werden. Die gegenläufige Regulierung von Rac1 und Rho durch E-Cadherin stimmt mit der Beobachtung von Noren *et al.* (2001) überein.

Der Antagonismus zwischen der Rac1 und Rho Aktivität über den „Bar-Sagi“ Signalweg (Abb. 5.1) wurde bereits in verschiedenen Zelltypen detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass das feinregulierte Gleichgewicht zwischen den antagonistischen Aktivitäten von Rac1 und Rho entscheidend für die Koordination zwischen der Zell-Motilität und der Zell-Adhäsion ist (Leeuwen et al., 1997; Nimmual et al., 2003; Sander et al., 1999; Zondag et al., 2000).

Die Rho Inaktivierung durch homophile E-Cadherin Interaktion wird durch eine negative Regulation der Rho Aktivität durch seinen Gegenspieler Rac1 ausgelöst. Der Crosstalk zwischen den beiden Rho GTPasen wird dabei über p120-Catenin und p190RhoGAP vermittelt (Wildenberg et al., 2006).

Durch Zell-Zell-Adhäsion aktiviertes Rac1 inhibiert Rho über den „Bar-Sagi“ Signalweg. Dabei versetzt p120-Catenin Rac1 in die Lage Rho zu inhibieren, indem es die kortikale Lokalisation von p190RhoGAP unterstützt. Nach der Aktivierung von Rac1 und nachfolgend der Aktivierung von ROS (*reactive oxygen species*) das wiederum die LMW-PTP (*low molecular-weight protein tyrosine phosphatase*) inhibiert, bindet phosphoryliertes p190RhoGAP über die Interaktion mit p120-Catenin an die Zell-Zell-Kontakte. An der Zellmembran ist p190RhoGAP in der Lage, mit seinem Substrat Rho-GTP zu interagieren. Dadurch wird das membranständige aktive Rho inaktiviert und somit die Rho Signalweiterleitung inhibiert.

Die Fähigkeit von mutiertem E-Cadherin Rac1 zu aktivieren ist inhibiert und als Folge davon auch der Rac1-abhängige Antagonismus von Rho. Zudem konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Lokalisation von mutiertem E-Cadherin an der Zelloberfläche (Bremm et al., 2008) zu einer verminderten Lokalisation von p120-Catenin an der Zellmembran führt. Da die kortikale Lokalisation von p120-Catenin aber Voraussetzung ist, um p190RhoGAP an den Zell-Adhäsions-Komplex und damit in die Nähe der Zellmembran zu translozieren, wo es mit seinem Substrat Rho GTP interagieren und dieses inaktivieren kann, kommt es im Fall von mutiertem E-Cadherin zu einer verminderten negativen Regulation von Rho durch Rac1 über diesen Wirkmechanismus (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1: p120-Catenin vermittelt die negative Regulation der Rho Aktivität durch die E-Cadherin aktiviertes Rac1**

Die homophile Interaktion von *wt* E-Cadherin bewirkt einen hohen Rac1 Aktivierungsstatus in *wt* Zellen. Dies hat eine verstärkte Aktivierung des „Bar-Sagi“ Signalwegs zur Folge, der über p120-Catenin und p190RhoGAP zur Inaktivierung von Rho und somit zur Inhibition der Rho Signalweiterleitung führt. Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimieren, haben die Fähigkeit verloren, Rac1 durch Zell-Zell-Adhäsion zu aktivieren. Als Folge davon kommt es nicht zu einer Aktivierung des „Bar-Sagi“ Signalwegs und somit auch nicht zur Inhibition der Rho Aktivität über diesen Rac1-Rho *Crosstalk*. Modifiziert nach Niessen und Yap, 2006.

Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass p120-Catenin erforderlich für die Stabilität von Cadherin an der Zellmembran ist (Davis et al., 2003; Ireton et al., 2002; Xiao et al., 2003). Die Koordination aus der Aktivierung von Rac1 und der Inhibition von Rho durch den Cadherin-Catenin-Komplex (über p120-Catenin und p190RhoGAP) wird benötigt, um die Kontraktilität der Zelle während der Bildung von Cadherin-Clustern und der Ausbildung des Adhäsionskomplexes zu vermindern (Wildenberg et al., 2006).

Allerdings scheint die antagonistische Wirkung der Rac1 Aktivität auf den Rho Aktivierungsstatus in der E-Cadherin vermittelten Zell-Adhäsion zelltypspezifisch zu sein. So finden Wang *et al.* (2006) zwar eine durch homophile Interaktion von mutiertem E-Cadherin bedingte verminderte Rac1 Aktivität, beobachten aber keinen Einfluss auf den Aktivierungsstatus von Rho. In der Literatur ist der Effekt der Rho Aktivität auf die Zell-Zell-Adhäsion nicht immer konsistent. In Fibroblasten wird die Bildung der Adhärenzkontakte durch eine starke Inhibition der Rho Aktivität

verhindert (Sander and Collard, 1999). Auf der anderen Seite zerstört ein zu hoher Rho Aktivierungsstatus die Adhärenzkomplexe und führt zur Zelltransformation (Jaffe and Hall, 2002).

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die somatische Mutation in E-Cadherin, bei der es sich um eine tumor-assoziierte genetische Alteration handelt, in der Lage ist, die Aktivität der kleinen Rho GTPasen Rac1 und Rho (direkt oder indirekt) zu regulieren und damit in das feinregulierte Gleichgewicht zwischen den antagonistischen Aktivitäten von Rac1 und Rho einzugreifen, was entscheidend für die Koordination von Adhäsion und Motilität der Zelle ist (Zondag et al., 2000).

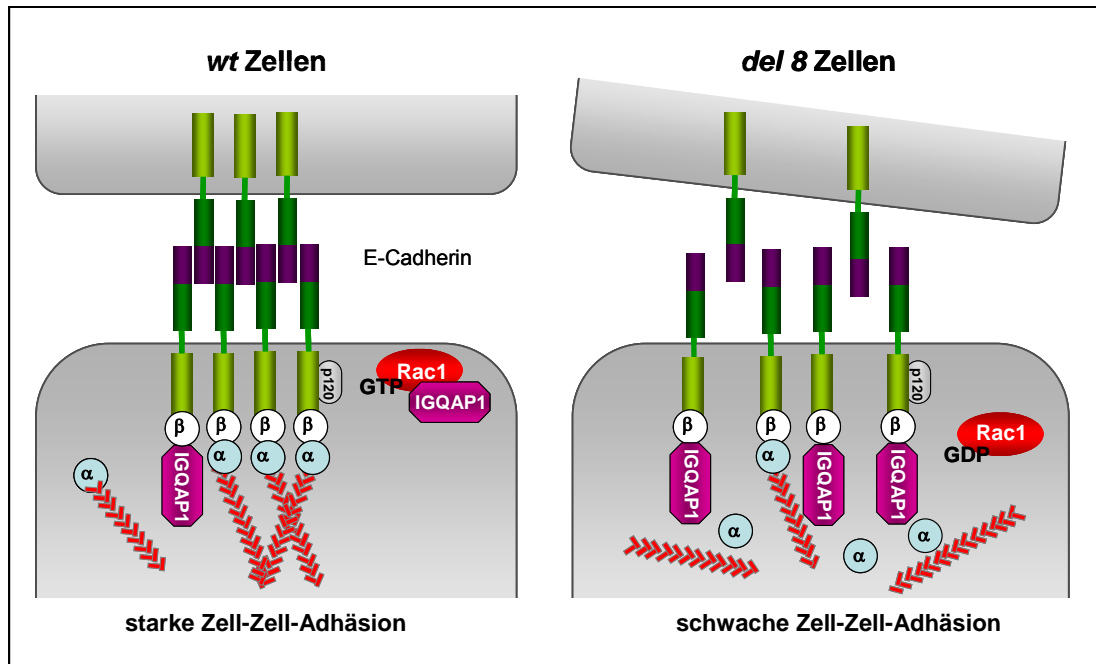
Nachfolgend wurde der Effekt von E-Cadherin auf die Aktivität der kleinen Rho GTPase Cdc42 gemessen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität von Cdc42 durch E-Cadherin-basierte Zell-Zell-Adhäsion festgestellt werden. Die kleine Rho GTPase Cdc42 ist damit in unserem Zellsystem auch nicht an der, durch die Mutation bedingten, verminderten Zell-Zell-Adhäsion und verstärkten Zell-Motilität beteiligt. In der Literatur ist der Effekt der Zell-Zell-Adhäsion auf die Aktivität von Cdc42, wie bei den anderen kleinen GTPasen auch, nicht immer konsistent. So konnte eine Stimulation der Cdc42 Aktivität durch Cadherin vermittelte Zell-Zell-Kontakte, in einigen (Kim et al., 2000), aber nicht in allen (Nakagawa et al., 2001) Studien gezeigt werden. Die widersprüchlichen Ergebnisse beruhen dabei wahrscheinlich auf der Verwendung unterschiedlicher Zelltypen und Versuchskonditionen (Yap and Kovacs, 2003). Laut den meisten Studien, ist die Rho und Rac1 Aktivität Voraussetzung für die stabile Lokalisation der Cadherine an den Zell-Zell-Kontakten, wohingegen die Unterdrückung der Cdc42 Aktivität eher selten zu Störungen in der Cadherin-Lokalisation oder in den Adhärenz-Kontakten führt (Yap and Kovacs, 2003). Allerdings belegen viele Beispiele in der Literatur, dass die Funktion der Rho GTPasen abhängig vom Zelltyp und dem Kontext der Zelle ist. Eine Erklärung hierfür ist die Existenz einer Vielzahl von GEFs für jede GTPase. Das fehlende Wissen darüber, wie spezifische GEFs die Aktivität der GTPasen vermitteln, erschwert das Verständnis des Mechanismus durch welche die spezifische Wirksamkeit der Rho Proteine bestimmt wird (Sinha and Yang, 2008).

Im Gegensatz zu der Aktivität der kleinen Rho GTPasen wurde kein signifikanter Effekt auf die **Expression** von Rac1, Rho und Cdc42 durch die Expression von Wildtyp oder mutiertem E-Cadherin ausgeübt. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus der Literatur überein. Wang *et. al.* (2006) konnten ebenfalls einen durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Effekt auf die Aktivität von Rac1 beobachten, hingegen aber keinen Effekt auf die Expression von Rac1 detektieren. Die durch Zell-Zell-Adhäsion aktivierte E-Cadherin vermittelte intrazelluläre Signalweiterleitung ist in der Lage, die Aktivität der kleinen Rho GTPasen zu modulieren; ein Einfluss auf die Expression ist hingegen nicht bekannt. Mutationen in E-Cadherin führen deshalb nicht notwendigerweise zu einer veränderten Expression von Rho, Rac1 und Cdc42.

## **5.2 Durch mutiertes E-Cadherin bedingte, reduzierte Rac1 Aktivierung beeinflusst die nachgeschaltete Signalweiterleitung von Rac1**

Die beobachtete erniedrigte Aktivität von Rac1 in MDA-MB-435S Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimieren, im Vergleich zu Zellen, die das Wildtyp-Protein exprimieren, resultierte in einer signifikanten Reduktion der Komplexbildung zwischen Rac1-GTP und dem Effektorprotein IQGAP1. Daraus lässt sich schließen, dass der verminderte Rac1 Aktivierungsstatus in Anwesenheit von mutiertem E-Cadherin die Rac1 Signalweiterleitung durch IQGAP1, das in unserem Zellsystem Rac1 nachgeschaltet ist, beeinflusst.

IQGAP1 reguliert die E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion in negativer Weise, indem es mit  $\beta$ -Catenin interagiert (Abb. 5.2). Aktives GTP-gebundenes Rac1 kann diese Interaktion verhindern und dadurch die E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte stabilisieren. Der verminderte Rac1 Aktivierungsstatus, der in den *del 8* Zellen beobachtet wurde, könnte die Bindung von IQGAP1 an  $\beta$ -Catenin erleichtern. Dadurch würde die Konzentration von  $\beta$ -Catenin an den Adhäsionskomplex vermindert, was wiederum zu einer weiteren Schwächung der Zell-Adhäsion führen würde.



**Abb. 5.2: Die Rolle von IQGAP1 bei der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion**

IQGAP1 reguliert die E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion negativ, indem es mit  $\beta$ -Catenin interagiert und  $\alpha$ -Catenin aus dem Zell-Adhäsions-Komplex verdrängt. In seiner GTP-gebundenen aktiven Form verhindert Rac1 bzw. Cdc42 die Bindung von IQGAP1 an  $\beta$ -Catenin und stabilisiert somit die Cadherin-vermittelte Zell-Adhäsion. Siehe Text. Modifiziert nach Fukata und Kaibuchi, 2001.

Allerdings wurden ebenfalls Unterschiede in der Expressionsstärke von IQGAP1 in *wt* Zellen, verglichen mit Vektor und *del 8* E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen, durch Westernblot-Analysen detektiert. Diese Unterschiede waren allerdings relativ gering (0,8 fach verglichen mit *wt*). Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass die Unterschiede in der Komplexbildung zwischen Rac1 und IQGAP1 nicht ausschließlich auf der unterschiedlichen Expression von IQGAP1 in den verschiedenen Zelllinien beruhen, sondern auch auf dem unterschiedlichen Rac1 Aktivierungsstatus dieser Zellen.

Die Ursache für die veränderte Expression in *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen ist unklar. Es ist bekannt, dass die kleinen Rho GTPasen Signalwege regulieren, die zu Veränderungen in der Genexpression führen (Jaffe and Hall, 2005). Über die Regulation der Expression von IQGAP1 liegen in der Literatur allerdings noch keine Ergebnisse vor.

Immunfluoreszenz-Analysen ergaben, dass IQGAP1 in motilen *del 8* Zellen zusätzlich in den Lamellipodien detektiert werden konnte, während es in den *wt* exprimierenden Zellen an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert war. Dies stimmt mit



früheren Berichten überein, dass sich IQGAP1 in migrierenden kolorektalen Tumorzellen vom Cytosol an die Zellmembran verlagert (Shimao et al., 2002). Es gibt Hinweise darauf, dass IQGAP1 in der vorgeschalteten Signalweiterleitung von Rac1 und damit als dessen Regulator agieren kann (Brown and Sacks, 2006). Es wurde postuliert, dass IQGAP1 die Zell-Motilität beeinflusst, indem es den Rac1 und Cdc42 Aktivierungsstatus am Leitsaum migrierender Zellen erhöht (Brown and Sacks, 2006). Obwohl Rac1 nicht durch die homophile Interaktion von E-Cadherin mit einer Deletion in Exon 8 aktiviert wird, wurde eine basale Rac1 Aktivität in diesen Zellen beobachtet. IQGAP1 könnte am Leitsaum der sich bewegenden Zelle für die Anreicherung von aktiven Rac1 zuständig sein, das eine wichtige Rolle in der Umstrukturierung des Actincytoskeletts spielt, welche für die Zellmigration notwendig ist.

### **5.3 Ein fein-reguliertes Zusammenspiel aus Rho und Rac1 Aktivität kontrolliert die Migration und Invasion der Tumorzellen**

Die Deletion von Exon 8 in E-Cadherin erhöht die migratorischen Fähigkeiten von Tumorzellen (Fuchs et al., 2002; Handschuh et al., 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch die Mutation in E-Cadherin bedingte erhöhte Zell-Motilität dabei mit einem niedrigen Aktivierungsstatus von Rac1 und einem erhöhten Aktivierungsstatus von Rho assoziiert ist.

Dass ein hoher Aktivierungsstatus von Rho die Motilität von Tumorzellen fördert, stimmt mit einer Reihe von Publikationen überein, die zeigen, dass die Inhibition der Rho Aktivität in verschiedenen Zelltypen die Motilität der Zelle hemmt (Banyard et al., 2000; Itoh et al., 1999; Stam et al., 1998). Über seinen Effektor ROCK stimuliert Rho die Actomyosin-Kontraktilität und den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion (Croft et al., 2004; Sahai and Marshall, 2002b). Der Verlust der Zell-Zell-Kontakte wiederum erlaubt es den Tumorzellen zu migrieren. Ein hoher Aktivierungsstatus von Rac1 dagegen, wie er in den *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen vorliegt, fördert in epithelialen Zellen wiederum E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion und wirkt dadurch der Zell-Motilität entgegen (Evers et al., 2000; Hordijk et al., 1997).

Um die Korrelation zwischen dem motilen Phänotyp und dem Aktivierungsstatus von Rac1 und Rho genauer zu untersuchen, wurde die Aktivität dieser kleinen GTPasen inhibiert. Die Motilitäts-Experimente zeigen, dass sowohl die Inhibition

von Rac1 als auch die Inhibition von Rho in *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen eine signifikante Reduktion der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten erhöhten Zell-Motilität verursachte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das durch mutiertes E-Cadherin veränderte Gleichgewicht der Rho GTPasen Rac1 und Rho eine entscheidende Rolle in der Regulation der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten erhöhten Motilität der Tumorzellen spielt.

Die Behandlung der *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen mit dem Rho Inhibitor C3T bewirkt eine signifikante Abnahme der Zell-Motilität. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Reihe von Publikationen überein die zeigen, dass die Inhibition der Rho Aktivität in verschiedenen Zelltypen die Motilität der Zelle hemmt (Price and Collard, 2001). Die signifikante Abnahme der Zell-Motilität in *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen nach Behandlung mit dem Rac1 Inhibitor zeigt jedoch, dass der motile Phänotyp der Zellen auch vom Rac1 Aktivitätsstatus der Zellen abhängig ist, und, dass Unterschiede im Rac1 Aktivierungsstatus das motile Verhalten der Zellen regulieren. So inhibiert ein sehr hoher aber auch ein sehr niedriger Aktivierungsstatus von Rac1 die Motilität der Zellen. Dies stimmt auch mit den Studien von Pankov *et al.* überein (Pankov et al., 2005). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Rac1 neben der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion auch an der Regulation der Zell-Matrix-Adhäsion beteiligt ist (Clark et al., 1998; Cox et al., 2001; del Pozo et al., 2000; Kim et al., 2000; Nakagawa et al., 2001). Eine sehr geringe Rac1 Aktivität in *del 8* Zellen bewirkt daher auch eine starke Reduktion der Zell-Matrix-Adhäsion. Migrierende Zellen benötigen aber ein Minimum an Anhaftung an das Substrat, um sich vorwärts ziehen zu können. Ist die Rac1 Aktivität und damit die Zell-Matrix-Adhäsion zu gering, könnte das die Migration der Zellen verhindern. Hierfür spricht auch die Wirkung des Rac1 Inhibitors TcdBF auf die Morphologie der Zellen. Der Inhibitor bewirkt die Reorganisation des Actincytoskeletts und führt, nach einer längeren Inkubationszeit, zur Abrundung der Zellen und schließlich zu deren Ablösung vom Substrat.

Im Gegensatz zu *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen führt die Inhibition der beiden kleinen Rho GTPasen in *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen nicht zu einem signifikanten Effekt auf die Zell-Motilität. Es konnte sogar eine leichte Erhöhung der Zell-Motilität nach Zugabe von TcdBF in *wt* Zellen beobachtet werden. Der unterschiedliche Effekt des Rac1 Inhibitors auf *wt* und mutiertes E-Cadherin exprimierenden Zellen, könnte auf die unterschiedliche Funktion zurückzuführen

sein, die aktives Rac1 in den beiden Zelllinien ausübt. Zellen die *wt* E-Cadherin exprimieren, weisen eine intakte Zell-Zell-Adhäsion auf und sind in der Lage, Rac1 durch homophile E-Cadherin Interaktion zu aktivieren. Wird Rac1 in diesen Zellen inhibiert, entfällt die Stabilisierung der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion, wodurch die Migration der Zellen erleichtert wird. Eine Erhöhung der Zell-Motilität nach Inhibition von Rac1 wurde bereits in verschiedenen Studien beobachtet (Dreissigacker et al., 2006; Hwang et al., 2006; Zuo et al., 2006).

Eine weitere Erklärung für die leicht erhöhte Zell-Motilität der mit Rac1 Inhibitor behandelten *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen ist, dass durch die Inhibition von Rac1 auch die negative Regulation von Rho durch Rac1 (über den „Bar-Sagi“ Signalweg) gehemmt wird. Dies könnte zu einer Verschiebung des Gleichgewichts der GTPasen zugunsten von aktivem Rho führen. Eine erhöhte Rho Aktivität stimuliert wiederum die Actomyosin-Kontraktilität und den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion was mit einer erhöhten Zell-Motilität assoziiert ist.

Nach Zugabe des Rho Inhibitors C3T zu den *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen, konnte hingegen eine schwache Abnahme der Zell-Motilität beobachtet werden. Dies unterstützt die Beobachtung, dass in dem angewandten Zellsystem eine erhöhte Rho Aktivität mit einem motilen Phänotyp einhergeht.

Generell ist der Effekt der Inhibitoren auf die Motilität der *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen schwach ausgeprägt. Möglicherweise wirken die Inhibitoren weniger auf die basale Zell-Motilität der *wt* Zellen ein, sondern nehmen vielmehr auf die durch mutiertes E-Cadherin vermittelte erhöhte Zell-Motilität Einfluss, die mit einem veränderten Gleichgewicht von Rac1 und Rho assoziiert ist.

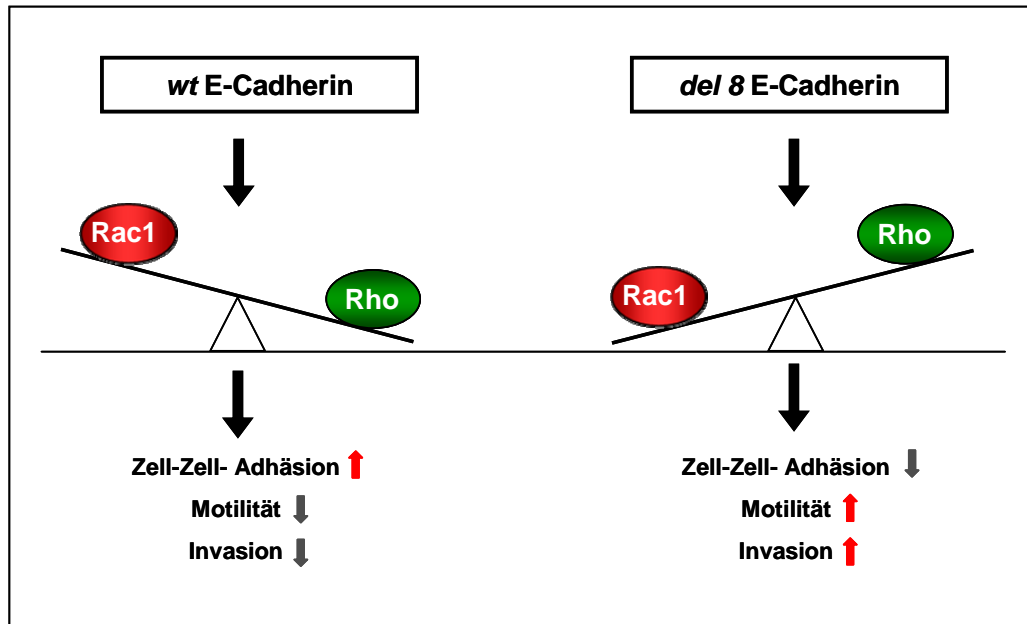
Ein feinreguliertes Gleichgewicht zwischen den antagonistischen Aktivitäten von Rac1 und Rho ist entscheidend für die Koordination zwischen der Zell-Adhäsion und der Zell-Motilität und beeinflusst den Phänotyp der Zellen (Zondag et al., 2000). Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass die durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Alterationen der Rac1 und Rho Aktivität in die Regulation der Tumordisseminierung involviert sind.

Nachfolgend wurden die Auswirkungen der durch mutiertes E-Cadherin veränderten Signalweiterleitung der Rho GTPasen Rac1 und Rho auf die Zell-Invasion untersucht. Mit Hilfe von Rac1 und Rho Inhibitoren wurde die Korrelation zwischen dem invasiven Phänotyp und der Aktivität dieser kleinen Rho GTPasen bestimmt.

Die Untersuchungen zeigten, dass analog zu der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten signifikant erhöhten Zell-Motilität, auch die Zell-Invasion signifikant erhöht war.

Neben der Zell-Motilität fördert ein hoher Aktivierungsstatus von Rho, wie er in *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen vorliegt, auch die Invasion der Tumorzellen. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von RhoA zu einer erhöhten Invasion von Tumorzellen führt (Yoshioka et al., 1999). Wie bereits beschrieben, stimuliert das Rho Effektorprotein ROCK die Actomyosin-Kontraktilität und den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion. Croft *et al.* konnten zeigen, dass dies die Invasion von Kolonkarzinomzellen *in vivo* induziert (Croft et al., 2004; Sahai and Marshall, 2002b). Desweiteren zeigen menschliche Tumoren häufig eine erhöhte Rho Expression und/oder Aktivität (Abraham et al., 2001; Gomez del Pulgar et al., 2005) und Rho wurde bereits mit nahezu allen Stadien der Tumorprogression in Zusammenhang gebracht (Vega and Ridley, 2008). Wie bereits für die Zell-Motilität geschildert, fördert ein hoher Aktivierungsstatus von Rac1 die E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion und hemmt dadurch neben der Migration auch die Invasion (Evers et al., 2000; Hordijk et al., 1997) der *wt* E-Cadherin exprimierenden Zellen. Ein niedriger Aktivierungsstatus von Rac1 hingegen, wie er bei *del 8* Zellen E-Cadherin exprimierenden Zellen vorliegt, ist mit einer erhöhten Migration der Zellen durch eine dreidimensionale Matrix assoziiert (Pankov et al., 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass sich der Aktivierungsstatus von Rac1 und Rho in *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen genau umgekehrt zu den *wt* Zellen verhält. Die Umkehrung des Gleichgewichts von Rac1 und Rho, in Anwesenheit von mutierten E-Cadherin, beeinflusst den invasiven und motilen Phänotyp der Tumorzellen (Abb. 5.3).



**Abb. 5.3: Das Gleichgewicht zwischen der Rac1 und Rho Aktivität beeinflusst den Phänotyp der Zelle**

Ein fein-reguliertes Zusammenspiel aus Rac1 und Rho Aktivität ist entscheidend für verschiedene zelluläre Prozesse wie der Zell-Zell-Adhäsion, der Zell-Migration und der Zell-Invasion. Modifiziert nach Malliri und Collard 2003.

Die Behandlung der *del 8* exprimierenden Zellen mit den beiden Inhibitoren führte zu einer Reduktion der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten erhöhten Zell-Invasion. Der Rac1 Inhibitor TcdBF verursachte dabei eine signifikante Reduktion der Invasivität, während bei der Behandlung mit dem Rho Inhibitor eine Tendenz zur reduzierten Invasivität beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigen, dass das durch mutiertes E-Cadherin veränderte Gleichgewicht der Aktivität der Rho GTPasen Rac1 und Rho, zu der erhöhten Invasion der Tumorzellen beitragen.

Andererseits legen die Ergebnisse aber auch nahe, dass die erhöhte Zell-Invasion nicht nur auf einem veränderten Gleichgewicht zwischen dem Aktivierungsstatus von Rac1 und Rho beruht. So besitzen die Vektor-transfizierten Zellen einen ähnlichen Aktivierungsstatus von Rac1 und Rho wie die *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen (hoher Rho Aktivierungsstatus und niedriger Rac1 Aktivierungsstatus), zeigen aber nur eine relativ geringe, nicht signifikant höhere Zell-Invasion verglichen mit *wt* Zellen. Im Vergleich zu den *del 8* exprimierenden Zellen wiederum weisen Vektor-transfizierten Zellen eine signifikant niedrigere Invasion auf. Dies deutet auf einen Funktionsgewinn (dominanter Effekt) der E-Cadherin-Mutation hin, der zur Erlangung eines invasiven Phänotyps führt.

Die Behandlung der *wt* exprimierenden Zellen und der Vektor-transfizierten Zellen mit den Inhibitoren, zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Zell-Invasion. Die Inhibitoren wirken, wie auch bei der Zell-Motilität beobachtet werden konnte, nicht auf die basale Invasion ein, sondern nur auf die, durch die Mutation in E-Cadherin, erhöhte Invasion (also auf den dominanten Effekt der Mutation).

Neben seiner Funktion als Zell-Adhäsionsmolekül besitzt E-Cadherin die Fähigkeit, als Rezeptormolekül ein komplexes Netz aus zahlreichen Signalwegen zu modulieren. Im Falle von mutiertem E-Cadherin liegen einige dieser Signalwege, wie die der kleinen Rho GTPasen Rac1 und Rho, dereguliert vor und tragen so zur Erlangung eines motilen und invasiven Phänotyps der Tumorzellen bei. Die Unterschiede im invasiven Verhalten zwischen *del 8* und Vektor-transfizierten Zellen zeigen, dass möglicherweise noch weitere Signalwege durch die Mutation in E-Cadherin dereguliert vorliegen, die erst gemeinsam mit den kleinen Rho GTPasen Rac1 und Rho zu einer erhöhten Invasion der Tumorzellen beitragen.

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Mutationen in E-Cadherin eine erhöhte Aktivität des EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptors zur Folge haben, die ebenfalls die Motilität und Invasion von Tumorzellen beeinflusst (Bremm et al., 2008; Mateus et al., 2007). Desweiteren sind Rho und Rac in der Lage, die Degradation und die Umstrukturierung der EZM modulieren, indem sie entweder die Expression der MMPs (*matrix metalloproteinases*), die die EZM abbauen, oder die Expression der Antagonisten der MMPs der TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) regulieren (Engers et al., 2001; Kheradmand et al., 1998; Matsumoto et al., 2001; Zhuge and Xu, 2001). Der durch die somatische Mutation in E-Cadherin bedingte veränderte Rac1 und Rho Aktivierungsstatus könnte zu einer verstärkten Sekretion von MMPs oder TIMPs und damit zu einer erhöhten Invasion der *del 8* Zellen führen. Eine erhöhte MMP3 Sekretion in *del 8* E-Cadherin exprimierenden Zellen konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden (Fuchs et al., 2005).

Als Regulatoren des Cytoskeletts spielen die kleinen Rho GTPasen eine wichtige Rolle in der Adhäsion, Migration und Invasion der Zelle. Die Erlangung motiler und invasiver Eigenschaften sind wiederum Schlüsselereignisse in der Tumorprogression (Hanahan and Weinberg, 2000). Durch die Modulation der Rho GTPasen Signaltransduktion hat E-Cadherin einen direkten Effekt auf diese Signalwege, die an

der Tumorentwicklung beteiligt sind. Mutationen im Tumorsuppressor E-Cadherin, die die Signaltransduktion der Rho GTPasen beeinflussen, können daher zum Erwerb eines motilen und invasiven Phänotyps von Tumorzellen beitragen.

Zusammengefasst konnte ein molekularer Zusammenhang zwischen der erniedrigten Zell-Adhäsion, der erhöhten Zell-Motilität sowie der erhöhten Zell-Invasion beim Vorliegen einer tumor-assoziierten E-Cadherin-Mutation definiert werden. Die Mutation in E-Cadherin verändert den zellulären Phänotyp und die kleinen Rho GTPasen Rac1 und Rho sind in die Vermittlung dieses Effekts involviert.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abe, K., and Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13-9.
- Abraham, M. T., Kuriakose, M. A., Sacks, P. G., Yee, H., Chiriboga, L., Bearer, E. L., and Delacure, M. D. (2001). Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope* **111**, 1285-9.
- Akhtar, N., Hudson, K. R., and Hotchin, N. A. (2000). Co-localization of Rac1 and E-cadherin in human epidermal keratinocytes. *Cell Adhes Commun* **7**, 465-76.
- Aronheim, A., Broder, Y. C., Cohen, A., Fritsch, A., Belisle, B., and Abo, A. (1998). Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol* **8**, 1125-8.
- Arthur, W. T., Noren, N. K., and BurrIDGE, K. (2002). Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol Res* **35**, 239-46.
- Aspenstrom, P., Fransson, A., and Saras, J. (2004). Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* **377**, 327-37.
- Aspenstrom, P., Ruusala, A., and Pacholsky, D. (2007). Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp Cell Res* **313**, 3673-9.
- Banyard, J., Anand-Apte, B., Symons, M., and Zetter, B. R. (2000). Motility and invasion are differentially modulated by Rho family GTPases. *Oncogene* **19**, 580-91.
- Bar-Sagi, D., and Hall, A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* **103**, 227-38.
- Baugher, P. J., Krishnamoorthy, L., Price, J. E., and Dharmawardhane, S. F. (2005). Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **7**, R965-74.
- Becker, K. F., Atkinson, M. J., Reich, U., Becker, I., Nekarda, H., Siewert, J. R., and Hofler, H. (1994). E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* **54**, 3845-52.
- Becker, K. F., Atkinson, M. J., Reich, U., Huang, H. H., Nekarda, H., Siewert, J. R., and Hofler, H. (1993). Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas. *Hum Mol Genet* **2**, 803-4.
- Behrens, J., and Birchmeier, W. (1994). Cell-cell adhesion in invasion and metastasis of carcinomas. *Cancer Treat Res* **71**, 251-66.
- Benard, V., Bohl, B. P., and Bokoch, G. M. (1999). Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J Biol Chem* **274**, 13198-204.
- Bernards, A., and Settleman, J. (2005). GAPs in growth factor signalling. *Growth Factors* **23**, 143-9.
- Berx, G., Becker, K. F., Hofler, H., and van Roy, F. (1998). Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* **12**, 226-37.
- Birchmeier, W. (1994). Molecular aspects of the loss of cell adhesion and gain of invasiveness in carcinomas. *Princess Takamatsu Symp* **24**, 214-32.



- Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* **1198**, 11-26.
- Bishop, A. L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-55.
- Boureau, A., Vignal, E., Faure, S., and Fort, P. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* **24**, 203-16.
- Bracke, M. E., Van Roy, F. M., and Mareel, M. M. (1996). The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* **213 ( Pt 1)**, 123-61.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Braga, V. (2000). Epithelial cell shape: cadherins and small GTPases. *Exp Cell Res* **261**, 83-90.
- Braga, V. M. (1999). Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell-cell adhesion. *Mol Pathol* **52**, 197-202.
- Braga, V. M., Machesky, L. M., Hall, A., and Hotchin, N. A. (1997). The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* **137**, 1421-31.
- Braga, V. M., and Yap, A. S. (2005). The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 466-74.
- Bremm, A., Walch, A., Fuchs, M., Mages, J., Duyster, J., Keller, G., Hermannstadter, C., Becker, K. F., Rauser, S., Langer, R., von Weyhern, C. H., Hofler, H., and Lubber, B. (2008). Enhanced activation of epidermal growth factor receptor caused by tumor-derived E-cadherin mutations. *Cancer Res* **68**, 707-14.
- Brown, M. D., and Sacks, D. B. (2006). IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol* **16**, 242-9.
- Bukholm, I. K., Nesland, J. M., Karesen, R., Jacobsen, U., and Borresen-Dale, A. L. (1998). E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. *J Pathol* **185**, 262-6.
- Carpenter, C. L., Tolia, K. F., Van Vugt, A., and Hartwig, J. (1999). Lipid kinases are novel effectors of the GTPase Rac1. *Adv Enzyme Regul* **39**, 299-312.
- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 118-32.
- Chan, A. O. (2006). E-cadherin in gastric cancer. *World J Gastroenterol* **12**, 199-203.
- Charrasse, S., Meriane, M., Comunale, F., Blangy, A., and Gauthier-Rouviere, C. (2002). N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J Cell Biol* **158**, 953-65.
- Clark, E. A., Golub, T. R., Lander, E. S., and Hynes, R. O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* **406**, 532-5.
- Clark, E. A., King, W. G., Brugge, J. S., Symons, M., and Hynes, R. O. (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol* **142**, 573-86.
- Cox, E. A., Sastry, S. K., and Huttenlocher, A. (2001). Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol Biol Cell* **12**, 265-77.

- Croft, D. R., Sahai, E., Mavria, G., Li, S., Tsai, J., Lee, W. M., Marshall, C. J., and Olson, M. F. (2004). Conditional ROCK activation in vivo induces tumor cell dissemination and angiogenesis. *Cancer Res* **64**, 8994-9001.
- Davis, M. A., Ireton, R. C., and Reynolds, A. B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* **163**, 525-34.
- del Pozo, M. A., Price, L. S., Alderson, N. B., Ren, X. D., and Schwartz, M. A. (2000). Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *Embo J* **19**, 2008-14.
- DesMarais, V., Ghosh, M., Eddy, R., and Condeelis, J. (2005). Cofilin takes the lead. *J Cell Sci* **118**, 19-26.
- Dreissigacker, U., Mueller, M. S., Unger, M., Siegert, P., Genze, F., Gierschik, P., and Giehl, K. (2006). Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. *Cell Signal* **18**, 1156-68.
- Dvorsky, R., and Ahmadian, M. R. (2004). Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO Rep* **5**, 1130-6.
- Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M., and Gill, G. N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* **1**, 253-9.
- Ehrlich, J. S., Hansen, M. D., and Nelson, W. J. (2002). Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell* **3**, 259-70.
- Ellison, G., Klinowska, T., Westwood, R. F., Docter, E., French, T., and Fox, J. C. (2002). Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol Pathol* **55**, 294-9.
- Engers, R., Springer, E., Michiels, F., Collard, J. G., and Gabbert, H. E. (2001). Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J Biol Chem* **276**, 41889-97.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* **106**, 489-98.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35.
- Evers, E. E., Zondag, G. C., Malliri, A., Price, L. S., ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (2000). Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer* **36**, 1269-74.
- Fricke, E., Hermannstadter, C., Keller, G., Fuchs, M., Brunner, I., Busch, R., Hofler, H., Becker, K. F., and Lubber, B. (2004). Effect of wild-type and mutant E-cadherin on cell proliferation and responsiveness to the chemotherapeutic agents cisplatin, etoposide, and 5-fluorouracil. *Oncology* **66**, 150-9.
- Fritz, G., Brachetti, C., Bahlmann, F., Schmidt, M., and Kaina, B. (2002). Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* **87**, 635-44.
- Frixen, U. H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D., and Birchmeier, W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* **113**, 173-85.
- Fuchs, M., Hermannstadter, C., Specht, K., Knyazev, P., Ullrich, A., Rosivatz, E., Busch, R., Hutzler, P., Hofler, H., and Lubber, B. (2005). Effect of tumor-

- associated mutant E-cadherin variants with defects in exons 8 or 9 on matrix metalloproteinase 3. *J Cell Physiol* **202**, 805-13.
- Fuchs, M., Hutzler, P., Brunner, I., Schlegel, J., Mages, J., Reuning, U., Hapke, S., Duyster, J., Hirohashi, S., Genda, T., Sakamoto, M., Uberall, F., Hofler, H., Becker, K. F., and Lubber, B. (2002). Motility enhancement by tumor-derived mutant E-cadherin is sensitive to treatment with epidermal growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Exp Cell Res* **276**, 129-41.
- Fuchs, M., Hutzler, P., Handschuh, G., Hermannstadter, C., Brunner, I., Hofler, H., and Lubber, B. (2004). Dynamics of cell adhesion and motility in living cells is altered by a single amino acid change in E-cadherin fused to enhanced green fluorescent protein. *Cell Motil Cytoskeleton* **59**, 50-61.
- Fujihara, H., Walker, L. A., Gong, M. C., Lemichez, E., Boquet, P., Somlyo, A. V., and Somlyo, A. P. (1997). Inhibition of RhoA translocation and calcium sensitization by in vivo ADP-ribosylation with the chimeric toxin DC3B. *Mol Biol Cell* **8**, 2437-47.
- Fukata, M., and Kaibuchi, K. (2001). Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 887-97.
- Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itoh, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Fujisawa, H., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (1999). Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem* **274**, 26044-50.
- Fukuyama, T., Ogita, H., Kawakatsu, T., Inagaki, M., and Takai, Y. (2006). Activation of Rac by cadherin through the c-Src-Rap1-phosphatidylinositol 3-kinase-Vav2 pathway. *Oncogene* **25**, 8-19.
- Gayther, S. A., Goringe, K. L., Ramus, S. J., Huntsman, D., Roviello, F., Grehan, N., Machado, J. C., Pinto, E., Seruca, R., Halling, K., MacLeod, P., Powell, S. M., Jackson, C. E., Ponder, B. A., and Caldas, C. (1998). Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* **58**, 4086-9.
- Genth, H., Gerhard, R., Maeda, A., Amano, M., Kaibuchi, K., Aktories, K., and Just, I. (2003). Entrapment of Rho ADP-ribosylated by Clostridium botulinum C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. *J Biol Chem* **278**, 28523-7.
- Gomez del Pulgar, T., Benitah, S. A., Valeron, P. F., Espina, C., and Lacal, J. C. (2005). Rho GTPase expression in tumorigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays* **27**, 602-13.
- Goodwin, M., Kovacs, E. M., Thoreson, M. A., Reynolds, A. B., and Yap, A. S. (2003). Minimal mutation of the cytoplasmic tail inhibits the ability of E-cadherin to activate Rac but not phosphatidylinositol 3-kinase: direct evidence of a role for cadherin-activated Rac signaling in adhesion and contact formation. *J Biol Chem* **278**, 20533-9.
- Gouw, L. G., Reading, N. S., Jenson, S. D., Lim, M. S., and Elenitoba-Johnson, K. S. (2005). Expression of the Rho-family GTPase gene RHOF in lymphocyte subsets and malignant lymphomas. *Br J Haematol* **129**, 531-3.
- Govek, E. E., Newey, S. E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* **19**, 1-49.
- Grunwald, G. B. (1993). The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 797-805.

- Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., Taite, H., Scoular, R., Miller, A., and Reeve, A. E. (1998). E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* **392**, 402-5.
- Gumbiner, B. M. (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* **148**, 399-404.
- Guo, W., and Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 816-26.
- Habets, G. G., Scholtes, E. H., Zuydgeest, D., van der Kammen, R. A., Stam, J. C., Berns, A., and Collard, J. G. (1994). Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell* **77**, 537-49.
- Hakoshima, T., Shimizu, T., and Maesaki, R. (2003). Structural basis of the Rho GTPase signaling. *J Biochem* **134**, 327-31.
- Hall, A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**, 635-40.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Handschuh, G., Candidus, S., Lubber, B., Reich, U., Schott, C., Oswald, S., Becke, H., Hutzler, P., Birchmeier, W., Hofler, H., and Becker, K. F. (1999). Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* **18**, 4301-12.
- Handschuh, G., Lubber, B., Hutzler, P., Hofler, H., and Becker, K. F. (2001). Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences. *J Mol Biol* **314**, 445-54.
- Hansen, M. D., and Nelson, W. J. (2001). Serum-activated assembly and membrane translocation of an endogenous Rac1:effector complex. *Curr Biol* **11**, 356-60.
- Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690-701.
- Hirohashi, S. (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* **153**, 333-9.
- Hordijk, P. L., ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Oomen, L. C., and Collard, J. G. (1997). Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* **278**, 1464-6.
- Huang, M., and Prendergast, G. C. (2006). RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol* **21**, 213-8.
- Hwang, S. Y., Jung, J. W., Jeong, J. S., Kim, Y. J., Oh, E. S., Kim, T. H., Kim, J. Y., Cho, K. H., and Han, I. O. (2006). Dominant-negative Rac increases both inherent and ionizing radiation-induced cell migration in C6 rat glioma cells. *Int J Cancer* **118**, 2056-63.
- Ireton, R. C., Davis, M. A., van Hengel, J., Mariner, D. J., Barnes, K., Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Matrisian, L., Bundy, L. M., Sealy, L., Gilbert, B., van Roy, F., and Reynolds, A. B. (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* **159**, 465-76.
- Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T., and Narumiya, S. (2001). Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDial1. *Nat Cell Biol* **3**, 8-14.
- Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1999). An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* **5**, 221-5.

- Izumi, G., Sakisaka, T., Baba, T., Tanaka, S., Morimoto, K., and Takai, Y. (2004). Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. *J Cell Biol* **166**, 237-48.
- Jacinto, A., Wood, W., Balayo, T., Turmaine, M., Martinez-Arias, A., and Martin, P. (2000). Dynamic actin-based epithelial adhesion and cell matching during *Drosophila* dorsal closure. *Curr Biol* **10**, 1420-6.
- Jaffe, A. B., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res* **84**, 57-80.
- Jaffe, A. B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-69.
- Jordan, P., Brazao, R., Boavida, M. G., Gespach, C., and Chastre, E. (1999). Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* **18**, 6835-9.
- Kaneko, K., Satoh, K., Masamune, A., Satoh, A., and Shimosegawa, T. (2002). Myosin light chain kinase inhibitors can block invasion and adhesion of human pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* **24**, 34-41.
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M., and Kaibuchi, K. (1999). Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* **147**, 1023-38.
- Keller, G., Vogelsang, H., Becker, I., Hutter, J., Ott, K., Candidus, S., Grundei, T., Becker, K. F., Mueller, J., Siewert, J. R., and Hofler, H. (1999). Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol* **155**, 337-42.
- Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M., and Werb, Z. (1998). Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* **280**, 898-902.
- Kim, S. H., Li, Z., and Sacks, D. B. (2000). E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J Biol Chem* **275**, 36999-7005.
- Kjoller, L., and Hall, A. (1999). Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* **253**, 166-79.
- Kleer, C. G., van Golen, K. L., Zhang, Y., Wu, Z. F., Rubin, M. A., and Merajver, S. D. (2002). Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. *Am J Pathol* **160**, 579-84.
- Kondo, T., Sentani, K., Oue, N., Yoshida, K., Nakayama, H., and Yasui, W. (2004). Expression of RHOC is associated with metastasis of gastric carcinomas. *Pathobiology* **71**, 19-25.
- Kovacs, E. M., Ali, R. G., McCormack, A. J., and Yap, A. S. (2002). E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *J Biol Chem* **277**, 6708-18.
- Kraemer, A., Goodwin, M., Verma, S., Yap, A. S., and Ali, R. G. (2007). Rac is a dominant regulator of cadherin-directed actin assembly that is activated by adhesive ligation independently of Tiam1. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1061-9.
- Kremer, M., Quintanilla-Martinez, L., Fuchs, M., Gamboa-Dominguez, A., Haye, S., Kalthoff, H., Rosivatz, E., Hermannstadter, C., Busch, R., Hofler, H., and Lubber, B. (2003). Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on tumorigenicity and metastasis. *Carcinogenesis* **24**, 1879-86.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lampugnani, M. G., Zanetti, A., Breviario, F., Balconi, G., Orsenigo, F., Corada, M., Spagnuolo, R., Betson, M., Braga, V., and Dejana, E. (2002). VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Mol Biol Cell* **13**, 1175-89.
- Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-69.
- Leckband, D., and Prakasam, A. (2006). Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annu Rev Biomed Eng* **8**, 259-87.
- Leeuwen, F. N., Kain, H. E., Kammen, R. A., Michiels, F., Kranenburg, O. W., and Collard, J. G. (1997). The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol* **139**, 797-807.
- Lerm, M., Schmidt, G., and Aktories, K. (2000). Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiol Lett* **188**, 1-6.
- Li, X., and Lim, B. (2003). RhoGTPases and their role in cancer. *Oncol Res* **13**, 323-31.
- Lozano, E., Betson, M., and Braga, V. M. (2003). Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays* **25**, 452-63.
- Luber, B., Candidus, S., Handschuh, G., Mentele, E., Hutzler, P., Feller, S., Voss, J., Hofler, H., and Becker, K. F. (2000). Tumor-derived mutated E-cadherin influences beta-catenin localization and increases susceptibility to actin cytoskeletal changes induced by pervanadate. *Cell Adhes Commun* **7**, 391-408.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895-8.
- Malliri, A., and Collard, J. G. (2003). Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 583-9.
- Mareel, M., and Leroy, A. (2003). Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* **83**, 337-76.
- Mateus, A. R., Seruca, R., Machado, J. C., Keller, G., Oliveira, M. J., Suriano, G., and Luber, B. (2007). EGFR regulates RhoA-GTP dependent cell motility in E-cadherin mutant cells. *Hum Mol Genet* **16**, 1639-47.
- Matsumoto, Y., Tanaka, K., Harimaya, K., Nakatani, F., Matsuda, S., and Iwamoto, Y. (2001). Small GTP-binding protein, Rho, both increased and decreased cellular motility, activation of matrix metalloproteinase 2 and invasion of human osteosarcoma cells. *Jpn J Cancer Res* **92**, 429-38.
- Mayer, B., Johnson, J. P., Leitzl, F., Jauch, K. W., Heiss, M. M., Schildberg, F. W., Birchmeier, W., and Funke, I. (1993). E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res* **53**, 1690-5.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., and Philips, M. R. (2001). Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* **152**, 111-26.
- Michiels, F., Habets, G. G., Stam, J. C., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1995). A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* **375**, 338-40.

- Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., and Kim, S. H. (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**, 939-45.
- Murphy, G. A., Solski, P. A., Jillian, S. A., Perez de la Ossa, P., D'Eustachio, P., Der, C. J., and Rush, M. G. (1999). Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth. *Oncogene* **18**, 3831-45.
- Muta, H., Noguchi, M., Kanai, Y., Ochiai, A., Nawata, H., and Hirohashi, S. (1996). E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Jpn J Cancer Res* **87**, 843-8.
- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N., and Kaibuchi, K. (2001). Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci* **114**, 1829-38.
- Nakajima, Y., Okamoto, M., Nishimura, H., Obata, K., Kitano, H., Sugita, M., and Matsuyama, T. (2001). Neuronal expression of mint1 and mint2, novel multimodular proteins, in adult murine brain. *Brain Res Mol Brain Res* **92**, 27-42.
- Nelson, W. J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans* **36**, 149-55.
- Niessen, C. M., and Yap, A. S. (2006). Another job for the talented p120-catenin. *Cell* **127**, 875-7.
- Nimnual, A. S., Taylor, L. J., and Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol* **5**, 236-41.
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995a). Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* **23**, 456-9.
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995b). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- Noren, N. K., Arthur, W. T., and Burridge, K. (2003). Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J Biol Chem* **278**, 13615-8.
- Noren, N. K., Niessen, C. M., Gumbiner, B. M., and Burridge, K. (2001). Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J Biol Chem* **276**, 33305-8.
- Noritake, J., Watanabe, T., Sato, K., Wang, S., and Kaibuchi, K. (2005). IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci* **118**, 2085-92.
- Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, T., Takatsuka, Y., Matsuyoshi, N., Hirano, S., Takeichi, M., and et al. (1993). Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* **53**, 1696-701.
- Olson, M. F. (2003). Dispatch. GTPase signalling: new functions for Diaphanous-related formins. *Curr Biol* **13**, R360-2.
- Olson, M. F., and Sahai, E. (2008). The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis*.
- Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S., and Weinberg, R. A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* **68**, 3645-54.
- Panani, A. D. (2008). Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: Clinical implications. *Cancer Lett*.

- Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K., and Yamada, K. M. (2005). A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol* **170**, 793-802.
- Parkin, D. M. (2001). Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* **2**, 533-43.
- Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-65.
- Price, L. S., and Collard, J. G. (2001). Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion. *Semin Cancer Biol* **11**, 167-73.
- Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**, 23-32.
- Richards, F. M., McKee, S. A., Rajpar, M. H., Cole, T. R., Evans, D. G., Jankowski, J. A., McKeown, C., Sanders, D. S., and Maher, E. R. (1999). Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genet* **8**, 607-10.
- Ridley, A. J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* **114**, 2713-22.
- Ridley, A. J. (2004). Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat* **84**, 13-9.
- Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* **16**, 522-9.
- Ridley, A. J., and Hall, A. (1992a). Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**, 661-71.
- Ridley, A. J., and Hall, A. (1992b). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-99.
- Riento, K., and Ridley, A. J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 446-56.
- Ross, D. T., Scherf, U., Eisen, M. B., Perou, C. M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S. S., Van de Rijn, M., Waltham, M., Pergamenschikov, A., Lee, J. C., Lashkari, D., Shalon, D., Myers, T. G., Weinstein, J. N., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* **24**, 227-35.
- Sahai, E., and Marshall, C. J. (2002a). RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 133-42.
- Sahai, E., and Marshall, C. J. (2002b). ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol* **4**, 408-15.
- Sahai, E., Olson, M. F., and Marshall, C. J. (2001). Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *Embo J* **20**, 755-66.
- Sander, E. E., and Collard, J. G. (1999). Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* **35**, 1302-8.
- Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* **147**, 1009-22.
- Schipper, J. H., Frixen, U. H., Behrens, J., Unger, A., Jahnke, K., and Birchmeier, W. (1991). E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* **51**, 6328-37.



- Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M., and Lengyel, E. (2000). Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* **19**, 3013-20.
- Schwartz, M. (2004). Rho signalling at a glance. *J Cell Sci* **117**, 5457-8.
- Sehr, P., Joseph, G., Genth, H., Just, I., Pick, E., and Aktories, K. (1998). Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* **37**, 5296-304.
- Shimao, Y., Nabeshima, K., Inoue, T., and Koono, M. (2002). Complex formation of IQGAP1 with E-cadherin/catenin during cohort migration of carcinoma cells. Its possible association with localized release from cell-cell adhesion. *Virchows Arch* **441**, 124-32.
- Shimoyama, Y., and Hirohashi, S. (1991). Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* **51**, 2185-92.
- Shino, Y., Watanabe, A., Yamada, Y., Tanase, M., Yamada, T., Matsuda, M., Yamashita, J., Tatsumi, M., Miwa, T., and Nakano, H. (1995). Clinicopathologic evaluation of immunohistochemical E-cadherin expression in human gastric carcinomas. *Cancer* **76**, 2193-201.
- Sinha, S., and Yang, W. (2008). Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. *Cell Signal*.
- Small, J. V., Stradal, T., Vignal, E., and Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* **12**, 112-20.
- Sorokina, E. M., and Chernoff, J. (2005). Rho-GTPases: new members, new pathways. *J Cell Biochem* **94**, 225-31.
- Stam, J. C., Michiels, F., van der Kammen, R. A., Moolenaar, W. H., and Collard, J. G. (1998). Invasion of T-lymphoma cells: cooperation between Rho family GTPases and lysophospholipid receptor signaling. *Embo J* **17**, 4066-74.
- Suwa, H., Ohshio, G., Imamura, T., Watanabe, G., Arii, S., Imamura, M., Narumiya, S., Hiai, H., and Fukumoto, M. (1998). Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer* **77**, 147-52.
- Tahara, E. (2004). Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ*, 327-49.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., and Takai, Y. (1997). Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* **139**, 1047-59.
- Takeichi, M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* **59**, 237-52.
- Takeichi, M. (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 806-11.
- Tamura, G., Sakata, K., Nishizuka, S., Maesawa, C., Suzuki, Y., Iwaya, T., Terashima, M., Saito, K., and Satodate, R. (1996). Inactivation of the E-cadherin gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* **87**, 1153-9.
- Umbas, R., Isaacs, W. B., Bringuier, P. P., Schaafsma, H. E., Karthaus, H. F., Oosterhof, G. O., Debryne, F. M., and Schalken, J. A. (1994). Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* **54**, 3929-33.
- Valencia, A., Kjeldgaard, M., Pai, E. F., and Sander, C. (1991). GTPase domains of ras p21 oncogene protein and elongation factor Tu: analysis of three-

- dimensional structures, sequence families, and functional sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5443-7.
- Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**, 2295-322.
- Van Aken, E., De Wever, O., Correia da Rocha, A. S., and Mareel, M. (2001). Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* **439**, 725-51.
- van Golen, K. L., Wu, Z. F., Qiao, X. T., Bao, L. W., and Merajver, S. D. (2000). RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* **60**, 5832-8.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., and Fuchs, E. (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**, 209-19.
- Vega, F. M., and Ridley, A. J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* **582**, 2093-2101.
- Vetter, I. R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-304.
- Villalonga, P., and Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* **24**, 159-64.
- Vivanco, I., and Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489-501.
- Vleminckx, K., Vakaet, L., Jr., Mareel, M., Fiers, W., and van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* **66**, 107-19.
- Vogelsgesang, M., Pautsch, A., and Aktories, K. (2007). C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **374**, 347-60.
- Wang, Y., Ohkubo, T., Tsubouchi, H., and Ozawa, M. (2006). Enhanced cell-substratum adhesion of E-cadherin-expressing cells is mediated by activation of the small GTPase protein, Rac1. *Int J Mol Med* **17**, 637-42.
- Wasserman, S. (1998). FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol* **8**, 111-5.
- Watabe, M., Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1994). Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J Cell Biol* **127**, 247-56.
- Weis, W. I., and Nelson, W. J. (2006). Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem* **281**, 35593-7.
- Wennerberg, K., and Der, C. J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**, 1301-12.
- Wildenberg, G. A., Dohn, M. R., Carnahan, R. H., Davis, M. A., Lobdell, N. A., Settleman, J., and Reynolds, A. B. (2006). p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* **127**, 1027-39.
- Xiao, K., Allison, D. F., Buckley, K. M., Kottke, M. D., Vincent, P. A., Faundez, V., and Kowalczyk, A. P. (2003). Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* **163**, 535-45.

- Yamada, S., and Nelson, W. J. (2007). Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell cell adhesion. *J Cell Biol* **178**, 517-27.
- Yap, A. S., and Kovacs, E. M. (2003). Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol* **160**, 11-6.
- Yoshioka, K., Nakamori, S., and Itoh, K. (1999). Overexpression of small GTP-binding protein RhoA promotes invasion of tumor cells. *Cancer Res* **59**, 2004-10.
- Zhuge, Y., and Xu, J. (2001). Rac1 mediates type I collagen-dependent MMP-2 activation. role in cell invasion across collagen barrier. *J Biol Chem* **276**, 16248-56.
- Zondag, G. C., Evers, E. E., ten Klooster, J. P., Janssen, L., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (2000). Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* **149**, 775-82.
- Zschesche, W., Schonborn, I., Behrens, J., Herrenknecht, K., Hartveit, F., Lilleng, P., and Birchmeier, W. (1997). Expression of E-cadherin and catenins in invasive mammary carcinomas. *Anticancer Res* **17**, 561-7.
- Zuo, Y., Shields, S. K., and Chakraborty, C. (2006). Enhanced intrinsic migration of aggressive breast cancer cells by inhibition of Rac1 GTPase. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 361-7.